

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

Inaugural-Dissertation

**Wachstumsarrest und Seneszenzinduktion in humanen
Tumorzelllinien durch Kombinationsbehandlung mit
Histondeacetylaseinhibitoren und Interferon- γ**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Rosen, Michael

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 15.08.2023

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Konzept der zellulären Seneszenz	8
1.2 Epigenetische Modulation durch Histondeacetylasen und Histonacetyltransferasen	9
1.3 Histondeacetylaseinhibitoren	13
1.4 Auswahl der Zelllinien	16
1.5 Extrinsische Seneszenzinduktion durch Tumornekrosefaktor-α und Interferon-γ	18
1.6 Epigenetische Modifikationen an Lysinseitenketten	19
1.7 Kriterien der zellulären Seneszenz	21
1.7.1 Wachstumsarrest als Seneszenzkriterium	21
1.7.2 Zellmorphologie des seneszenten Phänotyps	22
1.7.3 Seneszenzassoziierte beta-Galaktosidase-Aktivität	23
1.7.4 Translokation von phosphoHP1γ in seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci	23
1.8 Fragestellung	24
2. Materialien und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Technische Hilfsmittel	25
2.1.2 Verbrauchsgüter	26
2.1.3 Wirkstoffe und Reagenzien	26
2.1.4 Puffer und Lösungen	27
2.1.5 Kits	28
2.1.6 Antikörper	28
2.1.7 Zellkulturmedium und sterile Lösungen	28
2.1.8 Zelllinien	29
2.1.9 Software	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Auftauen der gefrorenen Zellen	29
2.2.2 Einfrieren von Zellproben	30
2.2.3 Lösen der adhärenen Zellen	30
2.2.4 Kultivieren der Zellen	30
2.2.5 Auszählen der Zellen	31
2.2.6 Behandlung der Zellen mit biologisch aktiven Substanzen	31
2.2.7 XTT-Assay	31

2.2.8	Wachstums-Assay	32
2.2.9	Mikroskopische Untersuchung der Morphologie	33
2.2.10	Beta-Galaktosidase-Assay	34
2.2.11	Immunfluoreszenzmikroskopie	35
2.2.12	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	36
2.2.13	Statistische Auswertung der Ergebnisse	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	Zellviabilität unter der Behandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren	39
3.2	Expression der Histondeacetylasen in unbehandelten Zellen	47
3.3	Immunfluoreszenz von H3K9ac	49
3.4	Histondeacetylaseinhibitor-induzierter Wachstumsarrest	53
3.5	Anhaltender Wachstumsarrest	58
3.6	Morphologische Veränderungen nach Histondeacetylaseinhibitor-Behandlung	61
3.7	Seneszenzassoziierte-beta-Galaktosidase-Assay	64
3.8	Analyse der seneszenzassoziierten Heterochromatinfoci nach Histondeacetylaseinhibitor-Behandlung	67
3.9	Wachstumsarrest in der Kombinationsbehandlung mit Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren	71
3.10	Seneszenzassoziierte-beta-Galaktosidase-Aktivität nach Kombinationsbehandlung mit Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren	79
3.11	Seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci in der Kombinationsbehandlung aus Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren	82
4.	Diskussion	85
4.1	Seneszenzinduktion durch Histondeacetylaseinhibitoren	85
4.2	Expressionsprofil der Histondeacetylasen in den Zelllinien	88
4.3	Wirkung der Histondeacetylaseinhibitoren auf Histonseitenketten und die Bedeutung für die Seneszenzinduktion	92
4.4	Seneszenzinduktion in der Kombinationsbehandlung aus Histondeacetylaseinhibitoren und Interferon- γ	94
4.5	Trippelbehandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren, Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α	97
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literaturverzeichnis	103
7.	Erklärung zum Eigenanteil	111
8.	Danksagung	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalwege in der Seneszenzinduktion.....	8
Abbildung 2: Wirkungsweise der HDACs und HATs auf das Chromatin	11
Abbildung 3: Strukturformeln der verwendeten HDACI.....	15
Abbildung 4: Schema des XTT-Assays zur Bestimmung des unteren Grenzbereichs	41
Abbildung 5: Schema des XTT-Assays zur Bestimmung des oberen Grenzbereichs	42
Abbildung 6: XTT-Assay der A204-Zellen nach Behandlung mit TSA über 96 h.....	43
Abbildung 7: XTT-Assay der A204-Zellen nach Behandlung mit SAHA über 96 h	44
Abbildung 8: XTT-Assay der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit TSA über 96 h	45
Abbildung 9: XTT-Assay der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit SAHA über 96 h.....	46
Abbildung 10: Western-Blot der HDAC-Subtypen in unbehandelten A204- und MCF-7-Zellen	47
Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit TSA (a) in A204-Zellen und (b) MCF-7-Zellen	50
Abbildung 12: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit SAHA in A204- und MCF-7-Zellen	51
Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit den Zytokinen IFN γ und TNF α in A204- und MCF-7-Zellen.....	52
Abbildung 14: Wachstumskurven der A204-Zellen nach Behandlung mit HDACI oder Zytokinen.....	55
Abbildung 15: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit HDACI oder Zytokinen.....	56
Abbildung 16: Wachstumskurven der A204-Zellen über vier Passagen.....	59
Abbildung 17: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen über vier Passagen	60
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen der A204-Zellen.....	62
Abbildung 19: SA-beta-Galaktosidase-Färbung mittels X-Gal der mit HDACI behandelten MCF-7-Zellen und A204-Zellen	65
Abbildung 20: Auswertung des Anteils SA-beta-Gal-positiver Zellen	66
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von pHp1 γ und Darstellung von SAHFs.....	68
Abbildung 22: Auswertung der pHp1 γ -positiven Zellen in HDACI- und Zytokin-behandelten MCF-7-Zellen und A204-Zellen	69
Abbildung 23: Wachstumskurven der A204-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI	72
Abbildung 24: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI	73
Abbildung 25: Wachstumskurven der A204-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI über vier Passagen	75
Abbildung 26: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI über vier Passagen.....	77
Abbildung 27: SA-beta-Galaktosidase-Aktivität von A204- und MCF-7-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI	80
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von pHp1 γ zur Analyse von SAHFs in A204- und MCF-7-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klasse und Typen verschiedener HDACs	10
---	----

Abkürzungsverzeichnis

BGP	Glycerin-2-phosphat-Dinatriumsalz-Hydrat
BSA	bovines Serumalbumin
CBX	Chromobox-Homolog, Synonym für Hp1
CBX3	Chromobox-Homolog 3, Synonym für Hp1 γ
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTCL	kutanes T-Zell-Lymphom
c-Myc	humanes zelluläres Myelocytomatose-Onkogen
DAKO	Protein-Block-Lösung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-Aminoethyl-Glykoether-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
E2F	Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACI	Histondeacetylaseinhibitor
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
Hp1	Heterochromatinprotein1
Hp1 $\alpha/\beta/\gamma$	3 Isoformen des humanen Heterochromatinprotein 1
HRP	Meerrettichperoxidase
H3	Histonprotein 3
H3K9	Lysin 9 in Histonprotein 3
H3K9ac	Acetylierung an H3K9
H3K9me1	einfache Methylierung an H3K9
H3K9me2	doppelte Methylierung an H3K9
H3K9me3	dreifache Methylierung an H3K9
H3K14	Lysin 14 in Histonprotein 3
H3K14ac	Acetylierung an H3K14
IFN γ	Interferon gamma (Typ II Interferon)
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NADH/NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD1	programmed cell death Protein 1
pHp1 γ	phosphoryliertes Heterochromatinprotein 1 γ
PIM1	Serin / Threonin-Protein-Kinase PIM-1
p16(INK4A)	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a
p21(waf)	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1
p53	p53-Protein
Rb	Retinoblastom-Protein
SAHA	Vorinostat

SAHF	seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SA-beta-Gal(aktosidase)	seneszenzassoziierte β -Galaktosidase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMARCB1	SWI / SNF-verwandter Matrix-assoziiertes Aktin-abhängiger Regulator von Mitglied 1 der Chromatin-Unterfamilie B
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SUMO	Small Ubiquitin-related modifier
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TSA	Trichostatin A
Tween	Polysorbat
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Konzept der zellulären Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz stellt einen natürlichen Mechanismus im Lebenszyklus von Zellen dar. Sie beschreibt einen permanenten Zellwachstumsarrest, der als Schutzmechanismus vor einer Zellfehlfunktion eingeleitet wird. Dies tritt im Wesentlichen unter zwei Hauptbedingungen ein:

- zum einem nach einer von der Verkürzung der Telomere abhängigen Anzahl physiologischer Teilungspassagen, der sogenannten Zellalterung,
- zum anderen telomerunabhängig bei oxidativem Stress oder DNA-Schäden, als Schutz vor der Entartung.

Zwei Hauptsignalwege die bei DNA-Schäden aktiviert werden sind p16/Rb und p21/p53, die sowohl Seneszenz als auch Apoptose einleiten können (Sikora et al., 2016) (Abb. 1).

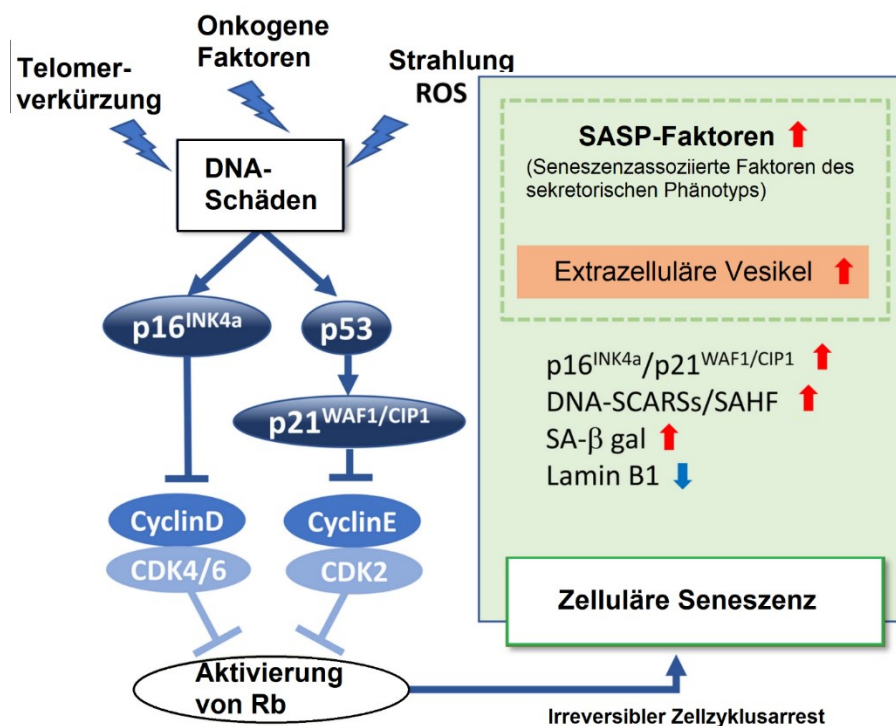


Abbildung 1: Signalwege in der Seneszenzinduktion

Die Abbildung zeigt die Signalwege der Seneszenzinduktion über DNA-Schäden (links) und die Ausprägung der zellulären Seneszenz (rechts). Hochregulation (roter Pfeil), Herunterregulation (blauer Pfeil)

Modifiziert nach (Misawa et al., 2020).

Neben intrinsisch vermitteltem Übergang in den Zellzyklusarrest, kann dieser im Körper auch über Zellen der Immunabwehr vermittelt werden, wie in einer Behandlung mit dem von Th1-Zellen ausgeschütteten Cytokincocktail aus IFN γ und TNF α (Braumüller et al., 2013). Dieser führte in Krebszellreihen zu einem permanenten Zellzyklusarrest, über die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von p16^{INK4A} über Rb, beispielsweise über den STAT1-Signalweg und TNFR1. Dieser Mechanismus konnte in mehreren humanen und murinen Zelllinien beobachtet werden und scheint damit einen universellen physiologischen Mechanismus der Tumorabwehr darzustellen (Braumüller et al., 2013); (Homann et al., 2022).

1.2 Epigenetische Modulation durch Histondeacetylasen und Histonacetyltransferasen

Die Veränderungen in der epigenetischen Modifikation des Chromatins scheinen einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorgenese, Progression und Metastasierung zu haben. Über die Sequenzierung des Tumorgenoms wird zunehmend angestrebt, zielgerichtete Therapien und Targets moderner Tumorthérapien auf die jeweilige Entität anzupassen. Hierbei wird das Epigenom eine bedeutende Rolle einnehmen, da hierdurch auch dynamische Veränderungen der DNA und damit die Aktivität bestimmter Gene in entarteten Zellen abgebildet werden. Diese Gene stellen wiederum ein mögliches Ziel für gerichtete Therapien dar.

Ein Teil der epigenetischen Modifikation des Chromatins erfolgt über die Acetylierung der Histone, welche über die Interaktion mit der DNA deren Ablesbarkeit beeinflussen. Somit können ebendiese Modifikationen zu einem „Silencing“ oder einer „Promotion“ bestimmter auf der DNA gespeicherter Programme führen (Jenuwein and Allis, 2001); (Ropero and Esteller, 2007).

Verantwortlich dafür zeigen sich spezialisierte Enzyme, die Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetyltransferasen (HATs).

Tabelle 1: Klasse und Typen verschiedener HDACs

Tabellarische Übersicht über die HDAC-Klassen und Untertypen. Tabelle modifiziert nach Witt et al., 2009.

HDAC-Klasse	Substrate	Bindungspartner	Expression in Gewebe	Phänotyp im Maus-Knockout-Modell	
Klasse I	HDAC1	p53, MyoD, E2F1, Stat3	Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST	ubiquitär	in Embryogenese lethal an Tag 9, Hochregulation von p21 und p27, insgesamt reduzierte HDAC-Aktivität
	HDAC2	Bcl-6, Stat3, Glucokortikoidrezeptor, YY-1	Sin3, Mi-2/NuRD, CoRest	ubiquitär	lebensfähig bis zur Perinatal, multiple kardiale Defekte (fatal), überschießende Hyperplasie des Herzmuskles, Arrhythmie
	HDAC3	GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP	N-CoR/SMRT	ubiquitär	in Embryogenese lethal an Tag 9, Zellzyklusdefekte, Defekte in DNA-Reparatur- und Apoptosemechanismen in embryonischen Fibroblasten, bedingter Knockout in Hepatozyten führt zur Hypertrophy und Induktion metabolischer Gene
	HDAC8	nicht bekannt	EST1B	ubiquitär	nicht bekannt
Klasse IIA	HDAC4	GCMa, GATA-1, HP-1	ANKRA, RFXANK	Herz, glatte Muskulatur, Gehirn	lebensfähig, vorzeitige Ossifikation, Hypertrophie in Chondrozyten
	HDAC5	Smad7, HP-1, GCMa	REA, Östrogenrezeptor	Herz, glatte Muskulatur, Gehirn	Myokardhypertrophie, abnormale Antwort auf kardialen Stress
	HDAC7	FLAG1 und 2	HIF1a, Bcl-6	Herz, Plazenta, Pankreas, glatte Muskulatur	Lethal in der Embryogenese, Verlust endothelialer Zell-Zell-Adhäsion
	HDAC9	nicht bekannt	FOX3P	glatte Muskulatur, Gehirn	lebensfähig bei Geburt, spontane myokardiale Hypertrophie
Klasse IIB	HDAC6	a-Tubulin, HSP90, SHP, Smad7	nicht bekannt	Niere, Leber, Herz, Pankreas	lebensfähig, keine signifikanten Defekte, Anstieg der allgemeinen Tubulin-Acetylierung, MEFs können sich nicht von oxidativem Stress erholen
	HDAC10	HSP90 (nicht bestätigt)	nicht bekannt	Milz, Leber, Niere	nicht bekannt
Klasse IV	HDAC11	nicht bekannt	HDAC6 (nicht bestätigt)	Herz, glatte Muskulatur, Niere, Gehirn	nicht bekannt

Die HDACs werden in 4 Klassen aufgeteilt, wobei die verschiedenen Enzyme entsprechende Targets wie Histone aber auch anderen zelluläre Moleküle, wie zum Beispiel p53 erkennen.

Die Einteilung der Klassen (Tabelle 1) ist auf die strukturelle Ähnlichkeit der Sequenzen zu orthologen Proteinen aus der Hefe zurückzuführen. Die Expression in unterschiedlichen Zellen und Geweben scheint mit der Einteilung der Klassen, die von den Hefen abgeleitet wurden, tatsächlich weitgehend übereinzustimmen, so dass verschiedene HDACs der gleichen Klasse auch in ähnlichen Geweben exprimiert werden.

Über die Deacetylierung nehmen sie einen entscheidenden Einfluss auf zahlreiche zelluläre Programme, wie Zellzyklus, Mitose, Apoptose, DNA-Reparatur und natürlich auch auf den Zellzyklusarrest. Dies ist zum einen zurückzuführen auf die vorwiegend auftretende Deacetylierung von Lysin-Seitenketten an Histonkörpern (Abb. 2A). Deacetyliertes Lysin trägt eine positive Ladung, was zu einer stärkeren Interaktion mit der negativ geladenen DNA führt. Hierdurch kommt es zu einem stärkeren Coiling der DNA um die Histone, was wiederum die Transkription bestimmter Sequenzen verhindert. Die Gegenspieler der HDACs sind Histonacetylasen (HATs), die die

Acetylierung der Histone erhöhen, was wiederum die Bindung zur DNA schwächt (Abb. 2B). Die DNA kann in diesem relaxierten Zustand leichter von Transkriptionsfaktoren erreicht werden, also leichter abgelesen werden.

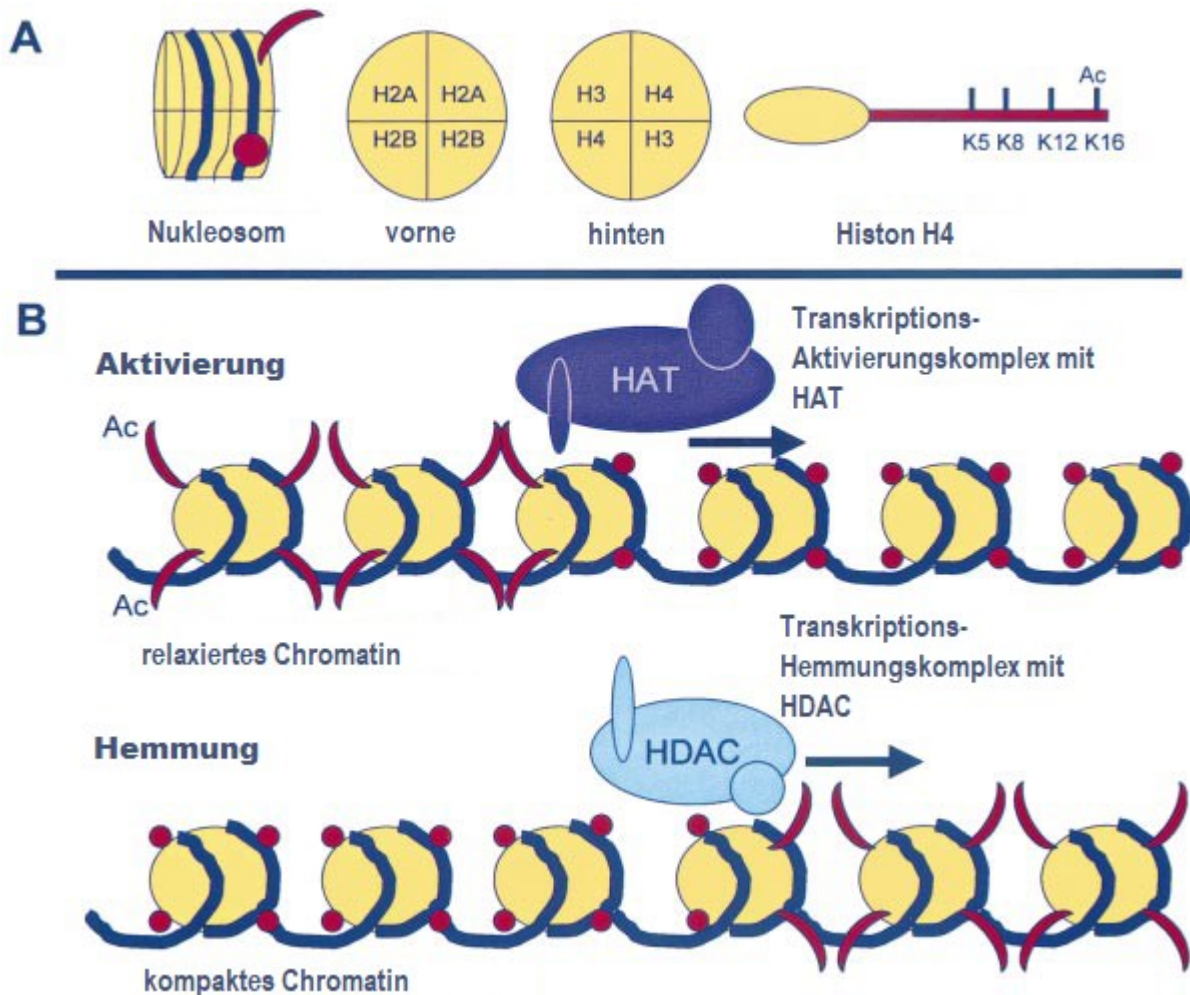


Abbildung 2: Wirkungsweise der HDACs und HATs auf das Chromatin

A: Schematischer Aufbau des Nucleosoms aus den Histonuntereinheiten H2A, H2B, H3 und H4, sowie die Repräsentation von Lysinresten an den Histonkörpern (K5, K8...)

B oben: Darstellung von relaxiertem Chromatin mit transkriptionaler Aktivität. Die roten Halbmonde stellen acetylierte Lysinreste dar, die die Bindung des DNA-Strangs an die Histonkörper schwächen. Schematische Darstellung des Transkriptionsaktivierungskomplexes mit HAT.

B unten: Simultan zur oberen Abbildung Darstellung von kompaktem Chromatin mit eng gebundener DNA durch Interaktion mit den Histonkörpern. Die roten Kugeln stellen deacetylierte Lysinreste dar, welche die DNA enger an die Histonkörper binden. Die transkriptionale Aktivität ist gehemmt. Darstellung des Transkriptionshemmungskomplexes mit HDAC.

(Grafik modifiziert nach de Ruijter et al., 2003)

Die HDACs besitzen neben den Histonen viele weitere Zielmoleküle und nehmen beispielsweise über die Acetylierung von Transkriptionsfaktoren und Kinasen auch indirekt Einfluss auf die Transkription und damit auf diverse zelluläre Programme. Sie interagieren darüber hinaus direkt mit Transkriptionsfaktoren über die Ausbildung eines „Transkriptions-hemmenden Komplexes“ mit weiteren Co-Enzymen (de Ruijter et al., 2003). Simultan dazu ist als Gegenspieler der „Transkription-aktivierende-Komplex“ in Interaktion mit HATs beschrieben (Abb. 2B).

Die Wirkungen der HDACs und HATs reichen von der Beeinflussung der Zellproliferation, der extrinsischen und intrinsischen Apoptose, des Zelltods durch Sauerstoffradikale, der Angiogenese, des autophagischen und mitotischen Zelltods bis hin zur Seneszenzinduktion (Xu et al., 2007).

Insbesondere in der Embryonalperiode nehmen HDACs und HATs auch entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Differenzierung von Progenitorzellen (Conway et al., 2012). Damit scheinen die HDACs in jedem Entwicklungsstand der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf das Zellprogramm zu nehmen.

Stark vereinfacht kann man hierbei den HDACs mitunter pro-onkogene Wirkungen, den HATs (und damit indirekt auch den HDACI) anti-onkogene Wirkungen zuschreiben (Mahlknecht and Hoelzer, 2000).

Die tatsächliche Wirkung ist aber deutlich differenzierter zu betrachten und von weiteren Faktoren abhängig.

Die verschiedenen HDACs haben dabei in Zusammenhang mit Ihren Zielmolekülen unterschiedliche Funktionen. So ist beispielsweise für HDAC7 eine pro-proliferative Wirkung, insbesondere in transformierten Zellen, beschrieben, wobei das Herunterregeln von HDAC7 zu einer Proliferationshemmung führt. Für HDAC1 hingegen wird eine Wirkung in Richtung Wachstumsarrest beschrieben, welcher durch die direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F und damit über eine Hemmung der Transkription bedingt wird (Zhu et al., 2011); (Willis-Martinez et al., 2010).

Allerdings scheint die Wirkung der HDACs auch zellspezifisch zu sein und somit vom zellulären Kontext abzuhängen (Xu et al., 2007).

Entscheidend für eine normale Zellfunktion ist hierbei eine Balance zwischen HDACs und HATs (Villar-Garea and Esteller, 2004). Die Acetylierung entsprechender Targets ist hierbei als reversibel anzusehen, so dass ein An- und Ausschalten bestimmter Signalwege über die Acetylierung und andere direkte Interaktionen mit HDACs und respektive HATs möglich scheint.

Auch das Ausmaß der Expression der HDACs scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion und Auswirkung zu nehmen. Deutlich wird das durch Zellen, die eine Überexpression einzelner HDACs aufweisen.

So konnte in Melanomzellen mit einem seneszenzähnlichen Phänotyp eine Überexpression von HDAC1 gezeigt werden (Willis-Martinez et al., 2010), während die unspezifische Hemmung von HDACs, inklusive HDAC1, in Glioblastomzellen zu einem permanenten Zellzyklusarrest führte (Was et al., 2019).

Hohe Expressionslevel der HDAC Klasse I und II werden in Assoziation mit der Tumorgenese gesehen (Drummond et al., 2005).

Ein Beispiel hierfür stellt das kolorektale Karzinom dar, bei dem hohe Level der Expression von HDAC der Klasse I in einer bestimmten Subgruppe der Karzinome als prognostisch ungünstiger Marker mit einem deutlich schlechteren Gesamtüberleben der Patienten gesehen wird. Insbesondere HDAC2 wurde als unabhängiger prognostischer Marker der Überlebensrate angenommen. Die Überexpression von HDACs zeigte sich vor allem in schnell proliferierenden und stark entarteten Tumoren (Weichert et al., 2008b).

Diese Resultate implizieren ein mögliches Profitieren entsprechender Patientengruppen von einer Inhibition der überexprimierten HDACs durch HDACI.

1.3 Histondeacetylaseinhibitoren

In der Behandlung verschiedener Tumore ist die Expression der HDACs und damit die Wirkung der HDACI zunehmend von Interesse, da vor allem in entarteten und schnell proliferierenden Zellpopulationen Effekte in Richtung Zellzykluskontrolle, Wachstumsarrest, Seneszenz, aber auch Apoptose beobachtet wurden, welche für die Therapie und Kontrolle von Tumoren wünschenswert sind.

In einem Review aus dem Jahr 2016 wurden die Ergebnisse von Originalarbeiten zusammengetragen und die Erkenntnisse aus der Expression einzelner HDAC-Klassen in bestimmten Tumorzellpopulationen verglichen (Li and Seto, 2016).

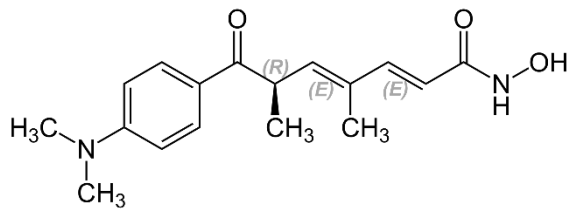
Es zeigte sich, bis auf wenige Ausnahmen, eine Überexpression der HDACs, und zwar klassenübergreifend, in zahlreichen Tumorentitäten, und zwar sowohl in soliden Tumoren als auch hämatologischen Entitäten und Lymphomen. Hohe Level der HDAC-Expression waren dabei auch mit aggressiverem Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose assoziiert.

Nur in wenigen Fällen zeigten niedrige Level an HDACs eine schlechte Tumorprognose. Eine mögliche Ausnahme zeigt sich bei HDAC6, so wie im Falle des HCC, bei dem niedrige Level an HDAC6-Expression bzw. ein Knockdown von HDAC6 mit einer schlechten Prognose und vermehrter Tumorangiogenese assoziiert ist (Lv et al., 2016).

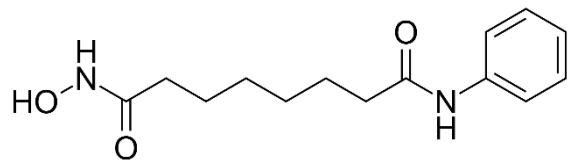
Im Falle der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) konnte eine Minderexpression von HDAC6 ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (van Damme et al., 2012), eine hohe HDAC6-Aktivität führte in diffusen großzelligen B-Zelllymphomen (DLBCL) zu einem günstigeren Krankheitsverlauf (Marquard et al., 2009).

HDACI hemmen die Deacetylierung durch die HDACs, was zu einer erhöhten DNA-Ablesbarkeit führt und damit bestimmte zellregulatorische Programme antreibt, somit auch pro-apoptotische Programme oder die Zelldifferenzierung, was eine mögliche Wirkung in Richtung Wachstumsstopp in dedifferenzierten Krebszellen erklären kann. Verschiedene HDACI haben dabei ein unterschiedliches Wirkprofil auf die vier Unterklassen der HDAC-Familie.

Die hier verwendeten HDACI Vorinostat (SAHA) und Trichostatin A (TSA) werden in Abbildung 3 in ihrer Strukturformel dargestellt. Beide Wirkstoffe gehören zur Familie der Hydroxamsäuren und haben als sogenannte PAN-Inhibitoren ein breites Wirkungsprofil auf die HDACs der Klassen I, II und IV (Yang and Grégoire, 2005). HDACS der Klasse III werden hingegen nicht beeinflusst. Die Klasse III der HDACs bilden die 7 Untergruppen der sogenannten Sirtuine, die aufgrund Ihrer NAD⁺-Abhängigkeit eine besondere Rolle einnehmen, und von den bisher bekannten HDACI im Allgemeinen nicht beeinflusst werden.



a) Trichostatin A (TSA)



b) Vorinostat (SAHA)

Abbildung 3: Strukturformeln der verwendeten HDACI

a) Strukturformel von Trichostatin A: [R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamid

b) Strukturformel von Vorinostat: N-Hydroxy-N'-phenyloctandiamid

(Quelle: https://de.wikipedia.org/wiki/Trichostatin_A#/media/Datei:Trichostatin_A.svg; Autor: Fvasconcellos 17. September 2008 und https://de.wikipedia.org/wiki/Vorinostat#/media/Datei:N1-hydroxy-N8-phenyloctanediamide_200.svg; Autor: Emeldir 27. April 2014; jeweils zur gemeinfreien Nutzung)

Die Bedeutung der Inhibition der HDACs wird deutlich, wenn man die Aktivität von Tumorsuppressorgenen wie den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p21^{waf} betrachtet, dessen Transkription in vielen humanen Tumorzellreihen herunterreguliert ist (Archer et al., 1998; Shoji et al., 2002; Pellikainen et al., 2003). Aus p21^{waf}-Knockout Mäusen kennt man die Bedeutung dieses Gens, da die Mäuse eine Vielzahl von Tumoren entwickelt haben (Martín-Caballero et al., 2001). Durch HDACI konnte die Aktivität von p21^{waf} epigenetisch wiederhergestellt werden (Archer et al., 1998; Blagosklonny et al., 2002). Hierbei zeigte sich eine Hyperacetylierung im Bereich des p21^{waf}-Promoters, was wiederum die Bedeutung der Acetylierung als epigenetische Modifikation in der Promotion von Genen zeigte (Gui et al., 2004).

Aufgrund der bisherigen Kenntnisse über die Wirkung der HDACI ist es daher nicht verwunderlich, dass die HDACI eine zunehmende Bedeutung in der Tumorthherapie gewinnen.

Einer der ersten HDACI, der in den USA für die Behandlung von kutanen T-Zelllymphomen (CTCL) zugelassen wurde, war Vorinostat (SAHA) (Olsen et al., 2007; Fantin et al., 2008), das als Drittlinientherapie in fortgeschrittenen Tumorstadien gilt.

Vor allem aber die Kombination mit bekannten Tumorthapien zeigt in vielen Fällen eine Verstärkung der Wirksamkeit.

So konnte durch HDACI die Trastuzumab-vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose beim Mammakarzinom verstärkt werden (Laengle et al., 2020).

Ein weiteres Beispiel zeigte sich in der Kombination von HDACI mit anti-PD1 in B-Zelllymphomen. Hierbei konnte eine Resistenz der Lymphomzellen gegen anti-PD1 durch die Hinzunahme des HDACI umgangen werden (Wang et al., 2019). Allerdings wurde hier eine unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener HDACI festgestellt. Auch weitere Ergebnisse legen nahe, dass eine personalisierte Kombination anhand von zellulären Biomarkern, wie MHC-Expression, als auch die Wirkprofile der einzelnen HDACI in Zukunft von großer Bedeutung sein werden (Suraweera et al., 2018).

1.4 Auswahl der Zelllinien

Bei der Auswahl der Zelllinien wurden für die Untersuchung bezüglich der Seneszenzinduktion bestimmte Parameter als notwendig gesehen.

Voraussetzung waren daher Zelllinien mit einer stabilen Proliferation über mehrere Passagen, und der Fähigkeit in einen permanenten Zellzyklusarrest versetzt zu werden.

Gewählt wurden zwei Zelllinien, die von humanen Tumoren abgeleitet wurden.

A204-Zellen stammen von einem embryonalen Rhabdomyosarkom und wurden 1973 von einem einjährigen Mädchen entnommen (Altogen Biosystems, 2022).

Das Rhabdomyosarkom betrifft in 50% der Fälle Kinder vor dem 10. Lebensjahr und ist einer der häufigsten mesenchymalen Tumore bei Kindern.

Bezogen auf die Inzidenz der Tumorerkrankungen ist es eine seltene Entität, allerdings ist das überaus aggressive Wachstumsverhalten charakteristisch.

Die abgeleitete Zellreihe der A204-Zellen zeigt nur ein begrenztes Ansprechen auf die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen (Altogen Biosystems, 2022).

1998 wurde der Ursprung der A204-Zellen von einem Rhabdomyosarkom in Frage gestellt, da typische Marker wie Desmin oder Myogenin nicht exprimiert wurden. Eine mögliche alternative Erklärung sah man in der Herunterregulation der Gene durch die Kulturpassagen (Morton and Potter, 1998).

2002 fand man, dass die A204-Zellen eine SMARCB1-Mutation tragen, was ihre Herkunft von einem Rhabdoidtumor, einem seltenen Weichteilsarkom des Kleinkindesalters bekräftigte (Betz et al., 2002).

Die zweite Zelllinie stellten die MCF-7-Zellen dar. Diese stammen von einem Adenokarzinom der Mamma einer 69-jährigen Patientin und wurden 1970 entnommen. Sie tragen weiterhin zahlreiche Marker epithelialen Brustdrüsengewebes und können Estradiol über Rezeptoren im Cytoplasma prozessieren. Die Zellen sind jedoch HER2-negativ und können eine Resistenz gegen Tamoxifen entwickeln (Fagan et al., 2017). In vitro wachsen sie in Monolayers und können ein kuppelartiges Wachstumsbild zeigen.

Die Proliferation der Zellen kann durch TNF α und Antiöstrogene gehemmt werden. Sie gelten als leicht zu kultivieren und zeigen eine langsame Duplikationsrate von 30 Stunden (Sutherland et al., 1983).

Von beiden Zelllinien war bereits bekannt, dass sie in Kultur ein stabiles Proliferationsverhalten zeigen und ein permanenter Wachstumsarrest induziert werden konnte. Die Seneszenzinduktion, also die Induktion eines permanenten Zellzyklusarrestes gelang hierbei mithilfe der Kombinationsbehandlung mit den Zytokinen IFN γ und TNF α .

Darüber hinaus wurde die Seneszenz-assoziierte nukleäre Translokation von Ago2 mit einer resultierenden Repression der E2F-abhängigen Zellzyklus-Gene gezeigt (Rentschler et al., 2018).

Aus dieser Arbeit waren auch die notwendigen Konzentrationen von IFN γ und TNF α in den verwendeten Zelllinien bekannt, sowie die nötige Behandlungsdauer zum Erreichen des vollständigen Wachstumsarrests. Daher konnten diese Parameter für die aktuellen Versuche zunächst übernommen werden, jedoch mussten diese Parameter je nach Fragestellung angepasst werden. Für beide Zelllinien wurde daher die Konzentration von IFN γ und TNF α titriert, bis ein vollständiger Wachstumsarrest erreicht wurde.

