

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Apoptoseinduktion in Nierenkarzinomzelllinien

Der Nachweis der Apoptose in den Zelllinien SN12, A498 und ACHN durch die HDIs Butyrat, Valproat und TSA wurde einerseits indirekt durch Nachweis einer Permeabilitätsänderung der Zell- und Kernmembran mittels Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay geführt. Andererseits sollte die Aktivierung der Apoptosekaskade in den behandelten Zellen durch Messung der Expressionsänderung einer Effektorcaspase (Caspase-3) nachgewiesen werden. Die Caspase-3-Expression wurde dabei sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene untersucht. Der Versuchsaufbau ist oben ausführlich dargelegt worden.

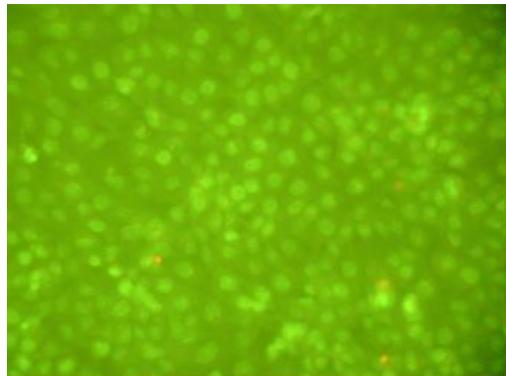
#### 4.1.1 Apoptosenachweis durch Fluoreszenzmikroskopie

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Zellen im Hinblick auf ihre morphologischen Veränderungen analysiert. Mit Hilfe des Apoptosenachweises durch den Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay können apoptotische Zellen identifiziert werden (Näheres siehe 3.4). Semiquantitative Vergleiche hinsichtlich der Anzahl apoptotischer Zellen beziehen sich auf die unbehandelte Negativkontrolle und erfolgten nach dem oben beschriebenen Apoptose-Score (Tabelle 2 unter 3.4).

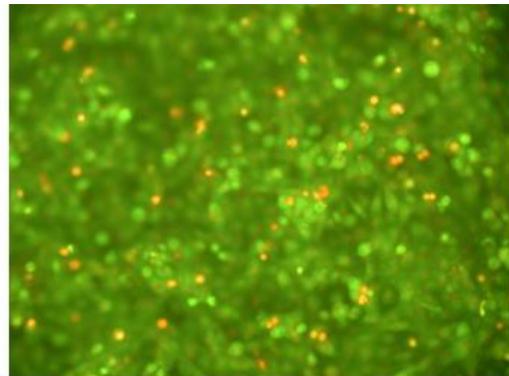
##### 4.1.1.1 Zelllinie SN12

In der Zelllinie SN12 konnte unter dem Einfluss der drei verwendeten Substanzen morphologische Apoptosezeichen nachgewiesen werden. Unter Butyrat wurde eine mittlere Apoptoseaktivität (Score: ++) nach 24h registriert. Valproat dagegen konnte zum Zeitpunkt 24h eine starke Apoptoseaktivität (Score: +++) bewirken. Bei beiden Substanzen konnte nach 48h die Anzahl der apoptotischen Zellen noch vergrößert werden (Score: +++) . Auch unter einer TSA-Behandlung lässt sich eine Zunahme der für die Apoptose typischen Veränderungen in der Farbstoffaufnahme vom Zeitpunkt 24h zum Zeitpunkt 48h nachweisen.

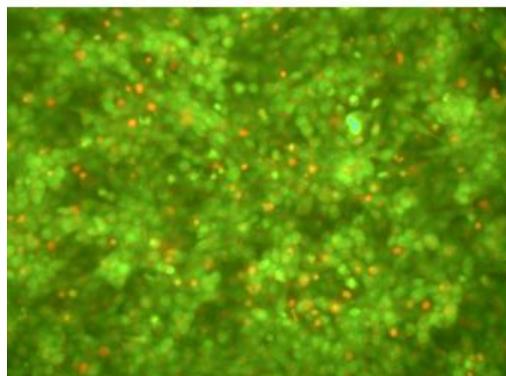
Die Ergebnisse des Acridinorange/Ethidiumbromid-Assays weisen darauf hin, dass die Induktion der Apoptose unter Valproat-Behandlung am stärksten ist (Abbildung 2).



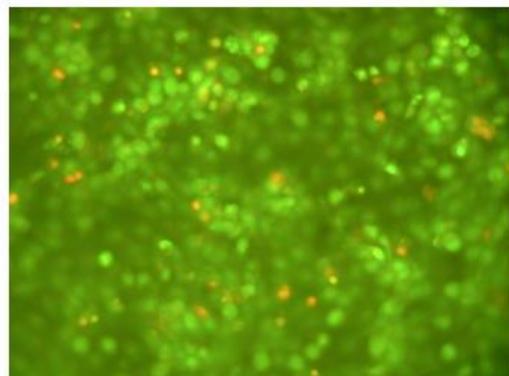
Neg.



SN12 und Butyrat 10mM nach 24h



SN12 und Valproat 10mM nach 24h



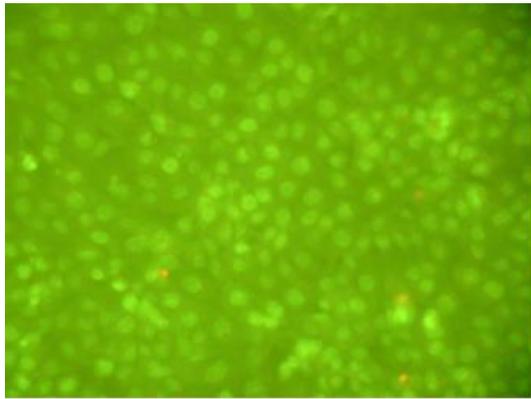
SN12 und TSA 10µM nach 24h

**Abbildung 2.** Apoptoseinduktion durch die Histondeacetylaseinhibitoren Butyrat, Valproat und TSA nach 24h. Im Vergleich zur Negativkontrolle deutliche Zeichen der frühen Apoptose im Acridinorange/ Ethidiumbromid Assay mit strahlend grünen Nuklei und dichten grünen Arealen bei der Mehrzahl der Zellen. Zudem - insbesondere bei Valproat-Behandlung – eine Vielzahl von Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose befinden, zu erkennen an einer orangenen Kernfärbung.

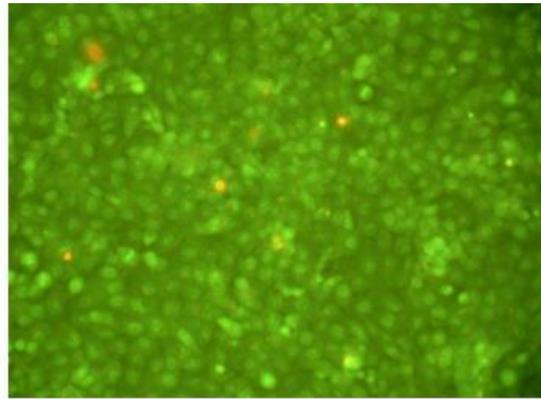
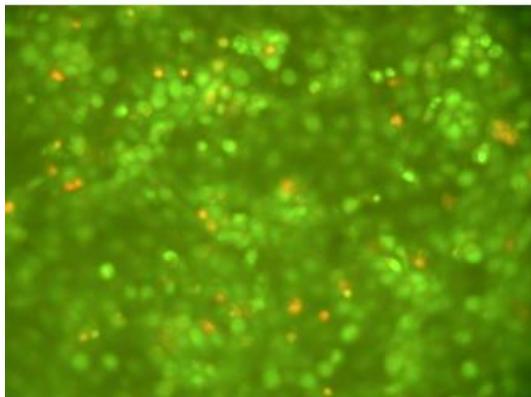
Unterschiede zwischen den verwendeten HDIs ergeben sich neben ihrer proapoptotischen Potenz auch aus ihrer konzentrationsabhängigen Wirkung. Für die Butyrat-Behandlung ergaben sich Hinweise für eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen mit steigenden Konzentrationen der Substanz. Bei Valproat-Behandlung ist die Apoptoseaktivität bei maximaler Konzentration am ausgeprägtesten. Dabei scheint erst ab einer Schwellenkonzentration von 1mM ein Effekt im Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay nachweisbar zu sein.

Auch bei TSA lässt sich anhand des morphologischen Bildes eine Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen mit steigender Konzentration nachweisen. War die apoptotische Aktivität

bei einer Konzentration von  $0,1\mu\text{M}$  noch schwach (Score: +), so war sie bei  $10\mu\text{M}$  stark (Score: +++) (Abbildung 3).



Neg.

SN12 und TSA  $0,1\mu\text{M}$  nach 24hSN12 und TSA  $10\mu\text{M}$  nach 24h

**Abbildung 3.** Apoptoseinduktion durch den Histondeacetylaseinhibitor TSA nach 24h. Konzentrationsabhängiger Zuwachs an Zellen, die einen strahlend grünen Nukleus mit dichten grünen Arealen besitzen, und an Zellen, deren Kerne eine orangene Färbung zeigen. Zeichen für frühe bzw. späte Apoptose.

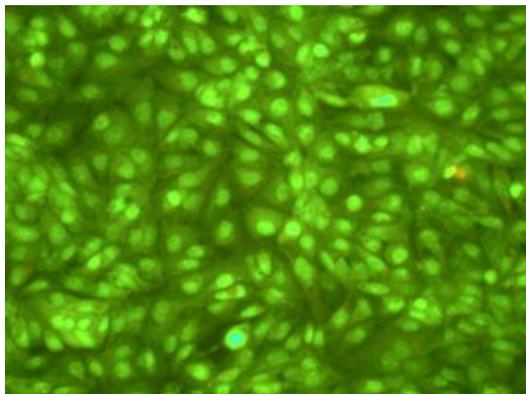
#### 4.1.1.2 Zelllinie A498

Butyrat erzielte nach 24h eine Apoptoseaktivität von mittlerer Stärke (Score: ++). Nach 48h konnte eine starke Apoptoseaktivität beobachtet werden (Score: +++). Unter dem Einfluss von Valproat ergab sich ein ähnliches Bild. Nach 24h konnte eine mittlere Apoptoseaktivität (Score: ++) registriert werden. Dabei wurden an jedem Konzentrationspunkt ausgeprägte Apoptosezeichen beobachtet, wobei der maximale Effekt auch bei den höchsten Konzentrationen beobachtet wurde (Score: ++). Dabei konnte mit zunehmender Inkubation der Substanz auch eine Steigerung der Apoptosezeichen festgestellt werden. Nach 48h Inkubationszeit (Score: +++) war eine Zunahme des Scores im Vergleich zur 24-stündigen Behandlung zu beobachten.

