

## 4 Ergebnisse

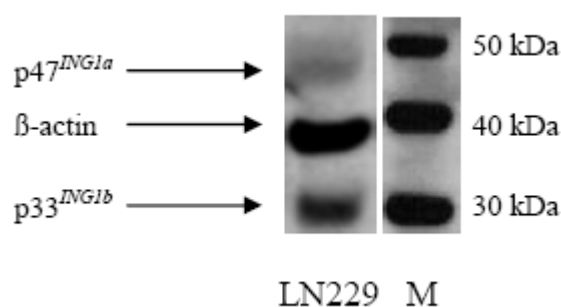
### 4.1 Gesamtproteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen der hergestellten Proteinlysate wurden nach der Methode von Bradford wie in 3.2.6 erläutert bestimmt. Sie bewegten sich zwischen 2 mg/mL und 6 mg/mL.

### 4.2 ING1-Proteinexpression in LN229-Zellen

Der Nachweis der Proteine der *ING1*-Isoformen  $p47^{ING1a}$  und  $p33^{ING1b}$  in den LN229-Mutterzellen, den transfizierten LN229-Zellen und den mit TSA behandelten Zellen erfolgte nach Herstellung der Proteinlysate wie in 3.2.5 erläutert mittels der Western Blot Analyse (siehe 3.2.7).

Die in Abb. 4.1 bei 30 kDa beobachtete Bande entspricht  $p33^{ING1b}$ . Diese Proteinisoform war in den hergestellten Proteinlysaten und durchgeführten Western Blots konstant nachzuweisen. Die Isoform  $p47^{ING1a}$  konnte mit Hilfe der CAB I-IV Ak ebenfalls nachgewiesen werden. Die Detektion der entsprechenden Bande bei 47 kDa im Western Blot war schwächer, als die der 30 kDa-Bande. Demnach werden die zwei *ING1*-Isoformen  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  in den LN229-Zellen exprimiert. Dies geschieht mit unterschiedlicher Intensität, wobei die Expression von  $p33^{ING1b}$  höher als die von  $p47^{ING1a}$  ist. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe Tallen et al. überein [5] und bestätigen die LN229-Glioblastomzelllinie neben ihren sonstigen Eigenschaften (siehe 3.1.1) als geeignetes Modell für die geplanten Untersuchungen.



**Abb. 4.1** Nachweis der zwei *ING1*-Isoformen in LN229-Zellen:  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$ . Western Blot mit einem Proteinlysate aus unbehandelten und nicht transfizierten LN229-Zellen. Mittels der CAB-Ak konnten die Proteine der zwei Isoformen von *ING1* mit unterschiedlicher Intensität detektiert werden. M = Marker

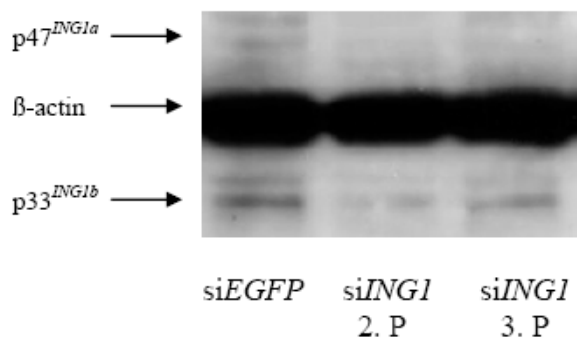
### 4.3 Transfektion

Da ING1 in malignen Gliomzellen reduziert exprimiert wird [3], sollten die Gliomzellen des vorliegenden Modells ING1 unterschiedlich stark exprimieren. *ING1* wurde zum einen mittels RNA-Interferenz in LN229-Zellen unterdrückt und zum anderen wurde die Expression der einzelnen *ING1*-Isoformen mit Hilfe von Plasmiden erhöht. Auf diese Weise konnten Ergebnisse von nicht transfizierten LN229-Zellen mit denen von LN229-Zellen mit erhöhten beziehungsweise erniedrigten ING1-Proteinspiegeln verglichen werden. Zusätzlich ermöglichte die vermehrte Expression der einzelnen *ING1*-Isoformen die Bestätigung der Spezifität der CAB-Ak.

#### 4.3.1 Reduktion der *ING1*-Expression durch RNAi

Die LN229-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. C. Hagemeier durch Dr. M. Truss (Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Berlin, Campus Mitte) stabil transfiziert (siehe 3.2.3). Es wurde das konservierte Exon (Exon 2, siehe Abb. 1.1) von *ING1* ausgeschaltet. Als Kontrolle diente eine LN229-Zelllinie, die mit *siEGFP* stabil transfiziert wurde.

Durch den Western Blot wurde die Verminderung der ING1-Proteine nachgewiesen. Die Proteinlysate der mit *siING1* transfizierten LN229-Zellen wurden zusammen mit Proteinlysaten der mit *siEGFP* transfizierten LN229-Zellen auf ein Acrylamidgel aufgetragen. In Abb. 4.2 ist sowohl eine Verminderung der  $p33^{ING1b}$ - als auch der  $p47^{ING1a}$ -Bande bei den mit *siING1* transfizierten LN229-Zellen im Vergleich zu den mit *siEGFP* transfizierten LN229-Zellen zu beobachten. Nach mehreren Zellteilungen der mit *siING1* stabil transfizierten LN229-Zellen war die Expression der ING1-Proteinisoformen mit zunehmender Tendenz wieder nachzuweisen. Bei der hier verwendeten 3. Passage nach Transfektion ist die verminderte Expression der ING1-Proteine zwar noch deutlich zu beobachten, im Vergleich zur 2. Passage nach Transfektion ist die  $p33^{ING1b}$  entsprechende Bande aber wieder stärker nachzuweisen. Für die weiteren Versuche mit den mit *siING1* stabil transfizierten LN229-Zellen wurden daher nur zweite, höchstens dritte Passagen nach Transfektion verwendet.



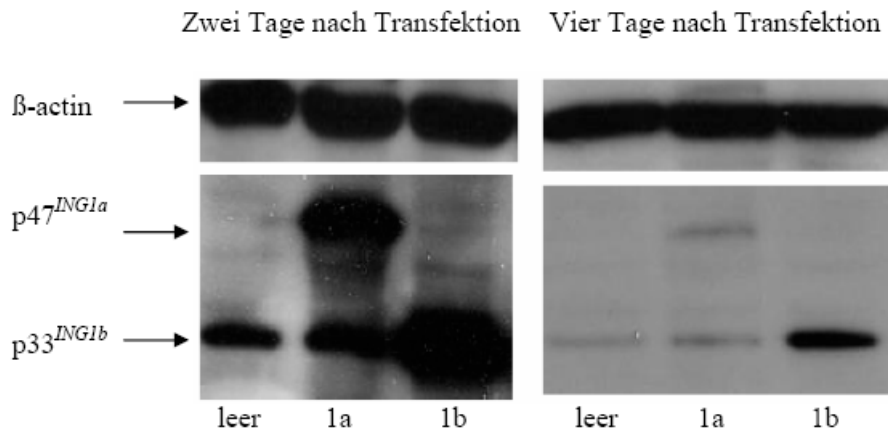
**Abb. 4.2** Die Western Blot Analyse von mit *siING1* transfizierten LN229-Zellen zeigt eine Verminderung von  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  nach der 2. Zellpassage (*siING1* 2. P) verglichen mit der Transfektionskontrolle (*siEGFP*). Weiter sieht man die Zunahme der ING1-Proteinexpression nach der 3. Zellpassage (*siING1* 3. P)

#### 4.3.2 Ektope Überexpression der ING1-Isoformen

Die Überexpression der zwei ING1-Isoformen  $p47^{ING1a}$  und  $p33^{ING1b}$  wurde durch transiente Transfektion der LN229-Zelllinie mit pCI-Plasmiden, wie in 3.2.4 beschrieben, erreicht. Als Kontrolle diente zum einen die Transfektion mit einem Leervektor und zum anderen alleinig mit Lipofectamine<sup>®</sup> behandelte LN229-Zellen, um Veränderungen der Proteinspiegel, die mit der Methode der Transfektion in Verbindung stehen könnten, später in die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse miteinbeziehen zu können.

