

5 Diskussion

Die Therapieoptionen zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms sind gegenwärtig noch unzureichend. Eine Vielzahl von Therapieansätzen kam in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms bereits zum Einsatz. Dabei erwiesen sich in der Vergangenheit insbesondere Hormon- und Chemotherapie als nahezu unwirksam.

Derzeit wird in der Praxis eine Zytokintherapie mit Interleukin-2 und/oder Interferon- α , häufig in Kombination mit 5-FU bevorzugt empfohlen und eingesetzt (Siemer, 2006).

Dabei betragen die Remissionsraten zwischen 20 und 40% (Fischer und Oberneder, 2001). Dennoch erliegt die große Mehrheit der Patienten ihrem Tumorleiden. Um neue Therapiestrategien zu entwickeln, werden in experimentellen Ansätzen unter anderem Angiogenesehemmer, Inhibitoren des Zellzyklus und allogene Stammzelltransplantationen erprobt (Tabelle 5) (Martel und Lara, 2003). Viel versprechende Ergebnisse hat eine erste klinische Studie zur Wirksamkeit von Angiogeneseinhibitoren in der second-line Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms erbracht (Motzer *et al.*, 2006a).

Funktioneller Ansatz	Substanzen	Wirkmechanismus
Hormontherapie	Gestagene, Androgene, Antiandrogene, Antiöstrogene	
Zytostatische Chemotherapie	Vinblastin, 5-Fluorouracil	Hemmung der Spindelapparatausbildung Hemmung der Pyrimidinsynthese
Immuntherapie	Interleukin-2, Interferon- α	Aktivierung von Zellen des Immunsystems
Radioimmuntherapie	¹³¹ Iod markierter Antikörper	gerichtet gegen das Protein G250, das vom klarzelligen Nierenzellkarzinom expremiert wird
Angiogeneseinhibitoren	Thalidomid SU5416	Hemmung der Expression oder Freisetzung verschiedener Angiogenesefaktoren Interaktion mit VEGF- Signaltransduktionskaskaden

Funktioneller Ansatz	Substanzen	Wirkmechanismus
Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)	Flavopiridol	Hemmung des Zellzyklus
Allog. Stammzell-transplantation		graft versus tumor effect

Tabelle 5. Auswahl von bisherigen Therapiestrategien in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms

Eine neue Substanzklasse, die bereits in einer Reihe von Tumoren ihre tumorsuppressive Wirkung unter Beweis gestellt hat, ist die Gruppe der HDIs (Tabelle 6) (Clarke *et al.*, 2001; Donadelli *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2004).

Name	Wirksamkeit im Tier-Modell	Tumorentität	Klinische Studien	Tumorentität
TSA	nachgewiesen	Blasen-Ca. (Canes <i>et al.</i> , 2005)	keine Daten vorliegend	
Butyrat	nachgewiesen	Colon-Ca. (Cordel <i>et al.</i> , 1998)	in Phase-II-Studie	NSCLC (Reid <i>et al.</i> , 2004)
Valproat	nachgewiesen	Endometrium-Ca. (Takai <i>et al.</i> , 2004)	in Phase-II-Studie	AML (Pilatrino <i>et al.</i> , 2005)

Tabelle 6. Überblick bisheriger Studien zur tumorsuppressiven Wirkung der HDIs im Tiermodell bzw. in klinischer Erprobung

Obwohl schon seit längerem bekannt ist, dass HDIs Apoptose induzieren und einen Wachstumsstopp bewirken, ist ihre Wirkung auf Nierenkarzinomzelllinien bisher kaum analysiert worden.

In der hier vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die HDIs Butyrat, Valproat und TSA in den Nierenkarzinomzelllinien SN12, A498 und ACHN Apoptose induzieren können.

In einer ersten Versuchsreihe wird eine durch HDIs induzierte Apoptose mit Hilfe des Acridinorange/Ethidiumbromid-Uptake-Assays nachgewiesen. In unserer Arbeit können wir so zeigen, dass die HDIs Butyrat, Valproat und TSA morphologische Veränderungen an Nierenkarzinomzelllinien bewirken, die einen apoptotischen Zelluntergang anzeigen. Ein

ähnliches Ergebnis wird für Butyrat in Kolonkarzinomzellen (Avivi-Green *et al.*, 2002) und für TSA unter anderem an Leberkarzinomzelllinien beschrieben (Herold *et al.*, 2002).

