

**Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**„Rolle der Histondeacetylase (HDAC) in humanen soliden
Tumoren“**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Annika Lehmann

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Denkert
2. Prof. Dr. med. G. Klöppel
3. PD Dr. med. habil. S. Koch

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
<i>Abstract</i>	4
<i>Einleitung</i>	5
<i>Material und Methoden</i>	6
<i>Ergebnisse</i>	8
<i>Diskussion</i>	10
<i>Referenzen</i>	12
Zugrundeliegende Publikationen und Anteilserklärung	13
Lebenslauf	15
Publikationsliste.....	16
Selbständigkeitserklärung	19
Danksagung.....	20

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Zusammenfassung

„Rolle der Histondeacetylase (HDAC) in humanen soliden Tumoren“

Annika Lehmann

Abstract:

Der starke funktionelle Zusammenhang zwischen vermehrter Histondeacetylase-Aktivität und der Entstehung maligner Neoplasien führte in den letzten Jahren zur Entwicklung verschiedener Histondeacetylase-Inhibitoren. Diese Substanzen, die u.a. durch die transkriptionelle Aktivierung von Tumorsuppressorgenen wirken, stellen einen interessanten Ansatzpunkt für neue zielgerichtete Chemotherapien dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression humaner Klasse I Histondeacetylasen in verschiedenen soliden Tumoren charakterisiert und die Effekte zweier bekannter HDAC-Inhibitoren im Zellkulturmodell untersucht. Eine vermehrte Expression einzelner HDAC-Isoformen war mit einer verstärkten Proliferation und Dedifferenzierung der Tumoren assoziiert und stellte in einigen Tumorentitäten einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Beide HDAC-Inhibitoren zeigten darüber hinaus deutliche wachstumshemmende Eigenschaften im Zellkulturmodell. Die tumorbiologische Relevanz der Klasse I Histondeacetylasen sowie die Möglichkeit einer effektiven Hemmung dieser Enzyme durch HDAC-Inhibitoren machen HDACs daher zu viel versprechenden Kandidaten in der Entwicklung neuer chemotherapeutischer Behandlungsstrategien.

Einleitung:

Maligne Neoplasien stellen in Deutschland trotz intensiver Forschung nach den Herz-Kreislaufkrankungen noch immer die zweithäufigste Todesursache dar [1]. Neben den drei Säulen der Krebstherapie, zu denen die Chirurgie, die Bestrahlung und die konventionelle Chemotherapie zählen, richtet sich der Fokus in den letzten Jahren mehr und mehr auf die so genannte zielgerichtete Chemotherapie („targeted therapy“), die sich mit der Beeinflussung definierter molekularer Zielstrukturen befasst. Ziel dieser neuartigen chemotherapeutischen Ansätze ist es vor allem, eine individualisierte Therapie zu ermöglichen und Biomarker für die Vorhersage eines Ansprechens auf bestimmte Therapien zu entwickeln.

Posttranslationale Modifikationen wie die Abspaltung von Histon-Acetylgruppen durch Histondeacetylasen (HDACs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Chromatinrestrukturierung und bei der transkriptionellen Regulation bestimmter Gene [2]. Darüber hinaus sind HDACs in der Lage, die direkte Deacetylierung tumorrelevanter Proteine wie z.B. p53, GATA-1, β -catenin und NF- κ B (RelA/p65) zu katalysieren, was zu einer Änderung der subzellulären Lokalisation bzw. Aktivität dieser Proteine führt [3]. Im menschlichen Gewebe sind bislang vier strukturell unterschiedliche Gruppen von Histondeacetylasen beschrieben, die insgesamt 18 Isoformen umfassen. Die am häufigsten exprimierten und tumorbiologisch relevantesten Isoformen sind die NAD⁺ unabhängigen Klasse I HDACs 1, 2 und 3 [4].

