

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien, Reagenzien und Geräte

Alle verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte, entsprechen den routinemäßig in medizinisch-naturwissenschaftlich Laboren Verwendeten, welche von entsprechenden Firmen bezogen werden können. Ebenso verhält es sich mit den Lösungen und Reagenzien. Alle Reagenzien wurden wie vom Hersteller empfohlen gelöst und gelagert.

##### 3.1.1 Zellen

Die untersuchten Zellen gehören der malignen Glioblastomzelllinie LN229 an. Diese Zelllinie wurde 1979 mit Zellen von dem fronto-parieto-occipitalem Glioblastom einer 60jährigen weißen Patientin erstmals kultiviert [113]. Es handelt sich um eine adhärent wachsende Monolayerkultur. Durch Stimulation der Zellen mit FasL konnte innerhalb von 16 Stunden (h) Zelltod durch Apoptose herbeigeführt werden. Auch durch Puromycin wurden die Zellen dosisabhängig getötet. Bcl-2 schützte die Zellen zwar vor FasL induziertem Zelltod, hatte aber wenig schützenden Effekt auf die durch Puromycin ausgelöste Apoptose [114]. Diese Beobachtungen bestätigen, dass es sich bei den LN229-Zellen um Glioblastomzellen handelt, die zur Apoptose fähig und damit für unsere geplanten Versuche sehr gut geeignet sind. Die Zellen exprimieren mutiertes *TP53*. Sie besitzen ein Wildtyp *PTEN*-Gen und exprimieren homozygote Deletionen in den  $p16^{INK4}$  und  $p14^{ARF}$  Tumorsuppressoren [114]. Hierbei handelt es sich um typische in GBM vorkommende Veränderungen. Daher wird diese Zelllinie häufig in Studien über Apoptose verwendet. Die LN229-Glioblastomzellen sind in ihrer molekulargenetischen Struktur gut beschrieben und dadurch ein nützliches Modell zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher *ING1*-Spiegel auf die Sensibilität von GBM gegenüber TSA und der durch TSA induzierten Apoptose.

##### 3.1.2 Zellkultur

|   |   |
|---|---|
| Zelllinie LN229   | GBM-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Prof. Weller, Universität Tübingen  |
| LN229 si <i>EGFP</i><br>LN229 si <i>ING1</i> (conserved exon) | LN229 stabil transfiziert mit si <i>EGFP</i> bzw. mit si <i>ING1</i> (Exon 2) zur Verfügung gestellt von Dr. M. Truss, Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Berlin, Campus Mitte |

| <u>Medien/Zusätze und Chemikalien</u>  | <u>Hersteller</u>         |
|--|---------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): 4500 mg/L Glucose, L-Glutamin, ohne Pyruvat | Gibco                     |
| Foetal Bovine Serum (FBS)  | Gibco                     |
| Penicillin/Streptomycin (10000 Units/mL Pen, 10000 µg/mL Strep in 0,85 % NaCl)       | Gibco                     |
| Phosphatpuffer (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>                      | Gibco                     |
| 10 x Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (-EDTA)                                    | Gibco                     |
| Trichostatin A (TSA), HDAC-Inhibitor   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Puromycin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Ethanol absolut  | Fa. Merck                 |
| <u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u>  | <u>Hersteller</u>         |
| Sterilbank Hera safe   | Heraeus instruments       |
| Wasserbad  | Memmert                   |
| Brutschrank Hera cell 240  | Heraeus instruments       |
| Lichtmikroskop (4x – 20x) Wilovert A   | Hund                      |
| Kulturflaschen 75cm <sup>2</sup>   | Becton Dickinson Labware  |
| Elektrische Pipette, Pipetboy acu  | integra bioscience        |
| Pipettenspitzen 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL   | Becton Dickinson Labware  |
| Manuelle Pipetten 0,5 µL – 1000 µL   | Labsystems                |
| Pipettenspitzen  | Sarstedt AG & Co.         |
| Kryoröhrchen   | Nunc GmbH & Co. KG        |
| Eismaschine  | Ziegra Eis Maschinen      |
| Fuchs-Rosenthal-Zählkammer   | Laborcenter, Nürnberg     |

### 3.1.3 Transformation, Bakterienzüchtung

|   |   |
|---|---|
| Bakterienzellen:<br>Chemokompetente E. coli TOP10F <sup>-</sup> Zellen<br>Genotyp:<br>F <sup>-</sup> { <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Tn10(Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i><br><i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i><br><i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i> | Invitrogen Life Technologies  |
| Plasmide:<br>pCI Leervektor, pCI <i>ING1a</i> , <i>ING1b</i> , <i>ING1c</i>   | zur Verfügung gestellt von Prof. K. Riabowol, Department of Biochemistry and Molecular Biology and Oncology, Southern Alberta Cancer Research Centre, University of Calgary |

| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u></b> | <b><u>Hersteller</u></b>   |
|---|--|
| Trypton   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Hefeextrakt   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| 5 N Natronlauge (NaOH)                                | Fa. Merck  |
| Agar  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Natriumchlorid  | Fa. Merck  |
| Ampicillin (Pulver)                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| SOC-Medium (Vollmedium für Prokaryonten)              | Invitrogen Life Technologies   |
| <b><u>Medium</u></b>                                  | <b><u>Herstellung</u></b>  |
| Ampicillin-Stammlösung (10 mg/mL)                     | 100 mg Ampicillin in 10 mL sterilem destilliertem Wasser (A. dest.) lösen, aliquotieren und bei – 20 Grad Celsius (°C) lagern  |
| Luria Bertani- (LB-) Medium                           | 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 950 mL A. dest. lösen und den pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, mit A. dest. zu einem Gesamtvolumen von 1L auffüllen und bei 4 °C lagern |
| <b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>            | <b><u>Hersteller</u></b>   |
| Biopur Reaktionsgefäße                                | Eppendorf AG   |
| Parafilm  | Pechitey Plastic Packing   |
| 15 mL und 50 mL Falcon-Reagenzröhrchen                | Becton Dickinson Labware   |
| Sterile 10 cm Petrischalen                            | Becton Dickinson Labware   |
| Schüttelinkubator TH 30                               | Edmund Bühler GmbH   |
| Bunsenbrenner Fireboy Eco                             | IBS Integra Biosciences GmbH   |
| Zentrifuge MegaFuge 1.0R                              | Heraeus instruments  |

### 3.1.4 Plasmidpräparation/DNA-Konzentrationsbestimmung

| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u></b> | <b><u>Hersteller</u></b>  |
|---|---------------------------|
| Plasmid Midi Kit                                      | Qiagen GmbH               |
| Isopropanol   | Fa. Merck                 |
| EDTA  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| TRIZMA Base   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Agarose   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Ethidiumbromid  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Borsäure  | Fa. Merck                 |
| Bromphenolblau  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |

|   |   |
|---|---|
| Glycerin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH   |
| 1 kb Leiter   | Invitrogen Life Technologies  |
| <b><u>Puffer und Lösungen</u></b>                       | <b><u>Herstellung</u></b>   |
| 1 M Trishydroxymethylaminomethane (Tris) pH 8,0         | 6,055 g Tris in 40 mL A. dest. lösen, den pH-Wert mit 5 N HCl auf 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 50 mL auffüllen                      |
| 0,5 M EDTA pH 8,0                                       | 18,61 g EDTA in 90 mL A. dest. lösen, den pH-Wert mit 5 N NaOH auf 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 100 mL auffüllen                    |
| Tris-EDTA-(TE-)Puffer                                   | 4 mL 1 M Tris-Stammlösung + 0,8 mL 1 M EDTA-Stammlösung, auf 400 mL mit A. dest. auffüllen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern |
| Tris-Borsäure-EDTA-(TBE-)Puffer (10x)                   | 108 g Tris + 55 g Borsäure + 93 g EDTA in 800 mL A. dest. lösen, auf 1 L auffüllen  |
| 150 mM Tris pH 7,6                                      | 18,17 g Tris in 800 mL A. dest. lösen, den pH-Wert mit 5 N HCl auf 7,6 einstellen, mit A. dest. auf 1 L auffüllen                       |
| Agarosegelprobenpuffer                                  | 250 mg Bromphenolblau in 33 mL 150 mM Tris pH 7,6 lösen, 60 mL Glycerin zugeben, mit A. dest. auf 100 mL auffüllen                      |
| Ethidiumbromidlösung (1 mg /mL)                         | 100 mg Ethidiumbromid in 100 mL A. dest. lösen  |
| <b><u>Geräte</u></b>                                    | <b><u>Hersteller</u></b>  |
| Zentrifuge BioFuge fresco                               | Heraeus instruments   |
| Elektrophoresekammern Mini-Sub-Cell® GT und Sub-Cell GT | BioRad Laboratories   |
| Gelkamm (10 Taschen / 20 Taschen)                       | BioRad Laboratories   |
| Gelträger (klein / groß)                                | BioRad Laboratories   |
| Gelgießvorrichtung                                      | BioRad Laboratories   |
| Stromversorgungsgerät                                   | Microcomputer Electrophoresis Power Supply E802, Consort  |
| Geldokumentationsanlage mit UV-Tisch                    | Intas Science Imaging Instruments GmbH  |
| Quarzküvetten   | Pharmacia Biotech   |
| Mikrowelle  | Bosch   |
| Autoklav  | Systec GmbH   |