Da die LN229-Zellen aufgrund eines fehlenden Antibiotikaresistenzgens des Vektors für eukaryontische Zellen nur transient transfiziert werden konnten, musste die Dauer der Transienz bestimmt werden. Dies erfolgte mittels der Western Blot Analyse von zwei, drei (nicht abgebildet), vier und fünf (nicht abgebildet) Tage nach Transfektion hergestellten Proteinlysaten. Wie in Abb. 4.3 zu sehen ist, sind die Banden der einzelnen ING1-Isoformen in den entsprechend transfizierten Zellen erhöht, was für das vermehrte Vorhandensein der jeweiligen ING1-Proteine, also deren ektope Überexpression, und damit für eine erfolgreiche Transfektion spricht. Bei den mit dem Vektor pCI *ING1a* transfizierten Zellen kommt es zu einer Erhöhung der  $p47^{ING1a}$  entsprechenden Bande und bei pCI *ING1b* zur Verstärkung der Bande, die  $p33^{ING1b}$  entspricht. Am vierten Tag nach Transfektion ist die Expression der einzelnen ING1-Isoformen zwar noch erhöht, sie werden aber geringer exprimiert als zwei Tage zuvor, was an den schwächeren Banden zu erkennen ist. Am fünften Tag nach der Transfektion war die Expression nur noch schwach erhöht (nicht abgebildet).

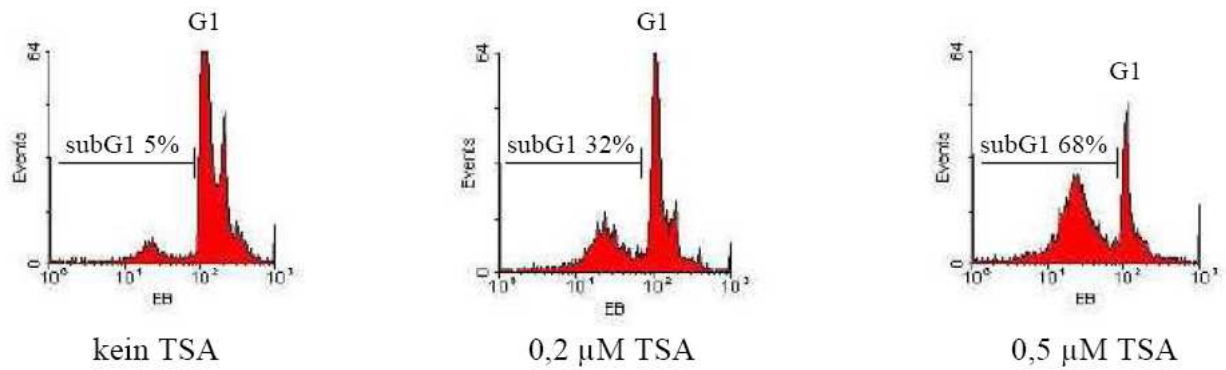
Durch die Überexpression der einzelnen Isoformen konnte gleichzeitig die Spezifität der benutzten CAb-Antikörper bestätigt werden, da bei der Transfektion mit einem der Plasmide eine höhere Detektion der entsprechenden Bande durch die CAb-Antikörper zu beobachten war.



**Abb. 4.3** Die Western Blot-Analyse zeigt die vermehrte Expression der einzelnen ING1-Proteinisoformen zwei Tage nach Transfektion und damit die erfolgreiche Transfektion. Bei Zellernte vier Tage nach Transfektion und anschließender Western Blot Analyse ist eine Abnahme dieser vermehrten Expression zu beobachten. leer = Transfektion der LN229-Zellen mit Leervektor, 1a = mit pCI *ING1a*, 1b = mit pCI *ING1b*

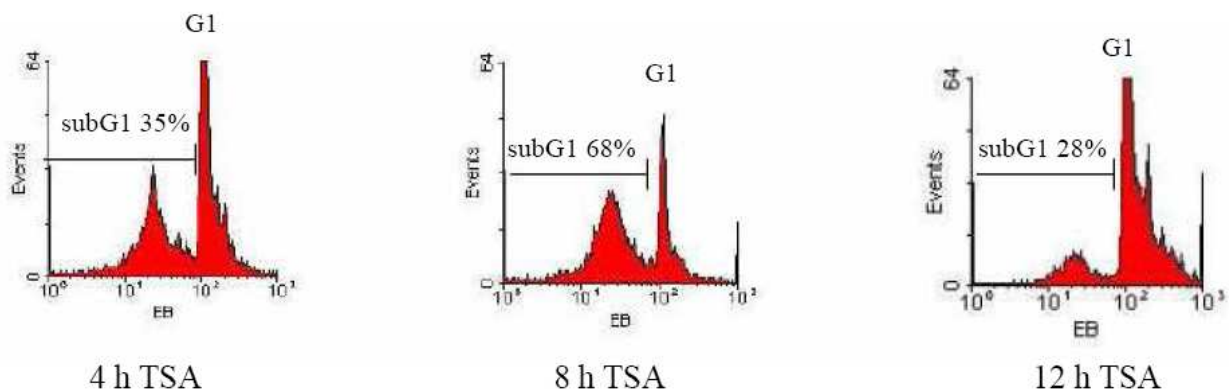
#### 4.4 Bestimmung der in LN229-Zellen Apoptose-auslösenden TSA-Konzentration und -Expositionszeit

Die einzusetzende TSA Konzentration wurde zum einen an Hand der aktuellen Literatur [110, 111] ausgewählt, zum anderen wurde die TSA-Konzentration und Dauer der Behandlung bestimmt, bei der 50 % der in der vorliegenden Arbeit verwendeten LN229-Zellen dem Zelltod zugeführt wurden ( $LC_{50}$ ). Zu diesem Zweck wurden Zellzyklusanalysen bei LN229-Zellen durchgeführt, welche unterschiedlich lange mit verschiedenen TSA-Konzentrationen behandelt wurden und insbesondere der Anteil der Zellen beobachtet, der sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befanden. Die Zellen wurden wie in 3.2.2 beschrieben mit 0,2  $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1  $\mu$ M (nicht abgebildet), 2  $\mu$ M (nicht abgebildet) oder 5  $\mu$ M (nicht abgebildet) TSA für 4 h, 8 h oder 12 h behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte, nicht transfizierte LN229-Zellen. Wie in Abb. 4.4 zu sehen ist, wächst der Anteil der in der subG1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen mit steigender TSA-Konzentration. Durch weitere Konzentrationssteigerung bis zu 5  $\mu$ M TSA war nur noch eine geringe Steigerung dieses Anteils zu erreichen (nicht abgebildet).



**Abb. 4.4** Die Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zur Konzentrationsbestimmung zeigt die Zunahme der Zellfraktion, die sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befindet nach 8-stündiger Behandlung mit 0,2  $\mu\text{M}$  TSA verglichen mit nicht behandelten Zellen. Eine weitere Zunahme dieses Zellanteils ist bei Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  TSA zu beobachten

Der Anteil der apoptotischen Zellen war nach 8 h TSA-Behandlung größer als nach 4 h Behandlung (siehe Abb. 4.5). Bei längerer Inkubation der Zellen über 12 h mit TSA konnte man eine Abnahme der in der subG1-Phase befindlichen Zellen beobachten.



**Abb. 4.5** Die Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zur Bestimmung der Behandlungsdauer zeigt, dass nach 8-stündiger Behandlung der LN229-Zellen mit 0,5  $\mu\text{M}$  TSA der Anteil der Zellen, die sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befinden, größer als nach 4 h, aber auch größer als nach 12 h Inkubation der Zellen mit 0,5  $\mu\text{M}$  TSA ist.

Da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der potentiellen Wechselwirkung zwischen ING1 und TSA und deren Auswirkung auf die Apoptose und weniger auf den durch TSA induzierten Wachstumsstillstand in GBM ist, wurde die TSA-Konzentration und die Dauer der Behandlung gewählt, bei deren Kombination 50% - 80% der Zellen apoptotisch waren. Dieses Kriterium war bei einer 8-stündigen Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  TSA erfüllt. Diese TSA Dosis im nM Bereich

wird regelmäßig in *in vitro* Experimenten angewandt [110, 111]. Entsprechend wurde für die folgenden Experimente die 8-stündige Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  TSA ausgewählt.

Die Wirkung von TSA auf LN229-Glioblastomzellen ist noch nicht beschrieben. Da die in LN229-Zellen vorkommenden, für Glioblastomzellen typischen Veränderungen Proteine wie p53, p14<sup>ARF</sup> oder p16<sup>INK4a</sup> betreffen, die in Signalwege involviert sind, welche für die antiproliferative Wirkung von TSA mitverantwortlich sind, bestand die Möglichkeit, dass die LN229-Zellen für TSA nicht sensibel sind. Jedoch konnte in LN229-Zellen der über Rezeptoren induzierte Weg der Apoptose, welcher die Aktivierung der Caspasen 3 und/oder 8 beinhaltet, nachgewiesen werden [113, 114]. Diese sind als Vermittler proapoptotischer Effekte von TSA in Krebszellen einschließlich GBM-Zellen bekannt [110, 111].