Die Erkenntnis, dass in vielen Geweben ein starker funktioneller Zusammenhang zwischen vermehrter HDAC-Aktivität und der Entstehung maligner Tumoren besteht, führte in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Reihe von Substanzen, die als Histondeacetylase-Inhibitoren (HDIs) agieren und durch die transkriptionelle Aktivierung von Tumorsuppressorgenen einen interessanten Ansatzpunkt im Rahmen zielgerichteter Chemotherapien bilden [3, 5, 6, 7]. HDIs zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutliche antineoplastische Effekte und sind unter anderem in der Lage, Tumorstadium und Metastasierung zu hemmen sowie Apoptose und Differenzierung zu induzieren [8, 9]. Darüber hinaus konnten in der Kombination mit verschiedenen konventionellen Chemotherapeutika bereits Synergien nachgewiesen werden [10, 11, 12]. Zu den bekanntesten HDIs zählen die Suberoylanilidhydroxaminsäure (SAHA) und die Valproinsäure (VPA), die sich in späten Phasen der klinischen Erprobung in der Tumorthherapie befinden und viel versprechende Antitumoreffekte mit geringer Toxizität aufweisen [3]. Kürzlich wurde SAHA durch die Food and Drug Administration (FDA) der Vereinigten Staaten für die klinische Anwendung im kutanen T-Zell-Lymphom zugelassen [13].

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Charakterisierung der Klasse I Histondeacetylasen 1, 2 und 3 in definierten humanen soliden Tumoren. Hierzu wurde der Expressionsstatus der HDAC-Isoformen an verschiedenen Tumorkollektiven immunhistochemisch erhoben und mit klinisch-pathologischen Daten und dem Patientenüberleben korreliert. Durch den Einsatz spezifischer siRNA konnten darüber hinaus Hinweise auf die Funktion einzelner Isoformen im Zellkulturmodell gewonnen werden. In einem weiteren Ansatz wurden Effekte der bekannten HDIs SAHA und VPA auf tumorrelevante Prozesse wie Proliferation und Zellzyklus in einem Zellkultursystem untersucht.

Material und Methoden:

Patienten:

Für die retrospektiven Studien wurde Gewebe von Patienten mit primären malignen Tumoren verwendet, das im Rahmen von chirurgischen Resektionen in den Jahren 1991-2005 an der Charité Berlin bzw. an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg entnommen wurde. Die histopathologische Beurteilung der HE-Schnitte sowie die Klassifizierung der Tumoren erfolgten durch erfahrene Pathologen der Charité Berlin. Die Verteilung klinisch-pathologischer Daten sowie Details bezüglich der Zusammensetzung der Patientenkohorten sind in den entsprechenden Kapiteln der Publikationen beschrieben.

Immunhistochemie: Für die immunhistochemische Detektion der HDAC-Isoformen an 5 µM Paraffinschnitten wurden folgende Antikörper verwendet: polyklonaler Kaninchen IgG Antikörper gegen HDAC1 (1:11, Abcam, Cambridge, UK), monoklonaler Maus IgG Antikörper gegen HDAC2 (1:5000, Abcam) und monoklonaler Maus IgG Antikörper gegen HDAC3 (1:500, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Die Antikörperspezifität wurde durch selektive RNA Inhibition und anschließende Detektion mittels Western Blot kontrolliert. Die Evaluierung erfolgte anhand eines Immunoreaktivitäts-Scores (IRS), bei dem die Färbeintensität (0-3) und der prozentuale Anteil gefärbter Zellen (0-4) ermittelt wurde. Der IRS mit Werten zwischen 0 und 12 wurde durch Multiplikation der beiden Faktoren bestimmt. Fälle mit einem IRS zwischen 0 und 6 wurden als negativ für die jeweilige Färbung eingestuft, Fälle mit einem IRS größer 6 als positiv.

Inhibitoren: Konfluente Karzinomzelllinien wurden mit einer Dichte von $0,6 \times 10^5$ Zellen pro ml in eine 96-Well Zellkulturschale ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen von VPA bzw. SAHA für 72 h behandelt.

Immunfluoreszenz: Konfluente Karzinomzelllinien wurden mit einer Dichte von $0,4 \times 10^5$ Zellen/ml in 4-Well-LabTEK Kammern ausgesät, über Nacht inkubiert und wie oben beschrieben mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Die Blockierung wurde mit serumhaltigem Puffer für 30 min (10% BSA, 1% NGS in PBS) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Primärantikörper gegen Acetyl-H3/H4 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper und DAPI für jeweils 30 min inkubiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica) visualisiert.