Das Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay bietet sich zur einfachen Untersuchung der proapoptotischen Potenz einer Substanz in *in vitro* Modellen an. Es ist leicht zu handhaben, kaum störanfällig, schnell durchführbar und preiswert. Diesen Vorteilen stehen aber auch einige wichtige Nachteile gegenüber. Es werden nur semiquantitative Ergebnisse produziert. Somit kann die proapoptotische Wirkung der einzelnen Substanzen nicht zufrieden stellend quantifiziert werden. So ist es sehr schwer abzuschätzen, welche der drei Substanzen am stärksten Apoptose induzieren kann. Mit dieser Untersuchung können mögliche Unterschiede hinsichtlich der proapoptotischen Wirksamkeit der drei untersuchten HDIs nicht geklärt werden. Dennoch sind wir mit Hilfe dieses einfachen Assays in der Lage, verlässliche Hinweise für eine Apoptoseinduktion durch HDI-Behandlung in Nierenkarzinomzellen zu liefern.

Ein weiterer Nachteil des Verfahrens ist die teilweise schwere Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Dementsprechend können nach längerer HDI-Einwirkung (48h) proapoptotische Effekte nicht ausreichend von toxischen Wirkungen unterschieden werden. Allerdings wird die Auswertung dadurch erleichtert, dass der Großteil der nekrotischen Zellen nicht mehr an den Zellkulturflaschen adhärent ist. Diese Zellen werden vor der Untersuchung auf Apoptose mit dem Zellkulturmedium verworfen.

Neben dem morphologischen Apoptosenachweis bieten sich verschiedene molekularbiologische Verfahren zum Nachweis einer Aktivierung der Apoptosekaskade an. Ein geeignetes Verfahren ist der Nachweis der Aktivierung von bestimmten Zelltodproteasen, den so genannten Caspasen. Wir haben für unsere Untersuchungen die Caspase-3 ausgewählt. Wie bereits durch eine Vielzahl von Studien gezeigt werden konnte, kann Apoptose unter anderem über einen extrinsischen Rezeptor eingeleiteten Weg oder über eine mitochondrial ausgelöste Kaskade vermittelt werden (Hengartner, 2000; Hetts, 1998). Beide Wege münden in eine Aktivierung der Caspase-3, die dann die Degeneration der Zelle einleitet. Aufgrund dieser Schlüsselstellung der Caspase-3 wird sie als ein Indikator für apoptotische Prozesse in Zellen angesehen.

Unsere Untersuchungen zielen darauf ab, eine Caspase-3-Expression auf mRNA und Protein-Ebene nachzuweisen. Allerdings ist die Wirkung der verschiedenen HDIs auf die Zelllinien sehr heterogen. Für Butyrat kann zum Zeitpunkt 24h nur in der Zelllinie ACHN eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität auf RNA-Ebene gemessen werden. Zum Zeitpunkt 48h ist ein Anstieg auf Protein- und RNA-Ebene in der ACHN und A498 zu sehen. Dass Butyrat Apoptose über eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität induziert, ist schon an einer Reihe von anderen Tumoren, zum Beispiel Fibrosarkomen, nachgewiesen worden (Rabelo *et al.*, 2003). Die Gruppe um

Clarke *et al.* (2001) konnte eine Inhibition des Tumorwachstums durch die Butyrat-Behandlung an Kolonkarzinomzelllinien (HAT-29) erreichen, die zudem zeit- und konzentrationsabhängig war. Darüber hinaus wird - wie in unserer Studie - auch in anderen Arbeiten über ein uneinheitliches Expressionsmuster der Caspase-3 unter einer Butyrat-Behandlung berichtet. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die Apoptoseaktivität in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht mit einem Caspase-3 Anstieg verbunden war (Heerdt *et al.*, 1999). Vermutlich kann Butyrat zusätzlich über einen Caspase-3 unabhängigen Weg Apoptose induzieren. Diese Überlegung wird dadurch gestützt, dass die Inaktivierung der Caspase-3 in Kolonkarzinomzelllinien (Caco-2) keinen Einfluss auf die durch Butyrat induzierte Apoptose hatte (Avivi-Green *et al.*, 2002). Der Mechanismus, über den Butyrat Apoptose induziert, könnte also zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien einer Tumorart und zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten variieren. Über welchen Mechanismus Butyrat alternativ Apoptose einleitet, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Nach den von uns erhobenen Daten kann eine Expression der Zelltodprotease Caspase-3 in Nierenkarzinomzelllinien nur nach längerer Einwirkzeit (48h) und in ausgewählten Zelllinien ausreichend belegt werden.

