

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

DISSERTATION

**Expression der Histondeacetylasen 1, 2 und 3 im  
Mammakarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Jana

aus Rottweil

Datum der Promotion: 25.10.2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt .....	5
2	Einleitung.....	8
2.1	Das Mammakarzinom .....	9
2.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	9
2.1.2	Histologie und molekularer Subtyp .....	10
2.1.3	Prognosefaktoren .....	11
2.1.4	Molekulare Diagnostik und Therapie .....	11
2.2	Histondeacetylasen (HDAC) .....	13
2.2.1	Klassifikation.....	13
2.2.2	HDAC in der Karzinogenese: die Histontheorie .....	13
2.2.3	Einfluss der HDAC auf andere Proteine .....	15
2.2.4	HDAC in Multiproteinkomplexen .....	17
2.3	HDAC-Inhibitoren .....	17
2.3.1	Wirkstoffklassen und Zulassung .....	17
2.3.2	Wirkung und Indikation .....	19
2.3.3	Pharmakodynamik und Nebenwirkungen .....	20
2.4	Fragestellung .....	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Patientenkollektiv .....	22
3.2	Material .....	24
3.2.1	Zelllinien .....	24
3.2.2	Chemikalien und Enzyme .....	24
3.2.3	Geräte.....	26
3.2.4	Kits.....	27
3.2.5	Lösungen und Kulturmedien .....	27
3.2.6	Verbrauchsmaterial.....	30
3.3	Methoden .....	31
3.3.1	Histopathologische Untersuchung .....	31
3.3.2	Erstellen eines Tissue-Micro-Arrays (TMA) .....	32
3.3.3	Immunhistochemie und Digitalisierung .....	32
3.3.4	Angaben zur Statistik.....	33
3.3.5	Zellkultur .....	33
3.3.6	Proteinisolierung .....	33
3.3.7	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	34
3.3.8	Westernblot .....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	HDAC-Expression im Mammakarzinom.....	35
4.2	Immunhistochemische Färbungen .....	36
4.2.1	Immunhistochemische Färbungen der HDAC1 .....	36
4.2.2	Immunhistochemische Färbungen der HDAC2 .....	36

4.2.3	Immunhistochemische Färbungen der HDAC3 .....	37
4.3	Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern .....	38
4.3.1	Korrelationen der HDAC1 .....	38
4.3.2	Korrelationen der HDAC2 .....	40
4.3.3	Korrelationen der HDAC3 .....	44
4.4	Univariate Überlebensanalyse .....	47
4.4.1	Prognostische Parameter im Kollektiv .....	47
4.4.2	Prognostische Relevanz der HDAC .....	49
4.5	Westernblot der Mammakarzinomzelllinien.....	51
5	Diskussion .....	52
5.1	Histondeacetylasen und Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern .....	52
5.1.1	Histondeacetylasen und Hormonrezeptorstatus .....	52
5.1.2	Histondeacetylasen und HER2-Status.....	55
5.1.3	Histondeacetylasen und Grading / Nodalstatus .....	55
5.2	HDAC2 in anderen malignen Tumoren .....	57
5.3	HDAC in Überlebensanalysen .....	57
5.4	Limitierungen der Arbeit .....	59
5.5	Therapeutischer Ausblick.....	60
5.5.1	HDAC als therapeutisches Target .....	60
6	Verzeichnisse .....	66
6.1	Literaturverzeichnis .....	66
6.2	Tabellenverzeichnis .....	75
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	76
7	Anhang.....	77
7.1	Eigene Kongressbeiträge.....	77
7.1.1	Poster und Vortrag.....	77
7.2	Originalarbeit .....	77
7.3	Eidesstattliche Versicherung.....	78
7.4	Curriculum Vitae .....	79
7.5	Danksagung.....	80

## Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
BRMS 1	Breast cancer metastasis suppressor 1
DNMT-Inhibitor	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DCIS	Duktales Karzinom in situ
ER	Östrogenrezeptor
FFPE	Formalin-fixiert-Paraffin-eingebettet
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylasen
HDACi	HDAC-Inhibitoren
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human-epidermal-growth receptor 2
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HR	Hormonrezeptor
HSP	Heat-Shock Protein
HT	antihormonelle Therapie
IDC	Invasiv-duktales Karzinom
IRS	Immunreaktiver Score
LIN	lobuläre-intraepitheliale Neoplasie
NF- $\kappa$ B	nuclear-factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
pCR	pathologische Komplettremission
PR	Progesteronrezeptor
RECIST	Response Evaluation Criteria in solid tumors
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
TKF	Transkriptionsfaktor
TMA	Tissue-Micro-Array
TNBC	Triple negative breast cancer
TSA	Trichostatin A
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

# 1 Abstrakt

Einleitung:

Seit einigen Jahren werden epigenetische Aspekte in der Karzinogenese diskutiert und untersucht. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei Histondeacetylasen (HDAC), die durch eine verstärkte Deacetylierung von DNA-Histonen aber auch anderer Zellzyklus-relevanter Proteine und Transkriptionsfaktoren zu vermehrter Zellproliferation und Angiogenese, Entdifferenzierung und Metastasierung führen.

Basierend auf der Hypothese der modulierenden Wirkung von HDAC in der Karzinogenese entstanden neue Therapiekonzepte. In In-Vitro- und In-Vivo-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine HDAC-Inhibition zur Wachstumshemmung maligner Zellen führt. Im Jahr 2006 wurde der HDAC-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen. Derzeit kommen mehrere HDAC-Inhibitoren in der Therapie verschiedener Tumorentitäten im Rahmen von klinischen Studien zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten der Isoformen HDAC1, 2 und 3 im Mammakarzinom untersucht. Dabei wurden der prognostische Charakter sowie die Korrelationen der HDAC-Expression mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern im Mammakarzinom analysiert. Ziel war die Identifikation einer Subgruppe, die ein potentiell höheres Ansprechen auf HDACi haben könnte.

Material und Methoden:

Die Analyse erfolgte mittels eines Tissue-Microarrays (TMA) aus Formalin-fixiertem-Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe von insgesamt 238 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom, diagnostiziert am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Charité in den Jahren 1985-1999. An diesem erfolgten immunhistochemische Untersuchungen für HDAC1, 2 und 3. Die gefärbten Schnitte wurden im Anschluss digitalisiert und mittels virtueller Mikroskopie ausgewertet.

Ergebnisse:

HDAC1 zeigte eine starke Expression in 68 (32,7%), eine schwache Expression in 69 (33,2%) und eine fehlende Expression in 71 (34,1%) Fällen. Hinsichtlich der HDAC2-Expression stellte sich folgendes Expressionsprofil dar: starke Expression in 51 (24,1%), schwache Expression in 69 (32,5%) und fehlende Expression in 92 (43,4%) Fällen. HDAC3 wies eine starke Expression in 71 (31,7%), eine schwache Expression in 73 (32,6%) und eine fehlende Expression in 80 (35,7%) Proben auf.

HDAC1 korrelierte signifikant mit einem positiven Hormonrezeptorstatus ( $p < 0,001$ ). Für HDAC2 konnten signifikante Korrelationen mit undifferenzierten (G3) ( $p < 0,001$ ) und Nodal-positiven ( $p = 0,04$ ) Tumoren sowie mit Hormonrezeptor-negativen ( $p = 0,02$ ) und HER2-positiven ( $p = 0,005$ ) Mammakarzinomen festgestellt werden. Für HDAC3 ergaben sich signifikante Daten bezüglich eines negativen Hormonrezeptorstatus ( $p = 0,04$ ) und einem schlechten Differenzierungsgrad ( $p < 0,001$ ).

Für das vorliegende Kollektiv konnten keine signifikanten Daten bezüglich der prognostischen Relevanz der HDAC-Expression im Mammakarzinom erhoben werden.

Schlussfolgerung:

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunhistochemie ein differentielles Expressionsmuster der Histondeacetylasen der Klasse 1 (HDAC1, 2 und 3) in 238 Mammakarzinomen gezeigt werden. Vor allem für HDAC2 wurden signifikante Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern (negativer Hormonrezeptorstatus, positiver HER2-Status, positiver Nodalstatus, G3-Differenzierung), die auf einen aggressiveren biologischen Tumortyp hinweisen, nachgewiesen.

Andere Autoren zeigten, dass eine HDAC-Inhibition in Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomzelllinien zur Expression des Östrogenrezeptors (ER) führt. Auch in unseren Ergebnissen waren eine vermehrte HDAC2- und 3-Expression mit einem negativen Hormonrezeptorstatus assoziiert, was ein Hinweis für eine HDAC-bedingte Hemmung der Transkription des Östrogenrezeptors sein könnte.

Im Zellversuch konnten ER-negative Mammakarzinomzelllinien durch eine Behandlung mit dem HDACi Trichostatin A für eine Hormontherapie mit Tamoxifen sensibilisiert werden. Demnach wäre es theoretisch denkbar, dass Patientinnen mit einem Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom durch eine HDAC-Inhibition von einer antihormonellen Therapie profitieren könnten.

In weiteren, insbesondere prospektiven Studien sollte die Rolle der einzelnen HDAC-Isoformen in der Karzinogenese des Mammakarzinoms sowie das mögliche therapeutische und prognostische Potenzial der HDAC-Inhibition weiter untersucht werden.

## Abstract

### Introduction:

During the last years epigenetic aspects in carcinogenesis have been discussed and alterations caused by histone deacetylases (HDAC) might play an important role. HDAC lead through increased deacetylation of DNA-histones and other proteins of cell cycle to proliferation, angiogenesis, lower grading and metastasis in cancer cells.

Based on this effect of HDAC in carcinogenesis new therapies were developed. In vitro and in vivo it has been shown that HDAC inhibition could limit growth of cancer cells.

In 2006 the HDAC inhibitor (HDACi) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was first approved for therapy for cutaneous T-cell lymphoma. Actually different HDACi are investigated in different types of cancers.

In this study the expression of the isoforms HDAC1, 2 and 3 in breast cancer was analyzed and correlated with relevant clinicopathological parameters. Furthermore, we examined a potential prognostic impact of the expression of these proteins to identify a subgroup who might have better benefit of HDACi.

### Methods:

A tissue micro array (TMA) was constructed by formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples from 238 patients with primary invasive breast cancer diagnosed in the years from 1985 - 1999 in the institute of pathology of Charité University hospital. An immunohistochemical staining of HDAC1, 2 and 3 was done. Finally the slides were digitized and evaluated by virtual microscopy.

### Results:

HDAC1 showed strong expression in 68 (32,7%), intermediate expression in 69 (33,2%) and low expression in 71 (34,1%) cases.

For HDAC2 strong expression could be observed in 51 (24,1%), intermediate expression in 69 (32,5%) and low expression in 92 (43,4%) cases.

HDAC3 was strongly expressed in 71 (31,7%), intermediately expressed in 73 (32,6%) and low expressed in 80 (35,7%) samples.

HDAC1 was highly expressed in hormone receptor positive tumors (n=203; p<0.001).

HDAC2 expression was significantly higher in less differentiated tumors (p<0.001) and hormone receptor negative tumors (p=0.02). A high HDAC2 expression was also significantly associated with an overexpression of HER2 (p=0.005) and the presence of

nodal metastasis  $p=0.04$ ). High HDAC3 expression correlated significantly with hormone negative status ( $p=0,04$ ) and less differentiated tumors ( $p<0,001$ ).

In our cohort none of the HDAC isoforms showed significant prognostic relevance.

Conclusion:

Our results show that the class-1 HDAC isoenzymes 1, 2 and 3 are differentially expressed in 238 breast cancer samples. Especially HDAC2 was correlated with clinicopathological parameters (negative hormone receptor status, overexpression of HER2, lower differentiation, nodal metastasis) which are associated with a more aggressive tumor type.

Other authors could show that HDAC inhibition in hormone receptor negative celllines could lead to expression of hormone receptor. According to this, our results show a correlation of higher HDAC2 and 3 expression in hormone receptor negative tumors.

This might be due to inhibition of transcription of estrogen receptor (ER) by HDAC.

In several in vitro studies ER negative celllines could be sensibilized by the HDAC inhibitor Trichostatin A for a therapy with tamoxifen. These findings might suggest that patients with hormone receptor negative tumors could benefit from hormone therapy by HDAC inhibition.

Further prospective studies are needed to investigate the individual roles of the HDAC isoforms in carcinogenesis of breast cancer and the therapeutic and prognostic impact of HDAC inhibitors.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Das Mammakarzinom**

#### **2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren**

Nach dem aktuellen Bericht des Robert-Koch-Instituts erkrankten 2008 in Deutschland 71.660 Frauen an einem Mammakarzinom. Damit stellt das Mammakarzinom mit 32,1% die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt gegenwärtig bei 83-87% [1].

Im Jahr 2008 verstarben 17.209 Frauen an einem Mammakarzinom, womit das Mammakarzinom trotz verbesserter Therapien weiterhin für die meisten krebsbedingten Todesfälle deutscher Frauen verantwortlich ist. Die allgemeine Inzidenz des Mammakarzinoms nimmt seit 1980 stetig zu. Insbesondere nach der Einführung des Mammographie-Screenings im Jahr 2005 ist ein sprunghafter Anstieg der Neuerkrankungen zu verzeichnen [1].

Derzeit beträgt die Lebenszeitinzidenz für Frauen mit unbelasteter Familienanamnese in Deutschland ein Mammakarzinom zu entwickeln 13,3% [1]. Die Hauptrisikofaktoren hierfür sind hohes Alter, frühe Menarche, Kinderlosigkeit oder hohes Alter bei der Geburt des ersten Kindes sowie später Eintritt der Menopause. Weitere Faktoren wie Adipositas sowie die Einnahme von Hormonersatztherapien tragen zusätzlich zur Entstehung eines Mammakarzinoms bei [2]. Die Einnahme hormoneller Antikonzeptiva ist mit einem geringfügig erhöhtem Brustkrebsrisiko verbunden [3].

Die Entwicklung eines Mammakarzinoms wird auch durch eine positive Familienanamnese begünstigt. Bei ungefähr 5% aller Patientinnen findet sich eine genetisch vererbare Form des Mammakarzinoms. In circa 50% dieser Fälle ist eine Mutation der Brustkrebsgene BRCA1 oder BRCA2 für die Erkrankung verantwortlich [4]. Aktuell konnte die Mutation eines dritten Genes „RAD51C“ oder BRCA3 für die Entstehung des Mammakarzinoms verantwortlich gemacht werden. Die Inzidenz der durch BRCA3 entstandenen Karzinome liegt momentan bei ca. 2% [5]. Mutationsträgerinnen von BRCA1, -2 oder -3 haben ein Lebenszeitrisiko von 80%, 70% bzw. 60-80% für die Entwicklung eines Mammakarzinoms.

## 2.1.2 Histologie und molekularer Subtyp

Man unterscheidet histologisch unterschiedliche Subtypen des invasiven Mammakarzinoms. Die meisten Karzinome sind invasiv-dukta (ca. 80%) oder invasiv-lobulär (ca.10-20%). Seltene Sonderformen sind der papilläre (<1%), muzinöse (2%), medulläre (<1%) und tubuläre Subtyp (2%). Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN) stellen nicht-invasive Formen ohne Merkmale der Gewebeeinfiltration dar [6].

Weiterhin wird das Mammakarzinom anhand des individuellen Genexpressionsprofils in molekulare Subtypen eingeteilt. Die Subgruppen werden hauptsächlich durch Expression von Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) und „human-epidermal-growth receptor 2“ (HER2) sowie Proliferationsmarker Ki-67 charakterisiert. Unterschieden wird dabei vorrangig zwischen luminalzellartigen (hormonrezeptorpositiven) und HER2-positiven (HER2+) Tumoren sowie den basalzellartigen Tumoren bzw. „triple negative breast cancer“ (TNBC) [7, 8]. Eine Übersicht der molekularen Subtypen kann Tabelle 1 entnommen werden.

**Tabelle 1:** Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms nach aktuellen St. Gallen Kriterien 2011; modifiziert nach Naume et al. [9]

	<b>Basal/ TNBC</b>	<b>HER2+/ HR-</b>	<b>HER2+/ HR+</b>	<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>
<b>HR</b>			ER+ und/oder PR+	ER+ und/oder PR+	ER+ und/oder PR+
<b>Typisches Grading</b>	G3, G2	G3 (G1, G2)	G3 (G1,G2)	G1 (G2)	G2, G3
<b>HER2</b>		+	+		
<b>Ki-67</b>	50-60%			<14%	>14%

### **2.1.3 Prognosefaktoren**

Die Prognosefaktoren und die Therapie des Mammakarzinoms sind inzwischen sehr individuell und abhängig von der jeweiligen Tumorbiologie. Eine Rolle spielen dabei sowohl die Einordnung in die TNM-Klassifikation und das Grading, als auch der molekulare Subtyp. Durch den Nottingham-Prognose-Index wurde bereits 1992 gezeigt, dass Entdifferenzierung, positiver Nodalstatus und die TumorgroÙe das Überleben negativ beeinflussen [10]. Aktuell gewinnt die Einteilung nach dem molekularen Subtyp zunehmend an prognostischer Relevanz [11]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass lumbale Tumore eine gute und TNBC eine schlechtere Prognose aufweisen. HER2-positive Tumore haben unbehandelt eine schlechte Prognose, bei Therapie mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab ist die Prognose jedoch deutlich besser [7, 12, 13]. Vor allem der Luminal A Typ zeigt sich prognostisch günstiger als der Luminal B Typ, wobei die Bestimmung von Ki-67 als prognostischer Marker eine wesentliche Rolle spielt [14]. Tumore mit einer hohen Expression von Ki-67 haben ein aggressiveres Proliferationsverhalten und somit eine schlechte Prognose.

### **2.1.4 Molekulare Diagnostik und Therapie**

Gegenstand aktueller Forschung sind molekularbiologische Tests zur exakteren Tumorcharakterisierung und somit verbesserten Therapieentscheidung. Besondere Relevanz zeigen dabei der Nachweis des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (u-PA) und des Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) sowie Verfahren der Genexpressionsanalyse wie OncotypeDX<sup>®</sup>, MammaPrint<sup>®</sup> und Endopredict<sup>®</sup> dar.

Die Bestimmung von u-PA/PAI-1 erfolgt an Frischgewebe. Hohe Konzentrationen von u-PA/PAI-1 sprechen beim nodal-negativen Mammakarzinom für ein erhöhtes Rezidivrisiko und für den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie [15, 16].

Auch Genexpressionsanalysen könnten zukünftig als prädiktives Verfahren in der klinischen Routine zum Standard werden.

Der sogenannte MammaPrint<sup>®</sup> ermittelt im Tumorfrischgewebe mittels DNA-Microarray die Expression von 70 Genen. Anhand des Expressionsmuster kann das individuelle Rezidivrisiko der Patientin bestimmt werden und eine individuelle Therapieentscheidung getroffen werden [17].

Der OncotypeDX<sup>®</sup> und der Endopredict<sup>®</sup> untersuchen die Expression einer ausgewählten Anzahl von Genen mittels RT-PCR an formalin-fixiertem-Paraffin-

eingebettetem (FFPE) Gewebe [18]. Daraus resultiert eine individuelle Einschätzung des Rezidivrisikos unter alleiniger endokriner Therapie im Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativem Mammakarzinom [19, 20].

Die molekulare Diagnostik ermöglicht durch entsprechende Auswahl der standardisierten Therapieoptionen eine individualisierte Therapie.

Zur standardisierten Therapie gehören nach den aktuellen S3-Leitlinien neben der Operation die Bestrahlung, Chemotherapie, Hormontherapie (HT) sowie Antikörpertherapie [21].

Grundsätzlich wird die operative Resektion angestrebt, meist in Form der brusterhaltenden Therapie oder der Mastektomie, gegebenenfalls mit anschließender Bestrahlung des Operationsfeldes. In die medikamentöse Therapieentscheidung werden Grading, Nodal- und Hormonrezeptorstatus sowie der HER2-Status miteinbezogen. Die meisten Therapieformen kommen dabei noch immer adjuvant zum Einsatz. Neoadjuvante Therapien, meist in Form der Chemotherapie, werden bei primär irresektablen und lokal fortgeschrittenen Tumoren sowie zur schnellen Erkenntnis der Therapiewirksamkeit eingesetzt. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass Patientinnen mit primär operablem Tumor, die durch neoadjuvante Therapien eine pathologische Komplettremission (pCR) erreichen, ein signifikant besseres Gesamtüberleben haben [22].