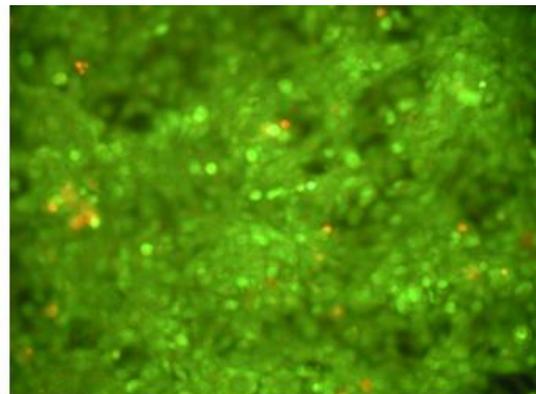
Auch TSA konnte in der A498 Apoptose induzieren. Nach 24h war die Stimulation noch von einer mittleren Stärke (Score: ++), während nach 48h schon bei niedriger Konzentration (1  $\mu$ M) eine starke Apoptoseaktivität (Score: +++) zu beobachten war.

Die Auswertung der Bilder lässt darauf schließen, dass Butyrat von den verwendeten Substanzen nach 24h am stärksten Apoptose induzieren konnte. Nach 48h dagegen konnte die größte Apoptoseaktivität unter einer TSA-Behandlung beobachtet werden.

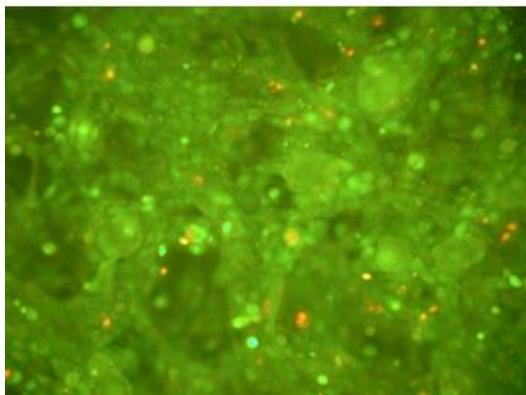
Beispielhaft werden nur die Ergebnisse der Mikroskopie nach 24h bei Konzentrationen von 1mM beziehungsweise 1  $\mu$ M gezeigt (Abbildung 4).



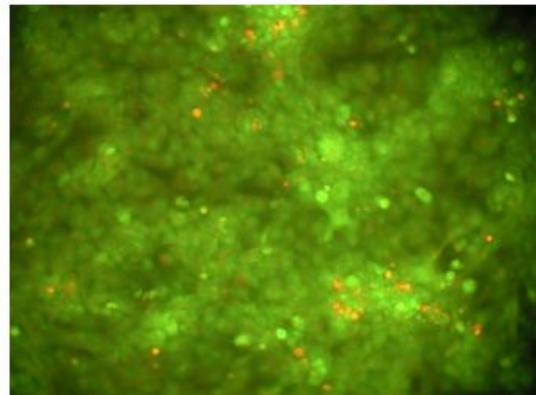
Neg.



A498 und Butyrat 1mM nach 24h



A498 und Valproat 1mM nach 24h

A498 und TSA 1  $\mu$ M nach 24h

**Abbildung 4.** Apoptoseinduktion durch die Histondeacetylaseinhibitoren Butyrat, Valproat und TSA. Nach 24h Inkubation Zeichen der frühen Apoptose im Acridinorange/Ethidiumbromid Assay mit strahlend grünen Nuklei, die dichte grüne Areale besitzen, bei der Mehrzahl der Zellen. Insbesondere unter Valproat- und TSA-Behandlung auch Zellen mit orangener Zellkernfärbung als Zeichen der späten Apoptose.

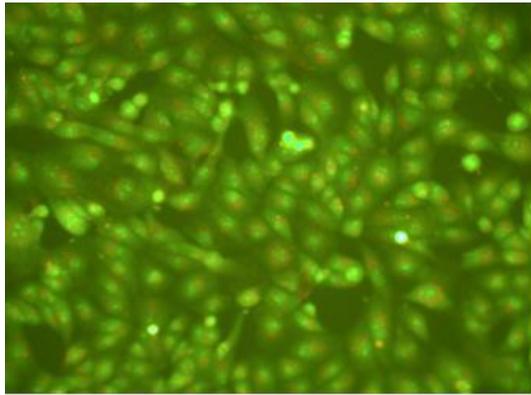
#### 4.1.1.3 Zelllinie ACHN

In der Zelllinie ACHN konnte Butyrat zum Zeitpunkt 24h an den Konzentrationspunkten 0,1 und 1mM keine wesentliche Apoptose induzieren (Score: +). Dagegen war am Konzentrationspunkt 10mM eine erhebliche Veränderung der Zellmorphologie zu beobachten, und die adhärenen Zellen zeigten eine Apoptoseaktivität von mittlerer Stärke (Score: ++). Nach 48h war sie an jedem Konzentrationspunkt in den Zellen deutlich ausgeprägt (Score: +++).

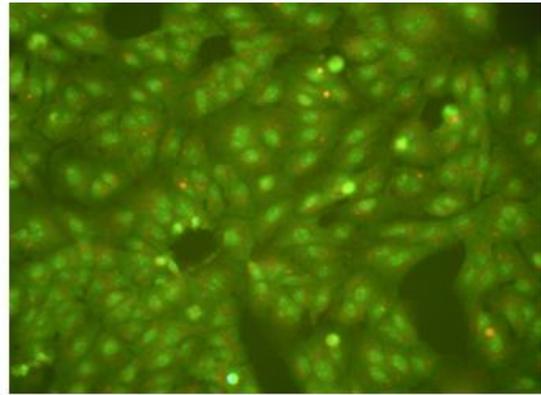
Auch Valproat konnte zu dem Zeitpunkt 24h in den Zellen erst mit der maximalen Konzentration ein verstärktes Apoptoseverhalten induzieren (Score: ++). Hier wurde bei maximaler Konzentration der Zellrasen nahezu vollständig zerstört, so dass von einem relevanten Anteil nekrotischer Zellen ausgegangen werden muss. Ähnliche Ergebnisse brachte eine 48-stündige Behandlung mit maximalen Valproat-Konzentrationen.

TSA konnte zum Zeitpunkt 24h ebenfalls nur ein Apoptosesignal von mittlerer Intensität bewirken (Score: ++). Dennoch kann anhand der mit dem Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay nachweisbaren morphologischen Zellveränderungen für TSA die höchste apoptoseinduzierende Potenz in ACHN-Zellen vermutet werden. Dabei waren die maximalen Effekte erst nach 48-stündiger Inkubationszeit von TSA zu beobachten (Score: +++).

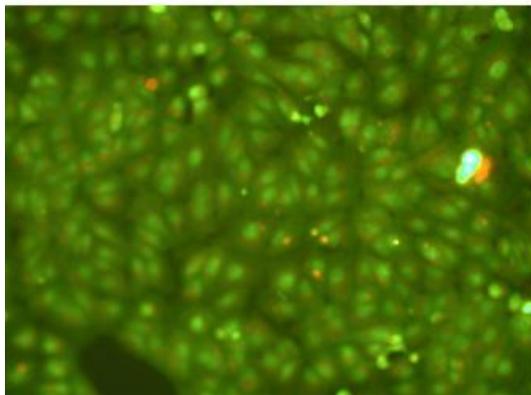
Beispielhaft werden nur die Ergebnisse der Mikroskopie nach 24h bei Konzentrationen von 1mM beziehungsweise 1 $\mu$ M gezeigt (Abbildung 5).



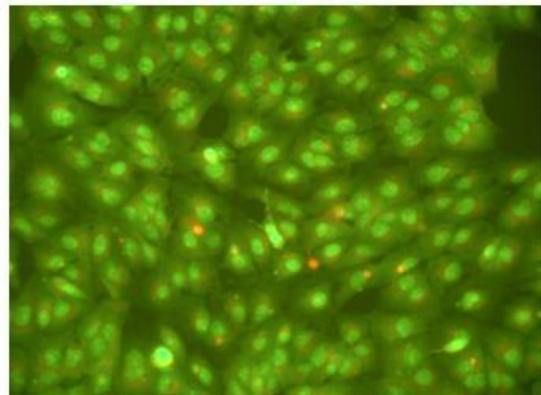
Neg.