Valproat erreicht in den Zelllinien SN12 und ACHN nach 24h eine konzentrationsabhängige Steigerung der Caspase-3-mRNA-Expression, die zudem in jeder Versuchsreihe mit einem Anstieg des Caspase-Proteins verbunden ist. Bei beiden Zelllinien wird erst bei maximaler Konzentration von 10mM ein deutlicher Anstieg der Caspase-3-Genexpression beobachtet. Bei der A498 sind die Ergebnisse nur eingeschränkt zu beurteilen, weil die Streuung der Werte recht groß ist. Allerdings zeichnet sich auch hier ein Trend zur Steigerung der Caspase-3-Genexpression ab. Auch andere Studien berichten von einem ähnlichen Verhalten von Tumorzellen, die mit Valproat behandelt worden sind. So kann in Mammakarzinomzelllinien durch Valproat ein Zuwachs an apoptotischen Zellen beobachtet werden (Gottlicher *et al.*, 2001). Diese Wirkung ist vermutlich auch auf *in vivo* Modelle übertragbar. So konnte eine Abnahme von Lungenmetastasen unter Valproat-Behandlung im Tiermodell nachgewiesen werden (Gottlicher *et al.*, 2001). Allerdings wird auch in dieser Arbeit nicht untersucht, über welche molekularen Mechanismen Valproat Apoptose vermittelt. In Zelllinien des Endometriumkarzinoms konnten Takai *et al.* (2004) zeigen, dass Valproat Apoptose induziert. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen trat in dieser Studie ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Aktivität ebenfalls erst bei hohen Konzentrationen (5mM) auf. Die Gruppe um Takai *et al.* (2004) brachte die Wirkung von Valproat unter anderem mit einer Hemmung der Bcl-2-Expression in Verbindung. Valproat kann demnach über den mitochondrialen Weg Apoptose

einleiten. Jedoch wurde in dieser Studie nicht explizit untersucht, ob die Apoptoseinduktion mit einer Steigerung der Caspase-3-Expression assoziiert ist. Demzufolge sind weitere Studien erforderlich, um die Wirkung von Valproat auf die Apoptosekaskade zu charakterisieren. Auch unsere Erkenntnisse zur Caspase-3-Expression unter Valproat-Behandlung müssen noch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden.

Die Wirkung von TSA auf die Caspase-3-Expression in Nierenkarzinomzelllinien ist ebenfalls sehr inhomogen. Nur in der Zelllinie ACHN kann eine Steigerung der Caspase-3 auf RNA- und Protein-Ebene nach 24 und 48h verzeichnet werden. Die Ergebnisse für ACHN-Zellen stimmen gut mit Resultaten einer früheren Studie zur Wirkung von TSA auf Zelllinien dieses Tumortyps überein. Dort wurden ebenfalls eine Apoptoseinduktion und ein Caspase-3-Anstieg unter der Behandlung von TSA nachgewiesen. Zudem wurde eine Veränderung des Expressionsmusters von Bcl-2, Caspase-9 und Caspase-7 registriert (Park *et al.*, 2003).

Dagegen ist unter TSA in der Zelllinie SN12 ein Anstieg der Caspase-3 auf RNA-Ebene nicht überzeugend zu belegen. Auf Protein-Ebene ist keinerlei Anstieg nachzuweisen. Die Gründe hierfür bleiben unbekannt. Eventuell übersteigt die bekannte toxische Wirkung des TSA die proapoptischen Effekte. Unsere Daten sind allerdings zu begrenzt, um dazu verlässliche Aussagen machen zu können. Damit bleibt die Rolle der Caspase-3 bei unseren Versuchen in dieser Zelllinie unklar. Allerdings zeigen die morphologischen Analysen im Mikroskop eine deutliche Apoptoseaktivität. Wahrscheinlich sind in diesem Zelltyp unter TSA die Zellen so stark geschädigt, dass ein spezifischer Proteinnachweis der Caspase-3 mit Antikörpern nicht mehr möglich ist. Ein Argument für diese Überlegung liegt in dem bekannten Nachteil des TSA, schnell toxisch zu wirken (Takai *et al.*, 2004).