Bei Triple negativen Karzinomen kommt aufgrund bisher fehlender Alternativen meist die Chemotherapie zur Anwendung. Zytostatika werden dabei in kombinierter Form verabreicht, meist kommen Taxan- und Anthrazyklinhaltige Kombinationen zum Einsatz.

Patientinnen mit HR-positiven Tumoren werden mit einer antihormonellen Therapie behandelt. Dabei werden bei prämenopausalen Patientinnen vor allem Antiöstrogene oder auch GnRH-Analoga und im Falle von postmenopausalen Patientinnen meistens Aromatase-Hemmer verabreicht.

Bei positivem HER2-Status wird der monoklonale HER2-Antikörper Trastuzumab zusätzlich zur adjuvanten Chemotherapie verabreicht [21].

In aktuellen Studien zeigen sich erste Hinweise auf die Wirkung des dualen Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib, vor allem in Kombination mit Trastuzumab im HER2-positiven Karzinom [23].

## **2.2 Histondeacetylasen (HDAC)**

### **2.2.1 Klassifikation**

Bereits 1964 konnten Allfrey et al. zeigen, dass die Modifikation der Histonstruktur zu einer veränderten Transkription führt. In den 90er Jahren gelang es schließlich die Histondeacetylase 1 (HDAC1) als erste Isoform der HDAC-Familie zu identifizieren [24, 25]. HDAC1 zeigte sich als Homolog der HDAC Rpd3 der Hefe, einem Genregulator und transkriptionellen Ko-Repressor [26]. Die 18 HDAC-Enzyme wurden anhand ihrer Struktur nach ihren Homologen der Hefe in 4 Klassen eingeteilt. Die Klasse I mit HDAC1, 2, 3 und 8 ist der HDAC Rpd3 der Hefe zuzuweisen. HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10 entsprechen der Hda1 der Hefe und gehören zu Klasse II. Die Klasse III beinhaltet die humanen Sirtuine 1-7, Homologe des Silent-information regulator 2-Proteins (Sir2) der Hefe, die im Gegensatz zu den anderen Klassen Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)-abhängig sind und kein Zink-haltiges katalytisches Zentrum besitzen.

HDAC11 macht aufgrund seiner individuellen Struktur die Klasse IV aus [27, 28].

Die HDAC Klasse I scheinen für die Karzinogenese aktuell am relevantesten zu sein und sind Gegenstand dieser Arbeit. Sie werden ausschließlich im Nukleus und im Gegensatz zu den anderen Klassen ubiquitär exprimiert [29].

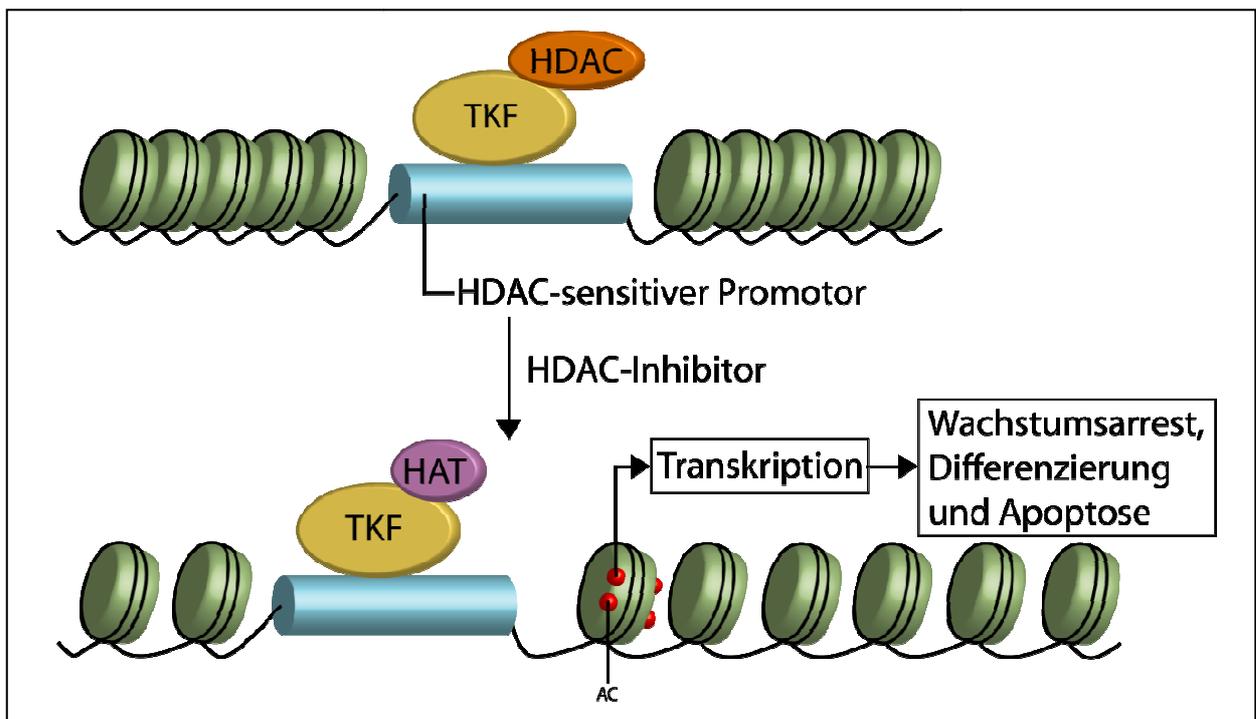
Die Klasse II der HDAC beinhaltet die größten Proteine der HDAC, ihre Expression ist gewebeabhängig und sie zirkuliert zwischen Zytoplasma und Nukleus der Zelle [30]. HDAC11 (Klasse IV) ist nukleär exprimiert, scheint aber mit der zytoplasmatischen HDAC6 zusammenzuarbeiten [31].

### **2.2.2 HDAC in der Karzinogenese: die Histontheorie**

Seit einigen Jahren werden epigenetische Aspekte in der Karzinogenese diskutiert und untersucht. Hierbei ist nicht die Veränderung der Gene selbst, sondern die Veränderung der die Gene umgebenden Proteine und deren Auswirkung auf die Genexpression ausschlaggebend für die Entstehung und Progression eines Malignoms. An Bedeutung gewinnen dabei zunehmend die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen und deren Funktion in der Regulation der Gentranskription.

Vier Paare der Histonmoleküle H2A, H2B, H3 und H4 bilden zusammen mit 146 Basenpaaren der DNA das Nukleosom, die kleinste Untereinheit des Chromatins.

Man geht davon aus, dass eine Acetylierung der Lysingruppen am N-terminalen Histoneende durch Histonacetyltransferasen (HAT) zu einer negativen Ladung der Histone führt. Die Bindung mit der ebenfalls negativ geladenen DNA wird somit gelockert. Die Transkription und Expression von tumorsuppressiven Genen wird ermöglicht, was in der Zelle zur Induktion von Differenzierung, Apoptose und Wachstumsarrest führt. Wird das Gleichgewicht durch eine verstärkte HDAC-Aktivität zu Gunsten der Deacetylierung verschoben, führen die nun deacetylierten Lysingruppen zu einer positiven Ladung der Histone, woraufhin die Bindungsaffinität zur DNA erhöht wird [32, 33]. Die somit erschwerte Gentranskription tumorsuppressiver Gene führt in der Tumorzelle zur Verstärkung von Zellproliferation und –migration, Angiogenese sowie schlechterer Differenzierung, Invasion und Metastasierung (Abb. 1) [34].



**Abb. 1:** Zusammenspiel von HDAC und HAT; TKF: Transkriptionsfaktor; modifiziert nach Marks et al. [33]

### **2.2.3 Einfluss der HDAC auf andere Proteine**

HDAC haben ihren Namen aufgrund ihrer deacetylierenden Wirkung auf Histone. In den letzten Jahren gab es aber immer mehr Hinweise darauf, dass auch andere Proteine Zielsubstrate von HDAC sein können [29].

Sowohl HDAC als auch HAT beeinflussen weitere Schlüsselproteine der Karzinogenese. Meist handelt es sich dabei um Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F1), die beispielsweise im deacetylierten Status nicht an die DNA binden können und die Transkription folglich supprimiert wird [35]. Weitere Substrate sind Chaperone, Signaltransduktoren und DNA-Reparaturproteine, deren deacetylierter Status ihre für den Zellzyklus relevante Funktion verändern kann. Tabelle 2 gibt einen Überblick über weitere Zielsubstrate von HDAC und HAT.

**Tabelle 2:** Übersicht über nicht-Histon Proteine und deren Verhalten im deacetylierten Zustand; modifiziert nach Kim et al. [36]

Deacetylierter Status	Protein	Funktion	HDAC Isoform
<b>Proteinstabilität ↓</b>	RUNX3	Tumorsuppressor	HDAC1, 5
	p53	Tumorsuppressor	HDAC1
	c-Myc	Onkoprotein	unklar
	AR	nukleärer Rezeptor	HDAC1
	Smad7	Signaltransduktor	HDAC1
<b>Proteinstabilität ↑</b>	HIF-1 $\alpha$	Transkriptionsfaktor	unklar
<b>Proteininteraktion ↓</b>	STAT3	Signaltransduktor	HDAC1, 2, 3
	AR	nukleärer Rezeptor	HDAC1
<b>Proteininteraktion ↑</b>	NF- $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor	unklar
	Ku70	DNA Reparatur-Protein	unklar
	HSP70	Chaperon	HDAC6
<b>Bindungsaffinität zur DNA ↓</b>	p53	Tumorsuppressor	unklar
	STAT3	Signaltransduktor	HDAC1, 2, 3
	E2F1	Transkriptionsfaktor	HDAC1
	MyoD	Transkriptionsfaktor	unklar
<b>Transkriptionsaktivität ↓</b>	RUNX3	Tumorsuppressor	HDAC1, 5
	p53	Tumorsuppressor	unklar
	AR	nukleärer Rezeptor	HDAC1
	E2F1	Transkriptionsfaktor	HDAC1
	MyoD	Transkriptionsfaktor	unklar

## **2.2.4 HDAC in Multiproteinkomplexen**

Schon sehr frühe Studien deuten darauf hin, dass vor allem HDAC1 und HDAC2 Teile hochmolekularer Multiproteinkomplexe sind. Es handelt sich dabei um Verbindungen mit Korepressoren bzw. -aktivatoren wie den Switch-independent-3- (Sin3), den Nuclear receptor corepressor- (NCoR) und den Nucleosome-Remodeling Histone Deacetylase-Komplex (NuRD) [27]. HDAC können nur in diesen Komplexen mit Transkriptionsfaktoren und Korepressoren bzw. Koaktivatoren an die DNA binden und wirken [37]. Transkriptionsfaktoren (z.B. p53) und nukleäre Rezeptoren (Thyroid- und Steroidrezeptoren) rekrutieren HDAC beispielsweise über Sin3 oder NCoR [38, 39]. Die Interaktion zwischen HDAC und NuRD-Komplex scheint durch DNA-Methylierung die Transkription zu supprimieren [40].

## **2.3 HDAC-Inhibitoren**

### **2.3.1 Wirkstoffklassen und Zulassung**

Seit einigen Jahren können HDAC pharmakologisch inhibiert werden. Erfolge konnten sowohl in In-Vitro- und in In-Vivo-Experimenten, als auch in klinischen Studien erzielt werden [41].

Seit 2006 ist der erste HDAC-Inhibitor (HDACi) Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) von der Food and Drug Administration (FDA) der USA zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen [42]. Auch Romidepsin, ein zyklisches Peptid, erhielt 2009 die Zulassung für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms [43].

Aktuell sind fünf Wirkstoffklassen der HDACi bekannt: kurzkettige Fettsäuren wie die Valproatsäure (VPA), Hydroxamsäuren wie SAHA und zyklische Peptide wie Depsipeptid sowie synthetische und nicht-synthetische Benzamide (Tabelle 3). Die Hydroxamsäuren funktionieren dabei als pan-HDACi, deren Effekt sich gegen die Klassen I, II und IV richtet. Die kurzkettigen Fettsäuren inhibieren die Klassen I und teilweise II, zyklische Peptide und Benzamide hingegen wirken selektiv gegen einzelne Isoformen. Die zyklischen Peptide wirken gegen HDAC1 und 2 und die Benzamide richten sich gegen HDAC1 und 3 [44]. Die Klasse der Sirtuine (Klasse III) kann aufgrund des fehlenden Zinkions ( $Zn^{2+}$ ) im katalytischen Zentrum nicht durch die an  $Zn^{2+}$ -bindenden HDACi gehemmt werden [36].

**Tabelle 3:** Übersicht der wichtigsten Vertreter der HDACi; MDS: Myelodysplastisches Syndrom, NSCLC: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, NCC: Nierenzellkarzinom, HCC: Hepatozelluläres Karzinom, AML: akute myeloische Leukämie, LC: Lungenkarzinom, CLL: Chronische lymphatische Leukämie; modifiziert nach Mund et al. [44]

<b>Wirkstoff- klasse</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Selektivität</b>	<b>klinische Anwendung</b>	<b>Tumortyp/ Erkrankung</b>
<b>Hydroxam- säuren</b>	<b>Trichostatin A (TSA)</b>	pan-HDACi	Phase I-III	präklinisch
	<b>SAHA</b>	pan-HDACi	zugelassen (FDA, 2006)	kutanes T-Zell- Lymphom
	<b>Panbinostat</b>	pan-HDACi	Phase I-III	Mammakarzinom, Gliom, Prostatakarzinom, MDS, NSCLC, NCC, HCC, hämatologische Malignome
	<b>Belinostat</b>	pan-HDACi	Phase I-II	Lymphome, AML, MDS, Sarkome, NSCLC, Ovarialkarzinom
<b>Zyklische Peptide</b>	<b>Depsipeptid/ Romidepsin</b>	HDAC1, 2	zugelassen (FDA, 2009)	Lymphome, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, multiples Myelom, MDS, LC
<b>kurzkettige Fettsäuren</b>	<b>Valproat (VPA)</b>	Klasse I/II	Phase I-III	CLL, Hirnmetastasen, AML, MDS, LC, Malignes Melanom
	<b>Phenylbutyrat</b>	Klasse I/II	Phase I-II	Antitrypsin-Mangel, Zystische Fibrose
	<b>AN-9</b>	Klasse I/II	Phase I-II	Malignes Melanom, Leukämie, Lymphome
<b>Benzamide</b>	<b>Entinostat</b>	HDAC1, 3	Phase I-II	Lymphome, MDS, Mammakarzinom, Leukämie, LC, NSCLC
	<b>Mocetinostat</b>	HDAC1, 3	Phase I-II	CLL, Lymphome, MDS
<b>Synth. Benzamide</b>	<b>N-Acetyldinalin</b>	HDAC1, 3	Phase I-III	NSCLC, metast. Myelom

### 2.3.2 Wirkung und Indikation

HDACi zeigen mögliche therapeutische Effekte in unterschiedlichen Krankheitsbildern. Neben inflammatorischen Erkrankungen und Diabetes mellitus gibt es vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Huntington-Krankheit, Parkinson und des Morbus Alzheimer erfolgversprechende Hinweise auf den Nutzen einer Therapie mit HDACi [36]. In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung jedoch zunehmend auf die tumorsuppressiven Eigenschaften von HDACi. In den 90er Jahren gelang in In-Vitro-Untersuchungen mittels Trichostatin A erstmals die HDAC-Inhibition [45]. Es zeigten sich eindeutige Zusammenhänge zwischen Wachstumsarrest bzw. Apoptose der Tumorzellen und der HDAC-Inhibition.

Interessanterweise reagieren gesunde Zellen relativ resistent gegenüber HDACi [46]. Inzwischen führt man die Wirkung der HDACi hauptsächlich auf die durch fehlende Gegenregulation der HDAC verstärkte HAT-Aktivität zurück. Die vermehrte Hyperacetylierung führt zu Veränderungen Expression und Funktion Zellzyklus-relevanter Proteine. Im Zellversuch kommt es unter HDACi zur Expression des Zellzyklus-relevanten Gens p21, das über eine Blockade des Cyclin-dependent-kinase (CDK)-Komplexes zum Wachstumsarrest führt [47]. Die Gene Bmf und Bim werden durch HDACi aktiviert und induzieren die Apoptose der Tumorzelle [48, 49]. Weitere Proteine wie p53 und RUNX3 werden durch HDACi moduliert und führen so zu Apoptose oder Wachstumsarrest.

Zusätzlich zeigen HDACi Effekte auf die Angiogenese des Tumors. Der Hypoxie-induzierte Faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), ein Angiogenese-stimulierender Transkriptionsfaktor, verliert durch HDACi an Stabilität, wodurch seine Wirkung herabgesetzt wird [50]. Des Weiteren wird die Expression des Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) HDACi-bedingt unterdrückt [51].

Weitere antiproliferative Effekte werden durch die Hyperacetylierung des Chaperons Heat-Shock-Protein 90 (HSP90) erzielt. Im deacetylierten Zustand ist HSP90 an der Faltung kanzerogener Proteine wie BcR-Abl oder HER2 beteiligt [52]. Im HDACi induzierten, hyperacetylierten Zustand kann HSP90 seiner Funktion als Chaperon nicht nachkommen, so dass seine Substratproteine ihre Wirkung nicht entfalten können.

### 2.3.3 Pharmakodynamik und Nebenwirkungen

Im Allgemeinen sind die Nebenwirkungen von HDACi im Vergleich zu aktuell verwendeten Zytostatika ähnlich schwerwiegend jedoch nicht so häufig. Pharmakodynamik und Nebenwirkungen variieren zwischen den einzelnen Wirkstoffklassen. Im Folgenden sind die Profile der wichtigsten Vertreter aufgelistet.

Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA):

SAHA ist ein sehr potenter Wirkstoff, der bereits in nanomolekularen Konzentrationen antiproliferative Effekte entfaltet. Oral verabreicht beträgt die Höchstdosis 400 mg pro Tag. Neben der Zulassung für das kutane T-Zell-Lymphom laufen aktuell Studien in Phase I-III in soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Diarrhoe, Fatigue, Übelkeit und Lungenembolien. Bei vereinzelt Patienten wurden zudem Anämien und Thrombozytopenien dokumentiert [53, 54].

Romidepsin (Zyklisches Peptid):

Romidepsin oder auch Depsipeptid ist der einzige HDACi in Form eines Prodrug. Erst intrazellulär kommt es zur Bindung der Sulfhydryl-Gruppe an die  $Zn^{2+}$ -Gruppe des katalytischen Zentrums der HDAC. Außerdem ist Romidepsin einer der wenigen selektiven HDACi für die Isoenzyme HDAC1 und 2. Romidepsin ist ebenfalls zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen. Aktuelle Studien zur Wirksamkeit in Lymphomen, Leukämien und soliden Tumoren befinden sich in Phase I-II. Häufige Nebenwirkungen sind neben Übelkeit, Erbrechen und Fatigue auch intermittierende Thrombozyto- und Granulozytopenien. In Phase I-Studien konnten asymptotische Abflachungen der T-Wellen und ST-Strecken-Senkungen beobachtet werden. In Phase II-Studien wurde eine Kardiotoxizität nicht bestätigt. Jedoch verstarb ein Patient an einer Herzklappenerkrankung, was zum Ausschluss von Patienten mit Herzerkrankungen führte [36, 54].

Entinostat (Benzamid):

Entinostat ist ein synthetisches Benzamid-Derivat, was selektiv gegen HDAC1 und 3 wirkt. Es befindet sich ebenfalls in Studien der Phase I-II zur Untersuchung der Wirksamkeit in Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren. Entinostat hat eine gute

orale Bioverfügbarkeit mit einer hohen Halbwertszeit von 30-50 Stunden. Die Gabe von  $10\text{mg}/\text{m}^2$  im 14-tägigen Rhythmus scheint daher am effektivsten zu sein. Häufig kommt es zu gastroenterologischen Nebenwirkungen und Fatigue. Bei höher frequentierter Gabe kam es zusätzlich zu neurologischen Nebenwirkungen wie Gangunsicherheit und Somnolenz sowie zu Elektrolytentgleisung wie Hypophosphatämie, Hyponatriämie und Hypoalbuminämie [36].