Die apoptotische Wirkung von TSA konnte Durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.4 und 4.5). In Abb. 4.4 sieht man, dass sich ein Großteil der Zellen (68%) nach 8 h TSA-Behandlung in der subG1-Phase des Zellzyklus befindet. Bei den unbehandelten Zellen dagegen befinden sich die meisten Zellen in der G1-Phase. Lediglich 5% besitzen einen zur subG1-Phase passenden DNA-Gehalt. Hierbei handelt es sich um die ersten Daten, die zeigen, dass TSA in malignen LN229-Glioblastomzellen unter den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zeit-Dosis-Bedingungen Apoptose induziert.

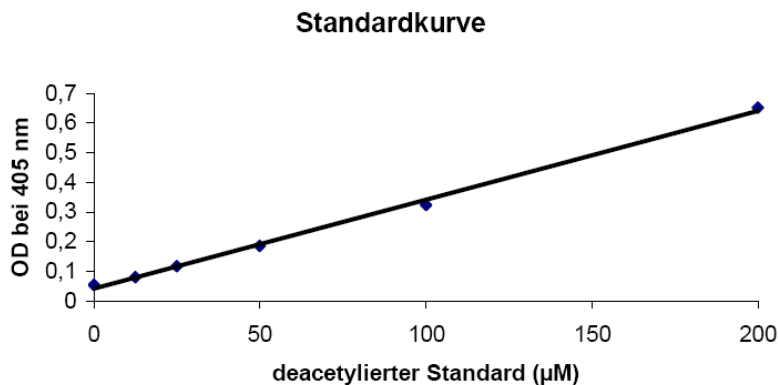
#### **4.5 Die Wirkung von TSA auf die Aktivität der HDAC in LN229-Zellen**

Die HDAC-Aktivität, die in normalen Zellen durch die Wirkung von TSA gehemmt wird, wurde für das vorliegende Modell mit einem HDAC-„Assay“ bestimmt. Mit der Verwendung dieser Methode konnte man die TSA-Wirkung in LN229-Zellen unabhängig und zusätzlich zur Bestimmung der Expression von acetylierten Histonen (siehe 4.6.1.1) überprüfen. Der HDAC-„Assay“ wurde wie vom Hersteller empfohlen und in 3.2.8 beschrieben durchgeführt. Mit einem Photometer wurde die OD bei 405 nm gemessen, welche sich proportional zur HDAC-Aktivität verhält. Zunächst wurde mit Hilfe des mitgelieferten deacetylierten Color de Lys<sup>TM</sup> Standards eine Standardkurve erstellt (siehe Abb. 4.7).

##### *4.5.1.1 Standardkurve*

Ein im „Kit“ enthaltener deacetylierter Color de Lys<sup>TM</sup> Standard wurde mit dem mitgelieferten Puffer zu sechs verschiedenen Konzentrationen verdünnt (0  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ ). Jeweils 50  $\mu\text{L}$  des verdünnten Color de Lys<sup>TM</sup> Standards wurden mit 50  $\mu\text{L}$  des Color de Lys<sup>TM</sup> Entwicklers gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die

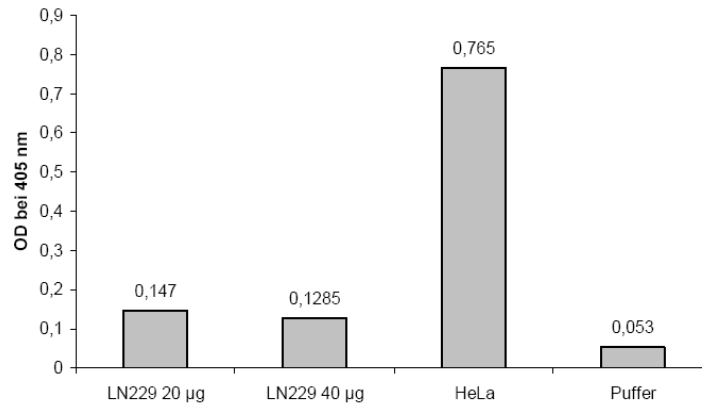
OD bei 405 nm gemessen und wie in Abb. 4.6 dargestellt in einem Koordinatensystem gegen die jeweilige Konzentration des Color de Lys<sup>TM</sup> Standards aufgetragen. Die OD nimmt proportional mit steigender Konzentration des deacetylierten Color de Lys<sup>TM</sup> Standards zu. An Hand dieser Kurve konnte die gemessene Extinktion unserer Proben einer bestimmten Konzentration des deacetylierten Color de Lys<sup>TM</sup> Standards zugeordnet werden, die der Menge des durch die jeweilige Probe umgesetzten Color de Lys<sup>TM</sup> Substrats entspricht.



**Abb. 4.6** Die Standardkurve des HDAC-„Assay“ zeigt die steigende OD bei steigender Konzentration des deacetylierten Standards. An Hand der Standardkurve kann die Menge umgesetzten Substrats durch HDAC und damit die HDAC-Aktivität der untersuchten Proteinlysate der LN229-Zellen abgelesen werden.

#### 4.5.1.2 Proteinkonzentration für den HDAC-„Assay“

Um die einzusetzende Proteinkonzentration zu bestimmen, bei der ausreichend HDAC-Aktivität vorhanden ist, um das Color de Lys<sup>TM</sup> Substrat zu deacetylieren, wurde der HDAC-„Assay“ einmalig mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (20 µg und 40 µg) durchgeführt. Bei dem Einsatz von 20 µg Protein kann im Vergleich zur Negativkontrolle eine ausreichend hohe OD gemessen (siehe Abb. 4.7). Somit kann man bei dieser Konzentration von einer für die Deacetylierung ausreichenden HDAC-Aktivität ausgehen. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, wurde durch eine höhere Konzentration die OD und damit die Deacetylierung des Color de Lys<sup>TM</sup> Substrats vermindert und die Entscheidung für eine Proteinkonzentration von 20 µg zur Messung der HDAC-Aktivität in Proteinlysaten aus LN229-Zellen mittels des HDAC-„Assay“ gestützt.



**Abb. 4.7** Der HDAC-„Assay“ mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen zeigt eine zur Messung der HDAC-Aktivität von Proteinlysaten von LN229-Zellen ausreichend hohe OD bei einer Proteinkonzentration von 20 µg. Bei einer Konzentration von 40 µg ist eine leichte Abnahme der OD zu beobachten. Das HeLa-Kernextrakt zeigt eine ungefähr fünffach höhere OD.

#### 4.5.1.3 HDAC-Aktivität nach TSA-Behandlung in LN229-Zellen

Die Wirkung von TSA auf die Aktivität von HDAC1 und HDAC2 ist für LN229-Glioblastomzellen bisher nicht publiziert.

Je höher die HDAC1- beziehungsweise HDAC2-Aktivität einer Probe ist, desto stärker wird das Color de Lys<sup>TM</sup> Substrat deacetyliert und desto höher ist, durch den vermehrten gelben Farbumschlag nach Zugabe des Color de Lys<sup>TM</sup> Entwicklers, die gemessene OD bei 405 nm.

Proteinlysate aus LN229-Zellen, die mit TSA behandelt waren, zeigten im HDAC-„Assay“ wie in Tabelle 4.1 dargestellt eine verminderte OD im Vergleich zu Proteinlysaten unbehandelter LN229-Zellen. Das spricht für die verminderte HDAC-Aktivität nach TSA-Behandlung und somit für die wirksame Hemmung der HDAC1 und/oder HDAC2 durch TSA.

Bei dem HeLa-Kernextrakt konnte man eine ungefähr fünffach höhere OD verglichen mit den unbehandelten LN229-Zellen messen, was für die erwartete hohe HDAC-Aktivität dieser Zellen spricht.



**Tab. 4.1:** Beispiel der gemessenen Extinktionen eines HDAC-„Assay“

<b>Probe</b>	<b>1. Wert</b> (OD bei 405 nm)	<b>2. Wert</b> (OD bei 405 nm)	<b>Mittelwert</b> (OD bei 405 nm)	<b>Standardabweichung</b>
LN229 (unbehandelt)	0,15	0,144	<b>0,147</b>	0,00424264
LN229 + 8 h 0,5 µM TSA	0,117	0,115	0,116	0,00141421
HeLa (Positivkontrolle)	0,726	0,804	<b>0,765</b>	0,05515433
Puffer (Negativkontrolle)	0,053	0,053	0,053	0

**Tab. 4.1** zeigt die Doppelbestimmung der Extinktionen von Proteinlysaten aus unbehandelten und mit TSA behandelten LN229-Zellen. Die unbehandelten Zellen zeigen eine höhere OD bei 405 nm und damit eine höhere HDAC-Aktivität als die mit TSA behandelten Zellen. Die HeLa-Kernextrakte zeigen eine ungefähr fünffach höhere HDAC-Aktivität verglichen mit den unbehandelten LN229-Zellen.