### 3.1.5 Transfektion

|   |                              |
|---|------------------------------|
| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u></b> | <b><u>Hersteller</u></b>     |
| Lipofectamine® 2000                                   | Invitrogen Life Technologies |

| <u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u> | <u>Hersteller</u>        |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Sterile 60 mm Ø Petrischalen        | Becton Dickinson Labware |

### 3.1.6 Proteinextraktion

| <u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u>                                 | <u>Hersteller</u>  |
|--|--|
| Tris HCl   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Merck  |
| 4-Nonylphenolpolyethylenglycol (Nonidet P-40)                                  | Boehringer Mannheim  |
| Triton x 100   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| PBS Dulbecco Pulver  | Biochrom KG  |
| <u>Puffer</u>  | <u>Herstellung</u>   |
| 2 M Tris   | 24,22 g Tris in 90 mL A. dest. lösen, mit A. dest. auf 1 L auffüllen   |
| Lysepuffer   | 4,38 g Natriumchlorid in 400 mL A. dest. lösen, 12,5 mL 2 M Tris, 5 mL Nonidet P 40 und 5 mL Triton X 100 zugeben, mit A. dest. auf 500 mL auffüllen |
| PBS-Puffer   | 9,55g PBS Dulbecco Pulver in 1 L A. dest. lösen  |
| <u>Geräte</u>  | <u>Hersteller</u>  |
| Zentrifugen Biofuge primo R<br>Biofuge pico                                    | Heraeus instruments  |
| Zentrifugenröhrchen:<br>15 ml Falcon-Reagenzröhrchen<br>1,5 ml Eppendorf-Gefäß | Becton Dickinson Labware<br>Eppendorf AG   |
| Zellschaber  | Corning in corporated  |

### 3.1.7 Proteinmessung nach Bradford

|                             |                     |
|-----------------------------|---------------------|
| Bradford-Reagenz            | BioRad Laboratories |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich GmbH  |
| Photometer                  | Pharmacia Biotech   |
| Plastikeinmalküvetten       | Sarstedt AG & Co.   |

### 3.1.8 Western Blot

| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u></b><br>SDS-Gelelektrophorese | <b><u>Hersteller</u></b>   |
|--|--|
| Acrylamid (AA)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Bisacrylamid (BAA)   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Ammoniumpersulfat (APS)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Tetramethylethylendiami (TEMED)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| SDS  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Tris-Base  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| 2N HCl   | Merck  |
| Glycin   | Serva Electrophoresis GmbH   |
| 4x Proteinprobenpuffer (NuPAGE <sup>®</sup> -System)                           | Invitrogen Life Technologies   |
| 10x reducing agent (NuPAGE <sup>®</sup> -System)                               | Invitrogen Life Technologies   |
| 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)   | USB Corporation  |
| Magic Marker (NuPAGE <sup>®</sup> -System)                                     | Invitrogen Life Technologies   |
| Bench Marker (NuPAGE <sup>®</sup> -System)                                     | Invitrogen Life Technologies   |
| <b><u>Puffer und Lösungen</u></b><br>SDS-Gelelektrophorese                     | <b><u>Herstellung</u></b>  |
| 30%ige Gellösung (Acrylamid/bis)   | 29,2 g AA + 0,8 g BAA, auf 100 mL mit A. dest. auffüllen, filtrieren und bei 4 °C lagern   |
| NuPAGE <sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gele  | Invitrogen Life Technologies   |
| 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)   | 10 g APS in 100 mL A. dest. lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern  |
| 10%ige SDS-Lösung  | 10 g SDS in 100 mL A. dest. lösen  |
| Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer (10x)   | 30,3 g Tris-Base + 144,2 g Glycin, mit A. dest. auf 1L auffüllen, für Elektrophoreselauf 100mL 10x Laufpuffer + 10 mL 10%ige SDS-Lösung mit A. dest. auf 1 L auffüllen und bei 4 °C lagern |
| MOPS-Elektrophoresepuffer (20x)  | 104,6 g MOPS + 60,6 g Tris + 10 g SDS + 3 g EDTA in 300 mL A. dest. lösen, mit A. dest. auf 500 mL auffüllen   |
| Trenngelbuffer (1,5M Tris-Chlorwasserstoff (HCl), pH 8,8)                      | 18,15 g Tris-Base in 60 mL A. dest. lösen, mit 2 N HCl den pH-Wert einstellen, mit A. dest. auf 100 mL auffüllen und bei 4 °C lagern   |
| Sammelgelbuffer (0,5M Tris-HCl, pH 6,8)  | 6 g Tris-Base in 60 mL A. dest. lösen, mit 2 N HCl den pH-Wert einstellen, mit A. dest. auf 100 mL auffüllen und bei 4 °C lagern   |

| <b><u>Geräte</u></b><br>SDS-Gelelektrophorese                          | <b><u>Hersteller</u></b>   |
|--|--|
| Glasplatten (Outer Plates 3)   | BioRad Laboratories  |
| Glasplatten (Short Plates Mini Protean 3)                              | BioRad Laboratories  |
| Probenkämme  | BioRad Laboratories  |
| Gießvorrichtung  | BioRad Laboratories  |
| Gelklammern  | BioRad Laboratories  |
| NuPAGE <sup>®</sup> Novex Bis-Tris Gele 4-12%                          | Invitrogen Life Technologies   |
| Elektrophoresekammer   | BioRad Laboratories  |
| Elektrophoreselektroden  | BioRad Laboratories  |
| Stromversorgungsgerät EPS 3501 XL                                      | Amersham Biosciences   |
| Adaptoren A2/4   | Amersham Biosciences   |
| Vortexgerät  | IKA Works  |
| Blockheizgerät   | Eppendorf AG   |
| Manuelle Pipetten 0,5µL – 1000µL<br>Pipettenspitzen                    | Eppendorf AG<br>Sarstedt AG & Co.  |
| Elektrische Pipette, EasyPet<br>Pipettenspitzen (5,10,25mL)            | Eppendorf AG<br>Becton Dickinson Labware   |
| Reaktionsgefäße (1,5mL)  | Eppendorf AG   |
| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige<br/>Lösungen</u></b><br>Transblot | <b><u>Hersteller</u></b>   |
| Glycin   | Serva Electrophoresis GmbH   |
| Methanol   | Merck  |
| Ponceau-Lösung   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Coomassie Brilliant Blue Fertiglösung                                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| <b><u>Puffer und Lösungen</u></b><br>Transblot                         | <b><u>Herstellung</u></b>  |
| 10%ige SDS-Lösung  | 10 g SDS in 100 mL A. dest. lösen  |
| Tris-Glycin-Transferpuffer (10x/1x)                                    | 58 g Tris-Base + 29 g Glycin + 37 mL<br>10%ige SDS-Lösung, auf 1 L mit A. dest.<br>auffüllen, für den Transblot 100 mL 10x<br>Transferpuffer + 200 mL Methanol mit A.<br>dest. auf 1 L auffüllen |
| 1x NuPAGE <sup>®</sup> -Transferpuffer                                 | 50 mL 20x NuPAGE <sup>®</sup> Transferpuffer + 100<br>mL Methanol absolut, mit A. dest. auf 1 L<br>auffüllen   |
| <b><u>Geräte</u></b><br>Transblot                                      | <b><u>Hersteller</u></b>   |
| Nitrocellulosemembran (0,2µm)  | BioRad Laboratories  |

|  |  |
|--|--|
| Filterpapier   | Schleicher & Schuell GmbH  |
| „Blotting-Pads“  | BioRad Laboratories  |
| „Blotting“-Elektroden  | BioRad Laboratories  |
| „Blotting“-Klammer   | BioRad Laboratories  |
| <b><u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u></b><br>Immunochemische Detektion   | <b><u>Hersteller</u></b>   |
| Tween 20   | BioRad Laboratories  |
| Magermilchpulver   | Carl Roth GmbH & Co  |
| ExtrAvidin   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| ECL-Detektionskit  | Amersham Biosciences UK Limited  |
| Primärantikörper:  | Hersteller   |
| CAb I-IV (anti-Human)  | zur Verfügung gestellt von Prof. K. Riabowol, Department of Biochemistry and Molecular Biology and Oncology, Southern Alberta Cancer Research Centre, University of Calgary, Antibodies from mouse hybridoma cells [120] |
| Anti-Acetyl-Histone H3 (rabbit antiserum)<br>Anti-Acetyl-Histone H4 (rabbit antiserum)   | Upstate Biotechnology  |
| Anti-Caspase 3   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Anti-FADD  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Anti-β-Aktin   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH  |
| Sekundärantikörper:  | Hersteller   |
| rabbit-anti-mouse, Biotin  | Dako   |
| pig-anti-rabbit, Biotin  | Dako   |
| „enhanced chemiluminescence“- (ECL-) anti-mouse IgG, „horseradish“ Peroxidase (HRP) linked species specific whole antibody from sheep,<br>ECL-anti-rabbit, HRP linked, from donkey | Amersham Biosciences UK Limited  |
| <b><u>Puffer und Lösungen</u></b><br>Immunochemische Detektion   | <b><u>Herstellung</u></b>  |
| 10x PBS  | 96 g PBS-Pulver in 1 L A. dest. lösen  |
| T-PBS (0,05%)  | 100 mL 10x PBS + 900 mL A. dest., 500 µL Tween 20 dazugeben  |
| ECL-Western blotting detection system  | Amersham Biosciences UK Limited  |



