

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellulären Mechanismen des programmierten Zelltodes, die durch den Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A ausgelöst werden, im Speziellen die Rolle des Tumorsuppressors ING1, in der Glioblastomzelllinie LN229 und damit die Auswirkungen der verminderten Expression von ING1 in malignen Gliomen [3] auf die Sensibilität gegenüber experimentellen Behandlungsstrategien wie der Hemmung von Histondeacetylase untersucht. Hierbei handelt es sich um die ersten Daten, die die Wirkung von TSA in LN229-Zellen analysieren und beschreiben.

5.1 Die Methoden

5.1.1 Zellkultur

Bei der Zellkultur werden Zellen außerhalb eines Organismus am Leben gehalten, um so zelluläre Prozesse besser untersuchen zu können. Die Zellkultur wurde als Testsystem zur Untersuchung der Toxizität von TSA auf die Zellen und seine Wirkung auf die Signaltransduktion genutzt. Adhärenz wachsende Zellen zur Toxizitätsprüfung zu verwenden ist eine gängige Methode, da solche Zellkulturen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden können. Bei der Quantifizierung der Zellschäden sollten allerdings Resistenzbildung und Reparaturmechanismen nicht außer Acht gelassen werden. Die Zellen wurden zu Proteinlysaten verarbeitet bevor eine 100 %ige Konfluenz erreicht war, da auch durch die Kontaktinhibition der programmierte Zelltod ausgelöst werden kann. Durch den Vergleich der gewonnenen Ergebnisse nach TSA-Behandlung mit denen unbehandelter Zellen, konnten die oben genannten Effekte von der eigentlichen TSA-Wirkung abgegrenzt werden. Auch das eingesetzte Lösungsmittel, welches oft für den Gebrauch der hydrophoben Substanzen unerlässlich ist - im vorliegenden Fall Ethanol - muss bei der Quantifizierung der Toxizität bedacht werden. Da allerdings keine Proteinlysate von LN229-Zellen untersucht wurden, die ausschließlich mit Ethanol behandelt wurden, ist letztlich die Wirkung von TSA von einem potentiellen Ethanol-Effekt nicht abzugrenzen.

5.1.2 Western Blot und CAB-Antikörper

Bei der Western Blot Methode handelt es sich um eine weit verbreitete immunologische Technik zum Nachweis von Proteinen. Sie eignet sich gut zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung spezifischer Proteine in einem Zelllysate. Der Nachweis der verschiedenen ING1-

Isoformen mittels der CAb-Ak erfolgte mit unterschiedlicher Intensität. Die Isoform p33^{ING1b} konnten, verglichen mit p47^{ING1a}, im Western Blot als stärkere Bande detektiert werden. Das liegt an der bereits bekannten geringeren Expression von p47^{ING1a} sowohl in LN229-Zellen, als auch in anderen Zelltypen [5, Korrespondenz mit Prof. Riabowol, Department of Biochemistry and Molecular Biology and Oncology, Southern Alberta Cancer Research Centre, University of Calgary].

5.1.3 Erhöhung der ING1-Expression in LN229-Zellen durch Transfektion mit Plasmiden

Da Versuche eine Zelllinie zu entwickeln, bei der die *ING1*-Expression induzierbar ist, noch nicht erfolgreich waren, da diese Zellen den programmierten Zelltod vollziehen, stellt die ektope Überexpression der *ING1*-Isoformen mit Hilfe von Plasmiden eine Alternative dar, um den Einfluss von ING1 auf die durch TSA induzierte Apoptose zu untersuchen.

Bei der Transfektion mit Plasmiden handelt es sich typischerweise um einen relativ kleinen Prozentsatz Zellen, der letztendlich DNA aufnimmt und somit das entsprechende Protein vermehrt exprimiert. Bei der Verwendung von Lipofectamine[®] als Transfektionsreagenz handelt es sich typischerweise um ungefähr 10 % der LN229-Zellen. Mittels der Western Blot Analyse konnte zwar die eindeutige Erhöhung der jeweiligen ING1-Isoform nach der Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden nachgewiesen werden, allerdings gestattet ein Western Blot keine Aussage über die Anzahl der tatsächlich transfizierten Zellen. Er liefert lediglich Informationen über die Proteinmenge in dem Proteinlysat, welches aus einer Vielzahl von Zellen entsteht. Bei der Durchflusszytometrischen Messung der apoptotischen Zellen wäre allerdings die Transfektion jeder einzelnen Zelle die Voraussetzung für ein aussagekräftiges Ergebnis. Eine Möglichkeit der Bestätigung einer solchen Voraussetzung stellt beispielsweise die Bestimmung der Transfektionseffizienz, mittels indirekter Immunfluoreszenz dar.

