

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Erniedrigte Expression des Tumorsuppressors "Inhibitor of Growth 1" (ING1)  
sensibilisiert Glioblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité  
- Universitätsmedizin Berlin -

von

Frank Kunitz

aus Frankfurt/Oder

Datum der Promotion: 11. Dezember 2015

ZUSAMMENFASSUNG .....	6
ABSTRACT .....	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	8
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Glioblastoma multiforme (GBM) - biologische Eigenschaften und therapeutische Herausforderungen.....</b>	<b>12</b>
1.1.1 <i>Epidemiologie und Inzidenz .....</i>	13
1.1.2 <i>Histopathologische und molekulargenetische Eigenschaften .....</i>	13
1.1.3 <i>Krankheitszeichen, Diagnosestellung und Therapieplanung.....</i>	15
1.1.4 <i>Aktuelle Therapiekonzepte und therapeutische Herausforderungen .....</i>	15
1.1.5 <i>Prognose.....</i>	17
<b>2. DER TYP II-TUMORSUPPRESSOR "INHIBITOR OF GROWTH 1" (ING1) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Funktion der <i>ING1</i>-Spleißvarianten .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Cisplatin (CDDP) als Modell zur Erzeugung von DNS-Schäden .....</b>	<b>22</b>
<b>3. ZIELSETZUNG UND HYPOTHESEN.....</b>	<b>23</b>
<b>4. EXPERIMENTELLES KONZEPT .....</b>	<b>24</b>
4.1.1 <i>Materialien, Geräte und Reagenzien .....</i>	25
4.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	25
4.1.3 <i>Geräte.....</i>	25
4.1.4 <i>Reagenzien .....</i>	27
4.1.5 <i>Puffer und Lösungen .....</i>	28
4.1.6 <i>Kits .....</i>	29
4.1.6.1 <i>Zellkultur.....</i>	29
4.1.6.2 <i>RNS-Isolierung, cDNS-Synthese, PCR und RT-PCR, Realtime-PCR.....</i>	30
4.1.6.3 <i>Proteinextraktion, Proteinmessung .....</i>	30
4.1.6.4 <i>Westernblot .....</i>	31
4.1.6.5 <i>Transformation, Bakterienzüchtung .....</i>	32
4.1.6.6 <i>Durchflusszytometrie .....</i>	33
4.1.6.7 <i>Sonstige Software.....</i>	34

<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Zellkultur .....	35
4.2.2	Zelllinie LN229.....	36
4.2.3	siRNS.....	37
4.2.4	Vincristin (VCR).....	37
4.2.5	Gammastrahlung.....	38
4.2.6	Behandlung der LN229-Zelllinie mit Cisplatin.....	38
4.2.7	Bestrahlung der LN229 Zelllinie.....	39
4.2.8	Aufbereitung der behandelten Zellkulturen.....	39
4.2.9	RNAse-freies Arbeiten und RNS-Isolierung .....	40
4.2.10	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und des Reinheitsgrades von RNS / DNS	41
4.2.11	Umwandlung der RNS in komplementäre DNS (cDNS) / Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT- PCR).....	42
<b>4.3</b>	<b>Polymerasekettenreaktion.....</b>	<b>43</b>
4.3.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR)	43
4.3.2	Primerdesign der Primer für die <i>ING1</i> -Isoformen .....	44
4.3.2.1	<b>Interne Expressionskontrollen .....</b>	<b>46</b>
4.3.3	Realtime-PCR am LightCycler.....	47
4.3.3.1	<b>Fluoreszenzsonden und -Farbstoffe .....</b>	<b>49</b>
4.3.3.2	<b>Durchführung der LightCycler Real-Time-PCR .....</b>	<b>49</b>
4.3.3.3	<b>Agarosegelelektrophorese .....</b>	<b>50</b>
4.3.3.4	<b>Erstellen der Eichreihen für die Real-Time-PCR .....</b>	<b>50</b>
4.3.3.4.1	<b>Klonieren.....</b>	<b>51</b>
4.3.3.4.2	Ligation .....	52
4.3.3.4.3	Transformation .....	52
4.3.3.4.4	Anzüchten der Bakterienklone .....	52
4.3.3.4.5	Plasmidextraktion.....	53
<b>4.4</b>	<b>Proteinanalyse .....</b>	<b>54</b>
4.4.1	Proteinextraktion und -konzentrationsbestimmung .....	54
4.4.2	Bestimmung der Proteinexpression (Westernblot).....	55
4.4.3	Elektrophorese / Transfer.....	55
4.4.4	Immunochemische Detektion.....	56

<b>4.5 Zellzyklusanalyse durch die Durchflusszytometrie (engl. „Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6 Mutationsanalyse für TP53 .....</b>	<b>60</b>
4.6.1 Silberfärbung.....	62
4.6.2 Isolierung der Einzelstrang-DNS aus dem Polyacrylamidgel .....	63
4.6.3 Aufreinigung der Proben und Sequenzierung .....	63
<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Ergebnis der Mutationsanalyse .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2 Morphologische Kontrolle der Zellschädigung nach zytostatischer Behandlung ...</b>	<b>67</b>
<b>5.3 ING1 mRNA-Expressionverhalten nach DNS-Schädigung durch CDDP.....</b>	<b>68</b>
5.3.1 Unterschiedliche Expression der ING1-Isoformen nach DNS-Schädigung durch CDDP in LD50-Dosierung.....	68
5.3.2 Unterschiedliche mRNA-Expression der ING1-Spleissvarianten nach DNS-Schädigung durch unterschiedliche CDDP-Dosierungen.....	69
5.3.3 $p47^{ING1a}$ -mRNA wird nach Gamma-Bestrahlung bevorzugt induziert.....	70
<b>5.4 DNS-Schädigung durch CDDP beeinflusst die Proteinspiegel der ING1-Isoformen <math>p33^{ING1b}</math> und <math>p47^{ING1a}</math> in malignen Gliomzellen unterschiedlich .....</b>	<b>71</b>
5.4.1 Reduzierte ING1-Proteinspiegel in malignen Gliomzellen nach Transfektion mit siRNA .....	72
<b>5.5 Zellzyklus unter dem Einfluss der Zytostatika/ „ING1 knock down“ führt zu einer Beschleunigung der Apoptose der Gliomzellen in Reaktion auf CDDP-induzierte DNS-Schäden .....</b>	<b>73</b>
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1 Wertung der Methoden .....</b>	<b>77</b>
6.1.1 Die Zellkulturmethode.....	77
6.1.2 Die LN229-Zelllinie.....	77
6.1.3 Die Arbeit mit Nukleinsäuren.....	78
6.1.4 Die PCR-Techniken.....	78
6.1.5 Die Proteinanalyse-Techniken .....	80
6.1.6 Die Reduktion der ING1-Expression in LN229-Zellen mittels siRNA.....	80

<b>6.2</b>	<b>Prüfung der aufgestellten Hypothesen.....</b>	<b>80</b>
<b>6.3</b>	<b>Wissenschaftliche Diskussion der Ergebnisse und Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT .....</b>	<b>95</b>
<b>10.</b>	<b>ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>96</b>
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>97</b>
<b>12.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>101</b>
<b>13.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>103</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Die Prognose von Patienten mit hochmalignen Tumoren des zentralen Nervensystems ist trotz eines zunehmenden Verständnisses der Pathogenese der Tumorerkrankung und verbesserten diagnostischen und therapeutischen Optionen in der Behandlung weiterhin ungünstig. Potentielle Tumorsuppressorgene, wie *ING1*, wurden in den letzten Jahren näher charakterisiert und ihre Funktion in Gehirntumoren analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Chemosensitivität von Glioblastomzelllinien und der potentielle Einfluss von *ING1* als Tumorsuppressorgen in der Tumorgenese untersucht.

**Material und Methoden:** Glioblastomzellen der *LN229*-Zelllinie wurden hinsichtlich des Expressionsniveaus von *ING1* vor und nach Behandlung mit zytostatischen Substanzen und ionisierender Bestrahlung auf RNS- und Proteinniveau untersucht. Zusätzlich erfolgten durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen nach siRNS-Behandlung zur Untersuchung der Rolle von *ING1* bei der Apoptose in diesen Zellen.

**Ergebnis:** In Glioblastomzellen der *LN229* Zelllinie mit nachgewiesener Mutation des *TP53*-Gens konnte nach zytostatischer Behandlung mit Cisplatin bzw. ionisierender Bestrahlung ein Anstieg der *ING1* Expression nachgewiesen werden. Die *ING1*-Isoform *ING1a*, die eine Beteiligung an Histondeacetylaseprozessen besitzt, zeigte hierbei eine fünfzigfach stärkere Induktion als *ING1b*, welche in die Ausbildung von Histonacetylaseprozessen involviert ist. Durch siRNS-Behandlung der Zellen mit reduzierter *ING1*-Expression konnte in vitro nach zytostatischer Behandlung mit Cisplatin eine akzelerierte Zellzyklusprogression mit beschleunigtem Eintritt in die Apoptose nachgewiesen werden.

**Diskussion:** In malignen Glioblastomen ist ein reduzierter *ING1*-Expressions Spiegel mit einer erhöhten Cisplatin sensitivität assoziiert. Dies wird durch eine reduzierte HDAC-Aktivität mit gesteigerter Formation der DNS und besserer Cisplatinwirkung an der DNS verursacht. Somit kann die Bestimmung der individuellen *ING1*-Expressionsniveaus in malignen Gliomen vor geplanter Therapie mit Cisplatin und HDAC-Inhibitoren einen prädiktiven Wert besitzen.

## ABSTRACT

**Background:** The prognosis of patients with high-grade malignant tumors of the central nervous system despite increasing understanding of the pathogenesis and improved diagnostic and therapeutic options in the treatment remains unfavorable. Potential tumor suppressor genes, such as *ING1* has been characterized and analyzed in their potential function in brain tumors. In the present study, the chemosensitivity of glioblastoma cell lines and the potential influence of *ING1* in tumorigenesis has been studied as a tumor suppressor gene.

**Material and Methods:** Glioblastoma cell line *LN229* cells were examined for the expression level of *ING1* before and after exposure of the cell line to cytostatic agents and ionizing radiation on RNA and protein level of *ING1*. In addition flow cytometric cell cycle analysis was performed after siRNA-treatment to represent the induction of apoptosis.

**Results:** An increase in *ING1* expression was detected in *LN229* glioblastoma cell line with confirmed mutation of the *TP53* gene and treatment with cytostatics as cisplatin or ionizing radiation. The *ING1* isoform *ING1a*, which owns a stake in histon deacetylase acitivity, showed a stronger induction than *ING1b*, which is involved in histone actyle acitivity. By siRNA-treatment of the cells with reduced expression *ING1* we showed *in vitro* after treatment with cisplatin an accelerated cell cycle progression with accelerated entry detected in apoptosis.

**Discussion:** In malignant glioblastoma cell line a reduced *ING1* expression level is associated with an increased chemosensitivity to cisplatin treatment. This is caused by a reduced HDAC activity with increased formation of the DNA and a better damage to the DNS. Thus the determination of the individual *ING1* expression levels in malignant gliomas may have prior to the therapy with cisplatin and HDAC inhibitors as a predictive value.

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b><u>Abkürzung</u></b>	<b><u>Bedeutung</u></b>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenosin
A. dest. (dH <sub>2</sub> O)	Aqua destillata (lateinisch für: destilliertes Wasser)
AA	Acrylamid
Ad	(lateinisch für: zu, auf bestimmte Menge auffüllen)
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin oder Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CDDP	Cisplatin
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomografie
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxytyrosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata (lateinisch für: zweifach destilliertes Wasser)
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
ddTTP	Didesoxytyrosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	(engl.) "epidermal growth factor receptor" (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EB	Ethidiumbromid
engl.	Kennzeichnet einen Fachausdruck in englischer Sprache
FACS	(engl.) „fluorescence activated cell sorting“ (Durchflusszytometrie)
FCS	fetales Kälber Serum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray (internationale Einheit für die Energiedosis ionisierender Strahlung)
h	Hora (lateinisch für: Stunde)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hoechst 33258	Produktbezeichnung der chemischen Verbindung Bisbenzimidazol
<i>in vitro</i>	Lateinisch für: im Glas
<i>in vivo</i>	Lateinisch für: im Lebendigen
ING	(engl.) "inhibitor of growth" (Wachstumshemmer)
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
lat.	Kennzeichnet einen Fachausdruck in lateinischer Sprache
LB	Luria Bertani (Nährmedium)
LD 50	Letaldosis 50 %
LED	Licht emittierende Diode
Log10	Dekadischer Logarithmus
LOH	(engl.) "loss of heterozygosity" (Verlust der Heterozygotie)
m/V	Masse bezogen auf das Volumen

Mb	Megabase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
min	Minute
min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NLS	(engl.) "nuclear localization signal" (Kernlokalisierungssignal)
Nm	Nanometer
NTS	(engl.) "nucleolar translocation sequences" (nukleoläre Translokationssequenz)
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei Lichtwellenlänge 260 nm
OD <sub>280</sub>	Optische Dichte bei Lichtwellenlänge 280 nm
PBS	(engl.) „phosphat buffered saline“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	(engl.) "polymerase chain reaction" (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	(engl.) "platelet derived growth factor" (Blutplättchenwachstumsfaktor)
pg	Pikogramm
pH-Wert	Negativ dekadischer Logarithmus der Aktivität von Wasserstoffionen, d. h. das Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PHD	(engl.) "plant homeodomain" (Zinkfingerdomäne)
PIP	(engl.) "PCNA interacting protein" (PCNA-interagierendes Protein)
pmol	Pikomol

PTEN	(engl.) "phosphatase and tensin homolog" (humanes Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sekunde(n)
siRNS	(engl.) "small interfering" RNS (s. 4.2.3)
SSCP	(engl.) „single-stranded-conformation-polymorphism“ (Konformationsunterschied einzelsträngiger Nucleotidsequenzen von gleicher Länge)
T	Thymin
Ta	(engl.) „annealing temperature“ (Anlagerungstemperatur)
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tm	(engl.) „melting temperature“ (Schmelztemperatur)
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>TP53</i>	<i>p53</i> -Tumorsuppressorgen
T-PBS	Tween-PBS
U	Uracil / Unit (Einheit für Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	(engl.) "vascular endothelial growth factor" (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. EINLEITUNG

Die Prognose von Patienten mit hochgradig malignen astrozytären Neubildungen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie dem Glioblastoma multiforme (GBM), ist trotz wachsendem Verständnis von Tumorentstehungs- und Resistenzmechanismen sowie kontinuierlich verbesserten diagnostischen und therapeutischen Optionen nach wie vor ungünstig. Das insgesamt schlechte Ansprechen der Tumoren auf die aktuellen Therapieformen ist unter anderem Folge einer Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung. Fehlfunktionen von Tumorsuppressorgenen wie *TP53* sind charakteristisch für das GBM. Sie können zu einer Resistenzentwicklung von GBM-Zellen gegenüber DNS-schädigenden Agenzien, wie beispielsweise platinhaltiger therapeutischer Substanzen oder Gamma-Strahlung, die bei der Behandlung von GBM regelmäßig zum Einsatz kommen, beitragen<sup>1</sup>. Die Identifikation von molekularen Markern, mittels derer ein individuelles Ansprechen der Tumorzellen auf die Behandlung vorhergesagt werden kann, trägt unmittelbar zur Verbesserung der Langzeitprognose von Patienten mit GBM bei. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der potenzielle Einfluss des Tumorsuppressors „Inhibitor of growth 1“ (*ING1*) auf die Therapiesensitivität von GBM-Zellen untersucht.