| <u>Geräte</u>                             | <u>Hersteller</u>                   |
|---|-------------------------------------|
| Immunochemische Detektion                 |                                     |
| Hyperkassette                             | Amersham Biosciences UK Limited     |
| Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film | Roche Applied Science               |
| Filmentwicklermaschine Compact 2          | Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG |
| Elektrische Pipette, EasyPet              | Eppendorf AG                        |
| Sterile Pipettenspitzen (5mL,10mL,25mL)   | Becton Dickinson Labware            |
| Manuelle Pipetten (0,5µL-100µL)           | Eppendorf AG                        |
| Pipettenspitzen                           | Sarstedt AG & Co.                   |

### 3.1.9 HDAC-,Assay“

|  |                              |
|--|------------------------------|
| Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien:<br>HDAC Colorimetric Activity Assay/Drug Discovery Kit - AK-501 Featuring the Color de Lys <sup>TM</sup> Substrate/Developer                           | BIOMOL Research Laboratories |
| <u>Inhalt:</u> HeLa Nuclear Extract, Color de Lys <sup>TM</sup> Substrate, Color de Lys <sup>TM</sup> Developer, HDAC Assay Buffer, Color de Lys <sup>TM</sup> Deacetylated Standard, Trichostatin A |                              |

### 3.1.10 Durchflusszytometrie

| <u>Chemikalien/Reagenzien/fertige Lösungen</u>   | <u>Hersteller</u>   |
|--|---|
| Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )  | Merck   |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )  | Merck   |
| Höchst 33258, Bisbenzimid  | Riedel-de Haën AG   |
| Ethidiumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid, Homidiumbromid, reinst | Serva   |
| 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH   |
| 2'-Deoxycytidin  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH   |
| 6 well plates  | Becton Dickinson Labware  |
| <u>Puffer und Lösungen</u>   | <u>Herstellung</u>  |
| BrdU-Stammlösung   | 6 mM 5-Bromo-2'-Deoxyuridin + 6 mM 2'-Deoxycytidin in PBS lösen   |
| Tris-Puffer  | 100 mM Tris-HCl + 154 mM NaCl + 0,4 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 mM CaCl <sub>2</sub> + 0,1 % Nonidet P40 + 0,2 % BSA in A. dest. lösen |

|   |  |
|---|--|
| Ethidiumbromid- (EB-) Stammlösung         | 150 µg/ml Ethidiumbromid in A. dest. lösen, bei 4 °C lichtgeschützt lagern |
| EB-Gebrauchslösung (3 µg/ml)              | 2 % EB-Stammlösung in Tris-Tuffer  |
| Hoechst 33258-Stammlösung                 | 2 mg/ml Hoechst 33258 in A. dest. lösen, bei 4 °C lichtgeschützt lagern    |
| Hoechst 33258-Gebrauchslösung (1,2 µg/ml) | 0,06% Hoechst 33258-Stammlösung in Tris-Puffer                             |
| <b><u>Geräte/Software</u></b>             | <b><u>Hersteller</u></b>   |
| Software<br>WinMDI, Version 2.8           | Joseph Trotter, Salk institute   |
| FlowMax, Version 2.3, Cytometry software  | Partec   |
| Durchflusszytometer PAS III               | Partec   |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Prinzip

Bei der Zellkultur handelt es sich um eine Routinemethode zur Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Es werden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch Primärkulturen (nicht immortalisierte Zellkulturen, direkt aus Gewebe gewonnen) verwendet. Man unterscheidet zudem adhärent wachsende Zellen und Suspensionszellen, die frei im Nährmedium schwimmend wachsen.

Damit die isolierten Zellen auch außerhalb des Organismus, also *in vitro* proliferieren, wachsen, sich differenzieren und ihre typischen Zellfunktionen ausüben, muss eine entsprechende Umgebung geschaffen werden. Nicht selbst synthetisierte, für das Wachstum jedoch notwendige Substanzen müssen den Zellen zugeführt und die entstehenden Abfallprodukte neutralisiert und entfernt werden. Dem eigentlichen Nährmedium muss tierisches oder menschliches Serum zugesetzt werden. Dieses liefert Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer und Neutralisationssysteme. Um einen neutralen pH-Wert auch bei Anfall von Abbauprodukten aufrecht zu erhalten, muss neben den anorganischen Puffersubstanzen der Zellkulturmedien eine bestimmte Temperatur und CO<sub>2</sub>-Begasung eingehalten werden. Da sich die Kapazität der Pufferung jedoch bei weiterem Anfall ausschöpft, wird ein Mediumwechsel oder eine Zellpassage nach einem bestimmten von der jeweiligen Zelllinie abhängigen Intervall nötig. Auch der Platzmangel bei übermäßigem Wachstum und die daraus folgende Kontaktinhibition

stellen einen Grund für regelmäßige Mediumwechsel beziehungsweise Zellpassagierungen dar. Bei der Kontaktinhibition befinden sich die Zellen in so engem Kontakt zueinander, dass sie aufhören zu wachsen und sich zu teilen.

### 3.2.1.2 *Protokoll*

Als Standardmedium für die adhärent wachsende maligne Glioblastomzelllinie LN229 wurde DMEM, mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FBS versetzt, verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C und 7,5 % - 10 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert, um einen pH Wert von ungefähr 7,4 bei einer NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration (Puffer) von 3,7 g/l aufrecht zu erhalten. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank. Nach 48 h - 72 h erfolgte der Mediumwechsel. Die Passage der Zellen erfolgte bei ungefähr 85 %iger Konfluenz. Die Passagezeit der LN229-Zellen unter den angegebenen Bedingungen betrug 48 h. Nach Abkippen des Mediums wurden die Zellen mit sterilem, im Wasserbad auf 37 °C erwärmtem PBS ohne Zusatz von Calcium und Magnesium gespült. Die Zellen wurden durch 5minütige Inkubation mit 3 mL warmen Trypsin-EDTA im 37 °C-Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst. Die Kontrolle des Ablösungsprozesses erfolgte lichtmikroskopisch. Die Zellen wurden anschließend zu annähernd gleichen Teilen auf zwei neue Flaschen aufgeteilt. Die Flaschen wurden mit 13,5 mL ebenfalls erwärmtem Medium gefüllt, so dass sich am Ende in jeder Flasche ein Gesamtvolumen von 15 mL befand.

Vor jedem Mediumwechsel beziehungsweise jeder Passage wurden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert, um einen Überblick über die Vitalität, Morphologie, eventuelle Kontaminationen und andere visuell erfassbare Parameter zu gewinnen.

Zur Lagerung bei -80 °C wurden die Zellen nach der Trypsinierung in mit 2 mL Gefriermedium (DMEM + 10% DMSO + 20 % FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) befüllte Kryoröhrchen überführt und unmittelbar danach bei -80 °C eingefroren.

## 3.2.2 Behandlung der Zellen mit TSA

### 3.2.2.1 *Prinzip und Protokoll*

Die Entscheidung über die einzusetzenden Konzentrationen fiel zum einen über die Orientierung an *in-vitro*-Studien [115-117], zum anderen wurde die letale Konzentration ((engl.) „lethal concentration“, LC) von TSA, das heißt diejenige Konzentration, durch die 50 % (LC<sub>50</sub>) der

Zellen dem Zelltod zugeführt werden, für die LN229-Zellen ermittelt. Zu diesem Zweck wurde TSA in fünf verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und mittels Durchflusszytometrie zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Anteil der Zellen ermittelt, die sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befanden.

