

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

DISSERTATION

**ING1 ist in die durch TSA induzierte Apoptose
und in den FADD/Caspase-3-Signalweg
in humanen Glioblastomzellen involviert.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin
von
Mona Tamannai
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling
2. Prof. Dr. Chr. Mawrin
3. Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer

Datum der Promotion: 14.12.2007

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Prognose für Patienten mit einem Glioblastoma multiforme (GBM) ist nach wie vor schlecht. Inhibitoren der Histondeacetylasen (HDACi) wie Trichostatin A (TSA) stellen hoffnungserweckende Alternativen zur konventionellen Therapie dar. Die fehlenden Funktionen von Tumorsuppressoren beispielsweise durch Mutationen von *TP53* oder Deletionen von *CDKN2A* sind charakteristisch für GBM und können zu Resistenzen führen. Wir haben kürzlich berichtet, dass die Expression des Typ II Tumorsuppressor *ING1* in Gliomen vermindert ist.

Fragestellung: Um der Frage nachzugehen, ob die ING1-Proteine in die durch TSA induzierte Apoptose in GBM involviert sind, wurde die Wirkung von TSA in LN229-Glioblastomzellen, die eine *TP53*-Mutation und einen inaktivierten $p14^{ARF}/p16^{INK4a}$ -Signalweg besitzen, mit verminderter *ING1*-Expression erreicht durch siRNA oder mit ektopter Überexpression von *ING1* untersucht.

Material und Methoden: Die Expression von ING1, acetylierten Histonen H3 und H4 und den Apoptose induzierenden Proteinen Caspase 3 und FADD wurde mittels Western Blot Analyse, die HDAC-Aktivität mit Hilfe eines HDAC-„Assays“ und die Apoptoseraten mittels FACS-Analyse bestimmt.

Ergebnisse: TSA induzierte die Hauptisoform von ING1 $p33^{ING1b}$ und erhöhte sowohl die Spiegel der Histonacetylierung als auch die Apoptoserate in LN229-Zellen. Bei den LN229-Zellen mit verminderter ING1-Expression war eine deutliche Resistenz gegenüber der durch TSA induzierten Apoptose, eine Beeinflussung der Aktivierung von Caspase 3 und die Hemmung von FADD zu beobachten.

Diskussion: ING1 ist möglicherweise in die Veränderung der proapoptotischen Wirkung von TSA involviert - eventuell über die Regulierung des FADD/Caspase-3-Signalweges. Die endogenen ING1-Spiegel könnten daher vielleicht die Sensitivität von GBM mit fehlender p53- und $p14^{ARF}/p16^{INK4a}$ -Funktion gegenüber der durch TSA ausgelösten Apoptose vorhersagen.

Schlüsselwörter: ING1, Glioblastoma multiforme, Apoptose, TSA

Abstract

Purpose: Prognosis for patients with glioblastoma multiforme (GBM) still remains poor. Inhibitors of histone deacetylases (HDACi) like Trichostatin A (TSA) are promising alternatives to conventional treatment. Deficient tumor suppressor functions, such as *TP53* mutations and *CDKN2A* deletions, are characteristic for GBM and can cause resistance. We have previously reported that the type II tumor suppressor *ING1* is downregulated in GBM.

Problem: To test whether *ING1* proteins function in TSA-induced apoptosis in GBM, we analysed TSA effects in LN229 GBM cells, which harbour *TP53* mutations and inactive p14^{ARF}/p16^{INK4a}-signaling, following *ING1* knockdown by siRNA or ectopic *ING1* overexpression.

Material and Methods: Expression of *ING1*-, acetylated histone H3- and H4-, and apoptosis-inducing proteins caspase 3 and FADD was determined by western blotting, HDAC activity by HDAC assay and apoptosis by FACS analysis.

Results: TSA induced the major *ING1* isoform p33^{ING1b} and increased levels of both histone acetylation and apoptosis in LN229 cells. *ING1* knockdown cells revealed marked resistance to TSA-induced apoptosis, impairment of caspase 3-activation and suppression of FADD.

Discussion: *ING1* might be involved in mediating the proapoptotic effects of TSA in GBM - possibly by regulating FADD/caspase 3-signaling. Therefore, endogenous *ING1* levels may predict sensitivity to TSA-induced apoptosis in GBM with deficient p53- and p14^{ARF}/p16^{INK4a}-functions.