### 1.1 Glioblastoma multiforme (GBM) - biologische Eigenschaften und therapeutische Herausforderungen

Das Glioblastoma multiforme (GBM) gehört zu den hochgradig malignen Gliomen<sup>2</sup>. Gliome sind Tumore, die aus entarteten Gliazellen hervorgehen. Gesunde Glia bildet unter anderem das Hüll- und Stützgewebe des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie übernimmt Aufgaben im Zellstoffwechsel und ist an der Reizübertragung zwischen den Nervenzellen sowie anderen Vorgängen im ZNS beteiligt. Gliazellen kommen im gesamten ZNS vor. Deshalb können Gliome in allen Regionen von Gehirn und Rückenmark entstehen. Es handelt sich dabei um primäre ZNS-Tumore, das heißt Tumore, die nicht infolge der Metastasierung einer Neubildung außerhalb des ZNS entstanden sind. Im Folgenden werden die biologischen Eigenschaften von GBM beschrieben, aus denen sich wichtige therapeutische Herausforderungen ergeben.<sup>2,3</sup>

### 1.1.1 *Epidemiologie und Inzidenz*

Tumore des zentralen Nervensystem haben bezüglich aller Krebserkrankungen insgesamt einen Anteil von ungefähr 2 %<sup>4</sup>. GBM machen etwa 13 % aller intrakraniellen Tumoren<sup>2</sup>. Die Inzidenz dieser Entität wird mit 5-6 Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr abgeschätzt<sup>5</sup>. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr. Männer haben ein 1,26fach höheres Risiko gegenüber Frauen, an einem malignen Gliom zu erkranken<sup>2,2</sup>. Bei Kindern und Jugendlichen, die jünger als 19 Jahre sind, beträgt die Inzidenz des GBM 2,6 pro 100.000 Einwohner im Jahr<sup>6</sup>.

### 1.1.2 *Histopathologische und molekulargenetische Eigenschaften*

Obwohl der zelluläre Ursprung von Gliomen beim Menschen noch nicht sicher identifiziert ist, deuten Untersuchungen auf neoplastisch transformierte neurale Stamm- oder Progenitorzellen als Ursprungszellen für die Initiation von Gliomen hin<sup>2,7</sup>.

Die Gruppe der Gliome umfasst zahlreiche histologische Untergruppen und Malignitätsgrade, die nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) klassifiziert werden.<sup>2</sup> Die WHO-Klassifikation der verschiedenen Subgruppen von Gliomen orientiert sich an der astrozytären oder oligodendroglialen Differenzierung der Zellen sowie an weiteren Malignitätsmerkmalen wie zelluläre Anaplasie, hohe Zelldichte, Angioneogenese, Apoptosefiguren und Nekrosen.

Nach aktueller Klassifikation der WHO erfolgt die Einteilung von ZNS-Tumoren in vier Grade<sup>2</sup>. Entsprechend dieser Klassifikation ist das GBM als Neubildung höchsten Grades (WHO Grad IV) eingestuft, weil es als hochmaligner, rasch wachsender Tumor mit geringer Differenzierung, zahlreiche Mitosen und Nekrosen aufweisen kann.

Diese histomorphologischen Charakteristika haben hohe prognostische Relevanz. Hochgradig maligne Gliome wachsen schnell und infiltrativ. Die GBM metastasiert nur selten außerhalb des ZNS.<sup>3</sup>

Man unterscheidet das primäre vom sekundären GBM. Erstgenanntes entsteht *de novo*, während sich sekundäre GBM durch maligne Transformation von niedrig-gradigen malignen Gliomen

entwickeln<sup>2,3</sup>. Diese Unterscheidung ist insofern von Bedeutung, als dass unterschiedliche genetische Entwicklungswege zu verschiedenen Mechanismen von Therapieresistenz führen und in der Folge unterschiedliche Behandlungen erforderlich machen können. Die bisher identifizierten molekulargenetischen Veränderungen, die in den Entstehungsmechanismen von GBM beteiligt sein können, sind zum Beispiel verschiedene Heterozygositätsverluste (engl. „loss of heterocycosity“, LOH) von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise der Verlust des *TP53*-Genlocus auf Chromosom 17q<sup>2</sup>. *TP53* spielt eine Schlüsselrolle bei der Steuerung des Zellzyklus, der Antwort auf DNS-Schäden, dem Zelltod, der Zelldifferenzierung und der Gefäßneubildung<sup>2,8</sup>. *TP53*-Mutationen werden insbesondere für die maligne Transformation von Gliomen verantwortlich gemacht, da sie in der Mehrzahl (65 %) der sekundär entstandenen GBM vorkommen, während sie in *de novo*-GBM eher selten vorhanden sind<sup>2</sup>.

Als klinisch-prognostisch relevant gilt die Promoterhypermethylierung des O6-Methylguaninmethyl-transferase- (*MGMT*) -Gens. *MGMT* kodiert ein DNS-Reparaturprotein, das den Transfer einer Methylgruppe von der O6-Position auf einen Cysteinrest katalysiert. Die Alkylierung von *MGMT* ist ein irreversibler Prozess, welcher in der Folge zur Zelldegeneration führt<sup>9</sup>. Eine *MGMT*-Promotermethylierung ist bei Patienten mit GBM, die zusätzlich zur Behandlung mit Alkylanzien eine Strahlentherapie<sup>10,11</sup> erhalten haben, mit einem längeren Überleben assoziiert.

Weitere prognostisch relevante Veränderungen sind Punktmutationen im Gen der Isocitratdehydrogenase 1 (*IDH1*-Gen) (Arg132), seltener im Isocitratdehydrogenase 2 (*IDH2*-Gen) (Arg172). Sie sind insbesondere bei Patienten mit sekundärem GBM mit einer verbesserten Prognose assoziiert<sup>9,12</sup>.

Ein LOH auf Chromosom 1p ist für 12-15 % aller GBM, auf 19q für 54 % der sekundären und 6 % der primären GBM beschrieben<sup>2</sup>. Für beide Gruppen wird der Verlust eines Tumorsuppressorgens in der geschädigten Region vermutet<sup>13,14</sup>.

Man geht derzeit davon aus, dass das Zusammenspiel der beschriebenen und noch unbekanntem molekulargenetischen Veränderungen maßgeblich an den Entstehungsmechanismen und am biologischen Verhalten von GBM beteiligt ist. Entsprechend ist die Identifikation weiterer molekularer Marker, welche als Prognosefaktoren bei der Therapieplanung zum Einsatz kommen können, von großer Bedeutung, wenn es darum geht, die Überlebenschancen für Patienten mit GBM weiter zu verbessern.

### 1.1.3 *Krankheitszeichen, Diagnosestellung und Therapieplanung*

Die klinischen Symptome von Patienten mit ZNS-Tumoren sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose verschieden und abhängig von der Tumorlokalisation. GBM sind häufig temporal (ca. 31 %) lokalisiert. Weitere Tumormanifestationen sind parietal (ca. 24 %), frontal (ca. 23 %) und okzipital (ca. 16 %) <sup>2</sup>. Die Anamnese von GBM-Patienten ist wegen des schnellen Tumorwachstums typischerweise meist kurz (ca. 3 Monate). Die Krankheitszeichen werden einerseits durch die lokale Raumforderung (epileptische Anfälle, Lähmungen, Wesensveränderungen, Teilleistungsstörungen) und andererseits durch den erhöhten intrakraniellen Druck (Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen bis zu Hirnstammstörungen mit Bewusstseinstörungen und Ateminsuffizienz) erzeugt <sup>5, 15</sup>.

Die Magnetresonanztomografie (MRT) vor und nach Kontrastmittelgabe ist bei klinischem Verdacht auf einen intrakraniellen Tumor die diagnostische Methode der Wahl. Zusätzlich können, im Notfall oder wenn weitere spezielle Anforderungen an die Diagnostik zum Beispiel im Rahmen einer Operationsplanung gestellt werden, CT-Untersuchungen durchgeführt werden <sup>5, 16</sup>. Hier stellt sich das Glioblastom in der Regel supratentoriell (frontal, temporal, parietal oder selten okzipital) dar. Oft zeigt sich eine Balkenbeteiligung mit Ausdehnung auf die kontralaterale Hemisphäre. In der bildgebenden Diagnostik werden bis zu 20 % multifokale Ausbreitungsmuster angetroffen; zusätzlich ergeben sich Zeichen eines raumfordernden und diffus infiltrierenden Wachstums. Um ein GBM stellt sich oft ein inhomogenes fingerförmiges Umgebungsödem mit kräftiger Kontrastmittelaufnahme dar; zentrale Nekrosen mit Einblutungen oder Spiegelbildungen könnten enthalten sein. <sup>15, 17</sup>

### 1.1.4 *Aktuelle Therapiekonzepte und therapeutische Herausforderungen*

Für Patienten mit GBM ist die neurochirurgische Tumorexstirpation die Therapie der Wahl. Das Ausmaß der Operation bestimmt zwar die Prognose der Patienten, maßgeblich wird diese jedoch durch die Abhängigkeit von der lokalen Ausbreitung und der unmittelbaren Tumorlokalisation z. B. in der Nähe zu lebenswichtigen Hirnstrukturen limitiert. Die Operation dient auch der Materialgewinnung für die histologische Diagnosestellung. Durch mikrochirurgische Operationstechniken, intraoperatives Monitoring potenziell gefährdeter Hirnfunktionen, spezielle Methoden der Neuronavigation sowie Möglichkeiten der intraoperativen bildgebenden Diagnostik (MRT, Ultraschall) wurde das operationsbedingte Morbiditätsrisiko der Patienten in den letzten Jahr-

zehnten kontinuierlich gesenkt<sup>16</sup>. Stereotaktische Biopsien können bei multiplen, ungünstig lokalisierten Läsionen, bei schlechtem Allgemeinzustand präoperativ durchgeführt werden und führen bei 90 % der Patienten-Fälle zur histologischen Diagnosesicherung<sup>16</sup>.

Weitere Säulen bei der Behandlung von GBM sind Chemotherapie und Bestrahlung.

Eine Strahlentherapie kann bei postoperativ verbliebenem Resttumor die Überlebenszeit des Patienten verlängern<sup>16</sup>. Die lokale Strahlentherapie wird bei fehlender prognostischer Überlegenheit der Ganzhirnbestrahlung bei Gliomen bevorzugt<sup>5</sup>. Die Bestrahlung erfolgt in der Regel mit einer Fraktionierung von 2 Gy bei einer Gesamtdosis von 60 Gy<sup>10</sup>.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der randomisierten EORTC-Studie<sup>18</sup> (engl. „European Organisation for Research and Treatment of Cancer“, Europäische Organisation für Forschung und Behandlung von Krebs) wird die Therapie des GBM als Kombination aus Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid als Standardtherapie empfohlen<sup>10, 18-20</sup>. Hier wurden erwachsene Patienten mit einer alleinigen Strahlentherapie oder mit identischer Strahlentherapie und Temozolomid behandelt. Der Methylierungsstatus des MGMT wurde nachträglich aus dem Tumorgewebe bestimmt. Bei einer Methylierung des MGMT-Promotors war der Erfolg einer kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomid im Gesamtüberleben verbessert. Dieses Ergebnis steht für die praktische Anwendung molekularer Marker als Prognosefaktoren bei der Therapieplanung.

Eine weitere Substanzklasse in der zytostatischen Therapie des GBM sind Platinderivate wie Cisplatin. Zusätzlich kommen Alkylanzien wie Carmustin oder Cyclophosphamid, Nitrosoharnstoffe wie Bis-Chlorethyl-Nitrosourea (BCNU), Topoisomerase-II-Inhibitoren wie Etoposid<sup>10, 16, 19, 21, 22</sup> und Antimetabolite wie Methotrexat<sup>23</sup> zum Einsatz. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Kombinationstherapie mit diesen Substanzen verglichen mit bestimmten Monotherapien keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten erzeugt. Daher werden Kombinationstherapien gemäß der aktuellen Leitlinie für die Therapie von erwachsenen Patienten mit malignen Gliomen nicht empfohlen<sup>16, 24</sup>.

Experimentelle Therapieansätze sehen u. a. gentherapeutische Ansätze vor. So wird beispielsweise untersucht, ob Herpesviren als Transport-Vektoren für das Einschleusen von Testsubstanzen in GBM funktionieren können und ob dieses Vorgehen in Kombination mit etablierten Behandlungsmethoden effektiv ist<sup>24-27</sup>.

Ein nicht unbedeutendes Problem für die Entwicklung neuer Medikamente ist allerdings die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bei parenteraler bzw. enteraler Applikationsform. Diese Barrieren für potenziell wirksame Antitumor-Medikamente aufzuheben, damit ein effektiver Wirkstoffspiegel der Substanz in den Tumorzellen im ZNS erreicht wird, ist ein weiteres Ziel aktueller Forschungsprojekte <sup>26, 28</sup>.

Weitere experimentelle Behandlungen basieren auf der Beeinflussung anderer typischer biologischer Eigenschaften von GBM wie der pathologischen Neoangiogenese: Die antiangiogenetische Wirkung einer Kombination von antiendothelalem Wachstumsfaktor (anti-VEGF; z. B. Bevacizumab) und einer zytotoxischen Therapie wird derzeit in klinischen Studien überprüft <sup>29-31</sup>. Dabei hat die Kombinationstherapie mit Bevacizumab und Temozolomid (z. T. auch mit einer Strahlentherapie) bereits vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben der Patienten gezeigt <sup>32, 33</sup>. <sup>5, 34</sup>

In einigen Fällen müssen individuelle supportive Maßnahmen im Rahmen der Palliativmedizin als alleinige Option durchgeführt werden.

Vor diesem Hintergrund benötigt eine Verbesserung der bereits bestehenden Behandlungsansätze in der Neuroonkologie unbedingt ein erweitertes Verständnis der molekulargenetischen Eigenschaften von GBM. Dazu gehört auch die Identifikation neuer biologischer Marker mittels derer das Ansprechen auf vielversprechende Zytostatika wie Platinsubstanzen sowie eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen im Rahmen der Behandlungsplanung individuell vorhergesagt werden könnte.

### 1.1.5 *Prognose*

Die mittlere Überlebenszeit eines Patienten mit GBM liegt ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung etwa zwischen 6-12 Monaten <sup>5</sup>.

Durch die mittlerweile empfohlene Kombination von Temozolomid und Bestrahlung wurde die mediane Überlebenszeit der Patienten altersabhängig von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate von 2 % auf 10% angehoben <sup>10, 18, 20</sup>. Jüngere Patienten haben insgesamt eine günstigere Prognose <sup>10, 35</sup>. Zwanzig bis 30 % der Patienten entwickeln ein Rezidiv der Erkrankung <sup>10</sup>. Im Rezidivfall konnte durch die Verwendung von Bevacizumab und Irinotecan ein

weiteres progressionsfreies Überleben von 6 Monaten<sup>10</sup> erreicht werden. Die Radikalität der chirurgischen Resektion hat bei Erwachsenen keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit<sup>36-38</sup>.

## 2. DER TYP II-TUMORSUPPRESSOR "INHIBITOR OF GROWTH 1" (ING1)

Tumorsuppressorgene fungieren mit ihren Proteinen als zentrale Steuerglieder in den Signalwegen einer Zelle. Tumorsuppressoren haben wichtige Aufgaben bei zellulären Signalwegen, die bei der Wachstumskontrolle eine Rolle spielen. Hierzu gehören beispielsweise Mechanismen der Proliferation, Apoptose, Seneszenz und DNS-Reparatur<sup>39</sup>.

Tumorsuppressoren werden nach ihrer Funktion in zwei Klassen kategorisiert:

Beim Typ I handelt es sich um Proteine, welche neben vielen anderen wachstumsregulatorischen Funktionen Mutationen im Genom erkennen und Schutzmechanismen einleiten. Die zugehörigen Gene sind in vielen Malignomen mutiert. Ein bekannter Typ I-Tumorsuppressor ist zum Beispiel *TP53*.<sup>39</sup>

Typ II-Tumorsuppressoren sind insbesondere durch ihren direkten Einfluss auf das Zellwachstum gekennzeichnet. Sie sind in malignen Zellen oft reduziert exprimiert bzw. ihre Funktionen inaktiviert. Mutationen kommen seltener vor.<sup>40</sup>

Seit der Erstbeschreibung 1996 in Brustepithel- und Mamma-Karzinomzellen wurden für *ING1*<sup>41</sup> zahlreiche Funktionen bei verschiedenen biologischen Prozessen wie Apoptose<sup>42, 43</sup>, Zellalterung<sup>44-47</sup>, DNS-Reparatur<sup>48</sup>, Zellzyklusregulation, Angiogenese<sup>49</sup> und Chemosensitivität<sup>50</sup> beschrieben.

Das *ING1*-Gen wurde auf dem langen Arm von Chromosom 13q33-34 lokalisiert<sup>51</sup>. Diese *ING1*-Region enthält die genetische Information für mindestens drei Proteinisoformen, welche durch den Vorgang des alternativen Spleißens generiert werden. Zwei dieser Isoformen waren Gegenstand der Untersuchungen. Die Isoform *p47<sup>ING1a</sup>* wird von den Exonen 1b und 2 kodiert, während *p33<sup>ING1b</sup>* von den Exonen 1a und 2 kodiert wird (siehe Abbildung 2.1). Bei der Proliferation menschlicher Zellen ist die Isoform *p33<sup>ING1b</sup>* am ausgeprägtesten exprimiert<sup>52</sup>.

