

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch
Histondeacetylaseinhibitoren in Zelllinien des
Nierenzellkarzinoms

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Axel Mußler

aus Bielefeld

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. St. Weikert

2. Prof. Dr. med. J. Roigas

3. Priv.-Doz. Dr. A. Meye

Datum der Promotion: 23.9.2007

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1	Einleitung	8
2	Materialien	15
2.1	Histondeacetylaseinhibitoren (HDIs)	15
2.2	Zelllinien und Zellkultur	15
2.3	Proteinaufarbeitung	16
2.4	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
2.5	Western-Blot	17
2.6	Antikörper	18
2.7	RNA	19
2.8	Primer und Hybridisierungsproben	20
2.9	Puffer und Lösungen	21
3	Methoden	24
3.1	Zellkultur	24
3.2	Proteinaufarbeitung und Western blotting	25
3.2.1	Proteinaufarbeitung	25
3.2.2	Das Western Blot Verfahren	26
3.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.2.2.2	Enhanced chemiluminescence Western blotting (ECL Western blotting)	27
3.3	RNA-Aufarbeitung und RT-PCR	29
3.3.1	RNA-Aufarbeitung	29
3.3.2	RT-PCR	30
3.4	Acridinorange/Ethidiumbromid-Assays	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Apoptoseinduktion in Nierenkarzinomzelllinien	33
4.1.1	Apoptosenachweis durch Fluoreszenzmikroskopie	33
4.1.1.1	Zelllinie SN12	33
4.1.1.2	Zelllinie A498	35
4.1.1.3	Zelllinie ACHN	37
4.2	Einfluss der Histondeacetylaseinhibitoren auf die Caspase-3-Expression auf mRNA-Ebene	38
4.3	Konzentrationsabhängige Effekte der HDI-Behandlung auf die Caspase-mRNA-Expression	42
4.4	Auswirkung der Histondeacetylaseinhibitoren auf das Caspase-3-Protein	44
4.4.1	Caspase-3 in der Zelllinie SN12	45
4.4.2	Caspase-3 in der Zelllinie A498	46
4.4.3	Caspase-3 in der Zelllinie ACHN	46
4.5	Zusammenfassung der Apoptose-Nachweisverfahren	48
4.6	Survivin-mRNA Expression in unbehandelten und mit Histondeacetylaseinhibitoren behandelten Nierenkarzinomzelllinien	49
4.6.1	Entwicklung eines Survivin-Standards und Charakterisierung der nativen Zelllinien	49
4.6.2	Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in Nierenkarzinomzelllinien	52
4.6.2.1	Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie SN12	53
4.6.2.2	Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie A498	54
4.6.2.3	Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie ACHN	54
4.6.3	Konzentrationsabhängige Einflüsse auf die Survivin-mRNA-Expression	55
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	57
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	70
7	Abstract	71

8	Literaturverzeichnis	72
	Anhang	77
	Lebenslauf	77
	Danksagung	78
	Erklärung	79

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
AML	akute myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
APS	Amoniumpersulfat
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CP	Crossing point
Cyt C	Cytochrom C
DEPC	diethylpyrocarbonate
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrioltetraessigsäure
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas-Liganden
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HDIs	Histondeacetylaseinhibitoren
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
MEM	Minimum Essential Medium
NSCLC	non-small cell lung cancer
Neg.	Negativkontrolle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PBS	phosphate buffered saline
RGE	relative Genexpression
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction

Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SDS	dodecylsulfate-Na-salt
TEMED	Tetramethylethyldiamine
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNF-Rezeptor	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TSA	Trichostatin A
VEGF	vascular endothelial growth factor

6 Zusammenfassung

Aufgrund der gegenwärtig unbefriedigenden Ergebnisse in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist es notwendig, neue Therapiestrategien zu entwickeln. Einer von mehreren Ansätzen ist die Induktion von Apoptose in Tumoren. Histondeacetylaseinhibitoren (HDIs) haben in einer Reihe von Malignomen bewiesen, dass sie Apoptose einleiten und so Tumorgewebe verkleinern können.

Diese Arbeit untersuchte, ob die HDIs Butyrat, Valproat und Trichostatin A (TSA) auch in Nierenkarzinomzelllinien (SN12, A498, ACHN) proapoptotisch wirken. Des Weiteren sind die Effekte einer HDI Behandlung auf die Genexpression des antiapoptotischen Survivins analysiert worden.