ACHN und Butyrat 1mM nach 24h



ACHN und Valproat 1mM nach 24h



ACHN und TSA 1μM nach 24h

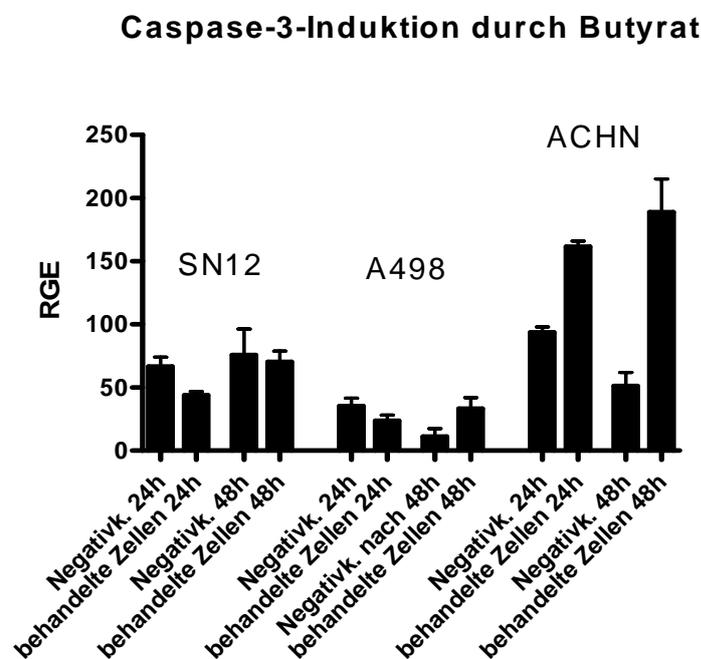
**Abbildung 5.** Apoptoseinduktion durch die Histondeacetylaseinhibitoren Butyrat, Valproat und TSA. An den Konzentrationspunkten 1mM bzw. 1μM war nach 24h Inkubation kein wesentlicher Zuwachs an apoptotischen Zellen zu erkennen.

4.2 Einfluss der Histondeacetylaseinhibitoren auf die Caspase-3-Expression auf mRNA-Ebene  
Nach dem morphologischen Apoptosenachweis in Nierenkarzinomzelllinien sollte im nächsten Schritt die Aktivierung der Apoptose-Signalwege auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Dabei wurde untersucht, ob es zu einer Hochregulation der Caspase-3-mRNA in behandelten Zellen kommt. In den Diagrammen werden die Mittelwerte der relativen Genexpression (RGE) dargestellt. Der Anstieg wird im Vergleich zu der unbehandelten Negativkontrolle angegeben. Insgesamt zeigte sich bei der Caspase-3-Expression in den behandelten Zelllinien ein uneinheitliches Bild. Nicht in allen Zelllinien war eine Caspase-3-Hochregulation mittels der RT-PCR nachweisbar. Zudem konnten bei der Untersuchung der unbehandelten Nierenkarzinomzellen Unterschiede hinsichtlich der Caspase-3-Expression unabhängig von einer Behandlung, d.h. nativ, festgestellt werden. So wurde die relative mRNA-Expression zum Zeitpunkt 24h in den Zelllinien SN12 und A498 mit 66,5RGE (+/- 7,6RGE) bzw.

35,3RGE (+/- 6,3RGE) bestimmt, die damit niedriger als in der Zelllinie ACHN mit einer Expression von 93,6RGE (+/- 4,4RGE) liegt.

Hinsichtlich der Expression der Caspase-3 unter der HDI Behandlung wurden folgende Ergebnisse beobachtet:

Butyrat konnte in der Zelllinie SN12 weder nach 24h noch 48h eine Caspase-3-Induktion erreichen. Auch an A498 Zellen steigerte Butyrat nach 24h nicht die Caspase-3-Genexpression. Jedoch konnte nach 48h eine Verdreifachung der Genexpression gemessen werden. An ACHN Zellen ergab sich für Butyrat eine 1,7 fache Steigerung nach 24h. Dieser Trend bestätigte sich nach 48h, an diesem Zeitpunkt wurde eine 3,7 fach höhere Caspase-3-Genexpression registriert (Abbildung 6).

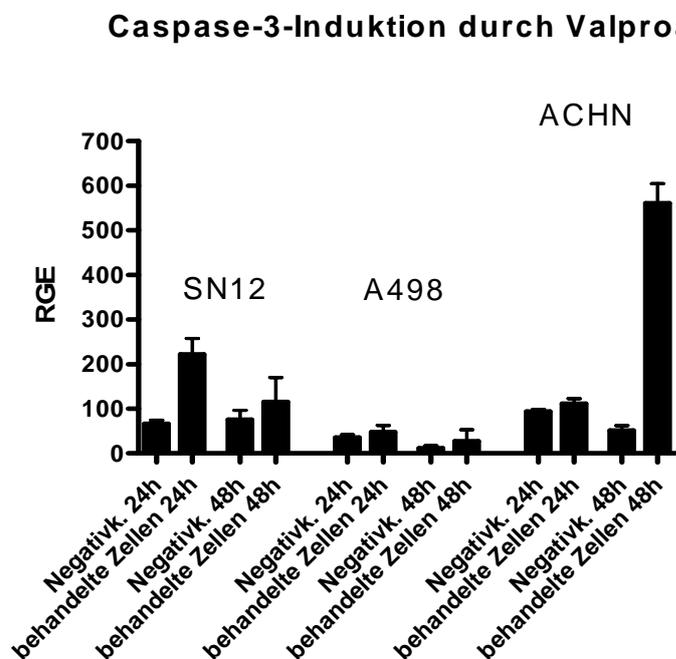


**Abbildung 6.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Caspase-3-Genexpression in den Zelllinien SN12, A498 und ACHN gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zelllinien wurden 24h und 48h mit 0,1, 1 und 10mM Butyrat inkubiert.

Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien (gepoolt über die drei verwendeten Konzentrationen) nach 24 und 48h im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Caspase-3-Gens wurde die Kopienzahl des Caspase-3-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

Unter einer Valproat Behandlung stieg die Caspase-3-Genexpression in der Zelllinie SN12 nach 24h um das 3,3 fache an. Nach 48h war eine 1,5 fach höhere Expression zu verzeichnen. Damit war Valproat in der SN12 nach 24h und 48h der stärkste Induktor. An A498 Zellen konnte durch

Valproat nach 24h eine Tendenz zu einer Steigerung der Genexpression beobachtet werden. Eine Steigerung der Genexpression nach 48h um das 2,4 fache bestätigte diesen Trend, der schon nach 24h zu sehen war. Auch in der Zelllinie ACHN war eine Valproat-Behandlung über 24h und 48h mit einer Steigerung des Caspase-3-mRNA-Levels assoziiert. Nach 24h war der Effekt mit einer Steigerung um das 1,2 fache noch gering, doch nach 48h erhöhte Valproat die Genexpression um das 11 fache und erreichte damit eine RGE von 560,9 (+/- 43,6), ein Wert, der von keinem in dieser Studie untersuchten HDI übertroffen wurde (Abbildung 7). Einschränkend muss angemerkt werden, dass die Streuung der Ergebnisse der Valproat Behandlung an SN12 und A498 Zellen recht hoch war, so dass hier die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden müssen.

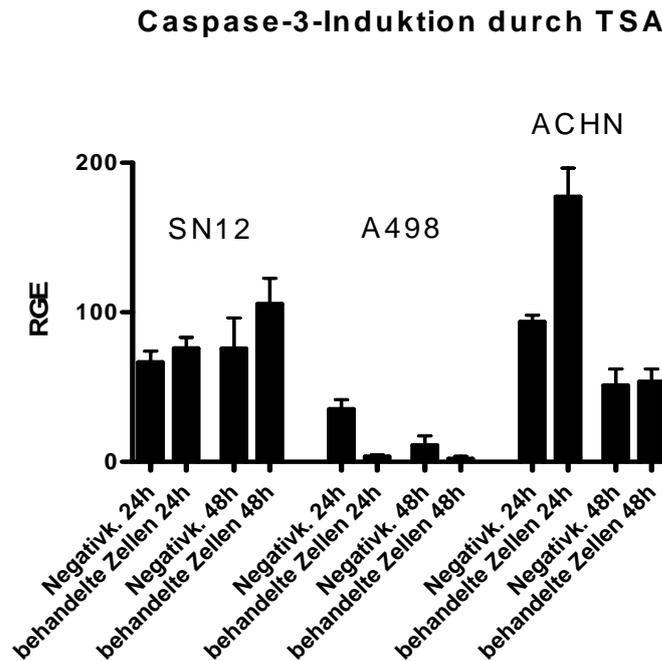


**Abbildung 7.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Caspase-3-Genexpression in den Zelllinien SN12, A498 und ACHN gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zelllinien wurden 24 und 48h mit 0,1, 1 und 10mM Valproat inkubiert.

Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien (gepoolt über die drei verwendeten Konzentrationen) nach 24 und 48h im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Caspase-3-Gens wurde die Kopienzahl des Caspase-3-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

TSA erreichte an SN12 Zellen nach 24h keine nennenswerte Steigerung der Genexpression, jedoch konnte nach 48h eine 1,4-fach höhere Genexpression registriert werden, somit lässt sich nur eine Tendenz zu einer Induktion der Genexpression ablesen. In A498 konnte unter dem

Einfluss von TSA zu keinem Zeitpunkt eine stimulierende Wirkung auf die Genexpression nachgewiesen werden. Überraschenderweise fand sich sogar eine Abnahme der Caspase-3-Expression auf dem Transkript-Level, wobei die Gründe für diese Beobachtung unklar sind. Auch bei ACHN-Zellen war das Ergebnis für TSA uneinheitlich. TSA konnte zum Zeitpunkt 24h eine Induktion um das 1,9 fache erzielen. Allerdings wurde nach 48h Stunden kein Effekt beobachtet (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Caspase-3-Genexpression in den Zelllinien SN12, A498 und ACHN gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zelllinien wurden 24 und 48h mit 0,1, 1 und 10 $\mu$ M TSA inkubiert.

Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien (gepoolt über die drei verwendeten Konzentrationen) nach 24 und 48h im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Caspase-3-Gens wurde die Kopienzahl des Caspase-3-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

Fasst man nun die Ergebnisse für die drei untersuchten Zelllinien zusammen, so ergibt sich folgendes Bild. Lediglich bei der Zelllinie ACHN waren Behandlungen mit allen drei HDIs regelmäßig mit einer Steigerung der Caspase-3 Expression auf mRNA-Ebene verbunden (Abbildungen 6-8). Interessanterweise wurde in der Zelllinie ACHN auch die höchste native Caspase-3-Expression gemessen.

Für die anderen Zelllinien zeigt sich ein uneinheitliches Bild, wobei zumindest die Behandlung mit Valproat und TSA in der Zelllinie SN12 mit einer Erhöhung der Caspase-3-mRNA einhergeht.