*ING1* zu den Typ II-Tumorsuppressoren gezählt<sup>41, 52</sup>, beispielsweise wurde der Verlust der Genfunktion in *ING1*-"Knock-out"-Mäusen mit einem erhöhten Auftreten von B-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht<sup>53</sup>. Bei Gliomen ist die Eigenschaft als Tumorsuppressor mit der Interaktion mit dem Tumorsuppressor *TP53* verbunden<sup>52, 54</sup>. Eine Interaktion mit weiteren Wachstums-

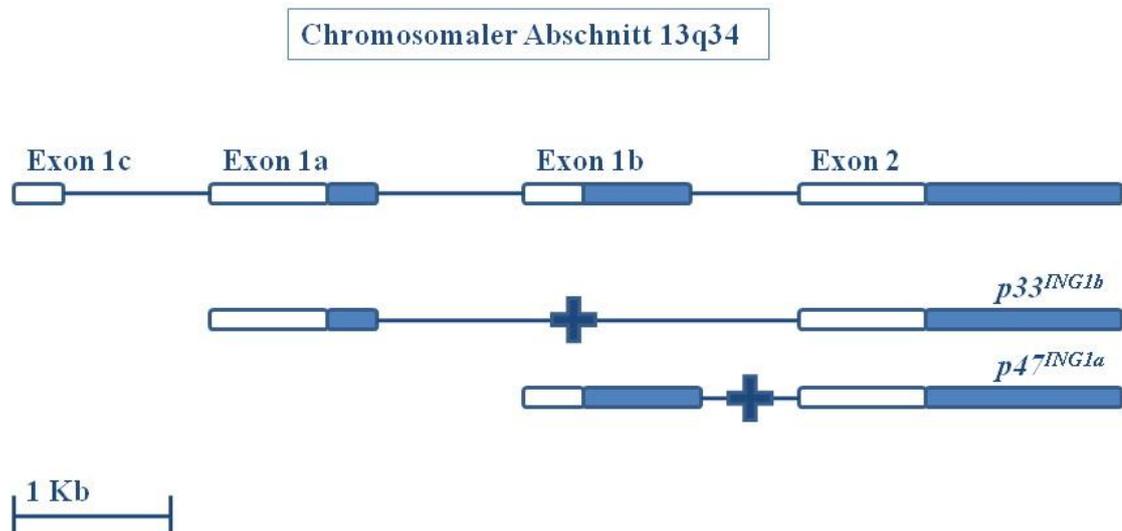
regulatoren und der Proteinisoform  $p33^{ING1b}$  sind bekannt, so ist es in den Signalketten der drei Regulatoren *H3K4* (engl. „histone H3 methylated on lysine (K) 4“), *TP 53* und *PCNA* eingebunden. Zusammen mit *PIP* (engl. „phosphatidylinositol monophosphates“) als Aktivator führt es mit *PCNA* zur Modulation der Prozesse in der DNS-Reparatur und Replikation als auch bei der Apoptose. *H3K4* beeinflusst zusammen mit dem *ING1-PIP*-Komplex den Grad der Histonmethylierung (siehe unten). Der *ING1/TP53*-Signalweg wirkt sich besonders während den G1, S und G2-Phasen des Zellzyklus aus, in der Regel wird hier über die Apoptose berichtet<sup>52</sup>. Eine Abweichung im Muster der *ING1*-Promotermethylierung konnte für die chronische lymphatische Leukämie oder das Ovarialkarzinom beschrieben werden. Hier wurde die Vermutung einer Rolle in der Onkogenese diskutiert<sup>55,56</sup>.

Nach der DNS-Schädigung durch UV-Licht von Fibroblastenkulturen konnte eine Bindung von der Proteinisoform  $p33^{ING1b}$  an *PNCA* (engl. "Proliferating cell nuclear antigen“) nachgewiesen werden. *PCNA* ist als ein bedeutender Akteur bei der DNS-Replikation und -reparatur bekannt. Ohne die Interaktion zwischen  $p33^{ING1b}$  und *PNCA* gingen die Zellen in Apoptose.<sup>57</sup> Eine Schlüsselrolle für  $p33^{ING1b}$  wurde in diesem Prozess diskutiert<sup>52</sup>.

Für die Funktion der Tumorsuppression ist zum Einen die Transduktion von Signalen durch signalaktive Phospholipide verantwortlich<sup>52, 58-60</sup>. Des Weiteren werden eine Chromatin-Modifikation und eine anschließende Aktivierung von Histonacetylasen und -deacetylasen durch *ING1* diskutiert. Durch die Modifikation von Histonen kann durch Konfigurationsänderungen des DNS-Histonkomplexes die Transkription von Genen ermöglicht bzw. verhindert werden.<sup>61-63</sup> Hier teilt sich die *ING*-Familie ein konserviertes Zinkfinger-Motiv (engl. "plant homeodomain“, (PHD)-Finger). Allen *ING1*-Isoformen ist dieses PHD-Fingermotiv am C-Terminus gemeinsam, eine  $C_4HC_3$ -Zinkfingerstruktur von 50-80 Aminosäuren, die eine DNS-Bindungsstelle darstellt<sup>63-65</sup>. Die Funktion des PHD-Motivs liegt in der epigenetischen Bindung an die DNS bei der Vervielfältigung des Erbguts bzw. anderen genregulatorischen Prozessen<sup>66, 67</sup>.

Beim GBM wurde in Abschnitt 1.1.2 eine *TP53*-Defizienz als charakteristisch bezeichnet. Diese Störung kann eine Resistenz gegenüber DNS-schädigenden Substanzen wie Cisplatin bedingen. Diesem Beispiel einer defizitären Tumorfunktion entsprechend, wurde für *ING1* eine Funktion bei den Mechanismen einer veränderten Chemosensitivität von malignen Hirntumorzellen beschrieben<sup>50</sup>. So wurde in 100 malignen ZNS-Tumoren (darunter 34 Glioblastome) eine Mutati-

onsanalyse der kodierenden Regionen vorgenommen und keine Mutationen nachgewiesen. Vielmehr konnte semiquantitativ gezeigt werden, dass die *ING1*-Expression in diesen Tumoren mit deren zunehmendem Malignitätsgrad reduziert war <sup>68</sup>.



**Abbildung 2.1:** Darstellung des *ING1* Gens und seiner Spleißprodukte. Die Linie (mit dem Kreuz) soll den Spleißvorgang symbolisieren. (modifiziert nach <sup>69</sup>)

Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass *ING1*-Proteine aufgrund ihrer tumorsuppressorischen Funktionen bzw. ihrer epigenetischen Steuerungsfunktionen einen Einfluss auf die Reaktion von Gliomzellen nach einer DNS-Schädigung haben.

Basierend auf diesen Ergebnissen wird *ING1* der Klasse von Typ II-Tumorsuppressorgenen zugeordnet <sup>70</sup>.

## 2.1 Funktion der *ING1*-Spleißvarianten

Die Suppression der Spleißvariante *p33*<sup>ING1b</sup> *in vivo* trug zur Tumorentstehung des Neuroblastoms bei <sup>41</sup>. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *ING1* eine Funktion in der Zellalterung besitzt. Die Nähe des Gens zur Lokalisation von Telomerstrukturen auf Chromosom 13q33 kann diese Tatsache begründen <sup>44, 65, 71</sup>. In humanen Fibroblastenzelllinien, welche mit *p33*<sup>ING1b</sup>-Antisense behandelt wurden, konnte die Replikationsfähigkeit der Zellen gesteigert werden. Die Expression von *ING1*-Spleißvarianten lag in alternden Zellen hierbei höher als in jungen

Fibroblastenzellen<sup>72</sup>. Eine ektope *p47<sup>ING1a</sup>*-Überexpression zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Apoptose in Abhängigkeit zum Zellalter<sup>46</sup>.

Hinsichtlich der Zellzykluskontrolle konnte gezeigt werden, dass die *ING1*-Spleißvarianten in den jeweiligen Zellzyklusphasen quantitativ unterschiedlich nachweisbar sind. Im Übergang von G<sub>0</sub> zu G<sub>1</sub> sind sie verringert nachweisbar, während sie in der späten G<sub>2</sub>-Phase höhere Level aufweisen. Das Maximum der *ING1*-Expression ist in der S-Phase und ein erneutes Absinken des Expressionsniveaus ist in der G<sub>2</sub>-Phase nachweisbar. Genauere Aussagen über den zugehörigen Regelmechanismus sind aktuell noch nicht bekannt<sup>72</sup>.

Erhöhte Spiegel von *p33<sup>ING1b</sup>* bedingen einen G<sub>1</sub>-Arrest der Zellen, während eine verminderte *p33<sup>ING1b</sup>*-Expression mit einem erhöhten Zellwachstum und Zelltransformation *in vitro* einhergeht<sup>41</sup>.

Die Vielzahl der Funktionen in welche *ING1* involviert ist, verweist auf eine universelle Rolle der *ING1*-Proteine in der Regulierung des Zellzyklus.

## 2.2 Cisplatin (CDDP) als Modell zur Erzeugung von DNS-Schäden

Cisplatin ist eine Schwermetallkomplexverbindung, welche strukturell als eine Diaminodichloro-Platinverbindung dargestellt werden kann. CDDP bindet an alle Basen der DNS und wirkt alkylierend durch intra- oder interstrangartige Quervernetzungen („crosslinks“), in deren Folge DNS-, RNS- und Proteinsynthesen gestört werden. Die Zelle tritt dann in die Apoptose ein oder die DNS wird repariert, was zur Resistenzbildung einer Zelle gegenüber CDDP führen kann.<sup>73,74</sup> Hier sind die besonders schwerwiegenden Doppelstrangbrüche von Interesse<sup>75</sup>.

Platinsubstanzen sind Bestandteil etablierter Chemotherapie-Regime, die auch für Kinder und Jugendliche mit hochgradig malignen Gliomen relevant sind<sup>76</sup>. Spezielle molekulare Marker, die beispielsweise das individuelle Ansprechen der Tumore auf Platinverbindungen im Rahmen der Therapieplanung individuell vorhersagen, wurden bisher noch nicht identifiziert. Sie könnten jedoch zur Therapieoptimierung beitragen.

Die Rolle einer intakten bzw. gestörten *ING1*-Funktion vor dem Hintergrund des putativen Tumorsuppressorgens Typ II bei der cisplatininduzierten Apoptose war Forschungsgegenstand in dieser Arbeit.

### 3. ZIELSETZUNG UND HYPOTHESEN

*ING1*-Proteine stellen wichtige Regulatoren des Zellzyklus dar. Als Tumorsuppressoren des Typ II hat die Aktivierung, Suppression oder Deaktivierung von *ING1* einen möglichen Einfluss auf das Therapieansprechen maligner Tumoren unter antineoplastischer Therapie. Vor diesem Hintergrund soll ein besseres molekulares Verständnis der funktionellen Relevanz des *ING1*-Genproduktes bei der Apoptose erreicht werden.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, zum besseren molekularen Verständnis von hochgradig malignen Gliomen unter Cisplatintherapie und zur Verbesserung von Therapiekonzepten für Patienten mit diesen Tumoren beizutragen. Dazu bedarf es der Identifizierung neuer molekularer Faktoren sowie der Definition von deren Rolle in der Gliombiologie. Aufgrund seiner tumorsuppressorischen Funktionen ist *ING1* ein Kandidat, der in diesem Zusammenhang relevant sein könnte.

**Als Grundlage für das vorliegende Projekt wurden folgende Hypothesen aufgestellt:**

1. Die endogene Expression der *ING1*-Isoformen  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  in GBM-Zellen wird durch DNS-Schädigung unterschiedlich induziert.
2. Eine reduzierte *ING1*-Expression verändert das Wachstums- und Apoptoseverhalten von GBM-Zellen nach Cisplatinbehandlung.

#### 4. EXPERIMENTELLES KONZEPT

Zur Prüfung der oben genannten Hypothesen (siehe Abschnitt 3) sind folgende Untersuchungen an malignen Gliomzellen notwendig:

- die Analyse der endogenen Expressionsspiegel von *ING1*-mRNS und -Proteine nach Behandlung mit DNS-schädigenden Agenzien (Cisplatin, Gammastrahlung) sowie nach Behandlung mit Zytostatika, die alternative Apoptosewege induzieren (Mitosehemmer Vincristin) sowie
- die Zellzyklusanalyse von GBM-Zellen mit alterierter *ING1*-Expression nach DNS-Schädigung.

#### 4.1.1 *Materialien, Geräte und Reagenzien*

Alle Materialien, Geräte, Reagenzien wurden, wie vom Hersteller empfohlen und in medizinisch-agnostischen bzw. naturwissenschaftlichen Laboren verwendet, gelöst und gelagert.

#### 4.1.2 *Verbrauchsmaterialien*

##### Materialien

##### Hersteller

Eppendorf Reaktionsgefäße (safe lock) 500, 1500, 1000, 2000 µl	Eppendorf
Falcon Reaktionsgefäße 15, 50 ml	Falcon
Parafilm	Pechitey Plastic Packing
Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson Labware
Pipettenspitzen 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml für Pipetboy acu	Becton Dickinson Labware

#### 4.1.3 *Geräte*

##### Gerät

##### Hersteller

Autoklav	Systemec GmbH
Blockheizgerät; Thermomixer	comfort Eppendorf
Deionisierungsanlage Milli Q UF plus	Millipore
Elektrophoresekammern Mini-Sub-Cell GT und Sub-Cell GT (inclusive Gelkamm, Gelträger Gelgießvorrichtung)	BioRad Laboratories
Feinwaage; SBA 51	Scaltec
Gel-Fotodokumentationsanlage mit UV-Tisch	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Kipptischschüttler 3013	GFLR
Magnetrührer, heizbar, C 35	Cabinco
Membranvakuumpumpe; Vacuubrand GMBH	Vacuubrand GMBH
Microcomputer, Electrophoresis, Power Supply E802 (Stromversorgungsgerät)	Consort
Mikrowellengerät	Sharp

Minishaker; MS2	IKAID Werke
Miniwasserbad	Julabo
Netzstromversorgungsgerät; E802 300 V-2000 mA	Consort
Netzstromversorgungsgerät; pp 4000	Biometra
Netzstromversorgungsgeräte; Blue Power 500,3000	Serva
pH-Meter	Hanna Instruments
Photometer Küvetten	Amersham Bioscience
Photometer; Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Pipette (elektrisch), EasyPet	Eppendorf AG
Pipette (elektrisch), Pipetboy acu	integra bioscience,
Pipetten (manuell) 0,5 µl-1000 µl	Labsystems Sarstedt AG & Co.
Pipetten Precision 5-100 µl	Biozym
Pipetten Proline 0,2-10 µl, 5-100 µl	BioHIT
Pipetten; P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson
Röntgenfilmentwicklungsgerät;45 compact	Protec
Slab Gel Dryer (Vakuum-Geltrockner)	Hoafar Scientific
Strahlentherapiegerät, Gammatron „S“	Siemens
Thermocycler; T-Gradient	Biometra
Thermocycler; Unoblock	Biometra
Thermomixer (Blockheizgerät)	Eppendorf AG
Thermomixer Aufsätze 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Vortex; REAX top	Heidolph
Zell-/ Bakterieninkubator TH 30	Edmund Bühler
Zentifuge; Megafuge 1,0R (Rotor 2704; Einsätze #7570F)	Heraeus instruments
Zentrifuge (Tischzentrifuge); Galaxy mini	Merck Eurolab
Zentrifuge BioFuge fresco	Heraeus instruments
Zentrifuge; Biofuge fresco (Rotorblatt 3324)	Heraeus instruments
Zentrifuge; Biofuge pico (Rotor 3325 F152750)	Heraeus instruments
Electro Cell Manipulator/Model ECM 630	BTX