## **2.4 Fragestellung**

Das Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression der HDAC im Mammakarzinom. Da der Einfluss der HDAC1, 2 und 3 in der Karzinogenese aktuell am relevantesten erscheint, befasst sich diese Arbeit ausschließlich mit diesen Isoformen. HDAC sind durch die bereits bekannte Wirkung von HDACi in anderen malignen Erkrankungen ein interessantes therapeutisches Target, das auch in der individualisierten Therapie des Mammakarzinoms von Bedeutung sein könnte.

Deshalb soll diese Arbeit die Beantwortung der folgenden Fragen zum Ziel haben:

- 1) Werden die Isoformen HDAC1, 2 und 3 im Mammakarzinom exprimiert?
- 2) Können die Isoformen HDAC1, 2 und 3 mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern assoziiert werden, um so eine Subgruppe zu identifizieren, die potentiell ein erhöhtes Ansprechen auf HDACi verspricht?
- 3) Korreliert die HDAC-Expression mit Gesamtüberleben und Prognose von Mammakarzinompatientinnen?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten an Tumorgewebe von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom, diagnostiziert im Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin zu Berlin. In die Studie eingeschlossen wurden Gewebeproben von 238 Patientinnen mit der Primärdiagnose eines invasiven Mammakarzinoms, die in der Charité im Zeitraum von 1985 bis 1999 diagnostiziert und behandelt wurden. Karzinomrezidive, nicht-invasive Karzinome und bilaterale Karzinome wurden ausgeschlossen. Die Überlebensdaten wurden unter Berücksichtigung des Datenschutzes am örtlichen Landeseinwohnermeldeamt recherchiert. Als Gesamtüberleben galt der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Todeszeitpunkt.

Die Charakteristik des Patientenkollektivs gliedert sich folgendermaßen auf (Tabelle 4): Histologisch handelte es sich um 173 (72,7%) invasiv-duktales Karzinome, 39 (16,4%) invasiv-lobuläre Karzinome und 26 (10,9%) Karzinome anderer histologischer Entität. Darunter sind u.a. muzinöse und medulläre Karzinome. Der überwiegende Anteil der Karzinome war nodal-negativ (143; 63%). Die Verteilung von Tumoren  $\leq$ / $>$  2cm war annähernd gleich. 46% der eingeschlossenen Karzinome wiesen eine mäßige Differenzierung auf. In die Gruppe der Hormonrezeptor-positiven Tumore wurden Karzinome mit folgendem Expressionsprofil zusammengefasst: ER positiv/PR positiv, ER negativ/PR positiv und ER positiv/PR negativ. 188 (81%) Karzinome erwiesen sich als Hormonrezeptor positiv. 26 (11%) Karzinome wiesen eine Überexpression von HER2 auf.

Sowohl die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus als auch des HER2 Status wurden durch erneute Untersuchung auf dem Tissue-Micro-Array (TMA) bzw. bei fehlendem Material auf dem Großflächenschnitt verifiziert.

**Tabelle 4:** Charakteristik der pathologischen Parameter des Kollektivs

<b>Pathologischer Parameter</b>	<b>Anzahl (Prozent)</b>
<b>Histologischer Typ</b>	238 (100%)
invasiv-duktral	173 (72,7%)
lobulär	39 (16,4%)
andere	26 (10,9%)
<b>T-Stadium</b>	236 (100%)
pT1	127 (53,8%)
pT2	89 (37,7%)
pT3	7 (3%)
pT4	13 (5,5%)
<b>Nodalstatus</b>	227 (100%)
negativ	143 (63%)
positiv	84 (37%)
<b>Grading</b>	238 (100%)
G1	66 (27,7%)
G2	109 (45,8%)
G3	63 (26,5%)
<b>Hormonrezeptorstatus</b>	233 (100%)
beide negativ	45 (19,3%)
ER und/oder PR positiv	188 (80,7%)
<b>HER2-Status</b>	228 (100%)
negativ	202 (88,6%)
positiv	26 (11,4%)
<b>Alter</b>	238 (100%)
≤ 60 Jahre	121 (50,8%)
> 60 Jahre	117 (49,2%)

## 3.2 Material

### 3.2.1 Zelllinien

SK-BR-3 (ATCC# HTB 30)	Cell Lines Service, Heidelberg
Adenokarzinom der Brustdrüse	
MCF7 (ATCC# HTB-22)	Cell Lines Service, Heidelberg
Adenokarzinom der Brustdrüse	
MDA-MB 231 (ATCC# HTB 26)	Cell Lines Service, Heidelberg
Adenokarzinom der Brustdrüse	

### 3.2.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid Appligene oncor	Illkirchen Graffenstaden, Frankreich
Alkaline phosphatase	Tropix, Bedford, USA
Conjugated goat anti mouse antibody, cat # AC 32 ML	
Alkaline Phosphatase conjugated goat anti rabbit antibody, cat # AC 31 RL	Tropix, Bedford, USA
Antibody diluent reagent Solution	Zymed, San Francisco, USA
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	Merck, Darmstadt
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CDP-Star Ready-to-Use	Tropix, Bedford, USA
Coomassie Brilliantblau	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Dimethylsufoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM),cat #BE12-70F	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Essigsäure	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA

Ethylendiamintetraessigsäure- di-Natriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS), Kat # SO115	Biochrom, Berlin
Glycin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
I-Block	Tropix, Bedford, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Monoklonaler HDAC2 Antikörper, ab12169	Abcam, Cambridge, UK
Monoklonaler Mouse Anti-Human Progesteron Receptor # M3569	DAKO, Glostrup, Dänemark
Monoklonaler Mouse Anti-Human Oestrogen Receptor # 9101S100AC	Neomarkers, Fremont, USA
Ms X Actin	Chemicon International, Temecula, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitro-Block II	Tropix, Bedford, USA
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Page Ruter Perstained:	Fermentas, USA
Protein Ladder Plus #SM1811	
Polyklonaler HDAC1 Antikörper, ab15316	Abcam, Cambridge, UK
Polyklonaler HDAC3 Antikörper, cat # 611124	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Polyklonaler Rabbit Anti-Human c-erB-2 Onkoprotein, # A0485	DAKO, Glostrup, Dänemark
Sigma fast: Fast red TRI	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Naphtol AS-MX tablet sets	
12-O-Tetradecanoylphorbol- 13-acetate (TPA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCL)	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ver Inform HER2 DNA Probe	Ventana, Tucson, USA
Ver Inform Chr. 17 Probe	Ventana, Tucson, USA
Xylol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

### 3.2.3 Geräte

Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer	Bio Rad, Hemel Hempstead, UK
Dampfsterilisator Varioclav Einzelkochtafel	H+P Labortechnik, München Rommelsbacher Haushaltsgeräte GmbH, Dinkelsbühl
Elektrophoresekammern Apagel Maxi und Mini	Biometra, Göttingen
Elektrophoresenetzgerät Savant PS250	Savant Instruments, Holbrook, USA
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Schnellkochtopf	Steinbach, Kerpen
Schüttler	Biometra, Göttingen
Slide Scanner Mirax Scan	Zeiss, Göttingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tissue-Micro-Arrayer	Bleecher Instruments, Woodland, USA
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau

Vortexer Reax 2000  
Wasserbad  
Zellkulturbrutschrank BB 16  
Zellkulturmikroskop IMT-2

Heidolph, Schwabach  
GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
Heraeus, Hanau  
Olympus Optical, Hamburg

### 3.2.4 Kits

BCA protein assay kit;  
cat #23225  
Super Sensitive Detection Kit

Pierce Rockford, Illinois, USA  
Bio Genex, San Ramon, USA

### 3.2.5 Lösungen und Kulturmedien

#### 10 x Elektrophoresepuffer:

30,3g Tris-base  
144,0g Glycin  
2,8g SDS  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O  
pH 8,3-8,4 einstellen

#### 10 x Transpuffer:

29,0g Glycin  
58,0g TRIS-Base  
3,7g SDS  
ad 800,0 ml H<sub>2</sub>O  
pH 8,3 einstellen

#### Blocking-Puffer:

0,6g I-Block  
30,0 ml 10 x PBS oder TBS  
PBS mit 270,0 ml Aqua Bidest auffüllen,  
erhitzen (nicht kochen), abkühlen lassen  
300 µl Tween 20

**Waschpuffer:**

100,0 ml 10 x PBS oder TBS  
1,0 ml Tween 20  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O

**10 x Assaypuffer:**

12,1g TRIS-Base in 350,0 ml Aqua dest.  
lösen, pH 9,8 einstellen  
1,0165g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
ad 500,0 ml H<sub>2</sub>O

**DMEM, serumhaltig:**

500,0 ml DMEM  
10,0 ml L-Glutamin  
50,0 ml FCS

**DMEM, serumfrei:**

500,0 ml DMEM  
10,0 ml L-Glutamin

**10 x Citratpuffer:**

3,78g Zitronensäure-Monohydrat  
24,21g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O  
pH 6,0 einstellen

**10 x TRIS-Puffer:**

9,0g Tris-Base  
68,5g Tris-HCL  
87,8g NaCl  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,4 einstellen

**Proteinlysispuffer:**

1,2 ml 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)  
2,0 ml 10% SDS  
1,0 ml Glycerol  
0,5 ml DTT (1M)  
5,3 ml Aqua Bidest

**Polyacrylamidgel 10%:**

2,5 ml Acrylamid  
2,5 ml 1,5M Tris-HCL (pH 8,8)  
100,0 µl 10% SDS  
50,0 µl 10% APS  
5,0 µl TEMED  
4,8 ml H<sub>2</sub>O

**Sammelgel 4%:**

0,5 ml Acrylamid  
1,25 ml 0,5M Tris-HCL (pH 6,8)  
50,0 µl 10% SDS  
50,0 µl 10% APS  
10,0 µl TEMED  
3,2 ml H<sub>2</sub>O

**Coomassie-Färbelösung:**

0,6g Coomassie-Blau  
100,0 ml Essigsäure  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O

**Färbefixierlösung für Coomassie:**

250,0 ml Isopropanol  
100,0 ml Essigsäure  
ad 1000,0 ml H<sub>2</sub>O

### 3.2.6 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3 MM CHR	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser 24 x 60 mm / 24 x 40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filter Hyperfilm	Schleicher und Schuell, Dassel Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Insulinspritzen 1 ml	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Microtest Zellkulturplatte 96 well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Objektträger (Super Frost Plus) 25 x 75 x 1,0 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pap Pen	The Binding Site, Birmingham, UK
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
Petrischalen für Zellkultur	Falcon-Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 / 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Skalpell	Bard-Parker-Becton Dickinson, Hancock, USA
Spritzen 5 / 10 / 20 ml	B. Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Falcon-Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Zellschaber	Costar, Corning, USA
Zellstoff	Hartmann, Heidenheim

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Histopathologische Untersuchung

Nach Fixierung in 4% Formaldehyd wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet, um anschließend in 5 µm dünne Präparate geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt zu werden.

Das Grading der Mammakarzinome wurde nach Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis beurteilt [55]. Der Nodalstatus und die Tumorgroße wurden gemäß den Richtlinien der TNM-Klassifikation der 7. Auflage festgelegt [56].

Der HER2-Status wurde gemäß S3-Leitlinie bei Fällen mit einem Dako-Score 2+ hinsichtlich einer möglichen Genamplifizierung mittels silberverstärkter In-Situ-Hybridisierung (SISH) weiter untersucht. Fälle mit Dako-Score 0 und 1+ galten als negativ, ein Dako-Score von 3+ sowie 2+ und Nachweis einer HER2-Genamplifizierung galten als positiv.

Zur Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurde ein immunreaktiver Score (IRS) verwendet. Durch ein zugrundeliegendes Punktesystem ergibt sich aus der Multiplikation der Färbintensität mit der Anzahl positiver Zellen ein Score zwischen 0 und 12 (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Übersicht des Immunoreaktiven Scores [57]

Anzahl positiver Zellen	Punktzahl	Farbintensität	Punktzahl
keine	0	negativ	0
<10%	1	schwach	1
10-50%	2	mäßig	2
51-80%	3	stark	3
>80%	4		

### **3.3.2 Erstellen eines Tissue-Micro-Arrays (TMA)**

Zur Herstellung des TMAs wurden Formalin-fixiert-Paraffin-eingebettete (FFPE) Tumorproben der 238 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom verwendet. Alle Proben stammten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité Campus Mitte. Im HE-Schnitt wurden die invasiven Tumorareale markiert. Anschließend wurden zwei repräsentative Tumorstanzen pro Patientin entnommen und mittels eines Micro-Arrayer (Bleecher Instruments, Woodland, USA) in einen neuen Paraffinblock eingebettet. Die Spotgröße betrug 1 mm.

Um eine bessere Orientierung auf den TMAs sowie eine Differenzierung zwischen verschiedenen TMAs zu ermöglichen, wurden Kontrollfelder mit unterschiedlichen histologischen Entitäten (Leber, Niere, Uterus und Tonsille) in das TMA-Layout eingefügt.

### **3.3.3 Immunhistochemie und Digitalisierung**

Durch dreimaliges Waschen zu je 3 Minuten in Xylol sowie in absteigender Ethanolreihe (2 x 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol für jeweils 5 min) wurden die Schnitte entparaffinisiert. Um die Bindebereitschaft der Epitope für die Antikörper zu erhöhen, wurden die Proben nach einer Wässerung in Aqua dest. in Citratpuffer erhitzt und 5 min im Schnellkochtopf bei Überdruck gekocht. Bis zur Applikation des Antikörpers wurden die Gewebsschnitte in TBS-Pufferlösung feucht gehalten. Nach Auftragen eines Proteinblocks (5-10 Minuten) wurden die primären Antikörper verdünnt in Antibody diluent solution in folgender Konzentration aufgetragen: HDAC1 1:11, HDAC2 1:5000 und HDAC3 1:500.

Über Nacht wurden die Proben bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrmals mit TBS/Tween gewaschen, um dann mit dem Zweitantikörper und der alkalischen Phosphatase des Biotin Streptavidin Amplified Detection Systems für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Für die Färbung wurden naphtholhaltige Färbetabletten verwendet, zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nachdem die Schnitte mit Aquatex und Deckgläsern eingedeckt wurden, erfolgte die Digitalisierung mittels des Slide Scanner Mirax Scan (Zeiss, Göttingen). Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms VM Slide Explorer 2009 (VMscope, Berlin, Deutschland).

### **3.3.4 Angaben zur Statistik**

Für die statistischen Berechnungen dieser Arbeit wurde das Programm SPSS Statistics Version 18 (IBM, Armonk, USA) verwendet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Mittels des  $\chi^2$ -Test für Trends wurden lineare Zusammenhänge überprüft.

Das Gesamtüberleben wurde in einer univariaten Überlebensanalyse mit der Kaplan-Meier Methode bestimmt und durch den Log-Rank-Test verifiziert.

### **3.3.5 Zellkultur**

Die Kultivierung der humanen Mammakarzinomzelllinien MCF7, SK-BR-3 und MDA-MB-231 erfolgte in Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10% FCS und 2% L-Glutamin in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5%igen Volumenanteil CO<sup>2</sup>. Alle Experimente wurden innerhalb von 10 Passagen durchgeführt. Bei 80%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zuerst das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin gespült. Nach erneutem Absaugen wurde 1 ml frisches Trypsin hinzugegeben und gleichmäßig verteilt. Die Flaschen wurden bei 37° inkubiert.

Durch mikroskopische Kontrolle wurde sichergestellt, dass sich genügend Zellen vom Boden gelöst hatten und der Vorgang wurde durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Je nach Zelllinie wurde 0,25 bis 5 ml in der Kulturflasche belassen und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen sowie unter Verwendung steriler Lösungen und Materialien durchgeführt.

### **3.3.6 Proteinisolierung**

Die Zellsuspension wurde bei Bedarf mit Medium auf 2,5 ml aufgefüllt und dann in 40 mm große Petrischalen ausgesät.

Es wurden jeweils 2 ml der Medien entnommen und 5 min bei 5000/U zentrifugiert. Für den Versuch wurde nur jeweils 1,5 ml verwendet, der Rest wurde bei -20°C eingefroren und für weitere Experimente aufgehoben. Anschließend wurden die Schalen mit 1 ml PBS gespült, die Zelllinien auf Eis gelagert und mit jeweils 100 µl Proteinlysispuffer lysiert.

Nachdem das Lysat zur mechanischen Degradierung mehrmals in einer Insulinspritze aufgezogen wurde, erfolgte die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Für die Quantifizierung der Proteine erfolgte eine Proteinbestimmung durch den BCA-Kit nach Pierce. Hierbei wird  $\text{Cu}^{2+}$  durch die Proteine zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Die reduzierten  $\text{Cu}^{1+}$  bilden anschließend farbige Komplexe mit Bicinchoninsäure. Die entstehende Farbintensität gilt als Maß für die Reaktion und wurde mittels eines ELISA-Readers bei 490 nm gemessen. Die Proben wurden nach Anweisung des Herstellers 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die unter denselben Versuchsbedingungen mitgeführte Proteinstandardreihe wurde zur abschließenden Berechnung der Proteinkonzentration zu Hilfe genommen.

### **3.3.8 Westernblot**

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit Lysepuffer auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und bei  $95^{\circ}\text{C}$  lysiert. Anschließend wurden die Proben und eine Kontrolle zur Längenorientierung in einem 10% Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE bei 100 V für 2 h aufgetrennt. Nun erfolgte das eigentliche Blotten, wobei die Proteine in einem Semi-Dry-System mit einer Stromstärke von 100 mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Weiterführend wurden durch die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Blockingpuffer unspezifische Bindungsstellen gehemmt.

Die mono- und polyklonalen Antikörper für HDAC1, 2 und 3 wurden in der entsprechenden Verdünnung (HDAC1 1:30, HDAC2 1:1000 und HDAC3 1:100) im Blockingpuffer auf die Membran aufgetragen und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen 3-mal mit Waschpuffer gewaschen und der sekundäre Antikörper konnte in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockingpuffer appliziert werden. Nach der 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut 3-mal im Waschpuffer und 4 min im Assaypuffer gewaschen. Nach 5-minütiger Inkubation im CDP-Star RTU Lumineszenzsystem fand eine Reaktion mit den Antikörpern statt und abschließend konnte der Hyperfilm belichtet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 HDAC-Expression im Mammakarzinom

Innerhalb der einzelnen HDAC-Färbungen wurden in die abschließende Analyse für HDAC1 208, für HDAC2 212 und für HDAC3 224 Fälle einbezogen. Die übrigen Fälle konnten aufgrund fehlenden Tumormaterials auf dem TMA nicht in die Auswertung eingeschlossen werden. Zur qualitativen Bewertung wurde die nukleäre HDAC-Expression in Gruppen eingeteilt. Hierbei wurde ein IRS von 0 bis 4 als negative, ein IRS von 6 bis 8 als schwache und ein IRS von 9 bis 12 als starke HDAC-Expression definiert.

Eine starke Expression konnte für HDAC1 in 32,7%, für HDAC2 in 24,1% und für HDAC3 in 31,7% der Fälle nachgewiesen werden. Die einzelnen Verteilungen der HDAC-Expression können Tabelle 6 entnommen werden.