In der Zelllinie A498 kann TSA die Caspase-3-Expression weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene beeinflussen, obwohl die morphologischen Untersuchungen im Mikroskop einen eindeutigen Apoptosenachweis erbracht haben. Auch hier bleibt ungeklärt, ob TSA Caspase-3 unabhängig Apoptose induzieren kann. Verschiedene andere Studien legen diese Vermutung nahe (Henderson *et al.*, 2003; Ruefli *et al.*, 2001). So ist TSA in der Lage, Apoptose, wenn auch in einem geringeren Umfang, in Zellen zu induzieren, die konstitutiv keine Caspase-3 exprimieren. Im Vergleich dazu war allerdings die Apoptoseinduktion durch TSA in Caspase-3 exprimierenden Zellen ausgeprägter (Henderson *et al.*, 2003). Henderson *et al.* (2003) haben die durch eine TSA-Behandlung induzierten Effekte auf die Apoptosekaskade näher charakterisiert. Nach den Daten dieser Gruppe wird die TSA-Wirkung vorrangig über Caspase-9, Caspase-8, Caspase-2 und Bid vermittelt. Darüber hinaus wird in einer weiteren Studie darüber berichtet,

dass eine Behandlung mit dem HDI SAHA, ein dem TSA in der chemischen Struktur ähnlicher HDI, auch in Gegenwart des Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk Apoptose induzieren kann (Ruefli *et al.*, 2001). In dieser Studie wird eine nicht näher spezifizierte, noch unbekannte Caspase, die nicht durch zVAD-fmk gehemmt wird, für die Apoptose verantwortlich gemacht.

Eine weitere Studie, die Effekte einer TSA Behandlung ebenfalls auf A498 Zellen untersucht, stellte fest, dass TSA dort einen Zellzyklusstopp bewirkte (Park *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die molekularen Effekte des TSA genauer zu klären.

Zudem können wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass beim Vergleich der verwendeten HDIs TSA sehr unterschiedlich aggressiv auf die drei Zelllinien wirkt, während die Zelllinien jeweils auf Butyrat und Valproat ähnlich stark reagieren. Eine mögliche Erklärung für die stark schwankende Wirkung von TSA auf die einzelnen Zelllinien ergibt sich aus deren Unterschieden im Differenzierungsgrad. Hoch differenzierte Karzinomzelltypen, wie zum Beispiel ACHN, reagieren dabei sensibler auf TSA als niedrig differenzierte Zelllinien, wie zum Beispiel A498. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an unterschiedlichen Leberkarzinomzelllinien gemacht (Herold *et al.*, 2002), so dass ein potentieller Einsatz von TSA in *in vitro* Modellen gut differenzierter Tumoren Erfolg versprechender ist als bei niedrig differenzierten Tumoren.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Zelllinien ergibt sich aus ihren nativen Caspase-3 Expressionsmustern. Für ACHN wird unbehandelt die höchste relative Genexpression der Caspase-3 gemessen. Am niedrigsten ist die relative Genexpression bei der Zelllinie A498. SN12 und ACHN reagieren generell auf eine Behandlung mit HDIs mit einer höheren Caspase-Expression als A498. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine hohe native Caspase-3-Expression eine Voraussetzung für eine weitere Steigerung der Caspase-3-Expression durch HDIs ist. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine starke Entdifferenzierung mit dem Verlust oder der Störung von Signalkaskaden einhergeht, die für die TSA-Wirkung entscheidend sind.