Die A204-Zellen zeigten eine hohe Sensitivität gegenüber IFN γ und noch ausgeprägter gegen TNF α . So führten bereits 100 ng/ml IFN γ und 10 pg/ml TNF α zu einer ausgeprägten Proliferationshemmung, jedoch konnte in unseren Experimenten kein vollständiger Wachstumsarrest erreicht werden. Daher wurde die Konzentration von

TNF α erhöht, bis ein vollständiger Arrest erreicht werden konnte. Dies wurde erstmals bei Konzentrationen über 50 pg/ml TNF α und 100 ng/ml IFN γ erreicht, allerdings wurde hierdurch in den Wiederholungen der Versuche nicht konsequent reproduzierbar ein vollständiger Wachstumsarrest, also konstante Zellzahlen in der ersten Passage nach der Behandlung, erreicht. Da die Behandlung mit den Zytokinen als Kontrolle dienen sollten, war das konsequente Erreichen eines vollständigen Wachstumsarrestes entscheidend, daher wurden die Konzentrationen schließlich leicht überschwellig gewählt, mit IFN γ 100 ng/ml und TNF α 100 pg/ml für die A204-Zellen. Dadurch konnte konsequent ein vollständiger Wachstumsarrest erreicht werden. Beginnend toxische Effekte, die eine Reduktion der Zellzahl unter die Ausgangsmenge bedingt haben, waren im Regelfall nur gering ausgeprägt.

Die MCF-7-Zellen zeigten eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber TNF α . Hier wurde in gleicher Weise Konzentrationen von 100 ng/ml IFN γ und 10 ng/ml TNF α für einen vollständigen und reproduzierbaren Wachstumsarrest titriert.

Als Teil der Fragestellung sollten in ähnlicher Weise die HDACI in dem verwendeten Zellsystem etabliert werden.

Die wirksamen Konzentrationen der HDACI wurden vom Hersteller für SAHA in einem Bereich zwischen 0,1 und 10 μ M angegeben, für TSA mit 100 ng/ml.

1.5 Extrinsische Seneszenzinduktion durch Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ

Die Induktion eines seneszenten Phänotyps in malignen Zellen führt zu einem permanenten Zellzyklusarrest und stellt damit einen effektiven Mechanismus der Tumorkontrolle dar (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

In der Induktion der Seneszenz wird in der Zwischenzeit von einigen Gruppen ein intrinsischer Weg und ein extrinsischer unterschieden (Rentschler et al., 2018).

Die intrinsische Induktion kann neben der Telomerverkürzung durch eine Überexpression von Onkogenen erreicht werden (Collado et al., 2005). Des Weiteren zeigte sich, dass der Verlust von Seneszenz-Mediatoren, im Wesentlichen Tumorsuppressorgenen, die durch Onkogene induziert werden, zur Entwicklung maligner Tumore führen kann. Die Seneszenzinduktion kann hierbei unabhängig von

p53 und der Telomeraseaktivität erfolgen, was anhand einer p53-negativen Zelllinie aus ösophagealen humanen Keratinozyten gezeigt wurde (Takaoka et al., 2004).

Die intrinsische Seneszenzinduktion kann aber auch therapeutisch durch klassische Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid, erreicht werden. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Lymphomzellen nach Behandlung durch Cyclophosphamid neben der Apoptose auch in die Seneszenz übergehen. Allerdings zeigte sich nicht nur bezüglich der Apoptose- sondern auch in der Seneszenzinduktion ein schlechtes Ansprechen in p53-mutierten Zellen, was eine Rolle von p53 nahelegt (Schmitt et al., 2002).

Eine weitere Form der Seneszenzinduktion, die vom Immunsystem des Körpers über Th1-Zellen vermittelt wird, wird als extrinsische Induktion beschrieben. Hierbei konnten sowohl transferierte Th1-Zellen, als auch die Kombination der von Th1-Zellen sezernierten Zytokine IFN γ und TNF α einen seneszenten Phänotyp erzeugen (Braumüller et al., 2013). Dieser Vorgang wird als eine Art universeller Abwehrmechanismus des körpereigenen Immunsystems gegen entartete Zellen gesehen (Wieder et al., 2017). Wie bereits eingangs erwähnt, kommt es durch die Zytokine zur Aktivierung des p16^{INK4A}/Rb-Pathways und damit zur Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren wie E2F. Zudem ist p16^{INK4A} mit einem seneszenten Phänotyp assoziiert (Braumüller et al., 2013).

Gleichzeitig muss von einer Aktivierung des STAT1-Pathways über IFN γ R1 ausgegangen werden. Der genaue Mechanismus der extrinsischen Seneszenzinduktion wird allerdings noch unzureichend verstanden und ist Gegenstand weiterer Forschungsprojekte (Homann et al., 2022).

1.6 Epigenetische Modifikationen an Lysinseitenketten

Durch die Wirkung der HDACs kommt es zur posttranslationalen Modifikation von Proteinstrukturen an Histonen und anderen Proteinen. Im Wesentlichen kommt es zur Deacetylierung von Histonseitenketten an Lysin. Ein bekanntes Target der HDACs ist die Lysinseitenkette 9 des Histonkörpers 3 (H3K9), welches durch die HDACs deacetyliert wird und damit auch dem Einfluss durch die HDACI unterliegen sollte.

H3K9 ist ebenfalls ein mögliches Ziel einer weiteren posttranslationalen Modifikation, nämlich der Methylierung.

Je nach Modifikation kann H3K9 unterschiedliche Funktionen erfüllen. So korreliert die Acetylierung mit aktiven Promoterregionen (Karmodiya et al., 2012).

Allerdings wurde an dieser Lysinseitenkette eine Zunahme der Methylierung im Zusammenhang mit einem seneszenten Phänotyp und der dadurch bedingten Zellalterung beschrieben (Sidler et al., 2017). Lysin kann bis zu dreimal methyliert werden, und bildet damit je nach Methylierungsstatus 3 posttranslationale Subtypen aus, H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3 (Goda et al., 2013). Der hypermethylierte Subtyp H3K9me3 fand sich besonders häufig an inaktiven Genen, während der hypomethylierte Typ H3K9m1 an Startregionen der aktiven Transkription angereichert ist (Barski et al., 2007).

Der hypermethylierte Subtyp findet sich außerdem in Bereichen von kondensierten Heterochromatinfoci und interagiert mit der α -Untereinheit des humanen Heterochromatinproteins 1 (HP1 α) (Lehnertz et al., 2003), welches mit seinen zwei weiteren Untereinheiten HP1 β und HP1 γ an seneszenzassoziierten Heterochromatinfoci (SAHF) zu finden ist (Zhang et al., 2007).

Jedoch fanden sich auch hochaktive Genregionen mit einer Anreicherung des hypermethylierten Subtyps (Barski et al., 2007). So gibt es auch im Heterochromatin, insbesondere perizentrisch gelegen, Genbereiche mit hoher transkriptionaler Aktivität (Lehnertz et al., 2003).

Mögliche weitere Modifikationen sind die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und die SUMOylierung (Small Ubiquitin-related Modifier) der Lysinreste (Boyle et al., 2005).

Die verschiedenen möglichen Modifikationen beeinflussen sich dabei gegenseitig, sowohl direkt als auch indirekt.

So kann H3K9 acetyliert, oder auch wie oben beschrieben methyliert werden, jedoch muss vor einer Methylierung zunächst die Deacetylierung des Lysinrestes erfolgen (Goda et al., 2013).

Indirekt beeinflussen posttranslationale Modifikationen auch weitere Modifikationen anderer Lysinreste. Eine Deacetylierung von H3K14ac scheint eine bedingte Voraussetzung für die Methylierung an H3K9 darzustellen, was wiederum zu einer Herunterregulation der betroffenen Region führt (Berger, 2002).

Bei der Betrachtung der Interaktionen der epigenetischen Modifikationen untereinander wird auch deutlich, dass die Annahme, dass eine Acetylierung der

Lysinreste an Histonen zu einer relaxierten und damit transkriptiv aktiveren DNA führt, eine starke Verallgemeinerung ist (Boyle et al., 2005).

Die Acetylierung an H3K14 verhindert die Methylierung an H3K9 und damit auch die Ausbildung eines stabilen komprimierten Chromatinstatus, so dass eine relaxierte DNA entsteht. Es muss also von Interaktionen der Modifikationen untereinander ausgegangen werden, so wie in diesem Fall ein enges Zusammenspiel zwischen Acetylierung und Methylierung der Lysinreste besteht (Iizuka and Smith, 2003).

Wenn man miteinschließt, dass für die Rekrutierung des HDAC-Komplexes an Cytosin gebundene Methylreste, sogenannte CpG-Inseln, verantwortlich sind, wird das enge Zusammenspiel epigenetischer Modifikationen untereinander verdeutlicht (de Ruijter, Annemieke J M et al., 2003).

Aufgrund des komplexen Musters an möglichen epigenetischen Modifikationen mit teils gegensätzlichen Auswirkungen auf die Aktivität der entsprechenden Genregionen, scheint die epigenetische Modifikation nur einen Teil der Aktivität entsprechender Gene zu beeinflussen. Weitere Faktoren, wie die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, müssen in der Aktivität der Gene ebenfalls in Betracht gezogen werden. Hier drängt sich erneut der Begriff des „Zellkontextes“ auf, der ebenfalls eine Rolle zu spielen scheint. Darüber hinaus scheint auch die Lokalisation in der DNA eine Rolle zu spielen, sowie nicht zuletzt der Gesamtkontext epigenetischer Modifikationen, die die Aktivität von Genen, als auch weitere epigenetische Modifikationen beeinflussen (Minucci and Pelicci, 2006).

1.7 Kriterien der zellulären Seneszenz

1.7.1 Wachstumsarrest als Seneszenzkriterium

Ein entscheidendes Kriterium, um den seneszenten Phänotyp nachzuweisen, ist der permanente Wachstumsarrest, der mit dem Zellzyklusarrest einhergeht (Burton and Faragher, 2015). Im Falle eines vollständigen Arrestes aller Zellen sollte die Zellzahl in der Kultur daher auch ohne weitere Behandlung mit dem seneszenzinduzierenden Reagenz für mehrere Passagen, streng genommen dauerhaft, konstant sein.

Geht man von einem permanenten Arrest aus, muss dieser auch nach Ende der Behandlung anhalten. Im Falle, dass 100% der Zellen in den permanenten Wachstums- und Zellzyklusarrest übergehen, ist in den folgenden unbehandelten Passagen von völlig konstanten Zellzahlen auszugehen. Die Schwierigkeit ergibt sich aber daraus, dass nicht 100% der Zellen in die Seneszenz übergehen und die weiterhin proliferierenden Zellen das Ergebnis dementsprechend beeinflussen können. Dennoch können durch den Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen und den Positivkontrollen Rückschlüsse auf das Verhalten unter der Behandlung und in Folge dessen auf die Proliferationshemmung als Seneszenzkriterium geschlossen werden.

1.7.2 Zellmorphologie des seneszenten Phänotyps

Im Vergleich zu normalen Zellen, als auch zu Tumorzellen mit aberrantem Zyklus, wurden morphologische Besonderheiten festgestellt, die viele seneszente Zellen gemeinsam haben, und die damit in Assoziation zum seneszenten Phänotyp gesehen werden (Kuilman et al., 2010; Herranz and Gil, 2018). Diese morphologischen Veränderungen lassen sich teilweise durch den Arrest des Zellzyklus erklären.

Durch die Anhäufung von DNA-Schäden können die Zellen nicht in die Mitose übergehen, und es kommt zu einer Polyploidie und damit zu einer Vergrößerung des Kerns. Durch die Arretierung im Zellzyklus kommt es zu einer Zunahme des Zellplasmas, und zu einer eher plumpen Form („Stemness“), teilweise mit unregelmäßiger Form und Größe der Zellen (Sikora et al., 2016). Aufgrund der Vergrößerung des Zellkerns durch die Polyploidie und die Zunahme an Zellplasma erinnern die Zellen morphologisch an ein „Spiegelei“.

Die Veränderungen lassen sich in ähnlicher Form in vielen Zelllinien feststellen und werden auf Abweichungen in der Zellteilung zurückgeführt, die durch die Seneszenzinduktion unterbunden wird, so dass polyploide, plasmareiche Zellen entstehen. Aber auch aberrante Zellteilungen mit vergleichsweise kleinen Abkömmlingen sind beschrieben (Sikora et al., 2016).

1.7.3 Seneszenzassoziierte beta-Galaktosidase-Aktivität

Die Zunahme von SA-beta-Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Zellen ist ein wichtiger Hinweis zur Identifizierung seneszenten Zellen. Das lysosomale Enzym wurde als Biomarker der Seneszenz entdeckt, wenn auch die genaue Funktion im Zusammenhang mit der Seneszenzinduktion noch nicht bekannt ist (Lee et al., 2006). Die Aktivität konnte in seneszenten Fibroblasten und Keratinozyten nachgewiesen werden, nicht jedoch in ausdifferenzierten Keratinozyten. Die fehlende Aktivität in immortalisierten Zellen konnte durch die Manipulation der Zellen in einen nicht-immortalisierten Phänotyp ebenfalls umgekehrt werden, sodass sich eine Galaktosidase-Aktivität zeigte (Dimri et al., 1995). Seit der Erstbeschreibung wurde die Aktivität der SA-beta-Galaktosidase als Hinweis eines seneszenten Phänotyps in vielen Zelllinien beschrieben, auch wenn die Expression zellabhängig ist (Dimri et al., 1995). Darüber hinaus ist die Funktion des Enzyms keinesfalls notwendig für die Seneszenzinduktion (Lee et al., 2006). Nichtsdestotrotz ist die SA-beta-Galaktosidase-Aktivität ein valider Biomarker der Seneszenz, der häufig als Goldstandard gefordert wird.

Standardisierte Kits ermöglichen einen einfachen und zuverlässigen Nachweis der Galaktosidase-Aktivität durch eine Farbreaktion mit x-Gal.

1.7.4 Translokation von phosphoHP1 γ in seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci

In vielen Zellen wird im Zuge des Übergangs in einen seneszenten Phänotyp die Ausbildung sogenannter Seneszenz-assoziiierter-Heterochromatin-Foci (SAHF) beschrieben (Aird and Zhang, 2013). Diese tragen zur Repression zellproliferationsfördernder Gene bei, indem die Expression von Genen wie zum Beispiel Cyclin A gehemmt wird. Weitere Teile dieser SAHF sind assoziierte Proteine, wie auch HP1 (Heterochromatin Protein 1, Synonym: CBX3 für chromobox protein homolog 3) und Histonproteine und deren Derivate wie macroH2A. Eine Bindung an H3K9m1 wurde beschrieben, die zu einer epigenetischen Repression führte (Koike et al., 2000). Während der Seneszenzentwicklung in der Zelle kommt es zur Translokation von Hp1 γ im Zuge der Kondensierung der Heterochromatinfoci (Zhang

et al., 2007). Hp1 γ wird, anders als die verwandten Proteine HP1 α und HP1 β , für die Bindung in den SAHF durch PIM1 (Koike et al., 2000) an Serin93 phosphoryliert (Zhang et al., 2007).

In der Immunfluoreszenz mit einem phospoHP1 γ -Antikörper als Marker stellen sich diese Foci als punktförmige leuchtende Signalanhebungen im Bereich des Nucleus dar.

Die seneszenzassoziierte Zunahme an SAHF mit phosphoryliertem Hp1 γ sollte in der vorliegenden Arbeit nach Möglichkeit quantifiziert werden, um als Hinweis für die Seneszenzinduktion zu dienen (Braumüller et al., 2013).

1.8 Fragestellung

Dem Organismus stehen zur Bekämpfung und Kontrolle entarteter Zellen mehrere Mechanismen zur Verfügung. Neben der intrinsischen Apoptose, dem programmierten Zelltod durch Akkumulation von DNA-Schäden, die nicht durch zelluläre Mechanismen repariert werden können, kann auch die körpereigene Immunabwehr die Apoptose extrinsisch induzieren. Neben dem Abtöten dieser entarteten Zellen gibt es noch andere Mechanismen der Tumorkontrolle. Einer davon ist die zelluläre Seneszenz, ein permanenter Zellzyklusarrest, der auch mit der Zellalterung assoziiert ist. Dieser Mechanismus ist Teil der Programmierung praktisch aller Zellen und kann wiederum sowohl intrinsisch nach einer gegebenen Anzahl an Zellteilungen erfolgen oder auch extrinsisch durch Zellen der Immunabwehr induziert werden. Letzteres macht sich der Körper zunutze, um entartete Zellen in die Seneszenz, den permanenten Zellzyklusarrest, zu treiben, und damit eine effektive Tumorkontrolle zu erreichen.

In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass für die extrinsische Seneszenzinduktion bestimmte Zytokinsignale genutzt werden. So können T-Zellen durch die Sekretion von IFN γ und TNF α die Seneszenz in teilungsfähigen Zellen induzieren. Bei diesem Mechanismus geht man von einem universellen Signalweg aus, der als Teil des Immunsystems in allen Körperzellen induziert werden kann.

Aber auch andere Signalwege zur Seneszenzinduktion sind bekannt. Erstaunlicherweise können auch die HDACi, welche unspezifisch HDAC inhibieren, die wiederum über epigenetische Modifikation von Histonen, DNA und weiterer

Substrate die Aktivität bestimmter Signalwege und Induktion bestimmter Programme, die auf der DNA codiert sind, beeinflussen, in vielen Tumorzelllinien einen seneszenten Phänotyp hervorrufen.

In diesem Projekt sollte zunächst das Verhalten und die Seneszenzinduktion in Tumorzellen unter der Behandlung mit HDACI geprüft und die Behandlung in diesen Zellsystemen etabliert werden. Die Wahl der Zelllinien fiel hierbei bewusst auf solche, von denen bereits bekannt war, dass eine Seneszenzinduktion möglich war, und zwar insbesondere durch den Zytokincocktail bestehend aus IFN γ und TNF α , der als Kontrolle diene.

In einem weiteren Schritt kombinierten wir HDACI mit IFN γ , um zum einen mehr über die Beeinflussung der Signalwege zu erfahren und zum anderen um Rückschlüsse über neue effektive Kombinationen für therapeutische Zwecke zu gewinnen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Hilfsmittel

Gerätebezeichnung	Hersteller und Firmensitz
Blockheizer HB-LS2	VLM GmbH, Leopoldshöhe
Blotting-Kammer Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Feldkirchen
Neubauer Zellzählungskammer	Karl Hecht GmbH, Sondheim
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Kühlschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Kühlschrank -80°C Hera Freeze	Heraeus, Hanau
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Inkubator 37°C Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Laminar Flow cabinet Airstream II plus	Esco Lifesciences, Friedberg
Magnetrührer RCT Basic	IKA Werke, Staufen
Mikroskop Leica DM IL	Leica Biosystems, Nussloch
Multiwell Reader Multiskan EX	Thermo Fisher, Waltham, USA
Pipetten Eppendorf	Eppendorf SE, Hamburg
Pipettierhilfe Research /Reference plus	Eppendorf SE, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy 2	Integra Biosciences, Biebertal
Schwenkplatte Stuart	Bibby Scientific, Altrincham, UK
Analysewaage	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Vortex Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad 37°C	GFL Technology, Vertrieb über Lauda, Lauda-Königshofen

Zeiss Axiovert Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zeiss Fluoreszenz-Illuminator	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Elektrophorese-System Mini 1D für SDS-PAGE	Bio-Rad, Feldkirchen

2.1.2 Verbrauchsgüter

Material	Hersteller und Firmensitz
Zellkulturschalen Costar	Corning, New York, USA
Zellkulturplatten (6-Well) Costar	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen Rainin BioClean	Mettler Toledo, Columbus, USA
Einmalpipetten Costar	Corning, New York, USA
Parafilm	Bemis Flexible Packaging, Neenah, USA
Handschuhe Abena Classic	Abena Deutschland, Zörbig
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Eppendorf-Cups	Eppendorf SE, Hamburg
Chamberslides	BD Biosciences, Heidelberg
Objektträger / Deckplatten	R. Langenbrinck, Emmendingen
Polypropylen-Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Polypropylen-Phiolen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Protran Nitrocellulose-Transfermembran	GE Healthcare, München
Whatman-Papier	Whatman, Dassel

2.1.3 Wirkstoffe und Reagenzien

Wirkstoff/Reagenz	Hersteller und Firmensitz
SAHA (Vorinostat)	Selleck-Chemicals, Planegg
Trichostatin A	Selleck-Chemicals, Planegg
Rekombinantes Interferon- γ	Bio-Techne; Wiesbaden
Rekombinantes TNF- α	Bio-Techne; Wiesbaden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ultra Pure H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol)	Invitrogen, Vertrieb über Thermo Scientific, Waltham, USA
Aceton	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Methanol >99%	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Triton X100 (Octoxinol 9)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Tween 80 (Polysorbat)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
DAKO Protein Block	DAKO GmbH, Hamburg

Trypan blau Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris (Trisamin Base) >99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin >99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Ethanol 99,9%	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Milchpulver, Blotting-Qualität	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na ₂ -EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraacetat)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
BGP (Glycerin-2-phosphat Dinatriumsalz Hydrat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Urea	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Glycerin >99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
„Complete“ Proteaseinhibitor	Roche, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
WB Lauf-Puffer	3 g/l Tris 18.5 g/l Glycin 0.1% SDS
WB Transfer-Puffer	3 g/l Tris 18.5 g/l Glycin 20 % Ethanol
WB Block-Puffer	PBS 5% Milchpulver
Lyse-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ -EDTA 1 mM EGTA 1% Triton X-100 1 mM BGP 2 M Urea Proteaseinhibitor
SDS Lade-Puffer (Laemmli-Puffer)	0.35 M Tris pH 6.8 9.3 % Dithiotreitol 30 % Glycerin 10 % SDS 0.02 % Bromphenolblau

2.1.5 Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Mammalian beta-Galactosidase Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Antikörper

Antikörper, Host, Verdünnung	Hersteller und Firmensitz
Anti-Histone H3K9ac EPR16988 rabbit 1:3000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-phosphoHP1 γ EPR19802 rabbit 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-rabbit Alexa488 A32731 goat 1:100	Invitrogen, Bezug über Thermo Scientific, Waltham, USA
Anti-HDAC2 EPR5001 rabbit 1:5000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HDAC3 Y415 rabbit 1:5000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HDAC4 EPR22937-157 rabbit 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HDAC5 ab55403 rabbit 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HDAC7 EPR10922 rabbit 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti- β -Actin MAB1501R mouse 1:5000	EMD Millipore, Burlington, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-konjugierter Antikörper #7074 goat 1:3000	Cell Signaling, Cambridge, UK
Anti-mouse IgG, HRP-konjugierter Antikörper #7076 horse 1:3000	Cell Signaling, Cambridge, UK

2.1.7 Zellkulturmedium und sterile Lösungen

Material	Hersteller und Firmensitz
RPMI-1640	Biochrom, Berlin
Penicillin 10000 U/ml	Biochrom, Berlin
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin 10mg/ml	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Hepes Puffer	Biochrom, Berlin

Pyruvat	Biochrom, Berlin
nichtessentielle Aminosäure	Biochrom, Berlin

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung, Kulturmedium, Bezug
A204	Rhabdomyosarkom, RPMI-Medium aus Bestand von K. Schilbach; Universität Tübingen
MCF-7	Mammakarzinom, RPMI-Medium aus Bestand von F. Essmann; ehemals Universität Tübingen, jetzt Robert Bosch Center for Tumor Diseases, Stuttgart

2.1.9 Software

Software	Entwickler und Firmensitz
Axiovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen
ImageJ (FIJI)	Wayne Rasband, gemeinfreie Nutzung
Graphpad Prism	Graphpad Software, San Diego, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
SPSS	IBM, Armonk, New York, USA

2.2 Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, falls nicht anderweitig angegeben.

2.2.1 Auftauen der gefrorenen Zellen

Proben der Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Revitalisieren werden sie im 37°C Wasserbad rasch aufgetaut und anschließend sofort in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums gelöst. Die Zellen werden durch Zentrifugieren bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten von der Mediumlösung abgetrennt. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet wird in 10ml des Kulturmediums

resuspendiert und einmal gewaschen um das DMSO zu entfernen. Die Zellen werden anschließend verwendet und können ausgesät werden.

2.2.2 Einfrieren von Zellproben

In regelmäßigen Abständen sollten Proben der Zelllinien eingefroren werden, um Zellen mit niedriger Passagenzahl zu konservieren. Die adhärenen Zellen wurden abgelöst und im Kryo-Puffer aus 90% Kulturmedium und 10% DMSO resuspendiert, mit einer Zelldichte von etwa $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zelllösung wird auf Aliquots aufgeteilt und in Kryo-Phiole abgefüllt. Diese werden anschließend in Kryo-Einheiten verstaut und für 24 h bei -80°C eingefroren. Anschließend werden die Einheiten im Flüssigstickstoff-Tank für die Langzeitaufbewahrung gelagert.

2.2.3 Lösen der adhärenen Zellen

Adhärenente Zellen in den Zellkulturflaschen werden durch die Inkubation mit 5 ml Trypsinlösung bei 37°C für 5 Minuten abgelöst. Der Verdauungsprozess durch das Trypsin wird anschließend durch das Hinzufügen von Kulturmedium gestoppt. Das Ablösen der Zellen wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wird die Lösung für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das verbliebene Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und kann nun für das Aussäen oder für Versuche genutzt werden.

2.2.4 Kultivieren der Zellen

Die resuspendierten Zellen werden in 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium ausgesät und im Inkubationsschrank unter luftfeuchter Atmosphäre mit 5% CO_2 bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wird das Wachstum unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Passagierung erfolgt bei konfluierendem Zellwachstum. Die geernteten Zellen werden für die Rekultivierung und weitere Versuche verwendet.

2.2.5 Auszählen der Zellen

Die Zellzahl wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wird die Zelllösung mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:9 verdünnt und unter der Deckplatte aufgebracht. Die vier Quadrate mit jeweils 4x4 Unterquadraten werden ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Der Mittelwert wird mit 10^5 multipliziert um die mittlere Zellzahl der Lösung pro ml zu erhalten. Durch die Farblösung kann zwischen blaugefärbten toten Zellen und ungefärbten vitalen Zellen unterschieden werden.

2.2.6 Behandlung der Zellen mit biologisch aktiven Substanzen

Die Zellen werden mit den Zytokinen, HDACI oder anderen entsprechenden Substanzen behandelt, indem die nötige Konzentration des Reagenzes dem Kulturmedium hinzugefügt wird, und die Zellen in diesem reagenzhaltigen Medium für den benötigten Behandlungszeitraum inkubiert werden. Um die Behandlung zu beenden, wird das Reagenz-Medium entfernt und die adhärennten Zellen werden mit PBS gewaschen. Danach wird frisches Kulturmedium hinzugefügt. Als Kontrolle diente jeweils die entsprechende Menge Lösungsvermittler, im vorliegenden Fall DMSO.

2.2.7 XTT-Assay

Um die Zahl der vitalen Zellen unter der Behandlung zu bestimmen und somit die Toxizität und der Substanzen zu ermitteln, wurde ein XTT-Assay durchgeführt (Roehm et al., 1991). Der Essay wurde mit einem kommerziellen Kit durchgeführt, das das Zellüberleben indirekt über eine quantitative Reaktion mit Reduktionsprodukten, die nur lebende Zellen produzieren, bestimmt. Die Reduktionsprodukte werden durch ein Farbreagenz oxidiert, was zur Bildung von Farbmolekülen führt, die wiederum über die photometrische Extinktion quantifiziert werden können und Rückschluss auf die Anzahl lebender Zellen zulassen.

Zellen beider Zellreihen wurden in 9-Well-Platten ausgesät und zwar mit einer Probenreihe mit 500 Zellen pro Well und eine zweite Reihe mit 3000 Zellen damit der Effekt auf Populationen mit einer niedrigen Dichte, welche also proliferiert, sowie

Populationen mit einer hohen Dichte, welche konfluierend wachsen und dadurch zum Wachstumsstopp gelangen, beobachtet werden kann.

Die einzelnen Proben wurden als Triplikate angelegt. Die Testreihen umfassten unterschiedliche Zelllinien, Zellzahl der Aussaat und Behandlung, sowie jeweils entsprechende Kontrollen ohne Behandlung in derselben Platte. Die Behandlungsreagenzien oder, im Falle der Kontrollen, entsprechende Lösungsmittel wurden in steigender Konzentration hinzugefügt. Dadurch konnte der Effekt bzw. die Toxizität in Abhängigkeit der Behandlungskonzentration bestimmt werden.

Nach dem Aussäen der Zellen wurden diese für 24 h inkubiert, bevor die Behandlung begonnen wurde, um eine sichere Adhärenz an die Oberfläche zu etablieren. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Behandlung erfolgte mit Reagenz-haltigem Medium in der gewünschten Behandlungsdosis. Nach weiteren 24 h bis 96 h Inkubation mit Behandlungsmedium wurde der XTT-Assay entsprechend des beigefügten Protokolls durchgeführt. Nach dem Hinzufügen des XTT-Substrats, welches den Umsatz zu Farbmolekülen ermöglicht, wurden die Zellen mitsamt dem Substrat weiter bei 37°C inkubiert, um die Farbreaktion zu begünstigen. Nach 2-4 h Umsatz erfolgte die Messung der Extinktion mit einem Multi-Well-Reader mit einer Wellenlänge von 450 nm. Bereits nach 4 h war bei der verwendeten Zellzahl die Extinktion so hoch, dass aufgrund des logarithmischen Verhaltens und den Begrenzungen des Readers die Genauigkeit der Ergebnisse nicht mehr gegeben war, weshalb eine Inkubation über einen längeren Zeitraum und damit noch höherem Farbumsatz als nicht sinnvoll erschien.

2.2.8 Wachstums-Assay

Der Wachstums-Assay wurde in Anlehnung an die Arbeit von Braumüller (Braumüller et al., 2013) durchgeführt.

In 6-Well-Kulturplatten wurden 10^5 Zellen ausgesät (p-1). Jede Platte beinhaltete 3 Test-Wells mit Proben, die mit derselben Konzentration eines Reagenzes behandelt wurden, sowie 3 Kontroll-Wells mit unbehandelten Proben mit Standardmedium. Dadurch gab es für jeden Test eine eigene Kontrolle mit 3 Replikaten auf derselben Platte. Die Zellen wurden nach dem Aussäen auf die Platten für 24 h bei 37°C inkubiert,

um auch hier eine sichere Adhärenz zu ermöglichen. Die Adhärenz wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde das Standardmedium entfernt und mit Behandlungsmedium mit dem entsprechenden Reagenz hinzugegeben. Zu den Kontrollen wurde entsprechend frisches Standardmedium gegeben. Nach Inkubation für die entsprechende Behandlungsdauer, in der Regel 96 h, falls nicht anders angegeben, wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden passagiert und gezählt (p0).

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die passagierten Zellen erneut in 6-Well-Platten ausgesät, nach demselben Schema mit 3 Test-Wells und 3 Kontroll-Wells. Die Zellen wurden diesmal sowohl in den ursprünglich behandelten Populationen als auch in den Kontrollen nur mit Standardmedium inkubiert, für weitere 96 h. Daraufhin wurden die Zellen erneut passagiert und ausgezählt. Für den Fall, dass insgesamt weniger als 3×10^5 Zellen verblieben waren, vor allem bei den höheren Behandlungskonzentrationen oder den Kombinationsbehandlungen mit stärkerer Auswirkung auf die Wachstumshemmung und Toxizität, wurden die verbliebenen Zellen vollständig wiederausgesät und gleichmäßig auf die 3 Replikate verteilt. Anschließend wurde die entsprechende Kontrolle mit derselben reduzierten Zellzahl durchgeführt.

Indem wir die Gesamtzahl der Zellen durch die Zahl der ausgesäten Zellen teilten, haben wir den Proliferationsfaktor erhalten, mit dem wir die hypothetische reelle Zellzahl extrapolieren konnten, die wir normalerweise erhalten würden, wenn wir alle passagierten Zellen aussäen würden und wir von einem rein logarithmischen Wachstum ohne Begrenzungen durch Mangel an Platz oder Nährstoffen ausgehen können.

Um zu zeigen, dass der Effekt der Behandlung auch weitere Passagen, die über die eigentliche Behandlung hinausgehen, anhält, werden die Zellen in gleicher Weise wie von p0 nach p1 weiter bis zu Passage p2 und weiteren folgenden Passagen beobachtet.

2.2.9 Mikroskopische Untersuchung der Morphologie

Nachdem die Zellen für 96 h behandelt wurden, wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zu unbehandelten

Zellen festzuhalten. Repräsentative Aufnahmen wurden mithilfe eines AxioVision-Mikroskops von Zeiss mit entsprechender digitaler Software erstellt, was identische, reproduzierbare Bedingungen für die Bildaufnahme ermöglichte und somit auch die Vergleichbarkeit der Morphologie.

2.2.10 Beta-Galaktosidase-Assay

Der Beta-Galaktosidase-Assay wurde in Anlehnung an die Arbeit von Braumüller (Braumüller et al., 2013) durchgeführt.

In den Elisa-Platten mit 96 Vertiefungen wurden 2000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach Inkubation für 24 h ohne Behandlung zur Etablierung der Adhärenz wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von jeweils einem der HDACI beziehungsweise Kombinationen aus HDACI mit den Zytokinen behandelt. Triplikate oder sogar eine noch höhere Anzahl identischer Proben derselben Behandlung, genauso wie unbehandelte Proben als Kontrolle und Positivkontrollen mit IFN γ und TNF α wurden auf denselben Platten mitgeführt.

Nach der Inkubation in Behandlungsmedium für 96 h wurde das Medium entfernt. Anschließend wurde der Assay entsprechend der Anleitung des fertigen Kits durchgeführt.

Die Fixationslösung wurde für 15 min bei Raumtemperatur appliziert und die Proben anschließend mit PBS gewaschen. Nachdem die Färbungslösung hinzugegeben wurde, wurden die Platten für 12 h ohne CO $_2$ bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden Kernstrukturen mit DAPI gegengefärbt.

Die Färbung wurde anschließend mit dem Mikroskop digital aufgenommen, in derselben Art wie die Aufnahmen der Zellmorphologie, allerdings wurden diesmal zusätzlich Bilder der Immunfluoreszenz der DAPI-gefärbten Kerne aufgenommen, wodurch die Gesamtzahl der Zellen einfach ausgezählt werden konnte.

Die grün-blaue Färbung von beta-Gal konnte mit digitalen Filtern verstärkt werden, was die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellen erleichterte.

2.2.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in Anlehnung an die Arbeit von Rentschler et al. (Rentschler et al., 2018) durchgeführt.

Passagierete Zellen wurden in den Chamberslides für Immunfluoreszenzfärbungen ausgesät mit je 10^4 Zellen pro Kammer. Nach 24 h Inkubationszeit für die Adhärenz der Zellen bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen anschließend zwischen 24 h und 96 h mit Zytokinen oder HDACI behandelt. Für jede Kammer mit behandelten Zellen wurde zeitgleich eine Kammer mit unbehandelten Zellen als Kontrolle erstellt.

Nach der Behandlung wurde das Medium entfernt. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Fixation mit Methanol/Aceton 1:1 mit anschließendem Trocknen. Anschließend erneutes Waschen mit PBSAT (PBS/BSA/Tween) und PBST (PBS/Triton x100). Nach der Protein-Blockierung mit DAKO-Block konnte die Immunfärbung durchgeführt werden.

Dafür wurden die Kammern für mindestens 12 h bei 4°C mit dem Primärantikörper versetzt. Nach mehreren Waschvorgängen mit PBST wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST erfolgte die Kernfärbung mit DAPI. Anschließend konnten die Kammern entfernt und der Träger gedeckelt werden. Die Lagerung erfolgte dunkel und gekühlt, bis die Aufnahmen mit dem digitalen Immunfluoreszenzmikroskop durchgeführt werden konnten.

Der Nachweis wurde in erster Linie qualitativ geführt, mit Ausnahme der Aufnahmen der phosphoHP1 γ -positiven SAHF, die auch semiquantitativ ausgewertet wurden.

Für die qualitative Analyse wurde die Belichtungszeit in der Kontrolle so gewählt, dass gerade noch keine Immunfluoreszenz wahrnehmbar ist. Mit der gleichen Belichtungszeit erfolgte dann die Aufnahme der behandelten Zellen. Wenn in diesen Zellen bei gleicher Belichtungszeit die Immunfluoreszenz darstellbar war, wurde der Test qualitativ als positiv und somit als Beweis einer Zunahme der entsprechenden Zielstruktur gewertet.