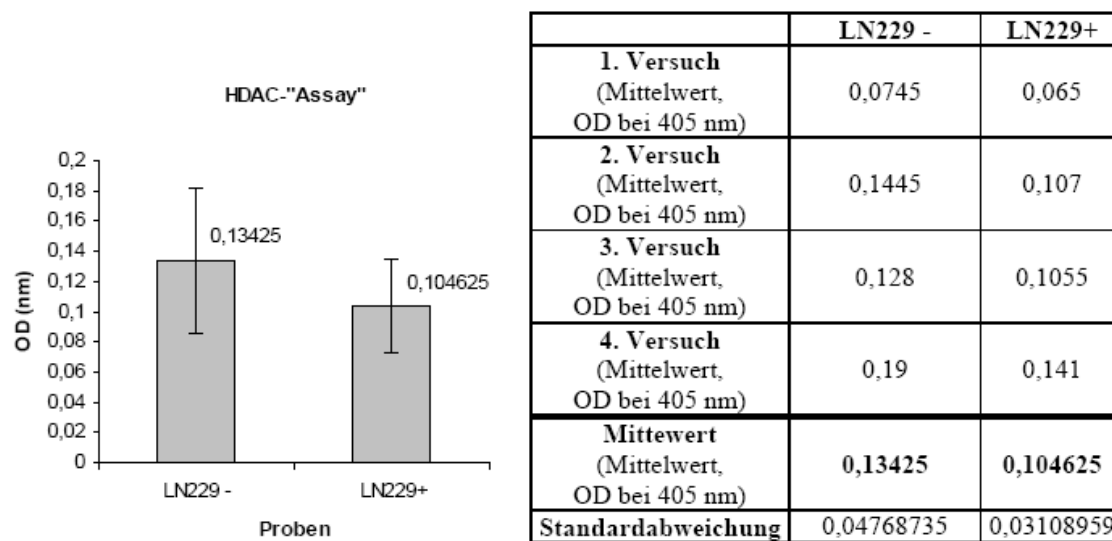
In vier weiteren unabhängig und mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführten „Assays“ konnte die Abnahme der HDAC-Aktivität in Zellen, die über 8 h mit 0,5 µM TSA behandelten waren, im Vergleich zu unbehandelten LN229-Zellen bestätigt werden (siehe Tab. 4.2 und Abb. 4.8). Trotz einer gewissen Schwankung der Extinktionswerte zwischen den einzelnen Versuchen, war die Abnahme in vier Versuchen reproduzierbar. Die prozentualen Abnahmen der Extinktion bei 405 nm betragen 13%, 26%, 18% und 26% (siehe Tab. 4.2). Hiermit ist bestätigt, dass TSA in LN229-Zellen die Aktivität der HDAC1 und/oder HDAC2 reduziert beziehungsweise in LN229-Zellen wirksam ist.

**Tab. 4.2:** HDAC-„Assays“ mit Proteinlysaten von mit TSA behandelten und unbehandelten LN229-Zellen

<b>Proben</b>	<b>1. Wert</b> (OD bei 405 nm)	<b>2. Wert</b> (OD bei 405 nm)	<b>Mittelwert</b> (OD bei 405 nm)	<b>Standardabweichung</b>	<b>Abnahme der HDAC-Aktivität nach TSA (%)</b>
LN229 -	0,074	0,075	0,0745	0,00070711	
LN229+	0,065	0,065	0,065	0	13
<b>LN229 -</b>	<b>0,15</b>	<b>0,139</b>	<b>0,1445</b>	<b>0,00777817</b>	
<b>LN229+</b>	<b>0,117</b>	<b>0,097</b>	<b>0,107</b>	<b>0,01414214</b>	<b>26</b>
LN229 -	0,131	0,125	0,128	0,00424264	
LN229+	0,107	0,104	0,1055	0,00212132	18
<b>LN229 -</b>	<b>0,199</b>	<b>0,181</b>	<b>0,19</b>	<b>0,01272792</b>	
<b>LN229+</b>	<b>0,139</b>	<b>0,143</b>	<b>0,141</b>	<b>0,00282843</b>	<b>26</b>

**Tab. 4.2** zeigt die photometrisch bei 405 nm bestimmten Extinktionen der vier in Abb. 4.8 dargestellten HDAC-„Assays“. Aus der Tabelle sind Mittelwert und Standardabweichung der Doppelbestimmungen abzulesen. Die letzte

Spalte der Tabelle gibt die prozentuale Abnahme der Extinktion und damit der HDAC-Aktivität nach der 8-stündigen Behandlung mit 0,5  $\mu$ M TSA (+) verglichen mit unbehandelten (-) LN229-Zellen an.



**Abb. 4.8** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der OD von den vier, in Tab 4.2 dargestellten, unabhängig voneinander durchgeführten HDAC-,Assays“ mit verschiedenen Proteinlysaten aus unbehandelten (-) und mit TSA behandelten (+) LN229-Zellen.

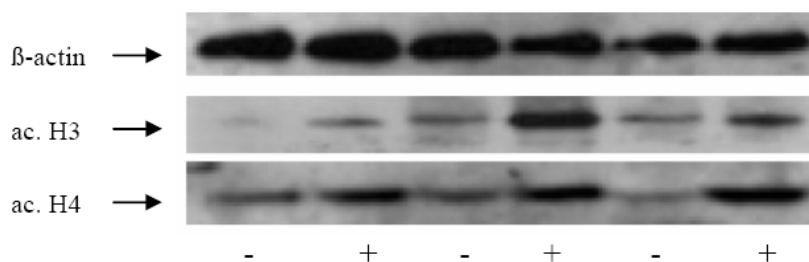
#### **4.6 Acetylierung der Histone H3 und H4 in LN229-Glioblastomzellen nach TSA-Behandlung**

Die durch TSA vermittelte Hemmung der HDAC1 und HDAC2, die für das vorliegende Zellmodell mittels HDAC-,Assay“ bestätigt werden konnte (siehe 4.5.1.3), führt zu einer gesteigerten Acetylierung der Histone H3 und H4 [21]. Die acetylierende Wirkung von HDACi wie TSA kommt durch verminderte Deacetylierung zustande und ist sowohl in normalen Zellen als auch in transformierten Zellen nachzuweisen [127-129]. Des Weiteren acetylieren beziehungsweise deacetylieren die mit ING1 assoziierten HAT- und HDAC-Komplexe hauptsächlich die Histone H3 und H4 [21]. Der Nachweis von acetyliertem Histon H3 und H4 erfolgte mit Hilfe der Western Blot Analyse, um mit einer vom HDAC-,Assay“ unabhängigen Methode die TSA-Wirkung sicherzustellen. Dazu wurden die Zellen wie in 3.2.1 beschrieben mit TSA behandelt und acetyliertes H3 und H4 mittels Western Blot Analyse detektiert.

##### *4.6.1.1 Histon Western Blot*

In Abb. 4.9 kann man bei durch  $\beta$ -Aktin bestätigten gleichgeladenen Proteinmengen bei den Proteinlysaten aus mit TSA behandelten Zellen im Vergleich mit den unbehandelten Proben

stärkere Banden bei 17 kDa beziehungsweise 10 kDa sehen, die einer Erhöhung des acetylierten Histons H3 beziehungsweise H4 entsprechen. Durch die gleichmäßigen  $\beta$ -Aktin-Banden konnte eine Wirkung von TSA auf die allgemeine Proteinexpression ausgeschlossen werden. Die eindeutige Vermehrung der acetylierten Histone H3 und H4 nach der Behandlung der Zellen mit TSA konnte in mehreren unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden. Die von uns ermittelte Dosis und Behandlungsdauer von TSA ist demnach in LN229-Glioblastomzellen wirksam. Diese Daten bestätigen unsere Ergebnisse hinsichtlich der durch TSA vermittelten Hemmung der HDAC-Aktivität (siehe 4.5.1.3) und gehören zu den ersten Daten, die zeigen, dass TSA den Acetylierungsgrad der Histone in malignen LN229-Glioblastomzellen verändern kann.