5.1.4 Reduktion der ING1-Expression in LN229-Zellen mittels siRNA

Trotz stabiler Transfektion der LN229-Zellen mit der entsprechenden siRNA für das konservierte Exon 2 (siehe Abb. 1.1) konnten nach mehreren Passagierungen der Zellen regelmäßig wieder die ursprünglichen ING1-Proteinspiegel in der Western Blot Analyse beobachtet werden. Die nicht transfizierten Zellen scheinen trotz des Selektionsreagenz Puromycin nach gewisser Zeit wieder zu proliferieren und die LN229-Zellen mit verminderter ING1-Expression zu verdrängen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Repression der ING1-Expression zwar abnimmt, die Resistenz gegenüber Puromycin, welche die

transfizierten Zellen besitzen, jedoch weiter besteht. Um die verminderte Expression von ING1 dennoch zu gewährleisten, wurden für die Versuche nur sehr frühe Zellpassagen verwendet und vor jedem Versuch die verminderte Expression anhand eines Western Blots kontrolliert.

5.1.5 HDAC-„Assay“

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von TSA wurde zusätzlich zu der Analyse der Histonacetylierung mittels Western Blot einen Enzymassay durchgeführt, der die HDAC-Aktivität direkt misst. Da die Histonacetylierung keinen direkten Effekt eines Histondeacetylaseinhibitors darstellt, sondern nur sekundär über die verminderte Deacetylierung oder relativ vermehrte HAT-Aktivität zustande kommt, stellt der HDAC-„Assay“ als Methode der direkten Erfassung der HDAC-Aktivität und somit der Wirkung von TSA eine zusätzliche Untersuchung zur Bestätigung der im Western Blot gewonnenen Ergebnisse dar. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde der HDAC-„Assay“ erfolgreich im Labor der Neuropathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, etabliert.

5.1.6 Durchflusszytometrie und die LC₅₀ von TSA

Die Messung des Anteils der Zellen, die sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befanden, ergab bei sechs unabhängigen Zellproben aus nicht transfizierten LN229-Zellen abweichende Ergebnisse. Allein die Apoptoserate der nicht mit TSA behandelten Zellen schwankte zwischen 3 % und 18 %. Bei den initialen Konzentrations-Zeit-Versuchen zur Bestimmung der LC₅₀ von TSA in LN229-Zellen konnte man bei einer Behandlungsdauer von acht Stunden und einer Konzentration von 0,5 µM TSA einen Anteil von apoptotischen Zellen von 68 % messen (siehe Abb. 4.4 und 4.5). In den folgenden Versuchen schwankte dieser Anteil bei gleicher Konzentration und Behandlungsdauer zwischen 29 % und 87%. Allerdings gab es keine Schwankungen innerhalb eines Versuchsansatzes, so dass die Apoptoserate innerhalb eines Ansatzes bei allen Proben tendenziell eher hoch beziehungsweise niedrig war. Der direkte Vergleich von Zahlen von unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten war demnach schwer möglich, wohingegen die Tendenzen deutlich ablesbar waren. Der direkte Vergleich einzelner Proben desselben Experiments stellte kein Problem dar.

Die relativ große Schwankungsbreite spricht sowohl für die Empfindlichkeit der Methode als auch der Zellen. Die zahlreichen Arbeitsschritte zwischen der Zellernte bis hin zur Messung der Zellproben mittels der Durchflusszytometrie scheinen Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen zu nehmen. So ist es durchaus vorstellbar, dass beispielsweise die Dauer der Kryokonservierung

nach Zellernte und das Auftauen der Zellproben den Zellen in unterschiedlicher Weise Schaden zufügen und damit den programmierten Zelltod auslösen können. Durch die gleichzeitige Messung von unbehandelten und nicht transfizierten Zellen konnte eine durch diese Vorgänge entstandene hohe Apoptoserate festgestellt und von der durch TSA ausgelösten Apoptose abgegrenzt werden.

5.2 Apoptose durch TSA in LN229-Zellen

HDACi lösen in den verschiedensten Zellen *in vitro* und *in vivo* in unterschiedlichem Ausmaß Wachstumshemmung, Zelldifferenzierung und Apoptose aus [92, 130]. Interessanterweise sind normale Zellen im Vergleich zu Tumorzellen fast immer sehr viel resistenter gegenüber diesen Wirkungen von Inhibitoren der HDAC [92]. Die antiproliferative Wirkung von TSA wird mit p14^{ARF} und p16^{INK4a} in Zusammenhang gebracht [29, 96]. Der *CDKN2A* Lokus spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorsuppression und ist in ungefähr 40 % der humanen Krebsarten inaktiviert [131]. Er kodiert zwei Tumorsuppressorproteine - p14^{ARF} und p16^{INK4a}. Durch die Deletionen dieser Region in LN229-Zellen [114] hätte es möglich sein können, dass TSA in LN229-Zellen nicht wirksam ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass dies jedoch nicht der Fall ist. Die zum Teil beschriebene Abhängigkeit der durch ING ausgelösten Apoptose von funktionellem p53 [23, 35] und der ebenfalls teilweise beschriebenen Abhängigkeit der wachstumsinhibitorischen Wirkung von TSA von p53 [138] konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Trotz der Mutation von *TP53* in LN229-Zellen [114] war TSA in LN229-Zellen wirksam - die LN229-Zellen zeigten sich sehr sensibel für die durch TSA ausgelöste Apoptose (siehe 4.4). Das spricht für den möglichen Einsatz von TSA auch bei GBM mit den häufig vorkommenden Veränderungen der oben genannten Tumorsuppressoren.