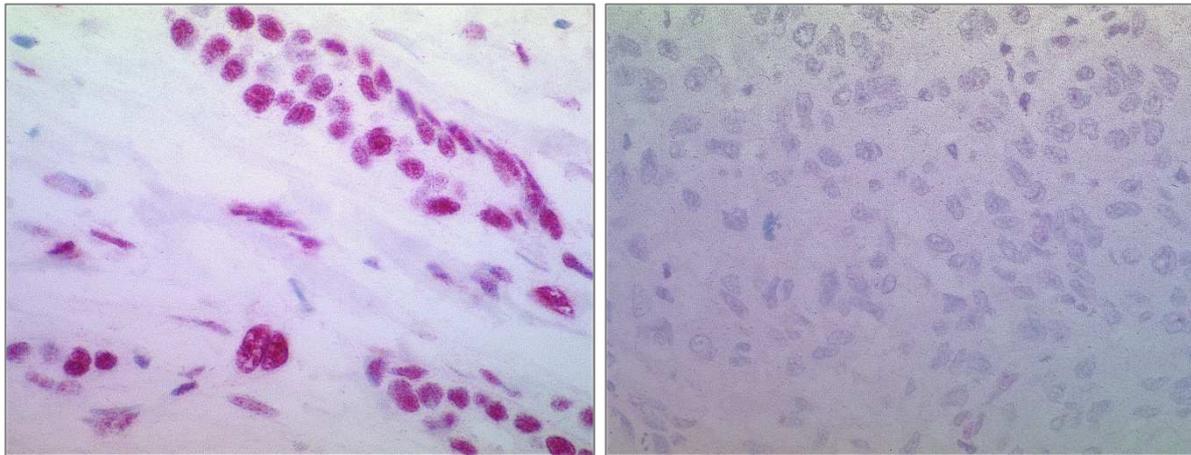
**Tabelle 6:** Verteilung der HDAC-Expression im Kollektiv

HDAC-Subtyp	negativ	schwach	stark	gesamt
<b>HDAC1</b>	71 (34,1%)	69 (33,2%)	68 (32,7%)	208 (100%)
<b>HDAC2</b>	92 (43,4%)	69 (32,5%)	51 (24,1%)	212 (100%)
<b>HDAC3</b>	80 (35,7%)	73 (32,6%)	71 (31,7%)	224 (100%)

## 4.2 Immunhistochemische Färbungen

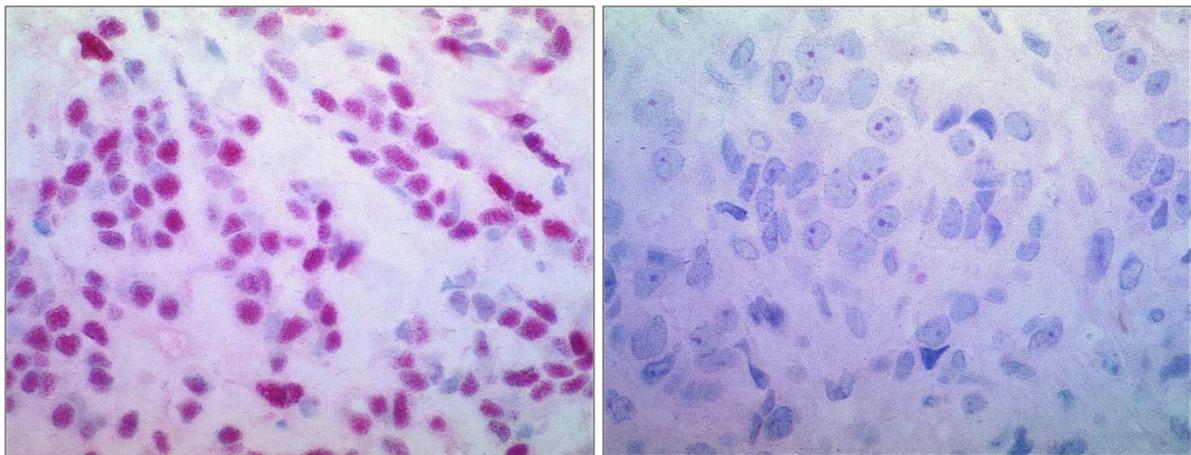
Im Folgenden sind Beispiele der immunhistochemischen Färbung der Kategorie „stark“ und „negativ“ für HDAC1, HDAC2 und HDAC3 aufgeführt.

### 4.2.1 Immunhistochemische Färbungen der HDAC1



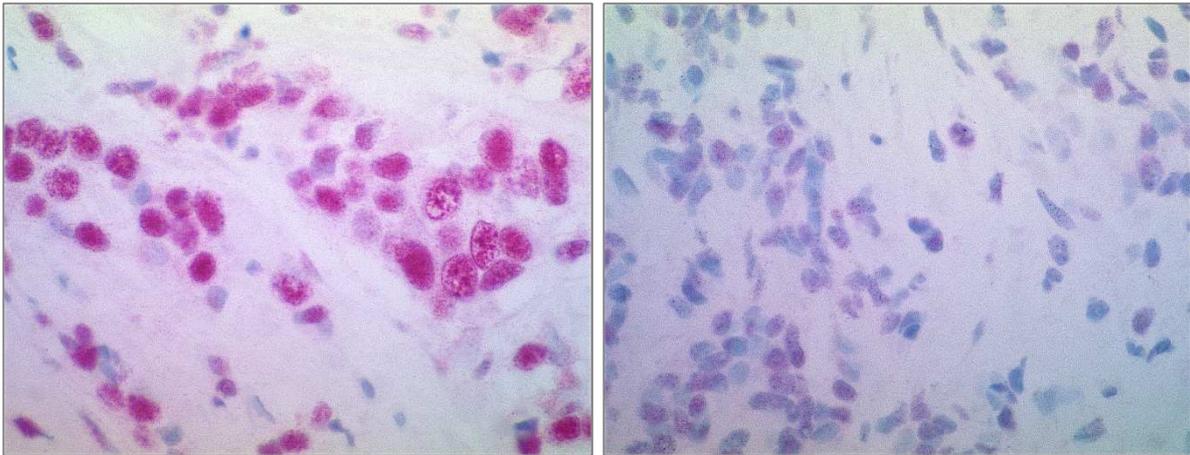
**Abb. 2:** Starke und negative HDAC1-Expression im Mammakarzinom

### 4.2.2 Immunhistochemische Färbungen der HDAC2



**Abb. 3:** Starke und negative HDAC2-Expression im Mammakarzinom

### 4.2.3 Immunhistochemische Färbungen der HDAC3



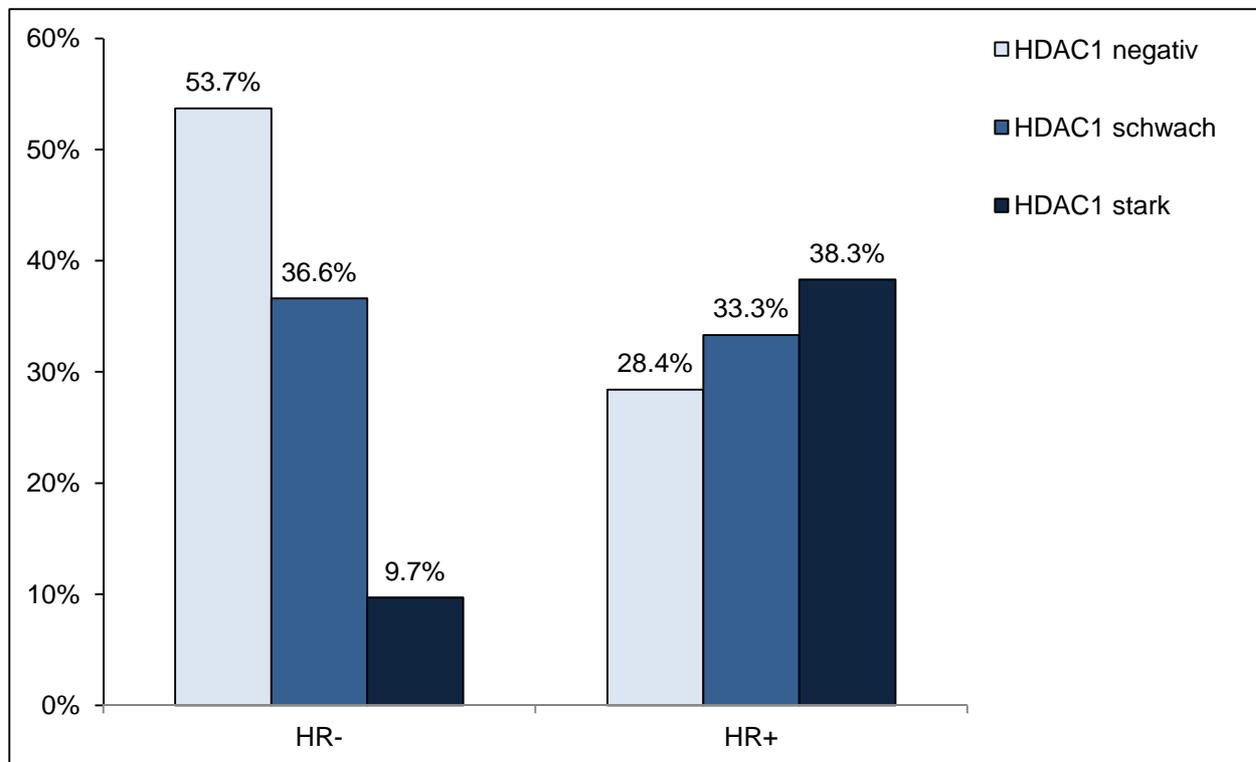
**Abb. 4:** Starke und negative HDAC3-Expression im Mammakarzinom

### 4.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

#### 4.3.1 Korrelationen der HDAC1

Die HDAC1-Expression korrelierte signifikant mit dem Hormonrezeptorstatus ( $p < 0,001$ ,  $n=204$ ). Tumore mit einem positiven Hormonrezeptorstatus wiesen in 38,8 % der Fälle eine starke HDAC1-Expression auf. Tumore mit negativem Hormonrezeptorstatus waren dagegen nur in 9,7 % der Fälle HDAC1 positiv (Abb. 5).

Für das Grading ( $p=0,89$ ), den histologischen Subtyp ( $p=0,17$ ), das T-Stadium ( $p=0,88$ ), den Nodalstatus ( $p=0,23$ ) und den HER2-Status ( $p=0,71$ ) konnten keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden (Tabelle 7).



**Abb. 5:** Signifikante Korrelationen der HDAC1-Expression mit dem positiven Hormonrezeptorstatus;  $n=204$  ( $\chi^2$ -Test:  $p < 0,001$ )

**Tabelle 7:** HDAC1-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern

Pathologischer Parameter	Fallzahl	HDAC1 negativ	HDAC1 schwach	HDAC1 stark	p-Wert $\chi^2$ -Test
<b>Grading</b>					0,89
G1	61 (100%)	24 (39,3%)	20 (32,8%)	17 (27,9%)	
G2	90 (100%)	25 (27,8%)	28 (31,1%)	37 (41,1%)	
G3	53 (100%)	20 (37,8%)	21 (39,6%)	12 (22,6%)	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>					*<0,001
HR+	162 (100%)	46 (28,4%)	54 (33,3%)	62 (38,3%)	
HR-	41 (100%)	22 (53,7%)	15 (36,6%)	4 (9,7%)	
<b>HER2-Status</b>					0,71
negativ	175 (100%)	60 (34,3%)	58 (33,1%)	57 (32,6%)	
positiv	25 (100%)	9 (36%)	9 (36%)	7 (28%)	
<b>T-Stadium</b>					0,88
pT1	116 (100%)	41 (35,3%)	37 (31,9%)	38 (32,8%)	
pT2/pT3	78 (100%)	23 (29,5%)	30 (38,5%)	25 (32%)	
pT4	9 (100%)	4 (44,4%)	2 (22,2%)	3 (33,4%)	
<b>Nodalstatus</b>					0,23
negativ	129 (100%)	48 (37,2%)	42 (32,6%)	39 (30,2%)	
positiv	67 (100%)	18 (26,9%)	26 (38,8%)	23 (34,3%)	
<b>Histologischer Typ</b>					0,17
invasiv-duktal/andere	176 (100%)	62 (35,2%)	60 (34,1%)	54 (30,7%)	
lobulär	28 (100%)	7 (25%)	9 (32,1%)	12 (42,9%)	

### 4.3.2 Korrelationen der HDAC2

Es zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen einer positiven HDAC2-Expression und dem histologischen Differenzierungsgrad der Tumore ( $p < 0,001$ ), dem Hormonrezeptorstatus ( $p = 0,02$ ), dem HER2-Status ( $p = 0,005$ ) und dem Nodalstatus ( $p = 0,04$ ).

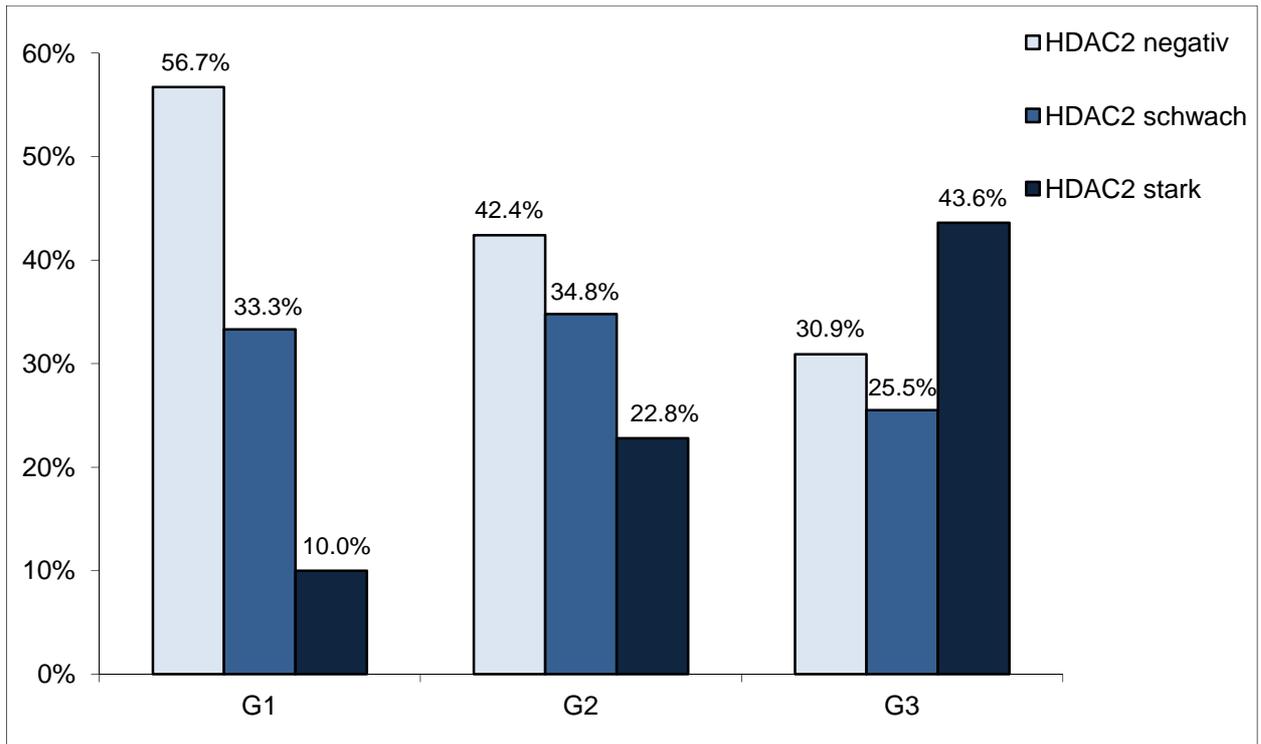
Entdifferenzierte Tumore (G3) zeigten in 43,6% ( $n = 24$ ) der Fälle eine starke HDAC2-Expression, gut differenzierte Tumore (G1) hingegen zeigten in 56,7% der Fälle ( $n = 34$ ) keine HDAC2-Expression (Abb. 6).

Eine weitere signifikante Korrelation ergab sich bezüglich des Hormonrezeptorstatus ( $p = 0,02$ ): Karzinome mit einer positiven Expression des Hormonrezeptors wiesen eher keine HDAC2-Expression ( $n = 73$ ; 44,8%) auf, Hormonrezeptor-negative Karzinome hingegen exprimierten verstärkt HDAC2 ( $n = 19$ ; 44,2%) (Abb. 7).

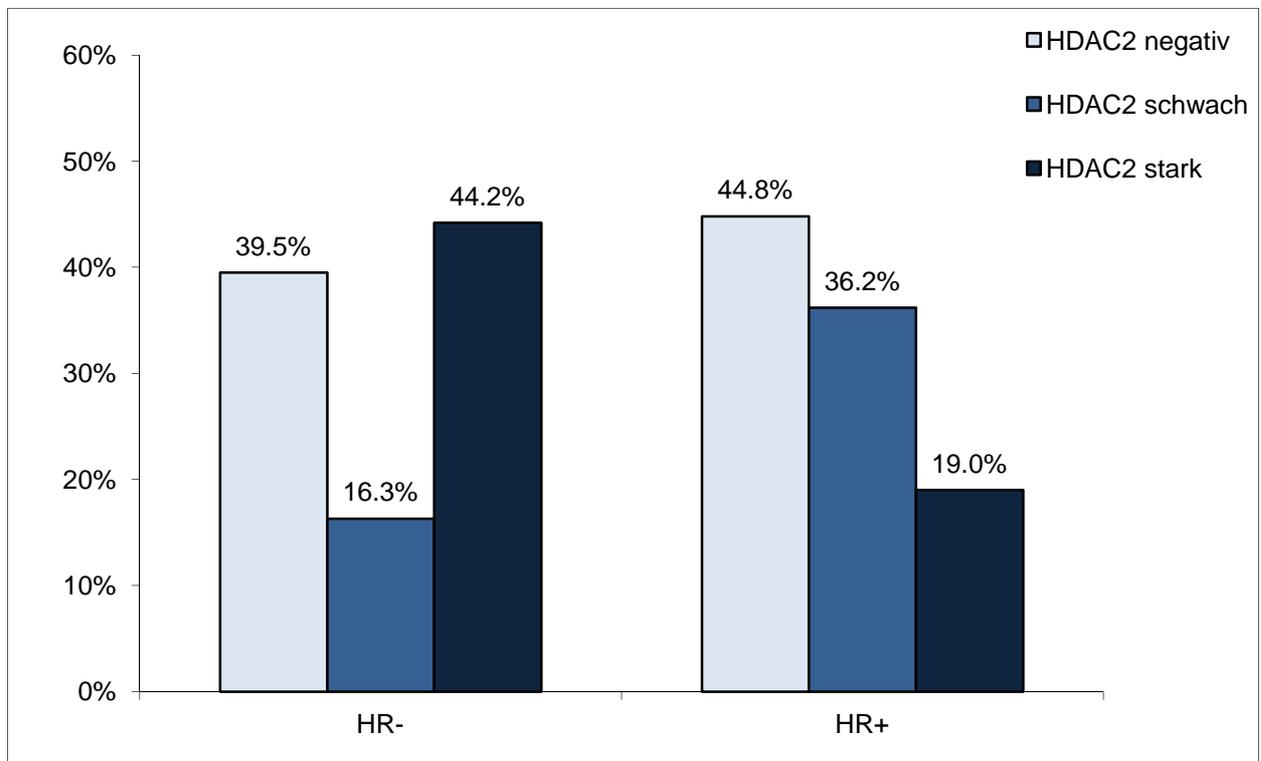
In HER2-positiven Mammakarzinomen ( $n = 11$ ; 44%) konnte eine starke HDAC2-Expression nachgewiesen werden ( $p = 0,005$ ). Dazu korrelierend ergab sich für HER2-negative Mammakarzinome ( $n = 83$ ; 46,6%) eine überwiegend fehlende HDAC2-Expression (Abb. 8).

Nodal-positive Tumore ( $n = 19$ ; 27,1%) zeigten eine starke HDAC2-Expression auf ( $p = 0,04$ ), Nodal-negative Mammakarzinome ( $n = 66$ ; 50,8%) hingegen wiesen eher keine HDAC2-Expression auf (Abb. 9).