XTT: Der Anteil vitaler Zellen wurde nach 72 stündiger Inhibitorbehandlung mit Hilfe eines XTT Zellproliferations Kits (Roche Molecular Biochemicals, Grenzach-Wyhlen, Germany) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff für 4 h bei 37°C inkubiert und die Formazanbildung bei 450 nm gemessen.

Zellzyklus: Nach wie oben beschriebener Behandlung der Zelllinien mit VPA bzw. SAHA wurden die Zellen geerntet und in 70% Ethanol fixiert und gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 500µl Verdünnungspuffer (50µl 0,1% Triton X100 und 250mg 0,5% BSA in 50 ml PBS) aufgenommen. Ein RNase-Verdau mittels 4µl RNase (10mg/ml) erfolgte für 1 Std. bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl Propidiumiodid gefärbt und der prozentuale Anteil der Zellen in der G₀/G₁, S, und G₂/M-Phase durchflusszytometrisch an einem FACSCalibur Gerät (BD Bioscience, San Jose, USA) ermittelt.

RNAi: Die siRNA-Transfektion erfolgte mit Oligofectamin (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers 24h nach der Aussaat unter serumfreien Bedingungen. Pro Ansatz wurden 30 pmol siRNA verwendet, wobei eine „non-silencing“ siRNA als Kontrolle diente. Die Zellernte für den Western Blot sowie den XTT-Test erfolgten 72h nach Transfektion.

Western Blot: Je 100 µg Gesamtprotein wurden auf einem 12%igen Polyacrylamidgel bei 100 V aufgetrennt und die Proben anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach der Blockierung mit Blockingpuffer (0,2% I-Block (TROPIX), 0,1% Tween-20 gelöst in PBS) wurde die Membran mit primärem Antikörper (HDAC1 (1:30), HDAC2 (1:800), HDAC3 (1:200)) inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit AP-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5000) und CSPD-Substrat (Tropix). Als Ladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet (1:5000).

Ergebnisse:

Klasse I HDAC-Isoformexpression in soliden Tumoren

Die *in vivo*-Expressionsdaten zeigten eine starke Expression aller drei HDAC-Isoformen in einem hohen Prozentsatz von Malignomen unterschiedlicher Tumorentitäten (Tabelle 1). Betrachtet man die Verteilung der Expressionsdaten, so zeigte sich HDAC3 in den Kollektiven als die am häufigsten exprimierte Isoform.

Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten und Patientenüberleben

Die Korrelation der Expression einzelner HDAC-Isoformen mit klinisch-pathologischen Daten kann hier nur in Kürze zusammenfassend dargestellt werden. Sowohl in der Kolonkarzinomkohorte als auch in der Magenkarzinomkohorte konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohem Expressionslevel einzelner HDAC-Isoformen und einem fortgeschrittenen Tumorstadium festgestellt werden (Kolon: HDAC1, $p=0,008$; HDAC2, $p=0,017$; HDAC3, $p=0,005$; Magen: HDAC2, $p=0,0231$). Die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse zeigte weiterhin, dass eine hohe Expression einzelner HDAC-Isoformen, insbesondere der Isoform 2, in den untersuchten Tumorentitäten häufig in gering differenzierten Tumoren zu finden war (Prostata: HDAC1, $p=0,006$; HDAC2, $p=0,047$; Magen: HDAC2, $p=0,0033$). Erfolgte eine Gruppierung der Fälle anhand der Expression aller drei Isoformen (gHDAC) in negativ (alle drei Isoformen negativ) versus teilweise positiv (eine oder zwei Isoformen positiv) versus positiv (alle drei Isoformen positiv), korrelierte eine verstärkte gHDAC-Expression im Kolonkarzinom ebenfalls mit dem Tumorgrad (gHDAC, $p=0,002$). Eine Färbung der Schnitte mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 zeigte darüber hinaus, dass ein hoher HDAC-Expressionsstatus vermehrt in Karzinomen mit hoher proliferativer Aktivität zu finden war (Kolon: gHDAC, $p=0,022$; Prostata: HDAC1, $p=0,032$; HDAC2, $p=0,002$; HDAC3, $p<0,001$).