5.2.1 Apoptose durch TSA bei verminderten oder erhöhten ING1-Proteinspiegeln

Da eines der Ziele dieser Promotionsarbeit das bessere Verständnis der Rolle des Tumorsuppressorproteins ING1 in der durch TSA ausgelösten Apoptose war, wurden die Proteinspiegel von ING1 durch Transfektion verändert und die Effekte von TSA auf die transfizierten Zellen erneut analysiert.

Bei der Verminderung von ING1 durch die stabile Transfektion mit si*ING1* kam es zu einer Abnahme der durch TSA ausgelösten Apoptose in LN229-Zellen - die Zellen mit verminderter ING1-Expression zeigten sich gegenüber dem programmierten Zelltod durch TSA resistenter.

Dieses Ergebnis passt zu der Feststellung, dass *ING1* in malignen Gliomen regelmäßig vermindert ist und dass der Grad der Verminderung mit dem Malignitätsgrad des jeweiligen Glioms korreliert [3], wenn man bedenkt, dass maligne Tumoren sehr häufig Mechanismen entwickelt haben, mit denen sie die Signalwege der Apoptose umgehen beziehungsweise ausschalten können. Da *ING1* nach dem vorher Gesagten ein Protein dieser blockierten Signalwege in malignen Gliomen sein könnte, stellt die Erforschung von *ING1* und der Signalwege, in die *ING1* involviert ist, einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum besseren Verständnis von Resistenzentwicklungen maligner Gliome gegenüber aktuelle Therapien dar. Die Bestimmung der *ING1*-Spiegel könnte dazu beitragen die Sensibilität eines GBM auf eine TSA-Behandlung besser einschätzen zu können.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass der Prozentsatz von Zellen, die den programmierten Zelltod vollziehen, durch die Transfektion mit $p33^{ING1b}$ beziehungsweise $p47^{ING1a}$ nicht gesteigert werden konnte. Diese ausbleibende Steigerung der Apoptoserate bei Überexpression von $p47^{ING1a}$ beziehungsweise $p33^{ING1b}$ nach TSA-Behandlung könnte durchaus an der in 5.1.3 beschriebenen geringen Zahl der Zellen, die tatsächlich transfiziert waren, liegen. Ein weiterer Punkt, der diese Theorie stützt, ist die ohnehin sehr hohe Apoptoserate als Antwort auf die TSA-Behandlung. Bei einem Anteil von bis zu 80 % apoptotischen Zellen ist es gut vorstellbar, dass eine weitere Erhöhung der in der subG1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen nur schwer, also bei entsprechend hoher Transfektionseffizienz, zu erreichen ist. In jedem Fall sollte in zukünftigen Versuchen die Transfektionseffizienz mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft werden. So könnte beispielsweise die erfolgreiche Transfektion jeder einzelnen Zelle durch ein mit dem grün fluoreszierenden Protein („green fluorescence protein“ = GFP) markierten Plasmid identifiziert werden.

Anders sieht es bei der Transfektion der LN229-Zellen mit siRNA aus. Hier wurde durch die klonale Selektion eine einheitlich verminderte Expression von *ING1* in allen Zellen erreicht. Durch den Zusatz des Selektionsreagenz Puromycin konnten nur die transfizierten Zellen überleben, da diese nach Transfektion zusätzlich ein Resistenzgen gegen Puromycin enthielten. Bei der stabilen Transfektion spiegelt der Western Blot die erfolgreiche Transfektion gut wider.

5.2.2 Welche Signalwege spielen bei der durch TSA vermittelten Apoptose in LN229-Zellen eine Rolle?

Am Anfang des extrinsischen Apoptoseweges steht FADD, welches durch die Todesrezeptoren aktiviert wird und über die Aktivierung der Caspase 8 die Caspase-Kaskade auslöst. Am Ende

des intrinsischen und des extrinsischen Apoptoseweges stehen die Effektorcaspasen, von denen die Proteinspiegel der Caspase 3 genauer betrachtet wurden (siehe Abb. 5.1).

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus der verminderten Apoptoserate bei verminderter ING1-Expression besser verstehen zu können, erfolgte als nächstes die genauere Betrachtung der Apoptosewege, die in Zusammenhang mit GBM beschrieben sind und die durch TSA induziert werden könnten. Zu diesen gehört beispielsweise die Aktivierung von Caspase 3 [103].