#### 4.1.4 Reagenzien

<b><u>Medien/Zusätze und Chemikalien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Acrylamid (AA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acrylamidlösung	Biorad
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumchlorid (N <sub>2</sub> HC)l	Merck
Ammoniumpersulfatlösung (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bisacrylamid (BAA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Harnstoff	Merck
Isopropanol	Merck
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nonidet (4-Nonylphenolpolyethylenglycol P-40)	Boehringer Mannheim
PBS Dulbecco Pulver	Biochrom KG
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II)	Firma MBI Fermentas
Tetramethylethyldiami (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton 100 x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TRIZMA Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween 20	BioRad Laboratories

#### 4.1.5 *Puffer und Lösungen*

##### Puffer

0,5 M EDTA pH 8,0

10 x PBS

10 x TBE-Puffer

150 mM Tris pH 7,6

1 M Trishydroxymethylaminomethane  
(Tris) pH 8,0

2 M Tris

Agarosegelprobenpuffer

Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml)

PBS-Puffer

T-PBS (0,05 %)

Tris-Borsäure-EDTA-(TBE-)Puffer (10 x)

Tris-EDTA-(TE-)Puffer

##### Herstellung

18,61 g EDTA in 90 ml dH<sub>2</sub>O lösen, den pH-Wert mit 5 N NaOH auf 8,0 einstellen, mit dH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

96 g PBS in 1 l dH<sub>2</sub>O lösen

TRIS 0,89 M, EDTA-Na<sub>2</sub>-Salz 0,02 M, Borsäure 0,89 M, pH 8,3 ± 0,2 ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

18,17 g Tris in 800 ml dH<sub>2</sub>O lösen, den pH-Wert mit 5 N HCl auf 7,6 einstellen, mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

6,055 g Tris in 40 ml dH<sub>2</sub>O lösen, den pH-Wert mit 5 N HCl auf 8,0 einstellen, mit dH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

24,22 g Tris in 90 ml dH<sub>2</sub>O lösen, mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

250 mg Bromphenolblau in 33 ml 150 mM Tris pH 7,6 lösen, 60 ml Glycerin zugeben, mit dH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen

100 mg Ethidiumbromid in 100 ml dH<sub>2</sub>O lösen

9,55 g PBS Dulbecco Pulver in 1 l ddH<sub>2</sub>O lösen

100 ml 10x PBS + 900 ml dH<sub>2</sub>O, 500 µl Tween 20 dazugeben

108 g Tris + 55 g Borsäure + 93 g EDTA in 800 ml dH<sub>2</sub>O lösen, auf 1 l auffüllen

4 ml 1 M Tris-Stammlösung + 0,8 ml 1 M EDTA-Stammlösung, auf 400 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern

#### 4.1.6 *Kits*

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	ABI PRISM
Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH
QIAEX II-Kit (Nukleinsäuren-Gel-Extraktion).	Qiagen GmbH

#### 4.1.6.1 *Zellkultur*

<u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus instruments
Eismaschine	Ziegra Eis Maschinen
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Laborcenter, Nürnberg
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG
Kulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Falcon
Lichtmikroskop (4 x – 20 x) Wilovert A	Hund
Sterilbank Hera safe	Heraeus instruments
Ultraschallhomogenisiersator für biologisches Gewebe; Ultra Thurax T 25 basic	IKAID Werke
Wasserbad (temperierbar)	Memmert
Zellschaber	Falcon

<u>Zelllinien</u>	<u>Herkunft</u>
Zelllinie LN229	GBM-Zelllinie, ( Prof. Weller, Universität Tübingen)

<u>Medien/Zusätze und Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco´s modified Eagle medium (DMEM): 4500 mg/l Glucose, L-Glutamin, ohne Pyruvat	Gibco BRL
Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen, 10000 µg/ml Strep in 0,85 % NaCl)	Gibco BRL

Phosphatpuffer (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Gibco GRL
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure 10 x (EDTA)	Gibco GRL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

#### 4.1.6.2 *RNS-Isolierung, cDNS-Synthese, PCR und RT-PCR, Realtime-PCR*

<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
10 x PCR-Puffer	MBI Fermentas
Amplification Grade DNase I (20 U) (Komplettsystem)	Invitrogen
AmpliTaQ (thermostabile DNS – Polymerase) 5 U/µl	MBI Fermentas
dNTP (Desoxyribonukleotidtriphosphat ) 2 mM	MBI Fermentas
Lightcycler (kombiniert mit LightCycler Software Version 3.5)	Roche
Magnesiumchloridlösung 25 mM	MBI Fermentas
PUREGENE DNS-Purification Kit	Gentra
Ribonuclease H (30 U)	Gibco BRL Life Technologies
Spezifisch synthetisierte Oligonukleotide (z. B. Primer)	MWG Biotech oder TiB-Molbiol
Superscript II First-Strand-Synthese“-Kit (Komplettsystem)	Invitrogen
TRIzol Total RNA Isolation Reagent	Gibco BRL

#### 4.1.6.3 *Proteinextraktion, Proteinmessung*

<b><u>Puffer/ Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller/Herstellung</u></b>
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH
Bradfordreagenz	BioRad Laboratories
NonSDS-RIPA-Puffer (Lyse-Puffer)	4,38 g Natriumchlorid in 400 ml dH <sub>2</sub> O lösen, 12,5 ml 2 M Tris, 5 ml Nonidet P 40 und 5 ml Triton x 100 zugeben, mit dH <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen

PBS-Puffer 9,55 g PBS Dulbecco Pulver in 1 l dH<sub>2</sub>O lösen

#### 4.1.6.4 *Westernblot*

##### Reagenzien

10 x reducing agent (NuPage-System)  
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)  
4x Proteinprobenpuffer (NuPage-System)  
Anti-Actin-Antikörper  
Bench Marker (NuPAGE-System)  
CAb I-IV (anti-Human)-*ING1*-Antikörper

Coomassie Brilliant Blue Fertiglösung  
ECL-Detektionskit  
ExtrAvidin  
Magic Marker (NuPAGE-System)  
Methanol  
Ponceau-Lösung  
rabbit-anti-mouse, Biotin (Sekundärantikörper)

##### Puffer und Lösungen

MOPS-Elektrophoresepuffer (20 x)  
  
NuPAGE-Transferpuffer (1 x)

##### Hersteller

Invitrogen Life Technologies  
USB Corporation  
Invitrogen Life Technologies  
Dako  
Invitrogen Life Technologies  
zur Verfügung gestellt von Prof. K. Riabowol, Department of Biochemistry and Molecular Biology and Oncology, Southern Alberta Cancer Research Centre, University of Calgary, Kanada  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
Amersham Biosciences UK Limited  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
Invitrogen Life Technologies  
Merck  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
Dako

##### Herstellung

104,6 g MOPS; 60,6 g TRIS; 10 g SDS; 3 g EDTA in 300 ml dH<sub>2</sub>O add. lösen, Gebrauchslösung mit ddH<sub>2</sub>O add. 500 ml  
50 ml 20 x NuPAGE Transferpuffer + 100 ml Methanol absolut, mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

RIPA Puffer (500 ml Ansatz)

2 M Tris + 4,38 g + NaCl + 1 % Nonidet P  
40 + 1 % Triton x 100 auf 500 ml mit dH<sub>2</sub>O  
auffüllen

### Geräte/Verbrauchsmaterialien

### Hersteller

NuPage-System :

Invitrogen Life Technologies

„Blottingpads“; „Blotting“-Elektroden;  
„Blotting“-Klammer; Probenkämme; Gel-  
klammern, Elektrophoresekammer,  
Elektrophoreselektroden

Filmentwicklermaschine Compact 2

Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG

Filterpapier

Schleicher & Schuell GmbH

Hyperkassette (Röntgenfilmkassette)

Amersham Biosciences UK Limited

Lumi-Film; Chemiluminescent Detection  
Film

Roche Applied Science

Nitrozellulosemembran (0,2 µm)

BioRad Laboratories

NuPAGE Novex Bis-Tris Gele 4-12 %

Invitrogen Life Technologies

Stromversorgungsgerät EPS 3501 XL

Amersham Biosciences

Plastikküvetten

Sarstedt AG & Co.

Fotometer

Pharmacia Biotech

#### 4.1.6.5 *Transformation, Bakterienzüchtung*

TOPO TA Cloning Kit

Invitrogen Life Technologies

pCR 2.1-TOPO 3.9kb Vektor

Invitrogen Life Technologies

Bakterienzellen: Chemokompetente E.coli

Invitrogen Life Technologies

TOP10F<sup>-</sup> Zellen Genotyp: F'(lacIq, Tn10(TetR))  
mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1  
araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1  
nupG

### **Reagenzien**

Trypton

Hefeextrakt

Agar

Ampicillin (Pulver)

SOC-Medium

### **Hersteller**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Invitrogen Life Technologies

### **Puffer und Lösungen**

Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml)

LB- Medium (Luria Bertani-Medium)

### **Herstellung**

(Lagerung bei -20 °C)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in  
1000 ml ddH<sub>2</sub>O (Lagerung bei 4°C)

#### 4.1.6.6 *Durchflusszytometrie*

### **Chemikalien/Reagenzien**

2'-Deoxycytidin

5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)

6 well plates

Ethidiumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-  
phenylphenanthridiniumbromid,

Homidiumbromid

Höchst 33258, Bisbenzimid

Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)

### **Hersteller**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Becton Dickinson Labware

Serva

Riedel-de Haën AG

Merck

Merck

### **Puffer und Lösungen**

BrdU-Stammlösung

EB-Gebrauchslösung (3 µg/ml)

### **Herstellung**

6 mM 5-Bromo-2'-Deoxyuridin +  
6 mM 2'- Deoxycytidin in PBS  
lösen

2 % EB-Stammlösung in Tris-  
Puffer

Ethidiumbromid- (EB-) Stammlösung	150 µg/ml Ethidiumbromid in dH <sub>2</sub> O lösen, bei 4°C lichtgeschützt lagern
Hoechst 33258-Gebrauchslösung (1,2 µg/ml)	0,06 % Hoechst 33258-Stammlösung in Tris- Puffer
Hoechst 33258-Stammlösung	2 mg/ml Hoechst 33258 in dH <sub>2</sub> O lösen, bei 4°C lichtgeschützt lagern
Tris-Puffer	100 mM Tris-HCl + 154 mM NaCl + 0,4 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 mM CaCl <sub>2</sub> + 0,1 % Nonidet P40 + 0,2 % BSA in dH <sub>2</sub> O lösen

### **Geräte/Software**

Durchflusszytometer PAS III  
FlowMax, Version 2.3, Cytometry software  
WinMDI, Version 2.8

### **Hersteller**

Partec  
Joseph Trotter, Salk institute Partec  
Joseph Trotter, Salk institute Partec

#### 4.1.6.7 *Sonstige Software*

### **Software**

ABI PRISM 337 v2.1  
Chromas (Version 1.1)  
Data Collection und Data Analysis  
Programms (Version 1.2. bzw. DI-7.1)  
Editseq 5.0  
Gel-Pro 3.2 Software  
Microsoft Office 2007  
Oligo 4.0  
PubMed  
Seqman II 5.0  
Sequence Editor v1.3  
UniGene

### **Hersteller**

Applied Biosystems  
Technelysium  
Applied Biosystems  
DNASStar Inc. 2001  
Media Cybernietcs  
Microsoft  
Molecular Biology Insights  
NCBI  
DNASStar Inc.2001  
Applied Biosystems  
NCBI

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Bei dieser Methode werden Zellen *in vitro* kultiviert. Zellen können direkt aus dem Zellverband eines tierischen oder pflanzlichen Organismus gelöst und als Primärkultur oder in immortalisierter Form in Kultur gebracht und vermehrt werden. Einige Zellen schwimmen frei im Nährmedium, während andere adhärent auf einer Oberfläche gedeihen.

Um die typischen Eigenschaften der vom Gesamtorganismus isolierten Zellen (wie Wachstum, Teilung usw.) in diesem Modell möglichst naturgetreu untersuchen zu können, muss eine entsprechende Umgebung simuliert werden.

Die Anzucht der Zellen erfolgte für die vorliegende Arbeit in 75 cm<sup>2</sup>-messenden Kulturflaschen mit Mikro-Filter im Inkubator. Der Ansatz des Nährmediums in der Kulturfläche bestand aus 14,25 ml Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) und 0,75 ml FCS . Auf den Zusatz eines Antibiotikums wurde verzichtet. Die Kulturbedingungen lagen bei einer Temperatur von 37°C und einer 6,5 % Kohlendioxid-Atmosphäre. Vitalität, Morphologie oder krankhafte Veränderungen der Kulturen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überwacht. Essenzielle Stoffwechselmetabolite (z. B. Aminosäuren, anorganische Salze oder Spurenelemente) wurden über das konfektionierte Kulturmedium zugeführt. Von den Zellen abgegebene Stoffwechselendprodukte wurden in regelmäßigen Abständen durch Wechseln des Nährmediums entfernt. Im Einzelfall ist die Verwendung weiterer Hilfsstoffe (Haftvermittler oder Hormone), welche für die Synthese der Zellen benötigt werden, notwendig. In diesem Fall konnte auf diese Adjuvantien verzichtet werden.

Zum Erreichen eines optimalen pH-Wertes in Kultur wurden anorganische Puffersubstanzen bzw. eine Begasung des Inkubationsraumes mit Kohlendioxid verwendet. Farbindikationen im Nährmedium zeigten durch Farbwechsel in Abhängigkeit des pH-Wertes den Zustand der Pufferkapazität an, dann erfolgte ein Wechsel des Nährmediums in entsprechenden Intervallen. Regelmäßige Mediumwechsel erfolgten bei der Zellpassagierung (s. u.). Für die geplanten Experimente war eine Kontaktinhibition der schnell wachsenden Zellen als Ausgangspunkt für die Synchronisierung maßgeblich, da diese ein Fortschreiten im Zellzyklus unterbindet. Um vergleichbare Voraussetzungen für die anstehenden Experimente zu haben, das heißt dieselben

Wachstumsphasen bei den meisten Zellen jeder Kulturflasche zu gewährleisten, wurden die Zellen regelmäßig für jedes Kulturgefäß ausgezählt. Sofern sie konfluent ausgebreitet waren, wurden sie zu jeweils gleichen Anteilen auf weitere Flaschen aufgeteilt<sup>78</sup>. Dieses Passagieren der Zellkulturen erfolgte nach Inkubation mit 2 ml einer 0,25 % Trypsinlösung 0,53 mM EDTA Lösung.

Zur Lagerung der Zellen wurden diese nach deren Sedimentation in einer Zentrifuge in mit 2 ml Gefriermedium (DMEM, mit 10 % DMSO 20 % FBS) befüllten Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gefroren.

Die optische Kontrolle und schriftliche Dokumentation der Zellschädigung nach zytostatischer bzw. radiogener Behandlung wurde durch ein Zwei-Phasen-Durchlichtmikroskop unter 100-facher Vergrößerung durchgeführt und fotodokumentiert. Durch diese rein morphologische Begutachtung der Zellkulturflaschen konnten Veränderungen des Zellwachstums, der Zellkonfluenz und Zelldichte, Zellablösung und der Zellmorphologie erfasst werden.<sup>78</sup>

#### 4.2.2 Zelllinie LN229

In dieser Arbeit wurde die Glioblastomzelllinie LN229 untersucht (zur Verfügung gestellt von Prof. Weller, ehemals Universität Tübingen, nun Universität Zürich). Die Zellen entstammen einem fronto-parieto-occipital gelegenen Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) einer 60-jährigen Patientin aus dem Jahre 1979.<sup>77, 78</sup>

Charakteristisch für diese Zelllinie ist ein mutiertes *TP53* sowie eine homozygote Deletion von *p16* und *p14<sup>ARF</sup>*. Weiterhin weisen die Zellen einen Wildtyp-*PTEN*-Status auf<sup>77</sup>. Diese molekulargenetischen Veränderungen sind für viele Gliome charakteristisch<sup>2</sup> (siehe Abschnitt 1.1.2). Zudem werden *TP53*-Mutationen in Gliomen mit deren Resistenz gegenüber Cisplatin assoziiert<sup>79-81</sup>.

Funktionell weisen die Zellen eine *Fas*-Liganden-induzierte Apoptose 16 Stunden nach Zellstimulation auf. Durch gesteigerte *bcl-2*-Aktivität konnte die ligandeninduzierte dosisabhängige puromycininduzierte Apoptose beschrieben werden<sup>82</sup>. Diese Fähigkeit zur Apoptose und die gut beschriebene molekulargenetische Struktur machen diese Zelllinie zu einem geeigneten Modell für die geplanten Versuche.