In der univariaten Überlebensanalyse war eine erhöhte HDAC1 (Kolon, $p=0,022$, Magen, $p=0,0102$), HDAC2 (Kolon, $p=0,001$, Prostata, $p=0,004$, Magen, $p=0,0005$) bzw. gHDAC-Expression (Kolon, $p=0,001$, Magen, $p=0,0022$) in einem Teil der Tumorkohorten mit einem verminderten Patientenüberleben assoziiert. Eine unabhängige prognostische Signifikanz konnte abhängig von der untersuchten Tumorentität in einer multivariaten Analyse für HDAC1 (Magen: RR 2.09 [1.30-3.35], $p=0,0024$), sowie für HDAC2 (Kolon: RR 2.6 [1.095-6.116], $p=0,03$; Prostata: RR 2.4 [1.150-4.856], $p=0,02$; Magen: RR 1.72 [1.08-2.73], $p=0,0225$) und gHDAC (Magen: RR 2.18 [1.19-4.01], $p=0,025$) nachgewiesen werden.

		HDAC1	HDAC2	HDAC3
Kolon		36,4 %	57,9 %	72,9 %
Prostata		69,8 %	74,0 %	94,8 %
Magen	K _{Tr}	62,2 %	55,2 %	61,5 %
	K _{Val}	38,7 %	42,7 %	52,7 %

K_{Tr} = Trainingskohorte; K_{Val} = Validierungskohorte

Effekte spezifischer und unspezifischer HDAC-Inhibition

Eine chemische HDAC-Inhibition mittels SAHA (2 μ M) und VPA (2 mM) führte im Zellkulturmodell nach 72 h zu einer deutlichen Reacetylierung der Histone H3 und H4, wie eine Anfärbung mit fluoreszenzgekoppelten Acetyl-H3/H4-Antikörpern zeigte. Morphologische Veränderungen der Zellen wie die Bildung zytoplasmatischer Ausläufer konnten insbesondere nach einer Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor VPA beobachtet werden. Diese lassen auf eine vermehrte Differenzierung der Zellen schließen.

Beide HDIs zeigten konzentrationsabhängig deutliche zytoreduktive Eigenschaften in den untersuchten Zellkultursystemen. So konnte nach der Behandlung mit 4 μ M SAHA in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien nach 72 h eine signifikante Reduktion der vitalen Zellpopulation um 69,9% erreicht werden, wohingegen die Behandlung mit 4 mM VPA zelllinienabhängig zu einer Zellzahlreduktion um bis zu 77,3% führte.

Der Einsatz selektiver HDAC-siRNA führte zu einer isoformspezifischen Ausschaltung der jeweiligen Isoform, wie ein Western Blot zeigte. Eine verminderte Expression der HDAC-Isoformen 1 und 2 hatte dabei einen signifikanten zytoreduktiven Effekt in der Zelllinie CX-2 (HDAC1:13,3%; HDAC2: 29,8%). Eine Hemmung der HDAC-Isoform 3 hatte dagegen keinen deutlichen Einfluss auf die Zellzahl. Insgesamt konnte durch die Ausschaltung einzelner HDAC-Isoformen die Zellzahl jedoch nicht in dem Maße gemindert werden, wie es durch die unspezifische bzw. semiselektive Behandlung mit chemischen HDIs der Fall war.

In der Kolonkarzinomzelllinie CX-2 konnte für die Behandlung mit VPA ein deutlicher Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase festgestellt werden. Eine Behandlung der Zellen mit SAHA führte in den eingesetzten Konzentrationen dagegen zu einer starken Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase. Auch der Einsatz spezifischer HDAC2-siRNA führte in der Zelllinie CX-2 zu einem leichten Arrest der Zellen in der G2/M-Phase.

Diskussion:

Wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Effekte bekannter HDIs konnten bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden [8, 9]. Nach wie vor ist jedoch über den exakten Wirkmechanismus dieser Substanzen und die Rolle einzelner HDAC-Isoformen bei der Tumorprogression wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei der bekanntesten HDAC-Inhibitoren, SAHA und VPA, im Zellkulturmodell deutliche antineoplastische Effekte zeigen. Weiterhin konnten anhand von *in vivo*-Expressionsdaten sowie durch den Einsatz spezifischer siRNA Hinweise auf die Rolle einzelner HDAC-Isoformen bei der Karzinogenese und Progression verschiedener humaner Tumorentitäten gewonnen werden.