Für die semiquantitative Auswertung der SAHF, die durch Antikörper gegen phosphoHP1 γ fluoreszierend markiert wurden, wurde die Anzahl der markierten SAHF pro Zellkern ausgezählt. Hierbei wurde in Anlehnung an die Arbeit von Braumüller et al. von 2013 ein Cutoff an SAHF pro Zellkern bestimmt, ab dem eine Zelle als positiv

gewertet wurde. In jener Arbeit wurde ein Cutoff von 5 SAHF pro Zellkern gewählt. Aufgrund der bereits hohen Grundaktivität in beiden Zelllinien auch ohne Behandlung wurde für die A204-Zellen ein Cutoff von 6 SAHF gewählt, für die MCF-7-Zellen sogar ein Cutoff von 8 SAHF pro Zellkern, damit eine Zelle als positiv gewertet wurde. Hierdurch konnte die Trennschärfe der behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollen verbessert werden.

2.2.12 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) werden Moleküle nach der Größe, bzw. dem molekularen Gewicht aufgetrennt. Über SDS werden negative Ladungen zu den Proteinen hinzugefügt, so dass die ursprüngliche Ladung des Moleküls in der Auftrennung keine Rolle spielt und die Moleküle lediglich anhand ihres Gewichts aufgetrennt werden (Laemmli, 1970; Gallagher, 2006).

Die SDS-Page wird dabei mit einem Stacking-Gel, das die Proteine an einer gemeinsamen Lauffront vereinigt, und einem Running-Gel durchgeführt, das die Proteine dann trennt. Die gegossenen Gele werden in einen Lauf-Tank mit Puffer gestellt und die Proben in vorgeformte Gel-Taschen neben einer vorgefärbten Proteinprobe, die als Maßstab dient, eingebracht. Anschließend wird zunächst eine geringere Spannung angelegt, um die Proteine vom Stacking-Gel in das Running-Gel zu überführen. Anschließend erfolgt mit einer höheren Spannung die Auftrennung der Proteinmoleküle durch die Wanderung in Richtung der Anode.

Um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, müssen diese aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden (Hnasko and Hnasko, 2015).

Anschließend werden die Proteine mit einem primären Antikörper inkubiert, der gegen das gesuchte Target gerichtet ist. Anschließend mit sekundären Antikörpern, die mit HRP markiert sind inkubiert, um über die Färbung eine Signalverstärkung und die Möglichkeit einer Detektion über Chemolumineszenz zu erreichen.

Um die Proteine vom Gel auf die Membran zu transportieren, wurden Gel und Membran in einer feuchten Kammer aus Schwämmen und sogenanntem Whatman-Papier verpackt.

Dieses Paket wurde in eine Trägerkassette gegeben und in eine Kammer mit Blotting-Puffer gestellt. Anschließend wurden durch eine angelegte konstante Spannung über Nacht die Proteine in die Membran transferiert, wobei die Kathode gelseitig und die Anode membranseitig angelegt wurden. Da aufgrund des hohen Widerstands gegen das elektrische Feld auch eine deutliche Erhitzung erfolgen kann, wurde die Kammer über Nacht gekühlt, um die Zerstörung der Proteinproben zu verhindern.

Anschließend erfolgte die Markierung mit den primären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für etwa 1 h in einem Protein-Block/PBS-Gemisch inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper hinzugefügt und über Nacht geschwenkt bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran mehrfach gründlich mit PBS-T gewaschen.

Eine Lösung mit dem Western-Blotting-Substrat aus gleichen Teilen Luminol und Oxidationsreagenz wurde vorbereitet und auf Eis gekühlt.

Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Abdeckungen aus einem Propylen-Protector bzw. einer Kunststoffolie eingeschlagen und eventuelle Luftblasen unter der Abdeckung vorsichtig herausgedrückt. Anschließend wurde der Film für etwa 30 s belichtet und anschließend entwickelt.

2.2.13 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung der pHP1 γ -Assays erfolgte die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes sowie der Standardabweichung, in der Darstellung wurde typischerweise die 1. Standardabweichung mittels Fehlerbalken dargestellt.

Ergänzend kam zur Prüfung eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen Kontrollen und Tests der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz (Students t-Test), um die Mittelwerte der erhobenen Stichproben zu vergleichen. Hierbei wurde ein Konfidenzintervall von mindestens 95% ($p=0,05$) definiert. Die Normalverteilung der Stichproben wurde angenommen. Dieses Verfahren wurde gewählt, da jeder Test eine eigene Kontrolle aufwies, somit nur diese zwei Gruppen je Experiment verglichen werden mussten.

Die Auswertung der XTT-Assays und der SA-beta-Galaktosidase-Assays erfolgte ebenfalls über die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes sowie der Standardabweichung, ebenfalls erfolgte hier die Darstellung der 1. Standardabweichung.

Da hier in einem Experiment jeweils mehrere Gruppen mit der Kontrollgruppe verglichen wurden, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA herangezogen. Für jedes Experiment wurde eine Levene-Statistik zur Prüfung der Varianzhomogenität durchgeführt. Konnte mit einem ausreichenden Konfidenzintervall von einer Varianzhomogenität ausgegangen werden, wurde mittels ANOVA die Hypothese der Gleichheit der Mittelwerte über die Gruppen hinweg geprüft. Konnte diese Hypothese mit einem Konfidenzintervall von 95% ($p=0,05$) verworfen werden, sind anschließend als Post-Hoc-Test Mehrfachvergleiche zwischen einzelnen Gruppen erfolgt, hierbei wurde im Falle der ANOVA eine Bonferroni-Korrektur des Alpha-Fehlers durchgeführt. Die entscheidenden Mehrfachvergleiche bezogen sich hierbei auf den Vergleich der Kontrollgruppe mit den einzelnen Testgruppen. Die Signifikanz wurden mit einem Konfidenzintervall von 95% ($p=0,05$) bestimmt und dargestellt.

Konnte über die Levene-Statistik keine ausreichende Sicherheit bezüglich des Vorliegens einer Varianzhomogenität bestimmt werden, wurde nach gleichem Vorgehen stattdessen ein Welch-ANOVA durchgeführt, der Post-Hoc-Test erfolgte hierbei mit einer Korrektur des Alpha-Fehlers nach Dunnett-T3 und Games-Howell.

Im Falle der Growth Assays zeigten sich deutliche Abweichungen der Zellzahlen aufgrund der teils langen Inkubationszeiten über mehrere Passagen, so dass die Erhebung eines Mittelwertes der Werte von wiederholten Experimenten nicht sinnvoll erschien.

Wir haben die Experimente wiederholt und dabei ein ähnliches Ergebnis erzielt. Exemplarisch wurde in den Abbildungen des Growth Assays eines der Experimente dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Zellviabilität unter der Behandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren

Mit Hilfe eines XTT-Essays sollten Rückschlüsse auf die zu testenden Konzentrationen für jede Zellreihe gezogen werden. Dabei war es wichtig, zum einen Konzentrationen zu wählen, die im wirksamen Bereich liegen und eine messbare Wirkung auf die Zellproliferation nehmen, andererseits sollte die Toxizität in diesem Bereich möglichst gering sein, um mit dem Sterben vitaler Zellen einen möglichst geringen Einfluss auf die Zellzahl und somit auf die korrespondierende Proliferationsrate zu nehmen.

Der XTT-Essay erlaubt über den Umsatz von zellulären Reduktionsfaktoren, im Wesentlichen NADH, auf die Aktivität der Mitochondrien, und damit auf die Anzahl vitaler Zellen zurückzuschließen. Diese Reduktionsfaktoren setzen das Reagenz in einer Farbreaktion um, welche dann über die Extinktion im Fotometer gemessen werden kann.

Für die Etablierung der Behandlung mit HDACI in den verwendeten Zelllinien musste zunächst der Bereich sinnvoller Behandlungskonzentrationen festgelegt werden, in welchem eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation bei möglichst geringer Toxizität besteht.

Über die Bestimmung des Wachstumsverhaltens der Zellen sollte sowohl Rückschlüsse auf die Toxizität als auch auf die Proliferationshemmung möglich sein, in dem die Wirkung der HDACI auf die Zellviabilität der behandelten Zellen in verschiedenen Wachstumsphasen beobachtet wurde.

Da die HDACI diverse Wirkungen auf die Zellen und ihr Wachstumsverhalten nehmen konnten, unter anderem über Zellzyklusarrest, wie in der Seneszenzinduktion, aber zeitgleich auch zu einem Zelltod über Apoptoseinduktion führen konnten (Xu et al., 2007), war unser Ziel zunächst das Wachstumsverhalten der Zellen unter der Behandlung mit HDACI zu untersuchen. Hierbei haben wir die Viabilität von Zellpopulationen beider Zelllinien in der logarithmischen und respektive der Plateauphase des Wachstums mittels des XTT-Assays bestimmt.

Um die nötige Konzentration für eine Proliferationshemmung zu bestimmen, wurden die Zellen in einer geringeren Ausgangsmenge betrachtet, damit sie zum Zeitpunkt der Behandlung mit den HDACI in einer log-Phase des Wachstums sind und die konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl unter den HDACI in erster Linie auf ein gehemmtes Wachstum zurückzuführen ist (Abb. 4). Dennoch musste hierbei von einer verringerten Zunahme der Zellzahl durch den kombinierten Effekt eines Zellzyklusarrestes mit daraus folgender Proliferationshemmung, als auch durch eine Induktion des Zelltodes durch Apoptose ausgegangen werden, da dies mögliche bekannte Wirkungen der HDACI darstellten.

Simultan wurde für die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Toxizität, in erster Linie durch Apoptoseinduktion, eine größere Zellzahl betrachtet, damit zum Zeitpunkt der Behandlung die Zellen aufgrund des konfluierenden Wachstums auf begrenztem Raum in einer nicht proliferierenden Plateauphase sind, und somit die konzentrationsabhängige Abnahme der Zahl vitaler Zellen durch die HDACI-Behandlung im Wesentlichen durch die Toxizität bedingt war (Abb. 5).

Über das Wachstumsverhalten der Zellpopulationen in geringer Ausgangsmenge, die unbehandelt logarithmisch proliferieren würden, wurde der minimale Konzentrationsbereich bestimmt, bei dem eine Hemmung der Proliferation unter der Behandlung eintrat. Dieser Bereich wurde dann als unterer Grenzbereich sinnvoller Behandlungskonzentrationen der HDACI festgelegt.

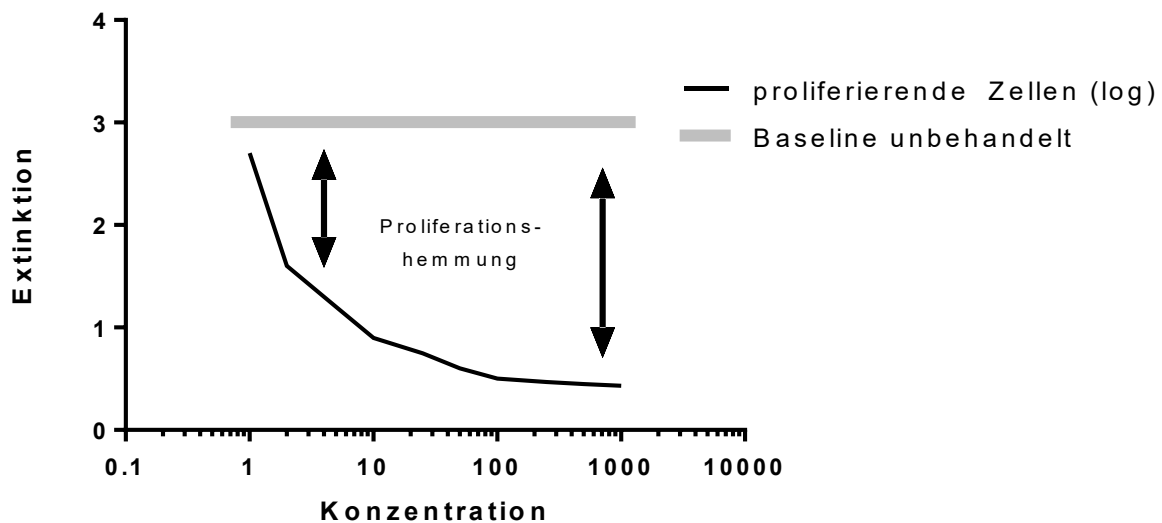


Abbildung 4: Schema des XTT-Assays zur Bestimmung des unteren Grenzbereichs

Schematische Darstellung der Deutung der Ergebnisse des XTT-Essays. Wirkung der HDACI in steigender Konzentration auf logarithmischer Skala (x-Achse). Die Extinktion korrelierte dabei logarithmisch mit der Anzahl vitaler Zellen. Die hellgraue Gerade zeigt die Baseline, also die Zellzahl unbehandelter Zellen, die das Zellwachstum in der gleichen Zeit ohne Behandlung erreicht hat. Die durch die Pfeile dargestellte Differenz zur Baseline in den exponentiell proliferierenden Zellen zeigt den proliferationshemmenden Effekt durch die HDACI.

In gleicher Weise wurde das Wachstumsverhalten von konfluent gewachsenen, nicht proliferierenden Zellen beobachtet. Dieses Verhalten wurde über die Aussaat einer hohen Ausgangsmenge an Zellen erreicht. Da hier im unbehandelten Fall keine Proliferation zu erwarten war, konnte die Verringerung der Zellzahl in erster Linie auf die Toxizität der Behandlung zurückgeführt werden. Der obere Konzentrationsbereich wurde als der Bereich definiert, bei dem noch keine ausgeprägte Toxizität zu beobachten war. Als Korrelat diente die gemessene Extinktion der Farbreaktion eines XTT-Assays als quantifizierbarer Marker der Zellviabilität.

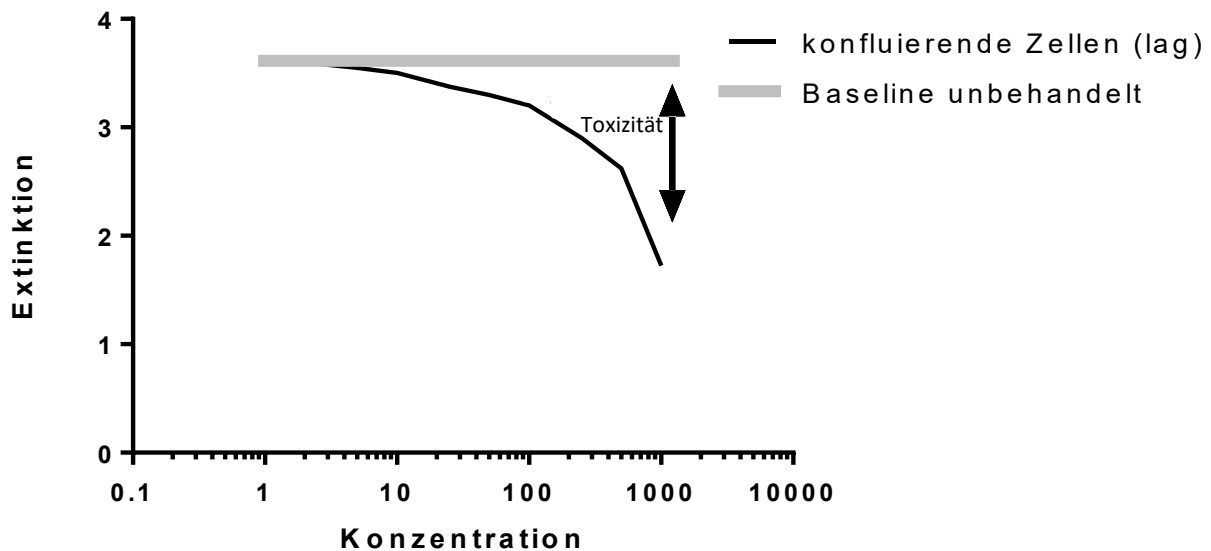


Abbildung 5: Schema des XTT-Assays zur Bestimmung des oberen Grenzbereichs

Schematische Darstellung der Deutung der Ergebnisse des XTT-Essays. Wirkung der HDACI in steigender Konzentration auf logarithmischer Skala (x). Die Extinktion korrelierte dabei logarithmisch mit der Anzahl vitaler Zellen. Die hellgraue Gerade zeigt die Baseline, also die Zellzahl unbehandelter Zellen, die das Zellwachstum in der gleichen Zeit ohne Behandlung erreicht hat. Die durch die Pfeile dargestellte Differenz zur Baseline in den nicht proliferierenden Zellen zeigt in erster Linie die Toxizität durch die HDACI.

So ergab sich für die Zellreihe A204 in der Behandlung mit TSA über 96 h ein sinnvoller Konzentrationsbereich unterhalb 100 ng/ml. Im Bereich oberhalb von 200 ng/ml kam es zu einer deutlichen Zunahme der Toxizität, welche sich in der Abnahme der Extinktion in der konfluent gewachsenen Zellpopulation zeigte (Abb. 6a).

Die Konzentration von 20 ng/ml zeigte im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung bereits eine deutliche Proliferationshemmung, so dass bereits diese niedrigeren Konzentrationen eine sichtbare Wirkung im Sinne der Proliferationshemmung aufweisen sollten (Abb. 6b).

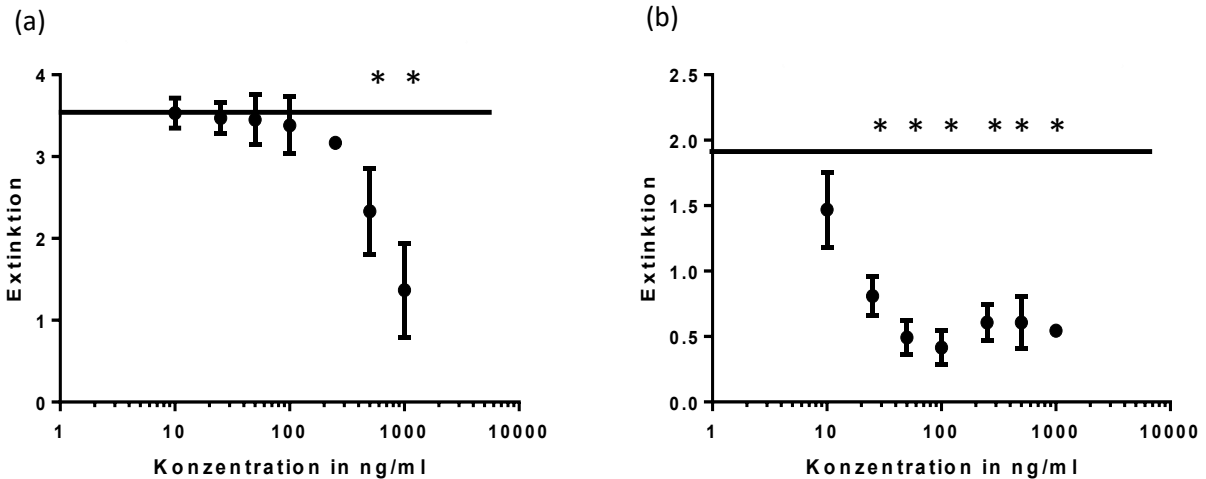


Abbildung 6: XTT-Assay der A204-Zellen nach Behandlung mit TSA über 96 h

A204-Zellen in der Behandlung mit TSA. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ist gegenüber der Konzentration von TSA in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert, die Balken die erste Standardabweichung ($n=3$). Die Horizontale zeigt die unbehandelte Kontrolle als Baseline.

(a) Bei 3000 Zellen als Ausgangsmenge wurde von einem konfluierenden Zellwachstum ausgegangen. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Baseline.

(b) Bei 500 Zellen Ausgangsmenge erfolgte die Behandlung von Zellen, die noch proliferieren. Die Signifikanz wurde mit Welch-ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Dunnett-T3-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Baseline.

In der Behandlung von A204 mit SAHA über 96 h zeigte sich bezüglich der Toxizität ein guter Konzentrationsbereich unterhalb von 5 μM . Auch hier kam es oberhalb dieser Konzentration zu einer deutlichen Zunahme der Toxizität (Abb. 7a). Die niedrigste getestete Konzentration lag hier bei 0,1 μM , welche eine geringe Proliferationshemmung zeigte. Eine signifikante Proliferationshemmung sahen wir aber erst bei Konzentrationen oberhalb von 0,2 μM (Abb. 7b).

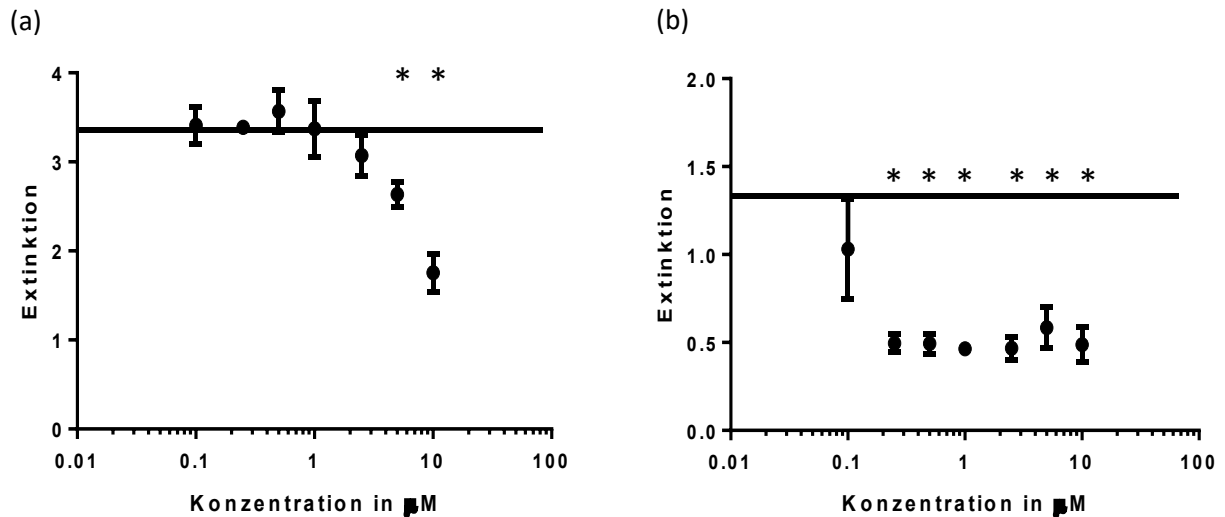


Abbildung 7: XTT-Assay der A204-Zellen nach Behandlung mit SAHA über 96 h

A204-Zellen in der Behandlung mit SAHA. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ist gegenüber der Konzentration von SAHA in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert, die Balken die erste Standardabweichung ($n=3$). Die Horizontale zeigt die unbehandelte Kontrolle als Baseline.

(a) Bei 3000 Zellen als Ausgangsmenge wurde von einem konfluierenden Zellwachstum ausgegangen. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Baseline.

(b) Bei 500 Zellen Ausgangsmenge erfolgte die Behandlung von Zellen, die noch proliferieren.

Die Signifikanz wurde mit Welch-ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Dunnett-T3-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Baseline.

In der Behandlung von MCF-7 mit TSA über 96 h kam es erst ab Konzentrationen oberhalb von 200 ng/ml zu einer scheinbaren Zunahme der Toxizität (Abb. 8a), die in unserer Stichprobe allerdings nicht als signifikant zu werten war. Eine Proliferationshemmung war schon bei Konzentrationen von 10 ng/ml zu beobachten (Abb. 8b). Jedoch schien der Effekt in der Graphik zunächst geringer ausgeprägt als bei den A204-Zellen. Allerdings bestand bei den MCF-7-Zellen eine niedrigere Grundextinktion, was als Korrelat des Umsatzes von Reduktionsfaktoren zu der geringeren Wachstums- und Zellumsatzkinetik der MCF-7-Zellen passt (Sutherland et al., 1983).

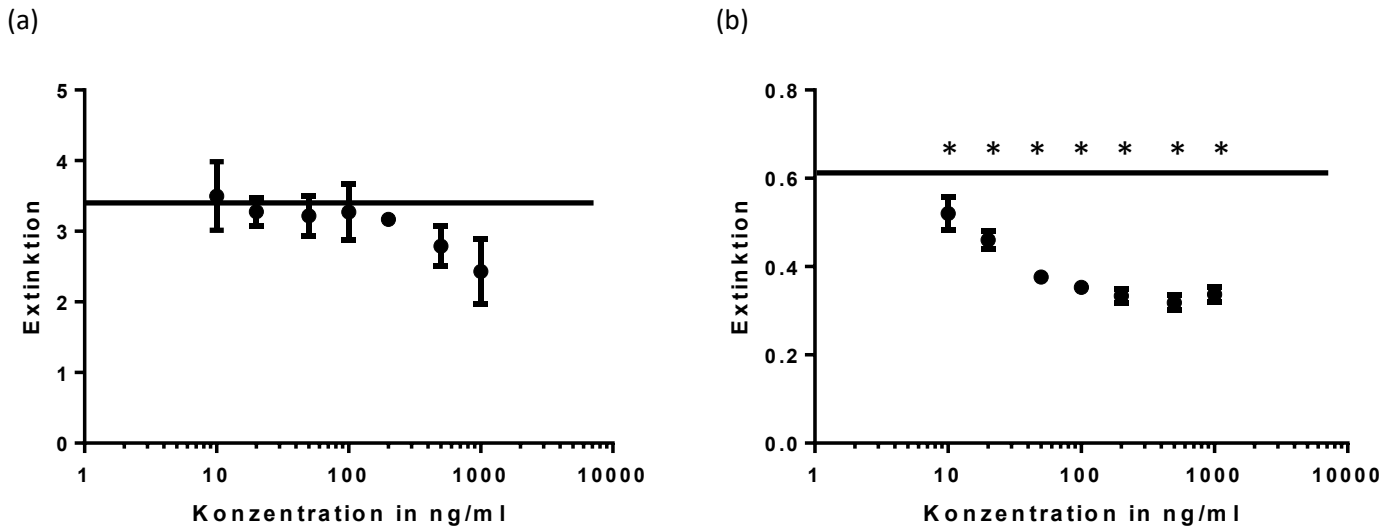


Abbildung 8: XTT-Assay der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit TSA über 96 h

Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ist gegenüber der Konzentration von SAHA in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert, die Balken die erste Standardabweichung. $n=3$. Die Horizontale zeigt die unbehandelte Kontrolle als Baseline.

(a) Bei 3000 Zellen als Ausgangsmenge wurde von einem konfluierenden Zellwachstum ausgegangen. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. In diesem Versuch konnte keine signifikante Abweichung der Messpunkte von der Baseline festgestellt werden ($p>0,05$).

(b) Bei 500 Zellen Ausgangsmenge erfolgte die Behandlung von Zellen, die noch proliferieren. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p<0,05$ gegenüber der Baseline.

MCF-7-Zellen zeigten sich insbesondere in der Proliferationshemmung und in der Behandlung mit SAHA resistenter als die Zellen der A204-Reihe, so dass Unterschiede in der Extinktion geringer ausgefallen sind, was wiederum für eine geringere Beeinflussung der Zellzahlen spricht (Abb. 9a und 9b). Daraus lässt sich möglicherweise auf eine höhere Resistenz der MCF-7-Zellen in der Behandlung mit HDACI schließen.

In der Behandlung von MCF-7 mit SAHA kam es auch bei der vom Hersteller angegebenen Höchstdosis von 10 μM zu einem nur geringen Anstieg der Toxizität. Eine deutliche Abnahme der Zellzahl in den konfluent gewachsenen Zellen zeigte sich auch nicht bei einer Behandlung mit der Höchstkonzentration von 10 μM (Abb. 9a). Außerdem zeigte sich in der Behandlung mit SAHA ebenfalls nur eine geringe Proliferationshemmung, diese war erst bei Konzentrationen oberhalb von 5 μM signifikant im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 9b). Dennoch haben wir im Weiteren davon abgesehen, die MCF-7-Zellen mit deutlich höheren Konzentrationen von SAHA zu behandeln, zum einen um den vom Hersteller

angegebenen wirksamen Bereich einzuhalten, zum anderen um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Zellsysteme zu erreichen. In den weiteren Wachstumsstudien zeigte sich bei der Zellzahl ohnehin ein deutlich größerer Einfluss der HDACI auf die MCF-7-Zellen, als es der indirekte Nachweis über die Viabilität mit dem XTT-Essay zunächst vermuten ließ.

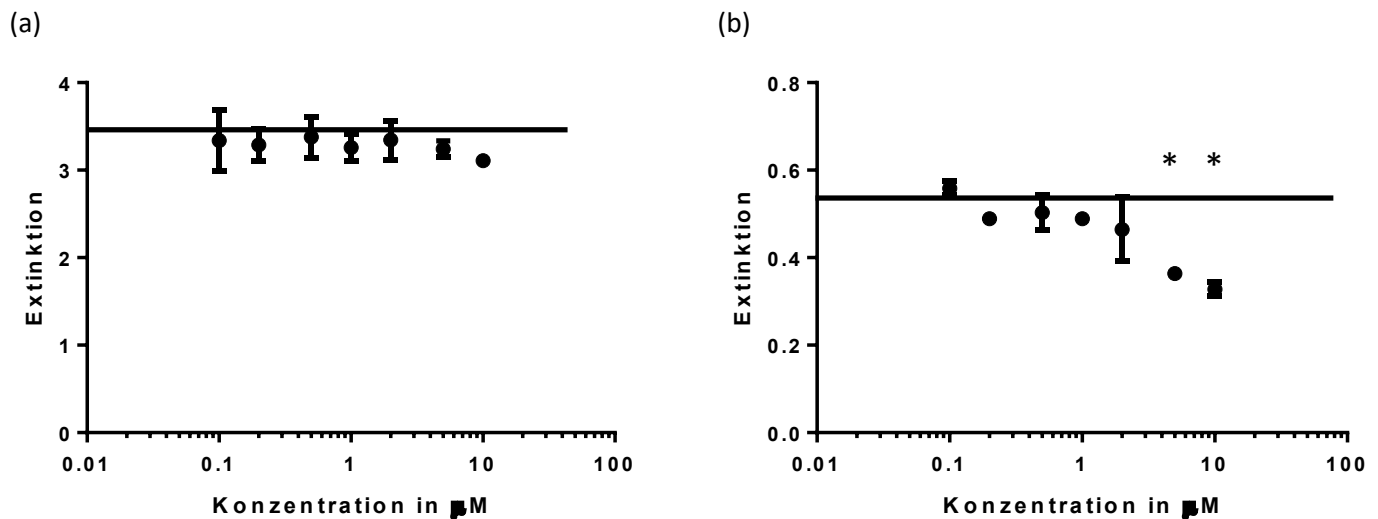


Abbildung 9: XTT-Assay der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit SAHA über 96 h

Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ist gegenüber der Konzentration von SAHA in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Messpunkte zeigen den Mittelwert, die Balken die erste Standardabweichung. $n=3$. Die Horizontale zeigt die unbeeandelte Kontrolle als Baseline.

(a) Bei 3000 Zellen als Ausgangsmenge wurde von einem konfluierenden Zellwachstum ausgegangen. Die Signifikanz wurde mit ANOVA bestimmt. In diesem Versuch konnte keine signifikante Abweichung der Messpunkte von der Baseline festgestellt werden ($p>0,05$).

(b) Bei 500 Zellen Ausgangsmenge erfolgte die Behandlung von Zellen, die noch proliferieren. Die Signifikanz wurde mit Welch-ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Dunnett-T3-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p<0,05$ gegenüber der Baseline.

In der Behandlung beider Zellreihen wurde anschließend im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit ein gemeinsamer Konzentrationsbereich für beide Zellreihen gewählt, jeweils an die Ergebnisse des XTT-Assays des jeweiligen HDACI angepasst. So wurden in der Folge für TSA Konzentrationen zwischen 10 und 100 ng/ml verwendet, bei SAHA Konzentrationen zwischen 1 und 5 µM.

3.2 Expression der Histondeacetylasen in unbehandelten Zellen

Die Expression der HDACs als Zielmolekül unserer Behandlung wurde in unbehandelten Zellen der verwendeten Zelllinien mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens bestimmt. Dadurch konnte ein Expressionsprofil der HDACs in den Tumorzellen bestimmt werden. Außerdem ergab sich so ein Hinweis, dass die Wirkung der Behandlung mit den HDACI tatsächlich auf der Inhibition der HDACs beruhen sollte.

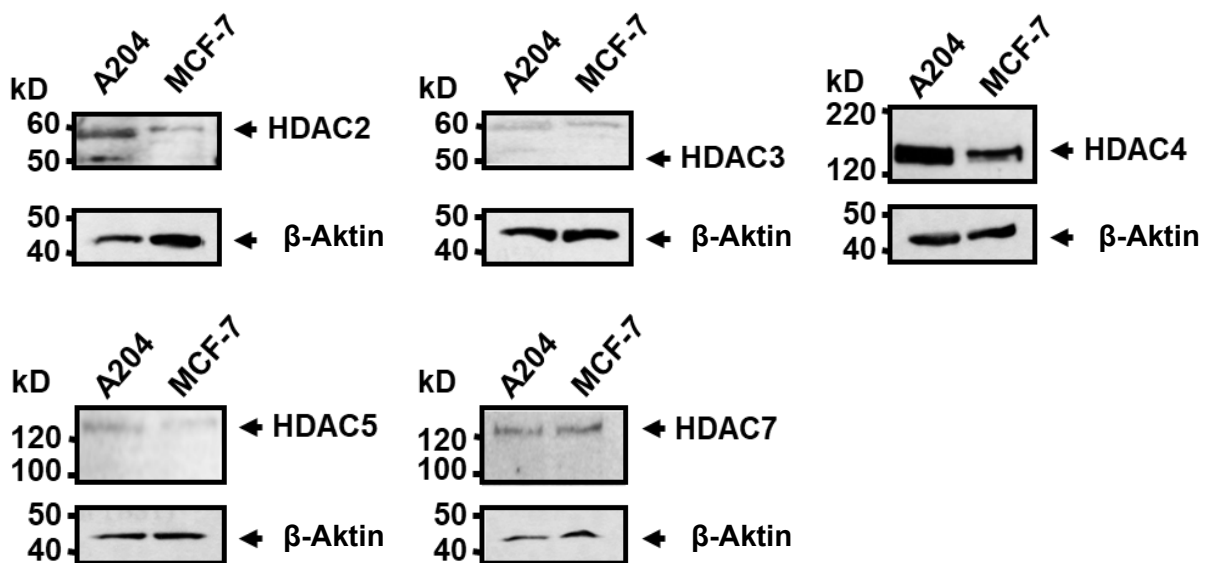


Abbildung 10: Western-Blot der HDAC-Subtypen in unbehandelten A204- und MCF-7-Zellen

Aufnahmen der Western-Blots nach Antikörpermarkierung verschiedener HDACs. Qualitativer Vergleich der Expression der einzelnen HDAC-Subtypen durch Gegenüberstellung beider unbehandelten Zellreihen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Das Ausmaß und die Sättigung der Bande entsprechen dem Ausmaß der Expression des gesuchten Proteins. Das scheinbare Molekulargewicht in kilo Dalton (kD) wird durch die Markierungen an der linken Seite des Western-Blots gezeigt.

Es zeigte sich eine geringere Expression der getesteten HDACs in den MCF-7-Zellen als in den A204-Zellen. In beiden Zellreihen zeigte sich eine nur sehr geringe Expression der HDACs 2 und 3 als Vertreter der Klasse I HDACs, wobei die Expression des HDAC2 in den A204-Zellen höher ist, als in den MCF-7-Zellen (Abb. 10).

HDAC4, HDAC5 und HDAC7 gehören zu der HDAC Klasse IIa. HDAC3 und HDAC5 werden dabei in beiden Zellreihen kaum exprimiert, HDAC4 wird dafür deutlich

exprimiert. Die Expression von HDAC7 ist in beiden Zellreihen ähnlich hoch. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass MCF-7-Zellen die meisten untersuchten HDACs weniger ausgeprägt exprimieren, als die A204-Zellen (Abb. 10).

HDAC2 ist in den A204 deutlich exprimiert, in den MCF-7-Zellen weniger ausgeprägt. Da es sich jedoch nur um einen qualitativen Nachweis handelt, ist ein positiver Effekt der HDACi auch in MCF-7-Zellen nicht auszuschließen.

Da in den Zellreihen A204 und MCF-7 HDAC3 kaum exprimiert wird, ist ein bedeutender Einfluss hier zum einen nicht zu erwarten. Zum anderen legt dies auch nahe, dass eine Behandlung mit selektiven HDAC3-Inhibitoren, wie z.B. RGFP699, BG45 oder T247, zunächst nicht sinnvoll erscheint, und in dieser Studie auch nicht durchgeführt wurde.

HDAC7 wird in beiden hier untersuchten Zellreihen exprimiert, daher ist anzunehmen, dass eine Inhibition durch HDACi auch über HDAC7 einen Effekt in Richtung Zellzyklusarrest zeigen kann.

Die stärkste Expression zeigte sich in beiden Zellreihen für HDAC4, in den A204-Zellen noch ausgeprägter als in den MCF-7-Zellen.