Valproat erzielt ähnliche Ergebnisse in der Zelllinie A498, wobei durch die relativ große Streuung der Messwerte keine abschließende Beurteilung möglich ist. Die A498 reagierte zudem sensibel, d. h. mit einer Steigerung der Caspase-3 Expression, auf eine Butyrat Behandlung nach 48h.

#### 4.3 Konzentrationsabhängige Effekte der HDI-Behandlung auf die Caspase-mRNA-Expression

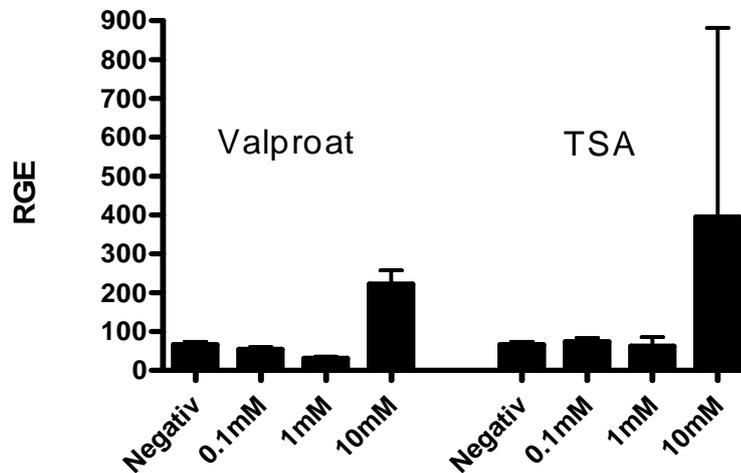
Die Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben behandelt und über den Zeitraum 24h jeweils mit Butyrat (0,1mM, 1mM, 10mM), Valproat (0,1mM, 1mM, 10mM) und TSA (0,1µM, 1µM, 10µM) inkubiert. Die Werte wurden mittels RT-PCR generiert. In den Diagrammen werden die Mittelwerte der relativen Genexpression angegeben. Anstiege der Genexpression beziehen sich auf die unbehandelte Negativkontrolle.

Im Rahmen einer zweiten Untersuchung sollte die Frage beantwortet werden, ob die Caspase-3-Induktion konzentrationsabhängig erfolgte. Der Zeitpunkt 24h wurde ausgewählt, weil die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, dass der maximale Effekt oft schon nach 24h eingetreten war. Außerdem beobachteten wir im Acridinorange/Ethidiumbromid uptake, eine verstärkte Zunahmen von nekrotischen Zellen nach 48h, so dass wir den degradierenden Einfluss von mRNA abbauenden Enzymen aus nekrotischen Zellen auf intakte mRNA möglichst gering halten wollten.

Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Caspase-3-Expression nach Behandlung mit HDIs ließ sich lediglich in der Zelllinien ACHN (alle drei Substanzen) und SN12 (TSA und Valproat) belegen. In den Abbildungen 9 und 10 sind die Effekte der HDIs auf die Caspase-3-Expression konzentrationsabhängig dargestellt.

In der Zelllinie SN12 wurde unter Valproat- und TSA-Behandlung eine konzentrationsabhängige Geninduktion beobachtet. Allerdings erzielten beide Histondeacetylaseinhibitoren erst bei höchster Konzentration eine deutliche Steigerung der Genexpression. Unter Valproat konnte ein 3,3 und unter TSA ein 5,9-facher Anstieg registriert werden (Abbildung 9). Wobei für TSA aufgrund der großen Streuung der Werte nur von einem Trend gesprochen werden kann.

### Konzentrationsabhängige Induktion der Caspase-3-Genexpression in SN12-Zellen nach 24h



**Abbildung 9.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Caspase-3-Genexpression in der Zelllinien SN12 gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zellen wurden mit 0,1, 1, 10mM Butyrat oder Valproat und 0,1, 1, 10 $\mu$ M TSA 24h inkubiert.

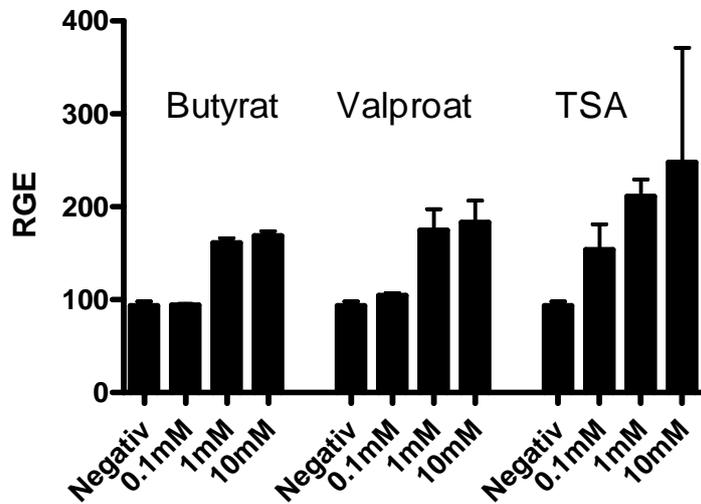
Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien nach 24h zu den jeweiligen Konzentrationspunkten im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder.

Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Caspase-3-Gens wurde die Kopienzahl des Caspase-3-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

Dagegen konnten alle drei Histondeacetylaseinhibitoren an ACHN-Zellen eine konzentrationsabhängige Caspase-3-Geninduktion bewirken. Unter Butyrat kam es bei maximaler Konzentration zu einer Zunahme der Genexpression um das 1,7 fache.

Valproat vermochte die Genexpression an dem Konzentrationspunkt 10mM um das 2,1 fache zu steigern. Dieses Ergebnis wurde auch hier von TSA übertroffen. Unter einer Inkubation mit TSA wurde eine um das 2,6 fache gesteigerte Caspase-3-Genexpression an ACHN-Zellen beobachtet (Abbildung 10). Damit erreichte TSA bei beiden Zelllinien die stärkste Steigerung der Caspase-3-Genexpression.

### Konzentrationsabhängige Induktion der Caspase-3-Genexpression in ACHN-Zellen nach 24h



**Abbildung 10.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Caspase-3-Genexpression in den Zelllinien SN12 gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zellen wurden mit 0,1, 1, 10mM Butyrat oder Valproat und 0,1, 1, 10 $\mu$ M TSA 24h inkubiert.

Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien nach 24h zu den jeweiligen Konzentrationspunkten im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder.

Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Caspase-3-Gens wurde die Kopienzahl des Caspase-3-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

#### 4.4 Auswirkung der Histondeacetylaseinhibitoren auf das Caspase-3-Protein

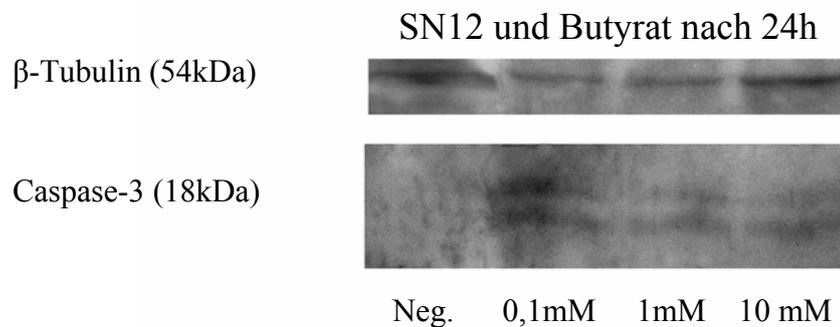
Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gilt Caspase-3 als ein Marker für apoptotische Aktivität in Zelllinien. In einer weiteren Versuchsreihe wurde mittels Western Blot analysiert, ob es unter dem Einfluss von Butyrat, Valproat und TSA in den Zelllinien SN12, A498 und ACHN zu Veränderungen der Caspase-3-Expression auf Proteinebene kommt. Es war dabei von besonderem Interesse, ob die auf dem Level des Transcriptoms gemachten Beobachtungen auch auf der Ebene des Proteins bestätigt werden können. Ein Nachweis des Caspase-3-Proteins unter HDI-Behandlung würde dann weitere Evidenz für eine Aktivierung der Apoptosekaskade liefern. Funktionell relevant wäre tatsächlich auch nur die Synthese und Aktivierung des Caspase-3-Proteins.

Vergleiche hinsichtlich der Stärke der Caspase-3-Protein-Expression beziehen sich auf die unbehandelte Negativkontrolle. Einzelne Abbildungen der Western Blots stehen beispielhaft für eine dreifache Durchführung der Versuche. Als Referenzprotein wurde das ubiquitär

vorkommende Protein  $\beta$ -Tubulin verwendet, das ein Molekulargewicht von 51-54 Kilodalton (kDa) besitzt. Die Procaspase-3 wird zur aktiven Caspase-3 umgewandelt, indem durch Aktivatorcaspasen Teile des Proteins abgetrennt werden. Deshalb zeigt sich die Caspase-3 nach Aktivierung im Western Blot als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

#### 4.4.1 Caspase-3 in der Zelllinie SN12

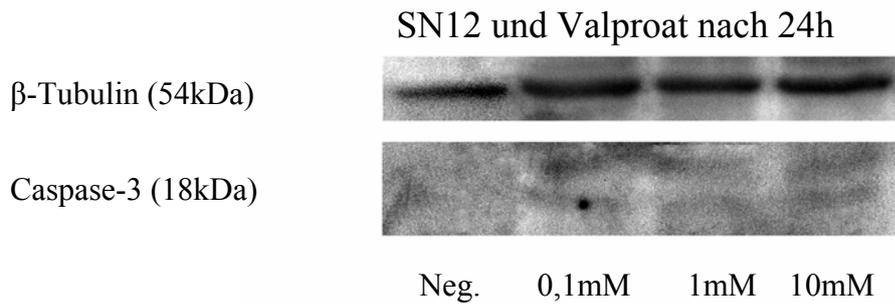
Unter dem Einfluss von Butyrat konnte sowohl nach 24h als auch nach 48h eine Caspase-3 Induktion beobachtet werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11.** Mit Hilfe des Western Blots wurde der Effekt der HDI Behandlung auf die Expression des Caspase-3-Proteins untersucht. Die Zellen wurden 24h mit 0,1, 1 und 10mM Butyrat inkubiert. Das ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Tubulin diente als Kontrolle für identische Proteinmengen zwischen den unterschiedlichen Proben. Sein Molekulargewicht beträgt 54kDa. Die aktivierte Caspase-3 zeigt sich im Western Blot als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

An allen drei Konzentrationspunkten kann die Caspase-3 Doppelbande deutlich dargestellt werden.