Vergleichbar mit Ergebnissen vorangegangener Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikante konzentrations- und zelllinienabhängige Proliferationshemmung durch den Einsatz der verwendeten HDIs im Zellkultursystem beobachtet. Auch der Einsatz spezifischer HDAC2-siRNA führte in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien zu einem moderaten Rückgang der Zellzahl. Im Vergleich konnte die Proliferationsrate durch die Ausschaltung einzelner Isoformen jedoch nicht in dem Maße gemindert werden, wie es durch eine semiselektive chemische HDAC-Inhibition mittels SAHA bzw. VPA der Fall war. Ein vergleichsweise breit gefächertes Therapieansatz durch den Einsatz von Pan-HDAC-Inhibitoren erscheint in dieser Tumorentität demnach geeigneter als eine gezielte isoformspezifische Therapie. Betrachtet man jedoch die Tatsache, dass sich für die entsprechende Patientenkohorte in unserer Studie ausschließlich für HDAC2 eine unabhängige prognostische Relevanz ergab, sollte unter Abwägung des Nebenwirkungsspektrums auch eine Fokussierung des Therapiekonzepts auf diese eine Isoform in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz zu zahlreichen *in vivo*-Daten, die Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Klasse I HDACs und der Entstehung maligner Tumoren liefern, ist bislang wenig über die Funktion einzelner HDAC-Isoformen in der Tumorgenese und -progression bekannt [14, 15, 16]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Klasse I HDAC-Expression in mehreren verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, die mit klinisch-pathologischen Daten sowie dem Patientenüberleben korrelierte. HDAC3 war dabei in den untersuchten Kohorten im Allgemeinen am stärksten exprimiert, gefolgt von HDAC2 und HDAC1. Der exakte Regulationsmechanismus von Aktivität und Expression bestimmter HDAC-Isoformen in der Zelle ist bislang weitestgehend unklar. Unter anderem wird diskutiert, dass spezifische Wachstumsfaktoren für eine gleichsinnige Steuerung der Klasse I HDAC-Expression verantwortlich sind [17]. Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorten zeigte sich ein hohes Maß an Konkordanz zwischen den Expressionsmustern der drei Isoformen, was für eine gemeinsame übergeordnete Regulationsebene sprechen könnte.

Auf der Basis unserer Daten lässt sich postulieren, dass insbesondere HDAC2 sowohl im Zusammenhang mit der Tumorprogression als auch prognostisch eine wichtige Rolle in mehreren der untersuchten Tumorentitäten zu spielen scheint. So zeigen verschiedene Korrelationen mit klinisch-pathologischen Daten wie Differenzierung, Tumorstadium,

Metastasierung und Nodalstatus, dass eine hohe HDAC2-Expression vermehrt in Tumoren mit aggressiverem Verhalten beobachtet wird. In einer multivariaten Überlebensanalyse erwies sich HDAC2 zudem als unabhängiger prognostischer Faktor in allen drei untersuchten Tumorentitäten, was diese Isoform zu einem interessanten Kandidaten als neuer prognostischer Marker macht. Auch in einer vergleichbaren Studie der Gruppe von Martin Göttlicher wurde eine besondere Rolle von HDAC2 in der Karzinogenese und Apoptoseregulation im Kolonkarzinom beschrieben [18]. Weitere Untersuchungen, insbesondere eine Verifizierung der prognostischen Relevanz der HDAC2-Expression in einer prospektiven Studie könnten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich diese Isoform als diagnostischer Marker etablieren ließe.

Im Gegensatz zu HDAC2 konnten für HDAC3 in den untersuchten Kohorten keine signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern bzw. dem Patientenüberleben nachgewiesen werden. Die hohe Expressionsrate dieser Isoform in der Mehrheit der untersuchten Tumore zeigt jedoch, dass sich auch HDAC3 als mögliches Therapietarget eignen könnte.