Aufgrund des Expressionsprofils in den unbehandelten Zellreihen, konnten wir zeigen, dass HDACs in den Zellen exprimiert werden, und dass beide Zellreihen ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, wenn auch die MCF-7-Zellen insgesamt eine geringere Expression zeigen. Aufgrund der deutlichen Expression von HDAC4 in beiden Zellreihen, kann bei einer übergreifenden effektiven Hemmung praktisch aller HDAC-Untergruppen, wie durch pan-Histondeacetylase-Inhibitoren, nämlich die HDACi TSA und SAHA, ein deutlicher Effekt durch die Inhibition von HDAC4 erwartet werden.

Geht man im Falle der HDAC von einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung aus, sollte ein großer Anteil der Effekte durch die HDACi auf die Inhibition von HDAC4 zurückzuführen sein. Ebenso, wenn auch weniger ausgeprägt, ist ein Effekt durch die Inhibition von HDAC2 und HDAC7 zu erwarten.

3.3 Immunfluoreszenz von H3K9ac

Durch die Behandlung mit den HDACI ist eine Zunahme der Acetylierung an Histonen und anderen molekularen Zielstrukturen zu erwarten. Durch die Markierung mit Antikörpern gegen acetylierte Histonseitenketten kann der Acetylierungsstatus der Histone vor und nach der Behandlung mit HDACI qualitativ bestimmt werden.

Für diesen Versuch wurde ein kommerzieller Antikörper gegen ein acetyliertes Lysin 9 an Histon 3 verwendet, welches ein mögliches Target für die durch die Inhibitoren gehemmten HDACs darstellt. Eine Zunahme des Acetylierungsstatus an H3K9 durch HDACI konnte bereits gezeigt werden (Hezroni et al., 2011).

Für beide Zelllinien wurden dafür Zellen für 24 h mit 100 ng/ml TSA oder 5 μ M SAHA behandelt, während die Kontrollzellen mit frischem Medium für dieselben 24 h parallel weiter inkubiert wurden.

Neben unbehandelten Kontrollen diente auch eine Behandlung mit IFN γ und TNF α als Vergleich.

Anschließend wurden die Zellen mit dem H3K9ac-Antikörper markiert und mit einer Kernfärbung mit DAPI gegengefärbt.

Im Folgenden zeigte sich in den Behandlungen sowohl mit SAHA als auch mit TSA in beiden Zellreihen ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 11; Abb. 12), was eindeutig für eine Zunahme der Acetylierung spricht, und somit auf eine effektive Hemmung der HDACs hinweist.

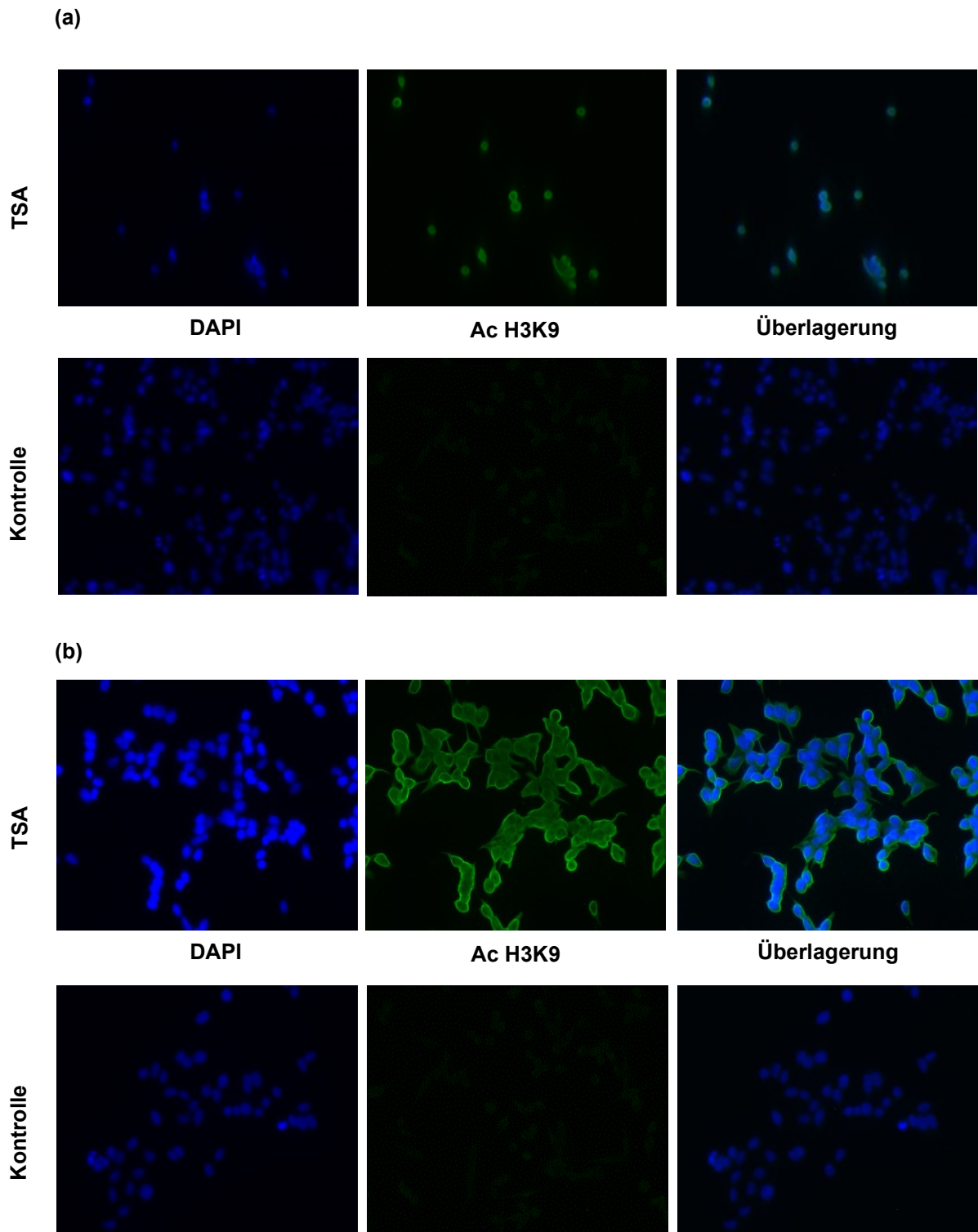


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit TSA (a) in A204-Zellen und (b) MCF-7-Zellen

Aufnahmen der Immunfluoreszenz von Kontrollzellen und TSA-behandelten Zellen. Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Kerbfärbung mittels DAPI, der ac H3K9-Antikörper-abhängigen Fluoreszenz und die Überlagerung der beiden Aufnahmen zu sehen. Im oberen Teil sind die A204-Zellen (a), im unteren Teil die MCF-7-Zellen (b) Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml TSA. Die Belichtungszeit für Kontrollzellen und TSA-behandelte Zellen war identisch. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Gruppen.

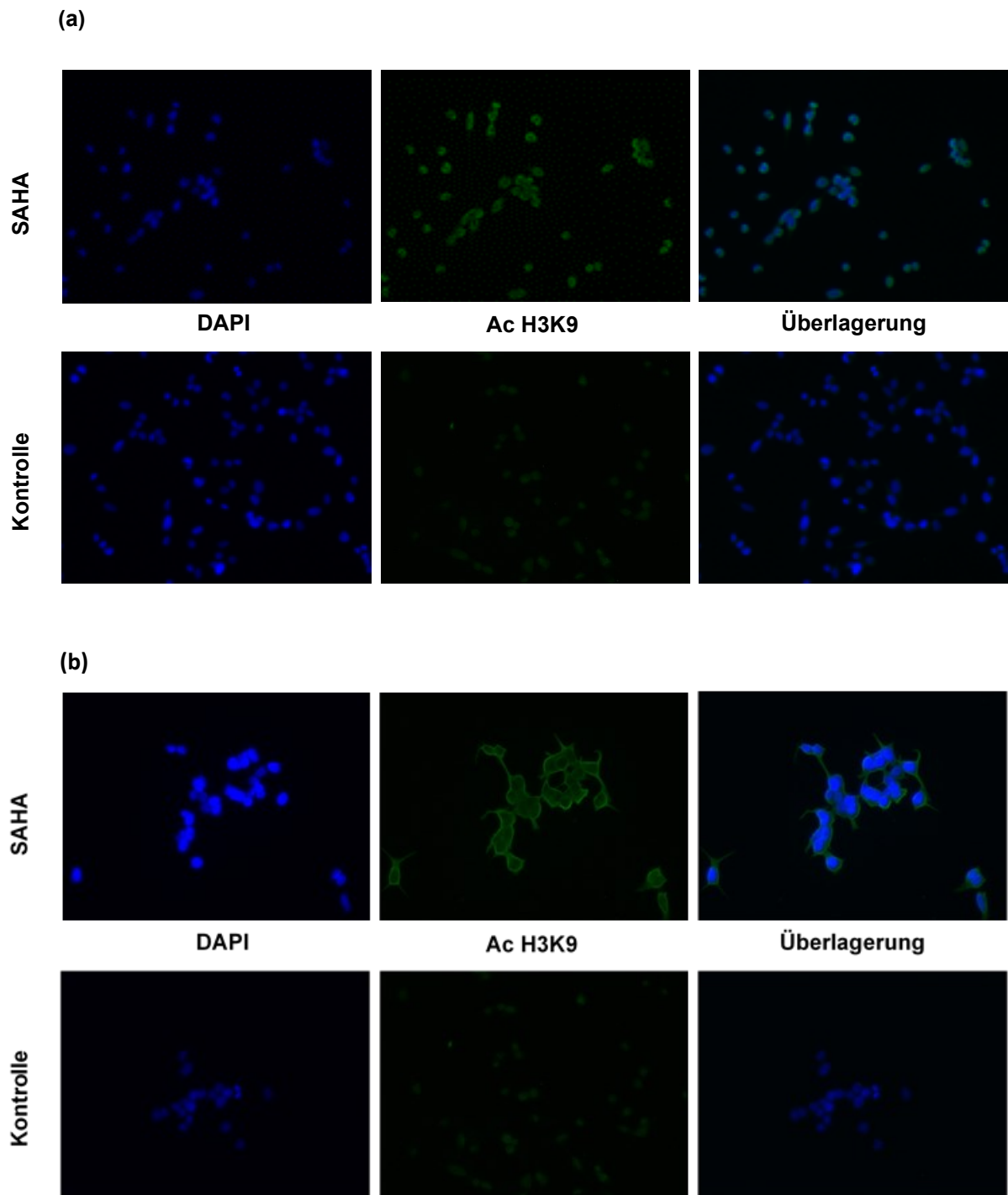


Abbildung 12: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit SAHA in A204- und MCF-7-Zellen

Aufnahmen der Immunfluoreszenz von Kontrollzellen und SAHA-behandelten Zellen. Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Kerbfärbung mittels DAPI, der ac H3K9-Antikörper-abhängigen Fluoreszenz und die Überlagerung der beiden Aufnahmen zu sehen. Im oberen Teil sind die A204-Zellen (a), im unteren Teil die MCF-7-Zellen (b) Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 5 μ M SAHA. Die Belichtungszeit für Kontrollzellen und SAHA-behandelte Zellen war identisch. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Gruppen.

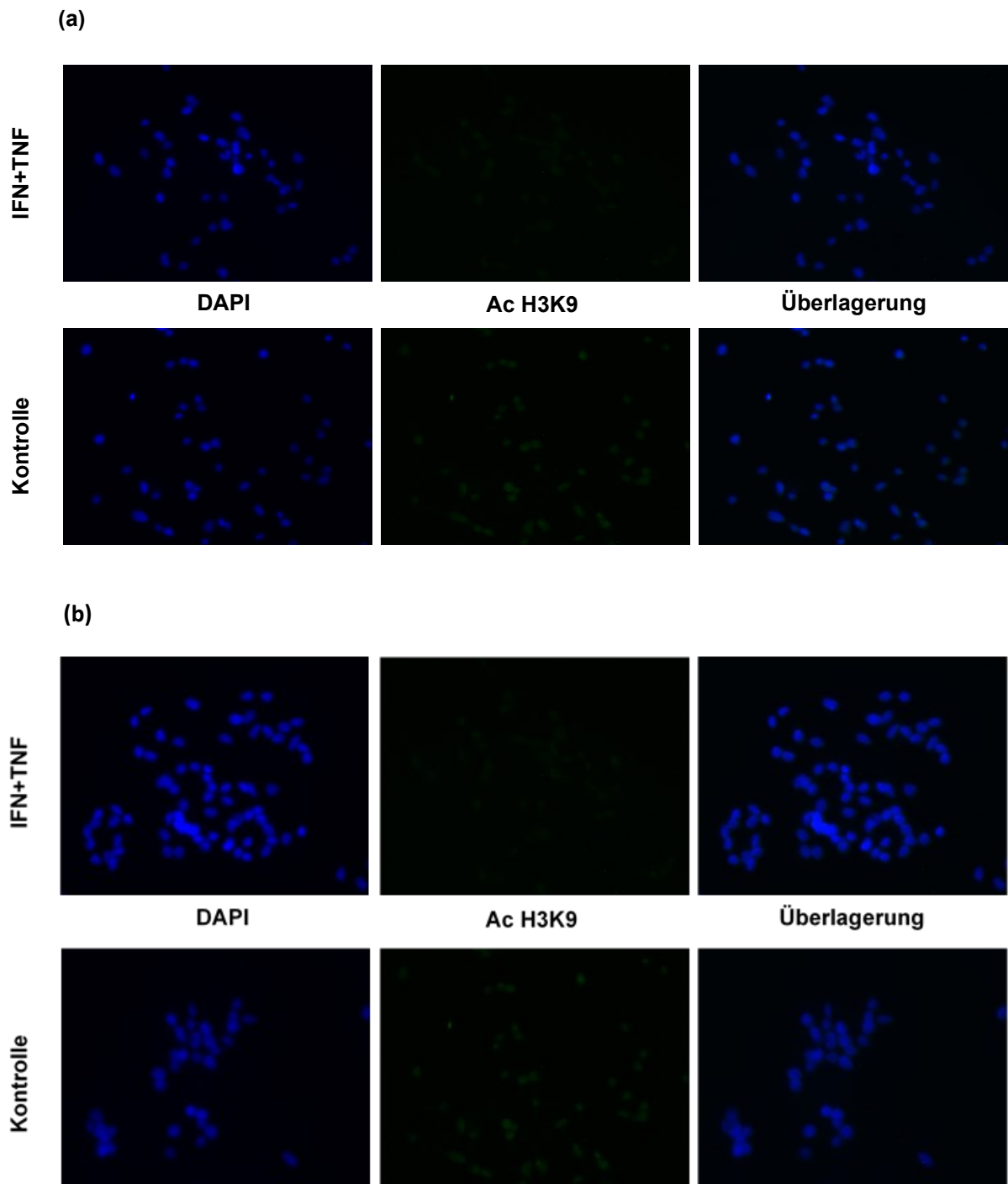


Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopie von H3K9ac unter Behandlung mit den Zytokinen IFN γ und TNF α in A204- und MCF-7-Zellen

Aufnahmen der Immunfluoreszenz von Kontrollzellen und Zytokin-behandelten Zellen. Von links nach rechts ist jeweils eine Aufnahme der Kerbfärbung mittels DAPI, der ac H3K9-Antikörper-abhängigen Fluoreszenz und die Überlagerung der beiden Aufnahmen zu sehen. Im oberen Teil sind die A204-Zellen (a), im unteren Teil die MCF-7-Zellen (b) Die Behandlung der Zellen erfolgte mit IFN γ +TNF α , bei den A204-Zellen mit 100 ng/ml +100 pg/ml, bei den MCF-7-Zellen mit 100 ng/ml+ 10 ng/ml. Die Belichtungszeit für Kontrollzellen und Zytokin-behandelte Zellen war identisch. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Gruppen.

In beiden Zellreihen und mit beiden verwendeten HDACI kommt es also zu einer Zunahme der Acetylierung an den Histonen, was die Inhibition der HDACs bestätigt und für die Wirksamkeit der HDACI in dem verwendeten Zellsystem spricht (Abb. 11 und 12).

In der Kontrolle mit IFN γ und TNF α bleibt die Acetylierung unter Behandlung so gering, dass sie unter den gegebenen Bedingungen und der gewählten Belichtungszeit nicht nachweisbar ist. Damit kommt es unter der Behandlung mit IFN γ und TNF α während der Inkubationszeit von 24 h nicht zu einer feststellbaren Zunahme der Acetylierung an H3K9 (Abb. 13).

3.4 Histondeacetylaseinhibitor-induzierter Wachstumsarrest

Die Proliferationshemmung, mit dem Ziel einen vollständigen Wachstumsarrest mit konstanten Zellzahlen zu erreichen, ist ein zentrales Kriterium der Seneszenz.

Eine aussagekräftige Methode, um die Proliferationshemmung durch die Behandlung nachzuweisen, ist das Zellwachstum von behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen zu messen und dann zu vergleichen.

In den folgenden Growth-Assays wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, so dass es 3 Wells mit identischer Behandlung und 3 Wells ohne Behandlung auf derselben Platte gab, die dann gemeinsam unter identischen Bedingungen inkubiert wurden.

Das entscheidende Augenmerk liegt bei diesem Wachstumsassay auf dem unterschiedlichen Verhalten der unbehandelten und behandelten Zellen im Übergang von p0 nach p1. Dafür wurde jeweils die gleiche Anzahl von Zellen mit und ohne Vorbehandlung ausgesät, allerdings nur in Medium, also unter identischen Bedingungen. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten ergab sich hierbei durch den anhaltenden Effekt der Vorbehandlung. Der proliferationshemmende Effekt ist also auf eine durch die zuvor durchgeführte Behandlung herbeigeführte Veränderung an den Zellen zurückzuführen.

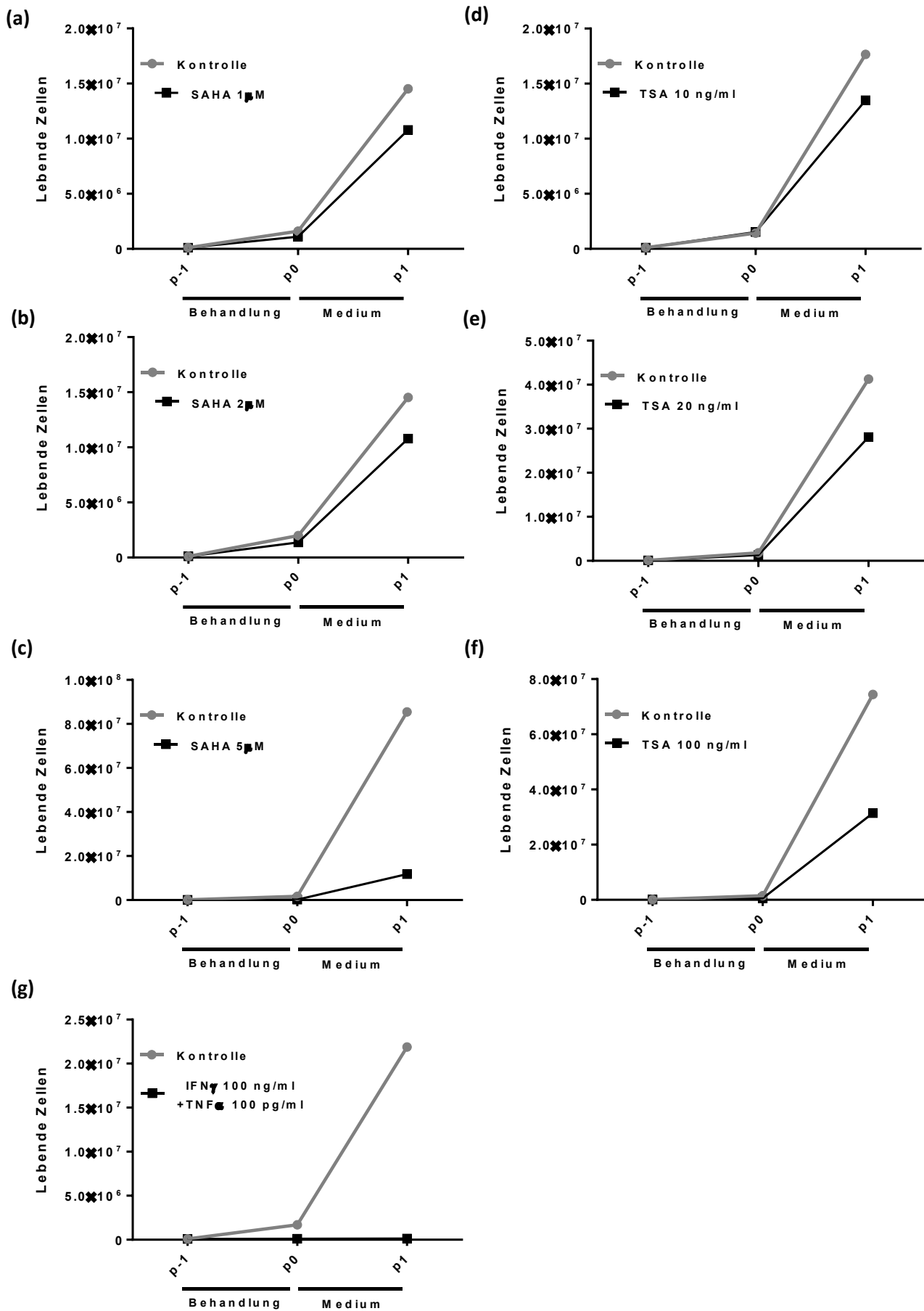


Abbildung 14: Wachstumskurven der A204-Zellen nach Behandlung mit HDACI oder Zytokinen

Wachstumskurven der A204-Zellen bei exponentiellem Zellwachstum in linearer Skalierung. Die X-Achse zeigt dabei die Zahl der Passage, die Y-Achse die Anzahl vitaler Zellen. Die graue Kurve zeigt jeweils die unbehandelten Zellen, die auf derselben Platte unter denselben Bedingungen als Kontrolle ausgesät wurden. Die Passage p-1 beschreibt die Aussaat von in der Regel 100 000 Zellen. p0 beschreibt die Passage der Zellen nach der Behandlung für mindestens 96 h. Die Passage p1 beschreibt die Zellzahl nach mindestens weiteren 96 h ohne weitere Behandlung. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt. (a)-(c) zeigt die Behandlung mit SAHA in steigenden Konzentrationen, (d)-(f) die Behandlung mit TSA und (g) die Behandlung mit IFN γ und TNF α .

Die Steigung der Kurven des Growth-Assays entspricht der Wachstumsrate, wobei eine identische Steigung derselben Wachstumsrate entspricht. Je flacher die Steigung, desto geringer die Wachstumsrate und damit die Proliferation. Ein waagrechter Verlauf der Kurve entspricht also einem vollständigen Wachstumsarrest, d.h. die Zellzahl bleibt von Passage zu Passage (annähernd) gleich.

Im Falle der A204 Zellen zeigte sich sowohl unter TSA als auch unter SAHA eine Abnahme der Zellzahl, was wiederum für eine Abnahme der Proliferationsrate unter der HDACI-Behandlung spricht. Die Abnahme der Proliferationsrate scheint sich dabei konzentrationsabhängig zu verhalten und mit zunehmender Konzentration der HDACI zu einer ausgeprägteren Proliferationshemmung zu führen. Auch unter den höchsten getesteten Konzentrationen der HDACI kommt es nicht zu einem vollständigen Wachstumsarrest, jedoch zeigt sich vor allem bei 5 μ M SAHA eine deutliche Zunahme der Wachstumshemmung (Abb. 14a-c). Die Wachstumshemmung ist weniger ausgeprägt bei TSA bis zu Konzentrationen von 100 ng/ml (Abb. 14d-f).

Die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α zeigt hingegen, dass für die A204-Zellen ein vollständiger Wachstumsarrest zu erreichen ist, der ein wichtiges Kriterium für die Seneszenzinduktion darstellt (Abb. 14g). In den A204-Zellen ist ein vollständiger Wachstumsarrest somit möglich, auch wenn dieser mit den verwendeten Konzentrationen der HDACI nicht erreicht wurde. Allerdings konnte eine deutliche und über die Behandlung hinaus anhaltende Proliferationshemmung erreicht werden.

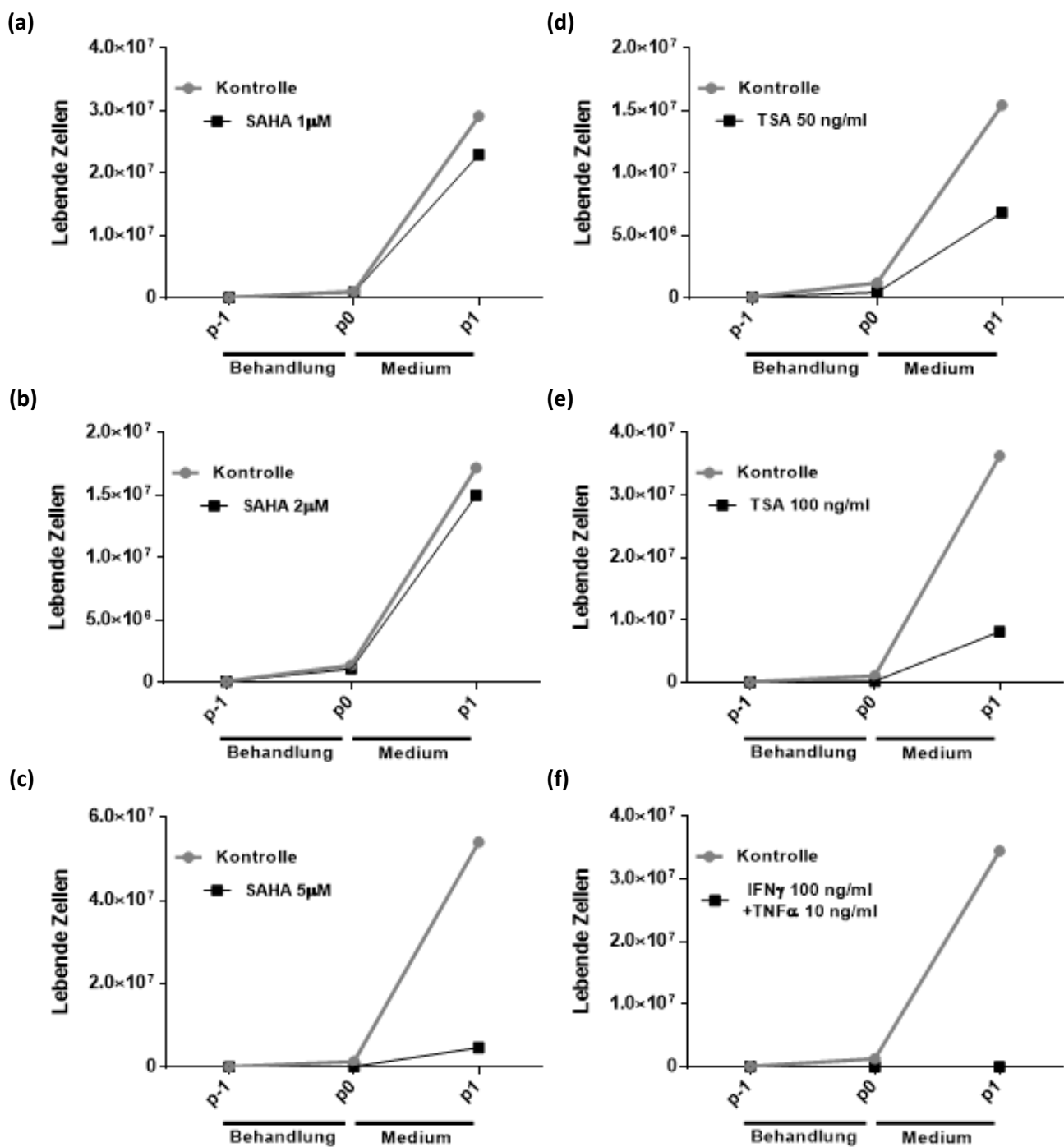


Abbildung 15: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen nach Behandlung mit HDACI oder Zytokinen

Wachstumskurven für die Behandlung der MCF-7-Zellen. Die X-Achse zeigt dabei die Zahl der Passage, die Y-Achse die Anzahl vitaler Zellen in linearer Skalierung. Die graue Kurve zeigt jeweils die unbehandelten Zellen, die auf derselben Platte unter denselben Bedingungen als Kontrolle ausgesät wurden. Die Passage p-1 beschreibt die Aussaat von in der Regel 100 000 Zellen. p0 beschreibt die Passage der Zellen nach der Behandlung für mindestens 96 h. Die Passage p1 beschreibt die Zellzahl nach mindestens weiteren 96 h ohne weitere Behandlung. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt. (a)-(c) zeigt die Behandlung mit SAHA in steigenden Konzentrationen, (d)-(e) die Behandlung mit TSA und (f) die Behandlung mit IFN γ und TNF α .

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den MCF-7 Zellen. Auch hier scheint es eine konzentrationsabhängige Wirkung der HDACI auf die Wachstumshemmung zu geben, wobei höhere Konzentrationen der HDACI positiv mit einer ausgeprägteren Proliferationshemmung korrelierten. In den MCF-7-Zellen konnte durch die HDACI in den verwendeten Konzentrationen jedoch kein vollständiger Wachstumsarrest erreicht werden. Allerdings zeigte sich auch hier eine deutliche und über die Behandlung mit den HDACI hinaus anhaltende Proliferationshemmung (Abb. 15a-e).

Auch die MCF-7 erreichen unter der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α einen vollständigen und über eine unbehandelte Passage anhaltenden Wachstumsarrest, was auch für diese Zelllinie die Möglichkeit des vollständigen Wachstumsarrests nachweist (Abb. 15f).

Zusammengefasst zeigt sich eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung beider Tumorzelllinien unter der Behandlung mit je einem der verwendeten HDACI im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, welcher auch über mindestens eine Passage nach Abschluss der Behandlung über 96 h anhält.

Beide Zellreihen lassen sich in einen vollständigen Wachstumsarrest versetzen, was durch die Positivkontrolle mit der Kombinationsbehandlung aus IFN γ und TNF α gezeigt werden konnte.

3.5 Anhaltender Wachstumsarrest

Ein Kriterium der Seneszenz ist die Permanenz des Wachstumsarrests. Im Falle einer erfolgreichen Seneszenzinduktion sollte daher ein Wachstumsarrest auch für weitere Passagen nach der Zytokin- beziehungsweise HDACI-Behandlung bestehen bleiben. Im Folgenden wurde daher erneut ein Wachstums-Assay nach zuvor beschriebenem Schema durchgeführt. Jedoch erfolgte hier die Behandlung für eine Dauer von 96 h, anschließend die Beobachtung der Proliferationsrate über mehrere unbehandelte Zyklen. Da nicht davon auszugehen ist, dass 100% der behandelten Zellen in ein seneszenten Stadium beziehungsweise eine anhaltende Proliferationshemmung übergehen, ist kein vollständiger Wachstumsarrest zu erwarten, da die verbliebenen teilungsfähigen Zellen aufgrund ihres exponentiellen Wachstumsverhaltens die Zellen in Wachstumsarrest nach einigen Passagen aufgrund ihrer inzwischen viel höheren Anzahl überlagern. Wie viele Passagen es jedoch dauert, bis sich die Proliferationsraten wieder an die der Kontrolle angleichen, gibt Aufschluss darüber, wie groß der Anteil an seneszenten Zellen zu Beginn war.

Aufgrund der logarithmischen Darstellung im Schaubild zeigt sich die Proliferationsrate in der Steigung der Kurve. Die logarithmische Skalierung ermöglicht es zudem kleinere Unterschiede in den unteren Zellzahlbereichen besser darzustellen. Außerdem ist so die Darstellung großer Zellzahlbereiche über mehrere Zehnerpotenzen einfacher und deutlicher möglich.

Als Vergleich dient auch hier die Behandlung mit IFN γ und TNF α .

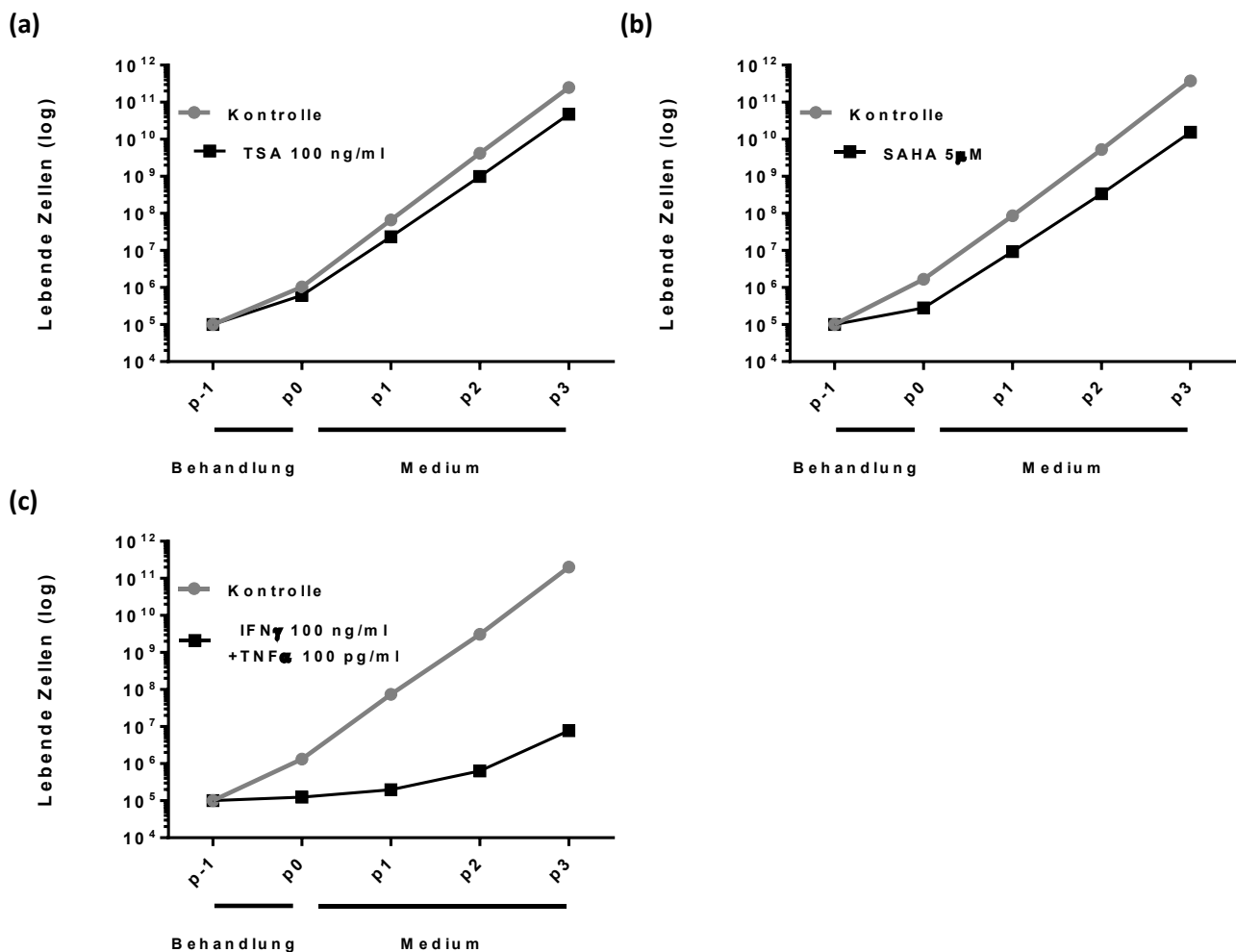


Abbildung 16: Wachstumskurven der A204-Zellen über vier Passagen

Zahl vitaler A204-Zellen an der Y-Achse in logarithmischer Skalierung und Passagenzahl an der X-Achse. Die graue Kurve zeigt die unbehandelten Kontrollen. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

Bei idealem logarithmischem Wachstumsverhalten sollten die Kontrollen aufgrund des exponentiellen Wachstums annähernd eine Gerade zeigen. (a) zeigt die Behandlung mit TSA, (b) die Behandlung mit SAHA und (c) die Behandlung mit IFN γ und TNF α . Die Behandlung erfolgte mit 100 ng/ml TSA, 5 μ M SAHA und die Positivkontrolle mit 100 ng/ml IFN γ + 100 pg/ml TNF α .

In der Behandlung mit TSA zeigte sich erneut nur ein unvollständiger Wachstumsarrest. Bereits in der dritten unbehandelten Passage hatte sich die Proliferationsrate weitgehend an die der unbehandelten Kontrolle angeglichen (Abb. 16a).