Die morphologischen Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop ergaben, dass die drei HDIs an den untersuchten Zelllinien apoptotische Veränderungen bewirkten. Auf der molekularen Ebene wurde per RT-PCR und Western Blot das Expressionsmuster der Caspase-3, die als Indikator für apoptotische Aktivität angesehen wird, untersucht. Auf mRNA- und Protein-Ebene fielen die Ergebnisse nicht eindeutig aus. Nur in der ACHN konnte für alle drei HDIs ein eindeutiger Anstieg der Caspase-3-Genexpression gezeigt werden. Interessanterweise konnte hier auch die höchste native Caspase-3-Expression beobachtet werden. Zudem steigerte Valproat in den drei Zelllinien die Caspase-3-Genexpression. Die Western Blot Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen, die auf mRNA-Ebene gemacht wurden. Dagegen konnten die verwendeten HDIs in sämtlichen Zelllinien die Survivin-Genexpression senken. Darüber hinaus war die Senkung der Survivin-Genexpression in einigen Zelllinien mit einer Steigerung der Caspase-3-Genexpression assoziiert. Somit ergeben sich aus unseren Resultaten erste Hinweise, dass HDIs ihre apoptotische Wirkung in Nierenkarzinomzelllinien über eine Beeinflussung der Survivin-Genexpression vermitteln.

Die Ergebnisse unserer Arbeit müssen durch weitere Forschung erhärtet werden. Sollten sich unsere Ergebnisse insbesondere *in vivo* bestätigen, so könnte aus unserem experimentellen Ansatz eine Therapieoption in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms entstehen.

7 Abstract

The unsatisfactory results of current therapies make it necessary to develop new therapeutic strategies for advanced renal cell carcinoma. The induction of apoptosis in tumors is one approach. Histone deacetylase inhibitors (HDIs) have shown in many tumors that they can induce apoptosis and growth arrest.

This study investigated whether the HDIs butyrate, valproic acid and trichostatin A (TSA) are able to induce apoptosis in renal cell carcinoma cell lines (SN12, A498, ACHN). Additionally, the effects on the gene expression of the antiapoptotic survivin were analyzed.

Microscopic observations showed that all three HDIs can cause typical apoptotic changes in the analysed cell lines. On the molecular level, caspase-3 gene expression, which is an indicator for apoptotic activity, was examined by RT-PCR and Western Blot. On the mRNA and protein level the results proved ambiguous. A clear increase of caspase-3 gene expression could only be demonstrated in HDI treated ACHN. Interestingly enough, the highest native caspase-3 gene expression was shown in ACHN. Additionally, valproic acid increased the caspase-3 level in all three cell lines. The Western blot results confirmed the observations made on mRNA level. In contrast, all used HDIs decreased survivin gene expression in all cell lines. In addition, the decrease of survivin gene expression was associated with an increase of caspase-3-gene expression in some cell lines. Therefore our results offer first hints that the apoptotic effect of HDIs are mediated by influencing survivin gene expression in cell lines of renal cell carcinoma.

The results of our study have to be substantiated by further research. If our results are confirmed *in vivo*, our experimental approach could be a new therapeutic option for the treatment of advanced renal cell carcinoma.

Anhang**Lebenslauf**

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

Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor der Urologischen Klinik und Hochschulambulanz der Charité – Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin, Herrn Prof. Dr. Kurt Miller, für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Steffen Weikert bedanken, der mich während meiner Arbeit intensiv betreute und mir bei allen inhaltlichen und methodischen Fragen stets hilfreich und fachkundig zur Seite stand. Seine kritischen Anmerkungen und sein Einsatz waren eine sehr große Hilfe bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei dem Leiter des urologischen Forschungslabors, Herrn Dr. Hans Krause, insbesondere für die Hilfe bei methodischen Aspekten dieser Arbeit. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen.

Zudem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des urologischen Forschungslabors, Frau Waltraud Jecabson, Frau Antonia Maaß und Frau Petra von Kwiatkowski, für die sehr freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich hier Frau Antonia Maaß herausheben, die mich in alle Geheimnisse der Zellkultur und des Western Blots einweihte und mich auch bei allen übrigen labortechnischen Fragen immer ausgesprochen engagiert und geduldig unterstützte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Johannes Meier, der mir viele Tipps zur elektronischen Textverarbeitung gab.

Dank gilt meiner Familie, die mich während dieser Zeit immer unterstützt und wieder aufgebaut hat. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht abschließen können.

Erklärung

„Ich, Axel Mußler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Histondeacetylaseinhibitoren in Zelllinien des Nierenzellkarzinoms

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, August 2006