#### 4.2.3 *siRNS*

Mizuno publizierte 1984 ein Experiment zur Beeinflussung der Ausbildung von Membranproteinen bei Bakterien mittels komplementärer RNS ((engl.) „antisense RNS“, asRNS) <sup>83</sup>. Der Theorie nach interagiert ein doppelsträngiges Hybrid aus asRNS und zelleigener mRNA so, dass die Transkription gestört wird. Ende der 90er Jahre wurde durch Fire <sup>84</sup> erstmals ein biologischer Prozess charakterisiert, in dem sich Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) unter Verwendung der RNS-Interferenz vor dem Einfluss einer Fremd-RNS schützten. Das asRNS-mRNA-Hybrid wird durch die asRNA-spezifischen RNase III in siRNS ((engl.) „small interfering RNA“) fragmentiert. Durch Bindung der siRNS an einen „RNA induced silencing complex“ (RISC) kommt es zur Repression des entsprechenden Genproduktes.

Durch Transfektion von Zellen mit einer spezifisch konstruierten siRNS kann die Expression eines bestimmten Gens im Erbmateriale dieser Zellen vermindert und in der Folge die entsprechende Proteinfunktion weitgehend ausgeschaltet werden.

In dieser Arbeit werden LN229-GBM-Zellen mit siRNS des konservierten *ING1*-Exons 2 stabil transfiziert (*siING1(Exon2)*, siehe Abschnitt 2 und Abbildung 5.6), um herauszufinden, ob *ING1* an der Zellantwort auf bestimmte DNS-schädigende Agenzien beteiligt ist. Dieser Arbeitsschritt wurde durch die Arbeitsgruppe um Prof. C. Hagemeier durch Dr. M. Truss (Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Berlin, Campus Mitte in Berlin) durchgeführt. Als Kontrolle dienen LN229-Zellen, welche mit *siEGFP* ((engl.) „green fluorescent protein“, *siEGFP*), das keinen bekannten Einfluss auf den Zellzyklus hat, transfiziert wurden <sup>85</sup>, um den genspezifischen Effekte bei *ING1* darstellen zu können. Mit der Zugabe von Puromycin wird eine Selektion zwischen untransfizierten Zellen und siRNS-transfizierten Zellen erreicht <sup>82, 86</sup>.

#### 4.2.4 *Vincristin (VCR)*

VCR induziert durch einen anderen Wirkmechanismus als die verwendeten Agenzien Gammastrahlung und Zytostatikatherapie mit Cisplatin Apoptose in den untersuchten Tumorzellen (Vergleich Abschnitt 2.2). VCR binden an das Protein Tubulin und hemmt so die Zellteilung in der Metaphase. Diese Kontrollsubstanz sollte im Experiment zur Darstellung der spezifischen *ING*-Antwort in der Apoptose unter *CDDP* dienen.

Vincristin ist ein Derivat aus der Gruppe der Vincaalkaloide, welches als Extrakt aus der Immergrünpflanze (*Catharanthus roseus*) gewonnen wird, mittlerweile wird diese Substanz synthetisch hergestellt. Vincaalkaloide stören die Mikrotubulinbildung, einen Teil des mitotischen Spindelapparats in der Zelle, der bei der Zellkernteilung ausgebildet wird. Sie binden an mikrotubuläre Proteine und bewirken eine Depolymerisation. Die Mitose wird in der G2- und M-Phase blockiert, der Zelltod (Apoptose) tritt dann in der Interphase ein.<sup>74</sup>

#### 4.2.5 *Gammastrahlung*

Gammastrahlung wurde als Alternative zum Schädigungsmechanismus zur Cisplatin ausgewählt. Dieser Mechanismus sollte im Experiment als ein weiterer Mechanismus zur Abgrenzung zu der spezifischen *ING1*-Antwort von Cisplatin dienen.

Gammastrahlung ist eine elektromagnetische Strahlung, welche beim Zerfall von Atomkernen entsteht. Gammastrahlung entsteht beim Zerfall des Atomkernes gemeinsam mit Alpha- und Betastrahlung. Bei der Absorption von Gammastrahlung im menschlichen Gewebe kommt es zu Ionisationsvorgängen in den Zellen. Die dabei im Gewebe freigesetzten Elektronen und Röntgenstrahlen führen zu chemischen Modifikationen der DNS. Die initiale Funktionsfähigkeit der Zelle bleibt erhalten. Kommt es jedoch zur Zellteilung, treten die strahleninduzierten Veränderungen auf, welche eine fehlerfreie Zellteilung verhindern. Die Möglichkeit der Entstehung von Doppelstrangbrüchen der DNS, welche auch unter Cisplatin beschrieben werden, war eine weitere Parallele bei der Untersuchung der *ING1*-Reaktion (Abschnitt 2.2).<sup>73, 74</sup>

#### 4.2.6 *Behandlung der LN229-Zelllinie mit Cisplatin*

Die zytostatische Behandlung der kultivierten Zellen mit Cisplatin (CDDP) erfolgte jeweils für 4, 8, 12 und 24 h. Eine zum Zeitpunkt 0 entnommene Probe diente als Referenzkontrolle. Als Kontrolle für die Behandlungsform wurde Vincristin (VCR) eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.4).

Für die Experimente dieser Arbeit wurden konfluente Zellkulturen, welche zuvor hinsichtlich der Tumorzellzahl in einer Neubauer Kammer ausgezählt wurden, verwendet (zwei Tage nach deren Passagieren). Es wurden ca.  $5-6 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche der LN229 Zelllinie behandelt.

Die eingesetzte Konzentration (Letaldosis 50 bzw. LD50) und die Behandlungszeiten der Zytostatika wurden durch Vorexperimente der Arbeitsgruppe ermittelt und durch Literaturrecherche<sup>50, 87</sup> und vergleichende Mittelwertbildung bestätigt. Die LD50 wird als die Zytostatikakonzentration definiert, durch die 50 % der behandelten Tumorzellen dem Zelltod zugeführt werden. Die ermittelte LD50 für CDDP in LN229 betrug 5 µM und für VCR 0,1 µM.

Neun konfluente Kulturen der LN229-Zelllinie wurden bereitgestellt, und zwar eine für die Nullkontrolle (0 Stunden-Wert bzw. unbehandelte Proben) und je vier für die CDDP und VCR (4, 8, 12, 24 Stunden Exposition). Zur Einstellung der LD50 wurde bei einem Endvolumen 15 ml frisches DMEM eingefüllt und die entsprechende Konzentration für CDDP bzw. VCR eingestellt. Nach der Inkubationszeit von 4, 8, 12 bzw. 24 Stunden wurden die Zellen der weiteren Aufbereitung zugeführt.

#### 4.2.7 *Bestrahlung der LN229 Zelllinie*

Die Bestrahlung der kultivierten Zellen wurde unter dosimetrischer Kontrolle mit einem Fokusoberflächenabstand von 65 cm, einer Feldgröße von 400 x 400 mm, fraktioniert mit einer Dosisrate von 1,3 Gy/min und einer Gesamtdosis von 20 Gy durchgeführt. Nach einer Zeit von jeweils 4, 8, 12, bzw. 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

(Die Bestrahlung wurde im Institut für Strahlenbiologie der Charité, Campus Mitte in Berlin, durchgeführt.)

#### 4.2.8 *Aufbereitung der behandelten Zellkulturen*

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten jeweils bei 4°C auf Eis zur Vermeidung von Denaturierung von Proteinen bzw. Proteolyse der Zellbestandteile. Nach Behandlung der Zellen mit Gammastrahlung beziehungsweise mit Zytostatika wurde das Kulturmedium abgegossen und die Zellen mit 10 ml eisgekühlten PBS gewaschen. Durch diesen Schritt wurden die noch vorhandenen abgelösten Zellen entfernt und die Zellaktivität der adhären Zellen verlangsamt. Nur adhären Zellen wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Anschließend wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die gelösten Zellen wurden mit dem eisgekühlten PBS in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die

Sedimentierung der Zellen nach Zentrifugation in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge mit 1200 x g für 5 Minuten. Die gewonnenen Zellpellets wurden entweder einer RNS-Isolierung (siehe Abschnitt 4.2.9) oder einer Proteinextraktion (siehe Abschnitt 4.4) zugeführt.

#### 4.2.9 *RNase-freies Arbeiten und RNS-Isolierung*

Die Ribonukleinsäure (RNS) dient als "Abschrift" der DNS bei der Proteinsynthese am Ribosom. Ihre Bildung *in vivo* ist abhängig davon, welche Proteine gerade für bestimmte Zellaktivitäten benötigt werden.

Aufgrund der Instabilität der RNS gegenüber ubiquitär vorkommenden RNasen erforderten die Arbeitsschritte während der RNS-Isolierung ein so genanntes RNase-freies Vorgehen. Dieses beinhaltet beispielsweise das Tragen von Einmalhandschuhen, die Verwendung eines RNase-freien Pipettensatzes und RNase-freie Reaktionsgefäße sowie das Arbeiten an einem gesonderten Arbeitsplatz unter sterilen Bedingungen.

Das zur RNS-Isolierung benötigte Wasser wurde mit 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) ad 1000 ml zweifach destilliertes Wasser versetzt und anschließend autoklaviert, um RNasen zu inaktivieren. In kommerziellen Reaktionskits waren RNase-freie Lösungen integriert.

Alle Proben und Reagenzien wurden, wenn artifizielle zelleigene Prozesse zu erwarten waren, gekühlt verarbeitet.

Die nach der zytotoxischen Behandlung aufbereiteten bzw. bei -80°C tiefgefrorenen Zellpellets (siehe Abschnitt 4.2.8.) wurden der RNS-Extraktion zugeführt. Das hierbei verwendete Trizol-Reagenz (siehe Abschnitt 4.1.4) war eine gebrauchsfertige monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, welches Zellmembranen aufbricht und mittels Phasentrennung (unter Ausnutzung der Gesetze der Lösungs- und Verteilungsvolumina) Zellbestandteile wie DNS, RNS und Proteine voneinander trennt.

Das Zellpellet wurde in einem sterilen 15 ml Falconröhrchen mit 1 ml Trizol resuspendiert und mit einem Vortexer vollständig lysiert. Die Probe wurde anschließend zur Weiterverarbeitung in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Die weitere RNS-Isolierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers (siehe Reagenzien/Kits). Die Zellreste wurden durch eine

Zentrifugation bei 12.000 g für 10 min entfernt. Der Überstand wurde in ein neues RNasefreies Reaktionsgefäß überführt, mit Chloroform gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation zeigte sich eine Phasentrennung. In der oberen wässrigen Phase, sie sollte ca. 60% des Gesamtvolumens ausmachen, befand sich die RNS. Die mittlere Schicht enthielt die DNS. In der unteren Schicht sammelten sich andere feste Zellbestandteile wie z. B. Proteine. Die wässrige Oberphase wurde abpipettiert und in ein ungebrauchtes Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von Isopropanol wurde eine Präzipitation der RNS erreicht, nach Zentrifugation sedimentierte diese am Boden des Gefäßes. Das Isopropanol wurde dekantiert, das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und bei 7.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend das Sediment bei offenem Deckel 10 min lang luftgetrocknet. Danach wurde es in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Eine 10-minütige Inkubation bei 60°C mit geschlossenem Deckel löste das Pellet vollständig. Die RNS wurde bis zur Konzentrationsmessung bei -80°C gelagert.

#### 4.2.10 *Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und des Reinheitsgrades von RNS / DNS*

Die Messung RNS- bzw. DNS-Konzentrationen erfolgte fotometrisch mit einem Spektrofotometer. Es wurde die optische Dichte (OD / Extinktion) der RNS-Lösung bei Lichtwellenlängen von 260 nm, entsprechend dem Absorptionsmaximum von RNS bzw. DNS und 280 nm, entsprechend dem Absorptionsmaximum von kontaminierenden Proteinen, gemessen. Für die Messung wurde eine Verdünnung der RNS-Proben von 1: 100 und 1: 200 hergestellt. Zur Berechnung der RNS-Konzentration wurde der ermittelte Extinktionswert bei 260 nm mit einem Proportionalitätsfaktor (40 für RNS / 50 für DNS) und mit dem Verdünnungsfaktor sowie der Zahl 100 (Umrechnungsfaktor von µg/ml in µg/µl) wie folgt multipliziert:

$$\text{RNS-Konzentration (}\mu\text{g}/\mu\text{l) in der Probe} = (\text{OD}_{260} \times 40 \times 100) \times \text{Verdünnungsfaktor}^{88}$$

Der Reinheitsgrad ist durch das Ausmaß der Proteinkontamination der Probe definiert. Er ermittelt sich aus dem Quotienten der Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm. Ein resultierender Wert größer als 1,6 spricht für eine gering proteinkontaminierte Probe. Optimal ist ein Wert zwischen 1,8 und 2,0.

#### 4.2.11 *Umwandlung der RNS in komplementäre DNS (cDNS) / Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)*

Aufgrund der Instabilität der RNS gegenüber ubiquitär vorkommenden RNasen erfolgte eine Überführung der isolierten RNS (siehe Abschnitt 4.2.9) in komplementäre DNS (cDNS), welche stabil gegenüber einer Degradierung durch RNasen ist. Unter Verwendung der Reversen Transkriptase, einem thermostabilen Enzym, welches RNS-Viren entstammt, erfolgt die enzymatisch gesteuerte Umwandlung von RNS in cDNS.

Für diesen Schritt wurde der „Superscript II First-Strand-Synthese“-Kit verwendet (siehe Abschnitt 4.1.6). Zur Entfernung eventueller DNS-Beimengungen in der Probe wurde der Reaktionsansatz, bestehend aus 2 µl RNS-Probe, 1 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl *Amplification Grade DNase I* (20 U) und Aqua destillata ad 10 µl, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Terminierung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 µl EDTA mit anschließender Inkubation bei 65°C für 15 Minuten und Eindampfen des Eluats im Thermomixer für ca. 15 bis 20 Minuten bei 65°C auf ca. 5 µl.

Für den weiteren Reaktionsansatz wurden pro Reaktionsgefäß 2 µl 10 x RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0,1 mM DDT, 1 µl RNaseOut (Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)), 1 µl Random-Hexamerprimer und RNasefreies Wasser ad 10 µl gemischt. Die Proben wurden für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl SuperScript II RT weitere 50 min in der Inkubation belassen. Terminiert wurde die Reaktion durch Temperaturerhöhung auf 70°C für 15 Minuten. Zur Vermeidung möglicher residueller RNS-Kontaminationen wurden alle Proben einem anschließenden RNS-Verdau unterzogen. Hierfür wurde jeder Probe 1 µl *Ribonuclease H* (30 U) zugefügt und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert.

Nach Umschreibung der RNS durch Behandlung in der RT-PCR in cDNA kann das Erbgut vermehrt, sicher verarbeitet oder in einer sogenannten cDNA-Bibliothek bei -80°C „archiviert“ werden.

## 4.3 Polymerasekettenreaktion

### 4.3.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR)

Die PCR ist eine enzymatische *in-vitro*-Methode zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments, das zwischen zwei bekannten Regionen innerhalb einer Nukleotidsequenz liegt. Das Enzym, eine thermostabile DNS-Polymerase, nutzt für eine Amplifikation kurze spezifische Oligonukleotide (18 bis 35 Nukleotide), so genannte „Primer“, welche sich komplementär an bekannte Abschnitte anlagern und als „Anker“ zur Replikation des flankierten Genabschnittes durch die Polymerase genutzt werden.

Kary B. Mullis wurde 1993 der Nobel Preis für Chemie verliehen, nachdem er 1985 diese Methode entwickelt hatte<sup>89-91</sup>. Die Methode ist in der Gentechnik mittlerweile als unverzichtbare Standardmethode etabliert. Mit der PCR ist es möglich, genetisches Material zu vervielfältigen, ohne auf aufwendige Schritte wie Vermehrung in Mikroorganismen oder anderen Kulturen zurückzugreifen.

Die Vervielfältigung der Primer-flankierten DNS-Abschnitte (s.o.) wird durch eine sich zyklisch wiederholende Prozedur erreicht. Durch die Temperaturerhöhung auf 95°C werden die beiden Stränge der DNS voneinander getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen gelöst werden. Bei einer spezifischen Temperatur (Annealingtemperatur) lagern sich die Primer optimal unter Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen an die DNS - Einzelstränge an.