Die p53 unabhängige [24] Induktion der Apoptose durch ING1 und auch die p53 abhängigen Formen [23, 35] wurden in Melanomzellen kürzlich mit Fas/Caspase 8 abhängigen durch ING3 gesteuerte Signalwegen in Verbindung gebracht [34]. Es konnte gezeigt werden, dass ING3 die durch UV-Strahlen ausgelöste Apoptose über die Veränderung der Fas-Expression steuert, die zur Aktivierung der Caspase 8 und über den „BH3 interacting domain death agonist“ (Bid) zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führt (siehe Abb. 5.1). Ein anderer Zusammenhang, der kürzlich beschrieben wurde, besteht vielleicht zwischen der durch ING ausgelösten Apoptose und dem TNF α -NF κ B-Caspase-8-Signalweg. ING1 induzierte die Expression von HSP70, ein durch Stress aktivierbares Hitzeschockprotein, welches in humanen Fibroblasten vorkommt. HSP70 wiederum scheint den NF κ B-Signalweg, der das Überleben einer Zelle unterstützt, zu hemmen und so den programmierten Zelltod über TNF- α auszulösen [39] (siehe Abb. 5.1). Diese zwei Beispiele machen deutlich, dass die ING-Proteine an mehreren Stellen der Signalwege des programmierten Zelltodes regulierend wirken und dass die Untersuchung weiterer Angriffspunkte von ING1 zum besseren Verständnis der die Apoptose auslösenden Faktoren und somit zur Entwicklung neuerer Behandlungsstrategien von GBM beiträgt.

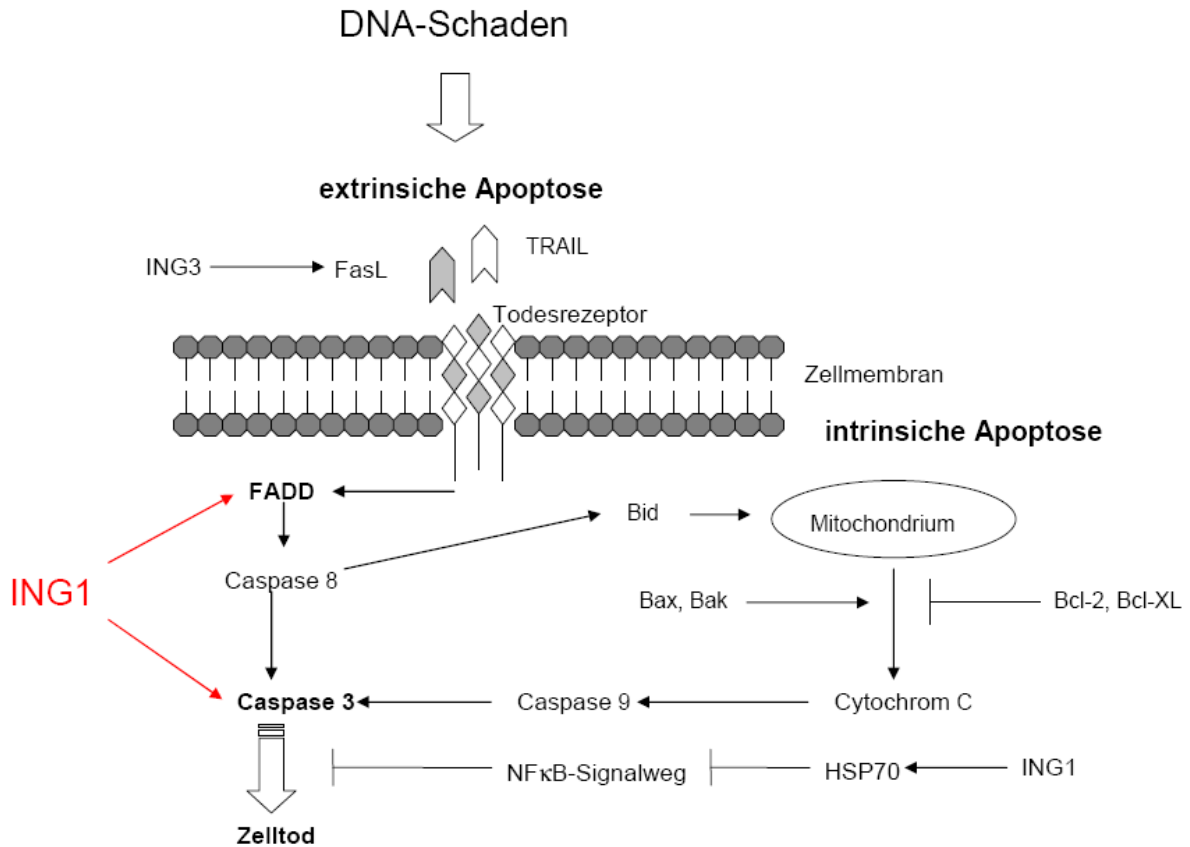


Abb. 5.1 Dargestellt sind die im Text beschriebenen, bereits bekannten Angriffspunkte von ING im intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg. Rot gekennzeichnet sind die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalwege des programmierten Zelltodes, in die ING1 involviert ist. —| = Hemmung, —> = Aktivierung