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Behandlung mit SAHA. Auch wenn der initiale Wachstumsarrest ausgeprägter ist, zeigte sich bereits nach einer unbehandelten Passage eine Angleichung an die Proliferationsrate der unbehandelten Kontrolle (Abb. 16b).

Bei den A204-Zellen zeigte sich in der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α ein beinahe vollständiger Wachstumsarrest. Auch ohne weitere Behandlung blieb die Proliferationsrate nach 3 Passagen unterhalb der unbehandelten Kontrolle, was für einen nachhaltigen Wachstumsarrest auch ohne weitere Behandlung spricht (Abb. 16c).

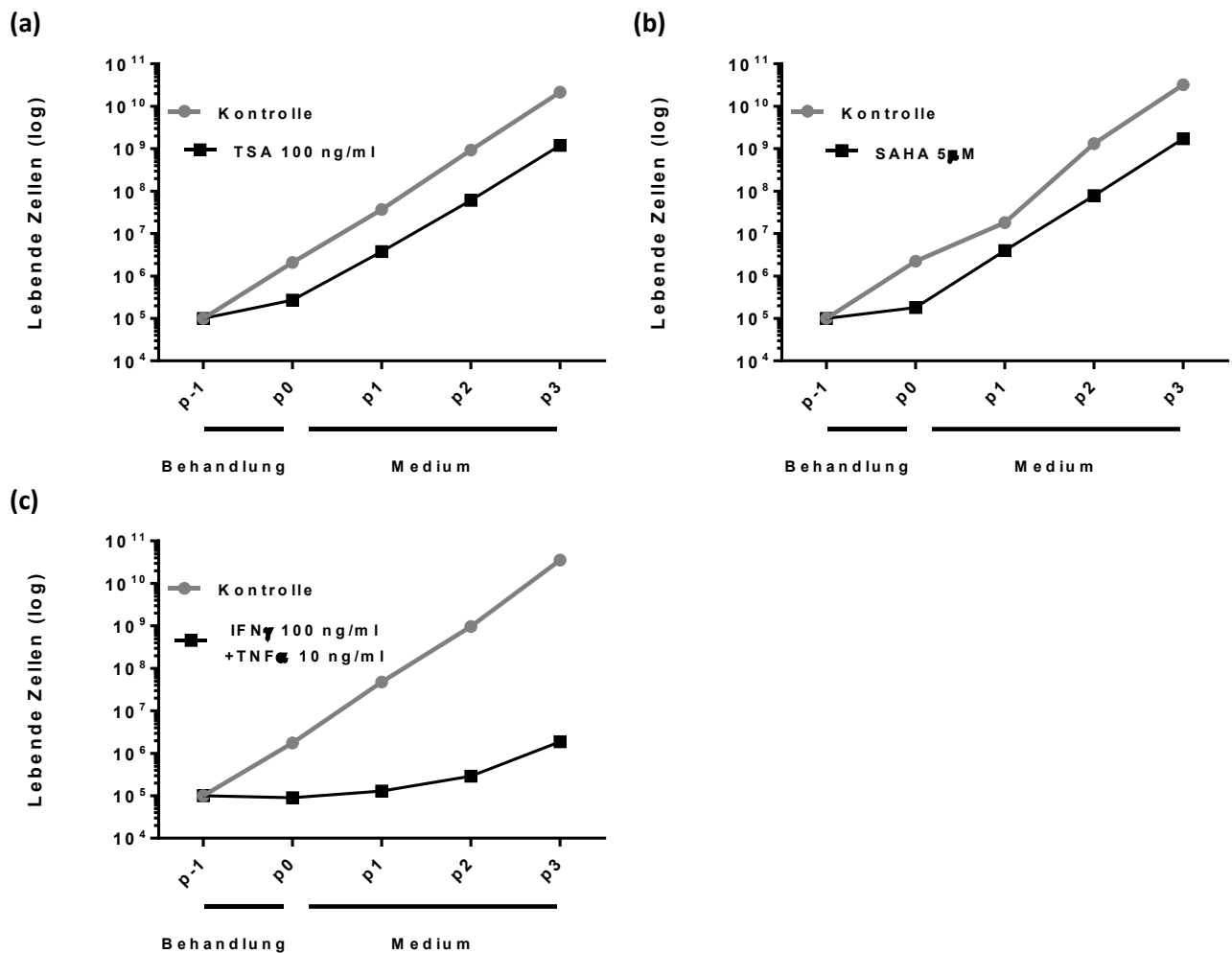


Abbildung 17: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen über vier Passagen

Zahl vitaler MCF-7-Zellen an der Y-Achse in logarithmischer Skalierung und die Passagenzahl an der X-Achse. Die graue Kurve zeigt die unbehandelten Kontrollen. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

(a) zeigt die Behandlung mit TSA, (b) die Behandlung mit SAHA und (c) die Behandlung mit IFN γ und TNF α . Die Behandlung erfolgte mit 100 ng/ml TSA, 5 μ M SAHA und die Positivkontrolle mit 100 ng/ml IFN γ + 10 ng/ml TNF α .

Die Behandlung mit SAHA und TSA verhält sich auch in MCF-7-Zellen ähnlich wie bei den A204-Zellen. Nach initialem unvollständigem Wachstumsarrest kommt es relativ schnell, nach 1-2 unbehandelten Passagen, wieder zur Angleichung an die Proliferationsrate der unbehandelten Kontrolle (Abb. 17a und 17b).

Auch im Fall der MCF-7-Zellen erbrachte die Behandlung mit der Positivkontrolle IFN γ und TNF α einen vollständigen Wachstumsarrest, mit einer konstant erniedrigten Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Somit kann man in MCF-7-Zellen von einem permanenten Wachstumsarrest ausgehen (Abb. 17c).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit den hier verwendeten Konzentrationen der HDACI in den verwendeten Zelllinien kein permanenter Wachstumsarrest induziert werden konnte.

3.6 Morphologische Veränderungen nach Histondeacetylaseinhibitor-Behandlung

Im Folgenden wurden unbehandelte Zellen beider Zelllinien jeweils mit Zellen, die über 96 h mit je einem der beiden HDACI behandelt wurden, bezüglich der induzierten morphologischen Veränderungen verglichen.

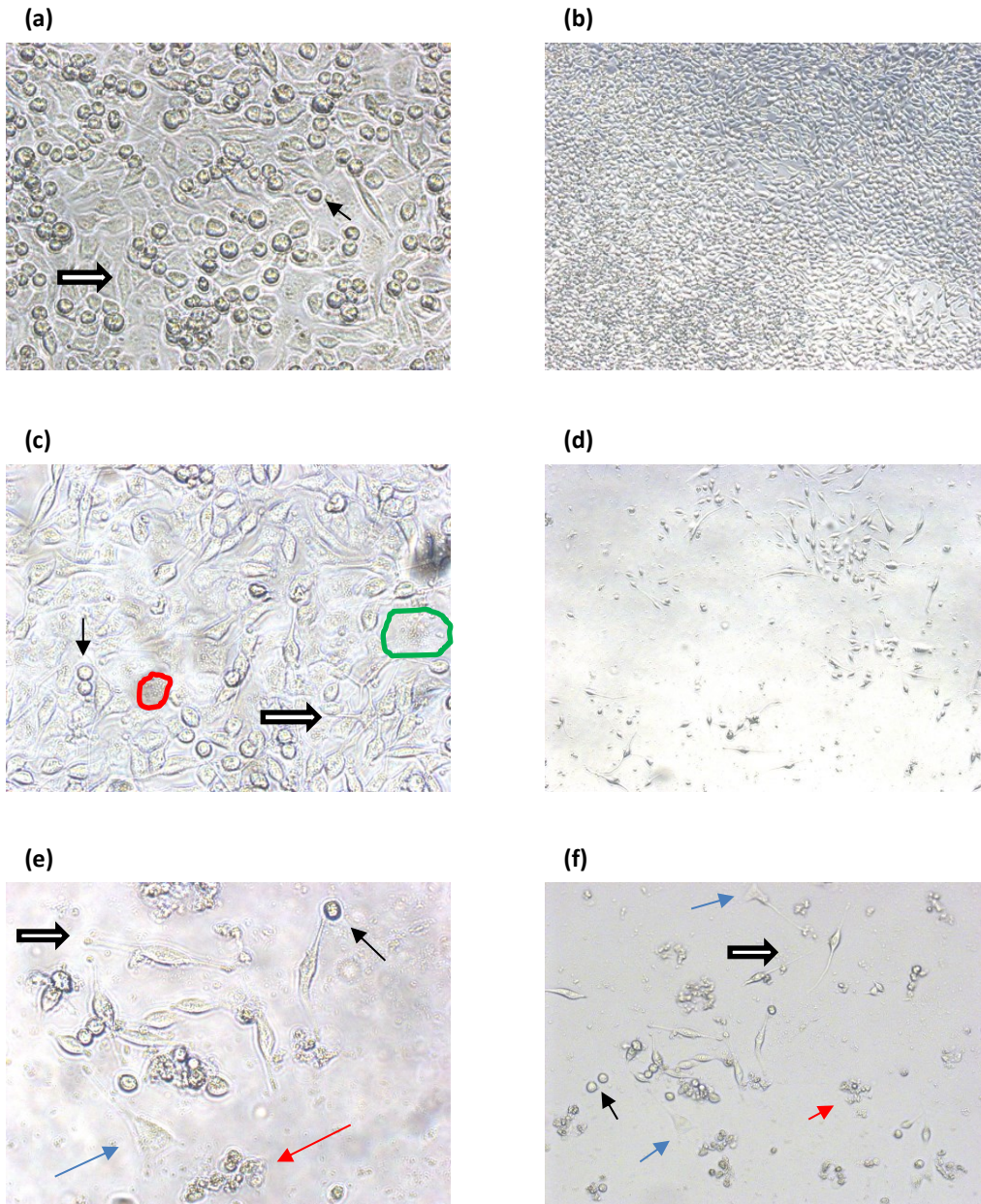


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen der A204-Zellen

(a) Unbehandelte A204-Zellen. 400x Vergrößerung, der dünne schwarze Pfeil zeigt die runde Morphologie, der dicke schwarz umrandete Pfeil die spindelförmige Form der A204-Zellen.

(b) Unbehandelte A204-Zellen. 100x Vergrößerung, konfluierendes Wachstumsmuster

(c) 400x Vergrößerung. Behandlung mit 5 µM SAHA über 96 h. Rarefizierung der runden Morphologie (dünner schwarzer Pfeil). Vergrößerten Zellkerne (rot umrandeter Zellkern) und reichlich Zytoplasma (grün umrandete Zelle). Dendritus-ähnliche Ausläufer (dick-umrandeter schwarzer Pfeil).

(d) 100x Vergrößerung. Behandlung mit 100 ng/ml TSA. Zellrarefizierung und morphologische Veränderungen.

(e)+(f) Kontrollbehandlung der A204-Zellen mit 100 ng/ml IFN γ und 100 pg/ml TNF α über 96 h.

(e) 400x Vergrößerung und (f) 200x Vergrößerung. Rarefizierung der runden Morphologie (schwarzer dünner Pfeil), dendritische Zellausläufer (dick-umrandeter schwarzer Pfeil), großer Zellkern und reichlich Zytoplasma (blauer Pfeil), Zelltrümmer und Zellreste abgestorbener Zellen (roter Pfeil).

Die unbehandelten A204-Zellen zeigten eine Besonderheit, nämlich dass diese in zwei verschiedenen distinktiven Morphologien in der Kultur vorliegen können. Zum einen zeigten sich spindelförmige Zellen mit kleinem Zellkern, zum anderen kreisrunde Zellen mit etwas prominenterem Zellkern, welche scheinbar in einer zweiten Schicht vorkommen. Auch die kreisrunden Zellen ließen sich physikalisch nicht ohne Weiteres mobilisieren, so dass auch hier von einer Adhärenz zur Oberfläche der Kulturschale bzw. zu den dort adhärennten spindelförmigen Zellen ausgegangen werden muss (Abb. 18a und 18b).

Unter der Behandlung mit den HDACI kam es zu einer Verringerung der Proliferation, was sich in einer verminderten Zelldichte zeigte. Die Zellen konnten unter der Behandlung in der gleichen Zeit, in der die unbehandelten Zellen ein konfluierendes Wachstum zeigten, die Kulturplatte nicht füllen und zeigten teils unbesiedelte Areale. Zusätzlich veränderte sich die Morphologie, insoweit, dass die runden Zellen seltener wurden und teils ganz verschwanden. Die spindelförmigen Zellen wurden zum Teil flächiger und nahmen sowohl an Zytoplasma als auch Zellkerngröße zu. Zusätzlich zeigte sich zum Teil ein eher kleiner Phänotyp, bei dem die spindelförmigen Ausläufer länger und schmaler wurden, und einzelne Zellen entfernt an Neurone mit Dendriten erinnerten. Dabei zeigen sich ähnliche morphologische Veränderungen unter der Behandlung mit SAHA und TSA (Abb. 18c und 18d).

Auffällig war, dass die runde Morphologie vor allem in Arealen mit wenig Zelldichte kaum zu finden war, wohingegen in Bereichen mit hoher Zelldichte vermehrt der runde Phänotyp zu sehen war. Man kann daher annehmen, dass der runde Phänotyp eine Art zweiten Layer darstellt, der sich ausbildet, wenn die Zellen im ersten Layer bereits konfluierend zusammengewachsen sind.

In der Kontrollbehandlung der A204-Zellen mit IFN γ und TNF α konnten ähnliche Veränderungen beobachtet werden, wie unter der Behandlung mit den HDACI. Neben der deutlichen Verminderung der Zellzahl kam es auch hier zu morphologischen Veränderungen zu flachen, zytoplasmareichen Zellen mit vergrößertem Zellkern und kleinen Zellen mit verlängerten, Dendriten-artigen Ausläufern. Auffällig hierbei war aber die deutliche Zunahme an Zelltrümmern und avitaler Zellreste (Abb. 18e und 18f). In der Kombinationsbehandlung mit IFN γ und TNF α muss also auch von einer nicht zu unterschätzenden Toxizität ausgegangen werden, am ehesten im Sinne einer Apoptoseinduktion. In den Einzelbehandlungen mit HDACI war dies nicht in dieser Ausprägung zu beobachten, da ein nicht toxischer Konzentrationsbereich für die

entsprechenden Zellen bereits im Vorfeld bestimmt wurde. Allerdings zeigte sich unter diesen Konzentrationen der HDACI auch kein vollständiger Wachstumsarrest, welcher bei höheren Konzentrationen eventuell möglich gewesen wäre.

Zusammenfassend zeigten die A204-Zellen distinktive Veränderungen unter der HDACI-Behandlung, die zu den Kriterien eines seneszenten Phänotyps passen. Die morphologischen Veränderungen der mit HDACI behandelten Zellen zeigten dabei Ähnlichkeiten mit den Zellen, die mit IFN γ und TNF α behandelt wurden. Allerdings zeigten sich in der Behandlung mit den Zytokinen vermehrt Hinweise für apoptotische und nekrotische Zellen, welche unter den HDACI in dieser Form nicht aufgetreten sind. Aus den XTT-Assays war zudem bekannt, dass höhere Konzentrationen der HDACI auch zu einem vermehrten Absterben der Zellen führen. Für das Erreichen eines vollständigen Wachstumsarrestes kann daher ein Zusammenspiel aus Seneszenzinduktion und Apoptose-/Nekroseinduktion plausibel sein, da es unwahrscheinlich scheint, dass 100% der Zellen in einen seneszenten Phänotyp übergehen. Die verbleibenden proliferierenden Zellen könnten in diesem experimentellen Ansatz durch Apoptose bzw. Nekrose zerstört werden.

3.7 Seneszenzassoziierte-beta-Galaktosidase-Assay

Bei der Induktion eines seneszenten Phänotyps ist von einer Zunahme der Aktivität der SA-beta-Galaktosidase auszugehen.

Für diesen Versuch wurden Zellen beider Zelllinien erneut mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden verwendeten HDACI behandelt.

Anschließend wurde in den Proben mit Hilfe eines SA-beta-Gal-Kits die SA-beta-Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Dabei wurden die SA-beta-Gal-positiven Zellen mit der Farbreaktion aus x-Gal blau markiert (Abb. 19).

Anschließend wurde der Anteil SA-beta-Gal-positiver Zellen bestimmt und mit den unbehandelten Kontrollen, sowie mit der Positivkontrolle, das heißt der Behandlung mit IFN γ und TNF α verglichen.

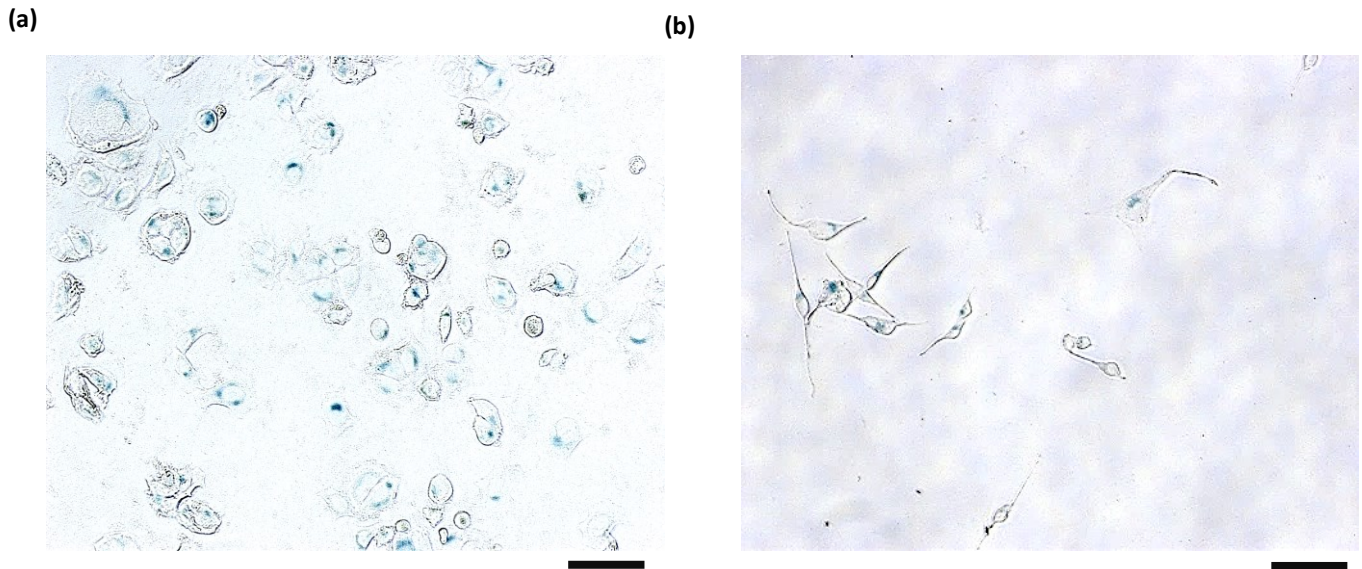


Abbildung 19: SA-beta-Galaktosidase-Färbung mittels X-Gal der mit HDACI behandelten MCF-7-Zellen und A204-Zellen

(a) 400x Vergrößerung. Seneszenztypische Veränderung der Morphologie der MCF-7-Zellen bei gleichzeitig positiver blau-grüner X-Gal-Färbung perinukleär, hier nach Behandlung mit SAHA 5 µM über 96 h. Der schwarze Balken entspricht 100 µm

(b) 400x Vergrößerung. Seneszenztypische Veränderung der Morphologie der A204-Zellen bei gleichzeitig positiver blau-grüner X-Gal-Färbung perinukleär, hier nach Behandlung mit TSA 100 ng/ml über 96 h. Der schwarze Balken entspricht 100 µm

Im Falle der MCF-7 Zellen zeigten bereits die Kontrollen eine hohe beta-Gal-Aktivität, so waren bereits bis zu 35% der Zellen ohne Behandlung SA-beta-Galaktosidase positiv.

Jedoch stieg die beta-Gal-Aktivität unter der Behandlung mit den HDACI weiter an, in den hohen Konzentrationen auf über 80% positive Zellen. Dieser Wert reicht damit an die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α heran, die ebenfalls bei 80% positiver Zellen liegt. In zunehmenden Konzentrationen der HDACI zeigte sich auch eine korrespondierende Zunahme der positiven Zellen, was auf eine mögliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der HDACI hindeutet (Abb. 20a).

Die A204-Zellen zeigten in der Medium-Kontrolle eine deutlich niedrigere Aktivität als die MCF-7-Zellen. Diese lag bei 15% SA-beta-Galaktosidase-positiven Zellen ohne Behandlung. Durch die Behandlung mit den HDACI kam es auch hier zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Steigerung der Aktivität. In den hohen Konzentrationen bis auf das Vierfache der unbehandelten Kontrollen. Die Werte erreichten einen Anteil positiver Zellen von bis zu 70%. Es zeigte sich auch hier eine

klare Konzentrationsabhängigkeit der SA-Beta-Gal-Induktion. Die Werte der höchsten verwendeten Konzentrationen der HDACI lagen in einem vergleichbaren Bereich wie die Positivkontrolle unter der Behandlung mit IFN γ und TNF α (Abb. 20b).

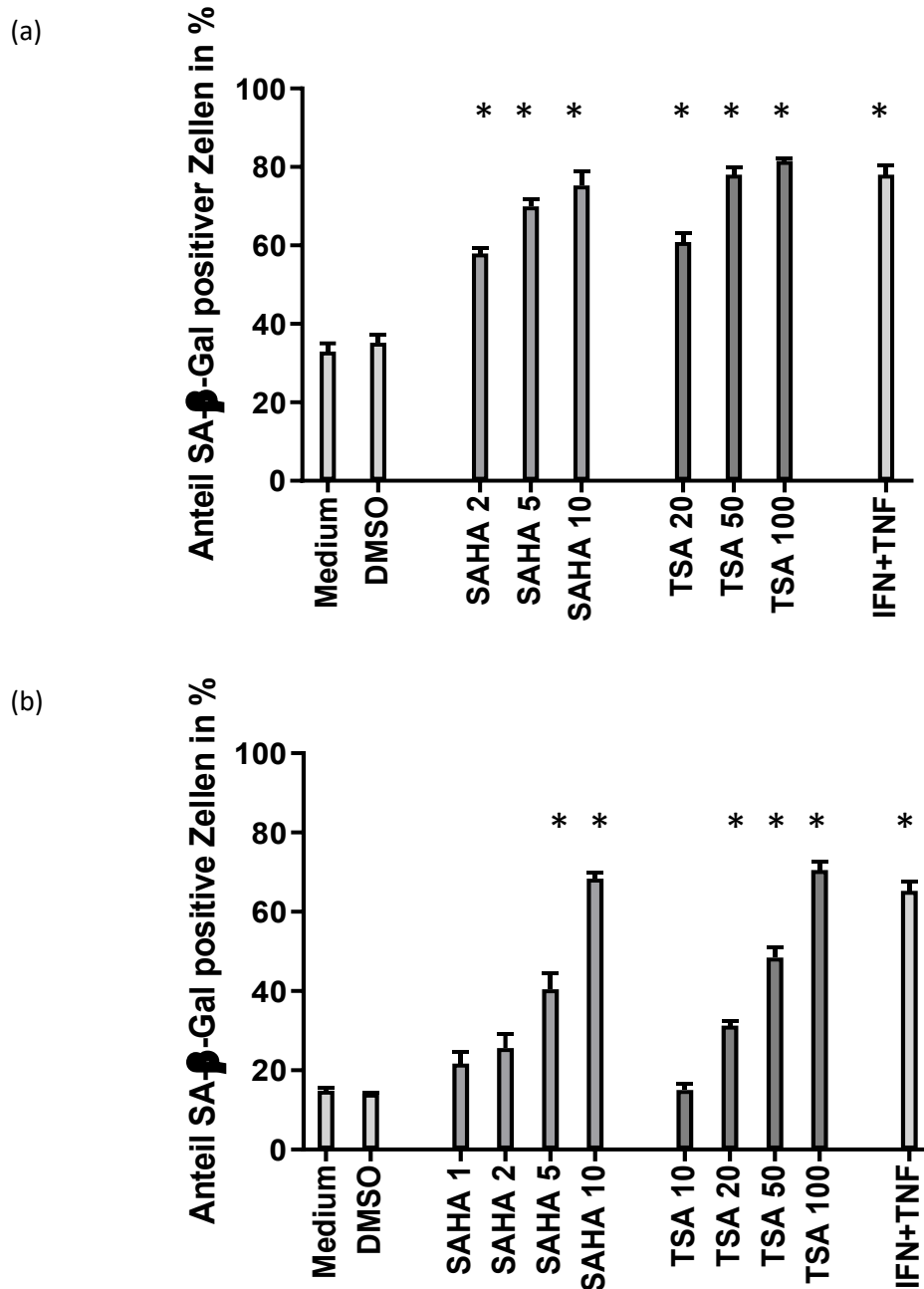


Abbildung 20: Auswertung des Anteils SA-beta-Gal-positiver Zellen

(a) MCF-7-Zellen. Y-Achse: Anteil der positiv gewerteten Zellen. X-Achse: Art der durchgeführten Behandlung, jeweils mit 96 h Inkubation. SAHA-Konzentration in μ M; TSA in ng/ml. IFN γ + TNF α -Behandlung mit 100 ng/ml + 10 ng/ml. Der Balken zeigt den Mittelwert, der Strich oberhalb der Balken zeigt die erste Standardabweichung (n=6).

Die Signifikanz wurde mit ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle mit DMSO.

(b) A204-Zellen. Y-Achse: Anteil der positiv gewerteten Zellen. X-Achse Art der durchgeführten Behandlung, jeweils mit 96 h Inkubation. SAHA-Konzentration in μM ; TSA in ng/ml. IFN γ + TNF α -Behandlung mit 100 ng/ml + 100 pg/ml. Der Balken zeigt den Mittelwert, der Strich oberhalb der Balken zeigt die erste Standardabweichung (n=6).

Die Signifikanz wurde mit Welch-ANOVA und Post-Hoc-Tests mit Dunnett-T3-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle mit DMSO.

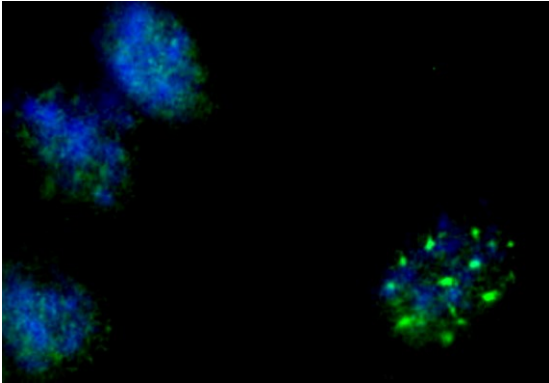
Durch die HDACI kommt es somit in beiden Zelllinien zu einem deutlichen Anstieg der seneszenzassoziierten Aktivität der SA-beta-Galaktosidase. Eine Induktion von SA-beta-Gal durch die HDACI war in beiden Zelllinien möglich und zeigte eine Korrelation mit den verwendeten Konzentrationen.

Interessanterweise erreicht die SA-beta-Gal-Induktion durch die höchsten verwendeten HDACI-Konzentrationen einen Anteil positiver Zellen, der an die Werte der Kontrolle mit IFN γ und TNF α herankommt. Jedoch gilt es zu bedenken, dass alle Zellen mit einer positiven Farbreaktion als positiv gewertet wurden, auch wenn (noch) keine seneszenztypische Änderung der Morphologie eingetreten war, welche sich nur bei einem Teil der behandelten Zellen zeigte.

3.8 Analyse der seneszenzassoziierten Heterochromatinfoci nach Histondeacetylaseinhibitor-Behandlung

Im Zuge der Seneszenzinduktion wird eine Zunahme der Translokation von pHP1 γ in seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci (SAHF) beschrieben. Durch die Detektion dieser SAHF mittels Immunfluoreszenz (Abb. 21) sollte deren Zunahme unter der Behandlung mit HDACI und als Positivkontrolle der Zytokinkombinationsbehandlung untersucht werden (Abb. 21).

a.)



b.)

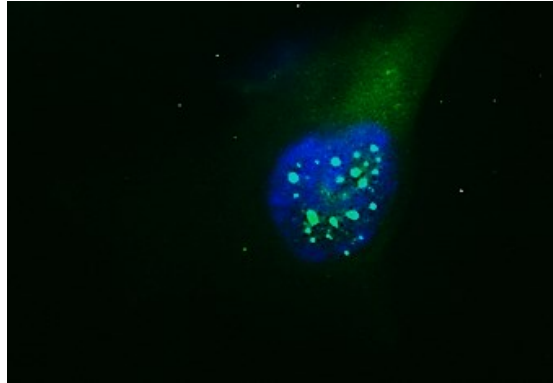


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von pHP1 γ und Darstellung von SAHFs

(a) Immunfluoreszenzfärbung von pHP1 γ in unbehandelten MCF-7-Zellen. Auf der linken Seite des Bildes sind drei Zellen ohne deutliche punktförmig markierte Heterochromatinfoci zu sehen, rechts im Bild eine Zelle mit mindestens 8 Foci. Diese wurde in der Auswertung als positive Zelle gewertet. Viele MCF-7-Zellen zeigten auch ohne Behandlung Heterochromatinfoci, daher wurde ein Cutoff von mehr als 8 Foci gewählt, um eine MCF-7-Zelle als positiv zu werten und die Möglichkeit einer Semiquantifizierung zu etablieren (abgeleitet von Braumüller et al., 2013).

(b) Immunfluoreszenzdarstellung der markierten pHP1 γ -Foci im Nucleus bei A204-Zellen. Diese Zellen wurden mit IFN γ und TNF α behandelt. Kernfärbung mit DAPI (blau). Die Translokations-Foci leuchten aufgrund der Markierung grün im blau angefärbten Nucleus. Ähnlich wie bei den MCF-7-Zellen wurde ein Cutoff für die Anzahl an Foci im Kern gewählt, um eine Semiquantifizierung zu ermöglichen, im Falle der A204-Zellen wurde ein Cutoff von 6 Foci gewählt. Hier ein typisches Beispiel einer A204-Zelle, die im Versuch als positiv gewertet wurde, da mehr als 6 positive Foci vorliegen.

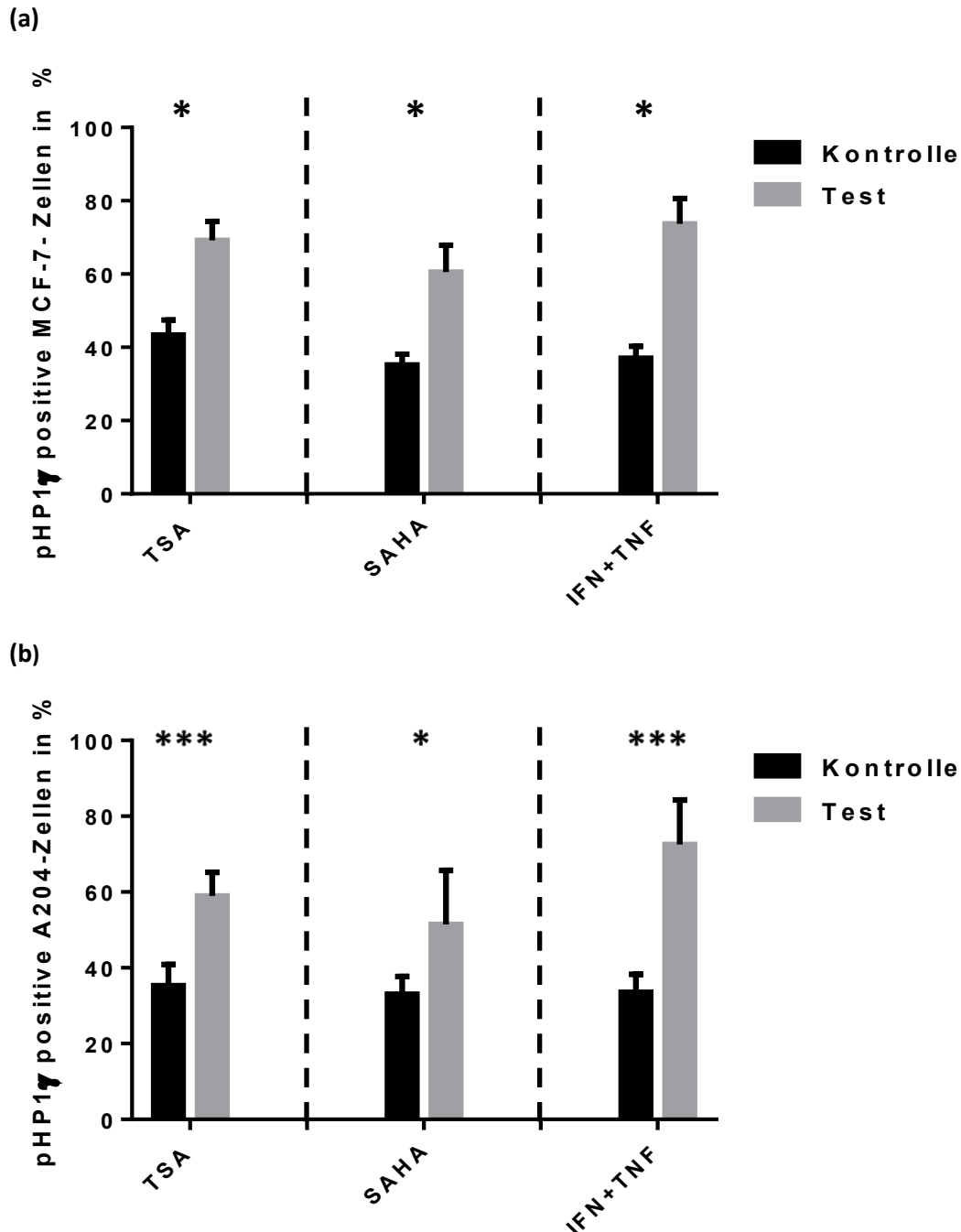


Abbildung 22: Auswertung der pHP1 γ -positiven Zellen in HDACI- und Zytokin-behandelten MCF-7-Zellen und A204-Zellen

(a) Y-Achse: Anteil der positiv gewerteten MCF-7-Zellen an der Anzahl aller Zellen in %; schwarzer Balken: Kontrolle mit Medium und DMSO; grauer Balken: Behandlung entsprechend der Legende der X-Achse. TSA 100 ng/ml; SAHA 5 μ M; IFN γ +TNF α 100 ng/ml + 10 ng/ml.

(b) Analog für die A204-Zellen. TSA 100 ng/ml; SAHA 5 μ M; IFN γ +TNF α 100 ng/ml + 100 pg/ml.

Der Balken zeigt den Mittelwert, die Striche oberhalb des Balkens zeigen die erste Standardabweichung (n=6).

Die Signifikanz des Unterschieds zur korrespondierenden Kontrolle wurde im Students-t-Test berechnet. Das Konfidenzintervall wurde durch Sterne * dargestellt: * entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,005$; *** entspricht $p < 0,0005$.

Allerdings zeigten sich auch in den unbehandelten Kontrollen bereits zahlreiche Signale von pHP1 γ , was die Bewertung der Zunahme SAHF erschwerte. Dieses Problem wurde insbesondere bei den MCF-7-Zellen deutlich, die bereits eine hohe Anzahl an SAHFs ohne Behandlung zeigten (Abb. 21a).

Um trotzdem eine Zunahme der SAHFs festzustellen, wurde für die A204-Zellen ein Cutoff von mindestens 6 pHP1 γ -positiven SAHF im Nucleus gewählt, ab dem eine Zelle als positiv galt. Im Falle der MCF-7-Zellen war die Grundaktivität so hoch, dass sogar ein Cutoff von 8 Foci gewählt wurde, um so eine Semiquantifizierung anhand der SAHFs pro Zellkern zu ermöglichen.

Unter Berücksichtigung des jeweiligen Cutoffs kommt es in beiden Zelllinien zu einer Zunahme der pHP1 γ -positiven SAHF im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, sowohl in der Behandlung mit den HDACI als auch in der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α (Abb. 22). Dabei liegt in beiden Zelllinien bereits eine hohe Grundaktivität in den Kontrollen von etwa 40% vor. Die Behandlung mit TSA zeigt einen etwas höheren Anstieg der Anzahl an SAHFs als SAHA. Bei den MCF-7-Zellen reichen die Werte nach TSA-Behandlung beinahe an die Zahl der SAHFs der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α heran.

Aufgrund der Assoziation von pHP1 γ mit SAHFs und der Zunahme der SAHFs im Zuge der Seneszenzinduktion (Zhang et al., 2007) ist auch im hier untersuchten System in vitro der Hinweis einer Seneszenzinduktion unter den HDACI in den behandelten Zelllinien zu finden. Zudem findet sich auch hier ein ähnliches Verhalten im Vergleich zur Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α , die bekanntermaßen zur Seneszenzinduktion führt.