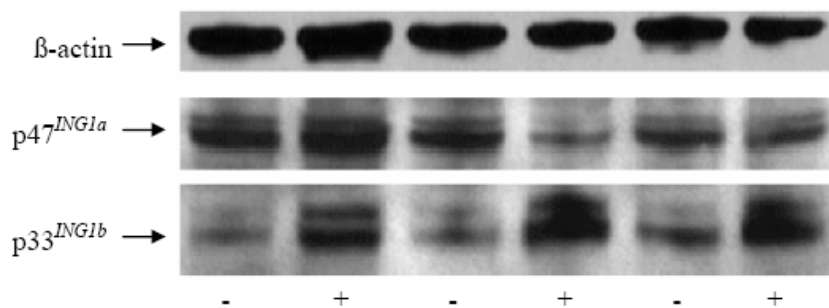


**Abb. 4.9** Der Western Blot mit drei unabhängig voneinander hergestellten Proteinlysaten aus unbehandelten (-) beziehungsweise behandelten (+) LN229-Zellen verdeutlicht die vermehrte Detektion von acetylierten Histonen H3 (ac. H3) und H4 (ac. H4) nach Behandlung von LN229-Zellen mit TSA (+) verglichen mit unbehandelten LN229-Zellen (-). Die nahezu gleich starken  $\beta$ -Aktin-Banden sprechen für gleichmäßig geladene Proteinmengen.

#### 4.7 Die endogene Expression der ING1-Isoformen nach TSA-Behandlung in LN229-Zellen

Es ist bekannt, dass TSA die Expression vieler Gene sowohl induziert, als auch reduziert [88, 91, 122]. Es kommt zur Aktivierung der Transkription von Tumorsuppressoren wie *CDKN2A* ( $p16^{INK\alpha}$ ) [106] und Signalwegen der Phosphoinositolphosphatasen, die PTEN aktivieren [107]. Auch die Aktivierung von  $p21^{WAF}$  spielt bei der antiproliferativen Wirkung von TSA eine Rolle (siehe 1.2.8). Die durch TSA ausgelöste Apoptose ist durch ihre Abhängigkeit von Mechanismen der Histonacetylierung charakterisiert. Da sowohl funktionelle als auch strukturelle Wechselwirkungen zwischen ING1 mit HAT- und HDAC-Komplexen bekannt sind, wie beispielsweise die vermehrte Assoziation von  $p33^{ING1b}$  mit HAT-Komplexen oder  $p47^{ING1a}$ , welches eher mit HDAC-Komplexen in Verbindung steht [21], wurde die Expression der verschiedenen ING1-Isoformen in LN229-Zellen nach 8-stündiger Behandlung mit  $0,5 \mu\text{M}$  TSA mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht.

Wie in Abb. 4.10 zu sehen ist, konnten mit Hilfe der CAB-Ak sowohl p47<sup>ING1a</sup> als auch p33<sup>ING1b</sup> konstant nachgewiesen und damit die Expression dieser beiden Isoformen in LN229-Zellen wiederholt bestätigt werden. Des Weiteren kann man beobachten, dass die p47<sup>ING1a</sup>-Spiegel durch TSA in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden, während bei der p33<sup>ING1b</sup>-Expression nach TSA-Behandlung wiederholt ein signifikanter Anstieg nachweisbar war - nach Einwirkung des Histondeacetylaseinhibitors TSA sieht man eine eindeutige Verstärkung der Bande, die p33<sup>ING1b</sup> entspricht. Diese Beobachtungen konnten in insgesamt acht Experimenten bestätigt werden. Die vorliegenden Daten zeigen, dass TSA die einzelnen Spleißvarianten von ING1 unterschiedlich beeinflusst.



**Abb. 4.10** Der Western Blot zeigt bei drei unabhängig voneinander hergestellten Proteinlysaten aus LN229-Zellen eine Erhöhung der endogenen p33<sup>ING1b</sup>-Expression nach 8-stündiger Behandlung der Zellen mit 0,5  $\mu$ M TSA (+) verglichen mit unbehandelten LN229-Zellen (-) bei durch  $\beta$ -Aktin bestätigten gleichgeladenen Proteinnengen. Bei der ING1-Isoform p47<sup>ING1a</sup> sind unterschiedliche Effekte festzustellen - nach der TSA-Behandlung (+) ist die p47<sup>ING1a</sup>-Expression verglichen mit unbehandelten LN229-Zellen (-) erhöht (Bahn 1 und 2), erniedrigt (Bahn 3 und 4) oder unverändert (Bahn 5 und 6).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine mögliche Zusammenarbeit von TSA und p33<sup>ING1b</sup> bei der Induktion der Apoptose, denn zum einen führt die TSA-Behandlung der LN229-Zellen wie in 4.4 erläutert zur Apoptose, zum anderen wird durch TSA die Expression von p33<sup>ING1b</sup> induziert. Die Erhöhung von p33<sup>ING1b</sup> könnte demnach Mitursache für die durch TSA ausgelöste Apoptose sein.

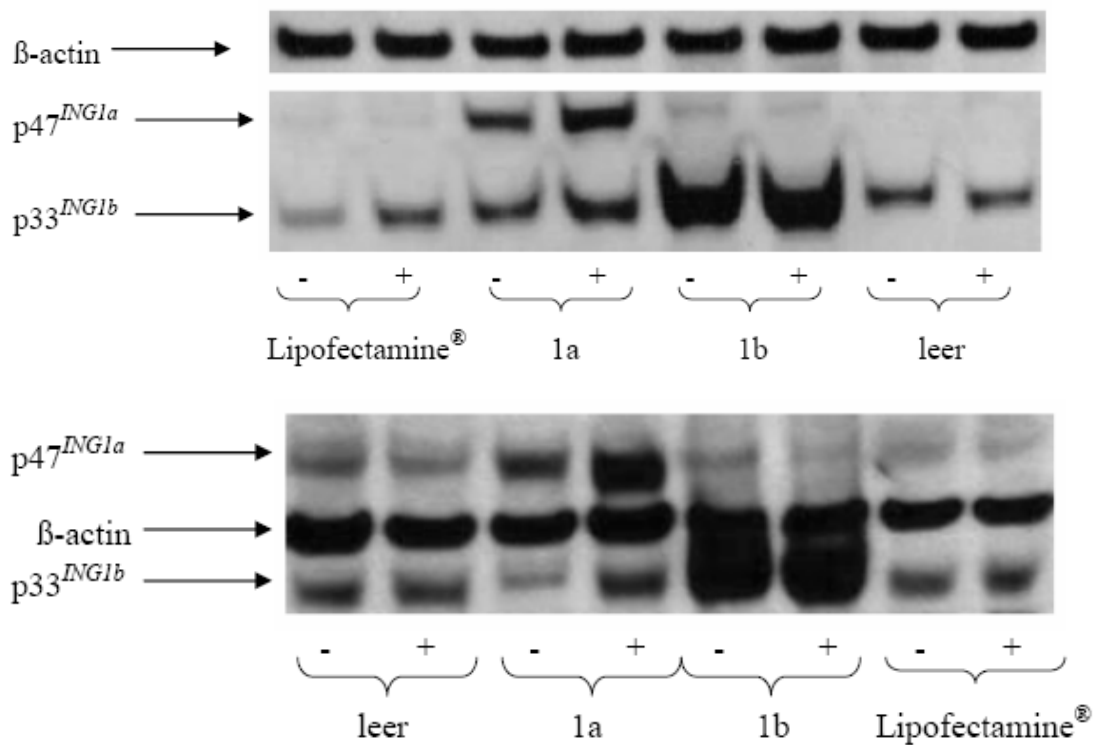
#### 4.8 Die Wirkung von TSA auf LN229-Zellen mit ektopter Überexpression der ING1-Isoformen

Nachdem die vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, dass endogenes p33<sup>ING1b</sup> durch TSA induziert wird (siehe 4.7) und, dass diese Veränderungen der ING1-Proteinexpression mit der in

LN229-Zellen durch TSA erhöhten Apoptoserate (siehe 4.4) korrelieren, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Expression von ING1 durch TSA auch in LN229-Zellen, die die ING1-Proteine überexprimieren, verändert wird. Zu diesem Zweck wurden Western Blot Analysen mit verschiedenen Proteinlysaten durchgeführt. Es handelte sich um Lysate aus LN229-Zellen, die mit unterschiedlichen Vektoren wie in 2.2.4 beschrieben transfiziert waren. Abb. 4.11 I. und Abb. 4.11 II. zeigen, dass die Transfektion mit pCI *ING1a* zur Überexpression von p47<sup>ING1a</sup> und von pCI *ING1b* zur Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> führt. Die gelungene Transfektion konnte durch die jeweils stärkeren Banden, die p33<sup>ING1b</sup> und p47<sup>ING1a</sup> entsprechen damit wiederholt bestätigt werden (siehe auch 4.3.2). Als Kontrolle diente zum einen ein Proteinlysat aus Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert waren und zum anderen ein Lysat aus untransfizierten LN229-Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>®</sup> behandelt waren. Alle fünf Zellproben waren einmal über 8 Stunden mit 0,5 µM TSA inkubiert und blieben einmal unbehandelt.