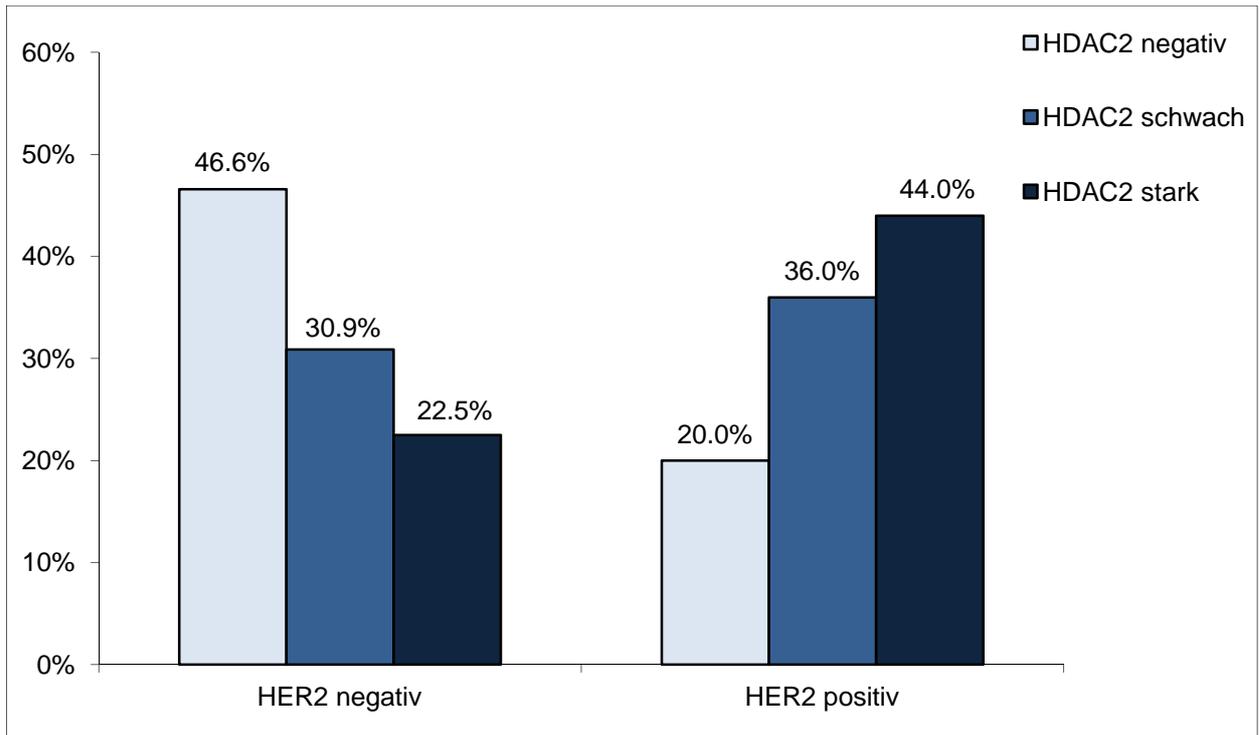
Weder das T-Stadium ( $p = 0,55$ ) noch der histologische Subtyp ( $p = 0,59$ ) korrelierten mit der HDAC-Expression (Tabelle 8).



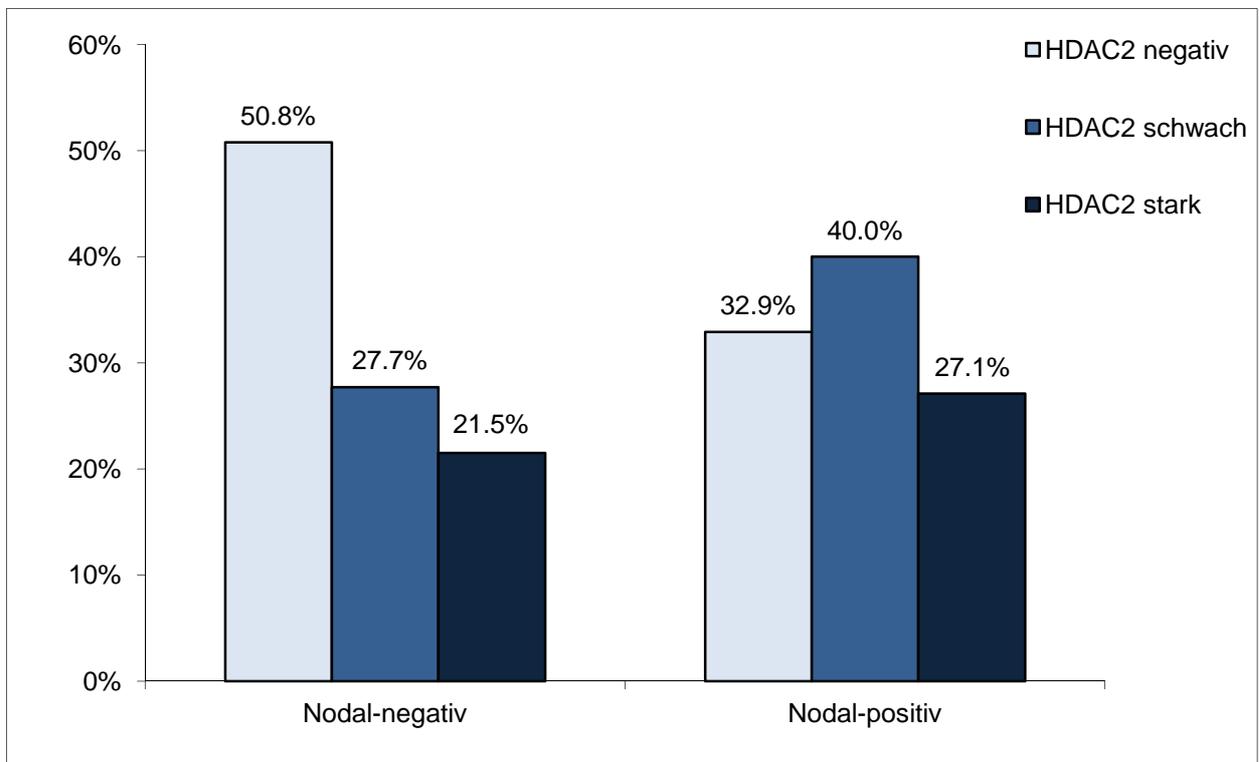
**Abb. 6:** Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit entdifferenzierten Tumoren (G3); n=207 ( $\chi^2$ -Test: p<0,001)



**Abb. 7:** Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem negativen Hormonrezeptorstatus; n=204 ( $\chi^2$ -Test: p=0,02)



**Abb. 8:** Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem positiven HER2-Status; n=203 ( $\chi^2$ -Test: p=0,005)



**Abb. 9:** Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem positiven Nodalstatus; n=200 ( $\chi^2$ -Test: p=0,04)

**Tabelle 8:** HDAC2-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern

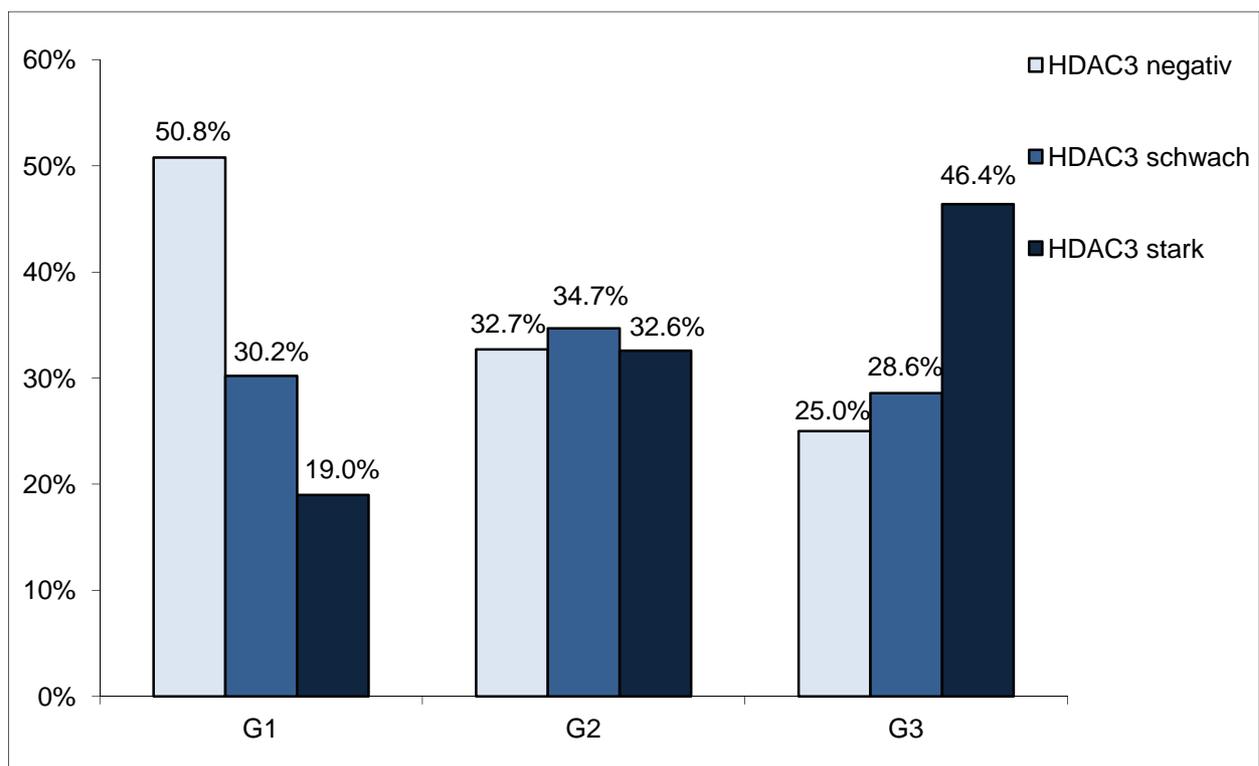
<b>Pathologischer Parameter</b>	<b>Fallzahl</b>	<b>HDAC2 negativ</b>	<b>HDAC2 schwach</b>	<b>HDAC2 stark</b>	<b>p-Wert <math>\chi^2</math>-Test</b>
<b>Grading</b>					*<0,001
G1	60 (100%)	34 (56,7%)	20 (33,3%)	6 (10%)	
G2	92 (100%)	39 (42,4%)	32 (34,8%)	21 (22,8%)	
G3	55 (100%)	17 (30,9%)	14 (25,5%)	24 (43,6%)	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>					*0,02
HR+	163 (100%)	73 (44,8%)	59 (36,2%)	31 (19%)	
HR-	43 (100%)	17 (39,5%)	7 (16,3%)	19 (44,2%)	
<b>HER2-Status</b>					*0,005
negativ	178 (100%)	83 (46,6%)	55 (30,9%)	40 (22,5%)	
positiv	25 (100%)	5 (20%)	9 (36%)	11 (44%)	
<b>T-Stadium</b>					0,43
pT1	117 (100%)	52 (44,4%)	41 (35%)	24 (20,6%)	
pT2/pT3	79 (100%)	32 (40,5%)	22 (27,9%)	25 (31,6%)	
pT4	10 (100%)	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)	
<b>Nodalstatus</b>					*0,04
negativ	130 (100%)	66 (50,8%)	36 (22,7%)	28 (21,5%)	
positiv	70 (100%)	23 (32,9%)	28 (40%)	19 (27,1%)	
<b>Histologischer Typ</b>					0,59
invasiv-duktral/andere	180 (100%)	80 (44,4%)	56 (31,1%)	44 (24,5%)	
lobulär	27 (100%)	10 (37%)	10 (37%)	7 (26%)	

### 4.3.3 Korrelationen der HDAC3

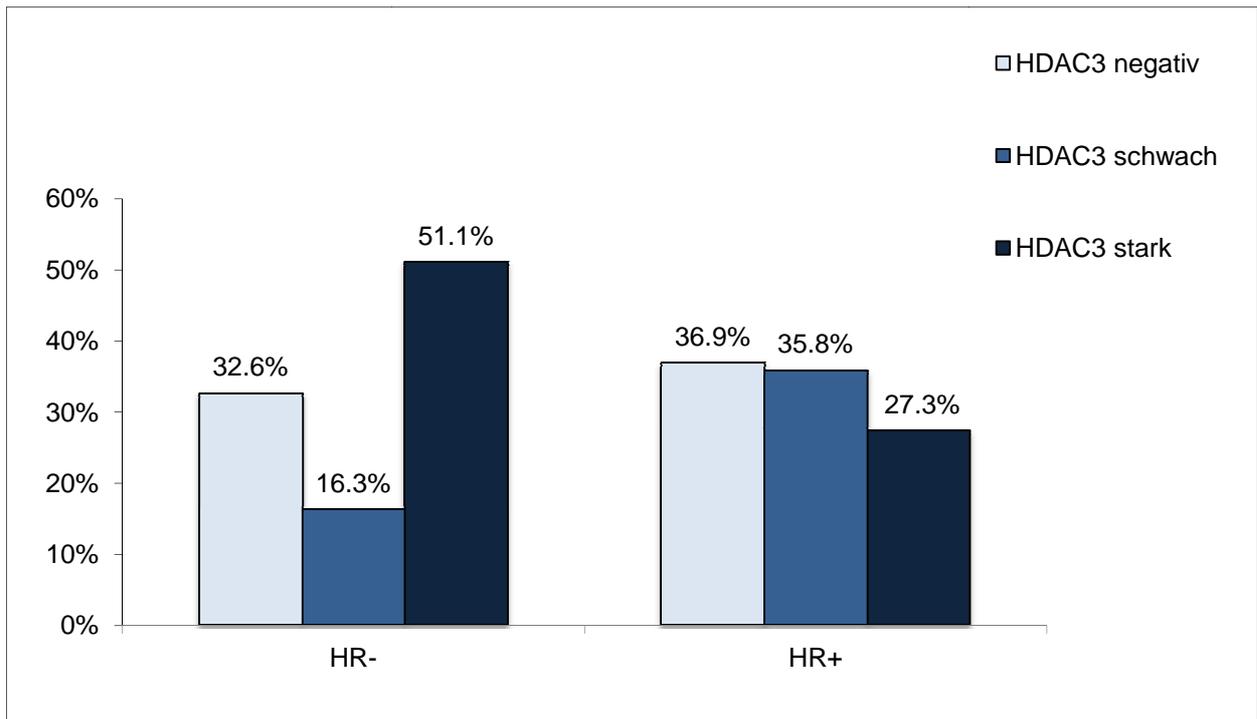
Die HDAC3-Expression korrelierte signifikant mit dem Grading ( $p < 0,001$ ): Entdifferenzierte Mammakarzinome (G3) zeigten überwiegend eine starke HDAC3-Expression ( $n=26$ ; 46,4%). Gut differenzierte Mammakarzinome (G1) wiesen hingegen in 50,8 % ( $n=32$ ) der Fälle keine HDAC3-Expression auf (Abb. 10).

Ein negativer Hormonrezeptorstatus ( $n=22$ , 51,1%) war signifikant mit einer starken HDAC3-Expression assoziiert ( $p=0,04$ ). Eine fehlende HDAC3-Expression zeigte sich in 36,9% ( $n=65$ ) der Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinome (Abb. 11).

Für den histologischen Subtyp ( $p=0,34$ ), das T-Stadium ( $p=0,55$ ), den Nodalstatus ( $p=0,61$ ) und den HER2-Status ( $p=0,12$ ) konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden (Tabelle 9).



**Abb. 10:** Signifikante Korrelationen der HDAC3-Expression mit entdifferenzierten Tumoren (G3);  $n=220$  ( $\chi^2$ -Test:  $p < 0,001$ )



**Abb. 11:** Signifikante Korrelationen der HDAC3-Expression mit dem negativen Hormonrezeptorstatus; n=219 ( $\chi^2$ -Test: p=0,04)

**Tabelle 9:** HDAC3-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern

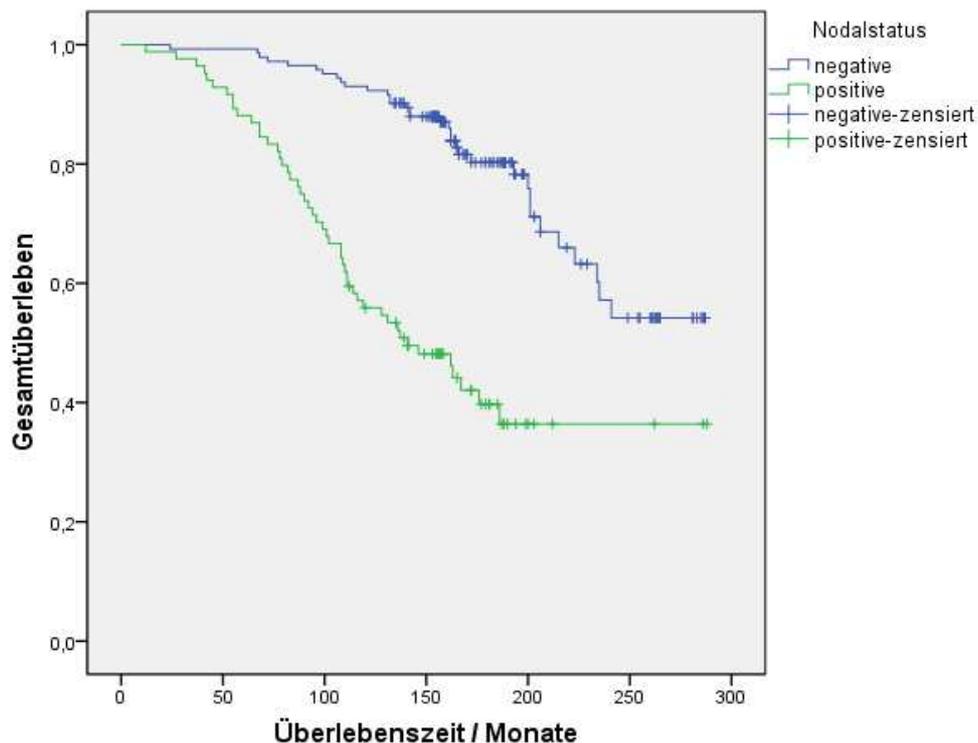
Pathologischer Parameter	Fallzahl	HDAC3 negativ	HDAC3 schwach	HDAC3 stark	p-Wert $\chi^2$ -Test
<b>Grading</b>					*<0,001
G1	63 (100%)	32 (50,8%)	19 (30,2%)	12 (19%)	
G2	101 (100%)	33 (32,7%)	35 (34,6%)	33 (32,7%)	
G3	56 (100%)	14 (25%)	16 (28,6%)	26 (46,4%)	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>					*0,04
HR+	176 (100%)	65 (36,9%)	63 (35,8%)	48 (27,3%)	
HR-	43 (100%)	14 (32,6%)	7 (16,3%)	22 (51,1%)	
<b>HER2-Status</b>					0,12
negativ	191 (100%)	71 (37,2%)	63 (33%)	57 (29,8%)	
positiv	25 (100%)	8 (32%)	4 (16%)	13 (52%)	
<b>T-Stadium</b>					0,55
pT1	119 (100%)	43 (36,1%)	37 (31,1%)	39 (32,8%)	
pT2/pT3	87 (100%)	28 (32,2%)	29 (33,3%)	30 (34,5%)	
pT4	13 (100%)	7 (53,8%)	4 (30,8%)	2 (15,4%)	
<b>Nodalstatus</b>					0,61
negativ	133 (100%)	51 (38,3%)	39 (29,3%)	43 (32,4%)	
positiv	78 (100%)	26 (33,3%)	26 (33,3%)	26 (33,3%)	
<b>Histologischer Typ</b>					0,34
invasiv-duktral/andere	185 (100%)	69 (37,2%)	58 (31,4%)	58 (31,4%)	
lobulär	35 (100%)	10 (28,6%)	12 (34,3%)	13 (37,1%)	

#### 4.4 Univariate Überlebensanalyse

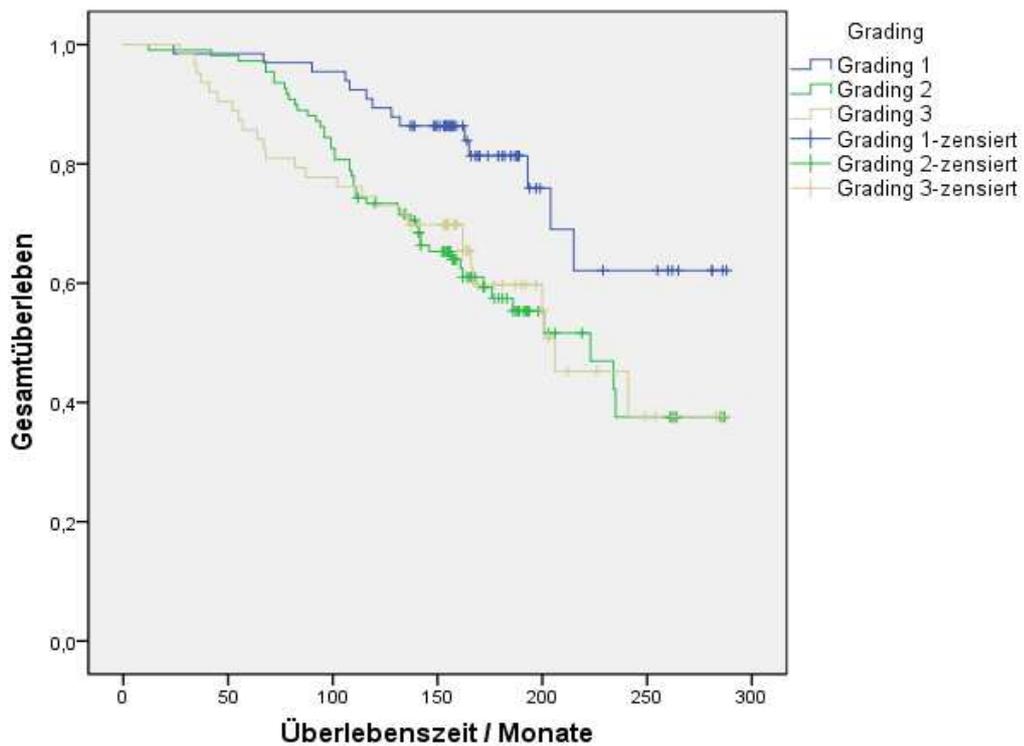
Die Nachbeobachtungszeit aller Patientinnen betrug im Durchschnitt 158 Monate. 88 Patientinnen (37%) verstarben während der Nachbeobachtungszeit.