Die zu testende Substanz (hier TSA) sollte nach Anwachsen der Zellen an den Kulturflaschenboden eingesetzt werden, da ansonsten die Adhäsion der Zellen verhindert werden könnte. Mit der Behandlung wurde 48 h nach der letzten Passage begonnen, nachdem eine ungefähr 85 %ige Konfluenz der Zellen erreicht war. Dadurch konnte von einem synchronisierten Zellzyklus durch Kontaktinhibition ausgegangen werden. Mittels der Durchflusszytometrie wurde sichergestellt, dass sich die Mehrzahl der Zellen zu diesem Zeitpunkt in der G1-Phase des Zellzyklus befand. Die Zelldichte sollte zum Zeitpunkt der Behandlung nicht zu groß sein, da in einem solchen Fall biologische Effekte wie die Apoptose auch ohne Zellgift hervorgerufen werden können.

Nach dem Abgießen des Mediums aus den Kulturflaschen und dem Spülen der Zellen mit PBS wurden sie mit TSA verdünnt mit DMEM in den verschiedenen Konzentrationen (0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) oder mit DMEM ohne TSA (Kontrollen), verschieden lange inkubiert (0 h, 4 h, 8 h, 12 h). Nach der Exposition wurden die Zellen sofort, also ohne Erholungsphase zu den entsprechenden Proteinlysaten verarbeitet.

### 3.2.3 RNA-Interferenz

#### 3.2.3.1 *Prinzip und Protokoll*

Im Jahre 1998 wurde erstmals ein neuer Schutzmechanismus gegen die Invasion von fremdem Genmaterial in dem winzigen Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben [118]. Er wurde als RNA-Interferenz identifiziert. Dabei handelt es sich um einen wirksamen und weit verbreiteten Mechanismus zur gezielten Geninaktivierung.

1984 machten Mizuno et al. [119] den ersten erfolgreichen Versuch, in Bakterien die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren. Dies erfolgte durch komplementäre RNA ((engl.) „antisense RNA“, asRNA), welche inzwischen ein beliebtes Mittel zur weitgehenden Ausschaltung von Genen geworden ist. Auch die asRNA wirkt wahrscheinlich über RNA-Interferenz. Man stellt sich vor, dass ein Hybrid aus asRNA und mitochondrialer RNA (mRNA) entsteht, welcher als Doppelstrang-RNA (dsRNA) den Mechanismus der RNA-Interferenz auslöst: die dsRNA wird durch ein Homolog der dsRNA-spezifischen RNase III in siRNA ((engl.) „small interfering

RNA“) zerlegt. Diese siRNA wird von einem „RNA induced silencing complex“ (RISC) gebunden - ein Proteinkomplex, welcher die Interaktion zwischen siRNA und der Ziel-mRNA ermöglicht. Dies führt letztendlich zur Degradation der Ziel-mRNA und somit zur Repression des entsprechenden Gens. Die Repression der Gene durch RNA-Interferenz ist im Gegensatz zum „Knock out“ durch Genunterbrechung nicht immer vollständig. Daher spricht man von „Knock Down“, wodurch die verminderte Expression der Gene beschrieben wird.

Die LN229-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. C. Hagemeier durch Dr. M. Truss (Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Berlin, Campus Mitte) stabil transfiziert. Dabei wurde das konservierte Exon (Exon 2, siehe Abb. 1.1) von *ING1* (5'-GGAGCTAGACGAGTGCTAC-3') ausgeschaltet, um gleichzeitig eine verminderte Expression aller Isoformen zu erzielen. Als Kontrolle diente eine LN229-Zelllinie, die mit *siEGFP* (5'-GCUACCUGUCCAUGGCCA-3') stabil transfiziert wurde. Als Selektionsreagenz wurden 4 µg Puromycin pro mL Standardmedium benutzt, welches in den untransfizierten LN229-Zellen den Zelltod auslöst [114], gegen das die mit siRNA transfizierten Zellen jedoch resistent sind.

### 3.2.4 Transformation, Bakterienzüchtung, Plasmidpräparation und Transfektion

#### 3.2.4.1 Prinzip

Bei der Transfektion wird fremdes Genmaterial in eine Wirtszelle überführt, welches dieser erlaubt, bereits besessene Leistungen in größerem Maße oder bisher nicht besessene Leistungen überhaupt erst auszuführen. Die einfachste Methode, isolierte spezifische DNA-Sequenzen zu vermehren, ist die Einschleusung von Plasmiden, die die entsprechenden Sequenzen enthalten, in Bakterien, welche eine enorme Vermehrungsfähigkeit besitzen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Die auf diese Weise vermehrten Plasmide können schließlich aus den Bakterien isoliert und beispielsweise mit Hilfe lipophiler Substanzen in andere Zellen transfiziert werden. Bei Plasmiden handelt es sich um extrachromosomale, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die aus einigen tausend bis hunderttausend Basenpaaren (bp) bestehen. Bakterienzellen verfügen häufig über derartige DNA-Moleküle, welche Antibiotikaresistenzen oder Gene für die Konjugation von Bakterienzellen tragen.

Bei den von uns verwendeten Plasmiden handelt es sich um einen pCI Vektor mit 4008 bp. Er besitzt eine „multiple cloning site“ für verschiedene Restriktionsenzyme. Die Klonierungsseiten für die für uns entscheidende *ING1a*- und *ING1b*-DNA liegen an den EcoR 1- (erste aus *Escherichia coli* (E. coli) Stamm R gewonnene Nuklease, 1063 bp) und Xba 1-Schnittstellen

(1081 bp). Der pCI *ING1a*-Vektor exprimiert die ING1-Isoform p47<sup>ING1a</sup> und der pCI *ING1b*-Vektor das Protein p33<sup>ING1b</sup>.

Des Weiteren trägt der Vektor ein Antibiotikaresistenzgen für prokaryontische Zellen mit einer Resistenz gegenüber Ampicillin, welches daher als Selektionsantibiotikum diente.

#### 3.2.4.2 Protokoll

##### Transformation

Die anschließenden Arbeiten erfolgten zur Schaffung einer möglichst sterilen Arbeitsumgebung an einer Butangasflamme eines Bunsenbrenners. 50 µL *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 8 µL (entsprechend 0,1 µg) Plasmid-DNA durch leichtes Klopfen vermischt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Es folgte eine 30-sekündige Erwärmung der Bakterienzellen im 42 °C warmen Wasserbad und dann die erneute Lagerung auf Eis. Schließlich wurden 250 µL SOC-Medium zugegeben und die mit Parafilm verschlossenen Reaktionsgefäße 1 h bei 37 °C und 225 Umdrehungen pro Minute ( $\text{min}^{-1}$ ) in einem Schüttelinkubator inkubiert. Dieser Bakterienstock konnte nun bei -80 °C gelagert werden.

##### Bakterienzüchtung

Zur Herstellung der Agarplatten wurden 15 g Agar in 1 L LB-Medium gelöst. Dieses Gemisch wurde autoklaviert und dann unter einer Reinraumwerkbank nach Zugabe von 5 mL Ampicillin steril in Petrischalen gegossen. Die fertig gegossenen Agarplatten konnten nun abkühlen und wurden dann bei 4 °C steril gelagert oder sofort weiterverwendet.

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten erneut unter sterilen Bedingungen an einer Butangasflamme. Aus denen bei -80 °C gelagerten *E. coli*-Bakterienstocks wurden jeweils 200 µL mittels eines in 100 % Ethanol getränkten und in der blauen heißen Flamme des Bunsenbrenners abgeflammt Glasstabs auf einer bei 37 °C 30 min vorgewärmten Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden zur Vermehrung der Bakterien über Nacht umgedreht bei 37 °C gelagert. Nach 12 h wurde mittels einer Pipettenspitze eine isolierte Kolonie von der Selektivplatte entnommen und in ein Reagenzröhrchen überführt, welches mit 5 mL LB-Medium und 100 µg/mL Ampicillin steril befüllt war. Es folgte eine 8-stündige Inkubation bei 37 °C und 300  $\text{min}^{-1}$  in einem Schüttelinkubator, um weiteres Wachstum zu erreichen. Anschließend wurden 50 µL dieser Startkultur in 25 mL sterilem LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin verdünnt. Es folgte eine 16-stündige Inkubation bei 37 °C und 300  $\text{min}^{-1}$  in einem

Schüttelinkubator. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C konnte das Pellet bei -20 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

#### Plasmidpräparation

Es folgte die Plasmidisolierung nach Qiagen mittels gebrauchsfertig zusammengestellten Lösungen. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde leicht abgewandelt wie folgt verwendet:

Nach Zugabe von RNase (100 µg/mL) zum Lösungspuffer P1 erfolgte die Resuspension des Bakterienpellets in 8 mL Puffer. Anschließend wurden 8 mL des Lysepuffers P2 zu den nun gelösten Zellen dazu pipettiert und durch mehrmaliges Umdrehen der Reaktionsgefäße vorsichtig mit den Zellen gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnten 8 mL des auf 4 °C vorgekühlten Neutralisationspuffers P3 dazugegeben und erneut durch vorsichtiges Umdrehen der Reaktionsgefäße gemischt werden. Das Gemisch wurde 20 min auf Eis inkubiert und dann 1 h bei 4 °C und 4300 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, das Pellet verworfen.