3.9 Wachstumsarrest in der Kombinationsbehandlung mit Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren

IFN γ zeigte in einigen Tumorzellen bereits in der Monobehandlung eine Proliferationshemmung und die Induktion eines seneszenten Phänotyps (Wang et al., 2014).

In der Kombination mit TNF α wurde dieser Effekt deutlich verstärkt. Zudem wurde ein permanenter Wachstumsarrest durch die Kombination der Zytokine IFN γ und TNF α erreicht (Rentschler et al., 2018). Diese Kombination entspricht dem natürlichen Mechanismus von TH1-Helferzellen zur Tumorkontrolle während einer Immunreaktion (Braumüller et al., 2013; Brenner et al., 2020).

HDACI sind dafür bekannt, die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika zu modifizieren (Rosato and Grant, 2004; Marks and Dokmanovic, 2005). Aufgrund dieser publizierten Vorarbeiten lag der Ansatz einer Kombination von HDACI und IFN γ zur vollständigen Seneszenzinduktion nahe.

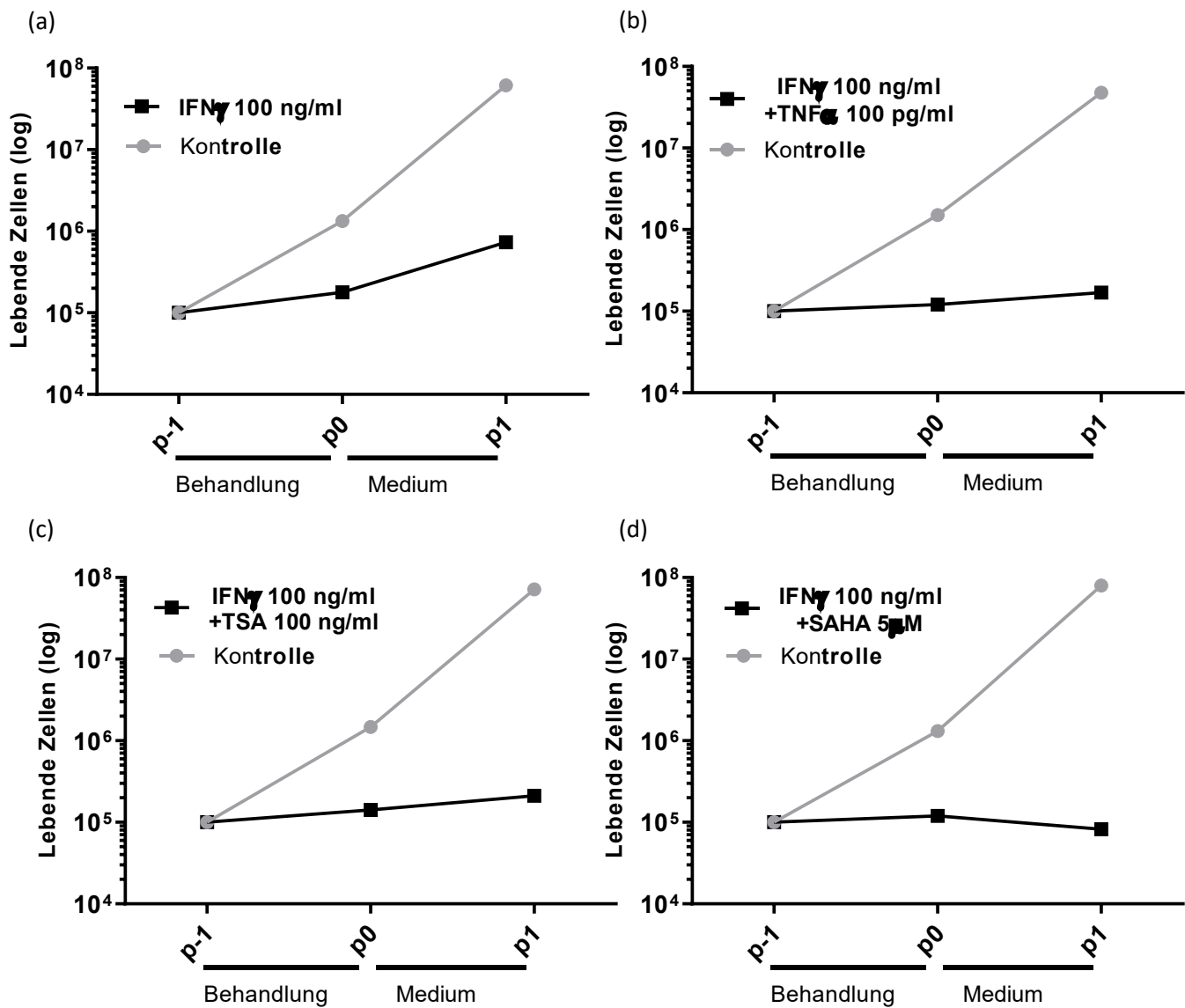


Abbildung 23: Wachstumskurven der A204-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI

Wachstumskurven der A204-Zellen in der Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI in logarithmischer Skalierung, jeweils mit eigener unbehandelter Kontrolle (graue Kurve). Die schwarze Kurve zeigt die entsprechende Behandlung. Die Y-Achse zeigt die vitalen Zellen in logarithmischer Skalierung, die X-Achse die Passagenzahl. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

(a) zeigt die Einzelbehandlung mit IFN γ 100 ng/ml, (b) die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α . (c) stellt die Behandlung mit IFN γ und TSA und (d) die Behandlung mit IFN γ und SAHA dar.

Bereits die Einzelbehandlung mit IFN γ zeigte eine deutliche Proliferationshemmung in beiden Zelllinien (Abb. 23a und 24a), vergleichbar mit der Wirkung der Einzelbehandlung mit den HDACI (Abb. 14 und 15).

Die Kombination von IFN γ mit je einem der beiden verwendeten HDACI erfolgte durch simultane Inkubation mit Medium, dem beide Behandlungsstoffe in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt wurden.

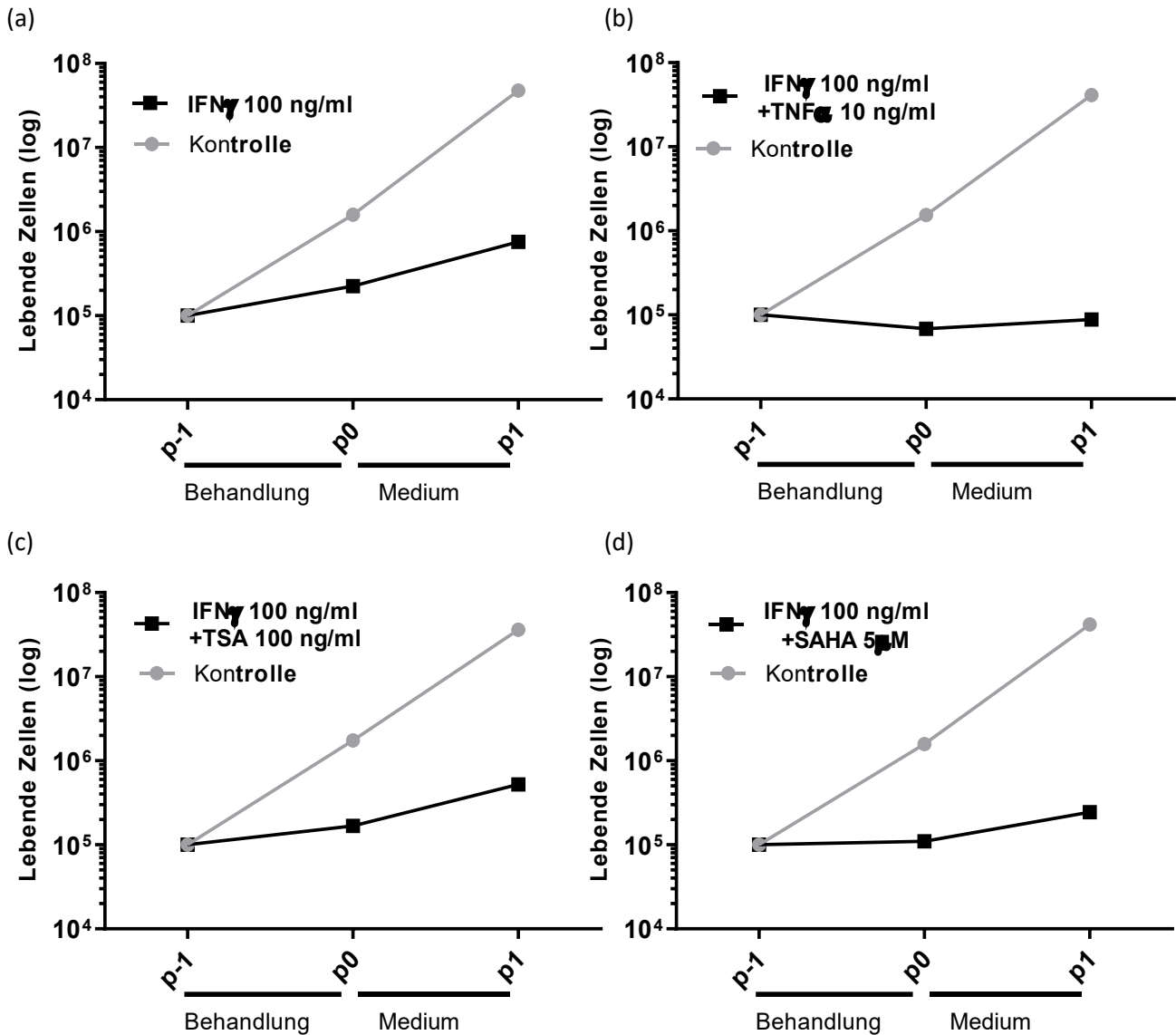


Abbildung 24: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI

Wachstumskurven der MCF-7-Zellen in der Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI in logarithmischer Skalierung, jeweils mit eigener unbehandelter Kontrolle (graue Kurve). Die schwarze Kurve zeigt die entsprechende Behandlung. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

(a) zeigt die Einzelbehandlung mit IFN γ , (b) die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α .

(c) stellt die Behandlung mit IFN γ und TSA und (d) Kombination von IFN γ und SAHA dar.

Strenggenommen musste als vollständiger Wachstumsarrest eine konstante Zellzahl von

100 000 in den Folgepassagen angenommen werden, technisch gesehen erschien dies jedoch nicht sinnvoll, so dass ein vollständiger Wachstumsarrest in Anlehnung an die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α festgelegt wurde. In dieser Kombination ist die Möglichkeit eines vollständigen Wachstumsarrests bereits bekannt, daher wurde das Ausmaß der Proliferationshemmung durch IFN γ und TNF α als Bezugswert genutzt. Die Kombination aus HDACI und IFN γ musste in den folgenden Passagen somit eine Zellzahl auf oder unter dem Niveau der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α erreichen, damit dies als vollständiger Wachstumsarrest gewertet wurde.

Unter dieser Annahme konnte durch die Behandlung mit IFN γ und SAHA ein vollständiger Wachstumsarrest in den A204-Zellen erreicht werden (Abb. 23d), welche das Niveau der Kombination aus IFN γ und TNF α erreicht (Abb. 23b). In der Kombination mit IFN γ und TSA konnte der vollständige Arrest nach diesem Kriterium nicht ganz erreicht werden, da die Zellzahl in Passage p1 über dem Niveau von IFN γ und TNF α lag. Allerdings zeigte sich eine deutliche Zunahme der Wachstumshemmung gegenüber der IFN γ -Einzelbehandlung (Abb. 23c).

In den MCF-7-Zellen konnte der vollständige Wachstumsarrest nur durch die Kontrolle mit IFN γ und TNF α erreicht werden (Abb. 24b). Hierbei zeigte sich aber eine deutliche Reduktion unter die initial ausgesäte Zellzahl von 100 000 auf etwa 50 000 Zellen, was auf die zusätzliche Induktion des Zelltods hindeutet.

In der Kombination IFN γ und SAHA (Abb. 24d) konnte immerhin eine deutliche Zunahme der Wachstumshemmung gegenüber der IFN γ -Einzelbehandlung (Abb. 24a) festgestellt werden, in der Behandlung mit IFN γ und TSA (Abb. 24c) nur eine leichte Zunahme der Hemmung gegenüber IFN γ alleine.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IFN γ und HDACI einen additiven Effekt auf die Zellproliferationshemmung aufweisen. Ähnlich wie die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α konnte zumindest in den A204-Zellen in den gewählten Konzentrationen sogar ein vollständiger Wachstumsarrest erreicht werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die MCF-7-Zellen, wie bereits im XTT-Assay festgestellt wurde, eine höhere Resistenz gegenüber den HDACI aufweisen. Zusätzlich ist TSA in der Kombination mit IFN γ in den gewählten Maximalkonzentrationen weniger effektiv als SAHA.

Ein ähnliches Bild vermittelte die Beobachtung der Proliferationshemmung in A204-Zellen über die Passage p1 hinaus. Hierbei wurden sowohl die Kontrollen, als auch die Tests weiterhin nach jeder Passage nur mit frischem Medium inkubiert, eine weitere Behandlung ist nicht erfolgt.

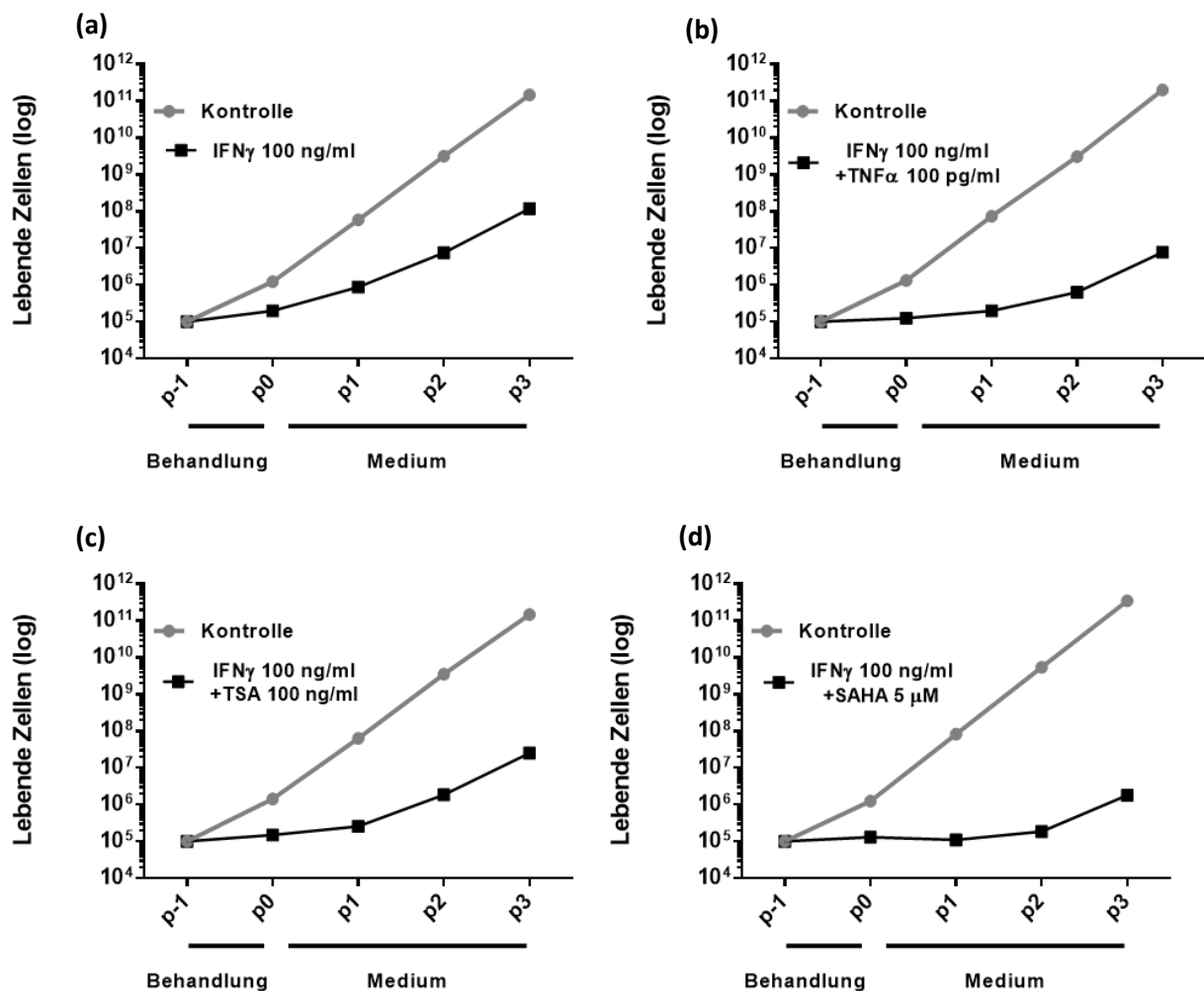


Abbildung 25: Wachstumskurven der A204-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI über vier Passagen

Schwarze Datenpunkte zeigen die Zellzahl behandelter A204-Zellen, graue Datenpunkte die Zellzahl unbehandelter Kontrollen, die auf derselben 6-Well-Platte ausgesät und inkubiert wurden. Die Y-Achse zeigt in logarithmischer Skalierung die Zahl vitaler Zellen, die X-Achse zeigt die Passagenzahl an. Nach initialer Behandlung über die Passage p-1 erfolgten die weiteren Passagen ohne Behandlung in Kulturmedium. (a) zeigt die Einzelbehandlung mit IFN γ 100 ng/ml, (b) die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und TNF α 100 pg/ml. (c) stellt die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und TSA 100 ng/ml, dar, und (d) die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und SAHA 5 μ M. Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

Wie zuvor auch wurde hierbei das Kriterium eines vollständigen Wachstumsarrests in Anlehnung an die Zellzahl der Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α definiert.

Bereits in der Einzelbehandlung der A204-Zellen mit IFN γ zeigte sich eine Hemmung der Proliferationsrate, die in den weiteren Passagen langsam abnimmt (Abb. 25a). In der Passage p3 hat die Proliferationsrate trotz eines langsamen Angleichens noch nicht das Ausmaß der Proliferation der unbehandelten Zellen erreicht.

Der Effekt wurde durch die Kombination mit beiden HDACI beziehungsweise mit TNF α verstärkt.

Die Kombination von IFN γ und TSA (Abb. 25c) zeigte sich dabei weniger effektiv, als die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α (Abb. 25b) und hat auch in p1 keinen vollständigen Wachstumsarrest erreicht. Die Kombination aus IFN γ und SAHA (Abb. 25d) zeigte sich am effektivsten und sogar noch effektiver als die Kombination aus IFN γ und TNF α .

In allen Behandlungen zeigt sich mit zunehmender Passagenzahl ein langsames Angleichen der Proliferationsrate an das Wachstum der nicht behandelten Kontrollen.

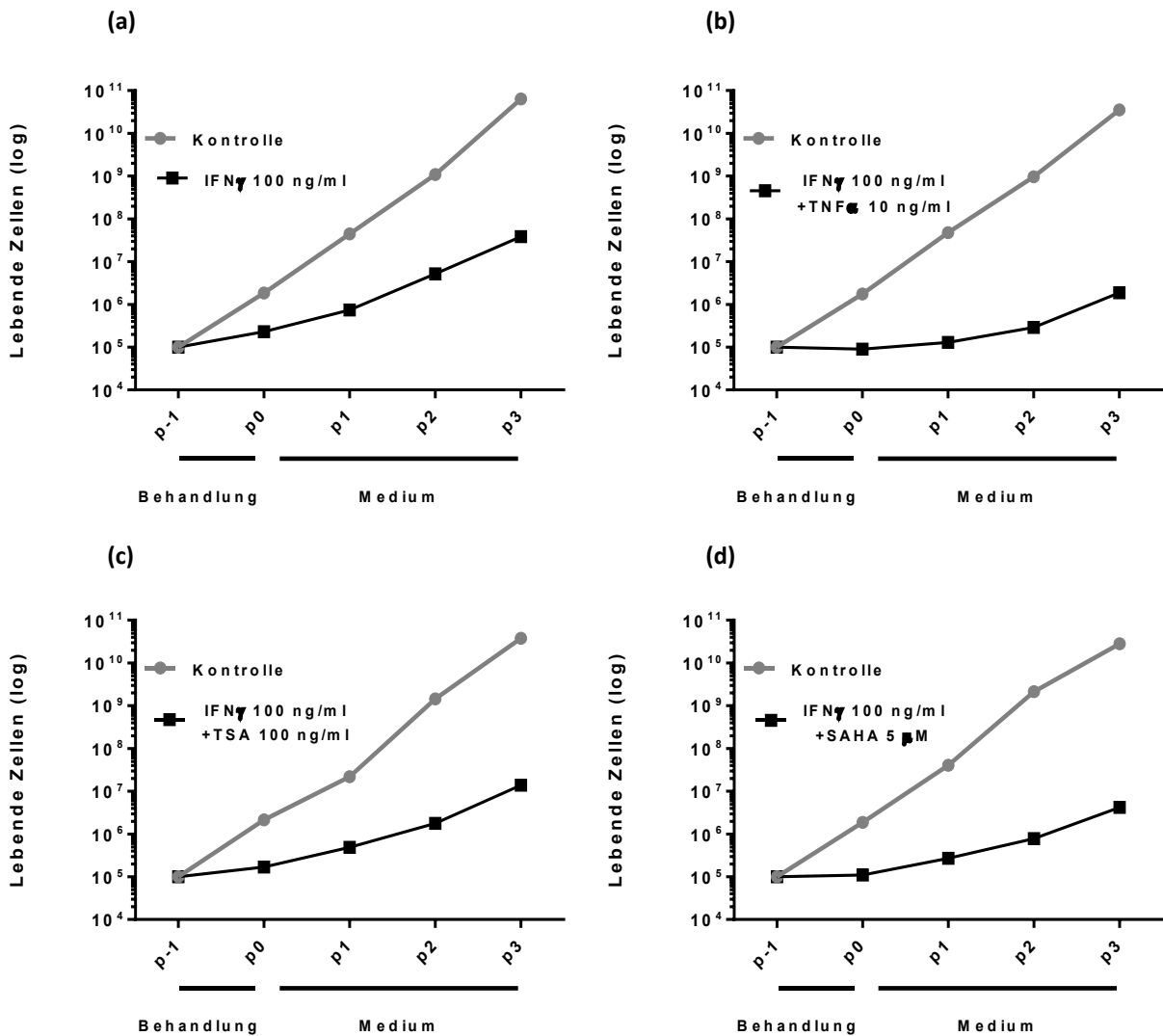


Abbildung 26: Wachstumskurven der MCF-7-Zellen in Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI über vier Passagen

Schwarze Datenpunkte zeigen die Zellzahl behandelter MCF-7-Zellen, graue Datenpunkte die Zellzahl unbehandelter Kontrollen, die auf derselben 6-Well-Platte ausgesät und inkubiert wurden. Die Y-Achse zeigt in logarithmischer Skalierung die Zahl vitaler Zellen, die X-Achse zeigt die Passagenzahl an. Nach initialer Behandlung über die Passage p-1 erfolgten die weiteren Passagen ohne Behandlung in Kulturmedium. (a) zeigt die Einzelbehandlung mit IFN γ 100 ng/ml, (b) die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und TNF α 10 ng/ml. (c) stellt die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und TSA 100 ng/ml und (d) die Behandlung mit IFN γ 100 ng/ml und SAHA 5 μ M.

Die Datenpunkte zeigen exemplarisch ein Experiment. Dieses Experiment wurde mit einem ähnlichen Ausgang wiederholt.

Auch die Beobachtung weiterer unbehandelter Passagen der MCF-7-Zellen zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie die initialen Passagen bereits vermuten ließen.

IFN γ in der Einzelbehandlung der MCF-7-Zellen (Abb. 26a) zeigte einen anhaltenden proliferationshemmenden Effekt.

Dieser wird durch alle Kombination verstärkt, am ausgeprägtesten aber durch die Kombination aus IFN γ und TNF α (Abb. 26b). Hierbei wurde ein vollständiger Wachstumsarrest erreicht, sowie eine anhaltende Proliferationshemmung. Die Kombination mit SAHA erreichte keinen vollständigen Wachstumsarrest, führte aber dennoch zu einer Steigerung des Effekts, im Vergleich zur IFN γ -Einzelbehandlung (Abb. 26d). Der additive Effekt von TSA fiel am geringsten aus (Abb. 26c).

In allen Behandlungen der MCF-7-Zellen konnte ein langsames Angleichen an die Proliferationsrate der unbehandelten Kontrollen gezeigt werden.

Dennoch besteht ein nachhaltiger Effekt auf die Proliferationsrate und natürlich auf die Gesamtzellzahl. Über das Ausmaß der Differenz zu den Kontrollen konnte wiederum auf die Effektivität der Behandlung geschlossen werden.

Die Einzelbehandlung mit IFN γ zeigte in beiden Zellreihen bereits einen nachhaltigen Effekt auf die Proliferationsrate. Die Kombination mit den HDACI respektive TNF α zeigte einen additiven Effekt auf die Proliferationshemmung. Die Positivkontrolle aus IFN γ und TNF α erreichte in beiden Zellreihen einen vollständigen Wachstumsarrest.

Zusammengefasst zeigte in den A204-Zellen die Kombination mit SAHA sogar einen etwas ausgeprägteren Effekt auf die Wachstumshemmung als IFN γ und TNF α . Die Kombination mit TSA hat den vollständigen Wachstumsarrest nicht erreicht, zeigte jedoch einen additiven Effekt im Vergleich zur IFN γ -Einzelbehandlung.

Die MCF-7-Zellen zeigten eine höhere Resistenz gegen die verwendeten Konzentrationen der HDACI. Lediglich die Kombination mit IFN γ und TNF α erreichte einen vollständigen Wachstumsarrest. Dennoch zeigten beide HDACI auch in MCF-7-Zellen einen additiven Effekt zur Einzelbehandlung mit IFN γ .

3.10 Seneszenzassoziierte-beta-Galaktosidase-Aktivität nach Kombinationsbehandlung mit Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren

Wie bereits in den Einzelbehandlungen mit den HDACI wurde auch in der Kombinationsbehandlung von IFN γ und HDACI ein SA-beta-Galaktosidase-Assay als Seneszenzmarker durchgeführt.

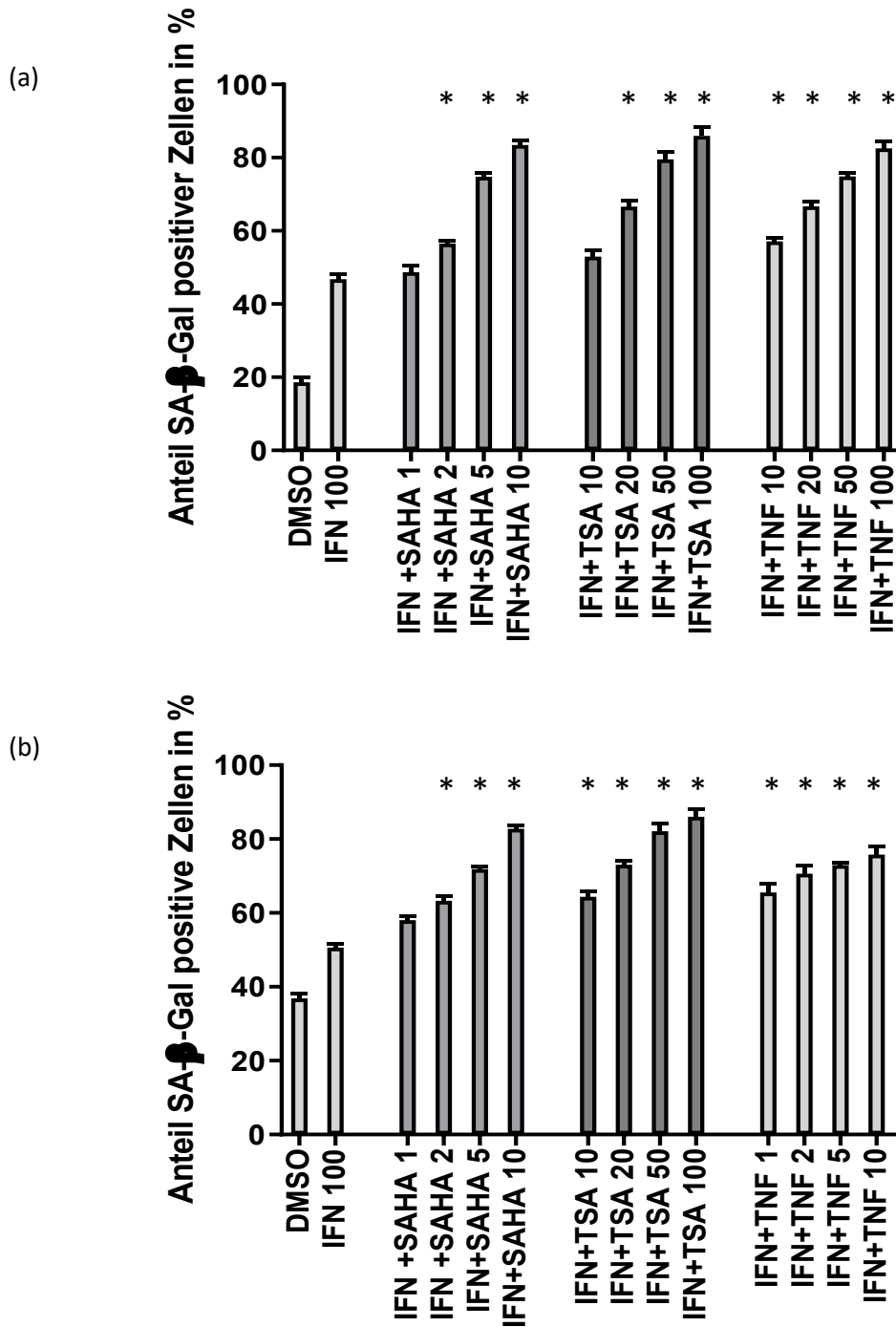


Abbildung 27: SA-beta-Galaktosidase-Aktivität von A204- und MCF-7-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI

Die Y-Achse zeigt den Anteil von SA-beta-Galaktosidase-positiven Zellen, die X-Achse listet die Art der Behandlung auf. (a) A204-Zellen in der entsprechenden Behandlung; (b) behandelte MCF-7-Zellen.

Kontrolle mit Standardmedium mit DMSO. Behandlung mit 100 ng/ml IFN γ und der aufgeführten Konzentration der HDACI in ng/ml für TSA, in μ M für SAHA und in pg/ml für TNF α bei den A204 und in ng/ml für TNF α bei den MCF-7-Zellen. Der Balken zeigt den Mittelwert, der Strich oberhalb des Balkens die erste Standardabweichung (n=6).

Die Signifikanz wurde für beide Zelllinien jeweils mit ANOVA und Bonferroni-Korrektur bestimmt. Der Stern * zeigt p<0,05 gegenüber der Einzelbehandlung mit IFN γ 100 ng/ml.

Bei den A204-Zellen zeigte sich bei den unbehandelten Zellen eine Grundaktivität von etwa 20% SA-beta-Galaktosidase-positiven Zellen, die durch die Einzelbehandlung mit IFN γ auf etwa 50% anstieg.

Bei der Kombination mit je einem HDACI zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Aktivität im Vergleich zur IFN γ -Einzelbehandlung. In den höchsten verwendeten Konzentrationen zeigten sich deutlich über 80% SA-beta-Galaktosidase-positiv Zellen.

Im Vergleich zur herkömmlichen Behandlung mit IFN γ und TNF α zeigte sich auch hier eine TNF α -abhängige Zunahme der positiven Zellen. Hier wurden ebenfalls über 80% positive Zellen in der höchsten TNF α -Konzentration erreicht (Abb. 27a).

Die MCF-7-Zellen zeigten bereits eine hohe Grundaktivität von SA-beta-Galaktosidase von etwa 40% der Zellen. Diese stieg bei der Kontrollbehandlung mit IFN γ auf etwa 50% an.

Die weitere Aktivitätszunahme verlief auch hier ähnlich zu den A204-Zellen mit einer konzentrationsabhängigen Aktivitätszunahme bei der Kombination mit je einem HDACI, wie auch in der Kombination mit TNF α . Die Kombinationsbehandlung mit den HDACI in den höchsten Konzentrationen zeigte über 80% positive Zellen und damit sogar etwas mehr Aktivität als die Vergleichsbehandlung mit IFN γ und TNF α , die in der höchsten verwendeten Konzentration knapp unter 80% SA-beta-Galaktosidase-positiver Zellen blieb. Bezüglich der Aktivität der SA-beta-Galaktosidase bestand eine ähnliche Effektivität der Kombinationsbehandlung mit IFN γ und je einem HDACI und IFN γ in Kombination mit TNF α . Zusätzlich schien eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Kombinationspartner auf die Aktivität der SA-beta-Galaktosidase zu bestehen, da sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der positiven Zellen zeigte (Abb. 27b).

Jede der getesteten Kombinationen zeigte sich darüber hinaus effektiver als die Einzelbehandlung mit IFN γ , welche bereits eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erbrachte.

3.11 Seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci in der Kombinationsbehandlung aus Interferon- γ und Histondeacetylaseinhibitoren

Die Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI wurde auch über die Zunahme der SAHF mittels pHP1 γ Immunfluoreszenzfärbung mit der IFN γ -Einzelbehandlung und der Kombination aus IFN γ und TNF α verglichen. Wie zuvor wurde auch hier ein Cutoff der nötigen SAHF pro Zelle gewählt, damit diese Zelle als positiv gewertet wurde. Als Cutoff wurden die bereits festgelegten Werte für die Zelllinie gewählt, das heißt für die A204-Zellen der Cutoff von 6 SAHF und für die MCF-7-Zellen 8 SAHF pro Zelle.

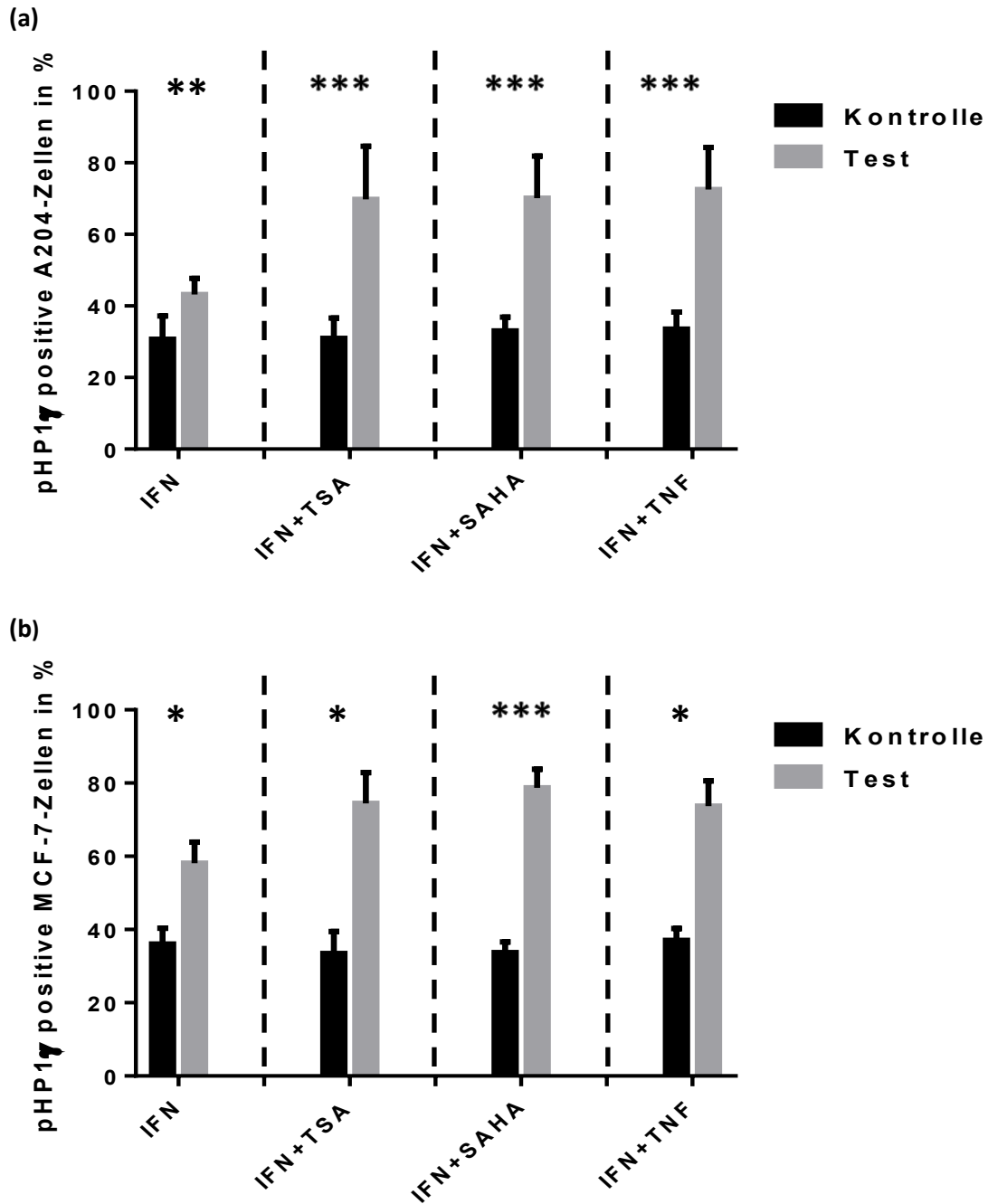


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung von pHP1 γ zur Analyse von SAHFs in A204- und MCF-7-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IFN γ und HDACI

Graue Säulen: behandelte Zellen; schwarze Säulen: Kontrolle mit Medium und DMSO, jeweils eine eigene korrespondierende Kontrolle für jede Testbehandlung. Die X-Achse zeigt die Behandlung kategorisch an, die Y-Achse den Anteil an positiv gewerteten Zellen in %. Der Balken zeigt den Mittelwert, der Strich oberhalb des Balkens die erste Standardabweichung. Die Signifikanz des Unterschieds zwischen Kontrolle und Test wurde im Students-t-Test bestimmt. Das Konfidenzintervall wird durch Sterne * dargestellt: * entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,005$; *** entspricht $p < 0,0005$.