Bei der Western Blot Analyse von Caspase 3 in LN229-Zellen mit verminderter ING1-Expression zeigte sich, dass ING1 die Proteinspiegel der Caspase 3 verändert. Die Verminderung von ING1 führte zu verminderter Expression der Procaspase 3 und der Effektorcaspase 3 (siehe 4.12). Im Umkehrschluss könnte ING1 demnach für die Aktivierung der Effektorcaspasen mitverantwortlich sein. Da die Caspase 3 als Effektor am Ende der Apoptosekaskade steht, wurden zusätzlich die Proteinspiegel eines weiter am Anfang stehenden, die Caspase-Kaskade regulierenden Proteins untersucht: auch FADD wurde bei reduzierter ING1-Expression vermindert exprimiert (siehe 4.12). Die verminderten Proteinspiegel von FADD und Procaspase 3 beziehungsweise aktivierter Caspase 3 waren sowohl ohne TSA-, als auch mit TSA-Behandlung zu beobachten. Gleichzeitig konnte bei verminderter ING1-Expression eine verminderte Apoptoserate beobachtet werden (siehe 4.11). Wenn man diese beiden Ergebnisse zusammen nimmt, könnte ING1 die Apoptose über FADD, die dadurch ausgelöste Aktivierung der Caspase 8 und entweder direkte Aktivierung der Effektorcaspasen

(unter anderem Caspase 3) oder über Bid und den intrinsischen Apoptoseweg auslösen (siehe Abb. 5.1).

Während die Reduktion der proapoptotischen Faktoren FADD und Caspase 3 bei der Verminderung von ING1 eindeutig ist, beobachtete man bei der Transfektion der LN229-Zellen mit den pCI Vektoren *ING1a* beziehungsweise *ING1b* keine wesentlichen Veränderungen der Proteinspiegel der aktivierten Caspase 3. Lediglich eine Tendenz zur Erhöhung der aktivierten Caspase 3 nach TSA-Behandlung war festzustellen. Diese Beobachtung bestätigt, dass TSA Apoptose induziert und dass diese über die Induktion der Caspase-Kaskade stattfindet. Noch ist es auf Grund des in 5.4 besprochenen unterschiedlichen und geringen Prozentsatzes an transfizierten Zellen nicht möglich die Frage nach der Zusammenarbeit von TSA und den ING1-Proteinen in Bezug auf die Apoptoseinduktion oder die Regulierung der FADD- oder Caspase 3-Spiegel zu beantworten. In Zukunft sollte auch hier die indirekte Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Transfektionseffizienz vor der Beurteilung der Proteinspiegel von FADD und der Caspase 3 in mit ING1 transfizierten Zellen Abhilfe schaffen.

5.2.3 Die mögliche Rolle von ING1 bei der durch TSA ausgelösten Apoptose

Histondeacetylaseinhibitoren wie TSA konnten in malignen menschlichen Tumorzellen die Expression des Todesrezeptors 5/TRAIL-R2 erhöhen [110]. TRAIL, welcher selektiv in Krebszellen die Apoptose auslösen kann, ist Ligand dieses Rezeptors [110]. Die kombinierte Behandlung von Zellen mit TSA und TRAIL führte zur Aktivierung von Bid, der Caspase-Kaskade und zur vermehrten Apoptose [112]. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die apoptotische Wirkung der durch TSA induzierten Histonacetylierung abhängig von ING1 oder zumindest beeinflussbar durch ING1 ist. So könnte beispielsweise die Beeinflussung der ING1-Proteinspiegel und die gleichzeitige Behandlung mit TSA - ähnlich wie die Kombination TRAIL und TSA - die Apoptoserate in malignen Gliomen verändern.

Die Behandlung von nicht transfizierten LN229-Zellen mit 0,5 μ M TSA über acht Stunden bewirkte die Induktion der Apoptose und die Acetylierung der Histone H3 und H4. Bei einer Verminderung von ING1 kam es zu einer verminderten Apoptoserate nach TSA-Behandlung. Bei ektopter Überexpression der ING1-Isoformen p33^{ING1b} und p47^{ING1a} kam es, verglichen mit der Leervektorkontrolle, isoformunabhängig zu einer stärkeren Acetylierung der Histone H3 und H4. Diese Ergebnisse sprechen für die Abhängigkeit oder Beeinflussbarkeit der apoptotischen Effekte der durch TSA ausgelösten Acetylierung der Histone durch ING1. Doch wie nimmt ING1 Einfluss auf die Histonacetylierung und damit auf die Apoptose? Die Wechselwirkung der