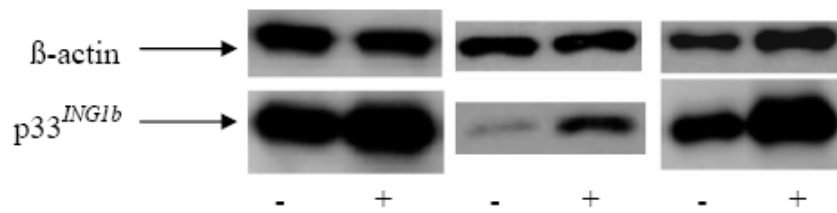
Die gleichmäßigen Banden bei 39 kDa (siehe Abb. 4.1) in Abb. 4.11 I. und 4.11 II. entsprechen dem Protein β-Aktin und beweisen die einheitlich geladenen Proteinmengen. Wie in 4.7 bereits besprochen, kann man auch hier bei der untransfizierten LN229-Kontrollzelllinie, die mit Lipofectamine<sup>®</sup> behandelt ist, bei Inkubation über 8 Stunden mit 0,5 µM TSA einen Anstieg der Expression von p33<sup>ING1b</sup> beobachten. p47<sup>ING1a</sup> ist sowohl bei den Lipofectamine<sup>®</sup>-Kontrollen mit und ohne TSA-Behandlung als auch bei den Proteinlysaten aus LN229-Zellen mit ektopter p33<sup>ING1b</sup>-Überexpression und aus den mit dem Leervektor transfizierten LN229-Zellen nur schwach zu erkennen, was die in 4.2 besprochene verminderte Expression von p47<sup>ING1a</sup> in LN229-Zellen bestätigt.

Nach Transfektion mit dem Vektor pCI *ING1a* konnte man nach Behandlung mit TSA eine Zunahme der p47<sup>ING1a</sup> entsprechenden Bande beobachten, was für eine Induktion von p47<sup>ING1a</sup> spricht. Die Verstärkung der Bande bei 30 kDa bei der ektopten Überexpression von p47<sup>ING1a</sup> kommt durch ein Abbauprodukt von p47<sup>ING1a</sup> zustande (Korrespondenz mit Prof. K. Riabowol, Department of Biochemistry and Molecular Biology and Oncology, Southern Alberta Cancer Research Centre, University of Calgary). Unsere Daten zeigen, dass die beiden Hauptisoformen der ING1-Proteinfamilie nach ihrer ektopten Überexpression in LN229-Zellen und 8-stündiger Behandlung mit 0,5 µM TSA stabilisiert beziehungsweise induziert werden.



**Abb. 4.11 I. und II.** Die zwei unabhängig voneinander, mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführten Western Blots zeigen die Stabilisierung beziehungsweise Induktion der zwei Hauptisoformen von ING1 p33<sup>ING1b</sup> und p47<sup>ING1a</sup> in LN229-Zellen mit ektopter Überexpression der jeweiligen Isoform nach der Behandlung der Zellen mit 0,5 µM TSA (+) verglichen mit unbehandelten LN229-Zellen (-). leer = Transfektion der LN229-Zellen mit Leervektor, 1a = mit pCI *ING1a*, 1b = mit pCI *ING1b*

Abb. 4.11 I. und II. vermitteln den Eindruck, dass die 8-stündige Behandlung mit 0,5 µM TSA nach der Transfektion mit dem Vektor pCI *ING1b* die p33<sup>ING1b</sup>-Expression nicht beeinflusst. Die Banden bei 30 kDa sind beide so stark, dass eine potentielle Induktion von p33<sup>ING1b</sup> durch TSA in diesem Western Blot nicht erfasst werden kann. Daher wurde dieses Experiment wiederholt und es konnten in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Western Blots eine Induktion von p33<sup>ING1b</sup> nach 8-stündiger Behandlung mit 0,5 µM TSA nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.12).



**Abb. 4.12** zeigt in drei unabhängig voneinander und mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführte Western Blots die Induktion von p33<sup>ING1b</sup> in LN229-Zellen mit ektopter Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> nach TSA-Behandlung (+) verglichen mit unbehandelten Zellen (-).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass TSA die beiden Hauptisoformen von ING1 p33<sup>ING1b</sup> und p47<sup>ING1a</sup> in LN229-Zellen, die mit *ING1a* oder *ING1b* transfiziert sind, stabilisieren oder sogar induzieren kann.

#### 4.9 Die Wirkung von TSA auf den Zellzyklus von LN229-Zellen mit ektopter Überexpression der ING1-Isoformen

Da TSA Apoptose in LN229-Zellen verursacht (siehe 4.4) und ING1 in die Apoptose verschiedener Tumorzellen involviert ist [24], wurden erneut Durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, um festzustellen, ob die ING1-Proteine in den gleichen Apoptosesignalweg involviert sind, über den TSA die meisten seiner Wirkungen ausübt. Es stellte sich die Frage, ob die Stabilisierung der ING1-Proteine durch TSA in LN229-Zellen, die mit *ING1a* oder *ING1b* transfiziert waren (siehe 4.8), die Apoptoserate steigern würde. Wenn die ING1-Proteine und TSA über unterschiedliche Apoptosesignalwege wirken, so würde man eine Erhöhung der Apoptoserate bei TSA-Behandlung und gleichzeitiger Überexpression der ING1-Proteine verglichen mit der TSA-Behandlung oder der Überexpression alleine erwarten. In drei unabhängigen Experimenten wurde der Prozentsatz der in der subG1-Phase befindlichen Zellen von transfizierten, nicht transfizierten, von TSA behandelten und unbehandelten Zellen verglichen. Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um nicht transfizierte oder nicht transfizierte und mit Lipofectamine® behandelte LN229-Zellen, solche die mit pCI *ING1a* oder pCI *ING1b* und Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden. Sie wurden wie in 3.2.9.2 beschrieben weiter behandelt.

Tab. 4.3 zeigt anhand von drei durchgeführten Versuchen erneut (siehe 4.4) den apoptotischen Effekt, den TSA auf LN229-Glioblastomzellen hat. Dieser Effekt ist an der deutlichen Steigerung der in der subG1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen nach 8-stündiger

Behandlung mit 0,5  $\mu$ M TSA zu sehen (siehe Tab. 4.3). Diese TSA Wirkung konnte sowohl in nicht transfizierten als auch in mit pCI *ING1a* beziehungsweise pCI *ING1b* beziehungsweise einem Leervektor transfizierten Zellen beobachtet werden. Nach TSA-Behandlung fand eine durchschnittliche Steigerung der apoptotischen Zellen um das 4,3-fache statt. Es ergab sich allerdings kein Unterschied im Ausmaß der Erhöhung zwischen den mit *ING1*, mit einem Leervektor transfizierten oder nicht transfizierten beziehungsweise nicht transfizierten und mit Lipofectamine® behandelten Zellen. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen konnte keine reproduzierbare Korrelation zwischen ektopter *ING1*-Überexpression und proapoptotischer TSA-Wirkung festgestellt werden. Das könnte bedeuten, dass die *ING1*-Proteine in einem durch TSA beeinflussbaren Apoptosesignalweg agieren.

Des Weiteren ist in Tab. 4.3 der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, dargestellt. Nach der Behandlung der LN229-Zelllysate mit 0,5  $\mu$ M TSA war sowohl in den transfizierten als auch in den Kontrolllysaten eine Verminderung dieses Anteils festzustellen.