Generell ließen sich die Ergebnisse der Expressionsanalysen und die Ergebnisse der Zellkulturversuche gut miteinander in Einklang bringen. So zeigte sich im Kolonkarzinom sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen hoher HDAC-Expression bzw. -Aktivität und vermehrter Tumordedifferenzierung sowie erhöhter Proliferationsrate. Im Hinblick auf spätere klinische Studien könnte demnach eine Evaluierung des HDAC-Expressionsprofils im Vorfeld dazu beitragen, Patienten zu identifizieren, die besonders von einer Anti-HDAC-Therapie profitieren würden.

Insbesondere die Tatsache, dass sich für einzelne HDAC-Isoformen eine unabhängige prognostische Relevanz in verschiedenen Tumorentitäten sowie Korrelationen mit einer verstärkten Proliferation und Dedifferenzierung nachweisen ließ, macht Histondeacetylasen zu viel versprechenden Kandidaten zur Vorhersage individueller Patientenprognosen und möglicher Therapieerfolge.

Referenzen:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J & Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* (2007) **57**: pp. 43-66.
- [2] Richards EJ & Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* (2002) **108**: pp. 489-500.
- [3] Xu WS, Parmigiani RB & Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* (2007) **26**: pp. 5541-5552.
- [4] de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S & van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* (2003) **370**: pp. 737-749.
- [5] Miller TA, Witter DJ & Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* (2003) **46**: pp. 5097-5116.
- [6] Yoshida M, Matsuyama A, Komatsu Y & Nishino N. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. *Curr Med Chem* (2003) **10**: pp. 2351-2358.
- [7] Marks PA & Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* (2007) **25**: pp. 84-90.
- [8] Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T & Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* (2001) **1**: pp. 194-202.
- [9] Bolden JE, Peart MJ & Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* (2006) **5**: pp. 769-784.
- [10] Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM & Munster PN. In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates. *Mol Cancer Ther* (2005) **4**: pp. 1993-2000.
- [11] Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y & Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* (2003) **63**: pp. 7291-7300.
- [12] Tumber A, Collins LS, Petersen KD, Thougard A, Christiansen SJ, Dejligbjerg M, Jensen PB, Sehested M & Ritchie JWA. The histone deacetylase inhibitor PXD101 synergises with 5-fluorouracil to inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* (2007) **60**: pp. 275-283.
- [13] Duvic M & Vu J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* (2007) **16**: pp. 1111-1120.
- [14] Krusche CA, Wülfing P, Kersting C, Vloet A, Böcker W, Kiesel L, Beier HM & Alfer J. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat* (2005) **90**: pp. 15-23.
- [15] Wilson AJ, Byun D, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH & Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* (2006) **281**: pp. 13548-13558.
- [16] Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, Raju GC & Hooi SC. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* (2005) **12**: pp. 395-404.
- [17] Dangond F, Hafler DA, Tong JK, Randall J, Kojima R, Utku N & Gullans SR. Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) **242**: pp. 648-652.
- [18] Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen K & Göttlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* (2004) **5**: pp. 455-463.

Zugrundeliegende Publikationen und Anteilserklärung

Annika Lehmann (geb. Röske) hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Weichert W, **Röske A**, Niesporek S, Noske A, Buckendahl A, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T & 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. *Clin Cancer Res* (2008) **14**: pp. 1669-77.

45 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Auswahl der Tumorentität, Durchführung der Zellkulturexperimente: HDI-Behandlung bzw.

Kombinationsbehandlung mit 5-FU, siRNA-Transfektion, Western Blot, Immunfluoreszenz, XTT-Assay, Durchflusszytometrische Zellzyklus- und Apoptosemessungen mittels FACS, Nachweis der Antikörperspezifität mittels siRNA-Transfektion und Western Blot;

Statistische Auswertung der *in vitro*-Versuche, Überarbeitung des Manuskripts

Publikation 2: Weichert W, **Röske A**, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M & 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. *Br J Cancer* (2008) **98**: pp. 604-10.

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Auswahl der Tumorentität, Nachweis der Antikörperspezifität mittels siRNA-Transfektion und Western Blot; Beteiligung an der statistischen Auswertung, Überarbeitung des Manuskripts

Publikation 3: Weichert W, **Röske A**, Gekeler V, Beckers T, Ebert MPA, Pross M, Dietel M, Denkert C & Röcken C. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* (2008) **9**: pp. 139-48.