Im Hinblick auf die teilweise diskrepanten Ergebnisse für den morphologischen Apoptosenachweis und die Expressionsmuster von Caspase-3 in den behandelten Zellen stellt sich die Frage nach weiteren molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion durch HDIs. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass Apoptoseinduktion durch HDIs mit einer Steigerung der Caspase-3 assoziiert ist (Clarke *et al.*, 2001; Donadelli *et al.*, 2003). Darüber hinaus verändern HDIs das Expressionsmuster anderer Proteine, die in die Regulation der Apoptose involviert sind. So konnte gezeigt werden, dass HDIs die Aktivität des proapoptotischen p53 steigern. Auch auf Ebene der Bcl-2 Familie verändern HDIs das Gleichgewicht zwischen proapoptotischen Familienmitgliedern wie Bid und Bax und dem antiapoptotischen Bcl-2 (Herold *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse haben wir

untersucht, ob sich das Expressionsmuster durch HDIs auch auf Ebene der IAP-Familie, die ebenfalls an der Regulation der Apoptose entscheidend beteiligt ist, verändert.

Ein Mitglied dieser Familie ist das 1997 entdeckte Survivin (Ambrosini *et al.*, 1997). Survivin ist in der Lage, Apoptose zu hemmen und die mitotische Teilung von Zellen zu regulieren. Im Gegensatz zu normalem, adultem Gewebe wird Survivin in nahezu jedem malignen Tumorgewebe exprimiert (Ambrosini *et al.*, 1997). So ist die Survivin-Genexpression in Tumoren durch unterschiedliche Mechanismen dereguliert. Beispielsweise konnte in Tumorzelllinien eine stärkere Survivin-Promoteraktivität als in normalen Zelllinien nachgewiesen werden (Altieri, 2003).

Insbesondere wegen seiner Fähigkeiten, Apoptose zu hemmen und den Zellzyklus zu regulieren und damit das Überleben von Zellen zu sichern, ist Survivin als neue Zielstruktur in der Therapie maligner Tumore interessant. Durch ein Ausschalten dieser Funktionen haben diverse Arbeitsgruppen mit unterschiedlichsten Methoden versucht, Tumorwachstum zu inhibieren. So konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung von Survivin durch siRNAs (small interfering RNA) eine Tumolvolumen-Reduktion bewirkt (Williams *et al.*, 2003). Auch immunologische Ansätze wie Vaccination gegen Survivin wurden verfolgt (Andersen *et al.*, 2001; Andersen und Thor, 2002). Eine weitere Strategie besteht in der Inhibierung der Phosphorylierung des Survivin (Altieri, 2003). Wenn Survivin nicht phosphoryliert ist, verliert es seine Fähigkeit, Apoptose zu hemmen (Grossman *et al.*, 2001).

Survivin ist aufgrund seiner antiapoptotischen und eine Chemoresistenz vermittelnden Eigenschaften ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms.

Wie in vielen anderen Tumoren konnte auch in den meisten Nierenzellkarzinomen eine Survivin-Genexpression nachgewiesen werden (Mahotka *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir, ob sich die Survivin-Expression durch eine HDI-Behandlung beeinflussen lässt. Wir können ebenfalls in allen drei Zelllinien Survivin-mRNA nachweisen. Interessanterweise weist die Zelllinie A498, die die niedrigste Caspase-3-Expression zeigt, die höchste Survivin-Expression auf. Für diese Zelllinie ist somit eine besonders ausgeprägte Apoptoseresistenz anzunehmen. Sowohl eine Survivin-Überexpression als auch eine niedrige oder fehlende Caspase-3-Expression sind als starke antiapoptotische Faktoren aufzufassen. Dies stimmt auch mit dem biologischen Verhalten dieser Zelllinie überein. A498 stammt von einem besonders aggressiven und entdifferenzierten Tumor ab – Eigenschaften, die auch *in vivo* mit einer hohen Survivinexpression assoziiert sind (Mahotka *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass die Histondeacetylaseinhibitoren Butyrat, Valproat und TSA die Genexpression von Survivin in Nierenkarzinomzelllinien hemmen. Insbesondere in der Zelllinie A498 ist die Hemmung so stark, dass die Survivin-mRNA kaum zu detektieren ist. Leider lassen sich anhand unserer begrenzten Daten keine Aussagen zur Konzentrationsabhängigkeit der HDI-Wirkung treffen. In den Zelllinien SN12 und ACHN ist eine Senkung der Survivin-Genexpression zwar ebenfalls nachweisbar, ist aber im Vergleich weniger ausgeprägt. Die fehlende bzw. nicht ausreichend belegbare Konzentrationsabhängigkeit schränkt die Aussagekraft unserer Daten ein. Durch Hemmung der Survivinexpression ist eine höhere Apoptoseempfindlichkeit der Zelllinien zu erwarten. Entsprechend konnten wir morphologisch auch eine verstärkte Apoptoseaktivität feststellen. Dies ergibt erste Hinweise für eine antiapoptotische Wirkung der HDIs über eine Senkung der Survivin-Genexpression und somit über eine Wiederherstellung des mitochondrialen Apoptoseweges. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich nur um unbedeutende Epiphänomene oder sogar nur Artefakte handelt. Zukünftige Untersuchungen sollten auf eine weitere Charakterisierung der HDI-Wirkung auf die Signalkaskade „up-stream“ oder „down-stream“ von Survivin abzielen.