Während der Zentrifugation wurden die Qiagen Säulen 100 mit 4 mL Äquilibrierungspuffer gewaschen. Auf die äquilibrierten Säulen wurde nun der gereinigte Überstand pipettiert, so dass die Plasmid-DNA an die Säulen binden konnte. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit 10 mL Waschpuffer gewaschen. Durch die Zugabe von 5 mL Elutionspuffer konnte die DNA von den Säulen gelöst werden und das Eluat wurde bei 4 °C über Nacht gelagert.

Durch Zugabe von 3,5 mL Isopropanol zu dem Eluat und einstündiger Zentrifugation bei 4300 x g, erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, das Pellet vorsichtig mit 2 mL 70 %igem Ethanol gereinigt. Es folgte erneut die einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 4300 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min an der Luft getrocknet. Jetzt wurde das Pellet in 100 µL TE-Puffer resuspendiert und anschließend 10 min im 56 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Aliquotierung konnten die Zellen für einen Monat bei 4 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden.

#### Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der Plasmidisolierung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Es wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet: 0,5 g Agarose wurde in 50 mL 1fach TBE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht, dann abgekühlt und anschließend mit 1 µL Ethidiumbromidlösung

versetzt. 2  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA wurden mit 1  $\mu\text{L}$  A. dest. und 3  $\mu\text{L}$  Agarosegelprobenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wurde die 1 kb (Kilobase) Leiter von Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 100 mA über 45 min. Das Gel konnte anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert werden.

#### Quantifizierung der Plasmid-DNA

Nach der Verdünnung der Plasmide 1:100 mit A. dest. wurden sie in Quarzküvetten pipettiert und die Absorption photometrisch bei 260 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:  $\text{Konzentration DNA} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/mL}$

#### Transfektion

Eine Zellkulturflasche mit synchronisierten LN229-Zellen, erreicht durch ungefähr 85 %ige Konfluenz der Zellen, wurde trypsinisiert, die Zellen anschließend in 5 mL Medium resuspendiert und 10 min bei  $1000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und dann erneut 10 min bei  $1000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 mL Transfektionsmedium (ohne Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Anschließend wurde jeweils 1 mL der Zellsuspension (entsprechend ungefähr  $10^5$  -  $10^6$  Zellen) in 60 mm Petrischalen mit vorgelegten 4 mL Transfektionsmedium pipettiert und die Zellen für 24 h inkubiert. Pro 60 mm Petrischale wurden 8  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, verdünnt in 500  $\mu\text{L}$  DMEM, eingesetzt. Des Weiteren wurden pro Schale 20  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> mit 500  $\mu\text{L}$  DMEM gemischt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zu jeder Plasmidverdünnung dazugegeben. Um den toxischen Effekt des Gemisches Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>®</sup> mit Antibiotikum für die Zellen zu vermeiden, war das Transfektionsmedium antibiotikafrei.

Nach 20-minütiger Inkubation des DNA-Lipofectamine<sup>®</sup>-Gemisches bei Raumtemperatur wurde jeweils 1 mL zu jeder 60 mm Petrischale dazupipettiert. Als Kontrolle wurde eine Petrischale nur mit Lipofectamine<sup>®</sup> ohne DNA inkubiert. Es erfolgte nach vorsichtigem Schwenken der Schalen die 24-stündige Inkubation im Brutschrank und dann die Trypsinierung und Umsetzung der Zellen in  $75 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflaschen.

Bei fehlendem Antibiotikaresistenzgen für eukaryontische Zellen erfolgte lediglich eine transiente Transfektion der Zellen mit den Vektoren. Die Lyse der Zellen erfolgte 2, 3, 4 und 5 Tage nach der Transfektion, um die Dauer der Transienz zu ermitteln. Mittels der Western Blot



Analyse (siehe 3.2.6) wurden die ING1-Proteine detektiert und eine suffiziente Transfektion bestätigt.

### 3.2.5 Zellyse und Proteinextraktion

#### 3.2.5.1 Durchführung

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis, um Proteolyse und Denaturierung von Proteinen zu vermindern. Nach Abkippen des Mediums wurden die Zellkulturflaschen zweimal mit 10 mL eiskaltem PBS gespült. Nach erneutem Befüllen der Flaschen mit 10 mL eiskaltem PBS wurden die Zellen 5-7 min mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Dann wurde das PBS mit den darin befindlichen Zellen mit einer Pipette abgesaugt und in ein 15 mL Reagenzröhrchen überführt. Die Röhrchen mit den im PBS enthaltenen Zellen wurden 10 min bei 3500 min<sup>-1</sup> und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µL eiskaltem PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß erneut 5 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µL Proteinextraktionspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde schließlich 20 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Das Zellysate (Überstand) konnte nun aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.

### 3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 3.2.6.1 Prinzip

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford. Bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau positiv geladene Proteine, so findet eine Änderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) statt. Dieser Farbumschlag kann mit einem Photometer bei 595 nm erfasst werden und lässt dann einen Rückschluss auf die Menge der in der Probe enthaltenen Proteine zu.

#### 3.2.6.2 Protokoll

Die Proteinextrakte wurden 1 : 10 und 1 : 20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Um die gemessenen Extinktionswerte später einer bestimmten Proteinkonzentration zuordnen zu können,

wurde gleichzeitig eine Standardreihe mit in A. dest. gelöstem BSA und somit bekannten Proteinkonzentrationen (von 0 mg/mL - 1 mg/mL) hergestellt und gemessen.

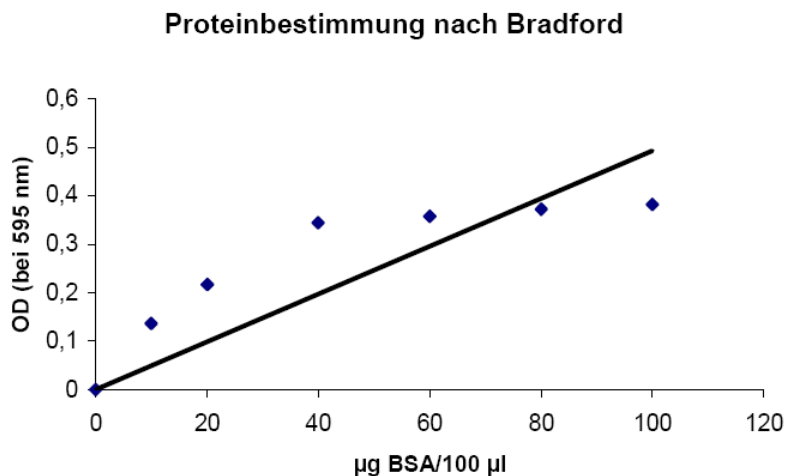
Das Bradford-Reagenz wurde vor Benutzung 1 : 4 mit A. dest. verdünnt und anschließend gefiltert. 100 µL jeder Proben- beziehungsweise BSA-Verdünnung wurden mit 5 mL verdünntem Bradford-Reagenz mittels eines Vortexgerätes gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit zwischen 15 min - 25 min erfolgte die photometrische Messung in Kunststoff-Einmalküvetten bei 595 nm.

Die gemessene optische Dichte (OD) wurde gegen die bekannte Konzentration der Standardreihe in einem Koordinatensystem aufgetragen. Ein Eichgraph wurde interpoliert (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.1). An Hand der Eichkurve konnten nun die entsprechenden Proteinkonzentrationen abgelesen werden.

**Tab. 3.1:** Proteinbestimmung nach Bradford

| Protein-Konzentration (mg/mL)<br>der BSA-Standardreihe | 0     | 0,1  | 0,2   | 0,4   | 0,6   | 0,8   | 1     |
|--|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD (bei 595 nm)  | 0,234 | 0,37 | 0,451 | 0,579 | 0,592 | 0,607 | 0,616 |

**Tab. 3.1** stellt ein Beispiel für eine Proteinmessung dar. Es sind die gemessenen OD bei 595 nm bei den jeweiligen Proteinkonzentrationen angegeben.



**Abb. 3.1** Graphische Darstellung der BSA-Standardreihe und des interpolierten Eichgraphen. Mit Hilfe einer solchen Grafik konnten die ermittelten OD der Proteinlysate einer entsprechenden Proteinkonzentration zugeordnet werden

Mi Hilfe folgender Formel wurde die an der Eichkurve abgelesene Konzentration eines Proteinlysats in den Proteingehalt in mg/mL umgerechnet:

$$\frac{\mu\text{g} / 100 \mu\text{L} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnung}}{1000} = \text{Proteingehalt in mg/mL}$$

Faktor = 10

Verdünnung = 10 bzw. 20

### 3.2.7 Western Blot

(„to blot“, engl.: mit Löschpapier aufsaugen)

Der Western Blot ist eine biochemische Methode, welche im Rahmen der Proteinanalytik in großem Umfang angewandt wird. Er ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine und deren Expressionsspiegel mittels spezifischer Antikörpern und gibt Informationen über deren Molekulargewicht.