(a) zeigt die A204-Zellen. Die Behandlungskonzentrationen entsprechen 100 ng/ml für IFN γ , 100 ng/ml für TSA, 5 μ M für SAHA und 100 pg/ml für TNF α . n=6

(b) zeigt die MCF-7-Zellen. Die Behandlungskonzentrationen entsprechen 100 ng/ml für IFN γ , 100 ng/ml für TSA, 5 μ M für SAHA und 10 ng/ml für TNF α . n=3

Die A204-Zellen zeigten bereits eine Grundaktivität von 30% positiv gewerteter Zellen mit mindestens 6 SAHF im Nucleus. Durch die Monobehandlung mit IFN γ kam es zu einer Zunahme auf über 40% positiver Zellen. In der Kombination von IFN γ mit einem HDACI oder TNF α konnte dieser Effekt deutlich verstärkt werden, so dass Werte um 70% positiver Zellen erreicht werden konnten. In der Kombinationsbehandlung ergab sich kein deutlicher Vorteil eines HDACI im Vergleich zum anderen. Allerdings hatten beide Kombinationsbehandlungen mit HDACI eine vergleichbare Aktivitätszunahme wie die Positivkontrolle mit IFN γ und TNF α (Abb. 28a).

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in den MCF-7-Zellen. Hier lag die Grundaktivität ohne Behandlung bei etwa 35% positiver Zellen. Durch die alleinige Behandlung mit IFN γ konnte die Aktivität bereits auf fast 60% positive Zellen gesteigert werden. Durch die Kombination mit den HDACI oder TNF α zeigte sich eine weitere Aktivitätszunahme auf 75%. Auch hier zeigten sich vergleichbare Aktivitätszunahmen zwischen den HDACI untereinander und den HDACI und TNF α (Abb. 28b).

Beide Zelllinien weisen eine hohe basale Aktivität im Sinne der Translokation von pHp1 γ in die SAHF des Nucleus auf. Bereits durch die Behandlung mit IFN γ kann diese Aktivität gesteigert werden. Eine weitere Aktivitätszunahme konnte durch die Kombination mit HDACI bzw. TNF α erreicht werden, wobei die Kombination von IFN γ und HDACI einen vergleichbaren Effekt auf die pHp1 γ -Translokation aufwies, wie die Kontrollbehandlung mit IFN γ und TNF α . Zusätzlich konnte in diesem Experiment kein deutlicher Unterschied in der Effektivität der Kombination zwischen TSA und SAHA festgestellt werden.

Da bei der Zunahme der Translokation von pHp1 γ in SAHF von einer Zunahme der Zellen, die einen seneszenten Phänotyp erreichen, ausgegangen werden kann, sprechen die Ergebnisse für eine Seneszenzinduktion durch IFN γ in der Einzelbehandlung der Zelllinien, die durch Kombination mit HDACI in ähnlicher Weise wie durch TNF α noch deutlich gesteigert werden kann.

4. Diskussion

4.1 Seneszenzinduktion durch Histondeacetylaseinhibitoren

HDACI haben in beiden Zellsystemen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität geführt, was durch Vorgänge, die zu einer Reduktion der Zellzahl führen, zu erklären ist. Der XTT-Assay hat uns Aufschluss über die wirksamen Bereiche der HDACI für die MCF-7- und A204-Zellen gegeben und die Wirksamkeit der HDACI in unserem Modell bestätigt. Jedoch war hier keine genaue Unterscheidung zwischen einer Toxizität, in diesem Fall über die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose der Zellen, und einer Proliferationshemmung möglich. In dem wir das Verhalten der Zellviabilität von konfluierend gewachsenen Zellen, welche nicht weiter proliferieren, und weiterhin proliferierenden Zellen verglichen haben, konnten wir Konzentrationsbereiche mit Wirkung auf die Zellproliferation, bei leicht zunehmender Toxizität bestimmen. Tatsächlich muss jedoch von einem Zusammenspiel beider Einflüsse ausgegangen werden. Im besten Fall konnte ein Wirkungsbereich gefunden werden, bei dem ein möglichst hoher Einfluss in Richtung Proliferationshemmung bestand, bei gleichzeitig möglichst geringer Toxizität.

Ein vollständiger Wachstumsarrest konnte in der Einzelbehandlung mit den HDACI in den verwendeten Konzentrationen nicht erreicht werden, allerdings wurde als höchste Behandlungskonzentration der Bereich gewählt, bei dem noch keine auffällige Toxizität im XTT-Assay nachweisbar war. Im Gegensatz dazu zeigten sich in der Kontrollbehandlung mit IFN γ und TNF α in der Auszählung bedeutend mehr avitale Zellen und Zellreste. Insbesondere durch die Wirkung von TNF α ist hierbei eine Zunahme der Toxizität durch Apoptose und Nekrose zu erwarten (Chu, 2013).

Die Möglichkeit, dass praktisch alle Zellen in einen nicht-proliferierenden Phänotyp übergehen, scheint unwahrscheinlich. Vielmehr ist davon auszugehen, dass ein kleiner Teil der Zellen weiterhin proliferieren wird. In der Betrachtung der Zellzahl wird dies durch Apoptose der Zellen kompensiert, so dass trotz wenigen proliferierenden Zellen die Zellzahl weitestgehend konstant bleibt.

Für das Erreichen eines vollständigen Wachstumsarrestes scheint daher tatsächlich neben der Seneszenzinduktion die Apoptose bzw. der Zelltod für das Erreichen konstanter Zellzahlen in den weiteren Passagen notwendig zu sein. Deshalb ist davon auszugehen, dass auch die Einzelbehandlung mit HDACI in höheren Konzentrationen ein vollständiger Wachstumsarrest zu erreichen ist, allerdings unter der Annahme, dass neben der Proliferationshemmung auch die Apoptose eine zunehmende Rolle spielt. Hierbei werden sowohl die Proliferationshemmung, als auch Apoptose potentiell über die Wirkung von HDACI vermittelt (Mrakovic et al., 2019). Auch die proportionale Abnahme der Proliferation in Abhängigkeit von der Zunahme der HDACI-Konzentration legt die Möglichkeit eines vollständigen Wachstumsarrests nahe.

Entsprechende antiproliferative und apoptoseinduzierende Effekte der HDACI wurden bereits in zahlreichen Beispielen beschrieben. Sakajiri et al haben 2005 den Effekt von Valproat und SAHA auf 14 Lymphomzelllinien beschrieben und in allen Reihen eine Verminderung der Tumorproliferation festgestellt (Sakajiri et al., 2005). Im Mausversuch zeigte sich darüber hinaus eine gute Verträglichkeit der HDACI. Bian et al. konnten die Proliferationshemmung durch HDACI in Brustkrebszellen zeigen (Bian et al., 2018). Die Hemmung der Proliferation in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs durch HDACI wurde in einer aktuellen Publikation durch Kakiuchi et al gezeigt. Außerdem zeigte sich in dieser Untersuchung ein Rückgang der Migrationstendenz und der Invasivität (Kakiuchi et al., 2021). Auch wenn hier nur wenige Beispiele herausgegriffen wurden, so finden sich doch bedeutend mehr Daten, die belegen, dass eine Proliferationshemmung der HDACI in vielen Tumorzelllinien verursacht wird. Dies deckt sich mit unserer Beobachtung, dass HDACI auch in unseren Versuchen eine Proliferationshemmung in den beiden Zytokin-empfindlichen Zelllinien, nämlich der MCF-7- und A204-Zellen, erzeugt haben.

In der Beobachtung der Entwicklung der Zellzahlen über mehrere, unbehandelte Passagen, zeigte sich in der Einzelbehandlung mit den HDACI eine relativ schnelle Angleichung der Proliferationszahlen an die unbehandelten Kontrollen. Wie zuvor in unserem Modell erläutert, ist aufgrund der Tatsache, dass ein Wachstumsarrest aller Zellen unwahrscheinlich ist, eine Angleichung der Proliferationsrate an die unbehandelten Kontrollen zu erwarten, da die wenigen weiterhin proliferierenden

Zellen zunehmend ins Gewicht fallen, auch wenn ursprünglich fast alle Zellen in einen Wachstumsarrest versetzt wurden.

Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede, bei der Angleichungsgeschwindigkeit der Proliferationsraten. Hier zeigt sich eine Diskrepanz zwischen der HDACI-Einzelbehandlung und den Kontrollen mit IFN γ und TNF α , welche über mehrere Passagen eine deutlich verringerte Proliferationsrate aufwiesen.

Der Umstand, dass die Proliferationshemmung durch die HDACI-Einzelbehandlung nur relativ kurzzeitig anhält, steht in Diskrepanz zu den weiteren Kriterien einer Seneszenzentwicklung, wie die Induktion von SA-beta-Galaktosidase oder den morphologischen Änderungen, welche für die Induktion eines seneszenten Phänotyps auch in der Einzelbehandlung durch die HDACI gesprochen haben.

Der Anstieg der SA-beta-Galaktosidase-positiven Zellen war hierbei in der Einzelbehandlung mit den HDACI durchaus mit den Kontrollen mit IFN γ und TNF α zu vergleichen. Ebenso zeigten sich durch die HDACI typische morphologische Kriterien, die einem seneszenten Phänotyp zuzuordnen sind. Auch die Translokation von pHP1 γ in SAHF zeigte eine Zunahme, allerdings nicht so ausgeprägt wie in der Kontrolle mit den Zytokinen.

Diese morphologischen Veränderungen (Herranz and Gil, 2018), die Expression von SA-beta-Galaktosidase (Debacq-Chainiaux et al., 2009), und die Translokation von pHP1 γ in SAHF (Zhang et al., 2005) werden dem seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp zugeschrieben. Zudem werden diese Marker von anderen Autoren wie Beck et al. in einer Arbeit aus dem Jahr 2020 und Salama et al. im Jahr 2014 beschrieben und als typisch für den seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp betrachtet (Salama et al., 2014; Beck et al., 2020).

Insgesamt haben wir also einige Hinweise für die Induktion eines seneszenten Phänotyps durch HDACI gesehen. Die Diskrepanz bezüglich der Proliferationshemmung lässt sich, wie zuvor erläutert, durch eine zu geringe Behandlungskonzentration erklären, welche vermeintlich einen zu großen Anteil der Zellen nicht in einen Wachstumsarrest versetzt, die dann mit jeder Folgepassage mehr und mehr ins Gewicht fallen.

Für MCF-7-Zellen ist darüber hinaus ein Zellzyklusarrest unter SAHA beschrieben (Knutson et al., 2012) und für TSA eine Proliferationshemmung in

Rhabdomyosarkomzellen (Tarnowski et al., 2019), von denen sich die A204-Zellen ableiten.

In der Zusammenschau halten wir die Seneszenzinduktion durch die HDACI in unserem Modell daher für sehr wahrscheinlich. Neben der Erhöhung der Behandlungskonzentration wäre in weiteren Untersuchungen auch eine sequentielle wiederholte Behandlung mit verringerten Konzentrationen der HDACI denkbar. Theoretisch sollte, wenn man von einem anhaltenden Wachstumsarrest ausgeht, dadurch eine weitere Zunahme der Proliferationshemmung möglich sein, da immer mehr Zellen in einen Wachstumsarrest übergehen. Von Interesse wäre darüber hinaus auch das Ausmaß der Toxizität in der sequentiellen Behandlung. Ob die Toxizität dabei ebenfalls zunimmt, können wir derzeit nicht mit Sicherheit sagen. Diese Fragestellung zeigt somit eine Möglichkeit für weiterführende Untersuchungen auf.

4.2 Expressionsprofil der Histondeacetylasen in den Zelllinien

Der Western-Blot hat gezeigt, dass die Zellen HDACs exprimieren, so dass aufgrund des Vorhandenseins der Zielmoleküle eine Wirkung der HDACI zu erwarten ist. Ob die Hemmung der HDACs über die Histonmodifikation oder die Wirkung an anderen Substraten zurückzuführen ist, konnte in dieser Arbeit hingegen nicht belegt werden. Es zeigten sich im Verlauf der Experimente Unterschiede in der Expression der bestimmten HDACs zwischen den beiden Zellreihen. So ist es auch denkbar, dass Zellen ein bestimmtes Expressionsmuster der HDACs aufweisen, welches in entarteten Abkömmlingen wiederum aberrieren könnte. Dies belegt auch eine Arbeit von Hayashi et al. aus dem Jahr 2010, welche einen stufenweisen Anstieg der Expressionslevel von HDAC1, HDAC2 und HDAC3 in benignen, semimalignen bis hin zu malignen Ovarialtumoren zeigte (Hayashi et al., 2010).

Da entartete Zellen genetische Veränderungen aufweisen können, wie auch eine aberrierende Genexpression insbesondere von Tumorsuppressoren und Onkogenen, ist auch eine Abweichung des epigenetischen Modifikationsprofils und der modifizierenden Faktoren, wie den HDACs, naheliegend (Chen et al., 2015).

Insgesamt schien in den MCF-7-Zellen eine geringere Expression der HDACs im Vergleich zu den A204 vorzuliegen. HDAC4 war in beiden Zellreihen stark exprimiert, HDAC2 und HDAC7 geringer. HDAC3 und HDAC5 waren kaum exprimiert.

Die Betrachtung des Expressionsprofils war insoweit interessant, dass eine unselektive Inhibition der HDACs durch die von uns verwendeten pan-Histondeacetylaseinhibitoren nur eine Wirkung auf HDACs entwickeln kann, die auch von den Zellen exprimiert werden. In unserem Beispiel wurde kaum HDAC3 exprimiert, was einen Einfluss der HDACI über die Inhibition von HDAC3 unwahrscheinlich machte. Die Wirkung konnte in erster Linie über die Inhibition von HDACs erklärt werden, die kräftig exprimiert wurden, im Wesentlichen HDAC4 und weniger ausgeprägt HDAC7 und HDAC2.

Erhöhte Level von HDAC4 konnten von Cheng et al. 2021 in nasopharyngealen Karzinomen im Vergleich zu normalen nasopharyngealen Epithelien nachgewiesen werden (Cheng et al., 2021).

Ouaïssi et al. fanden zudem signifikant erhöhte Level von HDAC7 in 9 von 11 untersuchten Pankreaskarzinomproben (Ouaïssi et al., 2008). Li et al. beschrieben in einer Arbeit von 2017 deutlich erhöhte Level von HDAC2 in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu atypischen und normalen Ösophagusepithelien (Li et al., 2017). Hohe Level der von in unseren Zellreihen exprimierten HDACs sind also in anderen Entitäten mit der Onkogenese assoziiert und in entarteten Zellen höher exprimiert, als in den nicht-entarteten Ursprungszellen.

Die funktionelle Rolle der einzelnen HDACs ist bisher nicht ausreichend beleuchtet, allerdings legen vergleichende Daten nahe, dass beispielsweise HDAC1 und HDAC2 in vielen maligneren Arten von Tumoren in höherer Expression vorkommen (Ropero and Esteller, 2007) und mit einem schlechteren klinischen Verlauf vergesellschaftet sind. Eine Kausalität konnte hierbei bedingt gezeigt werden, da ein Knockdown von HDAC1 und HDAC2 positive Effekte auf die Tumorkontrolle zeigten.

Für HDAC2 konnte gezeigt werden, dass es Reparaturmechanismen bei DNA-Schäden antreibt und eine Minderexpression von HDAC2 zur Kumulation von DNA-Schäden führt (Yao and Rahman, 2012).

Allerdings gibt es zahlreiche Beispiele, die zeigen, dass eine hohe Expression von HDAC2 mit aggressiven Tumoren assoziiert ist.

So korreliert eine Überexpression von HDAC2 mit schnellwachsenden Adenokarzinomen der Mamma, aber auch mit einer Aktivität von DNA-Reparatur-Mechanismen (Shan et al., 2017).

Hohe Level von HDAC2 werden als unabhängiger prognostischer Marker für ein geringes Gesamtüberleben beim kolorektalen Karzinom gesehen (Weichert et al., 2008b).

HDAC2, aber auch HDAC1 und HDAC3 sind im Falle des Prostatakarzinoms mit einer stärkeren Entdifferenzierung und schnelleren Proliferationsrate assoziiert (Weichert et al., 2008a).

Auch bei hepatocellulären Karzinomen wurden HDAC1 und HDAC2 als unabhängige prognostische Faktoren einer höheren Sterblichkeit entdeckt. HDAC1 ist hierbei mit der Tumormetastasierung assoziiert (Ler et al., 2015).

Das urotheliale Karzinom weist ebenfalls eine Assoziation zu hohen Leveln der Aktivität von HDAC1 und HDAC2 auf. Die kombinierte Inhibition führte hierbei zur Induktion des nichtapoptotischen Zelltods und einer Reduktion der Proliferation entarteter Zellen (Pinkerneil et al., 2016).

Onkogenes Potential wurden für HDAC2 auch für das Adenokarzinom des Magens (Kim et al., 2013)] und der Lunge (Jung et al., 2012) beschrieben.

In der Zusammenschau muss bezüglich HDAC1 und HDAC2 in vielen soliden Tumoren von einer Assoziation zu schneller Proliferation, aggressivem Wachstum und schlechteren Überlebensraten ausgegangen werden. Gleichzeitig konnte durch die Inhibition und Knockdown, insbesondere simultan von HDAC1 und HDAC2, positive antionkogene Effekte gesehen werden, die zu einer Reduktion der Proliferationsrate, Induktion von Apoptose und nicht-apoptotischem Zelltod, sowie Seneszenzinduktion führten. Bezüglich der Überlebensraten konnten bisher nur wenige Daten erhoben werden, aber der aktuelle Stand gibt Hoffnung, dass auch die Sterblichkeit durch die Inhibition der HDAC1 und HDAC2 reduziert werden kann. Beide Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, haben HDAC2 exprimiert und wir gehen davon aus, dass die HDAC1 als pan-Histondeacetylaseinhibitoren HDAC2 inhibiert haben. Daher ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der von uns beobachteten Effekte in Richtung Proliferationshemmung und Seneszenzinduktion durch die Inhibition von HDAC2 vermittelt wurden.

Neben dem genetischen Knockdown stellen auch selektive HDAC1, wie RGFP699, die Möglichkeit dar, die Wirkung der einzelnen HDACs zu verstehen, da eine gezielte Inhibition eines einzelnen HDAC leichtere Rückschlüsse auf die Wirkungsweise ermöglicht, als die unspezifische Inhibition, welche die pan-HDAC1 erreichen.

So konnte für die selektive Inhibition von HDAC3 die Apoptoseinduktion und Wachstumsverlangsamung in Malignomzellen gezeigt werden (Sarkar et al., 2020). Im Falle der MCF-7- und A204-Zellen scheint eine selektive HDAC3-Inhibition dagegen wenig erfolgversprechend, da HDAC3 nicht exprimiert wird. Allerdings könnten nicht-Histon-Targets von HDAC3 eine Rolle spielen. Die selektive Inhibition von HDAC3 führte zur Apoptose und Wachstumsverlangsamung in den betroffenen Zellen (Li and Seto, 2016), was im Umkehrschluss auf einen pro-proliferativen und apoptosehemmenden Effekt von HDAC3 in bestimmten Tumorzellen schließen lässt. Darüber hinaus wurde eine HDAC3-vermittelte Zunahme der Expression von pro-inflammatorischen Genen, die durch LPS induziert werden, gezeigt (West and Johnstone, 2014).

Im Umkehrschluss kann angenommen werden, dass eine hohe Expression eines HDACs, so wie in unserem Fall HDAC4, einen starken Einfluss auf das Zellverhalten nimmt. Ein bedeutender Teil der Wirkung der HDACi könnte also durch die Hemmung von HDAC4 erklärt werden, vor allem, da aus weiteren Daten die proliferationsfördernde Wirkung von HDAC4 bereits beschrieben ist (Cai et al., 2018). HDAC4 zeigte onkogenes Potential, da es in Kombination mit viralen Onkogenen in Fibroblasten zur Proliferation unabhängig von Wachstumssignalen führte, allerdings nur bei gleichzeitiger Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 und dem RB-Gen (Paluvai et al., 2018). In diesem Zusammenhang scheint die Überexpression von HDAC4 ein möglicher Faktor für das Tumorstadium in beiden getesteten Zelllinien zu sein. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der HDAC1 und 4 in Glioblastomzellen zu einem Zellzyklusarrest in G2/M führte (Was et al., 2019).

Ebenso kann die Expression von HDAC7 in unseren Zellreihen eine proliferative Wirkung vermitteln, welche über die Inhibition durch die HDACi gehemmt wird. HDAC7 interagiert direkt mit c-Myc und nimmt Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation. Ein Knockdown von HDAC7 zeigte in diversen Tumorzelllinien einen Zyklusarrest in der S1/G-Phase (Zhu et al., 2011). Daher scheint HDAC7 ein möglicher Faktor in der Entgleisung des Zellzyklus in Tumorzellen zu sein.

Erneut gilt es zu betonen, dass die Wirkung der HDACs vom Zellkontext abhängig zu sein scheint, und zwar nicht nur von Zelltyp zu Zelltyp, sondern auch vom Zustand der

entsprechenden Zellen selbst (Xu et al., 2007). So wird HDAC1 in frühen Phasen der Onkogenese ein onkosuppressiver Effekt, in späteren Phasen ein onkogener Effekt zugeschrieben (Santoro et al., 2013). Ein weiteres Indiz dafür ist, dass die HDACs, so wie auch deren Inhibition, das Gleichgewicht zellulärer Mechanismen verschieben können. Diese Wirkweise erinnert an die Wirkung von Partialagonisten in der Pharmakologie, die an einem Rezeptor je nach Situation einen aktivierenden oder einen hemmenden Einfluss entwickeln können.

In der Zusammenschau der bisherigen Kenntnisse über die HDACs scheinen sie verallgemeinert eine antreibende Wirkung auf die Zellproliferation und den Zellumsatz zu haben, indem sie den Zellzyklus vorantreiben. Daher lassen sich auch die wachstumshemmenden Effekte der pan-HDACI erklären. Ein genaueres Verständnis der spezifischen Wirkungen der einzelnen HDACs und die Entdeckung selektiver Inhibitoren, könnten in Zukunft spezifische Therapien möglich machen, die in ihrer Wirkung auf die Art der Zelle und den Zellkontext angepasst sind.

Die bisherigen Kenntnisse der unselektiven Hemmung der HDACs führt aber bereits jetzt zu vielversprechenden Ergebnissen im Bereich der Tumorkontrolle.

4.3 Wirkung der Histondeacetylaseinhibitoren auf Histonseitenketten und die Bedeutung für die Seneszenzinduktion

In der Immunfluoreszenzfärbung von H3K9ac konnte eine Zunahme acetylierter Lysinreste an Stelle 9 der Histonkörper 3 in der Behandlung mit den HDACI gezeigt werden. Durch die Hemmung der HDACs verschob sich das Gleichgewicht zugunsten der HATs, welche wiederum die Acetylierung typischer Substrate, wie z.B. diese Lysinreste, vorantreiben können.

Dadurch konnten wir einen weiteren Nachweis der Wirksamkeit der HDACI in den verwendeten Zellsystemen erbringen. In den Kontrollen, die mit IFN γ und TNF α behandelt wurden, konnte diese Zunahme an acetylierten Lysinresten nicht gezeigt werden. Wir gehen in der Zusammenschau der Ergebnisse von einer Seneszenzinduktion durch die HDACI aus. Dies wurde als mögliche Wirkung von HDACI bereits in verschiedenen Systemen beschrieben (Munro et al., 2004).

In der Kombination aus IFN γ und TNF α ist die Seneszenzinduktion bereits beschrieben worden (Braumüller et al., 2013; Sapega et al., 2018). Dies deckt sich auch mit unseren Ergebnissen bezüglich der Zytokinbehandlung.

Da beide Verfahren eine Seneszenzinduktion ermöglichen, sind zwei Schlüsse denkbar. Entweder ist die Acetylierung an H3K9 nicht entscheidend für die Seneszenzinduktion, da IFN γ und TNF α auch ohne diese starke Zunahme der Acetylierung einen seneszenten Phänotyp induzieren können, oder beide Verfahren greifen an unterschiedlichen Stellen in den Vorgang ein und nehmen über verschiedene Signalwege Einfluss auf die Zellzykluskontrolle.

Da für die HDACs sowohl Substrate der epigenetischen Modulation beschrieben sind, die die Expression von beispielsweise p21 beeinflussen (Gui et al., 2004), als auch direkte Targets, wie p53, die direkt über Acetylierung durch HDACs und HATs beeinflusst werden (Mrakovcic et al., 2019), bleibt weiterhin die Frage, inwieweit die Wirkung der HDACs von der epigenetischen Modulation und Beeinflussung der Transkription oder der direkten Wirkung auf weitere Substrate abhängt.

Inwieweit die Zunahme an H3K9 für die Seneszenzinduktion durch die HDAC1 notwendig ist, kann aus unseren Daten nicht erschlossen werden.

Denkbar ist der Ansatz, dass über die Acetylierung der Histonkörper und damit die Schwächung der Bindung zur DNA das Chromatin in einen Zustand höherer möglicher transkriptionaler Aktivität versetzt wird, aber dies alleine nicht direkt zu einer Transkription und Genaktivierung führt, sondern noch weitere Signale zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren notwendig sind (Karmodiya et al., 2012).

Die HDAC1 vermittelte Seneszenzinduktion erfolgt über die Aktivierung von p16^{INK4A} (Munro et al., 2004). Zusätzlich interagieren HDAC1 über die Hemmung von HDACs mit Transkriptionsfaktoren, wie E2F (Willis-Martinez et al., 2010) und weiteren Substraten, wie p53 (Buchwald et al., 2009).

Über das breite Wirkungsspektrum der HDACs in der Zelle und die komplexen Auswirkungen der zahlreichen epigenetischen Modifikationen scheint die Acetylierung von Histonkörpern zur Steigerung der transkriptionalen Aktivität beizutragen. Diese kann aber die Wirkung der HDACs und HDAC1 allein nicht ausreichend erklären. Vielmehr scheint sich die kombinierte Interaktion mit nicht-Histon-Substraten und weiteren Genen, die ihre Wirkung über die durch die HDAC1-vermittelte Steigerung der transkriptionalen Aktivität entwickeln können, erklären zu lassen.

Im Vergleich zur extrinsischen Induktion der Seneszenz mit den Zytokinen IFN γ und TNF α , bei der die Seneszenz über eine Aktivierung des p16^{INK4A}/pRb-Pathway vermittelt wird (Braumüller et al., 2013), ist auch für die HDACI eine Seneszenzinduktion über die Aktivierung von p16^{INK4A} beschrieben (Munro et al., 2004).

Daher kann der Weg über p16^{INK4A} mit resultierender Hypophosphorylierung von Rb als gemeinsame Endstrecke der Seneszenzinduktion sowohl der HDACI als auch der Zytokine IFN γ und TNF α möglich sein.

Die Histonacetylierung, die durch die HDACI vermittelt wird, scheint für die Seneszenzinduktion über die Zytokine nicht notwendig zu sein. Allerdings wird hier neben der Aktivierung von p16^{INK4A} die Notwendigkeit eines STAT1- und vor allem eines TNFR1-Signals beschrieben. In TNFR1-Knockout-Mutanten (TNFR1 -/-) konnte keine Seneszenzinduktion durch die Zytokine erreicht werden, stattdessen zeigte sich ein aggressives Wachstum (Braumüller et al., 2013).

Im Gegensatz dazu scheint bei der Seneszenzinduktion durch die HDACI ebenfalls die Aktivierung von p16^{INK4A} notwendig zu sein, allerdings liegt hier kein TNFR1-Signal vor. In wie weit die Histonacetylierung oder die Interaktion der HDACs mit weiteren nicht-Histon-Substraten eine Notwendigkeit darstellt, ist aktuell nicht sicher belegt. Da aber bei den Zytokinen IFN γ und TNF α weitere Signale neben der Aktivierung von p16^{INK4A} notwendig sind, liegt nahe, dass auch bei der HDACI-vermittelten Induktion weitere Signale neben p16^{INK4A} erforderlich sind. Da die HDACI auch in der alleinigen Behandlung einen seneszenten Phänotyp induzieren können, scheint es auch möglich, dass die weiteren Signale ebenfalls über die HDACI vermittelt werden könnten.

4.4 Seneszenzinduktion in der Kombinationsbehandlung aus Histondeacetylaseinhibitoren und Interferon- γ

In der Kombination der HDACI mit IFN γ zeigte sich ein vollständiger Wachstumsarrest, die Proliferationshemmung hielt hier über 3-4 Passagen, die wir beobachtet haben, an. Dabei zeigte bereits IFN γ einen deutlichen proliferationshemmenden Effekt. In der Kombination mit den HDACI ergab sich ein additiver Effekt. Allerdings war selbst in den Kontrollen mit IFN γ und TNF α kein dauerhafter vollständiger Wachstumsarrest

nach einem einmaligen Behandlungszyklus zu erreichen. Vielmehr kam es zu einer langsamen Angleichung der Proliferationsrate an die Rate der unbehandelten Zellpopulationen.

Dieses Phänomen wird durch die Tatsache erklärt, dass nicht alle Zellen im anfänglichen Behandlungszyklus in einen seneszenten Phänotyp übergegangen sind. Die Zellen, die weiterhin proliferieren können, nahmen mit jeder weiteren Passage aufgrund ihrer weiterhin steigenden Zahl einen zunehmend stärkeren Einfluss auf die Zellzahl, als die initial seneszenten Zellen, die in Relation immer weiter an Gewicht verlieren, bis eine praktisch identische Proliferationsrate erreicht wurde.

Ein permanenter Wachstumsarrest ließ sich daher leider nicht sicher nachweisen, da nicht getrennt werden konnte, ob die Zunahme der Proliferationsrate durch die Zellen, die initial nicht in einen seneszenten Phänotyp übergegangen sind, bedingt wurde, oder durch die Wiederaufnahme einer proliferativen Aktivität ursprünglich gehemmter Zellen.

Allerdings fanden sich neben der Proliferationshemmung weitere zelluläre Merkmale, die für eine Seneszenzinduktion sprachen.

Denn auch die Untersuchung der SA-beta-Galaktosidase-positiven Zellen und der Translokation von pHP1 γ in SAHF zeigten einen additiven Effekt, der die Einzelbehandlungen übertraf und durchaus mit der Kombination aus IFN γ und TNF α vergleichbar war.

In unseren Versuchen sind wir von einer simultanen Behandlung bei gleichzeitiger Applikation der HDACi und IFN γ ausgegangen. Dass die Reihenfolge der Behandlung eine Rolle spielen kann und auch kontraproduktive Effekte erbringen kann, wurde bereits in einer anderen Arbeit gezeigt (Kim et al., 2003). Hierbei zeigte eine Behandlung durch die HDACi und anschließend die Behandlung mit Chemotherapeutika einen besseren Effekt, als die umgekehrte Reihenfolge der Behandlung (Marchion et al., 2005).

Dies scheint für die Möglichkeit einer Sensibilisierung oder eines Primings durch die HDACi zu sprechen. Die HDACi scheinen die Wirkung vieler antitumoraler, also proliferationshemmender und apoptosefördernder Wirkstoffe verstärken zu können, darunter klassische Chemotherapeutika (Munster et al., 2001; Marchion et al., 2005), aber auch körpereigene Zytokine mit antitumoralen Wirkungen (Bolden et al., 2006).

Die Kombination der HDACI mit IFN γ stellte sich als effektiver heraus, als die Einzelbehandlungen. So konnten vergleichbare Effekte auf Wachstumsarrest und andere Seneszenzmarker gezeigt werden, wie durch die Behandlung mit IFN γ und TNF α .

Wir postulieren also, dass die HDACI und IFN γ eine synergistische Wirkung aufweisen.

Hierbei ist sowohl das oben beschriebene Priming durch die HDACI möglich, welche dadurch die Wirkung von IFN γ verstärken, oder die Kombination der direkten Wirkungen von HDACI und IFN γ . Wir bevorzugen letztere Variante, da sich in der Wirkung von HDACI und IFN γ durchaus Ähnlichkeiten zeigen.

IFN γ führt zu einer Hochregulation von p53 und p21 in Melanomzellen und wird als entscheidend für einen p53-abhängigen Pathway bei DNA-Schäden gesehen, der zur Induktion eines seneszenten Phänotyps führt (Homann et al., 2022).

In Endothelzellen konnte beobachtet werden, dass durch IFN γ Seneszenz induziert werden konnte, und zwar auch in p16-Knockout-Zellen, allerdings nicht in p53-Knockout-Zellen (Kim et al., 2009).

IFN γ scheint also von p16 unabhängig über p53 und p21 einen seneszenten Phänotyp induzieren zu können.

Die Seneszenzinduktion durch die HDACI hingegen scheint in humanen Zellen dagegen vor allem über p16 vermittelt zu werden, da in Zellen mit einem Verlust von p16 keine Seneszenz durch HDACI induziert werden konnte. Die Störung der p53- und p21-Gene hingegen führte nur zu einer geringen Abnahme der HDACI-vermittelten Seneszenzinduktion (Munro et al., 2004).

Sowohl der IFN γ -vermittelte p53/p21-Signalweg als auch der HDACI induzierte p16-Signalweg führt zur Hemmung von Proteinen aus der Cyclin-Familie, die wiederum die Rb-Aktivierung hemmen und somit zu einem permanenten Zellzyklusarrest und zur Seneszenzinduktion führen.

Die Wirkung von HDACI und IFN γ auf 2 Signalwege, die letztlich zur Seneszenzinduktion führen können, kann den von uns beobachteten synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung von IFN γ und HDACI erklären und bestätigt nach unserer Ansicht die Ergebnisse unserer Experimente.

Hier gilt es allerdings zu bedenken, dass wir eine zeitliche Behandlungsreihenfolge nicht untersucht haben. Die Kombinationsbehandlungen sind durch gleichzeitige Behandlung mit den Behandlungspartnern erfolgt. Die Daten der Kombinationsbehandlung der HDACI mit Chemotherapeutika legen aber nahe, dass die Behandlungsreihenfolge durchaus eine entscheidende Rolle spielen kann (Marchion et al., 2005). Prinzipiell kann hier auch davon ausgegangen werden, dass eine serielle Behandlung mit HDACI und dann IFN γ , beziehungsweise in umgekehrter Reihenfolge auch abweichende, antagonistische Effekte erzielen kann (Kim et al., 2003; Marchion et al., 2005).

Die Arbeit von Sachweh et al aus dem Jahr 2013 könnte unseren Ergebnissen, welche einen synergistischen Effekt von HDACI und IFN γ nahelegten jedoch auch widersprechen. Nutlin-3 ist ein Aktivator von p53 und erhöht über diesen Weg auch p21, ähnlich wie IFN γ . Allerdings schien in der Kombinationsbehandlung von Nutlin-3 und TSA die Erhöhung von p21-Leveln durch Nutlin-3 durch TSA inhibiert worden zu sein, was potentiell gegen einen synergistischen Effekt in Richtung Seneszenzinduktion spricht (Sachweh et al., 2013).

Allerdings steht dieser Arbeit eine Publikation von Palani et al. aus dem Jahr 2012 gegenüber, welche einen synergistischen Effekt von Nutlin-3 und HDACI auf die Apoptoseinduktion von Wildtyp-p53-Zellen zeigte (Palani et al., 2012).