einzelnen ING1-Isoformen mit HAT- und/oder HDAC-Komplexen ist bekannt und vielfach untersucht [20-22]. Auch hier könnte die Zusammenarbeit von ING1 mit HAT-Komplexen die Antwort liefern. Vielleicht führt eine spezifische Wechselwirkung zwischen der „plant homeodomain“ von ING1 und den Histonen H3 [17, 29, 32] oder H4 [21] die HAT-Komplexe zu den entsprechenden Histonen und damit zu einer Veränderung des Acetylierungsgrades und folglich der Transkription bestimmter Faktoren wie FADD, die bei den Signalwegen der Apoptose eine Rolle spielen (siehe Abb. 5.2). So konnte beispielsweise kürzlich gezeigt werden, dass Yng1 (ING1 Korrelat in Hefen) mit dem aminoterminalen Ende von H3 interagiert, und dass diese Wechselwirkung durch die direkte Bindung der PHD Region von Yng1 an methyliertes Lysin 4 des Histons H3 (H3K4) stattfindet [31]. In weiteren Studien wurde eine Verbindung von ING2 mit H3K4 über die PHD Region nachgewiesen [16, 17].

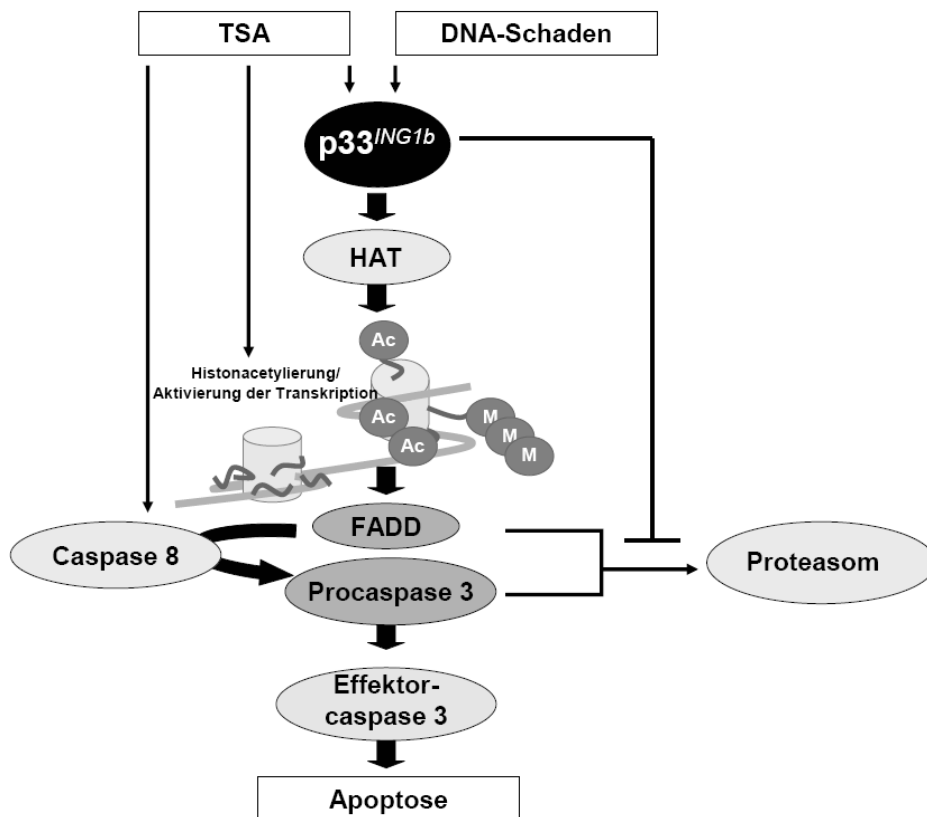


Abb. 5.2 Mögliche Rolle von ING1 in dem FADD/Caspase-3-Signalweg der Apoptose. Die Schädigung der DNA oder andere onkogene Signale führen zur Induktion von ING1b, wodurch die Spiegel der entsprechenden Proteinisoform p33^{ING1b} erhöht werden, die mit HAT-Komplexen interagiert. Diese Wechselwirkung verändert die Chromatinstruktur [17, 21, 30, 31] und fördert anschließend die Histonacetylierung und die Aktivierung der Transkription. Die PHD von p33^{ING1b} bindet möglicherweise sogar methylierte Kernhistone wie es bei ING2 der Fall ist. Durch diese epigenetischen Prozesse wird die Expression von später im Signalweg vorkommenden

Genen/Proteinen verändert. $p33^{ING1b}$ induziert vielleicht wie ING3 [34] auch die Apoptose über den Fas/Caspase-8-Signalweg. $p33^{ING1b}$ begünstigt die Apoptose über die Stabilisierung von FADD und Procaspase 3 möglicherweise über die Hemmung der Proteasomaktivität. TSA reguliert die ING1b-Expression, und die proapoptotischen Mechanismen von TSA wirken mit ING1 synergistisch auf die Induktion der Apoptose. $\text{---}\perp$ = Hemmung, $\text{---}\rightarrow$ = Aktivierung