Der nächste Schritt, die Elongation, findet bei einer optimalen Arbeitstemperatur des verwendeten hitzestabilen Enzyms (in der Regel bei ca. 72°C) statt. Die Dauer der einzelnen Schritte ist von der Länge des PCR-Produktes und den verwendeten Reagenzien und Geräten abhängig und liegt zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten. Ein PCR-Zyklus wird etwa 20 bis 45mal wiederholt. Durch jeden Zyklus wird die Anzahl amplifizierter Fragmente verdoppelt, so dass nach 20 Zyklen theoretisch 1.048.576 Kopien entstanden sind<sup>92</sup>. Tatsächlich arbeitet die Polymerase nicht so effizient, so dass eine exponentielle Vermehrung nicht immer erreicht wird<sup>93</sup>.

*Der Reaktionsansatz* muss optimale Reaktionsbedingungen für die Polymerase garantieren. Beispielsweise hat diese oft ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert oberhalb von 8,0, welcher durch Verwendung von Tris-Puffer erreicht wird. Dieser enthält zusätzlich noch einige Salze:

Kaliumchlorid (KCl) und Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Diese werden zur Steigerung der Ausbeute der PCR-Reaktion zugesetzt. Natriumchlorid (NaCl) kann die Amplifikation hemmen. Magnesiumionen (als Magnesiumchlorid) sind Kofaktoren der DNS-Polymerase und stimulieren ihre Aktivität. Außerdem bilden sie zusammen mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, der für den Nukleotid-Einbau entscheidend ist. Die Bausteine der DNS die Nukleotide (dNTP) werden für die Synthese im Überschuss hinzugefügt.<sup>94</sup>

#### 4.3.2 *Primerdesign der Primer für die INGI-Isoformen*

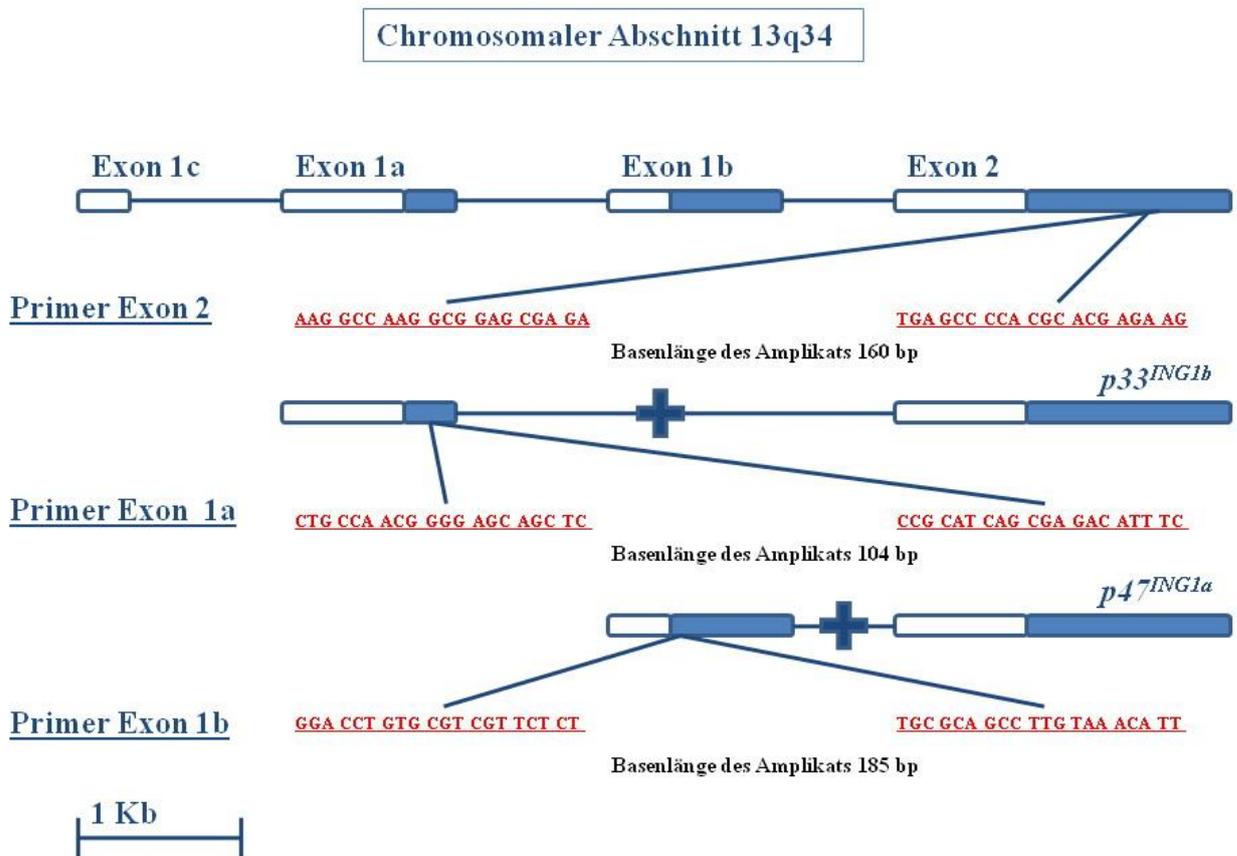
Die Sequenzen der cDNS (bzw. mRNS) für die Spleißvarianten von *ING1* wurden mit Hilfe des Genome-Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) ermittelt. Da für die einzelnen Spleißformen online jeweils unterschiedliche Sequenzen verfügbar waren, wurden diese mittels computerbasiertem Vergleich durch die Programme SeqMan und EditSeq auf eine gemeinsame Sequenzabfolge abgeglichen und so die genaue Lage der Primer für die entsprechenden *ING1*-Spleißvarianten generiert. Nach der Abstimmung der Sequenzen erfolgte das Primerdesign unter Verwendung des Oligo 4.0-Programmes für die Spleißformen  $p33^{ING1}$  und  $p47^{ING1}$ , welche genomisch Exon 1a und b von *ING1* entsprechen, und für das in allen Spleißvarianten enthaltene Exon 2 zur Generierung von Primern im konservierten Anteil aller Varianten.

Die im Genome-Browser weiterhin beinhalteten Information über sogenannte EST ((engl.) „expressed sequence tag“ wurden ebenfalls in die Analyse mit einbezogen. EST stellen transkribierte cDNS-Abschnitte dar, die im untersuchten Gewebe nachgewiesen werden<sup>95</sup>. Die Tabelle 4.1 zeigt die generierten Primersequenzen mit den resultierenden PCR-Produkten und die in der LightCycler-Untersuchung verwendeten Sonden (siehe auch Abschnitt 4.3.2 und 4.3.3.1). In Abbildung 4.1 wird schematisch die genomische Primerlage dargestellt. Der Primer wird jeweils nach seiner Orientierung auf dem Strang als „forward“-Primer, oder „reverse“-Primer benannt.

Die Annealingtemperatur der Primer ( $T_a$ ) liegt zwischen 40°C und 60°C und ist abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers sowie der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur ( $T_m$ ). Für Primer bis zu einer Länge von etwa 20 Nukleotiden findet sich bei Mülhardt eine einfache Formel zur Berechnung von  $T_m$ :  $T_m = 4 \text{ (Anzahl G und C)} + 2 \text{ (Anzahl A und T)}$ <sup>94</sup>. Eine für mehr als 20 Nukleotide geeignete Formel findet sich sowohl in der Fachliteratur<sup>96</sup> als auch integriert in der Software des Oligo 4.0-Programmes.

<b>Primer</b>	<b>Richtung</b>	<b>Produkt Länge</b>	<b>Sequenz</b>
<i>p33ING1b</i> Exon 1a	forward	104bp	CTG CCA ACG GGG AGC AGC TC
	reverse		CCG CAT CAG CGA GAC ATT TC
Sonde <i>p33ING1b</i> Exon 1a			6FAM AAC TAT GTG GAG GAC TAC CTG GAC TCC XT p
<i>p47ING1</i> Exon 1b	forward	185bp	GGA CCT GTG CGT CGT TCT CT
	reverse		TGC GCA GCC TTG TAA ACA TT
Sonde <i>p47ING1</i> Exon 1b			6FAM CAT TCA AAA CAG AGC CCC CAA AGC C XT p
<i>ING1</i> Exon 2	forward	160bp	AAG GCC AAG GCG GAG CGA GA
	reverse		TGA GCC CCA CGC ACG AGA AG

**Tabelle 4.1:** Primersequenzen, resultierende PCR-Produktgrößen und LightCycler-Sonden (auch Taqman-Sonden) für die Expressionanalyse Analyse von *ING1* in der Realtime-PCR (6FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) als Fluorophor und XTp (N, N, N, N-tetra-methyl-carboxyrhodamin) als Quencher Erläuterung 4.3.3.1)



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Primerlokalisationen im *ING1*-Gen. Die Linie mit dem Kreuz soll den Spleißvorgang symbolisieren.

#### 4.3.2.1 Interne Expressionskontrollen

Um bei einer Expressionsanalyse beispielsweise eine erhöhte Expression nachweisen zu können, benötigte man Kontrolldaten, die die „basale“ oder auch „Ruhe-Expressionsaktivität“ der Zelle repräsentieren. Hierzu wurden konstitutiv exprimierte Gene, welche idealerweise unabhängig von Zelltyp, der Zellzyklusphase und den äußeren Einflüssen exprimiert wurden, verwendet. Diese Gene, auch Housekeepinggene genannt, sind oft in den Grundstoffwechsel von Zellen eingebunden.<sup>97</sup> Es hat sich allerdings gezeigt, dass Housekeepinggene in unterschiedlichen Geweben Expressionschwankungen aufweisen. Dieses trifft z. B. für die Gene für  $\beta$ -Actin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu<sup>98</sup>. Deshalb verwendeten wir in dieser Arbeit zwei experimentell erprobte Housekeepinggene als Kontrollen, bei denen eine mögliche Beeinträchtigung durch zytotoxische Substanzen nicht bekannt war (s. u.). Die dazu notwendigen Sequenzen und PCR-Bedingungen für diese Analyse wurden uns freundlicherweise von

der Arbeitsgruppe um Prof. Seeger (Pädiatrische Hämatologie/ Onkologie, Charité Campus Virchow, Berlin) zur Verfügung gestellt.<sup>99</sup> Da eine Reaktion von Housekeepinggenen auf zytotoxischen Stress nie völlig auszuschließen ist, wurden in dieser Arbeit zwei Gene aus voneinander unabhängigen Systemen verwendet, um eine möglichst hohe Validität der Kontrolldaten zu gewährleisten (siehe Tabelle 4.2).

Zum Einen wurde das Gen *L13a* („ribosomal protein *L13a*“, *RPL13a*) genutzt, welches ein Protein für die humane ribosomale Untereinheit 60S mit zytoplasmatischer Lokalisation kodiert und der Familie der ribosomalen L13P Proteine angehört<sup>100</sup>. Die zweite Kontrolle war das Gen für  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2M$ ), welches für die kleinere, lösliche Untereinheit des Histokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I kodiert. Der MHC-Klasse-I-Proteinkomplex findet sich auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen und dient der Antigenpräsentation<sup>101</sup>.

Primer	Richtung	Produkt Länge	Sequenz
<i>RPL13a</i>	Forward	221bp	GCG GAT GAA CAC CAA CCC
	Reverse		CGC CCC AGA TAG GGC AAA CT
Sonde <i>RPL13a</i>			5'-FAM CTG CCC CAC AAA ACC AAG CGA GGC C-TAMRA
$\beta_2M$	Forward	75bp	GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG
	Reverse		TCC AAT CCA AAT GCG GCA TCT
Sonde $\beta_2M$			5'-FAM CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TCG ATC CC- TAMRA

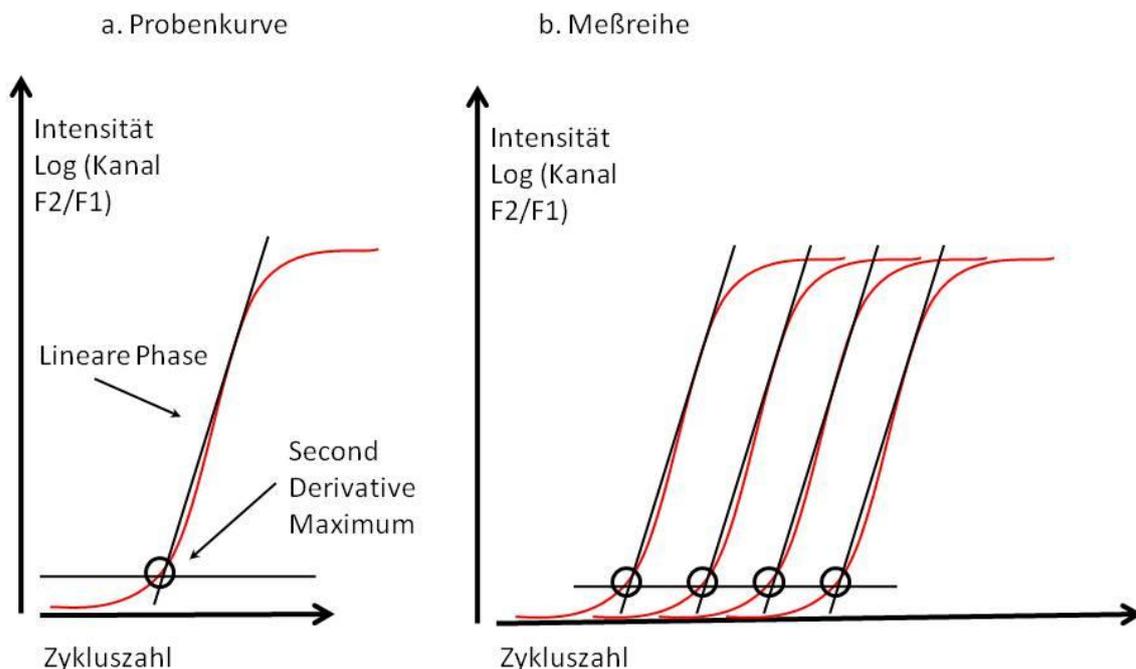
**Tabelle 4.2:** Sequenzen der Primer und Sonden der internen Expressionskontrollen (Housekeepinggene) (6FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) als Fluorophor- und Tetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher Erläuterung (siehe Abschnitt 4.3.3.1))

#### 4.3.3 *Realtime-PCR am LightCycler*

Die Quantifizierung der generierten cDNS-Produkte erfolgte mittels quantitativer PCR am LightCycler. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Sonden oder Farbstoffe, die eine temporäre Bindung der DNS-Sonde an die PCR-Doppelstränge erzeugten, verwendet (siehe Abschnitt 4.3.3.1).

Die aus einer blauen Licht emittierenden Diode (engl. „Light Emitting Diode“; LED, Wellenlänge 470 nm) und Fotozellen zusammengesetzte Messeinheit mit drei Messkanälen F1, 2, 3 (Wellenlänge F1 = grün = 515 nm, F2 = rot = 640 nm, F3 = tiefrot = 705 nm) maß das von den Proben emittierte Lichtsignal und ermittelte durch internen Software-gestützten Vergleich mit einer im Vorfeld erstellten Eichreihe die Konzentration.

Der Verlauf des Signalverhaltens wurde von der Software in einem Diagramm aufgetragen. Hierbei entsprach die Abszisse der Anzahl der abgelaufenen Zyklen. Die Ordinate gab die anwachsende Intensität (in den Kanälen F1/F2) des emittierten Signals an. In der Folge entstand eine S-förmige Kurve mit logarithmischem Wachstum (allosterisches Wachstum) (siehe Abbildung 4.2 a+b). Steuerung und Auswertung der PCR erfolgten mit einer speziellen Software LightCycler Software Version 3.5 (siehe Abschnitt 4.1.6.7).



**Abbildung 4.2:** Verlauf, a. einer Probenkurve und b. einer Messreihe bei einer quantitativen Realtime PCR: auf der x-Achse wird die Zykluszahl abgebildet, die Werte der y-Achse geben die Intensität des Fluoreszenzsignal in logarithmischer Darstellung (Log) wieder. Erläuterungen für "second derivative maximum" im Text (s. u.).

Wie in Abbildung 4.2 b dargestellt, entspricht jede S-Kurve einer PCR-Probe. Je weiter links auf der x-Achse eine Kurve entsteht, desto höher ist der Ausgangsgehalt an cDNS in der Probe.