**Tab. 4.3:** Durchflusszytometrisch gemessener Anteil der in der subG1- und G1-Phase des Zellzyklus befindlichen LN229-Zellen bei ektopter Überexpression von p33<sup>*ING1b*</sup> oder p47<sup>*ING1a*</sup> und nach TSA-Behandlung

Probe	1. Versuch subG1 / G1 (%)	2. Versuch subG1 / G1 (%)	3. Versuch subG1 / G1 (%)
LN229 -		x 9,7 ↻ 3 / 68	
LN229 +		↻ 29 / 60	
Lipofectamine® -			x 4,4 ↻ 18 / 36
Lipofectamine® +			↻ 80 / 7
leer -	x 2,3 ↻ 19 / 61	x 5,4 ↻ 7 / 67	x 3,9 ↻ 15 / 30
leer +	↻ 43 / 44	↻ 38 / 45	↻ 88 / 3
1a -	x 1,0 ↻ 51 / 29	x 4,6 ↻ 7 / 56	x 5,0 ↻ 15 / 32
1a +	↻ 52 / 30	↻ 29 / 45	↻ 75 / 7
1b -	↻ 44 / 29	↻ 9 / 54	↻ 16 / 33
1b +	x 2,0 ↻ 88 / 6	x 2,6 ↻ 23 / 50	x 4,9 ↻ 79 / 7

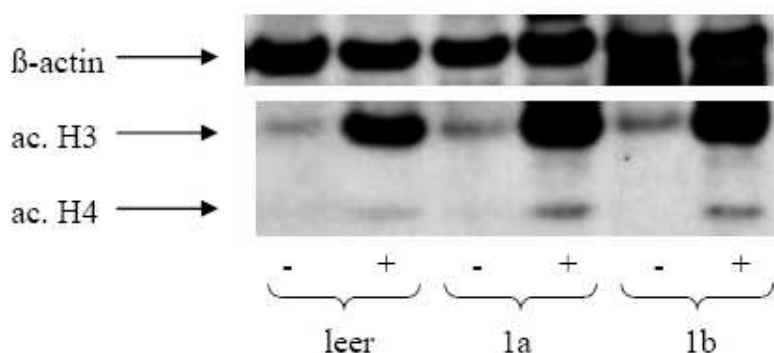
**Tab. 4.3** stellt die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander und mit unterschiedlichen LN229-Zellproben durchgeführten Durchflusszytometrischen Messungen dar. Die Tabelle gibt sowohl die subG1- als auch die G1-Phase des Zellzyklus wieder. Die Vermehrung der apoptotischen Zellen bei fast allen Zellproben nach der Behandlung mit 0,5  $\mu$ M TSA (+) verglichen mit unbehandelten LN229-Zellen (-) ist eindeutig abzulesen (die Zahlen an den Pfeilen (↻) geben den Anteil der apoptotischen Zellen nach TSA-Behandlung als Vielfaches der apoptotischen Zellen ohne TSA-Behandlung wieder). Der Anteil der Zellen in der G1-Phase ist, da die apoptotischen Zellen direkt aus der G1-Phase kommen, nach TSA-Behandlung vermindert. Eine Ausnahme stellen die Zellproben mit ektopter Überexpression von p47<sup>*ING1a*</sup> (1a) des ersten Versuches dar – hier handelt es sich in



Anbetracht der restlichen in der Tabelle dargestellten Ergebnisse am wahrscheinlichsten um eine Fehlbestimmung.  
 leer = Transfektion der LN229-Zellen mit Leervektor, 1a = mit pCI *ING1a*, 1b = mit pCI *ING1b*

#### 4.10 Die Wirkung von TSA auf die Histonacetylierung in LN229-Zellen mit ektopter Überexpression der ING1-Isoformen

Die Mikroinjektion von p33<sup>ING1b</sup> führte bereits in menschlichen Fibroblasten zu der spezifischen Acetylierung der Histone H3 und H4 [21]. Daher stellte sich die Frage, ob die ING1-Proteine auch einen synergistischen Effekt auf die durch TSA verursachte Acetylierung der Histone H3 und H4 hätten. Zu diesem Zweck wurden in Western Blots die Banden bei 17 kDa (acetyliertes H3) und bei 10 kDa (acetyliertes H4) mit und ohne 8-stündiger Behandlung mit 0,5 µM TSA von Proteinlysaten aus transfizierten und untransfizierten LN229-Zellen verglichen. In Abb. 4.13 wurden dieselben Proben wie Abb. 4.11 II. benutzt. Abb. 4.13 zeigt erneut (siehe Abb. 4.9) den eindeutig erhöhten Acetylierungsgrad der Histone H3 und H4 bei allen mit TSA behandelten Proben und bestätigt damit die Wirksamkeit von TSA in LN229-Zellen. Sowohl bei 17 kDa als auch bei 10 kDa kann man bei Überexpression von p47<sup>ING1a</sup> und auch von p33<sup>ING1b</sup> dickere Banden entsprechend vermehrtem Vorhandensein von acetyliertem H3 beziehungsweise H4 nach TSA-Behandlung verglichen mit nicht transfizierten Zellen beobachten. Die TSA Behandlung und die Überexpression der ING1-Proteine führen demnach zusammen zu einer stärkeren Acetylierung der Histone H3 und H4, als die TSA-Behandlung alleine. Zwischen der Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> und der Überexpression von p47<sup>ING1a</sup> war in Hinblick auf die beschriebene synergistische Wirkung jedoch kein Unterschied festzustellen. Dieser Effekt ist demnach nicht isoformabhängig.

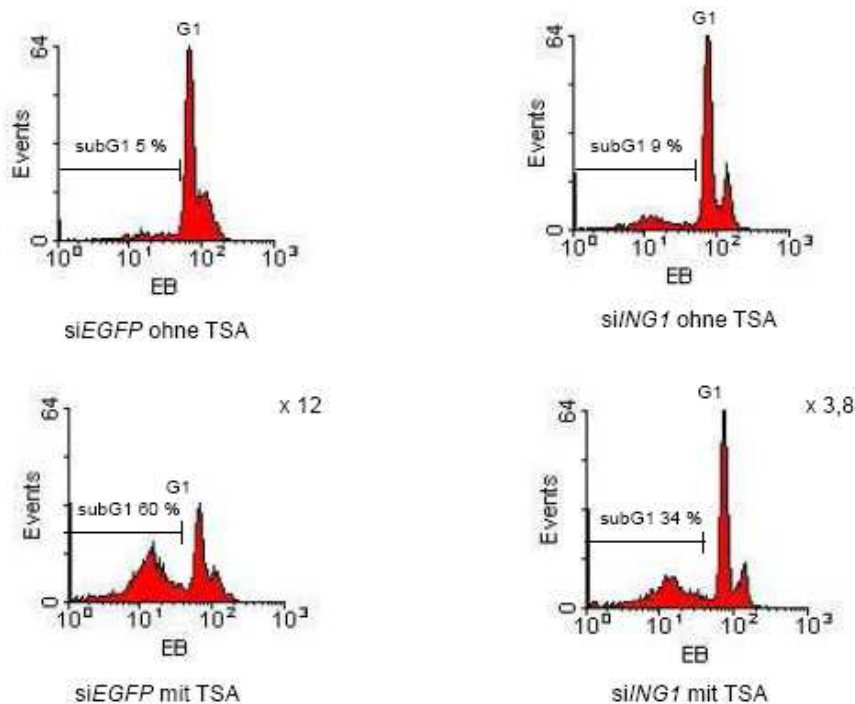


**Abb. 4.13** In diesem Western Blot ist das vermehrte Vorhandensein der acetylierten Histone H3 (ac. H3) und H4 (ac. H4) nach TSA-Behandlung (+) verglichen mit unbehandelten Zellen (-) bei allen drei Proteinlysaten festzustellen. Des Weiteren wird hier deutlich, dass nach TSA-Behandlung und gleichzeitiger ektopter Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> (1b, +) beziehungsweise p47<sup>ING1a</sup> (1a, +) eine stärkere Vermehrung der acetylierten

Histone H3 (ac. H3) und H4 (ac. H4) verglichen mit alleiniger TSA-Behandlung stattfindet (leer, +). leer = Transfektion der LN229-Zellen mit Leervektor, 1a = mit pCI *ING1a*, 1b = mit pCI *ING1b*

#### **4.11 Die Wirkung von TSA auf den Zellzyklus von LN229-Zellen mit reduzierter ING1-Expression**

Verschiedene Vorarbeiten haben gezeigt [2, 3], dass die *ING1*-Expression in Gliomen mit ansteigendem Malignitätsgrad abnimmt. In Glioblastomen konnte *ING1* nur selten nachgewiesen werden. Um ein für dieses Charakteristikum von *ING1* beziehungsweise von GBM repräsentatives Arbeitsmodell zu erhalten, und da Versuche mit Zellen, die bestimmte Proteine überexprimieren, anfällig für Artefakte sind, wurden für die folgenden Untersuchungen Zellen verwendet, in denen die Expression der *ING1*-Proteine vermindert ist. Hierbei handelt es sich um LN229-Zellen, die mit der siRNA-Sequenz für das gemeinsame Exon von *ING1* (Exon 2, siehe Abb. 1.1) stabil transfiziert sind, so dass alle Isoformen von *ING1* vermindert exprimiert werden. Als Kontrolle diente die stabile Transfektion mit *EGFP* siRNA. Durchflusszytometrisch wurden Proteinlysate der mit si*ING1* transfizierten Zellen und der Transfektionskontrolle untersucht und der Anteil der Zellen, die sich in der SubG1-Phase des Zellzyklus befanden mit und ohne 8-stündiger Behandlung mit 0,5 µM TSA verglichen. LN229-Zellen, die mit si*ING1* stabil transfiziert waren, zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit si*EGFP* stabil transfiziert waren eine geringere Empfindlichkeit gegenüber TSA. Wie in Abb. 4.14 zu sehen, erhöhte TSA in den Kontrollzellen den Prozentsatz der in Apoptose befindlichen Zellen um das 12-fache, wohingegen in den mit si*ING1* transfizierten Zellen nur in 3,8 mal so vielen Zellen der programmierte Zelltod induziert wurde. Das Ausmaß der Verminderung der Apoptoserate nach TSA durch die Herunterregulierung von *ING1* variierte durchaus in verschiedenen Experimenten. Allerdings konnte in zwei getrennt voneinander mit si*ING1* transfizierten LN229-Zellpools wiederholt die erhöhte Resistenz gegenüber der durch TSA ausgelösten Apoptose nachgewiesen werden.