5.3 Die Wirkung von TSA auf die Expression der ING1-Isoformen

TSA hemmt oder aktiviert möglicherweise die *ING1*-Promotoren und bestimmt so vielleicht das entsprechende Verhältnis der unterschiedlichen *ING1*-Isoformen zueinander. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression von $p33^{ING1b}$ durch TSA möglicherweise stabilisiert oder die Translationsrate gesteigert wird (siehe 4.7). TSA scheint die Isoformen von ING1 auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen. Möglicherweise geschieht dies über einen isoformspezifischen $p33^{ING1b}$ -Promoter wie es auch für den $p14^{ARF}$ -Promoter berichtet wurde [131] oder über die Stabilisierung von $p33^{ING1b}$ durch die Regulierung der Proteasomaktivität. Von ähnlichen Beobachtungen bezüglich eines differenzierten Einflusses von TSA auf unterschiedliche Isoformen von Tumorsuppressoren wurde kürzlich auch für die $p16^{INK4}/p14^{ARF}$ -Proteinfamilie berichtet [131], deren veränderte Expression und/oder Funktion in GBM häufig festzustellen ist [113].

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die unterschiedliche Assoziation der ING1-Isoformen mit HAT- beziehungsweise HDAC-Komplexen zu berücksichtigen. $p47^{ING1a}$ wird mit HDAC-, $p33^{ING1b}$ sowohl mit HAT- als auch mit HDAC-Aktivität assoziiert [21]. Die Mikroinjektion von $p33^{ING1b}$, jedoch nicht von $p47^{ING1a}$, führte in menschlichen Fibroblasten zur Hyperacetylierung der Histone H3 und H4. Auch hier liegen demnach unterschiedliche Funktionen der ING1-Spleißvarianten vor. Die beiden Isoformen werden daher mit gegensätzlichen Effekten auf das „Chromatin-Remodelling“ in Verbindung gebracht. $p33^{ING1b}$ scheint einen positiven Effekt auf die Transkription zu haben, wohingegen $p47^{ING1a}$ diese eher supprimiert, so dass letztendlich Gene/Proteine des Apoptose-Signalweges durch die verschiedenen ING1-Isoformen unterschiedlich beeinflusst werden und somit unterschiedliche Auswirkungen auf die Apoptose haben (siehe Abb. 5.2).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten isoformspezifischen Veränderungen der ING1-Proteinspiegel durch TSA lassen unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten offen. Sie könnten einerseits bedeuten, dass TSA die Transkription von ING1 beeinflusst, so wie es auch den

p14^{ARF}-Promoter beeinflusst [131]. Durch spezifische Veränderungen des Acetylierungsgrades der Kernhistone durch TSA könnte es zur vermehrten Transkription von p33^{ING1b} kommen.

Das alternative Spleißen stellt einen Vorgang dar, bei dem aus einer DNA-Sequenz unterschiedliche mRNA-Moleküle und durch deren Translation unterschiedliche Polypeptide entstehen können. Da auch die verschiedenen *ING1*-Isoformen auf diese Weise gebildet werden, besteht andererseits die Möglichkeit, dass TSA das alternative Spleißen von *ING1* reguliert und zu Gunsten der p33^{ING1b}-Expression verändert.

Auch die für TSA bereits beschriebene Beeinflussung der Proteasomaktivität stellt eine mögliche Ursache dar. Durch TSA konnte beispielsweise die zelluläre Proteasomaktivität in einer Kolonkarzinom-Zelllinie reduziert und dadurch die NFκB-Aktivität beeinflusst werden [132]. Auf ähnliche Weise könnte die Beeinflussung, beispielsweise die Hemmung, der zellulären Proteasomaktivität durch die TSA-Behandlung über den verminderten Abbau zu einer Erhöhung von p33^{ING1b} führen.

5.3.1 TSA-Wirkung bei Überexpression der *ING1*-Isoformen

Im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen beobachtete man bei vermehrter Expression von p33^{ING1b} oder p47^{ING1a} nach der Behandlung mit TSA eine Erhöhung oder zumindest die Stabilisierung aller *ING*-Isoformen. Dieser Effekt kommt möglicherweise durch die Aktivierung der transfizierten Plasmide durch TSA zustande. Sie wurde schon bei verschiedenen anderen Zelltypen einschließlich malignen Gliomzellen und auch bei anderen Histondeacetylaseinhibitoren wie beispielsweise Hydroxyurea beschrieben [133-137]. Diese Aktivierung könnte durch Veränderung der Chromatinstruktur durch die durch TSA vermittelte Histonacetylierung entstehen. Die betroffenen Chromatinstrukturen könnten zum einen die *ING1*-Isoformen selbst kodieren, zum anderen Transkriptionsfaktoren für den *ING1*-Promoter, und durch ihre Veränderung zur Aktivierung dieser Faktoren führen. Auch die Acetylierung der Transkriptionsfaktoren selbst und folglich die Aktivierung kommt in Frage. Ein direkter Effekt von TSA auf die *ING1*-Proteinexpression beispielsweise über die Verminderung der Proteasomaktivität durch TSA und damit Stabilisierung der *ING1*-Proteine scheint in diesem Fall eher nicht vorzuliegen.