Auch Valproat kann eine deutliche Steigerung des Caspase-3 Proteins erzielen (Abbildung 12). Das Signal ist nach 24h stärker als nach 48h. Unter TSA kann dagegen auf Proteinebene keine deutliche Caspase-3 Induktion nachgewiesen werden.



**Abbildung 12.** Mit Hilfe des Western Blots wurde der Effekt der HDI Behandlung auf die Expression des Caspase-3-Proteins untersucht. Die Zellen wurden 24h mit 0,1, 1 und 10 mM Valproat inkubiert. Das ubiquitär vorkommende β-Tubulin diente als Kontrolle für identische Proteinmengen zwischen den unterschiedlichen Proben. Sein Molekulargewicht beträgt 54kDa. Die aktivierte Caspase-3 zeigt sich im Western Blot als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

An jedem Konzentrationspunkt kann unter Valproat-Behandlung die Caspase-3 Doppelbande nachgewiesen werden.

#### 4.4.2 Caspase-3 in der Zelllinie A498

In der Zelllinie A498 konnte zum Zeitpunkt 24h durch Butyrat keine Caspase-3-Induktion gezeigt werden. Dagegen zeichnete sich ein Trend hin zu einer Stimulation nach 48h ab.

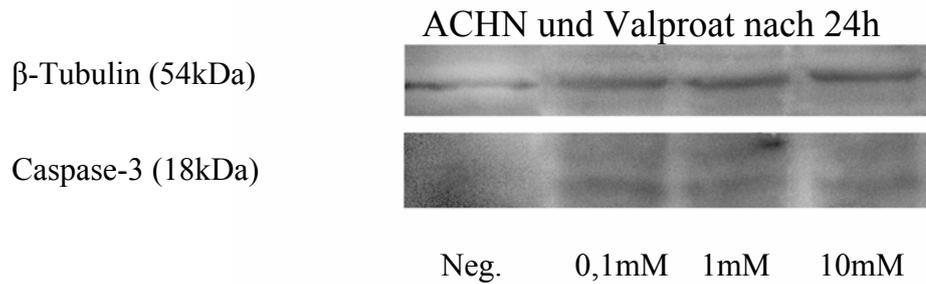
Unter Valproat ließ sich keine eindeutige Steigerung der Caspase-3-Expression beobachten.

Auch TSA konnte weder nach 24 noch nach 48h eine Caspase-Induktion bewirken.

#### 4.4.3 Caspase-3 in der Zelllinie ACHN

Alle drei Substanzen stimulierten die Zelllinie ACHN zu einer verstärkten Expression des Caspase-3-Proteins. Butyrat vermochte zu dem Zeitpunkt 48h Caspase-3-Expression besonders stark zu steigern. Nach 24h war nur eine geringe Steigerung der Caspase-3-Expression messbar.

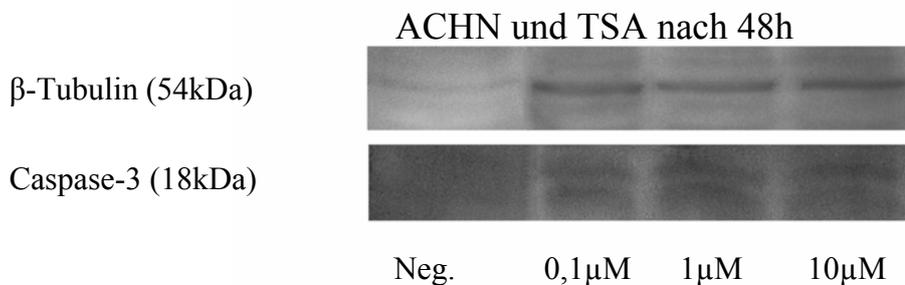
Eine starke Stimulation war auch unter einer Valproat-Behandlung zu beobachten. Eindeutig konnte auch hier Caspase-3 nach 24 und nach 48h nachgewiesen werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13.** Mit Hilfe des Western Blots wurde der Effekt der HDIs Behandlung auf die Expression des Caspase-3-Proteins untersucht. Die Zellen wurden mit Valproat 0,1, 1 und 10mM inkubiert. Das ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Tubulin diente als Kontrolle für identische Proteinmengen zwischen den unterschiedlichen Proben. Sein Molekulargewicht beträgt 54kDa. Die aktivierte Caspase-3 zeigt sich im Western Blot als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

Nachweis der Caspase-3 Doppelbande an jedem Konzentrationspunkt unter Valproat-Behandlung.

Der dritte HDI TSA erreichte zum Zeitpunkt 24h nur bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M eine Stimulation. Dagegen konnte nach 48h an jedem Konzentrationspunkt eine deutliche Steigerung der Caspase-3-Expression beobachtet werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14.** Mit Hilfe des Western Blots wurde der Effekt der HDI Behandlung auf die Expression des Caspase-Proteins untersucht. Die Zellen wurden 48h mit 0,1, 1 und 10 $\mu$ M TSA inkubiert. Das ubiquitär vorkommende  $\beta$ -Tubulin diente als Kontrolle für identische Proteinmengen zwischen den unterschiedlichen Proben. Sein Molekulargewicht beträgt 54kDa. Die aktivierte Caspase-3 zeigt sich im Western Blot als Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 18kDa.

Nachweis der Caspase-3 Doppelbande an den drei Konzentrationspunkten unter TSA-Behandlung.

#### 4.5 Zusammenfassung der Apoptose-Nachweisverfahren

Durch Behandlung von Nierenkarzinomzelllinien mit ausgewählten HDIs konnten apoptosetypische, im Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay nachweisbare morphologische Zellveränderungen ausgelöst werden. Daraus schlossen wir, dass alle drei HDIs in den untersuchten drei Zelllinien Apoptose induzieren.

Allerdings waren die auf molekularer Ebene gemachten Beobachtungen hinsichtlich einer Aktivierung der Apoptosekaskade uneinheitlich. Eine Hochregulation der Caspase-3-Expression als Zeichen apoptotischer Aktivität ließ sich nicht konstant nachweisen. Auf RNA-Ebene konnte durch Valproat in allen drei Zelllinien eine Stimulation der Caspase-3-Genexpression beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 24h war Valproat unter den drei Substanzen der potenteste Induktor an SN12 und an A498 Zellen, an ACHN Zellen zum Zeitpunkt 48h. Auf das Problem der großen Streuung der Werte für Valproat wurde weiter oben bereits eingegangen.

TSA konnte dagegen nur in den Zelllinien SN12 und ACHN eine Genexpression induzieren.

Butyrat erreichte die stärkste Stimulation in der A498 zum Zeitpunkt 48h und in der ACHN nach 24h. Die Substanz blieb aber bei der SN12 wirkungslos.

Die Ergebnisse auf Protein-Ebene zeigen ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Unter dem Einfluss von Butyrat und Valproat konnte in allen drei Zelllinien, wenn auch bei der A498 mit Einschränkung, eine verstärkte Expression des Caspase-3-Proteins nachgewiesen werden. In der Zelllinie SN12 war die Stimulation bei beiden Substanzen nach 24h stärker als nach 48h. TSA konnte in SN12 und A498 keinen Zuwachs des Caspase-3-Proteins bewirken. Dagegen war in der ACHN eine Stimulation nach 24h und 48h zu beobachten.

In der nun folgenden Synopse sind die Ergebnisse der drei Apoptose-Nachweisverfahren zusammengefasst (Tabelle 3).

	<b>Caspase-mRNA-Level</b>	<b>Caspase-Protein-Level</b>	<b>Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay</b>
<b>24h SN12</b>			
Butyrat	-	↑↑↑	++ (+++)
Valproat	↑↑ (+/-)	↑↑↑	+++
Trichostatin A	+/-	-	++
<b>24h A498</b>			
Butyrat	-(↑↑)	-	++ (+++)
Valproat	+/-	+/-	++ (+++)
Trichostatin A	↓	-	+(+++)

	Caspase- mRNA-Level	Caspase-Protein- Level	Acridinorange/Ethidiumbromid- Assay
<b>24h ACHN</b>			
Butyrat	↑	↑↑↑ (↑)	++ (+++)
Valproat	↑ (↑↑↑)	↑↑	++
Trichostatin A	↑ (-)	↑ (↑↑↑)	++ (+++)

**Tabelle 3.** ↑: Stimulation, ↓: Inhibierung, -: kein Effekt, +/-: kein eindeutiges Ergebnis  
 Apoptose-Score des Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay:  
 +: schwache apoptotische Aktivität  
 ++: mittlere apoptotische Aktivität  
 +++: starke apoptotische Aktivität

Die Synopse zeigt die Ergebnisse der drei Apoptose-Nachweisverfahren im Zusammenhang. In Klammern werden Ergebnisse zum Zeitpunkt 48h angegeben, wenn sie sich von den Ergebnissen nach 24h unterscheiden.