Keywords: *ING1*, glioblastoma multiforme, apoptosis, TSA

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	8
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 DER TYP II-TUMORSUPPRESSOR „INHIBITOR OF GROWTH 1“ (ING1)	12
1.1.1 Identifikation und Vorkommen.....	12
1.1.2 Aufbau des ING1-Gens und Strukturmerkmale der ING-Proteinfamilie.....	13
1.1.3 Funktion der ING-Proteine	15
1.2 ASTROZYTÄRE GLIOME	17
1.2.1 Epidemiologie und Inzidenz.....	17
1.2.2 Histopathologie.....	18
1.2.3 Ätiologie	19
1.2.4 Klinische Symptomatik.....	26
1.2.5 Diagnostik	26
1.2.6 Aktuelle Therapiekonzepte für maligne Gliome.....	27
1.2.7 Prognose für Patienten mit malignen Gliomen.....	29
1.3 DER HISTONDEACETYLASEINHIBITOR TRICHOSTATIN A.....	30
2 ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	32
2.1 ARBEITSHYPOTHESE	32
2.2 ZIELSETZUNG.....	32
3 MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1 MATERIALIEN, REAGENZIEN UND GERÄTE.....	33
3.1.1 Zellen.....	33
3.1.2 Zellkultur	33
3.1.3 Transformation, Bakterienzüchtung.....	34
3.1.4 Plasmidpräparation/DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.1.5 Transfektion.....	36
3.1.6 Proteinextraktion.....	37
3.1.7 Proteinmessung nach Bradford.....	37
3.1.8 Western Blot	38
3.1.9 HDAC-„Assay“	41
3.1.10 Durchflusszytometrie.....	41
3.2 METHODEN	42
3.2.1 Zellkultur	42
3.2.2 Behandlung der Zellen mit TSA	43
3.2.3 RNA-Interferenz	44
3.2.4 Transformation, Bakterienzüchtung, Plasmidpräparation und Transfektion.....	45

3.2.5	<i>Zelllyse und Proteinextraktion</i>	49
3.2.6	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	49
3.2.7	<i>Western Blot</i>	51
	<i>SDS-Gelelektrophorese</i>	51
	<i>Blockieren</i>	54
	<i>Immunochemische Detektion</i>	54
	<i>Entwicklung</i>	55
3.2.8	<i>HDAC-„Assay“</i>	55
3.2.9	<i>Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting)</i>	57
4	ERGEBNISSE	60
4.1	GESAMTPROTEINKONZENTRATIONEN.....	60
4.2	ING1-PROTEINEXPRESSION IN LN229-ZELLEN	60
4.3	TRANSFEKTION	61
4.3.1	<i>Reduktion der ING1-Expression durch RNAi</i>	61
4.3.2	<i>Ektope Überexpression der ING1-Isoformen</i>	62
4.4	BESTIMMUNG DER IN LN229-ZELLEN APOPTOSE-AUSLÖSENDE TSA-KONZENTRATION UND - EXPOSITIONSZEIT	63
4.5	DIE WIRKUNG VON TSA AUF DIE AKTIVITÄT DER HDAC IN LN229-ZELLEN.....	65
4.6	ACETYLIERUNG DER HISTONE H3 UND H4 IN LN229-GLIOBLASTOMZELLEN NACH TSA-BEHANDLUNG ...	69
4.7	DIE ENDOGENE EXPRESSION DER ING1-ISOFORMEN NACH TSA-BEHANDLUNG IN LN229-ZELLEN.....	70
4.8	DIE WIRKUNG VON TSA AUF LN229-ZELLEN MIT EKTOPER ÜBEREXPRESSION DER ING1-ISOFORMEN ...	71
4.9	DIE WIRKUNG VON TSA AUF DEN ZELLZYKLUS VON LN229-ZELLEN MIT EKTOPER ÜBEREXPRESSION DER ING1-ISOFORMEN	74
4.10	DIE WIRKUNG VON TSA AUF DIE HISTONACETYLIERUNG IN LN229-ZELLEN MIT EKTOPER ÜBEREXPRESSION DER ING1-ISOFORMEN	76
4.11	DIE WIRKUNG VON TSA AUF DEN ZELLZYKLUS VON LN229-ZELLEN MIT REDUZIERTER ING1- EXPRESSION	77
4.12	DIE WIRKUNG DER VERMINDERTEN ING1-EXPRESSION AUF DEN FADD-CASPASE-3-SIGNALWEG DER APOPTOSE IN LN229-ZELLEN	78
5	DISKUSSION	81
5.1	DIE METHODEN	81
5.1.1	<i>Zellkultur</i>	81
5.1.2	<i>Western Blot und CAb-Antikörper</i>	81
5.1.3	<i>Erhöhung der ING1-Expression in LN229-Zellen durch Transfektion mit Plasmiden</i>	82
5.1.4	<i>Reduktion der ING1-Expression in LN229-Zellen mittels siRNA</i>	82
5.1.5	<i>HDAC-„Assay“</i>	83
5.1.6	<i>Durchflusszytometrie und die LC₅₀ von TSA</i>	83
5.2	APOPTOSE DURCH TSA IN LN229-ZELLEN	84

5.2.1	<i>Apoptose durch TSA bei verminderten oder erhöhten ING1-Proteinspiegeln</i>	84
5.2.2	<i>Welche Signalwege spielen bei der durch TSA vermittelten Apoptose in LN229-Zellen eine Rolle?</i>	85
5.2.3	<i>Die mögliche Rolle von ING1 bei der durch TSA ausgelösten Apoptose</i>	88
5.3	DIE WIRKUNG VON TSA AUF DIE EXPRESSION DER ING1-ISOFORMEN	90
5.3.1	<i>TSA-Wirkung bei Überexpression der ING1-Isoformen</i>	91
5.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSSICHT	91
6	LITERATURVERZEICHNIS	94
7	EINGEREICHTES MANUSKRIFT	110
	LEBENS LAUF	110
	DANKSAGUNG	111
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	113