##### 4.4.1 Prognostische Parameter im Kollektiv

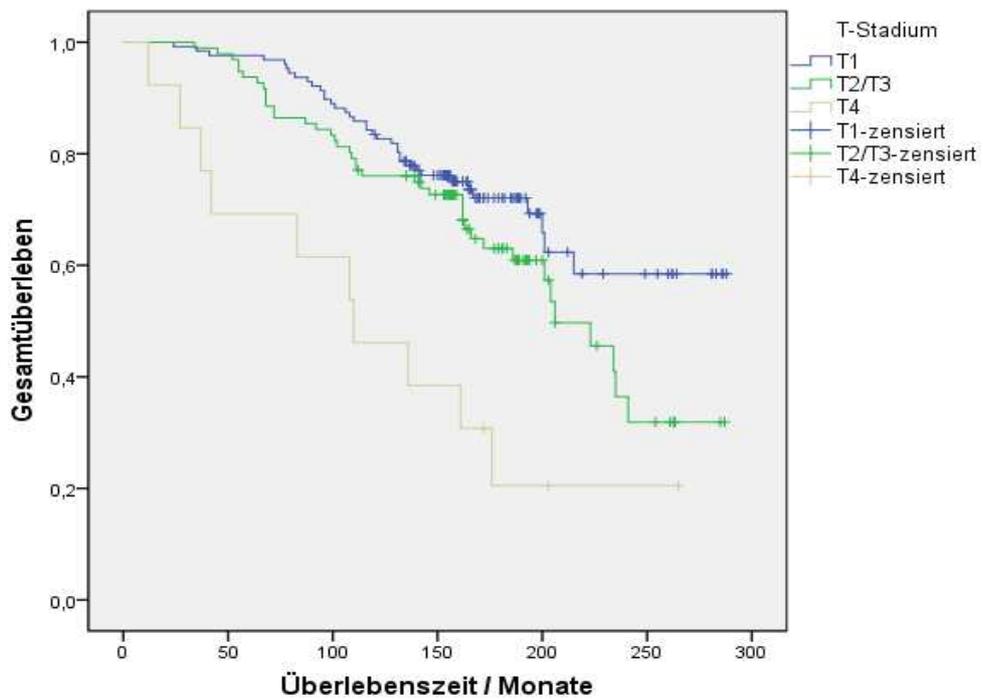
Im Folgenden soll die prognostische Relevanz einzelner klinisch-pathologischer Parameter für das Kollektiv dargestellt werden. Ein positiver Nodalstatus ( $p < 0,001$ ) sowie entdifferenzierte Tumore ( $p = 0,009$ ) erwiesen sich an dem hier vorliegenden Kollektiv signifikant als prognostisch ungünstiges Merkmal (Abb. 12; Abb. 13). Des Weiteren zeigten erwartungsgemäß fortgeschrittene Tumoren (pT2/3 und pT4) ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (Abb. 14).



**Abb. 12:** Einfluss des Nodalstatus auf das Gesamtüberleben; n=228 (Log-Rank-Test:  $p < 0,001$ )



**Abb. 13:** Einfluss des Gradings auf das Gesamtüberleben; n=237 (Log-Rank-Test: p=0,009)



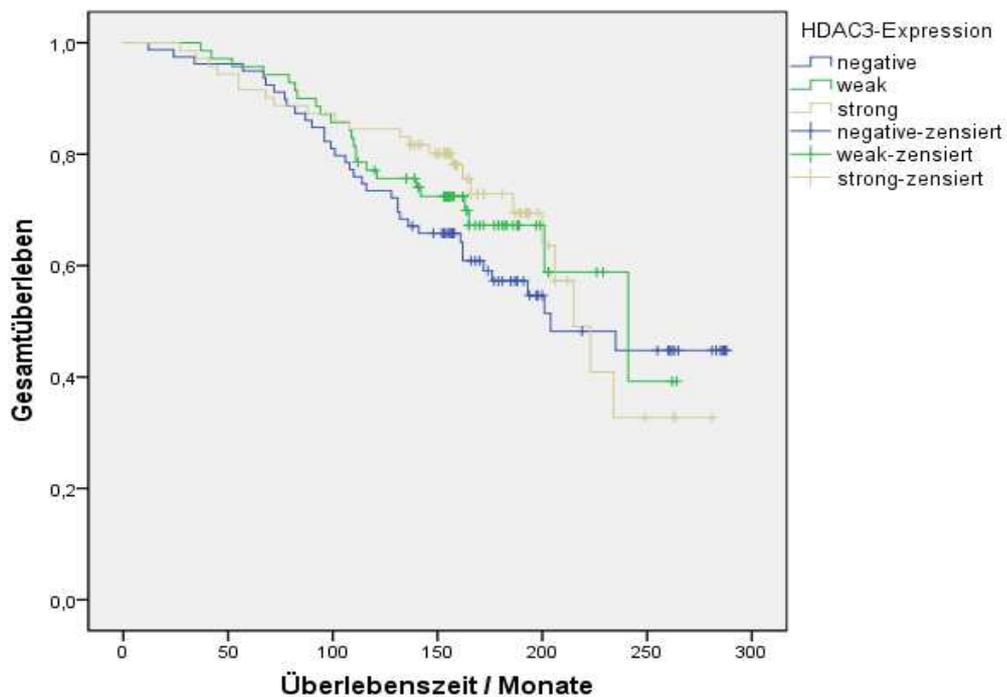
**Abb. 14:** Einfluss der Tumorgöße, angegeben im pT-Stadium auf das Gesamtüberleben; n=236 (Log-Rank-Test: p=0,009)

#### 4.4.2 Prognostische Relevanz der HDAC

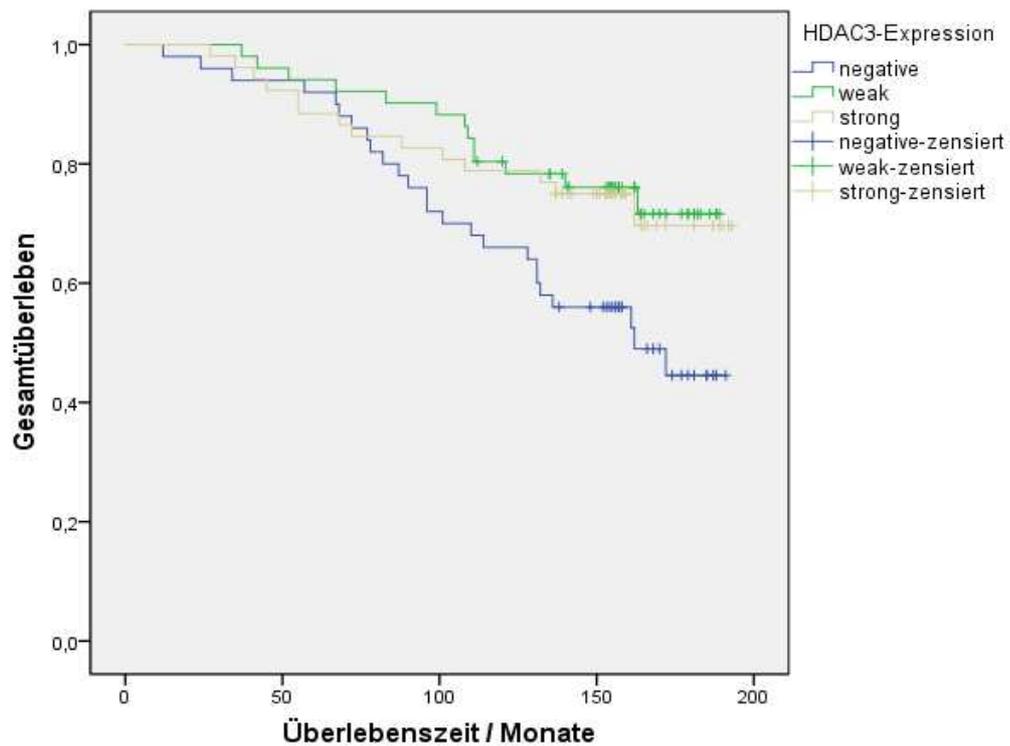
Für HDAC1 und HDAC2 zeigte sich keine prognostische Relevanz in der Überlebensanalyse.

Eine starke HDAC3-Expression korrelierte in der Gesamtkohorte nicht mit dem Gesamtüberleben (Abb. 15). Eine signifikante Korrelation ( $p=0,02$ ) konnte nur in der Subgruppe der Fälle von 1995-1999 ( $n=153$ ) erhoben werden. Die HDAC3-Expression zeigte sich hierbei als prognostisch günstiges Merkmal (Abb. 16).

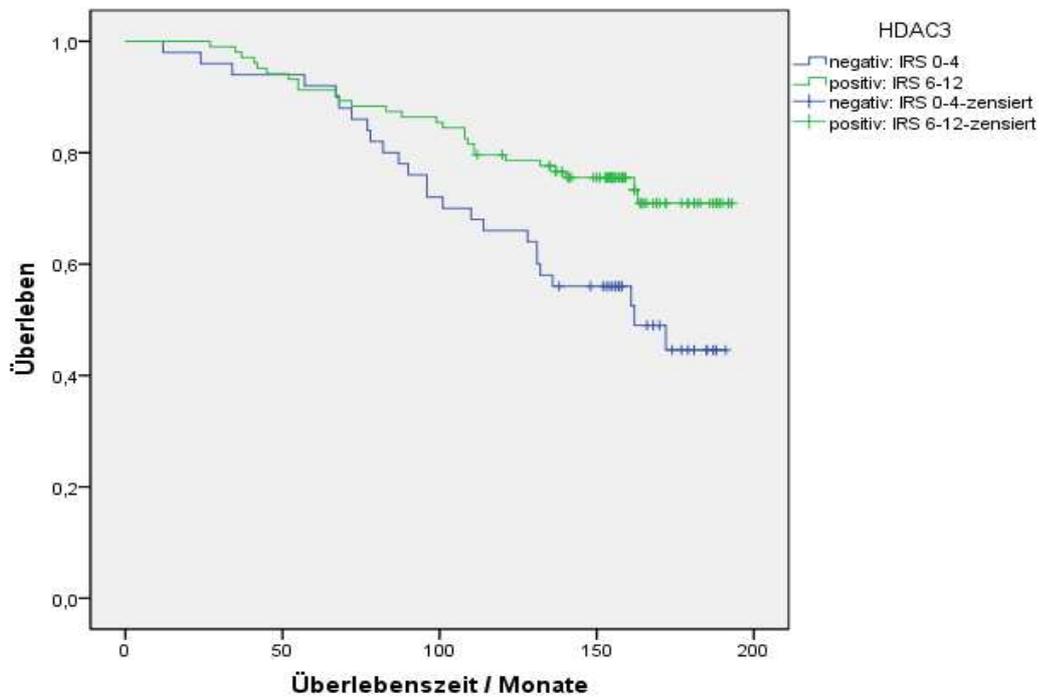
Der prognostisch günstige Einfluss der HDAC3-Expression verdeutlichte sich bei Zusammenfassung der Expressionsgruppen „stark“ und „schwach“ gegen die Gruppierung „negativ“ (Abb. 17).



**Abb. 15:** Einfluss der HDAC3-Expression im Gesamtkollektiv auf das Gesamtüberleben;  $n=220$  (Log-Rank-Test:  $p=0,53$ )



**Abb. 16:** Prognostisch günstiger Einfluss der HDAC3-Expression in der Subgruppe der Fälle von 1995-1999; n=153 (Log-Rank-Test: p=0,02)

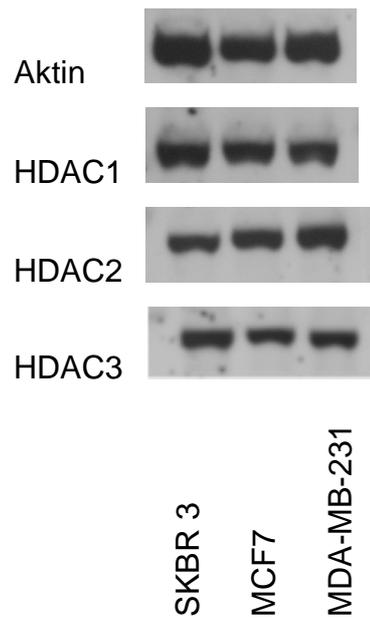


**Abb. 17:** Prognostisch günstiger Einfluss der HDAC3 Expression in der Subgruppe der Fälle von 1995-1999; Zusammenfassung der Subgruppen „schwach“ und „stark“; n=153 (Log-Rank-Test: p=0,006)

#### 4.5 Westernblot der Mammakarzinomzelllinien

Mittels Westernblot wurden ergänzend 3 Mammakarzinomzelllinien (SKBR 3, MCF 7, MDA-MB 231) auf eine HDAC-Expression untersucht.

Für HDAC1, HDAC2 und HDAC3 konnte in allen 3 Zelllinien eine deutliche Expression nachgewiesen werden. Aktin wurde hierbei als Positivkontrolle mitgeführt (Abb. 18).



**Abb. 18:** Nachweis der HDAC-Expression im Westernblot

## **5 Diskussion**

### **5.1 Histondeacetylasen und Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern**

In der vorliegenden Arbeit konnten signifikante Korrelationen zwischen den drei untersuchten Isoformen der Histondeacetylasen mit prognostisch und therapeutisch wichtigen Parametern des Mammakarzinoms beobachtet werden. Alle drei Isoformen korrelierten signifikant mit dem Hormonrezeptorstatus, HDAC2 und HDAC3 zusätzlich mit dem Grading. HDAC2 zeigte weitere signifikante Korrelationen mit dem Nodal- und dem HER2-Status.

#### **5.1.1 Histondeacetylasen und Hormonrezeptorstatus**

Eine starke HDAC2- und HDAC3-Expression konnte in den vorliegenden Ergebnissen mit einem negativen Hormonrezeptorstatus assoziiert werden. Im Kontrast dazu zeigten Hormonrezeptor-positive Tumore eher eine starke HDAC1-Expression.

Ebenso zeigten Krusche et al. in einer immunhistochemischen Untersuchung an 200 Proben invasiver Mammakarzinome die Korrelation der positiven HDAC1-Expression mit einem positiven Hormonrezeptorstatus (ER: n=111, 55,7% HDAC1-positiv; PR: n=79; 55,7% HDAC1-positiv). Die inverse Korrelation der HDAC3-Expression mit einem negativen Hormonrezeptorstatus konnte in diesem Kollektiv nicht nachgewiesen werden [58].

Nach den St. Gallen Kriterien gilt ein positiver Hormonrezeptorstatus im Mammakarzinom als positiver prognostischer Marker [11]. Die vermehrte HDAC2- und 3-Expression in Hormonrezeptor-negativen Tumoren ist somit gut mit der bisherigen Vorstellung vereinbar, dass eine starke HDAC-Expression mit invasiverem Wachstum bzw. vermehrter Metastasierung und schlechterer Prognose assoziiert ist [59].

Histondeacetylasen konnten auf verschiedenen Ebenen mit der Regulierung der Östrogenrezeptor (ER)-Expression in Verbindung gebracht werden.

HDAC1, 2 und 3 konnten auf ER- $\alpha$ -abhängigen Gen-Promotor Regionen nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich eine kontroverse Datenlage. Zhang et al. konnten eine vermehrte Expression der HDAC1-mRNA mit einem positiven Hormonrezeptorstatus assoziieren [60]. Auch unsere Daten zeigten auf Proteinebene die Korrelation eines positiven Hormonrezeptorstatus mit einer starken HDAC1-Expression. Eine qualitative

Aussage über die jeweilige Aktivität und das Zusammenspiel von ER- $\alpha$  und HDAC1 sowie einer eventuellen Beeinflussung des Signalwegs kann anhand unserer Analyse jedoch nicht gemacht werden.

Konträr dazu konnte HDAC1 auch mit der Suppression von ER und dessen Signalwegs assoziiert werden [61]. Im Zellversuch führte eine vermehrte HDAC1-Expression zu einer inhibierten ER- $\alpha$ -Transkription und sekundär zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellverbände [62].

Die HDAC2-Expression verhält sich in unseren Untersuchungen gegensätzlich zu HDAC1. Eine vermehrte Expression zeigte sich in Hormonrezeptor-negativen Tumoren, Hormonrezeptor-positive Tumoren hingegen exprimierten eher kein HDAC2.

Auf Proteinebene waren bislang keine Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem Hormonrezeptorstatus bekannt. Unterstützend zu unseren Ergebnissen konnte in Genexpressionsanalysen der Verlust von HDAC2 im Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinom festgestellt werden [63]. Demnach wäre eine HDAC2-Expression auf Proteinebene im Hormonrezeptor-negativen Karzinom theoretisch denkbar. In mehreren In-Vitro-Untersuchungen konnte ergänzend durch HDAC-Inhibition eine Reexpression des ER induziert werden. Yang et al. zeigten, dass ER-negative Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit Trichostatin A (TSA) ER-mRNA aufwiesen [64]. Konkordant hierzu konnte in den ER-negativen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 durch Behandlung mit Panbinostat sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine ER-Reexpression hervorgerufen werden [65]. Diesen Untersuchungen zufolge wäre es denkbar, dass die Expression des ER im Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom HDAC-induziert unterdrückt sein könnte.

Im Gegensatz dazu scheint die Expression des Östrogenrezeptors in ER-positiven Zelllinien durch HDAC-Inhibition reduziert zu werden. So konnte die ER- $\alpha$  Expression durch Gabe von HDACi auf mRNA- und Proteinebene unterdrückt werden [66, 67]. Eine isolierte HDAC2-Inhibition führte im Zellversuch zu einer verminderten Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren und verbesserte in Kombination mit einer antihormonellen Therapie den therapeutischen Effekt. Dies könnte auf die Funktion von HDAC2 als prädiktiver Marker für einen möglichen Therapieerfolg hinweisen [68].

Die HDAC-Inhibition scheint also abhängig vom Hormonrezeptorstatus in Kombination mit antihormonellen Therapien einen synergistischen Therapieeffekt zu erzielen, bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen über eine Limitierung und beim

Hormonrezeptor-negativen Karzinom über eine Reexpression der Hormonrezeptoren. Die wesentlichen Mechanismen der unterschiedlichen Funktionswege sind dabei noch unklar und sollten Thema weiterer Studien sein.

Die HDAC3-Expression und ihre Assoziation zum Hormonrezeptorstatus obliegen einer bisher kontroversen Datenlage. Konsistent zu unseren Ergebnissen scheint, Genexpressionsanalysen zufolge, HDAC3 im ER-positiven Karzinom unterexprimiert zu sein [69]. Hingegen konnten Krusche et al. eine vermehrte HDAC3-Expression in Hormonrezeptor-positiven Tumoren aufzeigen (ER: n=109, 55% HDAC3-positiv; PR: n=76, 59,2% HDAC3-positiv) [58]. Konkordant dazu zeigten Hedenfalk et al. in einer Genexpressionsanalyse die HDAC3-Überexpression im ER-positiven Mammakarzinom [70].