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an Idee, Konzept und Design der Studie, Auswahl der Tumorentität, Nachweis der Antikörperspezifität mittels siRNA-Transfektion und Western Blot; Statistische Auswertung, Überarbeitung des Manuskripts

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen mit Erstautorenschaft oder geteilter Erstautorenschaft:

Weichert W, **Röske A**, Niesporek S, Noske A, Buckendahl A, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T & 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. *Clin Cancer Res* (2008) **14**: pp. 1669-1677. (geteilte Erstautorenschaft)

Lehmann A, Denkert C, Budczies J, Buckendahl A, Darb-Esfahani S, Noske A, Müller B, Neuhaus P, Dietel M, Kristiansen G & Weichert W. Class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer. *Submitted* (2009)

Publikationen mit Koautorenschaft:

Weichert W, **Röske A**, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M & 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. *Br J Cancer* (2008) **98**: pp. 604-610.

Weichert W, **Röske A**, Gekeler V, Beckers T, Ebert MPA, Pross M, Dietel M, Denkert C & Röcken C. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* (2008) **9**: pp. 139-148.

Darb-Esfahani S, Faggad A, Noske A, Weichert W, Buckendahl AC, Müller B, Budczies J, **Röske A**, Dietel M, Denkert C. Phospho-mTOR and phospho-4EBP1 in endometrial adenocarcinoma: association with stage and grade in vivo and link with response to rapamycin treatment in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. (2008) [Epub]

Fritzsche FR, Weichert W, **Röske A**, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Scholman K, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer* (2008) **8**:381. [Epub]

Noske A, Lindenberg JL, Darb-Esfahani S, Weichert W, Buckendahl AC, **Röske A**, Sehouli J, Dietel M, Denkert C. Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis. *Oncol Rep.* (2008) **20**:pp. 1409-17.

Noske A, Weichert W, Niesporek S, **Röske A**, Buckendahl A, Koch I, Sehouli J, Dietel M & Denkert C. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer* (2008) **112**: pp. 1733-1743.

Niesporek S, Weichert W, Sinn B, **Röske A**, Noske A, Buckendahl AC, Wirtz R, Sehouli J, Koensgen D, Dietel M & Denkert C. [NF-kappaB subunit p65/RelA expression in ovarian carcinoma: prognostic impact and link to COX-2 overexpression]. *Verh Dtsch Ges Pathol* (2007) **91**: pp. 243-249.

Poster:

Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Loening S, Kristiansen G, Dietel M, Denkert C & Weichert W. Class I histone deacetylase isoforms in prostate cancer: expression patterns in vivo and functional implications in vitro.

18th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Prag (2006)

Röske A, Kristiansen G, Darb-Esfahani S, Noske A, Buckendahl A, Müller B, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C & Weichert W. Histondeacetylasen im Pankreaskarzinom – Effekte selektiver Ausschaltung *in vitro* und Expression *in vivo*.

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Berlin (2008)

Vorträge:

Röske A, Gekeler V, Niesporek S, Noske A, Buckendahl A, Dietel M, Boehm M, Beckers T, Denkert C & Weichert W. Klasse I Histondeacetylasen im colorektalen Karzinom: Expressionsmuster, prognostische Bedeutung und funktionelle Implikationen.

91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Magdeburg (2007)

Erklärung

„Ich, Annika Lehmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Rolle der Histondeacetylase (HDAC) in humanen soliden Tumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an meinen Doktorvater Carsten Denkert und an Wilko Weichert, die meine Arbeit mit großem Engagement betreut haben. Mit wertvollen Anregungen für meine theoretische und praktische Arbeit standen sie mir jeder Zeit zur Seite und ihre stets offene Tür und Diskussionsbereitschaft schufen eine angenehme, motivierende Arbeitsatmosphäre. Ihre fachliche Unterstützung und zahlreiche persönliche Aufmunterungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe Denkert, insbesondere den Mitarbeitern des Labors Lisa Glanz, Petra Wachs und Ines Koch für die geduldige Einarbeitung in die Methodik und ihre tatkräftige Unterstützung.

Bei Denise Treue, Andrea Krühn, Alexandra Stege, Jan Budczies und Markus Möbs möchte ich mich für die zahlreichen gemeinsam verbrachten Mensastunden und die anregenden Gespräche bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Mann, die mich stets unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben haben.