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	(engl.) „alternative reading frame“
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
Bax	(engl.) „Bcl-2-associated X protein“
Bcl-2	(engl.) B-cell lymphoma
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitrosourea
Bid	(engl.) „BH3 interacting domain death agonist“
BIK	(engl.) „Bcl-2 interacting killer“
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDDP	Cisplatin
CDK	(engl.) „cyclin-dependent kinase“
CDKN2A	(engl.) „cyclin-dependent kinase inhibitor 2A“
CLIC3	(engl.) „chloride intracellular channel 3“
CST6	Cystatin
cFLIP	(engl.) „cellular FLICE-like inhibitory protein“
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT	DNS Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „desoxyribonucleidacid“)
DR	(engl.) „death receptor“
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

	(engl. „ethylene-diamine-tetraacetic acid“)
E. coli	Escherichia coli
EGFP	(engl.) „epidermal growth factor“
engl.	englisch
evtl.	eventuell
FADD	(engl.) „Fas-associated death domain“
FLICE	(engl.) „FADD-associated death domain protein“
FBS	fetales Rinderserum
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	saures Gliafaserprotein
GFP	(engl.) „green fluorescence protein“
h	Stunde ((engl.) „hour“)
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff = „Salzsäure“
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HRP	(engl.) „horseradish peroxidase“
H3	Histon 3
H3K4	methyliertes Lysin 4 von H3
H4	Histon 4
ING	(engl.) „inhibitor of growth“
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
g	(engl.) „gravity“
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
L	Liter
LB	Luria Bertani
LC 50	(engl.) „lethal concentration that kills 50% of the treated cells“; tödliche Konzentration, die 50% der behandelten Zellen abtötet
LOH	(engl.) „loss of heterozygosity“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
min	Minute

min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mL	Milliliter
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mSin3	mammalian Sin3
µL	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NLS	(engl.) „nuclear localization signal“
NTS	(engl.) „nucleolar translocation sequences“
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OP	Operation
p53	p53-Tumorsuppressorprotein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	(engl.) „proliferating cell nuclear antigen“
PCR	(engl.) „potential chromatin remodelling“
PDGF	(engl.) „platelet derived growth factor“
PDGFR	(engl.) „platelet derived growth factor receptor“
PHD	(engl.) „plant homeodomain“
PIM	(engl.) „protein interacting motif“
PIP	(engl.) „PCNA interacting protein“
PNET	primitive neuroektodermale Tumoren
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphatase
PTEN	(engl.) „phosphatase and tensin homolog“
<i>RB</i>	Retinoblastoma-Gen
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „ribonucleidacid“)
SAP30	(engl.) „sin3-associated protein 30“
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	(engl.) „small interfering RNA“
sog.	sogenannt
Sp1	(engl.) „specificity protein 1“

Tab.	Tabelle
TAC1	Tachykinin
TACSTD2	(engl.) „tumor-associated calcium signal transducer 2“
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktoren
T-PBS	Tween-PBS
<i>TP53</i>	p53-Tumorsuppressorgen
TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAIL	tumor nekrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSA	Trichostatin A
TSPYL5	(engl.) „testis-specific protein Y-linked like 5“
u.a.	und andere
USA	(engl.) „United States of America“
VEGF	(engl.) „vascular endothelial growth factor“
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem

7 Eingereichtes Manuskript

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit sind Bestandteil des folgenden eingereichten Manuskriptes:

Tallen, G. U.*, Tamannai, M.*, Krabbe, S., Truss, M., Sinn, B., Wurm, R., Henze, G., Riabowol, K.T., von Deimling, A.

*Authors contributed equally to this work

The Inhibitor of Growth (ING1) is involved in TSA-induced apoptosis and in the FADD/caspase 3 signaling pathway in human glioblastoma cells.

submitted 07.05.2007

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt G. Tallen und auch K. Riabowol, durch die ich während der gesamten Zeit so wunderbar betreut wurde. Trotz der großen räumlichen Distanz waren sie für mich jederzeit als Ansprechpartner erreichbar und haben mir die Publikation der Ergebnisse ermöglicht. Sie haben meine wissenschaftliche Arbeit immer unterstützt und standen mir in jeglicher Hinsicht zur Seite.

Weiterhin danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. von Deimling und den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Neuropathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit durchführen zu können und für die vielen Ratschläge und Hilfeleistungen bei der täglichen Laborarbeit. Vor allem danke ich S. Krabbe, die mich hilfsbereit in viele Methoden eingearbeitet hat.

Mein großer Dank gilt Frau B. Sinn, die als kompetente Ansprechpartnerin bei Problemen mit der Durchflusszytometrie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Und insbesondere danke ich meiner Familie, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mir stets den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Mona Tamannai, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „ING1 ist in die durch TSA induzierte Apoptose und in den FADD/Caspase-3-Signalweg in humanen Glioblastomzellen involviert.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

17.06.07

.....
M. Tamannai