Wir sehen daher keinen ausreichenden Grund, von unserer Auslegung der Ergebnisse abzuweichen.

4.5 Trippelbehandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren, Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α

Auch die Trippelkombination aus HDACI, IFN γ und TNF α wurde zumindest initial untersucht, allerdings wurden die Ergebnisse nicht als Teil dieser Arbeit genutzt.

In der Trippelkombination sind wir in unseren Versuchen auf das Problem einer kombinierten Wirkstärke gestoßen, die eine Auswertung der Ergebnisse, vor allem in höheren Konzentrationen der Substrate, deutlich erschwerte. Tatsächlich können wir mit den durchgeführten Versuchen nur die Möglichkeiten der Trippelkombination erahnen – wir haben in den vorherigen Versuchen teils deutlich höhere Konzentration, vor allem der HDACI genutzt. Allerdings führte die resultierende, ausgeprägte

Proliferationshemmung zu einer sehr starken Reduktion der Zellzahl, auch unter das ursprüngliche Maß an behandelten Zellen hinaus. Aufgrund der wenigen Zellen, die ausgewertet werden konnten, bestand somit keine ausreichende Sicherheit bezüglich der Aussagekraft der Ergebnisse. Aufgrund dieser Beobachtung mussten wir in der Tripelbehandlung von einer höheren Toxizität ausgehen, die zu einer vermehrten Apoptose der Zellen führte und damit die Zellzahl ebenfalls reduzierte. Es konnte nicht von einer reinen Proliferationshemmung ausgegangen werden.

Die Grundzahl der behandelten Zellen zu erhöhen, wäre eine Möglichkeit gewesen, allerdings wäre in den unbehandelten Kontrollen dann ein rasches, konfluierendes Wachstum zu erwarten gewesen, was wiederum die Ergebnisse verfälscht hätte. Ein anderer Ansatz, die Kontrollen erst später auszusäen, hätte diesen möglichen Einfluss im Zuge der veränderten Inkubationszeit ausgeblendet. Wäre in der Inkubation jedoch ein Ereignis eingetreten, das die Zellzahl verändert hätte, wäre dies in den Kontrollen nicht ausreichend dargestellt worden.

Eine Möglichkeit wäre die Reduktion der Konzentrationen der Behandlungspartner gewesen. Da wir beispielsweise bei der beta-Gal-Färbung von einer Sättigung der Zunahme ausgehen mussten, theoretisch bei 100%, realistisch bei etwa 80-90% der Zellen, welche bereits in der Doppelbehandlung mit hohen Konzentrationen fast erreicht wurden, könnte so auch ein Bereich einer erhöhten Empfindlichkeit für Konzentrations- bzw. Wirkungsänderungen erreicht werden, so dass die Auswirkungen der einzelnen Substrate besser dargestellt werden könnte.

In der Kombination IFN γ , TNF α und HDACI zeigte sich eine noch ausgeprägtere Proliferationshemmung als in den Doppelbehandlungen mit IFN γ und HDACI bzw. TNF α (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser ausgeprägten Wirkung konnte in den ersten Versuchen in der Tripelkombination keine brauchbare Auswertung durchgeführt werden, da die Zellzahlen massiv reduziert waren.

Allerdings haben wir die Möglichkeiten der Tripelkombination auch nicht ausgereizt, sondern uns auf die Kombination von IFN γ und HDACI konzentriert.

Was wir dennoch festgestellt haben, ist, dass insbesondere in den Wachstums-Assays in der Tripelkombination die Anzahl der Zellen nach der Behandlung deutlich unter der Anzahl der ursprünglich ausgesäten Zellen lag, was darauf hindeutet, dass durch TNF α auch Zelltod und Apoptose an Gewicht gewinnen kann.

TNF α entfaltet seine Wirkung über den TNFR1-Rezeptor und wirkt als Todesrezeptor in Richtung extrinsischer Apoptose. Über weitere Rezeptoren wie Fas kommt es zu einer Aktivierung der Caspasen 8 und 10 (Ashkenazi, 2002).

Die Expression von TNF α konnte durch den HDAC1-selektiven HDACI FK228 in HL-60- und K562-Zellen durch die Hyperacetylierung der Promoterregion an H3 gesteigert werden (Sutheesophon et al., 2005).

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) entfaltet seine Wirkung über die Bindung an DR5 (Death-Receptor 5) und führt ebenfalls zur Aktivierung der Caspase 8, welche schließlich die Zelloptose induzieren kann. Die Expression von DR5 kann durch HDACI gesteigert werden (Nakata et al., 2004), was zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit der Zellen auf das TRAIL-Signal führt.

Die Kombination aus TNF α und HDACI sollte damit die extrinsische Apoptose über Caspase 8 vorantreiben, was mit unseren Beobachtungen übereinstimmt. Zusätzlich deutet dies wiederum auf unsere Hypothese hin, dass bei der Ausbildung des vollständigen Wachstumsarrests ein Zusammenspiel aus Apoptose- und Seneszenzinduktion stattfindet, insbesondere in der Kombinationsbehandlung mit IFN γ und TNF α . Vor allem am Anfang der Behandlung werden ähnliche Signalwege angesteuert, die schließlich in der Apoptose oder Seneszenz enden.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Untersuchung war zunächst die Seneszenzinduktion durch die HDACI Vorinostat und Trichostatin A in Zellreihen, in denen die Möglichkeit einer Seneszenzinduktion bereits gezeigt wurde, zu untersuchen und mit der extrinsischen Seneszenzinduktion durch die Zytokine IFN γ und TNF α zu vergleichen. Wir haben A204-Zellen und MCF-7-Zellen gewählt, da diese Zellen die Voraussetzung erfüllen (Rentschler et al., 2018).

Im ersten Teil dieser Untersuchung haben wir die HDACI in unseren Zelllinien etabliert, d.h. mittels eines XTT-Assays die Viabilität der Zellen in unterschiedlichen Proliferationsphasen unter Behandlung untersucht, um einen Wirkungsbereich festzulegen, der eine möglichst hohe Proliferationshemmung bei nur geringer Toxizität der HDACI aufweist. Anschließend haben wir die Wirkungsweise der HDACI in den Zellreihen untersucht. Hierfür haben wir die Expression der HDACs mittels Western Blot semiquantifiziert und hierbei eine starke Expression von HDAC4 und weniger ausgeprägt von HDAC7 und HDAC2 festgestellt. Eine Wirksamkeit der HDACI in diesen Zellen war also anzunehmen, da entsprechende Zielmoleküle vorhanden sind. Dabei gingen wir in der Behandlung mit HDACI von einer Vermittlung der Wirkung insbesondere über die HDACs mit einer höheren Expression aus.

Die Wirksamkeit der HDACI über die Zunahme der Acetylierung an Histonseitenketten konnte mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden. Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Acetylierung der Lysinseitenkette 9 an Histonekörper 3 (H3K9ac) durch Behandlung mit beiden getesteten HDACI. H3K9ac ist hierbei ein bekanntes Target der epigenetischen Acetylierung durch HATs. In der Behandlung mit IFN γ und TNF α konnte diese Zunahme nicht beobachtet werden. Für die Seneszenzinduktion scheint die Histonacetylierung somit nicht obligat, da IFN γ und TNF α Seneszenz auch ohne diese Zunahme induzieren können. Allerdings könnte die Histonacetylierung die Induktion der Seneszenz durch HDACI möglicherweise vermitteln.

Nachdem wir die prinzipielle Wirksamkeit der HDACI in den Zelllinien gezeigt haben, erfolgten morphologische Untersuchungen der behandelten Zellen. Hierbei konnten wir distinktive Veränderungen der Zellmorphologie, wie eine Vergrößerung des Zellkerns oder Zunahme des Zellplasmas, feststellen, die mit einem seneszenten Phänotyp assoziiert werden. Die Veränderungen zeigten sich hierbei sowohl in den mit IFN γ und TNF α als auch in den mit HDACI behandelten Zellen.

Ein wichtiges Kriterium der Seneszenz ist ein permanenter Wachstumsarrest, der auch nach der Behandlung weiterhin anhält. Wir konnten diesen mit IFN γ und TNF α erreichen, jedoch nicht in der Einzelbehandlung mit HDACI, auch wenn sich hier eine deutliche Proliferationshemmung zeigte, die sich jedoch in den weiteren Passagen ohne Behandlung wieder an die ursprüngliche Proliferationsrate anglich. Allerdings haben wir die Behandlungskonzentrationen der HDACI bewusst entsprechend des Viabilitätsassays so niedrig gewählt, dass kaum Toxizität durch Apoptose oder Nekrose der Zellen eintritt. Aufgrund der konzentrationsabhängigen Zunahme der Proliferationshemmung gehen wir von der Möglichkeit eines vollständigen Wachstumsarrests durch die HDACI in höheren Konzentrationen aus. Zudem müssen wir von der Notwendigkeit eines Zusammenspiels von Seneszenzinduktion und Apoptose zum Erreichen von konstanten Zellzahlen in jeder Passage im Sinne eines vollständigen Wachstumsarrestes ausgehen.

Der SA-beta-Galaktosidase-Assay zeigte hingegen eine deutliche Zunahme der SA-beta-Galaktosidase-Aktivität, eines etablierten Seneszenzmarkers, sowohl in der Behandlung mit HDACI als auch mit IFN γ und TNF α . Hierbei erreichten die HDACI ein ähnliches Aktivitätsniveau wie IFN γ und TNF α .

Auch die Zunahme von seneszenzassoziierten Heterochromatinfoci (SAHF) zeigte sich in der Behandlung mit den HDACI, wie auch in der Behandlung mit IFN γ und TNF α .

Dadurch sehen wir unsere Vermutung bekräftigt, dass die HDACI in unseren Zellreihen in höherer Konzentration einen seneszenten Phänotyp induzieren können.

In der weiteren Untersuchung haben wir die Kombination der Wirkung je eines HDACI mit IFN γ mit der Kombination aus IFN γ und TNF α verglichen. Die Behandlung erfolgte hierbei simultan mit IFN γ und je einem der HDACI. Wir haben zur Analyse die in der Einzelbehandlung verwendeten Methoden und Seneszenzmarker genutzt.

Die Kombination aus IFN γ und Vorinostat konnte einen vollständigen und über die Behandlung anhaltenden Wachstumsarrest erreichen und auch die Kombination aus IFN γ und Trichostatin A zeigte einen Effekt auf die Proliferationshemmung, der über die Effekte der Einzelbehandlungen hinausging. In der Betrachtung der SA-beta-Galaktosidase-Aktivität und der SAHF zeigte sich eine Zunahme in der Kombination mit IFN γ und je einem der HDACI, die mit der Kontrollbehandlung mit IFN γ und TNF α vergleichbar sind. Zudem zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wirksamkeit in steigenden Konzentrationen der HDACI. Wir sehen in der Kombination

von IFN γ und HDACI einen additiven Effekt auf Proliferationshemmung und Seneszenzinduktion.

Dies erklären wir durch eine IFN γ -vermittelte Aktivierung des p53/p21-Signalwegs bei zeitgleicher Induktion des p16-Signalwegs durch HDACI, welche beide über die Hemmung von Cyclinen die Aktivierung von Rb hemmen und damit zum Zellzyklusarrest und zur Seneszenzinduktion führen. Dieser synergistische Effekt ist insbesondere unter dem Kontext onkologischer Therapien bedeutend.

Zudem decken sich unsere Ergebnisse weitgehend mit bisherigen Daten, welche seneszenzinduzierende und antitumorale Effekte der HDACI in vielen Tumorzelllinien beschreiben, als auch die Verstärkung der Wirksamkeit vieler antitumoraler Substanzen durch die HDACI, wie in unserem Fall IFN γ . Die genaue Wirkungsweise der HDACI ist aufgrund des Wirkungsprofils als pan-HDAC-Inhibitoren, sowie der Beeinflussung weiterer Targets abseits der Histone, bisher nicht vollständig geklärt und kann zukünftig weiter entschlüsselt werden. Hierbei kommen HDACI ins Spiel, die spezifisch nur bestimmte HDACs inhibieren und somit die Wirkung einzelner HDACs und den Effekt durch deren Inhibition besser aufdecken können.

6. Literaturverzeichnis

- Aird, K. M., and Zhang, R., 'Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 965, 2013.
- Altogen Biosystems, *Transfection Reagent for A204 Cells (Rhabdomyosarcoma Cells)*, 2022. <https://altogen.com/product/a204-transfection-reagent-rhabdomyosarcoma-cells/>.
- Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A., and Hodin, R. A., 'p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, No. 12, 1998.
- Ashkenazi, A., 'Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily', *Nature reviews. Cancer*, Vol. 2, No. 6, 2002.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K., 'High-resolution profiling of histone methylations in the human genome', *Cell*, Vol. 129, No. 4, 2007.
- Beck, J., Horikawa, I., and Harris, C., 'Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models', *Veterinary pathology*, Vol. 57, No. 6, 2020.
- Berger, S. L., 'Histone modifications in transcriptional regulation', *Current opinion in genetics & development*, Vol. 12, No. 2, 2002.
- Betz, B. L., Strobeck, M. W., Reisman, D. N., Knudsen, E. S., and Weissman, B. E., 'Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB', *Oncogene*, Vol. 21, No. 34, 2002.
- Bian, X., Liang, Z., Feng, A., Salgado, E., and Shim, H., 'HDAC inhibitor suppresses proliferation and invasion of breast cancer cells through regulation of miR-200c targeting CRKL', *Biochemical pharmacology*, Vol. 147, 2018.
- Blagosklonny, M. V., Robey, R., Sackett, D. L., Du, L., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Fojo, T., and Bates, S. E., 'Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity', *Molecular cancer therapeutics*, Vol. 1, No. 11, 2002.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., and Johnstone, R. W., 'Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors', *Nature reviews. Drug discovery*, Vol. 5, No. 9, 2006.
- Boyle, G. M., Martyn, A. C., and Parsons, P. G., 'Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma', *Pigment Cell Research*, Vol. 18, No. 3, 2005.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.-U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., and Röcken, M., 'T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence', *Nature*, Vol. 494, No. 7437, 2013.
- Brenner, E., Schörg, B. F., Ahmetlić, F., Wieder, T., Hilke, F. J., Simon, N., Schroeder, C., Demidov, G., Riedel, T., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Forschner, A., Eigentler, T., Niessner, H., Sinnberg, T., Böhm, K. S., Hömberg, N., Braumüller, H., Dauch, D., Zwirner, S., Zender, L., Sonanini, D., Geishauser, A., Bauer, J., Eichner, M., Jarick, K. J., Beilhack, A., Biskup, S., Döcker, D., Schadendorf, D., Quintanilla-Martinez, L., Pichler, B. J., Kneilling, M., Mocikat, R., and Röcken, M., 'Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours', *Nature Communications*, Vol. 11, No. 1, 2020.

- Buchwald, M., Krämer, O. H., and Heinzl, T., 'HDACi--targets beyond chromatin', *Cancer letters*, Vol. 280, No. 2, 2009.
- Burton, D. G. A., and Faragher, R. G. A., 'Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion', *Age (Dordrecht, Netherlands)*, Vol. 37, No. 2, 2015.
- Cai, J.-Y., Xu, T.-T., Wang, Y., Chang, J.-J., Li, J., Chen, X.-Y., Chen, X., Yin, Y.-F., and Ni, X.-J., 'Histone deacetylase HDAC4 promotes the proliferation and invasion of glioma cells', *International journal of oncology*, Vol. 53, No. 6, 2018.
- Chen, H. P., Zhao, Y. T., and Zhao, T. C., 'Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression', *Critical reviews in oncogenesis*, Vol. 20, 1-2, 2015.
- Cheng, C., Yang, J., Li, S.-W., Huang, G., Li, C., Min, W.-P., and Sang, Y., 'HDAC4 promotes nasopharyngeal carcinoma progression and serves as a therapeutic target', *Cell death & disease*, Vol. 12, No. 2, 2021.
- Chu, W.-M., 'Tumor necrosis factor', *Cancer letters*, Vol. 328, No. 2, 2013.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., and Serrano, M., 'Tumour biology: senescence in premalignant tumours', *Nature*, Vol. 436, No. 7051, 2005.
- Conway, G. D., O'Bara, M. A., Vedia, B. H., Pol, S. U., and Sim, F. J., 'Histone deacetylase activity is required for human oligodendrocyte progenitor differentiation', *Glia*, Vol. 60, No. 12, 2012.
- de Ruijter, Annemieke J M, van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, André B P, 'Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family', *The Biochemical journal*, Vol. 370, Pt 3, 2003.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., and Toussaint, O., 'Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo', *Nature Protocols*, Vol. 4, No. 12, 2009.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O., 'A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, No. 20, 1995.
- Drummond, D. C., Noble, C. O., Kirpotin, D. B., Guo, Z., Scott, G. K., and Benz, C. C., 'Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents', *Annual review of pharmacology and toxicology*, Vol. 45, 2005.
- Fagan, D. H., Fettig, L. M., Avdulov, S., Beckwith, H., Peterson, M. S., Ho, Y.-Y., Wang, F., Polunovsky, V. A., and Yee, D., 'Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation', *Hormones & cancer*, Vol. 8, No. 4, 2017.
- Fantin, V. R., Loboda, A., Paweletz, C. P., Hendrickson, R. C., Pierce, J. W., Roth, J. A., Li, L., Gooden, F., Korenchuk, S., Hou, X. S., Harrington, E. A., Randolph, S., Reilly, J. F., Ware, C. M., Kadin, M. E., Frankel, S. R., and Richon, V. M., 'Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription predicts vorinostat resistance in cutaneous T-cell lymphoma', *Cancer research*, Vol. 68, No. 10, 2008.
- Gallagher, S. R., 'One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins', *Current protocols in immunology*, Chapter 8, 2006.
- Goda, S., Isagawa, T., Chikaoka, Y., Kawamura, T., and Aburatani, H., 'Control of histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation state via cooperative two-step demethylation by Jumonji domain containing 1A (JMJD1A) homodimer', *The Journal of biological chemistry*, Vol. 288, No. 52, 2013.

- Gui, C.-Y., Ngo, L., Xu, W. S., Richon, V. M., and Marks, P. A., 'Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101, No. 5, 2004.
- Hayashi, A., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Hayashi, T., Fuseya, C., Suzuki, A., Konishi, I., and Shiozawa, T., 'Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin', *International journal of cancer*, Vol. 127, No. 6, 2010.
- Herranz, N., and Gil, J., 'Mechanisms and functions of cellular senescence', *The Journal of clinical investigation*, Vol. 128, No. 4, 2018.
- Hezroni, H., Tzchori, I., Davidi, A., Mattout, A., Biran, A., Nissim-Rafinia, M., Westphal, H., and Meshorer, E., 'H3K9 histone acetylation predicts pluripotency and reprogramming capacity of ES cells', *Nucleus (Austin, Tex.)*, Vol. 2, No. 4, 2011.
- Hnasko, T. S., and Hnasko, R. M., 'The Western Blot', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 1318, 2015.
- Homann, L., Rentschler, M., Brenner, E., Böhm, K., Röcken, M., and Wieder, T., 'IFN- γ and TNF Induce Senescence and a Distinct Senescence-Associated Secretory Phenotype in Melanoma', *Cells*, Vol. 11, No. 9, 2022.
- Iizuka, M., and Smith, M. M., 'Functional consequences of histone modifications', *Current opinion in genetics & development*, Vol. 13, No. 2, 2003.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D., 'Translating the histone code', *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 293, No. 5532, 2001.
- Jung, K. H., Noh, J. H., Kim, J. K., Eun, J. W., Bae, H. J., Xie, H. J., Chang, Y. G., Kim, M. G., Park, H., Lee, J. Y., and Nam, S. W., 'HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins', *Journal of cellular biochemistry*, Vol. 113, No. 6, 2012.
- Kakiuchi, A., Kakuki, T., Ohwada, K., Kurose, M., Kondoh, A., Obata, K., Nomura, K., Miyata, R., Kaneko, Y., Konno, T., Kohno, T., Himi, T., Takano, K.-I., and Kojima, T., 'HDAC inhibitors suppress the proliferation, migration and invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells via p63-mediated tight junction molecules and p21-mediated growth arrest', *Oncology reports*, Vol. 45, No. 4, 2021.
- Karmodiya, K., Krebs, A. R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., and Tora, L., 'H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells', *BMC Genomics*, Vol. 13, No. 1, 2012.
- Kim, J. K., Noh, J. H., Eun, J. W., Jung, K. H., Bae, H. J., Shen, Q., Kim, M. G., Chang, Y. G., Kim, S.-J., Park, W. S., Lee, J. Y., Borlak, J., and Nam, S. W., 'Targeted inactivation of HDAC2 restores p16INK4a activity and exerts antitumor effects on human gastric cancer', *Molecular cancer research : MCR*, Vol. 11, No. 1, 2013.
- Kim, K. S., Kang, K. W., Seu, Y. B., Baek, S.-H., and Kim, J.-R., 'Interferon-gamma induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells', *Mechanisms of ageing and development*, Vol. 130, No. 3, 2009.
- Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., and Carrier, F., 'Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA', *Cancer research*, Vol. 63, No. 21, 2003.
- Knutson, A. K. a., Welsh, J., Taylor, T., Roy, S., Wang, W.-L. W., and Tenniswood, M., 'Comparative effects of histone deacetylase inhibitors on p53 target gene expression,

- cell cycle and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells', *Oncology reports*, Vol. 27, No. 3, 2012.
- Koike, N., Maita, H., Taira, T., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S. M., 'Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1)', *FEBS letters*, Vol. 467, No. 1, 2000.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S., 'The essence of senescence', *Genes & development*, Vol. 24, No. 22, 2010.
- Laemmli, U. K., 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, Vol. 227, No. 5259, 1970.
- Laengle, J., Kabiljo, J., Hunter, L., Homola, J., Proding, S., Egger, G., and Bergmann, M., 'Histone deacetylase inhibitors valproic acid and vorinostat enhance trastuzumab-mediated antibody-dependent cell-mediated phagocytosis', *Journal for immunotherapy of cancer*, Vol. 8, No. 1, 2020.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., and Hwang, E. S., 'Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase', *Aging cell*, Vol. 5, No. 2, 2006.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, Alwin A H A, Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, Antoine H F M, 'Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin', *Current biology : CB*, Vol. 13, No. 14, 2003.
- Ler, S. Y., Leung, C. H. W., Khin, L. W., Lu, G.-D., Salto-Tellez, M., Hartman, M., Iau, P. T. C., Yap, C. T., and Hooi, S. C., 'HDAC1 and HDAC2 independently predict mortality in hepatocellular carcinoma by a competing risk regression model in a Southeast Asian population', *Oncology reports*, Vol. 34, No. 5, 2015.
- Li, S., Wang, F., Qu, Y., Chen, X., Gao, M., Yang, J., Zhang, D., Zhang, N., Li, W., and Liu, H., 'HDAC2 regulates cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells', *Oncology letters*, Vol. 13, No. 1, 2017.
- Li, Y., and Seto, E., 'HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Vol. 6, No. 10, 2016.
- Lv, Z., Weng, X., Du, C., Zhang, C., Xiao, H., Cai, X., Ye, S., Cheng, J., Ding, C., Xie, H., Zhou, L., Wu, J., and Zheng, S., 'Downregulation of HDAC6 promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells and predicts poor prognosis in liver transplantation patients', *Molecular carcinogenesis*, Vol. 55, No. 5, 2016.
- Mahlknecht, U., and Hoelzer, D., 'Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, Vol. 6, No. 8, 2000.
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Turner, J. G., Daud, A. I., Sullivan, D. M., and Munster, P. N., 'Synergistic interaction between histone deacetylase and topoisomerase II inhibitors is mediated through topoisomerase IIbeta', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Vol. 11, No. 23, 2005.
- Marks, P. A., and Dokmanovic, M., 'Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents', *Expert opinion on investigational drugs*, Vol. 14, No. 12, 2005.
- Marquard, L., Poulsen, C. B., Gjerdrum, L. M., Nully Brown, P. de, Christensen, I. J., Jensen, P. B., Sehested, M., Johansen, P., and Ralfkiaer, E., 'Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas', *Histopathology*, Vol. 54, No. 6, 2009.

- Martín-Caballero, J., Flores, J. M., García-Palencia, P., and Serrano, M., 'Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice', *Cancer research*, Vol. 61, No. 16, 2001.
- Minucci, S., and Pelicci, P. G., 'Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer', *Nature reviews. Cancer*, Vol. 6, No. 1, 2006.
- Misawa, T., Tanaka, Y., Okada, R., and Takahashi, A., 'Biology of extracellular vesicles secreted from senescent cells as senescence-associated secretory phenotype factors', *Geriatrics & gerontology international*, Vol. 20, No. 6, 2020.
- Morton, C. L., and Potter, P. M., 'Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 286, No. 2, 1998.
- Mrakovcic, M., Kleinheinz, J., and Fröhlich, L. F., 'p53 at the Crossroads between Different Types of HDAC Inhibitor-Mediated Cancer Cell Death', *International journal of molecular sciences*, Vol. 20, No. 10, 2019.
- Muñoz-Espín, D., and Serrano, M., 'Cellular senescence: from physiology to pathology', *Nature reviews. Molecular cell biology*, Vol. 15, No. 7, 2014.
- Munro, J., Barr, N. I., Ireland, H., Morrison, V., and Parkinson, E. K., 'Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock', *Experimental cell research*, Vol. 295, No. 2, 2004.
- Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., and Richon, V. M., 'The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells', *Cancer research*, Vol. 61, No. 23, 2001.
- Nakata, S., Yoshida, T., Horinaka, M., Shiraishi, T., Wakada, M., and Sakai, T., 'Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells', *Oncogene*, Vol. 23, No. 37, 2004.
- Olsen, E. A., Kim, Y. H., Kuzel, T. M., Pacheco, T. R., Foss, F. M., Parker, S., Frankel, S. R., Chen, C., Ricker, J. L., Arduino, J. M., and Duvic, M., 'Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Vol. 25, No. 21, 2007.
- Ouaïssi, M., Sielezneff, I., Silvestre, R., Sastre, B., Bernard, J.-P., Lafontaine, J. S., Payan, M. J., Dahan, L., Pirrò, N., Seitz, J. F., Mas, E., Lombardo, D., and Ouaiissi, A., 'High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas', *Annals of surgical oncology*, Vol. 15, No. 8, 2008.
- Palani, C. D., Beck, J. F., and Sonnemann, J., 'Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression', *Investigational new drugs*, Vol. 30, No. 1, 2012.
- Paluvai, H., Di Giorgio, E., and Brancolini, C., 'Unscheduled HDAC4 repressive activity in human fibroblasts triggers TP53-dependent senescence and favors cell transformation', *Molecular oncology*, Vol. 12, No. 12, 2018.
- Pellikainen, M. J., Pekola, T. T., Ropponen, K. M., Kataja, V. V., Kellokoski, J. K., Eskelinen, M. J., and Kosma, V.-M., 'p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis', *Journal of clinical pathology*, Vol. 56, No. 3, 2003.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Deenen, R., Köhrer, K., Arent, T., Schulz, W. A., and Niegisch, G., 'Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial

- Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms', *Molecular cancer therapeutics*, Vol. 15, No. 2, 2016.
- Rentschler, M., Chen, Y., Pahl, J., Soria-Martinez, L., Braumüller, H., Brenner, E., Bischof, O., Röcken, M., and Wieder, T., 'Nuclear Translocation of Argonaute 2 in Cytokine-Induced Senescence', *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, Vol. 51, No. 3, 2018.
- Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., and Glasebrook, A. L., 'An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT', *Journal of immunological methods*, Vol. 142, No. 2, 1991.
- Ropero, S., and Esteller, M., 'The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer', *Molecular oncology*, Vol. 1, No. 1, 2007.
- Rosato, R. R., and Grant, S., 'Histone deacetylase inhibitors in clinical development', *Expert opinion on investigational drugs*, Vol. 13, No. 1, 2004.
- Sachweh, M. C. C., Drummond, C. J., Higgins, M., Campbell, J., and Laín, S., 'Incompatible effects of p53 and HDAC inhibition on p21 expression and cell cycle progression', *Cell death & disease*, Vol. 4, No. 3, 2013.
- Sakajiri, S., Kumagai, T., Kawamata, N., Saitoh, T., Said, J. W., and Koeffler, H. P., 'Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines', *Experimental hematology*, Vol. 33, No. 1, 2005.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M., 'Cellular senescence and its effector programs', *Genes & development*, Vol. 28, No. 2, 2014.
- Santoro, F., Botrugno, O. A., Dal Zuffo, R., Pallavicini, I., Matthews, G. M., Cluse, L., Barozzi, I., Senese, S., Fornasari, L., Moretti, S., Altucci, L., Pelicci, P. G., Chiocca, S., Johnstone, R. W., and Minucci, S., 'A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance', *Blood*, Vol. 121, No. 17, 2013.
- Sapega, O., Mikyšková, R., Bieblová, J., Mrázková, B., Hodný, Z., and Reiniš, M., 'Distinct phenotypes and 'bystander' effects of senescent tumour cells induced by docetaxel or immunomodulatory cytokines', *International journal of oncology*, Vol. 53, No. 5, 2018.
- Sarkar, R., Banerjee, S., Amin, S. A., Adhikari, N., and Jha, T., 'Histone deacetylase 3 (HDAC3) inhibitors as anticancer agents: A review', *European journal of medicinal chemistry*, Vol. 192, 2020.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., and Lowe, S. W., 'A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy', *Cell*, Vol. 109, No. 3, 2002.
- Shan, W., Jiang, Y., Yu, H., Huang, Q., Liu, L., Guo, X., Li, L., Mi, Q., Zhang, K., and Yang, Z., 'HDAC2 overexpression correlates with aggressive clinicopathological features and DNA-damage response pathway of breast cancer', *American journal of cancer research*, Vol. 7, No. 5, 2017.
- Shoji, T., Tanaka, F., Takata, T., Yanagihara, K., Otake, Y., Hanaoka, N., Miyahara, R., Nakagawa, T., Kawano, Y., Ishikawa, S., Katakura, H., and Wada, H., 'Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Vol. 20, No. 18, 2002.
- Sidler, C., Kovalchuk, O., and Kovalchuk, I., 'Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging', *Frontiers in genetics*, Vol. 8, 2017.
- Sikora, E., Mosieniak, G., and Sliwinska, M. A., 'Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells', *Current drug targets*, Vol. 17, No. 4, 2016.

- Suraweera, A., O'Byrne, K. J., and Richard, D. J., 'Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi', *Frontiers in Oncology*, Vol. 8, 2018.
- Sutheesophon, K., Nishimura, N., Kobayashi, Y., Furukawa, Y., Kawano, M., Itoh, K., Kano, Y., Ishii, H., and Furukawa, Y., 'Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228)', *Journal of cellular physiology*, Vol. 203, No. 2, 2005.
- Sutherland, R. L., Hall, R. E., and Taylor, I. W., 'Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells', *Cancer research*, Vol. 43, No. 9, 1983.
- Takaoka, M., Harada, H., Deramaudt, T. B., Oyama, K., Andl, C. D., Johnstone, C. N., Rhoades, B., Enders, G. H., Opitz, O. G., and Nakagawa, H., 'Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction', *Oncogene*, Vol. 23, No. 40, 2004.
- Tarnowski, M., Tkacz, M., Kopytko, P., Bujak, J., Piotrowska, K., and Pawlik, A., 'Trichostatin A Inhibits Rhabdomyosarcoma Proliferation and Induces Differentiation through MyomiR Reactivation', *Folia biologica*, Vol. 65, No. 1, 2019.
- van Damme, M., Crompot, E., Meuleman, N., Mineur, P., Bron, D., Lagneaux, L., and Stamatopoulos, B., 'HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance', *Epigenetics*, Vol. 7, No. 12, 2012.
- Villar-Garea, A., and Esteller, M., 'Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents', *International journal of cancer*, Vol. 112, No. 2, 2004.
- Wang, S., Zhou, M., Lin, F., Liu, D., Hong, W., Lu, L., Zhu, Y., and Xu, A., 'Interferon- γ induces senescence in normal human melanocytes', *PloS one*, Vol. 9, No. 3, 2014.
- Wang, X., Waschke, B. C., Woolaver, R. A., Chen, Z., Zhang, G., Piscopio, A. D., Liu, X., and Wang, J. H., 'Histone Deacetylase Inhibition Sensitizes PD1 Blockade-Resistant B-cell Lymphomas', *Cancer immunology research*, Vol. 7, No. 8, 2019.
- Was, H., Krol, S. K., Rotili, D., Mai, A., Wojtas, B., Kaminska, B., and Maleszewska, M., 'Histone deacetylase inhibitors exert anti-tumor effects on human adherent and stem-like glioma cells', *Clinical Epigenetics*, Vol. 11, No. 1, 2019.
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F. R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M., and Kristiansen, G., 'Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy', *British journal of cancer*, Vol. 98, No. 3, 2008a.
- Weichert, W., Röske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.-C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T., and Denkert, C., 'Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Vol. 14, No. 6, 2008b.
- West, A. C., and Johnstone, R. W., 'New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment', *The Journal of clinical investigation*, Vol. 124, No. 1, 2014.
- Wieder, T., Brenner, E., Braumüller, H., Bischof, O., and Röcken, M., 'Cytokine-induced senescence for cancer surveillance', *Cancer metastasis reviews*, Vol. 36, No. 2, 2017.
- Willis-Martinez, D., Richards, H. W., Timchenko, N. A., and Medrano, E. E., 'Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer', *Experimental gerontology*, Vol. 45, No. 4, 2010.

- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., and Oehme, I., 'HDAC family: What are the cancer relevant targets?', *Cancer letters*, Vol. 277, No. 1, 2009.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., and Marks, P. A., 'Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action', *Oncogene*, Vol. 26, No. 37, 2007.
- Yang, X.-J., and Grégoire, S., 'Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication', *Molecular and cellular biology*, Vol. 25, No. 8, 2005.
- Yao, H., and Rahman, I., 'Role of histone deacetylase 2 in epigenetics and cellular senescence: implications in lung inflammaging and COPD', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, Vol. 303, No. 7, 2012.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P. D., 'Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci', *Molecular and cellular biology*, Vol. 27, No. 6, 2007.
- Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D., and Adams, P. D., 'Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA', *Developmental cell*, Vol. 8, No. 1, 2005.
- Zhu, C., Chen, Q., Xie, Z., Ai, J., Tong, L., Ding, J., and Geng, M., 'The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, Vol. 89, No. 3, 2011.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in den Laboren der Arbeitsgruppe Tumorummunologie von Prof. Dr. Martin Röcken im Röntgenweg 13 in Tübingen durchgeführt. Unterstützt wurde ich dabei durch meinen Betreuer Prof. Dr. Thomas Wieder.

Das Experiment Kapitel 3.2 bzw. Abbildung 10 wurde durch Herrn Maximilian Rentschler durchgeführt und die Abbildung erstellt. Hierbei wurden die Zellen durch mich bereitgestellt, SDS-Page und Western-Blot, sowie die Erstellung der Abbildung sind durch Herrn Rentschler erfolgt.

Alle weiteren Experimente und Abbildungen dieser Arbeit sind durch mich erfolgt und von mir erstellt worden. Die Abbildungen in der Einleitung wurden entsprechend den angegebenen Quellen genutzt und teilweise angepasst.

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation mit dem Titel „Wachstumsarrest und Seneszenzinduktion in humanen Tumorzelllinien durch Kombinationsbehandlung mit Histondeacetylaseinhibitoren und Interferon- γ “ von mir selbst erstellt wurde und alle Quellen und Hilfen sachgemäß angegeben wurden.

Tübingen, der 10.12.2022

Michael Rosen

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Röcken, für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe und den Laborgebäuden diese Arbeit durchzuführen. Auch möchte ich mich für die Idee zu diesem Projekt, sowie die Diskussion der Ergebnisse in seinem Data Club bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Heidi Braumüller für die Einarbeitung in die Grundzüge der Methodik der Zellkultur.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Maximilian Rentschler bedanken, für die Einarbeitung in Methodik der Immunfluoreszenz, sowie die Durchführung und Bereitstellung der Ergebnisse des Immunoblots, wie oben angeführt.

Mein Dank gilt außerdem den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgemeinschaft Röcken, welche mir im Großen und Kleinen zur Seite standen, sowie die Diskussion der Ergebnisse im Rahmen des Data Clubs.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei Ronald Keller, der als guter Freund, Arzt und Forscher immer ein offenes Ohr und einen praktischen Rat bereit hatte.

Zuletzt gilt der größte Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Wieder, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Als mein Betreuer stand er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, plante die Experimente und diskutierte die Ergebnisse mit mir. Zudem hat er diese Arbeit in der Erstellung sorgfältig und kritisch korrigiert und das immerzu mit einem enormen Maß an Freundlichkeit und fachlicher Expertise.

Tübingen, der 10.12.2022

Michael Rosen