5.4 Schlussfolgerung und Aussicht

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass der Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A in der Glioblastomzelllinie LN229 Apoptose auslösen kann und dass *ING1*, FADD und Caspase 3 in

diesen Apoptoseweg involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass TSA die Expression der Hauptisoformen von *ING1* p33^{ING1b} und p47^{ING1a} unterschiedlich beeinflusst. Die vorliegenden Daten zeigen weiter, dass *ING1* in LN229-Zellen mit ektopter Überexpression von *ING1* stabilisiert wird. Die ektope Überexpression der *ING1*-Isoformen p33^{ING1b} und p47^{ING1a} hatte keinen Effekt auf die durch TSA ausgelöste Apoptose. Die mit Hilfe von siRNA erreichte verminderte Expression von *ING1* führte zu einer Verminderung der Apoptoserate nach TSA-Behandlung in malignen Glioblastomzellen. Die genauere Betrachtung der apoptotischen Signalwege erbrachte, dass die Verminderung von *ING1* sowohl die Proteinspiegel der Caspase 3 als auch von FADD vermindert.

Die initial aufgestellte Hypothese konnte demnach bestätigt werden: Die Expression von *ING1* in Glioblastomzellen beeinflusst die von TSA abhängige Apoptose und wird durch TSA isoformspezifisch moduliert.

Unsere Daten lassen jedoch auch Fragen offen. Warum konnte die Transfektion der LN229-Zellen mit den pCI Vektoren *ING1a* und *ING1b* verglichen mit nicht transfizierten Zellen die Apoptoserate nach der Behandlung mit TSA nicht signifikant steigern? Diese Frage ist besonders interessant, wenn man berücksichtigt, dass TSA die Proteinspiegel von *ING1* sowohl in den nicht transfizierten als auch in den transfizierten Zellen anhebt und die Apoptose auslöst. Die Annahme, dass die erhöhte Expression von p33^{ING1b} durch TSA die Apoptose in Gang setzt, konnte in der vorliegenden Arbeit daher nicht bestätigt werden. Allerdings konnte durch Verminderung von *ING1* - eine Situation, wie man sie in malignen Gliomen vorfindet [3] - die Apoptoserate gesenkt werden.

Wie genau der Tumorsuppressor *ING1* die Proteinspiegel von FADD beziehungsweise Caspase 3 verändert, ist eine weitere Frage, die einer Klärung bedarf. Eine Möglichkeit wäre eine veränderte Expression durch eine veränderte Chromatinstruktur, die durch Wechselwirkungen zwischen *ING* und Histonen zustande kommen könnte (siehe Abb. 5.2). Allerdings könnte es sich auch um einen von diesem kürzlich entdeckten über PHD vermittelten Mechanismus unabhängigen Vorgang handeln [39].

Es ist bekannt, dass maligne Gliomzellen genetische Instabilität aufweisen. Regelmäßig sind in diesen Tumorzellen Apoptosewege oder wachstumshemmende Wege blockiert. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und den vorliegenden Daten könnte *ING1* prognostische Relevanz bei der Vorhersage der Sensitivität von GBM auf eine TSA-Behandlung haben und somit für eine gezielte Therapie genutzt werden. Die effiziente Transfektion von LN229-Zellen mit den einzelnen *ING1*-Isoformen und die Überprüfung der Effizienz durch die

Immunfluoreszenz könnte in zukünftigen Versuchen eine erhöhte Apoptoserate nach der Behandlung mit TSA ergeben. Der Zusammenhang zwischen ING1, HDAC-Komplexen und Histonen könnte mittels Immunpräzipitation weiter erforscht werden, um den Mechanismus der durch TSA und ING1 vermittelten Apoptose besser verstehen zu können.

Auf diese Weise könnten neue und effektivere Behandlungskonzepte zur Therapie maligner Gliome entstehen, die sich die apoptotische Wirkung von TSA und die Induktion des durch TSA aktivierten Apoptoseweges und seine Proteine zunutze machen, um so die in malignen Gliomen häufig ausgeschalteten Apoptosewege zu reaktivieren, damit die Sensibilität gegenüber bestimmten Chemotherapien wieder herzustellen und folglich die Überlebenschancen für Patienten mit malignem Gliom zu verbessern.