Das Zusammenspiel zwischen HDAC und Hormonrezeptorstatus könnte auch therapeutisch von Nutzen sein. In In-Vitro-Analysen konnte beobachtet werden, dass Tamoxifen-resistente Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 durch HDAC-Inhibition für Tamoxifen resensibilisiert wurden [71]. Ursächlich scheint hierbei die Inhibition der PAK1, ein Zellzyklusprotein zuständig für die Zellmorphologie und –motilität, sowie deren funktioneller Einfluss auf die ER-Expression zu sein.

Im ER-negativen Karzinom weisen erste Experimente auf eine HDACi-vermittelte Sensibilisierung für eine antihormonelle Therapie hin. Im Mausmodell und in der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 kam es durch eine Kombinationsbehandlung mit einem HDAC-Inhibitor und einem DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitor zur verstärkten ER-Expression. Durch die Behandlung mit Trichostatin A und 5-azadC (DNMT-Inhibitor) konnte die Proliferation maligner Zellen verringert werden. Eine zusätzliche Tamoxifengabe konnte das Tumorwachstum nochmals reduzieren [72]. Im Xenograft-Mausmodell kam es unter Entinostat und Letrozol zur Reduktion des Tumorwachstums und zu verringerter Metastasierung [73]. Auch unsere Daten geben Hinweise auf eine mögliche Supprimierung der ER-Expression durch die Überexpression von HDAC2 und 3. In weiteren, insbesondere prospektiven Studien sollte das Zusammenspiel der einzelnen HDAC-Isoenzyme und der Hormonrezeptoren genauer untersucht werden. Hierbei sollte die potenzielle Reexpression der Hormonrezeptoren durch HDACi besonders beachtet werden.

### **5.1.2 Histondeacetylasen und HER2-Status**

In unseren Untersuchungen war eine starke HDAC2-Expression mit einem positiven HER2- Status assoziiert.

25% aller Mammakarzinome weisen eine Überexpression des HER2-Rezeptors oder eine Amplifikation des HER2-Onkogens, welches zur Familie der epidermalen Rezeptoren der Wachstumsfaktoren gehört, auf [74]. Über den Phosphatidylinositol 3 Kinase- und den extrazellulären Ras-Raf Signal-regulierten Kinase-Transduktionsweg stimuliert HER2 die Zellproliferation und führt somit zu einem reduzierteren Gesamtüberleben [75]. Der Zusammenhang zwischen HDAC2-Expression und positivem HER2-Status reiht sich in die Korrelationen klinisch-pathologischer Parameter, die für einen aggressiveren Tumortyp stehen, ein.

In Mammakarzinomzelllinien kommt es durch die HDAC-Inhibition mit SAHA zu einem verstärkten Abbau von HER2 [76]. Hintergrund dafür ist unter anderem die Acetylierung des Heat-Shock Proteins 90 (HSP 90). Durch die Acetylierung verliert das HSP 90 seine Funktion als Chaperon und kann andere Proteine wie HER2 nicht mehr bei der Erhaltung der Sekundärstruktur unterstützen. Das funktionsunfähige HER2 wird über das Proteasom abgebaut.

Des Weiteren konnte durch In-Vitro-Experimente gezeigt werden, dass die Kombination aus HER2-Antikörper Trastuzumab und SAHA einen synergistisch, zytotoxischen Effekt aufweist. Ähnlich verhält sich die Kombination aus Chemotherapeutika vom Taxotere-Typ und SAHA [76]. Diese Effekte konnten auch durch den HDAC-Inhibitor LAQ824, ein SAHA-Analogon, erzielt werden [77]. Folglich wäre eine Resensibilisierung Trastuzumab- bzw. Taxotere-resistenter Tumore durch HDAC-Inhibitoren vorstellbar.

### **5.1.3 Histondeacetylasen und Grading / Nodalstatus**

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, konnten wir die HDAC-Expression eher mit klinisch-pathologischen Parametern assoziieren, die einen aggressiveren Tumortyp charakterisieren. HDAC2 und 3 waren ebenfalls stärker in entdifferenzierten Tumoren exprimiert, die HDAC2-Expression korrelierte zusätzlich mit einem positiven Nodalstatus.

In In-Vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine HDAC-Inhibition durch SAHA eine Differenzierung von Mammakarzinomzellen ermöglichte [78]. HDAC konnten auch in anderen Tumorentitäten mit klinisch-pathologischen Parametern

assoziiert werden, die für eine ausgeprägtere Malignität des Tumors stehen. Im Prostatakarzinom war die Expression von HDAC1 und 2, im Kolonkarzinom auch die Expression von HDAC3, mit entdifferenzierten Tumoren vereinbar [79, 80]. Eine Assoziation zwischen starker HDAC-Expression und nodulärer Metastasierung bestand auch im Magenkarzinom [81]. Die Expression von HDAC scheint also in mehreren Tumorentitäten mit Charakteristika, die auf einen aggressiveren Subtyp hinweisen, zusammenzuhängen. Zu klären bleibt weiterhin, welche der Isoformen dabei eine bedeutendere Rolle spielen. Diese Ergebnisse scheinen die Hypothese der durch HDAC-inhibierten Transkription von Tumorsuppressorgenen und die damit assoziierte Proliferation, Entdifferenzierung und Metastasierung der malignen Zellen zu bestätigen [33].

Konträr hierzu konnten Suzuki et al. in immunhistochemischen Untersuchungen bei Progression des Mammakarzinoms bzw. beim Übergang von DCIS zu IDC eine Verminderung der Expression von HDAC1, 2 und 6 beobachten [82]. Die fortschreitende Malignität war dennoch mit einer Hypoacetylierung des Histons H4 verbunden, wie man sie auch in Folge einer verstärkten HDAC-Wirkung erwarten würde. Hintergrund hierfür könnte eine verminderte Funktionsfähigkeit der HAT sein. Konkordant dazu war eine verstärkte HDAC6-Expression mit weniger aggressiven Tumoren (ER positiv, geringe Tumorgöße, G1) und mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert [83, 84]. Weitere Studien sind erforderlich um die genaue Rolle der einzelnen HDAC-Isoformen und des Gleichgewichts bzw. der Funktionsfähigkeit von HDAC und HAT zu klären.

## **5.2 HDAC2 in anderen malignen Tumoren**

In mehreren Tumorentitäten wurde der Funktion von HDAC2 eine besondere Rolle zugeschrieben. Im Magen-, Kolon- und Prostatakarzinom konnte HDAC2 als unabhängiger prognostischer Marker detektiert werden [79-81].

In unseren Ergebnissen im Mammakarzinom zeigte HDAC2 als einzige Isoform Korrelationen mit allen vier im Mammakarzinom relevanten klinisch-pathologischen Parametern auf. HDAC2 wies dabei durch die Assoziation mit Hormonrezeptor-negativen und entdifferenzierten Karzinomen bzw. Nodal- und HER2-positiven Tumoren auf einen biologisch aggressiveren Tumorsubtyp hin.

In mehreren Publikationen wird die Relevanz von HDAC2 als potentieller Biomarker bzw. prädiktiver Marker diskutiert. Ropero et al. konnten, im Vergleich zu Wildtyp-Zelllinien, in Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilität als einzige Mutation eine HDAC2-Rastermutation feststellen. Diese geht mit dem Verlust der HDAC2-Proteinexpression einher. Die Zelllinien mit fehlender HDAC2-Expression sprachen schlechter auf eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren an [85]. So wäre es theoretisch denkbar, Patienten durch Bestimmung der HDAC2-Expression für eine Therapie mit HDAC-Inhibitoren zu selektieren und HDAC2 gezielt als therapeutisches Target zu nutzen.

Wie bereits in Kapitel 5.1.1 erwähnt, konnte in Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinien durch eine gezielte HDAC2-Inhibition eine verminderte ER- und PR-Expression erreicht werden. Verglichen mit der standardisierten Hormontherapie zeigte die Kombination von HDAC2-Inhibition und antihormoneller Therapie im Zellversuch stärkere Effekte [68]. Auch hier könnte HDAC2 ein prädiktiver Marker und gezieltes therapeutisches Target für eine Kombinationstherapie sein.

## **5.3 HDAC in Überlebensanalysen**

Die Expression verschiedener HDAC-Isoformen erwies sich in unterschiedlichen malignen Entitäten als negativer prognostischer Marker. Im Magenkarzinom zeigten sich HDAC1 und 2, im Kolonkarzinom HDAC2 und im hepatozellulären Karzinom HDAC1 als unabhängige Marker für eine schlechtere Prognose [86]. Im Ovarialkarzinom konnte dies für die HDAC1-Expression im endometrioiden Subtyp gezeigt werden [87]. Für das Mammakarzinom ist die Datenlage bislang inkonsistent. Krusche et al. konnten eine positive HDAC1-Expression mit einem besseren

krankheitsfreien Überleben assoziieren [58]. Signifikante Resultate ergaben sich dabei jedoch nur für Subgruppen (kleine Tumorgroße, Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ). In der multivariaten Überlebensanalyse bestätigte sich die HDAC1-Expression als unabhängiger prognostischer Faktor für ein längeres rezidivfreies Überleben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Zhang et al. auf mRNA-Ebene, wobei die Expression von HDAC1-mRNA mit einem längeren rezidivfreien- und Gesamtüberleben assoziierbar war [62]. Konkordant dazu verhielt sich auch die Expression von HDAC6 im Mammakarzinom. HDAC6-positive Tumore waren auf mRNA- und Proteinebene sowohl mit einem längeren rezidivfreien- als auch mit einem besseren Gesamtüberleben vereinbar [83, 84].

In den hier vorliegenden Überlebensanalysen konnten in der Gesamtkohorte keine signifikanten Daten bezüglich der prognostischen Relevanz der HDAC-Expression erhoben werden. In der Subgruppe der Patientinnen, die in den Jahren 1995-1999 diagnostiziert wurden, zeigte sich die HDAC3-Expression als positiver prognostischer Marker.

Insgesamt erstrecken sich Diagnose und Therapie der Kohorte über einen sehr langen Zeitraum (1985-1999). Über diesen Zeitraum haben sich Therapiemöglichkeiten und Lebenserwartung von Patientinnen mit Mammakarzinom erheblich verbessert. Des Weiteren erhielten die Patientinnen sowohl Strahlen- und Hormontherapie als auch kombinierte Therapien, was das Gesamtüberleben sicherlich unterschiedlich beeinflusst hat. Für folgende Untersuchungen wäre es daher empfehlenswert, die Analysen an einem größeren Kollektiv mit eindeutig definierter Therapie zu validieren.

Unter Berücksichtigung anderer Arbeiten scheint eine HDAC-Expression im Mammakarzinom mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden zu sein. Diese Ergebnisse sind eher überraschend und lassen sich durch das aktuelle Verständnis der HDAC in der Karzinogenese nicht gänzlich erklären. Zusätzlich wiesen unsere Korrelationsanalysen, sowie auch die anderer Autoren, eher auf die Assoziation von HDAC mit einem maligneren Tumortyp hin. Andererseits ist bekannt, dass HDAC in Multiproteinkomplexen funktionieren [37, 88]. Proteine wie Sin3, NuRD und Co-REST sind hierbei für die Bindung des Multikomplexes an die DNA zuständig. Die HDAC-Aktivität scheint also von mehreren Faktoren abhängig zu sein. Die Zusammensetzung des Multikomplexes spielt hierbei eine wichtige Rolle. Meehan et al. konnten eine Assoziation zwischen dem „Breast Cancer Metastasis Suppressor 1“ (BMRS1) und HDAC im Multikomplex nachweisen [89]. Erste Ergebnisse gaben Hinweise auf eine

Suppression von Metastasen über die HDAC-bedingte Aktivierung von BMRS 1, was für einen günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben spricht.

#### **5.4 Limitierungen der Arbeit**

Der folgende Abschnitt soll die durch Material und Methodik bedingten Einschränkungen dieser Arbeit diskutieren. Die hier vorliegenden Ergebnisse wurden retrospektiv erhoben, was mit einem erhöhten Risiko einhergeht falsche Kausalzusammenhänge zu schließen. Bezüglich des Grading, des Hormonrezeptor- sowie HER2-Status erfolgte eine Reevaluation der Tumorproben. Nodalstatus und Tumorgröße mussten jedoch vollständig aus den Patientenakten übernommen werden. Außerdem schließt die Studie Patientinnen eines sehr großen Zeitintervalls (1985-1999) mit ein. Innerhalb dieser Jahre haben sich die Therapiemöglichkeiten und somit die Prognose von Patientinnen mit Mammakarzinom verändert. Somit konnten hinsichtlich der prognostischen Relevanz der HDAC-Expression nur in der Subgruppe der Patientinnen der Jahre 1995-1999 signifikante Resultate erzielt werden. Es ist anzunehmen, dass Therapieregime und allgemeine Prognose dieser Subgruppe im Vergleich zur Gesamtkohorte konformer sind. Jedoch lässt sich bei der relativ geringen Fallzahl dieser Subgruppe (n=153) keine fundierte Aussage treffen.

Durch die Verwendung eines TMAs (Tissue-Micro-Array) zur immunhistochemischen Untersuchung kann im Vergleich zur konventionellen Methode bei geringerem Material- und Arbeitsaufwand eine größere Anzahl von Tumorproben simultan gefärbt werden. Aussagen zur Heterogenität des untersuchten Markers innerhalb des Tumors sind hierbei jedoch nur eingeschränkt möglich.

## 5.5 Therapeutischer Ausblick

### 5.5.1 HDAC als therapeutisches Target

HDAC könnten in Zukunft im klinischen Alltag sowohl therapeutisch als auch prognostisch eine wichtige Rolle spielen.

HDAC-Inhibitoren (HDACi) haben bereits seit längerer Zeit eine therapeutische Bedeutung. Im Jahr 2006 wurde der HDACi Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) von der Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen [42, 90]. Der für HDAC1 und 2 selektive HDACi Romidepsin folgte im Jahr 2009, ebenfalls für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms [43]. In der hämatologischen Onkologie führte eine Behandlung mit HDACi zu deutlichen therapeutischen Erfolgen. In soliden Tumoren hingegen scheint eine HDACi-Monotherapie aktuell nicht sehr vielversprechend zu sein.

Die Wirksamkeit von HDACi wird momentan in verschiedenen Tumorentitäten in klinischen Studien unterschiedlicher Phasen getestet. Die Untersuchung von Vorinostat (SAHA) in Phase I-Studien konnte erfolgreich abgeschlossen werden. In Phase II-Studien jedoch zeigte Vorinostat im nicht-kleinzelligen Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom nur eine geringe antiproliferative Wirksamkeit [91]. Eine weitere Studie bestätigte die Ergebnisse im metastasierten Mammakarzinom. Die orale Gabe von Vorinostat (200 mg/Tag; 3 Wochen-Zyklus) führte nach den Kriterien der Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) bei 4 von 14 Patientinnen zur Stabilisierung der Erkrankung. Partielle oder komplette Remissionen wurden nicht erreicht [92].

Ähnlich verhielten sich Studien zu anderen HDACi. Für den selektiven HDACi Romidepsin, der in hämatologischen Erkrankungen gute Ergebnisse zeigte, konnten in soliden Tumoren keine Behandlungserfolge erzielt werden. Im Prostatakarzinom beispielsweise konnte nur bei 2 von 25 Patienten eine partielle Remission nach RECIST beobachtet werden [93]. Auch in anderen Karzinomen wie dem Lungen-, Kolon- und Nierenzellkarzinom konnten keine therapeutischen Erfolge durch die Behandlung mit Romidepsin erzielt werden [94-96]. Der HDACi Entinostat, ein synthetisches Benzamid-Derivat, zeigte konkordant dazu geringe antiproliferative Wirksamkeit in klinischen Phase I-Studien [97].

In Kombinationstherapien zeichnen sich jedoch erste Erfolge ab. In mehreren soliden Tumoren erwies sich die Kombination aus HDACi und Zytostatikum als wirksam. Eine Übersicht hierzu zeigt Tabelle 10.

Patienten mit Prostatakarzinom wurden in einer Phase I-Studie mit Panbinostat (n=8) oder mit Panbinostat und Docetaxel (n=8) behandelt. In der Patientengruppe mit der Kombinationstherapie kam es zu einer Reduktion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA). Außerdem zeigten zwei der acht Patienten eine partielle Remission [98].

Insbesondere bei Patienten mit Lungenkarzinom konnte die Kombination aus einer Platin-basierten Chemotherapie mit HDACi therapeutische Erfolge erzielen. In einer Phase I-Studie (n=19) zur Kombinationstherapie mit Vorinostat-Carboplatin-Paclitaxel zeigten zehn Patienten eine partielle Remission [99]. Diese Ergebnisse bestätigten sich in einer Placebo-kontrollierten Phase II-Studie [100].

Für die Therapie des Mammakarzinoms konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Im Jahr 2006 hatten Arce et al. erste Erfolge mit einer Kombinationstherapie aus dem HDACi Valproat, dem DNMT-Inhibitor Hydralazin und den Zytostatika Doxorubicin und Cyclophosphamid [101]. Nach der neoadjuvanten Kombinationstherapie erreichten 31,2% der Patientinnen eine Komplettremission. 81% der Patientinnen sprachen insgesamt auf die Therapie an. In einer Studie mit alleiniger Zytostatikabehandlung erreichten hingegen nur 7% der Patientinnen eine Komplettremission und 45% eine partielle Remission [102].

Munster et al. zeigten 2009 in einer Phase I-Studie die Wirksamkeit der Kombination von Doxorubicin und dem HDACi Vorinostat in der Therapie des Prostatakarzinoms, malignen Melanoms und im Mammakarzinoms [103]. Für das Mammakarzinom konnten die Ergebnisse in einer Phase II-Studie bestätigt werden. Dabei sprachen 9 von 14 Patientinnen auf die Kombinationstherapie aus Valproat und Epirubicin an. Bei 7% der Patientinnen kam es zu einer kompletten und bei 57% zu einer partiellen Remission [104]. Interessant scheint dies auch vor dem Hintergrund der Hypothese, dass eine Zytostatika-Resistenz durch epigenetische Mechanismen erklärbar ist. Demnach könnten Zytostatika-resistente Tumore durch HDACi für eine Chemotherapie sensibilisiert werden [105]. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, dass eine diagnostische HDAC-Bestimmung Hinweise auf den Erfolg einer Chemotherapie bzw. Kombinationstherapie aus HDACi und Zytostatika geben könnte. Weitere prospektive Studien sind notwendig, um diese bislang vielversprechenden Ergebnisse zu verifizieren.

**Tabelle 10:** Übersicht aktueller Therapiekombinationen mit HDACi verschiedener Tumorentitäten; NSCL: Non small cell lung cancer, MDS: Myelodysplastisches Syndrom, AML: Akute myeloische Leukämie, ATRA: all-trans-retinoic acid; modifiziert nach Thurn et al. [106]

HDACi	Tumortyp	Kombination
<b>Vorinostat</b>	Mammakarzinom	Paclitaxel/Trastuzumab/Doxorubicin/ Cyclophosphamid; Carboplatin/Nabpaclitaxel; Bevacizumab/Paclitaxel; Capecitabin; Lapatinib
	NSCLC	Gefitinib; Paclitaxel/Radiatio
	Pankreaskarzinom	Fluorouracil/Radiatio
	Ovarialkarzinom	Carboplatin/Paclitaxel
	Kolonkarzinom	Fluorouracil/Leucovorin
	Nierenzellkarzinom	Carboplatin/Isotretinoin
	Lymphom	Doxorubicin
	T-Zell Lymphom	Cyclophosphamid/Vincristin/Doxorubicin Prednisolon
	B-Zell Lymphom	Rituximab/Cyclophosphamid/Etoposid/ Prednisolon
<b>Panobinostat</b>	Mammakarzinom	Trastuzumab; Letrozol
	Prostatakarzinom	Bicalutamid
	Nierenzellkarzinom	Everolimus
	Melanom	Decitabin/Temozolomid
	Multiples Myelom und Lymphome	Everolimus
<b>Valproat</b>	Mammakarzinom	5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamid
	Gliom	Temozolomid/Radiatio; Bevacizumab/Radiatio
	Ovarialkarzinom	Azacitadin/Carboplatin; Hydralazin
	Zervixkarzinom	Hydralazin
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Adriamycin/Cyclophosphamid/Vindesin
	Mesotheliom	Doxorubicin
	Sarkom	Bevacizumab/Gemcitabin/Docetaxel
	MDS	Azacitadin/ATRA
	MDS/AML	Decitabin/ Azacitadin /ATRA
	AML	Decitabin/ATRA
<b>Belinostat</b>	NSCLC	Carboplatin/Paclitaxel/Bevacizumab; Erlotinib
	Ovarialkarzinom	Carboplatin
	Weichteilsarkom	Doxorubicin
<b>Entinostat</b>	NSCLC	Azacitadin
	Kolonkarzinom	Azacitadin

Wie in Kapitel 5.1.1 bereits dargelegt, scheint eine Behandlung mit HDACi in vitro wie auch in vivo die Wirkung der antihormonellen Therapie (HT) zu potenzieren [71]. Darauf basierend wurden erste klinische Studien entworfen und durchgeführt, deren jeweiliges Design und Ergebnis Tabelle 11 zu entnehmen ist.