Für die Bestimmung des Gehaltes von cDNA (respektive der im Experiment durch die Zellen produzierten *ING1*-RNA) standen verschiedene mathematische Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Methode des sogenannten Second Derivative Maximum verwendet. Hierbei wurde der Referenzpunkt zur Konzentrationsbestimmung als Messpunkt nach dem Übergang des unteren Scheitelpunktes der S-Kurve in den linearen Abschnitt definiert. Diese Festlegung des Messpunktes wurde durch die verwendete Software vorgenommen. Die dadurch resultierende definierte Lage des Referenzpunktes ermöglichte den objektiven Vergleich der Proben (siehe Abbildung 4.2 a)

#### 4.3.3.1 Fluoreszenzsonden und -Farbstoffe

Für die PCR-Reaktion wurde neben zwei fluoreszenzmarkierten Sonden (so genannte TaqMan-Sonden) auch SYBR Green (chemisch 2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1*H*-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation) als interkalierender Farbstoff verwendet. SYBR Green, welches dem Reaktionsgemisch beigefügt wurde, lagerte sich in die kleinere der beiden Gruben (engl. „minor groove“) der doppelsträngigen DNS ein und emittierte dabei ein Fluoreszenzsignal.<sup>102</sup>

Die verwendeten Fluoreszenzsonden stellten kurze, komplementäre Oligonukleotide dar, die mit Fluorophoren am 3'-Ende markiert waren und am 5'-Ende einen Quencher aufwiesen. Die Fluoreszenz wurde durch Interaktion von 6-Carboxy-Fluoreszein (6FAM) als Fluorophor und N, N, N, N-tetra-methyl-carboxyrhodamin (Xtp) bzw. Tetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher erzeugt. Die quantenemittierenden Energieeigenschaften des Fluorophors werden vom Quencher bei ähnlichem Wellenlängenprofil gemindert bzw. ausgelöscht. Dieser Vorgang wird auch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) genannt. Durch die Amplifikation des PCR-Produktes wurde der Quencher vom Fluorophor gelöst und dessen inhibierende Wirkung aufgehoben. Es resultierte eine Fluoreszenzaktivität. Das abgegebene Lichtsignal verstärkte sich mit jedem PCR-Zyklus proportional zur Vermehrung des PCR-Produktes.<sup>103, 104</sup>

#### 4.3.3.2 Durchführung der LightCycler Real-Time-PCR

Die PCR-Reaktion erfolgte jeweils in speziell vorgefertigten Glaskapillaren mit einem Endvolumen von 20 µl. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben, die zur statistischen Mittelwertberechnung im Doppelansatz gemessen wurden, wurde eine Probe aus der Eichreihe (siehe 4.3.3.4) mit bekannter Konzentration in der PCR mit untersucht. Für das Reaktionsgemisch wurden 3 µl cDNS, 7,95 µl Reaktionswasser, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP, 0,3 µl BSA, jeweils 0,7 µl forward und reverse Primer mit 0,2 µl Sonde bzw. 1 µl SYBR Green (Verdünnung 1 : 10000) und 0,15 µl PlatinumTaq-Polymerase vermischt.

Die für diesen PCR-Ansatz verwendete Polymerase zeichnete sich durch einen Aktivierungsschritt aus, d. h. dass erst nach einer Aktivierung des Enzyms mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 15 Minuten der Start der PCR-Reaktion ermöglicht wurde, gefolgt von der Annealingsphase für 20 Sekunden, der Elongationsphase bei 72 °C und 30 Sekunden mit einem abschließenden Denaturierungsschritt bei 94°C für 10 Sekunden. Die Wechsel der Temperaturunterschiede erfolgten mit einem Temperaturgradienten von 20°C innerhalb einer Sekunde. Die Reaktion wurde für ca. 60 Zyklen ausgetragen. Am Monitor konnte der Fortschritt der PCR-Reaktion zeitgleich verfolgt werden. Mit Erreichen der Plateauphase wurde die PCR durch Abkühlen auf 35°C terminiert. Die Konzentrationsbestimmung des PCR-Produktes erfolgte unter Verwendung der hinterlegten Eichdatei (siehe Abschnitt 4.3.3.4)

#### 4.3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Eine Kontrolle der aller in dieser Arbeit generierten PCR- Produkte erfolgte durch deren elektrophoretische Auftrennung in einem 2 % Agarosegel. Hierfür wurden 2 g Agarose mit 100 ml 0,6 x TBE vermischt und bei 600 Watt in der Mikrowelle für 2 Minuten bis zur kompletten Gelierung der Agarose erhitzt. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromidlösung wurde das Gel in die Agarosegel-Kammern gefüllt. 5 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl Ladepuffer aufgetragen. Die Gele mit den applizierten Proben wurden bei 180 V für 15 bis 20 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht als sichtbare Banden beurteilt. Für die Einordnung der Größe des PCR-Produktes wurde parallel der Größenstandard pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) aufgetragen. Abschließend erfolgte eine Fotodokumentation des Gels oder das in den Banden befindliche Amplifikat wurde einer entsprechenden Weiterverarbeitung zugeführt.

#### 4.3.3.4 Erstellen der Eichreihen für die Real-Time-PCR

Die Konzentrationsbestimmung des PCR-Produktes basiert in der LightCycler-PCR-Reaktion auf zuvor erstellten Eichreihen. Diese stellen Verdünnungsreihen mit absteigender Konzentration des Amplifikats für jedes PCR-Produkt dar (siehe Abschnitt 4.3.2). In verschiedenen LightCycler-PCR-Ansätzen wurden für jede Verdünnungsstufe S-Kurven (siehe Abschnitt 4.3.3.4) erstellt. Diese dienten als Grundlage zur Konzentrationsbestimmung. Der Softwaregestützte Vergleich der Proben mit der als Eichdatei gespeicherten internen Referenz ermöglichte die Bestimmung der Konzentration (Abbildung 4.3). Um eine ausreichende Menge an aufgereinigtem PCR-Produkt für diese Eichreihen zu erhalten, erfolgten mehrere Arbeitsschritte: nach dem Generieren des PCR-Produktes und der Visualisierung durch ein Agarosegel wurden die Banden (bei bekannter PCR-Produktgröße) aus dem Gel ausgeschnitten und einer Gel-Aufreinigung entsprechend den Herstellerangaben unterzogen (QIAEX II Kit, QIAGEN).

In den folgenden Arbeitsschritten wurden die PCR-Produkte in einen Bakterienvektor eingebracht, in Bakterien vervielfältigt und wieder extrahiert. Der Prozess und Hintergründe wird in den Abschnitten 4.3.3.4.1 bis 4.3.3.4.5 beschrieben.

#### 4.3.3.4.1 **Klonieren**

Ziel des Klonierens ist die Vervielfältigung eines spezifischen PCR-Produktes aus den o.g. Expositionsexperimenten unter Verwendung des bakteriellen Vektors. Diese Methode ermöglicht eine einfache Vervielfältigung in der Real-Time-PCR zu bestimmenden Amplifikaten zur Erstellung einer Eichreihe (siehe Abschnitt 4.3.3.4).

Grundlage ist die exponentielle Vermehrungsfähigkeit von Bakterien und damit des PCR-Produktes. Plasmide entsprechen extrachromosomaler ringförmiger doppelsträngiger DNS, die einige tausend bis mehrere hunderttausend Basenpaare umfassen können. In Bakterien führen diese häufig notwendigen DNS-Sequenzen zu Antibiotikaresistenz und können durch Plasmidtransfer zwischen den Bakterienzellen ausgetauscht werden.

Das in dieser Arbeit verwendete TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet, nach einem initialen Ligationsschritt in den ampicillinresistenten pCR 2.1-TOPO 3.9 kb Vektor erfolgte die Transformation durch OneShot Elektroporation. Alle Arbeitsschritte erfolgten in einer sterilen Arbeitsumgebung unter sterilen

Bedingungen unter Verwendung steriler Reaktionsgefäße, hitzesterilisierte Materialien und einem Bunsenbrenner.

#### 4.3.3.4.2 Ligation

Bei der Ligation katalysierte eine Topoisomerase die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Dabei wurden das zu amplifizierende PCR-Produkt (*ING1*- Amplifikate: siehe 4.3.2) und der Plasmidvektor zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft.

Für den Reaktionsansatz wurden 4,0 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 1 µl verdünnte Salzlösung und 1 µl Vektor pCR 2.1-TOPO 3.9 kb miteinander vermischt, und das Volumen auf 10 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch rasches Abkühlen auf 4°C terminiert.

#### 4.3.3.4.3 Transformation

Elektrokompetente *E. coli*-Bakterienzellen waren in der Lage, in einem elektrischen Feld ein Plasmid aufzunehmen. Durch ladungsbedingte Wechselwirkungen zwischen Plasmid-Vektor und Bakterienmembran in einem elektrischen Feld und in der Pufferlösung wurden diese Komponenten gegeneinander beschleunigt, so dass der Plasmid-Vektor bei einem Zusammenstoß mit der Bakterienmembran in das Zytoplasma eindringen konnte. Für diesen Vorgang, der als Elektroporation bezeichnet wird, wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl *E. coli*- Zellen vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde in spezielle Elektroporatoroküvetten überführt und anschließend in einen Elektroschlitten eingesetzt (Electro Cell Manipulator). Entsprechend den Herstellerangaben wurde bei einer Spannung vom 2,0 kV, einem Widerstand von 150 Ohm und einer Kapazität von 25 µF ein kurzer Stromimpuls appliziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium in das Reaktionsgefäß und Inkubation unter Schütteln bei 37°C für 30 Minuten (Thermomixer). Dieser Ansatz konnte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

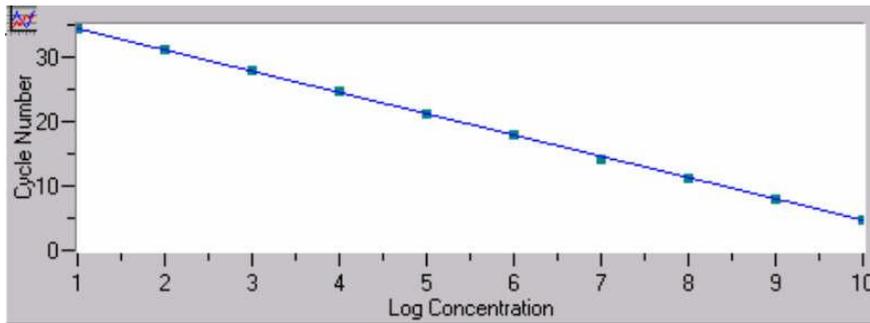
#### 4.3.3.4.4 Anzüchten der Bakterienklone

Zum Gießen von Agarplatten wurden 15 g Agarose in 1 l LB-Medium gelöst und anschließend autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Ampicillinlösung in die Flaschen mit dem geschmolzenen Gel, das Ausgießen und das Erkalten in Petrischalen. Nach Beschichten des Agars in den Petrischalen mit 20 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) wurden 200  $\mu$ l des E. coli-Stockes auf die bei 37°C vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37°C inkubiert. Das im Plasmid-Vektor kodierte Enzym  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichte plasmidtragende Bakterienklone die Hydrolyse des X-Gal-Substrats. In der Folge war eine farbliche Unterscheidung transfizierter von nicht transfizierten Klonen möglich. Klone, welche das Plasmid nicht aufgenommen hatten, konnten aufgrund fehlender plasmidkodierter Ampicillinresistenz nicht kolonisieren. Parallel wurden positive Klone einer Test-PCR unterzogen und auf das Vorhandensein des Amplifikats für *ING1* überprüft. Hierzu wurde eine sterile Pipettenspitze in den Klon eingebracht und in einen PCR-Reaktionsansatz überführt. Die Kontrolle der Probe nach der RCR erfolgte in einer Gelelektrophorese (siehe 4.3.3.3). Positive Bakterienklone wurden steril abpipettiert und in 2 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin aufgenommen. Anschließend wurden die Proben bei 37°C für 12 Stunden und bei 150 rpm in Dunkelheit bebrütet.

#### 4.3.3.4.5 Plasmidextraktion

Die Plasmidpräparation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung des QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) mit im Set enthaltenen gebrauchsfertigen Lösungen. Hierbei erfolgte nach Lyse der Bakterienzellen und mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten die Pelletierung der Plasmide durch Zentrifugation und anschließende Elution des eingedampften Pellets in 30  $\mu$ l sterilem Wasser. Dieses wurde bei -80°C bis zur endgültigen Verwendung gelagert.

Die Konzentration der extrahierten und fertiggestellten Plasmide wurden fotometrisch gemessen (siehe Abschnitt 4.2.10) und die Anzahl der Kopien errechnet<sup>100</sup>. Zur Erstellung der Eichreihen wurde eine Ausgangskonzentration der Plasmidlösung von  $10^9$  Kopien/ $\mu$ l in 100  $\mu$ l Gesamtvolumen generiert. In neun weiteren 500  $\mu$ l-Reaktionsgefäßen wurden mit 40  $\mu$ l 1 x TE-Puffer und 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O vorbereitet. Schrittweise wurden jeweils 10  $\mu$ l aus dem höher konzentrierten Gefäß in das nachstehende pipettiert und somit eine logarithmische Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration bis zur Verdünnungsstufe von  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l erstellt.



**Abbildung 4.3:** Darstellung der Konzentration der Eichreihen (x-Achse) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (y-Achse) nach der Messung im LightCycler (Quelle: Screenshot aus [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))

#### 4.4 Proteinanalyse

##### 4.4.1 *Proteinextraktion und -konzentrationsbestimmung*

Die bei - 80°C gelagerten Zellpellets (siehe 4.2.6 und 4.2.7) wurden auf 4°C aufgetaut und nach Zugabe von 1000 µl NonSDS-RIPA-Puffer homogenisiert. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 15000 U/min und 4°C erfolgte das Sedimentieren des Zelldetritus. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß zur weiteren Konzentrationsbestimmung überführt.

Grundlage der fotometrischen Konzentrationsbestimmung von Proteinen war die Methode nach Bradford. Hierbei kam es nach Bindung des kupferionenhaltigen Farbstoff "Coomassie Brilliant Blue" mit gelösten Proteinen zur Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm, die fotometrisch bestimmt werden konnte.

Um die Proteinkonzentration anhand der Extinktionswerte ermitteln zu können, wurde zum Vergleich eine Standardreihe mit gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) in einer aufsteigenden Konzentration erstellt. Mithilfe einer grafischen Darstellung der BSA-Standardreihe in einem Diagramm mit der Extinktion auf der Ordinate und der bekannten BSA-Konzentration auf der Abszisse ließ sich die entsprechende Proteinkonzentration der Probe zuordnen.

Die Proteinlösung wurde in einer Verdünnung von 1 : 20 bzw. 1 : 40 mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. In einem 15 ml Falconröhrchen wurden 1 ml Bradford-Essay-Farbstoff und 4 ml ddH<sub>2</sub>O vermischt und jeweils 100 µl Proteinverdünnungen im Verhältnis 1 : 20 bzw. 1 : 40 zugegeben. Nach Inkubation des Lösungsansatzes bei Raumtemperatur für 15-30 Minuten wurde 1 ml der Probe in

Einmalkunststoffküvetten gegeben und bei 595 nm fotometrisch gemessen. Der gemessene Extinktionswert bei 595 nm wurde mit dem BSA-Graphen abgeglichen und so die Proteinkonzentration abgelesen.

Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte anhand der Formel:

$\mu\text{g (Proteinlysate)} / 100 \mu\text{l} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnung} \times 0,001 = \text{Proteingehalt in mg/ml}$  (Faktor: 10; Verdünnung: 20 bzw. 40)

#### 4.4.2 *Bestimmung der Proteinexpression (Westernblot)*

Die biochemische Methode und der Begriff des Westernblot wurden erstmals 1981 von Burnette eingeführt<sup>103</sup>. Proteine konnten entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Ioneneigenladung der Proteinmoleküle ermöglichte eine Beschleunigung im Trägermaterial (z. B. SDS-Polyacrylamidgel- Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel). Die Geschwindigkeit der Proteine stand in direktem Verhältnis zur erzeugten Feldstärke und der Ionenladung der Moleküle. Das Wanderungsverhältnis wurde unter anderem auch durch die Molekülgröße und die Beschaffenheit des Trägermaterials beeinflusst.