**Abb. 4.14** Effekt von TSA auf den Zellzyklus von siEGFP- und siING1-LN229-Zellen: im Vergleich zu der Transfektionskontrollzelllinie siEGFP-LN229 (siEGFP) findet eine geringere Steigerung (um das 3,8fache, statt um das 12fache) der Apoptoserate bei Verminderung von *ING1* in LN229-Zellen (siING1) nach der TSA-Behandlung statt.

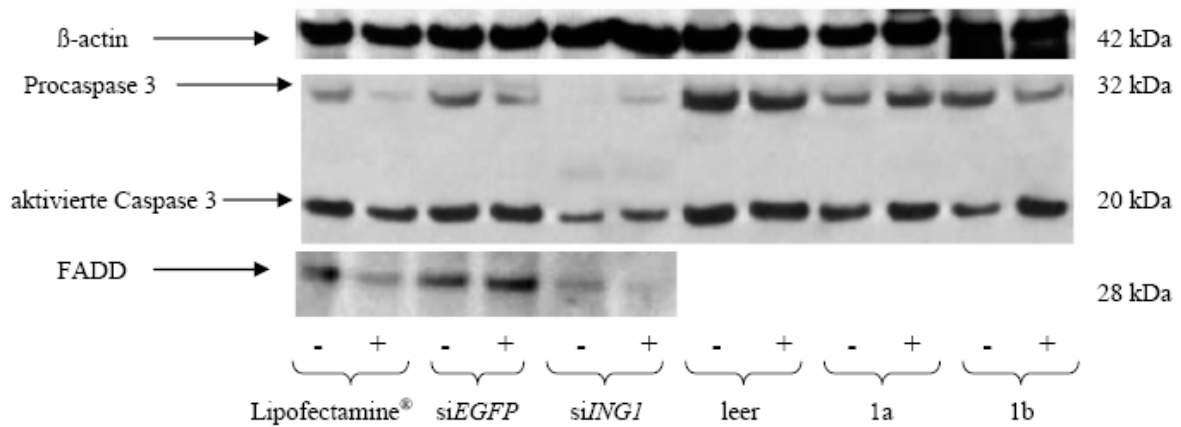
#### 4.12 Die Wirkung der verminderten *ING1*-Expression auf den FADD-Caspase-3-Signalweg der Apoptose in LN229-Zellen

Der erste Schritt auf dem extrinsischen Apoptoseweg ist die Assoziation des „tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) mit seinen beiden Todesrezeptoren DR4 und DR5. Die aktivierten „death“-Rezeptoren (DR) aktivieren FADD. FADD wiederum aktiviert Caspase 8, die dann weitere Caspasen, beispielsweise Caspase 3 aktivieren kann [123]. Der zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehörige und Apoptose induzierende Ligand TRAIL hat durch seine starke antitumoröse Aktivität und seine geringe Zytotoxizität gegenüber normalen Zellen und Geweben Aufmerksamkeit erregt [124]. Die 32 kDa schwere Caspase 3 spielt eine Schlüsselrolle bei den letzten Schritten des Apoptosesignalweges (siehe Abb. 5.1). Da der Caspase-3-Signalweg der Apoptose auch in malignen Gliomen einen der Hauptsignalwege der proapoptotischen TSA-Wirkung [103] repräsentiert, und weil die durch *ING* vermittelte Apoptose sowohl in anderen Malignomzellen, als auch in normalen Zellen gemäß aktueller Berichte mit Caspase-(8-)Aktivierung in Verbindung gebracht wird [34, 39], wurden die endogenen Proteinspiegel von Procaspase 3 und aktivierter Caspase 3 sowie von FADD mittels Western Blot in Proteinlysaten von TSA-behandelten und nicht behandelten LN229-Zellen mit

reduzierter und erhöhter *ING1*-Expression untersucht, um der Frage nachzugehen, warum die reduzierte *ING1*-Expression in LN229-Zellen zu der erhöhten Resistenz gegenüber dem durch TSA ausgelösten programmierten Zelltod führt (siehe 4.11).

Abb. 4.15 zeigt verminderte Proteinspiegel sowohl der Procaspase 3 als auch der aktivierten Caspase 3 in LN229-Zellen, die mit *siING1* stabil transfiziert sind im Vergleich zu untransfizierten oder mit *siEGFP* stabil transfizierten Zellen. Die verminderten Caspasespiegel bei verminderter Expression von *ING1* passen gut zu der in 4.11 beschriebenen verminderten, durch TSA vermittelten Apoptose in dieser Zelllinie, da die Caspasen in fast jedem Zelltyp eine entscheidende Rolle bei der Apoptose spielen [125, 126]. Die Inkubation mit TSA hat hier offensichtlich keinen Einfluss auf die endogenen Proteinspiegel der Procaspase 3 beziehungsweise aktivierten Caspase 3 - die Banden der Proben mit und ohne TSA-Behandlung sind unter Berücksichtigung der leicht unterschiedlichen  $\beta$ -Aktin-Banden etwa gleich stark. Auch bei fast allen anderen Proben kann man keinen Unterschied der Banden, die der Caspase 3 entsprechen, mit und ohne TSA-Behandlung feststellen. Eine Ausnahme stellen die Proteinlysate aus LN229-Zellen dar, die mit dem pCI Vektor *ING1b* transfiziert sind. Bei der ektopten Überexpression von  $p33^{ING1b}$  scheint die TSA-Behandlung einen Effekt auf die Caspase 3 zu haben: nach 8-stündiger Inkubation mit 0,5  $\mu$ M TSA sind die Proteinspiegel der Procaspase 3 erniedrigt und der aktivierten Caspase 3 leicht erhöht, was für einen leicht proapoptotischen Effekt bei der Kombination TSA mit  $p33^{ING1b}$ -Überexpression im Vergleich zu der Leervektorkontrolle spricht. Die Verminderung der Procaspase 3 kann man auch bei den drei Kontrollzelllinien beobachten.

Da FADD in der Kette der Apoptose einleitenden Ereignisse direkt vor der Caspase-Kaskade liegt [138], wurden als nächstes die FADD-Proteinspiegel mittels Western Blot Analyse untersucht, um auch hier die Wirkung der verminderten *ING1*-Expression zu erfassen. Wie anhand der Abb. 4.15 festzustellen ist, ist FADD in LN229-Zellen, die *ING1* vermindert exprimieren ebenfalls vermindert, bei durch  $\beta$ -Aktin bestätigter gleichgeladener Proteinmenge.



**Abb. 4.15** Der Western Blot zeigt die Verminderung der Procaspase 3, der aktivierten Caspase 3 und von FADD bei verminderter Expression von ING1 in LN229-Zellen (siING1) verglichen mit den Kontrollzelllinien (Lipofectamine<sup>®</sup> und siEGFP). Des Weiteren ist zu sehen, dass es bei ektopter Überexpression von p33<sup>ING1b</sup> (1b) und die zusätzliche Behandlung mit TSA (+) zu einer Verminderung der Procaspase 3 und Erhöhung der aktivierten Caspase 3 kommt. Bei allen anderen Zellproben ist durch die TSA-Behandlung (+) im Vergleich mit den gleichen Zellproben ohne TSA-Behandlung (-) keine Veränderung der Procaspase-3- oder Caspase-3-Proteinspiegel festzustellen. leer = Transfektion der LN229-Zellen mit Leervektor, 1a = mit pCI *ING1a*, 1b = mit pCI *ING1b*