Die Resultate dieser Arbeit ergeben darüber hinaus, dass – zumindest in einigen Zelllinien - die Hemmung der Survivin-Genexpression mit einer Steigerung der Caspase-3-Genexpression verbunden ist. Argumente für einen funktionellen Zusammenhang zwischen der HDI-Wirkung, Survivin und Caspase-3 finden sich auch in verschiedenen anderen Studien. So ist für Butyrat nachgewiesen worden, dass es über die Bcl-2 Familie in die Apoptosesignaltransduktion eingreift. Zum einen hemmt Butyrat die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 (Avivi-Green *et al.*, 2002). Zum anderen hat Butyrat in derselben Studie die Expression des proapoptotischen Bak gesteigert. Auch Valproat und TSA induzieren Apoptose über eine Inhibierung des Bcl-2 (Takai *et al.*, 2004). Dies legt die Vermutung nahe, dass die proapoptotische Wirkung der HDIs – zumindest teilweise - über einen Einfluss auf Apoptosemodulatoren, wie die Bcl-2 Proteingruppe, vermittelt ist. Beim Menschen sind zwei große Gruppen von Apoptosemodulatoren bekannt: die Bcl-2 Gruppe und die IAPs. Aus unserer Studie ergeben sich nun erstmals Hinweise für eine Beeinflussung der Survivin-Expression über HDIs in Nierenzellkarzinomzelllinien. Somit könnte die Wirksamkeit dieser Substanzen in Nierenzellkarzinomen zusätzlich auch über ihren Einfluss auf IAPs, wie Survivin, erklärt werden. Survivin ist im mitochondrialen Apoptoseweg „down-stream“ von der Bcl-2 Gruppe positioniert. Es ist also denkbar, dass HDIs mehrfach in die mitochondriale Apoptosekaskade eingreifen.

Für HDIs ist die Hoch-Regulation der Genexpression verschiedener Gene gut belegt (Marks *et al.*, 2001a). Es stellt sich somit die Frage, ob HDIs in der Lage sind, auch eine Hemmung der

Genexpression zu bewirken. Trotz zahlreicher Studien sind die molekularen Mechanismen und Wirkungen der HDIs bis heute nicht abschließend geklärt. Jedoch haben Genexpressionsanalysen über cDNA-Mikroarrays gezeigt, dass HDIs die Expression von Genen sowohl hemmen als auch steigern können (Glaser *et al.*, 2003). Während die Induktion der Genexpression überzeugend durch das Modell der Histonacetylierung veranschaulicht wird (Marks *et al.*, 2001b), ist der Mechanismus der Gensuppression durch HDIs weniger offensichtlich. Allerdings interagieren HATs auch mit anderen Zielmolekülen als ausschließlich mit Histonen. So regulieren HATs die Genexpression unter anderem über Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel das p53 (Gu und Roeder, 1997). Für TSA ist gezeigt worden, dass es p53 aktiviert und so die Expression seiner Zielgene, die in den Mechanismus der Apoptose involviert sind, hemmt bzw. steigert (Henderson *et al.*, 2003). Eines dieser Zielgene ist das Survivin. Dabei konnte gezeigt werden, dass p53 eine Hemmung der Survivin-Genexpression bewirkt (Mirza *et al.*, 2002).