Die Technik wurde von der Southern Blot Technik (Southern-Hybridisierung) abgeleitet, welche 1975 von Edwin Southern für die Analyse von DNA-Fragmenten entwickelt wurde. Eine weitere Technik, die sich des Prinzips des Blottens bedient, ist der Northern Blot. Er dient der RNA-Analyse.

Die Western Blot-Methode setzt sich aus mehreren aufeinander folgenden Schritten zusammen:

#### SDS-Gelelektrophorese

##### 3.2.7.1 Prinzip

Aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen wandern Proteine im elektrischen Feld. So kann eine Auftrennung der verschiedenen Proteine bei der Wanderung durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff erreicht werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zu der Feldstärke und der Ionenladung und umgekehrt proportional zu dem Teilchenradius und der Viskosität des Stoffes. Wichtig ist auch das Verhältnis zwischen Teilchenradius und Porenweite des Trägermaterials - je größer das Teilchen, desto langsamer die Wanderungsgeschwindigkeit. Bei der von uns verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nur nach ihrem Teilchenradius, also ihrem Molekulargewicht aufgetrennt - die niedermolekularen Proteine sind nach Abschluss der Elektrophorese der Anode am nächsten.

Unterschiedliche Ionenladungen beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen. Diese Ladungsunterschiede der Ionen können durch Zugabe von SDS (anionisches Detergens) ausgeglichen werden. Es entstehen SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Verhältnis zwischen Masse und Ladung (1,4 g SDS pro 1 g Protein), die in die Richtung der positiven Elektrode wandern. Zusätzlich denaturiert SDS die Proteine, so dass sie ihre spezifische Quartär-, Tertiär- und zum Teil sogar Sekundärstruktur verlieren und somit in einer mehr oder weniger einheitlichen Form als Polypeptid vorliegen. Das Erhitzen der Proteine vor der Elektrophorese trägt ebenfalls zur Denaturierung bei.

Das als Trägermaterial verwendete polymerisierte Acrylamid bestehend aus Polyacrylamid, Bisacrylamid, TEMED und APS bildet ein engmaschiges Netzwerk, dessen Poren je nach Acrylamidkonzentration und Vernetzungsgrad eine Größe zwischen 3 nm und 6 nm aufweisen. Das APS, welches leicht Radikale bildet, initiiert die Polymerisation des Acrylamids und Bisacrylamids. TEMED dient als Katalysator für die Polymerisation, indem es die Radikalbildung des APS erleichtert.

Bei der von uns verwendeten diskontinuierlichen Gelelektrophorese besteht die Trägermatrix aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporigen Trenngel. Bei diesem Verfahren wird am häufigsten das von U.K. Laemmli eingeführte Tris-Glycin-Puffersystem benutzt. Die Proben sowie die Gele enthalten Chloridionen, der Laufpuffer Glycinionen, die als Ladungsträger dienen. Da der pH-Wert des Sammelgels mit 6,8 sehr nahe am isoelektrischen Punkt des Glycins liegt, hat dieses am Beginn der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität. Es ist ein Folge-Ion. Die Chloridionen dagegen haben eine sehr hohe Mobilität - sie sind die Leit-Ionen. Es entsteht eine Spannung zwischen den Ionen. Im Bereich der Chloridionen findet sich eine niedrige Feldstärke, im Bereich der Glycinionen eine hohe. Dadurch befinden sich die dazwischen liegenden Proteine in einem Feldstärkegradienten, so dass sie sich je nach eigener elektrophoretischer Mobilität fokussieren. Es erfolgt eine Vortrennung der einzelnen Proteinklassen. Im engporigen Trenngel wandelt das Glycin sich durch den höheren pH-Wert in geladenes Glycinat um und überholt so die Proteinfront. Der Feldstärkegradient geht verloren und die Proteine trennen sich nun nach ihrer Größe auf. Als Ergebnis erhält man eine hohe Trennschärfe und Nachweisempfindlichkeit.

#### *3.2.7.2 Protokoll*

Die bei der Proteinextraktion gewonnenen Proteinproben wurden mit einem SDS-Probenpuffer und einem reduzierenden Agens gemischt und anschließend für 5 min in einem Blockheizgerät auf

95 °C erhitzt. Die Proteingemische mit einem Gesamtvolumen von 15 µL beziehungsweise 10 µL, welche jeweils 20 µg beziehungsweise 13 µg Protein enthielten, wurden nun in die Taschen der 10- beziehungsweise 15-well-Gele pipettiert.

Die von uns verwendeten Gele hatten entweder einen durchgehenden Gradienten von 4 % - 12 % (kommerziell erworben) oder teilten sich auf in Sammel- und Trenngel, wobei ersteres 4 %ig und letzteres zur Analyse der verschiedenen ING1-Isoformen, FADD und der Caspase 3 12 %ig oder zur Untersuchung der acetylierten Histone 15 %ig (eigene Herstellung) war. In einer mit Laufpuffer (MOPS-Laufpuffer bei den kommerziell erworbenen Gelen oder Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer bei den selbst hergestellten Gelen) gefüllten Elektrophoresekammer wurden die Proteine nun 15 min bei einer Spannung von 60 Volt (V) und anschließend 60 min bei 200 V zum Nachweis der ING1-Isoformen, FADD und der Caspase 3 beziehungsweise 120 min bei 100 V zum Nachweis der acetylierten Histone aufgetrennt.

Transblot

### *3.2.7.3 Prinzip und Protokoll*

Beim Blotten werden die aufgetrennten Proteine vom Gel elektrophoretisch auf ein anderes Trägermaterial, im vorliegenden Fall Nitrocellulosemembranen, übertragen. Dieser Schritt ermöglicht die leichtere Handhabung der Membran im Vergleich zum Gel, bei dem Reaktionen und Waschvorgänge behindert durch Diffusionsvorgänge langsamer ablaufen würden. Die Bindung der Proteine an die Nitrocellulose erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen.

Pro Gel wurden vier „Blotting-Pads“, 2 Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran vor Gebrauch 15 min mit dem Transferpuffer inkubiert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese den Kammern entnommen, die Plastikhüllen der Fertiggele mit Hilfe eines Messers aufgebrochen und das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde nun auf ein Filterpapier gelegt, die Membran auf das Gel und ein weiteres Filterpapier auf die Membran. Alle Luftblasen wurden mittels eines Glasstabes entfernt, da sie den Transfer stören würden. Das „Sandwich“ wurde nun, umgeben von zwei „Pads“ auf jeder Seite, mit der Membran zur Anode und dem Gel zur Kathode gerichtet, in die Blottingkammern eingelegt. Die Kammern wurden mit Transferpuffer (NuPAGE®-Transferpuffer bei den kommerziell erworbenen Gelen oder Tris-Glycin-Transferpuffer bei den selbst hergestellten Gelen) gefüllt. Der Transfer erfolgte über 1 h bei 170 mA und 20 V.

Die Gele wurden anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau-, die Membranen mit einer Ponceau-Färbelösung angefärbt, um die im Gel verbliebenen beziehungsweise die auf die Membran transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen und so den Transfer zu überprüfen. Die Membran konnte mit Tween-PBS (T-PBS) (Nachweis der ING1-Isoformen, FADD, der Caspase 3) beziehungsweise PBS (Nachweis der acetylierten Histone) wieder entfärbt werden.

Blockieren

#### *3.2.7.4 Prinzip und Protokoll*

Vor der Inkubation der Membran mit den entsprechenden Antikörpern (Ak) sollten unspezifische Proteinbindungsstellen der geblotteten Proteine auf der Membran blockiert werden. Bei uns geschah dies durch die einstündige Inkubation der Membran in 10 %igem Magermilchpulver.