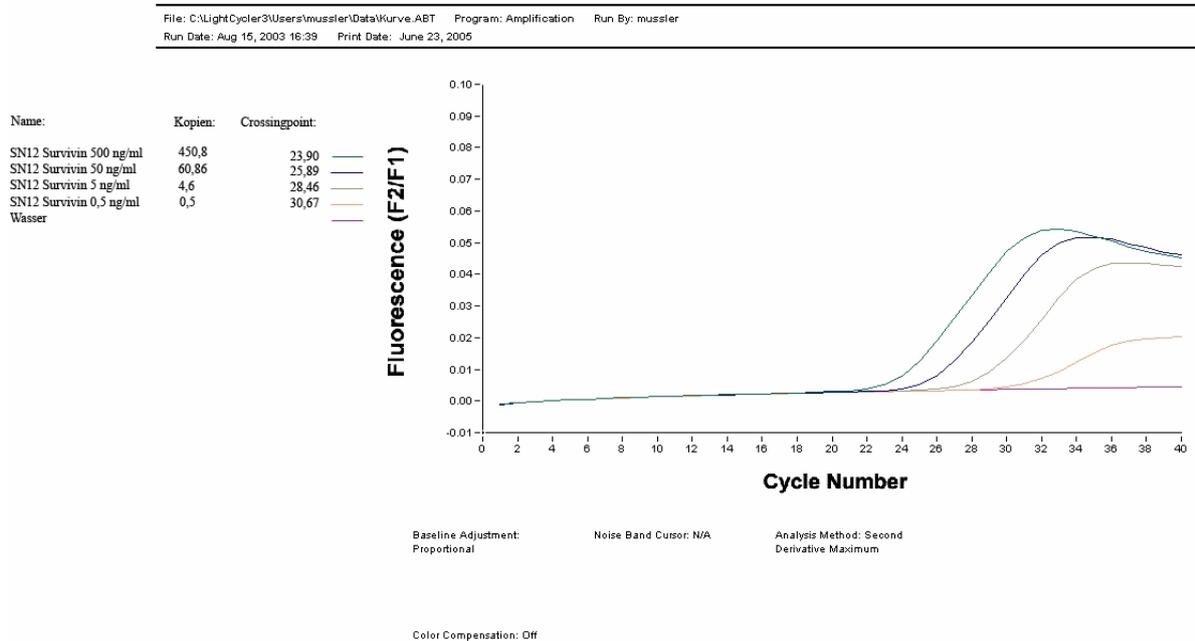
Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse können für die Nierenkarzinomzelllinien keine allgemeingültigen Aussagen zur potentiellen proapoptotischen Wirkung der HDIs und deren molekularen Mechanismen getroffen werden, obwohl sich Hinweise für eine Apoptoseinduktion durch HDIs ergaben. Wir wendeten uns in einer weiteren Versuchsreihe der Frage zu, ob spezifische, für Apoptoseresistenz von Nierenkarzinomzellen relevante Apoptosemodulatoren in ihrem Expressionsniveau durch HDIs beeinflusst werden. Mahotka *et al.* (1999) konnten zeigen, dass das antiapoptotische Survivin in einer Reihe von Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (n=11) nachweisbar war. Deshalb war es nahe liegend, erste Untersuchungen zum Einfluss von HDIs auf die Expression des Apoptosemodulators Survivin anzustellen.

#### 4.6 Survivin-mRNA Expression in unbehandelten und mit Histondeacetylaseinhibitoren behandelten Nierenkarzinomzelllinien

##### 4.6.1 Entwicklung eines Survivin-Standards und Charakterisierung der nativen Zelllinien

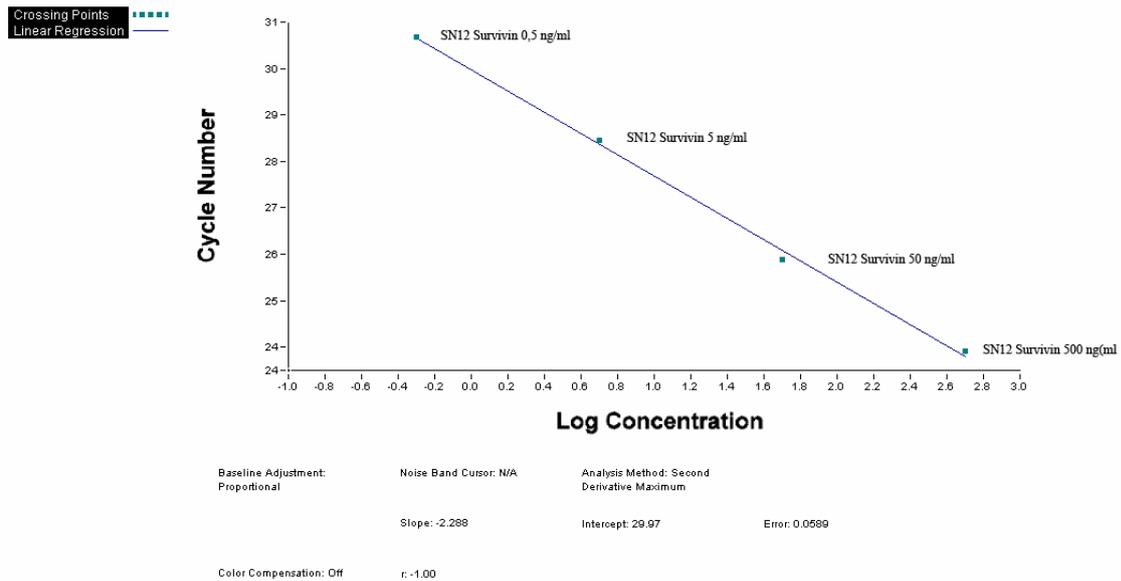
Zur Einführung eines Survivin-Standards wurden für die Zelllinien SN12, A498 und ACHN individuelle Standard-Kurven entwickelt. Dabei wurden in vier Proben mit bekannten Konzentrationen von mRNA, in vier unterschiedlichen Verdünnungsstufen, mittels RT-PCR die Anzahl der Survivin-Kopien gemessen (Abbildung 15 und 16). Somit konnten Crossing points (CP) entsprechende Kopienzahlen zugeordnet werden. In den folgenden RT-PCR Untersuchungen der Proben wurde als interner Standard eine Probe mit bekannter Kopienzahl mitgeführt. Nun konnte mit Hilfe dieses Standards in jeder zu untersuchenden Probe die Anzahl der Survivin-Kopien errechnet werden. Die gleiche Methode wurde für das zweite Zielgen

Caspase-3 angewendet. In einem letzten Schritt wurden die Werte für Survivin in Bezug auf die Werte für das Referenzgen PBGD normalisiert (Näheres siehe 3.3.2). So konnten für Survivin Werte für die relative Genexpression (RGE) angegeben werden. Exemplarisch ist das Ergebnis eines LightCycler Laufes für Survivin (Abbildung 17) und PBGD (Abbildung 18) dargestellt.



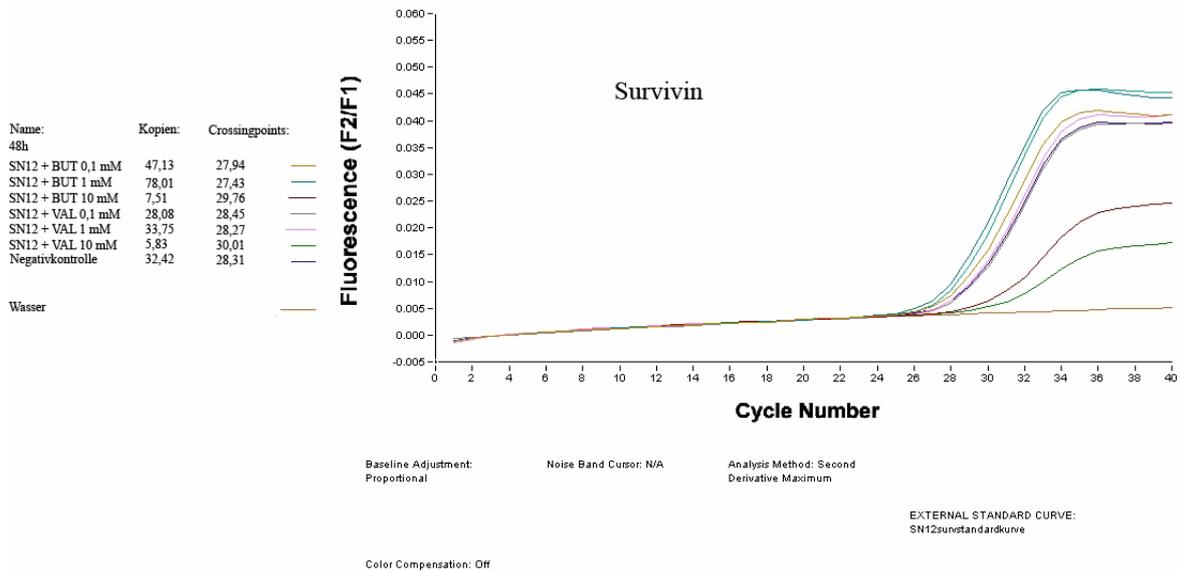
**Abbildung 15.** Beispielhaft wird hier die Erstellung der Survivin Standardkurve für die unbehandelte Zelllinie SN12 dargestellt. Die Crossing points und Kopienzahl von vier Proben mit bekannter RNA-Konzentration, die um eine Zehnerpotenz verdünnt wurde, wurden in einem LightCycler Lauf bestimmt. Eine Probe mit Wasser wurde mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination mit fremd-RNA zwischen den Proben nachzuweisen.