Die inhibierende Wirkung auf die Transkription zellzyklusregulierender Gene, die – ähnlich wie Survivin - mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden, ist für TSA gut belegt (Henderson *et al.*, 2003). So konnten Herold *et al.* (2002) unter dem Einfluss von TSA in Leberkarzinomzelllinien eine Senkung der Expression des den Zellzyklus stimulierenden Cyclin A beobachten. Analog dazu registrierten sie eine Steigerung der Expression des p21, das den Zellzyklus hemmt. Außerdem wurde eine vermehrte Aktivität des proapoptotischen Bax und eine verminderte Aktivität des antiapoptotischen Bcl-2 nachgewiesen (Herold *et al.*, 2002). Cyclin A und Bcl-2 greifen auf ähnlichen Ebenen in zelluläre Mechanismen ein wie Survivin. Infolgedessen ist eine Beeinflussung der Survivin-Expression durch TSA theoretisch durchaus möglich.

Ferner haben Studien den Schluss nahe gelegt, dass die Hemmung der Genexpression durch HDIs unter anderem auch über eine Interaktion mit Promotern zu erklären ist. Interessanterweise können Butyrat und TSA direkt spezifische Promoter von Onkogenen regulieren und so eine Gensuppression bewirken (Kostyniuk *et al.*, 2002). Dabei wurde weder die Bindung von vorhandenen Transkriptionsfaktoren an die Promoterregionen durch HDIs blockiert, noch wurden neue HDI abhängige Faktoren mit Wirkung auf die Promoteraktivität nachgewiesen. Butyrat und TSA scheinen also die Fähigkeit zu besitzen, direkt an bestimmte Promoter binden zu können (Kostyniuk *et al.*, 2002).

In einer weiteren Studie ist eine Steigerung bzw. Hemmung der Survivinexpression in Abhängigkeit vom Acetylierungsstatus der Promoterregion beobachtet worden. Die Autoren konnten zeigen, dass eine TSA-Behandlung zu einem Anstieg von acetylierten Histonen in der

Survivin-Promoterregion führte (Mirza *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde in früheren Arbeiten davon berichtet, dass HDIs keine Effekte auf die Survivinexpression auf mRNA-Ebene haben. Dagegen ist eine Hemmung auf Protein-Ebene beobachtet worden (De Schepper *et al.*, 2003). Allerdings wurde in der Studie von de Schepper *et al.* (2003) die Wirkung von Chlamydocin, einem anderen HDI, auf Zelllinien verschiedener Tumorentitäten untersucht. In Ovarial-, Bronchial- und Zervixkarzinomzelllinien konnte zudem eine Überexpression von Survivin eine durch Clamydocin induzierte Apoptose nicht verhindern. Die Autoren kommen daher zu der Vermutung, dass eine Degradation des Survivin nicht der Hauptmechanismus einer durch Clamydocin eingeleiteten Apoptose ist.

Es bleibt also ungeklärt, ob Survivin zu den 2% der Gene gehört, die von Histonacetylasen und –deacetylasen reguliert werden. Alternativ könnte es sich bei der Senkung der Survivin mRNA durch HDI Behandlung um ein assoziiertes Phänomen oder sogar nur um einen Artefakt handeln. Interessant ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass eine sehr hohe Survivinexpression in einer Zelllinie (A498) mit einem sehr aggressiven Phänotyp gefunden worden ist und diese ausgeprägte Überexpression durch HDIs besonders eindrucksvoll gesenkt worden ist. Wie bei anderen Tumoren könnte eine Survivin Überexpression auch in Nierenzellkarzinomen zur erhöhten Aggressivität und dem malignen Potential beitragen. Dabei könnten entsprechend der Daten von Mahotka *et al.* (1999) auch die Expression der verschiedenen Splicevarianten bzw. deren Expressionsverhältnis für ihre antiapoptotische Funktion relevant sein. In Nierentumoren fortgeschrittener Stadien wies diese Arbeitsgruppe nach, dass sich das Verhältnis vom eher proapoptotische wirksamen Survivin-2B zum antiapoptotischen Full-length-Survivin zu Gunsten des letzteren verschoben hat (Mahotka *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wäre eine Hemmung der Survivinexpression ein viel versprechender Therapieansatz in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms.