Immunochemische Detektion

#### *3.2.7.5 Prinzip und Protokoll*

Die geblotteten, auf der Membran befindlichen Proteine beziehungsweise Antigene lassen sich durch spezifische, gegen das zu untersuchende Protein gerichtete Antikörper anfärben. Zuerst erfolgte die Inkubation mit den primären, gegen das zu untersuchende Antigen/Protein selbst gerichteten Ak über Nacht. Es wurden CAB-Ak I - IV [120], welche die unterschiedlichen ING1-Isoformen erkennen 1 : 1 : 1 : 1 : 1, Anti-Acetyl-H3 beziehungsweise -H4, die gegen acetyliertes Histon H3 beziehungsweise Histon H4 gerichtet sind, 1 : 1000, Anti-Caspase 3 1 : 200, Anti-FADD 1 : 2000 und Anti- $\beta$ -Aktin 1 : 2000 mit 5 %igem Magermilchpulver verdünnt, benutzt. Nach 12 h Inkubation und 15-minütigem Waschen der Membranen in T-PBS (0,05 %) bei den CAb, Anti-Caspase 3 und Anti-FADD beziehungsweise PBS bei den Histon-Ak, um überschüssige primäre Ak zu beseitigen, erfolgte die einstündige Inkubation mit dem jeweiligen, gegen den primären Ak gerichteten, sekundären Ak in einer 1 : 2000 - 1 : 1000 Verdünnung. Die primären und sekundären Ak stammen aus verschiedenen Spezies (Maus, Kaninchen, Pferd und andere). Die sekundären Ak sind gegen Antigene der entsprechenden Spezies gerichtet, beispielsweise ein im Pferd produzierter Ak gegen Antigene der Maus („horse anti-mouse“ Ak). Wenn es sich bei dem primären Ak um die CAB-Ak, Anti-FADD, Anti-Caspase 3 oder Anti- $\beta$ -Aktin handelte, wurde ein Anti-Maus-Ak als sekundären Ak benutzt, bei den Ak gegen acetyliertes Histon H3 beziehungsweise H4 wurde ein gegen Kaninchenimmunglobuline gerichteten sekundären Ak verwendet. Der sekundäre Ak enthält zusätzlich eine Markierung,

welche im weiteren Verlauf leicht nachzuweisen ist, um die Position des gesuchten Proteins zu ermitteln. Er kann mit einem Enzym markiert (Alkaline Phosphatase, Peroxidase-konjugiert), biotinyliert oder radioaktiv markiert sein. Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl biotinylierte als auch mit Peroxidase konjugierte sekundäre Ak benutzt. Bei Verwendung der biotinylierten Ak war vor der Detektion zusätzlich eine einstündige Inkubation mit Streptavidin (Peroxidase Konjugat) nötig. Alle Membranen wurden nach erfolgter immunochemischer Detektion (siehe 3.2.6.6) in T-PBS (0,05%) beziehungsweise PBS über Nacht gewaschen und dann erneut mit Milchpulver blockiert. Anschließend wurde mit dem als Ladungskontrolle dienende Anti- $\beta$ -Aktin-Ak in einer Verdünnung von 1 : 2000 wie zuvor beschrieben fortgefahren. Aktin ist ein Protein des Zytoskeletts, welches in verschiedenen Spezies und Geweben sehr ähnliche immunologische und physikalische Eigenschaften hat und sich daher gut zur Kontrolle gleichgeladener Proteinmengen eignet.

## Entwicklung

### 3.2.7.6 *Prinzip und Protokoll*

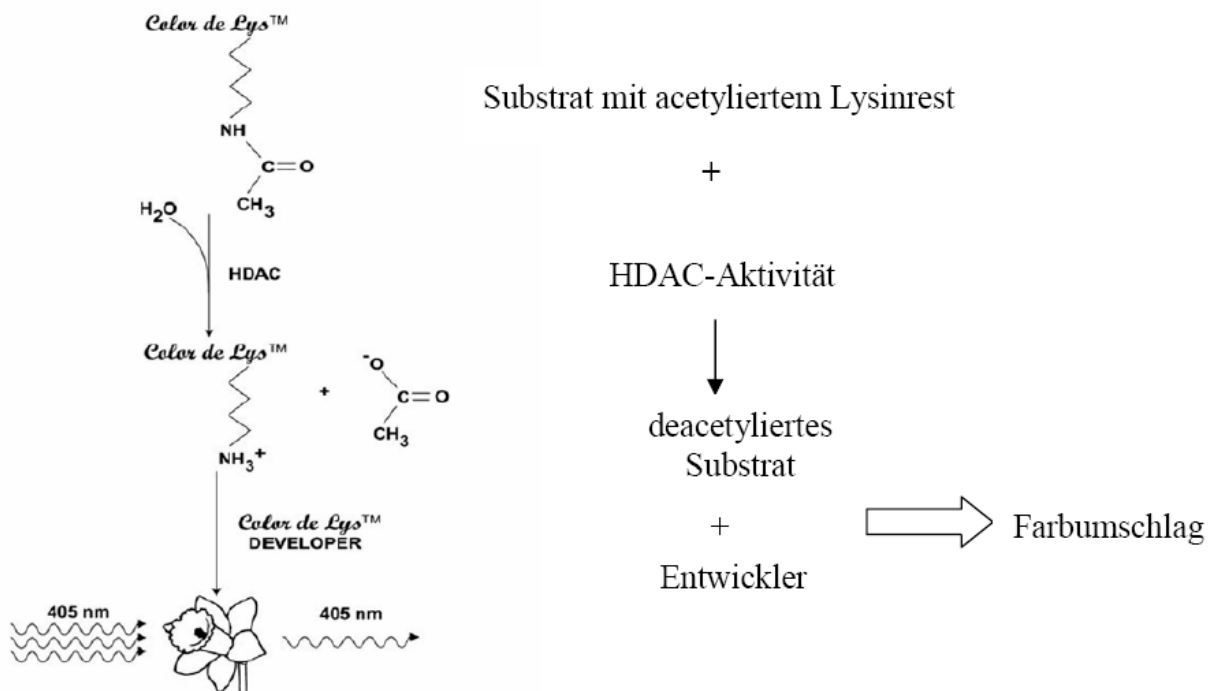
Die Detektion des durch die sekundären Ak oder das Streptavidin hervorgerufenen Signals fand mit Hilfe des „ECL-Western blotting detection system“ statt. Das Prinzip der ECL-Detektion beruht auf der Lumineszenz, die durch eine chemische Reaktion hervorgerufen wird. Dabei wird Luminol durch das an die sekundären Antikörper konjugierte Enzym HRP oxidiert, wobei Phenole die Lichtemission 1000fach verstärken. Die Wellenlänge der Emission liegt bei 428 nm. Durch Auflegen eines autoradiographischen Films können diese Signale detektiert werden. Das ECL wurde wie vom Hersteller empfohlen gemischt und die Membranen mit dem Gemisch 1 - 3 min inkubiert. Anschließend erfolgte die 2minütige - 45minütige Belichtung (je nach zu detektierendem Protein und Antikörper) eines Films in einer Hyperkassette in der Dunkelkammer. Zuletzt erfolgte die Entwicklung des Films in einer Filmentwicklermaschine.

## 3.2.8 HDAC-„Assay“

### 3.2.8.1 *Prinzip und Protokoll*

Dieser „Assay“ wurde entwickelt, um die Aktivität der HDAC in verschiedenen Proben direkt zu messen. Abb. 3.2 veranschaulicht die Reaktionsschritte des Enzymassays: Das Color de Lys<sup>TM</sup>-Substrat besitzt eine Seitenkette mit acetylierten Lysinresten. Nach Inkubation des Substrats mit

Proteinproben, die HDAC1- oder HDAC2-Aktivität besitzen, kommt es zur Deacetylierung der Lysinreste. In einer zweiten Reaktion werden dann die deacetylierten Substratmoleküle durch den Color de Lys<sup>TM</sup>-Entwickler, welcher einen gelben Farbumschlag bewirkt, sichtbar gemacht. Die HDAC-Aktivität in der jeweiligen Probe kann somit direkt bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Photometer gemessen werden, da sie proportional zur gemessenen OD ist.



**Abb. 3.2** Reaktionsschema des „Colorimetric Activity Assay“ (aus der Herstellerinformation, abgewandelt). Die Abbildung veranschaulicht das Prinzip der HDAC-Aktivitätsmessung mit Hilfe des HDAC-„Assay“. Durch die HDAC-Aktivität der eingesetzten Proteinlysate werden die acetylierten Lysinreste des Substrats deacetyliert. Das deacetylierte Substrat wird in einer weiteren Reaktion mit Hilfe eines Entwicklers, welcher einen Farbumschlag bei 405 nm bewirkt, sichtbar gemacht. Dieser Farbumschlag kann photometrisch erfasst werden.

Der „Assay“ wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Als Proteinproben wurden die in 3.2.5 hergestellten Proteinextrakte verwendet. Das 50 mM Substrat wurde mit dem mitgelieferten Puffer zu einem 3 mM Substrat für die zu messenden Proteinproben und zu einem 2 mM Substrat für das ebenfalls im „Kit“ enthaltene „human cervical cancer cell line“- (HeLa-) Kernextrakt verdünnt, welches als Positivkontrolle diente, da HeLa-Zellen eine sehr hohe HDAC-Aktivität besitzen. Als Negativkontrolle diente der benutzte Puffer, welcher ebenfalls mit 2 mM Substrat versetzt wurde. Nach 90-minütiger Inkubation der Proben und Kontrollen mit dem Substrat bei 37 °C in einer Mikrotiterplatte wurde der mit TSA versetzten Entwickler



dazugegeben, um die HDAC-Reaktion zu stoppen und den gelben Farbumschlag zu bewirken. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C konnte nun photometrisch die Extinktion bei 405 nm gemessen werden. Durch die Durchführung des „Assay“ mit dem mitgelieferten deacetylierten Standard konnte die Aktivität angegeben in  $\mu\text{M}$  umgesetztes Substrat ermittelt werden.