File: C:\LightCycler3\Users\mussler\Data\Kurve.ABT Program: Amplification Run By: mussler  
 Run Date: Aug 15, 2003 16:39 Print Date: June 23, 2005

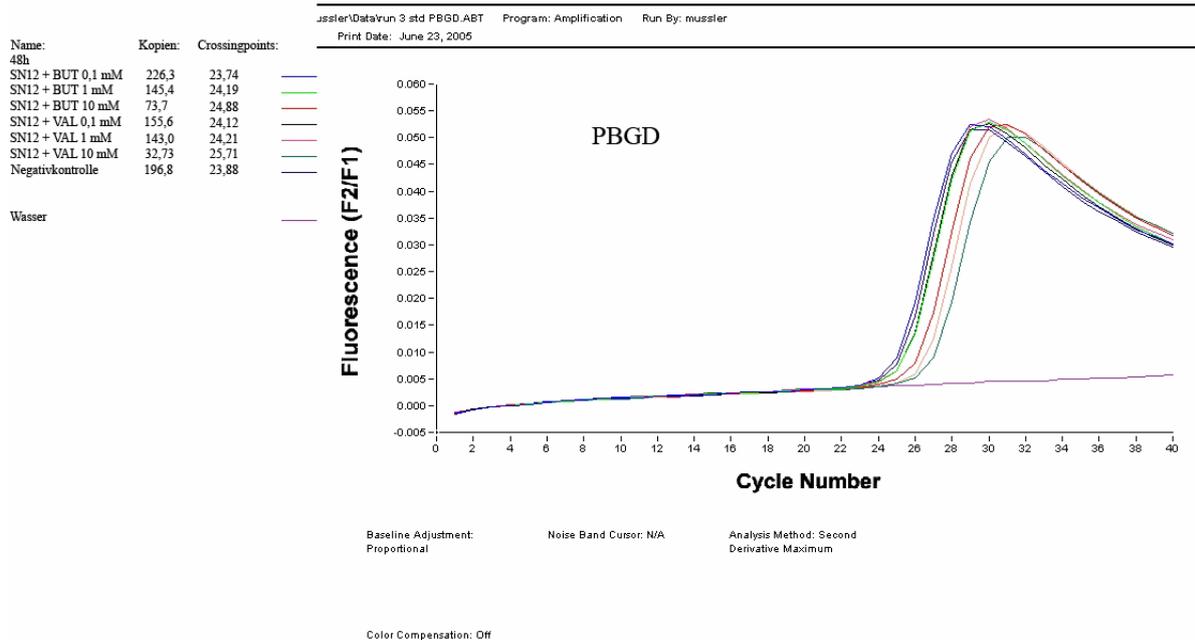


**Abbildung 16.** Anhand der Crossing points erstellte die LightCycler Software eine Standardkurve. Mit Hilfe eines internen Standards, dessen Survivinkopienzahl bekannt war, konnte nun für jede gemessene Probe die Kopienzahl des Survivin-Gens bestimmt werden.

File: C:\LightCycler3\Users\mussler\Data\run 3 std surv.ABT Program: Amplification Run By: mussler  
 Run Date: Aug 22, 2003 15:56 Print Date: June 23, 2005



**Abbildung 17.** Dargestellt ist ein typischer LightCycler Lauf der Zelllinie SN12. Hier wurden die Crossing points der einzelnen Proben für das Survivin-Gen unter Butyrat und Valproat Behandlung (0,1mM, 1mM, 10mM) nach 48h bestimmt. Eine Probe mit Wasser wurde mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination mit fremd-RNA zwischen den Proben nachzuweisen. Anschließend errechnete die LightCycler Software anhand der Survivin Standardkurve und eines internen Standards die Kopienzahl des Survivin-Gens.



**Abbildung 18.** Dargestellt ist ein typischer LightCycler Lauf der Zelllinie SN12. Hier wurden die Crossing points der einzelnen Proben für das PBGD-Gen unter Butyrat und Valproat Behandlung (0,1mM, 1mM, 10mM) nach 48h bestimmt. Eine Probe mit Wasser wurde mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination mit fremd-RNA zwischen den Proben nachzuweisen. Anschließend errechnete die LightCycler Software anhand der PBGD Standardkurve und eines internen Standards die Kopienzahl des PBGD-Gens.

Das Survivin-Expressionsmuster differierte zwischen den drei unbehandelten Zelllinien sehr stark. Während die Zelllinien SN12 mit einer RGE von 194 und ACHN mit einer RGE von 284 Survivin in einer ähnlichen Größenordnung expremierten, so zeigt sich bei der A498 mit einer RGE von 156607 eine um einige Zehnerpotenzen höhere Expression. Interessanterweise war in der A498 dagegen die niedrigste Caspase-3-Genexpression nachweisbar.

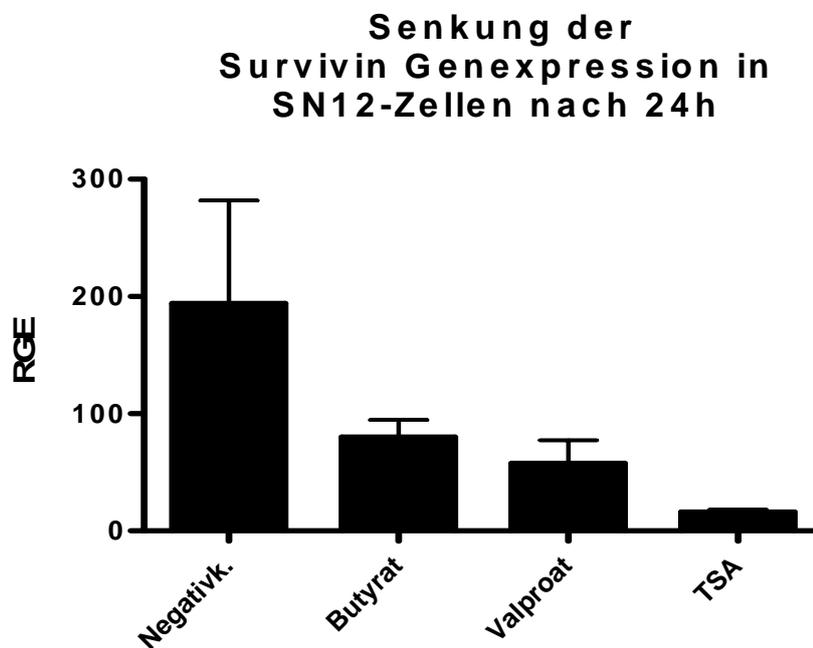
#### 4.6.2 Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in Nierenkarzinomzelllinien

In den Diagrammen werden die Mittelwerte der relativen Genexpression angegeben. Prozentangaben im Text beziehen sich auf die Survivin-Genexpression der unbehandelten Negativkontrolle. Für alle untersuchten Zelllinien konnte unter einer Behandlung mit jedem der drei HDIs eine Senkung der Survivin-Genexpression registriert werden.

#### 4.6.2.1 Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie SN12

Unter einer Butyrat Behandlung fiel die Genexpression nach 24h auf 41% des Vergleichswertes in unbehandelten Zellen. Nach 48h konnte eine Reduktion auf 65% des Vergleichswertes registriert werden. Unter Valproat wurde nach 24h eine Senkung der Genexpression auf 26% des Vergleichswertes in unbehandelten Zellen gemessen. Eine Senkung auf 8% des Vergleichswertes der Negativkontrolle zeigte sich unter TSA.

Damit war die stärkste Senkung der Genexpression nach 24h mit TSA assoziiert. Nach 48h dagegen wurde der größte Effekt unter einer Butyrat Behandlung beobachtet. Insgesamt war die Senkung bei allen drei Substanzen nach 24h stärker als nach 48h (Abbildung 19).



**Abbildung 19.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Survivin-Genexpression unter Butyrat, Valproat und TSA in der Zelllinien SN12 gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zelllinie wurden 24h und 48h mit 0,1, 1 und 10mM Butyrat, Valproat oder mit 0,1, 1 und 10 $\mu$ M TSA inkubiert. Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien (gepoolt über die drei verwendeten Konzentrationen) nach 24h im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Survivin-Gens wurde die Kopienzahl des Survivin-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

#### 4.6.2.2 Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie A498

Bereits nach 24h lässt sich für alle HDAC-Inhibitoren eine deutliche Reduktion der Survivinexpression nachweisen. Butyrat senkte nach 24h die mRNA-Expression auf 6% des Vergleichswertes in unbehandelten Zellen. Nach 48h war sie kaum noch detektierbar.

Eine noch stärkere Senkung der Genexpression konnte Valproat erzielen. Das Medikament supprimierte die Survivin-mRNA-Expression nach 24h auf 1% des Vergleichswertes. Nach 48h war es nahezu nicht mehr messbar.

TSA senkte die Genexpression auf 1% des Vergleichswertes der unbehandelten Negativkontrolle. Einen ähnlichen Rückgang, auf 3% des Vergleichswertes, ergab die Messung nach 48h. Damit war TSA der potenteste Inhibitor nach 24h.

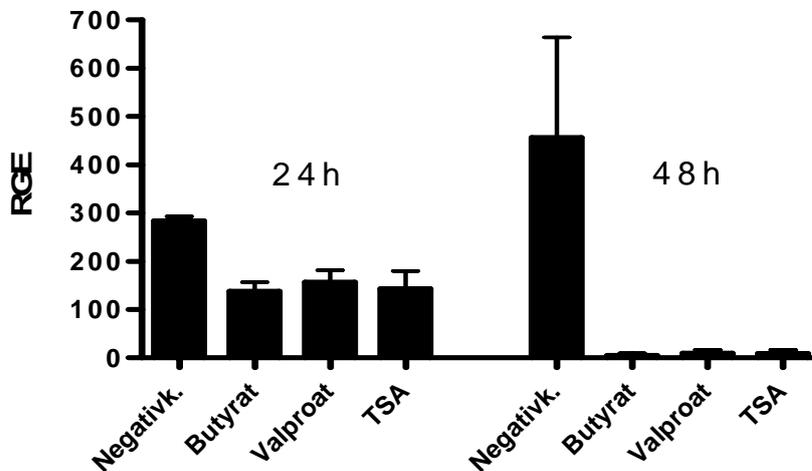
Wie bereits oben erwähnt zeichnete sich die A498 mit der höchsten nativen Survivin-Genexpression aus. Des Weiteren wurden an dieser Zelllinie die deutlichsten Effekte einer HDI Behandlung auf die Survivin-Genexpression beobachtet.

#### 4.6.2.3 Einfluss der HDIs auf Survivin-Genexpression in der Zelllinie ACHN

Die Zelllinie ACHN reagierte ebenfalls auf alle drei Substanzen mit einer Senkung der Survivin-Genexpression. Unter Butyrat wurde nach 24h eine Reduktion auf 49% des Vergleichswertes in der unbehandelten Negativkontrolle erzielt, die nach 48h deutlich übertroffen wurde, so dass eine Genexpression kaum noch zu detektieren war.