Allgemein zeigen sich erste Erfolge der Kombinationstherapien aus HDACi und HT. In der Studie von Munster et al. zeigte sich bei einer Kombination aus Vorinostat und Tamoxifen im metastasierten Mammakarzinom eine objektive Ansprechrage von 19% [107]. Eine alleinige Therapie mit Tamoxifen im metastasierten Mammakarzinom erzielte hingegen eine Ansprechrage unter 10%. Auch die Monotherapie mit Vorinostat war im Mammakarzinom dieses Stadiums weitestgehend erfolglos [92]. Weitere klinische Studien könnten hinsichtlich Dosis und geeigneter Kombination der einzelnen Wirkstoffe aufschlussreich sein. In-Vitro-Experimente gaben, wie bereits in Kapitel 5.1.1 erwähnt, Hinweise auf eine mögliche Resensibilisierung des ER durch HDACi [72]. Vor diesem Hintergrund erscheint die Studien von Tan et al. (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) besonders interessant. Hierbei soll geklärt werden, ob TNBC oder Hormonrezeptor-negative Karzinome durch HDACi für eine antihormonelle Therapie resensibilisiert werden könnten.

Erste Ergebnisse einer Phase I-Studie zur Kombination aus dem HDACi Panbinostat und Trastuzumab zeigten eine gute Verträglichkeit und Hinweise auf eine mögliche therapeutische Wirksamkeit [108].

**Tabelle 11:** Überblick der klinischen Studien zur Kombinationstherapie von HDACi und HT im Mammakarzinom. OR: Objective Response; SD: stable Disease; CB: Clinical benefit; HT: Hormontherapie, SABCS: San Antonio Breast Cancer Symposium. Modifiziert nach Linares et al. [69]

HDACi	HT	Phase	Kollektiv	Ergebnisse	Referenz
Vorinostat	Tamoxifen	II	HT-resistent; HR+	43 Patientinnen 19% OR 40% SD	Munster et al. 2011 [107]
Entinostat	Aromatase- Inhibitor	II	HT-resistent; HR+	10 Patientinnen CB > 6 Monate (1 Fall) CB > 5 Monate (2 Fälle)	Yardley et al. Poster SABCS 2009 NCI Clinical Trial NCT00676663
Vorinostat	Aromatase- Inhibitor	II	HT-resistent	noch nicht bekannt	Linden et al. NCI Clinical Trial NCT01153672
Panobinostat	Aromatase- Inhibitor	I-II	HR-/+ (Phase I) TNBC (Phase II)	noch nicht bekannt	Tan et al. NCI Clinical Trial NCT01105312
Vorinostat	Tamoxifen	II	Stadium I-III (Therapie 2 Wochen bevor OP)	noch nicht bekannt	Stearns et al. NCI Clinical Trial NCT01194427

### 5.5.2 HDAC als Biomarker

Die HDAC-Isoenzyme werden aktuell auch als potentielle Biomarker im Mammakarzinom diskutiert. Bislang wurde dabei hauptsächlich die Rolle von HDAC1 im Hormonrezeptor-positiven Karzinom und der Einfluss von HDAC6 auf das Gesamtüberleben nach antihormoneller Therapie berücksichtigt [84]. Wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, konnte in In-Vitro-Experimente unter Einsatz unterschiedlicher Zelllinien HDAC2 als möglicher Biomarker identifiziert werden. In einer weiteren Arbeit von Marchion et al. wurden die Isoenzyme HDAC1, 2 und 6 in Mammakarzinomzelllinien mittels Einsatz von siRNA (small interfering RNA) untersucht. Es zeigte sich, dass nur der siRNA-induzierte Knock Down von HDAC2 eine supprimierte Expression der für die Chromatinstruktur relevanten Gene sowie Hyperacetylierung von Histonen und anderer Proteine zur Folge hatte. Außerdem reagierten die Zellen nach HDAC2-Knock Down sensibler auf eine Zytostatikabehandlung mit Epirubicin [109].

Auch in ersten klinischen Studien konnte die potentielle Funktion von HDAC2 als therapeutisches Target und Biomarker dargelegt werden. In einer Phase I-Studie zur Wirksamkeit der Kombination aus Doxorubicin und Vorinostat in soliden Tumoren wurde die HDAC2-Expression vor Therapiebeginn bestimmt. Es zeigte sich, dass HDAC2-exprimierende Tumore einen deutlich verstärkt acetylierten Zellstatus nach Therapie aufwiesen [103]. Diese Ergebnisse konnten durch eine Phase II-Studie der gleichen Arbeitsgruppe unterstützt werden, wobei sich HDAC2 weiterhin als gezieltes therapeutisches Target und eventueller Biomarker für eine Kombinationstherapie aus HDACi und Zytostatikum erwies [104].

Ähnlich verhielt sich HDAC2 auch in der Studie von Munster et al. zur Wirksamkeit der Kombination aus Tamoxifen und Vorinostat. Die HDAC2-Expression war auch hierbei mit besserem Ansprechen auf die Therapie sowie mit konsekutiv verstärktem Acetylierungsstatus der Tumorzellen und assoziiert [107].

HDAC2 könnte im Mammakarzinom als selektives therapeutisches Target und Biomarker von Bedeutung sein. Durch prätherapeutische Bestimmung der HDAC2-Expression könnten Patientinnen, die wahrscheinlich eher von einer Kombinationstherapie mit HDACi profitieren, selektiert werden. Durch Anwendung selektiver HDAC2-Inhibitoren könnten die durch pan-HDACi verursachten Nebenwirkungen minimiert werden.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

- 1 Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, et al. Krebs in Deutschland 2007/2008. 2012; 8. Ausgabe: 64-7.
- 2 McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000; 321(7261): 624-8.
- 3 Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B, Wolf U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2010: 77-83.
- 4 Meindl A. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer*. 2002; 97(4): 472-80.
- 5 Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2010; 42(5): 410-4.
- 6 Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 2008; 4. Ausgabe: 1011-9.
- 7 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(19): 10869-74.
- 8 Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(18): 10393-8.
- 9 Naume B ST. Molecular profiling of early breast cancer in relation to detection of micrometastases. *Breast Cancer Res*. 2005; 7: 35.
- 10 Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992; 22(3): 207-19.
- 11 Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011; 22(8): 1736-47.
- 12 van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415(6871): 530-6.

- 13 Gianni L, Dafni U, Gelber RD, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011; 12(3): 236-44.
- 14 Millar EK, Graham PH, McNeil CM, et al. Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br J Cancer.* 2011; 105: 272-80.
- 15 Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(12): 913-20.
- 16 Harbeck N, Kates RE, Look MP, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res.* 2002; 62(16): 4617-22.
- 17 Mook S, Van't Veer LJ, Rutgers EJ, Piccart-Gebhart MJ, Cardoso F. Individualization of therapy using Mammaprint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007; 4(3): 147-55.
- 18 Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004; 164(1): 35-42.
- 19 Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(23): 3726-34.
- 20 Filipits M, Rudas M, Jakesz R, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(18): 6012-20.
- 21 Kreienberg R, Albert U, Follmann M, Koop I. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2012; 3. Auflage: 66-186.
- 22 Untch M, von Minckwitz G. Recent advances in systemic therapy: advances in neoadjuvant (primary) systemic therapy with cytotoxic agents. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(2): 203.
- 23 Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012; 9(1): 16-32.

- 24 Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 1996; 272(5260): 408-11.
- 25 Allfrey VG, Mirsky AE. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science*. 1964; 144(3618): 559.
- 26 Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(25): 14503-8.
- 27 de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003; 370(Pt 3): 737-49.
- 28 Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 417-35.
- 29 Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res*. 2001; 262(2): 75-83.
- 30 Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*. 2003; 19(5): 286-93.
- 31 Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*. 2002; 277(28): 25748-55.
- 32 Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000; 403(6765): 41-5.
- 33 Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3): 194-202.
- 34 Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007; 26(37): 5420-32.
- 35 Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005; 363: 15-23.
- 36 Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*. 2011; 3(2): 166-79.
- 37 Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*. 2009; 107(4): 600-8.
- 38 Wolffe AP, Urnov FD, Guschin D. Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem Soc Trans*. 2000; 28(4): 379-86.

- 39 Murphy M, Ahn J, Walker KK, et al. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 1999; 13(19): 2490-501.
- 40 Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol.* 2000; 184(1): 1-16.
- 41 Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review). *Int J Oncol.* 2008; 33(4): 637-46.
- 42 Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist.* 2007; 12(10): 1247-52.
- 43 Campas-Moya C. Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs Today (Barc).* 2009; 45(11): 787-95.
- 44 Mund C, Lyko F. Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges. *Bioessays.* 2010; 32(11): 949-57.
- 45 Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 1990; 265(28): 17174-9.
- 46 Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(6): 2069-83.
- 47 Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, et al. P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer.* 2000; 83(6): 817-25.
- 48 Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006; 13(1): 129-40.
- 49 Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(44): 16090-5.
- 50 Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002; 111(5): 709-20.
- 51 Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene.* 2002; 21(3): 427-36.

- 52 Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2005; 280(29): 26729-34.
- 53 Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25(21): 3109-15.
- 54 Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(1): 38-51.
- 55 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991; 19(5): 403-10.
- 56 Wittekind C MH. TNM Klassifikation maligner Tumoren. 2010; 7. Auflage: 169-81.
- 57 Remmele W SH. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987; 8: 138-40.
- 58 Krusche CA, Wulfing P, Kersting C, et al. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 90(1): 15-23.
- 59 Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(1): 37-50.
- 60 Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 94(1): 11-6.
- 61 Metivier R, Penot G, Hubner MR, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* 2003; 115(6): 751-63.
- 62 Kawai H, Li H, Avraham S, Jiang S, Avraham HK. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer.* 2003; 107(3): 353-8.
- 63 Hu X, Stern HM, Ge L, et al. Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res.* 2009; 7(4): 511-22.

- 64 Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, et al. Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.* 2000; 60(24): 6890-4.
- 65 Zhou Q, Atadja P, Davidson NE. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(1): 64-9.
- 66 deFazio A, Chiew YE, Donoghue C, Lee CS, Sutherland RL. Effect of sodium butyrate on estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines. *J Biol Chem.* 1992; 267(25): 18008-12.
- 67 Reid G, Metivier R, Lin CY, et al. Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene.* 2005; 24(31): 4894-907.
- 68 Bicaku E, Marchion DC, Schmitt ML, Munster PN. Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling. *Cancer Res.* 2008; 68(5): 1513-9.
- 69 Linares A, Dalenc F, Balaguer P, Boulle N, Cavailles V. Manipulating protein acetylation in breast cancer: a promising approach in combination with hormonal therapies? *J Biomed Biotechnol.* 2011; doi:10.1155/2011/856985.
- 70 Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344(8): 539-48.
- 71 Hirokawa Y, Arnold M, Nakajima H, Zalberg J, Maruta H. Signal therapy of breast cancers by the HDAC inhibitor FK228 that blocks the activation of PAK1 and abrogates the tamoxifen-resistance. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4(9): 956-60.
- 72 Fan J, Yin WJ, Lu JS, et al. ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134(8): 883-90.
- 73 Sabnis GJ, Goloubeva O, Chumsri S, Nguyen N, Sukumar S, Brodie AM. Functional activation of the estrogen receptor-alpha and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res.* 2011; 71(5): 1893-903.
- 74 Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989; 244(4905): 707-12.

- 75 Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000; 19(53): 6102-14.
- 76 Bali P, Pranpat M, Swaby R, et al. Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(17): 6382-9.
- 77 Fuino L, Bali P, Wittmann S, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Mol Cancer Ther*. 2003; 2(10): 971-84.
- 78 Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001; 61(23): 8492-7.
- 79 Weichert W, Roske A, Niesporek S, et al. 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(6): 1669-77.
- 80 Weichert W, Roske A, Gekeler V, et al. 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(3): 604-10.
- 81 Weichert W, Roske A, Gekeler V, et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2008; 9(2): 139-48.
- 82 Suzuki J, Chen YY, Scott GK, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(9): 3163-71.
- 83 Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(20): 6962-8.
- 84 Saji S, Kawakami M, Hayashi S, et al. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. 2005; 24(28): 4531-9.
- 85 Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, et al. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet*. 2006; 38(5): 566-9.
- 86 Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*. 2009; 280(2): 168-76.

- 87 Weichert W, Denkert C, Noske A, et al. Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia*. 2008; 10(9): 1021-7.
- 88 Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, Seigneurin-Berny D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*. 2001; 11(2): 162-6.
- 89 Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem*. 2004; 279(2): 1562-9.
- 90 Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007; 109(1): 31-9.
- 91 Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, et al. Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2008; 26(5): 483-8.
- 92 Luu TH, Morgan RJ, Leong L, et al. A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(21): 7138-42.
- 93 Molife LR, Attard G, Fong PC, et al. Phase II, two-stage, single-arm trial of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) romidepsin in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Ann Oncol*. 2010; 21(1): 109-13.
- 94 Whitehead RP, Rankin C, Hoff PM, et al. Phase II trial of romidepsin (NSC-630176) in previously treated colorectal cancer patients with advanced disease: a Southwest Oncology Group study (S0336). *Invest New Drugs*. 2009; 27(5): 469-75.
- 95 Schrupp DS, Fischette MR, Nguyen DM, et al. Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(1): 188-98.
- 96 Stadler WM, Margolin K, Ferber S, McCulloch W, Thompson JA. A phase II study of depsipeptide in refractory metastatic renal cell cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2006; 5(1): 57-60.
- 97 Gore L, Rothenberg ML, O'Bryant CL, et al. A phase I and pharmacokinetic study of the oral histone deacetylase inhibitor, MS-275, in patients with refractory solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(14): 4517-25.

- 98 Rathkopf D, Wong BY, Ross RW, et al. A phase I study of oral panobinostat alone and in combination with docetaxel in patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66(1): 181-9.
- 99 Ramalingam SS, Parise RA, Ramanathan RK, et al. Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(12): 3605-10.
- 100 Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, et al. Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(1): 56-62.
- 101 Arce C, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, et al. A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PLoS One*. 2006; 1: e98.
- 102 Fernandez-Sanchez M, Gamboa-Dominguez A, Uribe N, et al. Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Med Oncol*. 2006; 23(2): 171-83.
- 103 Munster PN, Marchion D, Thomas S, et al. Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. *Br J Cancer*. 2009; 101(7): 1044-50.
- 104 Munster P, Marchion D, Bicaku E, et al. Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(7): 2488-96.
- 105 Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A. Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? *Mol Cancer*. 2006; 5: 27.
- 106 Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol*. 2011; 7(2): 263-83.
- 107 Munster PN, Thurn KT, Thomas S, et al. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer*. 2011; 104: 1828-1835
- 108 Conte P, Campone M, Pronzato P, et al. Phase I trial of panobinostat (LBH589) in combination with trastuzumab in pretreated HER2-positive metastatic breast cancer (mBC): Preliminary safety and tolerability results. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1081

109 Marchion DC, Bicaku E, Turner JG, Schmitt ML, Morelli DR, Munster PN. HDAC2 regulates chromatin plasticity and enhances DNA vulnerability. Mol Cancer Ther. 2009; 8(4): 794-801

## 6.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms nach aktuellen St. Gallen Kriterien 2011 .....	10
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über nicht-Histon Proteine und deren Verhalten im deacetylierten Zustand .....	16
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der wichtigsten Vertreter der HDACi .....	18
<b>Tabelle 4:</b> Charakteristik der pathologischen Parameter des Kollektivs .....	23
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht des Immunoreaktiven Scores.....	31
<b>Tabelle 6:</b> Verteilung der HDAC-Expression im Kollektiv.....	35
<b>Tabelle 7:</b> HDAC1-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern .....	39
<b>Tabelle 8:</b> HDAC2-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern .....	43
<b>Tabelle 9:</b> HDAC3-Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern .....	46
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht aktueller Therapiekombinationen mit HDACi verschiedener Tumorentitäten .....	62
<b>Tabelle 11:</b> Überblick der klinischen Studien zur Kombinationstherapie von HDACi und HT im Mammakarzinom .....	64

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Zusammenspiel von HDAC und HAT .....	14
<b>Abb. 2:</b> Starke und negative HDAC1-Expression im Mammakarzinom .....	36
<b>Abb. 3:</b> Starke und negative HDAC2-Expression im Mammakarzinom .....	36
<b>Abb. 4:</b> Starke und negative HDAC3-Expression im Mammakarzinom .....	37
<b>Abb. 5:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC1-Expression mit dem positiven Hormonrezeptorstatus .....	38
<b>Abb. 6:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit entdifferenzierten Tumoren (G3) .....	41
<b>Abb. 7:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem negativen Hormonrezeptorstatus .....	41
<b>Abb. 8:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem positiven HER2- Status .....	42
<b>Abb. 9:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC2-Expression mit dem positiven Nodalstatus .....	42
<b>Abb. 10:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC3-Expression mit entdifferenzierten Tumoren (G3) .....	44
<b>Abb. 11:</b> Signifikante Korrelationen der HDAC3-Expression mit dem negativen Hormonrezeptorstatus .....	45
<b>Abb. 12:</b> Einfluss des Nodalstatus auf das Gesamtüberleben .....	47
<b>Abb. 13:</b> Einfluss des Gradings auf das Gesamtüberleben .....	48
<b>Abb. 14:</b> Einfluss der TumorgroÙe, angegeben im pT-Stadium auf das Gesamtüberleben .....	48
<b>Abb. 15:</b> Einfluss der HDAC3-Expression im Gesamtkollektiv auf das Gesamtüberleben .....	49
<b>Abb. 16:</b> Prognostisch günstiger Einfluss der HDAC3-Expression in der Subgruppe der Fälle von 1995-1999 .....	50
<b>Abb. 17:</b> Prognostisch günstiger Einfluss der HDAC3 Expression in der Subgruppe der Fälle von 1995-1999 .....	50
<b>Abb. 18:</b> Nachweis der HDAC-Expression im Westernblot .....	51

## **7 Anhang**

### **7.1 Eigene Kongressbeiträge**

#### **7.1.1 Poster und Vortrag**

Histondeacetylasen im Mammakarzinom; Jana L, Kasajima A, Müller BM, Winzer KJ, Lehmann A, Dietel M, Weichert W, Denkert C

Posterpreis der 31. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Senologie, Juni 2011, Dresden

#### **7.2 Originalarbeit**

Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression; Müller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, Winzer KJ, Dietel M, Weichert W, Denkert C.

BMC Cancer 2013

### 7.3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lisa Jana, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Expression der Histondeacetylasen 1, 2 und 3 im Mammakarzinom selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum: 17.12.2012

Unterschrift

#### **7.4 Curriculum Vitae**

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

## **7.5 Danksagung**

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carsten Denkert möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie die herzliche Betreuung und Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken. Weiterhin gilt besonderer Dank meiner Betreuerin Dr. med. Berit Müller, mit der ich sehr gerne zusammen gearbeitet habe, die stets für anfallende Schwierigkeiten ansprechbar war und mir auch während der Vorbereitung der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Senologie zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für interessante Anregungen und Diskussionen sowie insbesondere bei Ines Koch und Petra Wachs für die Hilfe beim Erlernen der praktischen Fähigkeiten im Labor bedanken.

Für die fortwährende Unterstützung und Motivation bis zur Fertigstellung dieser Arbeit gilt großer Dank meinen Freunden und meiner Familie.