Es sind somit weitere Untersuchungen gerechtfertigt, um zweifelsfrei zu klären, ob HDIs über eine Hemmung der Survivin-Genexpression Apoptose induzieren. Aus unserer Studie ergeben sich nun erstmals Hinweise für eine Beeinflussung der Survivinexpression über HDIs in Nierenkarzinomzelllinien. Dass die Hemmung der Survivin-Genexpression eine wichtige Rolle in der Induktion von Apoptose spielt, ist in anderen Studien bereits hervorgehoben worden. Das Flavon Silibinin zum Beispiel bewirkt in der Blasen-tumorzelllinie RT4 eine starke Hemmung der Survivin-Genexpression, die mit einer Apoptoseinduktion verbunden ist (Tyagi *et al.*, 2003). Auch hier ist die Suppression teilweise so massiv, dass das Gen kaum noch nachzuweisen ist, wie es in unserer Studie in der Zelllinie A498 der Fall ist.

Gerade für aggressive Nierenzellkarzinome könnte eine Beeinflussung der Survivinüberexpression einen neuartigen Therapieansatz darstellen, wird doch das antiapoptotisch wirksame Survivin für ein beschleunigtes Auftreten von Rezidiven und für die Chemoresistenz von Tumoren mitverantwortlich gemacht (Blanc-Brude *et al.*, 2003).

Unsere Daten charakterisieren HDIs als eine Substanzklasse, die Apoptose in Zelllinien des Nierenzellkarzinoms induzieren können. Diese Wirkung könnte entsprechend unserer Untersuchungen durch eine Senkung der Survivin-Genexpression und teilweise zusätzlich durch eine Steigerung der Caspase-3-Genexpression vermittelt sein. Die Mechanismen für diese Effekte bleiben allerdings weitgehend ungeklärt.

Valproat halten wir aufgrund der in unseren Experimenten beobachteten Wirkungen für die besonders Erfolg versprechende Substanz. Für Valproat kann eine Steigerung der Caspase-3-Genexpression auf mRNA- und Proteinebene sowie eine Hemmung der Survivinexpression auf mRNA-Ebene angenommen werden. Darüber hinaus hat Valproat gegenüber Butyrat und TSA pharmakokinetische und -dynamische Vorteile, die einen zukünftigen klinischen Einsatz eher begünstigen. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit von Butyrat sehr niedrig ist, so dass hohe Konzentrationen verwendet werden müssen, um wirksame Spiegel *in vivo* zu erzielen (Warrell *et al.*, 1998). Dies bedeutet, dass mit einer Reihe von Nebenwirkungen, wie z.B. Somnolenz, Verwirrung, gastrointestinale Beschwerden zu rechnen ist (Gilbert *et al.*, 2001; Gore und Carducci, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass TSA in hohen Dosen sehr toxisch wirkt. Insofern ist ein bedachter Umgang mit TSA geboten. Dagegen wird Valproat seit Jahrzehnten zur Langzeittherapie der Epilepsie eingesetzt und stellt, abgesehen von seiner Teratogenität, kein wesentliches Risiko für den Patienten dar. Viel versprechende Ergebnisse wurden an anderen Tumoren bereits im Tiermodell erzielt. So konnten Takai *et al.* (2004) im Maus-Modell die Reduktion eines Endometriumkarzinoms um bis zu 60% erreichen. Dieser tumorsuppressive Effekt war nicht von bedeutenden Nebenwirkungen begleitet. Auch Lungenmetastasen eines Mammakarzinoms in Ratten kamen durch Valproat zur Remission (Gottlicher *et al.*, 2001). Auch in der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen wie der Akuten myeloischen Leukämie wurden viel versprechende Ergebnisse mit Valproat erzielt (Bug *et al.*, 2005).

Die oben dargelegten Studien legen den Schluss nahe, dass HDIs und insbesondere Valproat in der Behandlung von Tumoren eine neue Therapiestrategie sein können. Auch Patienten mit einem Nierenzellkarzinom könnten in Zukunft von einem HDI profitieren. Bevor allerdings an eine Anwendung am Menschen zu denken ist, müssen *in vivo* Modelle zeigen, ob die HDI-Behandlung beim Nierenzellkarzinom mit Erfolg eingesetzt werden kann.