Valproat dagegen erreichte nach 24h eine Senkung der Expression auf 56% des Vergleichswertes in unbehandelten Zellen. Nach 48h konnte eine weitere Senkung der Expression auf 2% des Vergleichswertes beobachtet werden. TSA konnte eine Inhibierung von 49,6% nach 24h erzielen. Nach 48h wurde eine Senkung der Genexpression von 98,1% gemessen. Bei allen Substanzen war die Suppression nach 48h stärker ausgeprägt als nach 24h (Abbildung 20).

### Senkung der Survivin Genexpression in ACHN-Zellen nach 24h und 48h



**Abbildung 20.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Survivin-Genexpression unter Butyrat, Valproat und TSA in der Zelllinien ACHN gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zelllinie wurden 24h und 48h mit 0,1, 1 und 10mM Butyrat, Valproat oder mit 0,1, 1 und 10 $\mu$ M TSA inkubiert. Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression von mindestens zwei unabhängigen Messserien (gepoolt über die drei verwendeten Konzentrationen) nach 24 und 48h im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Survivin-Gens wurde die Kopienzahl des Survivin-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgens PBGD normalisiert.

#### 4.6.3 Konzentrationsabhängige Einflüsse auf die Survivin-mRNA-Expression

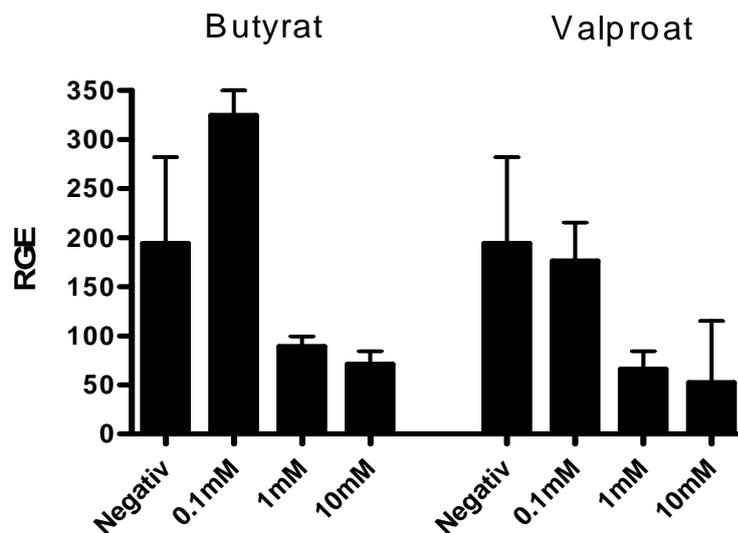
Zellen wurden wie unter 3.1. beschrieben behandelt und über den Zeitraum 24h jeweils mit Butyrat (0,1mM, 1mM, 10mM), Valproat (0,1mM, 1mM, 10mM) und TSA (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) inkubiert. Die Werte wurden mittels RT-PCR generiert. In den Diagrammen werden die Mittelwerte der relativen Genexpression angegeben. Prozentangaben im Text beziehen sich auf die Survivin-Genexpression der unbehandelten Negativkontrolle.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Hemmung der Survivin-Genexpression konzentrationsabhängig verläuft. Der Zeitpunkt 24h wurde ausgewählt, da die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ausgeprägte Effekte zu beobachten waren.

Bei allen Zelllinien lassen sich Effekte der HDIs auf die Survivin-mRNA-Expression bereits nach 24h nachweisen. Bei der Zelllinie SN12 deutet sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der Survivin-mRNA-Expression nach Behandlung mit Butyrat oder Valproat nur

bei Konzentrationen von 1mM und 10mM beziehungsweise 0,1mM und 1mM an. Für TSA zeigte sich bei dieser Zelllinie keine Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 21).

### Konzentrationsabhängige Senkung der Survivin Genexpression in SN12-Zellen nach 24h



**Abbildung 21.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde Survivin-Genexpression in der Zelllinien SN12 gemessen. Um vergleichbare Werte zu generieren, enthielt jede Probe die gleiche Menge mRNA. Die Zellen wurden mit 0,1, 1, 10mM Butyrat oder Valproat und 0,1, 1, 10 $\mu$ M TSA 24h inkubiert.

Die abgebildeten Säulen geben den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Genexpression (RGE) von mindestens zwei unabhängigen Messserien nach 24h zu den jeweiligen Konzentrationspunkten im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle wieder. Zur Ermittlung der relativen Genexpression des Survivin-Gens wurde die Kopienzahl des Survivin-Gens auf die Kopienzahl des Referenzgen PBGD normalisiert.

Für die Zelllinie A498 kann eine konzentrationsabhängige Wirkung für Butyrat und Valproat angenommen werden. Deutliche Effekte treten allerdings schon bei der geringsten angewendeten Konzentration auf. Bei Behandlung mit TSA tritt ein deutlicher Effekt erst bei einer Konzentration von 1 $\mu$ M auf und kann dann bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M nur noch geringfügig verstärkt werden.

Bei der Zelllinie ACHN tritt eine nennenswerte Senkung der Survivin-Expression erst bei mittleren und hohen Konzentrationen von Butyrat und Valproat beziehungsweise bei hohen Konzentrationen von TSA auf. Dabei erreichen Butyrat und Valproat ihren maximalen Effekt bei einer Konzentration von 1mM. Danach stellte sich für höhere Konzentrationen keine nennenswerte Zunahme der Effekte ein.

Bei Betrachtung der drei Zelllinien kann somit folgendes Fazit gezogen werden. Nur in der Zelllinie A498 kann eine konzentrationsabhängige Wirkung aller drei HDIs belegt werden. In den übrigen Zelllinien tritt die Wirkung von Butyrat und Valproat auf die Survivin-Expression ab einer Schwellenkonzentration von 1mM auf und kann durch eine Konzentrationserhöhung auf 10mM nicht wesentlich erhöht werden.

Die TSA Wirkung tritt bei der Zelllinie SN12 bereits bei einer Konzentration von 1 $\mu$ M und bei der Zelllinie ACHN erst bei höchster Konzentration (10 $\mu$ M) auf.

#### 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die HDIs Butyrat, Valproat und TSA konnte morphologisch nachgewiesen werden, dass sie in den Nierenkarzinomzelllinien SN12, A498 und ACHN Apoptose induzieren können. Auf mRNA-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 war an nativen ACHN Zellen die höchste Caspase-3-Expression beobachtet worden.

Zudem konnte Valproat in allen Zelllinien deutlich die Caspase-3-Genexpression steigern, allerdings war die Streuung der Ergebnisse bei hohen Werten recht groß, so dass diese Resultate vorsichtig zu interpretieren sind. Insgesamt ergeben sich erste Hinweise für eine Steigerung der Caspase-3-Genexpression durch Valproat.

Auch auf der Proteinebene wurde kein einheitliches Resultat erzielt, es konnte aber der Trend bestätigt werden, der sich nach Auswertung der RT-PCR Ergebnisse ergab. Auch hier konnte nur in der ACHN durch alle drei HDIs eine verstärkte Caspase-3-Expression nachgewiesen werden. Betrachtet man die übrigen Zelllinien, so zeigte sich auch hier, dass nur für Valproat konstante Ergebnisse zu verzeichnen waren. Dagegen bewirkten Butyrat und TSA regelmäßig keine Steigerung der Caspase-Expression.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die die drei Apoptose-Nachweisverfahren geliefert haben, waren die Resultate für die Genexpression des Apoptoseinhibitors Survivin einheitlich.

Die Expression des Survivin war in allen drei Zelllinien, die mit HDIs inkubiert wurden, erniedrigt. Besonders starke Effekte waren in der Survivin hochexpresmierenden Zelllinie A498 zu beobachten. Dabei war die stärkste Senkung der Survivin-Genexpression mit TSA assoziiert. Geringste Konzentrationen (0,1 $\mu$ M) reichten aus, um einen Effekt zu verzeichnen, während bei Butyrat und Valproat maximale Effekte ab Konzentrationen von 1mM auftraten.

Abschließend sind die gesamten Ergebnisse in einer Synopsis zusammengestellt (Tabelle 4).

	<b>Survivin – mRNA-Level</b>	<b>Caspase-3- mRNA-Level</b>	<b>Caspase-3- Protein-Level</b>	<b>Acridinorange/ Ethidiumbromid-Assay</b>
<b>24h SN12</b>				
Butyrat	↓↓ (-)	-	↑↑↑	++ (+++)
Valproat	↓↓ (-)	↑↑ (+/-)	↑↑↑	+++
TSA	↓↓↓ (-)	+/-	-	++
<b>24h A498</b>				
Butyrat	↓↓	- (↑↑)	-	++ (+++)
Valproat	↓↓↓	+/-	+/-	++ (+++)
TSA	↓↓↓	↓	-	+ (+++)
<b>24h ACHN</b>				
Butyrat	↓ (↓↓↓)	↑	↑↑↑ (↑)	++ (+++)
Valproat	↓ (↓↓↓)	↑ (↑↑↑)	↑↑	++
TSA	↓ (↓↓↓)	↑ (-)	↑ (↑↑↑)	++ (+++)

**Tabelle 4.** ↑: Stimulation, ↓: Inhibierung, -: kein Effekt, +/-: kein eindeutiges Ergebnis  
 Apoptose-Score des Acridinorange/Ethidiumbromid-Assay:  
 +: schwache apoptotische Aktivität  
 ++: mittlere apoptotische Aktivität  
 +++: starke apoptotische Aktivität

Die Synopse zeigt die Ergebnisse der drei Apoptose-Nachweisverfahren und die Ergebnisse für Survivin im Zusammenhang.

In Klammern werden Ergebnisse zum Zeitpunkt 48h angegeben, wenn sie sich von den Ergebnissen nach 24h unterscheiden.