### 3.2.9 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting)

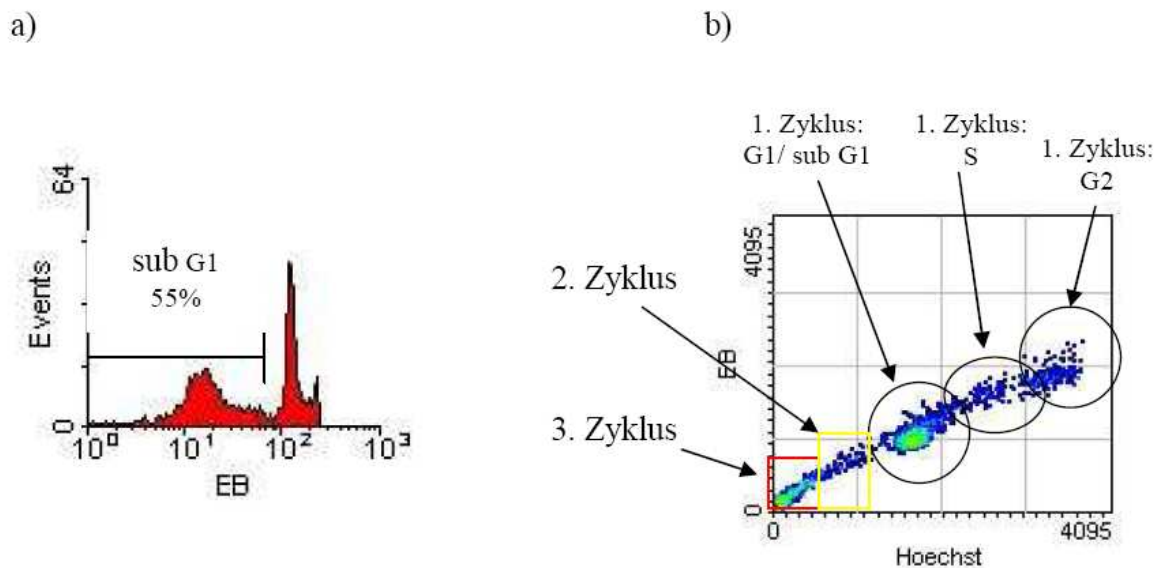
#### 3.2.9.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie wandern Partikel, in dem vorliegenden Fall Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl. Dabei wird für jede einzelne Zelle die Lichtabsorption („forward scatter“) sowie die Lichtreflektion („side scatter“) gemessen. Sie ergeben die relative Größe und relative optische Dichte der Zelle. Da auch die emittierte Fluoreszenz gemessen wird, kann man durch den Einsatz fluoreszierender spezifischer Ak weitere Informationen erhalten. Diese Ak sind beispielsweise gegen bestimmte Oberflächenmoleküle oder auch die Nukleinsäure der Zelle gerichtet. Durch Nukleinsäure-bindende fluoreszierende Farbstoffe kann der DNA-Gehalt einer Zelle festgestellt werden. Eine andere häufige Anwendung stellt der Nachweis von Leukozytenmarkern (insbesondere „Cluster of Differentiation“- (CD-) Markern) auf Blutleukozyten mittels Anfärbung mit spezifischen Antikörpern, die gegen die verschiedenen Oberflächenantigene gerichtet sind, dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Durchflusszytometrie die Zellzyklusphase, in der sich die jeweilige Zelle zum Zeitpunkt der Ernte befand, und letztendlich der Prozentsatz der apoptotischen Zellen bestimmt. Der DNA-Gehalt einer Zelle verändert sich während des Zellzyklus. Vor der Mitose (M-Phase) verdoppelt sich in der Synthese- (S-) Phase die chromosomale DNA. Typisch für apoptotische Zellen ist die Fragmentierung der DNA durch enzymatische Verdauung. Oft werden diese DNA-Fragmente von der Zelle freigesetzt, so dass der DNA-Gehalt der apoptotischen Zelle letztlich vermindert ist. Man spricht von einer subG1-Phase.

Durch Anfärben der DNA mittels fluoreszierender, DNA-interkalierender Stoffe kann man sich nun den unterschiedlichen Gehalt der Zellen an DNA zu Nutze machen, um die jeweilige Zellzyklusphase der einzelnen Zelle zu ermitteln. Bei dem von uns verwendeten Ethidiumbromid (EB), welches rot-orange bei einer Wellenlänge von 620 nm fluoresziert, handelt es sich um einen solchen Stoff. Auch das Bisbenzimid Hoechst 33258 gehört zu diesen Stoffen. Es dient der

DNA-Fluoro-Chromierung, indem es überwiegend von außen an das Basenpaar Adenin-Thymin bindet. Es fluoresziert blau bei 478 nm. Durch die Zugabe von 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU), mit welchem die proliferierenden Zellen von Beginn an (zeitgleich mit der Zugabe von TSA beziehungsweise dem Mediumwechsel bei den Kontrollzellen) inkubiert werden, wird mit jedem Zellzyklus eine Abnahme der blauen Fluoreszenz erfolgen, da das Thymidin-Analogon BrdU in der S-Phase statt Thymidin in die DNA eingebaut [121] wird, so dass die nun durch Replikation entstehende DNA sich von der bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen unterscheidet. Hoechst 33258 bindet nicht an BrdU. Gleichzeitig mit BrdU wird den Zellen 2'-Desoxycytidin zugesetzt, welches den Nukleotidstoffwechsel optimiert, der durch BrdU beeinflusst wird. Mit beiden Färbungen wird in mindestens drei aufeinander folgenden Zellzyklen eine Auftrennung der proliferierenden Zellen mit quantitativer Analyse der jeweiligen G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase und der nicht proliferierenden G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Fraktion möglich (siehe Abb. 2.3 b)). Durch Zytogramme der gleichen Proben, die den DNA-Gehalt durch logarithmische Auftragung der EB-Färbung anzeigen, konnten man zwischen intakten Zellen und Zellen in der subG1-Phase unterscheiden (siehe Abb. 2.3 a)).



**Abb. 3.3** Graphische Darstellung der Durchflusszytometrisch gemessenen Zellzyklusphasen. a) Ethidiumbromid-Färbung: die x-Achse repräsentiert den durch die EB-Färbung ermittelten DNA-Gehalt:  $> 10^2$  = intakte Zellen,  $< 10^2$  = Zellen in der subG1-Phase, die y-Achse repräsentiert die Anzahl der gemessenen Zellen mit definiertem DNA-Gehalt, b) die Zellzykluskinetik ermöglicht das Ablesen der jeweiligen Anteile der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklen und Phasen des Zellzyklus. Die x-Achse repräsentiert die BrdU-/Hoechst-Fluoreszenz, die y-Achse repräsentiert die EB-Fluoreszenz

### 3.2.9.2 *Protokoll*

Die Zellen wurden wie in 3.2.1.2 beschrieben kultiviert. Nach 48-stündiger Proliferation in einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche erfolgte die Trypsinierung und anschließende Zellzählung mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 6-„well-plates“ mit einem Durchmesser eines „wells“ von ungefähr 3,5 cm eingesät. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Behandlung mit TSA wie in 3.2.2 beschrieben, ein Mediumwechsel oder die Zellernte. Zusätzlich wurde dem Medium BrdU und 2'-Desoxycytidin in equimolarer Konzentration zugesetzt. Es wurden jeweils 60 µM der beiden Substanzen eingesetzt um eine scharfe Trennung der einzelnen Zellzyklusphasen zu erhalten. Nach der 8-stündigen Inkubation mit 0,5 µM TSA beziehungsweise ohne TSA wurde das Medium mit abgelösten Zellen in ein Reagenzröhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mittels Trypsinierung geerntet. Anschließend wurden sie zusammen mit den abgelösten Zellen in 10 mL PBS 2 min bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert, in 2 mL Gefriermedium (DMEM + 10% DMSO) resuspendiert und bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagert.

Nach Auftauen der Zellproben im Wasserbad bei Raumtemperatur wurden sie in Reagenzröhrchen überführt und bei 4 °C und 330 x g 7 min zentrifugiert. Zur Durchflusszytometrischen Messung erfolgte die Färbung der Zellproben bei indirektem Licht. Das Zellpellet wurde 15 min mit 1 mL 4 °C gekühlter Höchst-33258-Färbelösung unter regelmäßigem Schütteln inkubiert und anschließend 15 min unter den gleichen Bedingungen mit 4 °C kalter EB-Lösung. Die Quantifizierung der Zellzyklen und Subpopulationen erfolgte mit dem Durchflusszytometer in einer zweiparametrischen Darstellung der beiden Substanzen Hoechst 33258 und EB. Beide Fluorochrome wurden durch eine Quecksilberhochdrucklampe als UV-Quelle mit einer Extinktion von 365 nm angeregt. Von jeder Probe wurden ungefähr 10 000 Zellen analysiert.