Die derart separierten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und gebunden.

Unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper erfolgte die Visualisierung. Ein Antikörper (Primärantikörper) band an einem spezifischen Epitop am Protein. In einem zweiten Schritt band ein fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), dessen Spezifität sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtete. Das Signal konnte fototechnisch sichtbar gemacht werden. Die Intensität des Signals kann Rückschlüsse auf die Proteinmenge liefern.

#### 4.4.3 *Elektrophorese / Transfer*

Für die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungen wurde das NuPage-Gelelektrophorese-System entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Elektrophoresekammern bestehen aus einer größeren, äußeren und einer kleineren, inneren Kammer, die durch das Elektrophoresegel voneinander getrennt sind.

Die innere Kammer wurde mit 1x MOPS-Laufpuffer aufgefüllt und zusätzlich mit 500µl Antioxidans zur Vermeidung der Degradierung der Proteine versetzt. Die äußere Kammer dient als Kühlung um die elektrische Widerstandswärme abzuleiten.

Im Anschluss an die Proteinmessung (siehe Abschnitt 4.4.1) wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Für die Elektrophorese wurden jeweils 30-180 µg Protein eingesetzt. Diesem Ansatz wurden 6,25 µl 4 x Ladepuffer und 1 µl reduzierendes Agens zugefügt. Zum Erreichen des Gesamtvolumens von 25 µl jeweils wurde der Ansatz mit Aqua dest. aufgefüllt. Alle Arbeitsschritte erfolgten zum Schutz der Proteineluate vor Degradierung eisgekühlt.

Die derart vorbereiteten Proteinlösungen wurden nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten mit einem Gesamtvolumen von 25 µl in die jeweiligen Taschen des Elektrophoresegels appliziert. Als Größenstandard für die Molekulargewichte wurde 5 µl Magic Marker (Firma Sigma) verwendet. Bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 125 mA (entspricht einer Leistung von ca. 100 W) erfolgte bei einer ca. einstündigen Elektrophorese die Separation der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht.

Nach Öffnen der Gelkammern erfolgte die Überführung des Gels auf eine Nitrozellulosemembran. Dieses „Sandwich“ wurde erneut in die Elektrophoresekammer (Transferkammer) eingelegt und für ca. 2 Stunden bei 30-35 V, 170 mA (ca. 100 W) erneut dem elektrischen Feld ausgesetzt. Während das Gel zur Kathode ausgerichtet wurde, wurde die Nitrozellulosemembran zur Anode gerichtet. Bei diesem Schritt kam es zum Transfer der unterschiedlich großen Proteine auf die Nitrozellulosemembran.

Zur internen Kontrolle des Transfers wurden die Gele anschließend mit "Coomassie-Brilliant-Blue" gefärbt, die Membran mit Ponceau-Rot. Dadurch konnte eine visuelle Kontrolle der geboteten Proteine erreicht werden und die Qualität der vorangegangenen Arbeitsschritte abgeschätzt werden.

#### 4.4.4 *Immunochemische Detektion*

Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde mit 10 % Magermilchpulver inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der *ING1*-Proteine mittels spezifischer Antikörper. Als interne Kontrolle wurde der Antikörper gegen das

Protein des  $\beta$ -Actin-Housekeepinggen eingesetzt (siehe Abschnitt 4.3.2.1) In einem ersten Inkubationsschritt wurde die Membran mit einem spezifischem monoklonalen *ING1*-Antikörpergemisch (CAb I-IV) (Primärantikörper)<sup>104</sup> beschichtet und 10 % Magermilchpulver für mindestens 12 Stunden inkubiert.

Das Antikörpergemisch CAb I-IV richtet sich gegen *ING1*-Epitope beim Menschen und einigen Nagetieren, die Proteinisoformen  $p33^{ING1b}$  und  $47^{ING1c}$  können detektiert werden.<sup>104</sup>

Nach mehreren Waschschritten mit T-PBS 1 x wurden überschüssige Antikörper entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann mit einem biotinierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper für 1 Stunde in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 in 5 % Magermilchlösung inkubiert. Nach weiteren Waschschritten der Membran mit T-PBS 1 x zur Entfernung überschüssiger Antikörper erfolgte die Inkubation der Membran mit Extravidin in einer Verdünnung 1:3000 in 5 % Magermilchlösung für 1 Stunde. Zur Verwendung kam das „ECL Western blotting detection system“ nach Angaben des Herstellers. Das an den Sekundärantikörper gebundene Biotin wurde hierbei reduziert und unter Verwendung der ECL-Reaktionslösung aktiviert. Die durch diese chemische Reaktion hervorgerufene Lumineszenz wurde durch einen Röntgenfilm detektiert und nach ca. 10- bis 20-minütiger Belichtung visualisiert.

#### 4.5 Zellzyklusanalyse durch die Durchflusszytometrie (engl. „Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS)

Bei der FACS-Untersuchung wurden durch einen Laserstrahl die in einem Flüssigkeitsstrom befindlichen Zellen analysiert und quantifiziert. Eine große Anzahl von Zellen konnte beispielsweise mit Hilfe von der Licht-Streuung, der Fluoreszenz und der Bestimmung der Absorption Messungen analysiert werden.<sup>105, 106</sup>

Grundlage der Methode war die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Markern, welche sich an die spezifischen Oberflächenmoleküle oder im Erbgut (DNS) der Zelle anlagerten. Die Zellen durchflossen in einer Einzelsuspension dünne Kapillaren, während durch einen Laserstrahl die gebundenen Farbstoffe erregt wurden und ihr Energieniveau änderten. Diese Änderung wurde durch Fotodetektoren registriert und in einem speziellen Computersystem ausgewertet. Zusätzliche Informationen wie Zellgröße und Granularität wurden durch Lichtbeugung und -streuung erlangt.

Die jeweiligen Einzelinformationen z. B. aus Färbeverhalten und Zellgröße konnten in gegenseitige Relation gebracht werden und somit Aussagen über z. B. Zellzyklus gemacht werden.

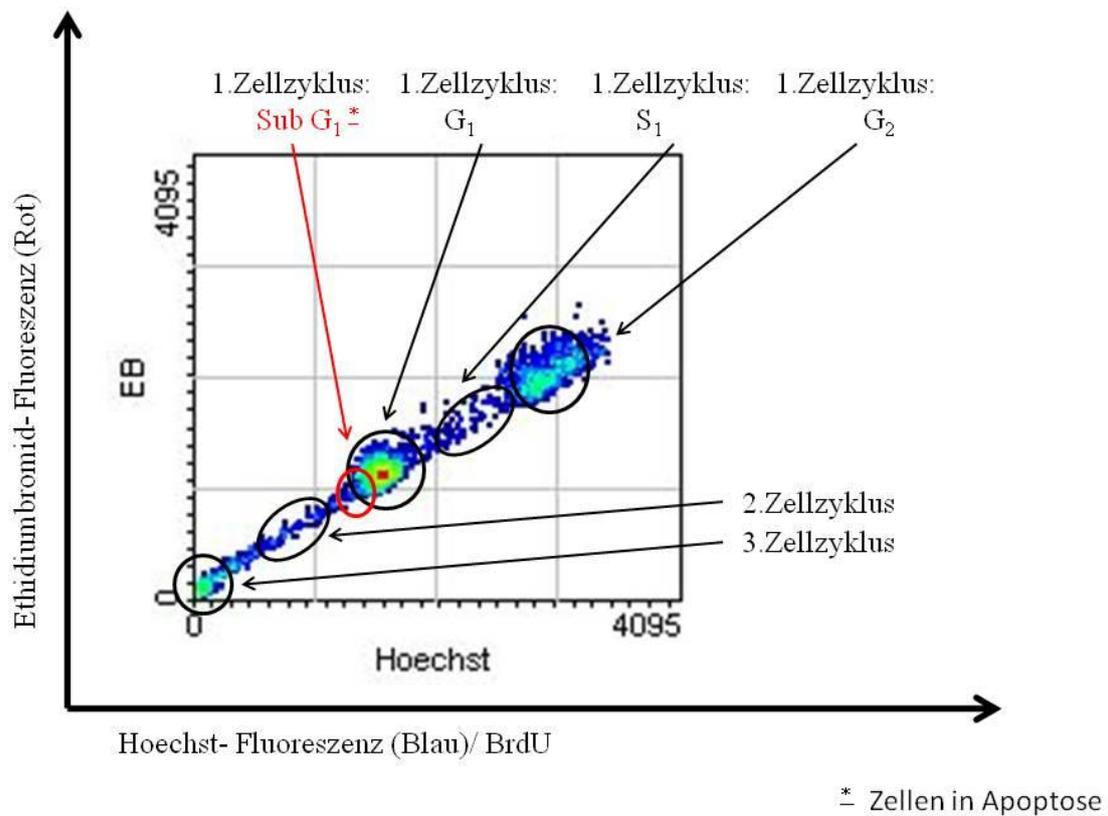
Für die Zellzyklusanalyse in dieser Arbeit wurde die Methode nach D. Gilligan<sup>107</sup> verwendet. Im Zellzyklus verändert sich der DNS-Gehalt in der Zelle. Grundprinzip war die Verwendung von 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU), welches nach Passagierung der Zellkulturen vor Beginn des Experimentes in einem Volumen von 100 µl dem Zellmedium zugegeben wurde. BrdU wurde als Thymidinanalogon während der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut.

Nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin (bzw. Vincristin oder Gammastrahlen; siehe Abschnitte 4.2.6 und 4.2.7) und der Färbung des Eluats mit Hoechst 33258 und Ethidiumbromid wurden die Proben der Analyse zugeführt. Der Farbstoff Hoechst 33258, chemisch Bis-Benzimidazol, band nicht an BrdU aber an vorhandene Thymidin- und Adenin-reiche Regionen der "minor groove" der DNS und emittierte bei einer Wellenlänge von 478 nm bläuliches Licht. Mit jedem Zellzyklus, der durchlaufen wird, verringert sich das blaue Signal, da sich auch BrdU eingebaut hatte. Durch die jeweiligen Färbungen konnten die Zellen den entsprechenden Zellzyklusphasen zugeordnet werden und in sogenannten „dot plots“, d. h. Zellhaufen, softwaregestützt abgebildet und somit einer Zellphase (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase) zugeordnet werden.

Historisch wurde die Darstellung erstmals durch Ormerod und Kubbies in einem Diagramm dargestellt<sup>108</sup>. Ähnlich stellt die Auswertungssoftware (Abbildung 4.4) die Zyklen in der Form eines „dot plots“ dar.

Zellen in der subG<sub>1</sub>-Phase, die im Zellzyklus einer Apoptose entsprechen, konnten identifiziert und in ihrem prozentualen Anteil vergleichend zu den in anderen Zyklusphasen befindlichen Zellen abgebildet werden (Abbildung 4.4).

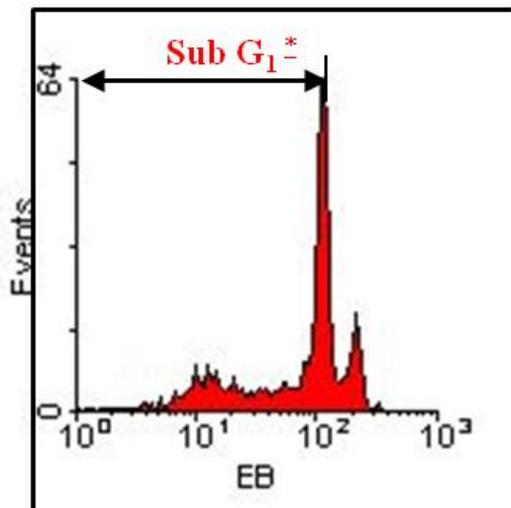
Ethidiumbromid emittierte bei einer Wellenlänge von 620 nm rötliches Licht und interkalierte mit allen Basen der doppelsträngigen DNS ohne Beeinflussung von BrdU. Hier lag die DNS fragmentiert vor (enzymatischer Abbau), was sich in der logarithmischen Darstellung visualisieren ließ. Die Quantifizierung der subG<sub>1</sub>-Phase war einfacher in einem Zytogramm darzustellen (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.4:** Darstellung des Zellzyklus mit der Auswertungssoftware (FlowMax, Version 2.3, Cytometry software; WinMDI, Version 2.8)

Die Pfeile zeigen auf die jeweiligen Zyklusphasen. Die Färbung der „dots“ (Punkte) visualisiert die Anzahl der Zellen in diesem Stadium (von blau - wenige Zellen über grün zu rot - viele Zellen).

Diese Methode wurde im Labor der Autoren des Artikels <sup>108</sup> durchgeführt (Klinik für Strahlentherapie, Charité-Universitätsmedizin-Berlin; Campus Mitte (Berlin)).



\* - Zellen in Apoptose

**Abbildung 4.5:** Beispiel für die Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellen, die sich in Apoptose befinden. (Zytogramm)

Zellen mit einem EB-DNS-Signal unter  $10^2$  sind Zellen in der Apoptose (SubG<sub>1</sub>-Phase), da die EB-Färbung einen geringen DNS-Gehalt (nicht intakte Zelle entspricht zerstörter DNS) auf der Ordinate ausweist (Ethidiumbromid-Färbung)

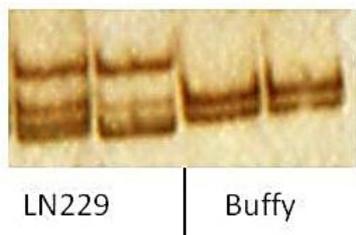
#### 4.6 Mutationsanalyse für TP53

Die 11 bekannten Exone von *TP53* (einschließlich der UTR-Region, d. h. nicht kodierender Genabschnitte) wurden mittels Single-stranded-conformation-polymorphism- (SSCP-) Analyse auf Mutationen untersucht. Die verwendeten Primersequenzen sind in der Tabelle 4.3 gelistet. Wie im Abschnitt 4.2.2 beschrieben besaß *LN229* eine Mutation des *TP53*-Genes. Da Gilomzelllinien auch in der Kultur eine hohe Mutationsrate besitzen, wurde die eigene „Variante“ auf Mutationen untersucht.

Die SSCP-Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis von Basenveränderungen in der einzelsträngigen DNS<sup>109, 110</sup>. Die Methode nutzt die Eigenschaft einzelsträngiger DNS, unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einer Gelelektrophorese eine gefaltete Konfiguration auszubilden. Aus einer alleinigen Änderung einer singulären Base in der DNS-Sequenz resultierte in einer veränderten Sekundärkonformation und verändertem Laufverhalten im Gel. Zur Kontrolle kamen sogenannte "buffy coats", DNS aus Leukozyten gesunder Blutspender, zum Einsatz.<sup>111</sup>

Für die Analyse wurden 0,35 mm dicke, nicht-denaturierende Polyacrylamidgelle hergestellt. Hierfür wurden 70 ml Acrylamidlösung in einem Verhältnis von 1:49 zwischen Bisacrylamid und 12 % Acrylamid mit 20 µl Temed und 180 µl 20 % Ammoniumpersulfat polymerisiert. Die

Lösung wurde zwischen zwei silanisierte Glasplatten mit einem Gelkamm zur Ausbildung von Taschen gegossen. Nach vollständiger Polymerisation der Gele sowie nach einem erneuten termischen Denaturierungsschritt zur Trennung der DNS-Stränge wurden die Proben mit einem Ladepuffer in die Geltaschen appliziert und das Gel dann in eine Elektrophoresekammer gespannt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 3 W für 16 Stunden. Bei aberrantem Laufverhalten der Proben erfolgte ein Vergleich mit der Leukozyten-DNS. Zeigte diese ein vergleichbares Laufverhalten, wurde die Beobachtung nicht als Veränderung registriert. Unterschiedliches elektrophoretisches Wanderungsverhalten von Tumor- und Buffy coat-DNS wurde als Mutation oder Polymorphismus interpretiert. Die Abbildung 4.6 illustriert eine solche Aberration in der Silberfärbung des Gels.



**Abbildung 4.6:** SSCP-Gel nach der Elektrophorese und Silberfärbung mit den Primern des Exons 4 *TP53*: Links das aberrante Laufverhalten der Zelllinie LN229, rechts Buffy coat (Lymphozyten) als Normalkontrolle (siehe auch Abschnitt 4.6.1).

Kodierende Regionen:			
Exon	Locus	Orientierung	Sequenz
2	<i>TP53ex2-f</i>	forward	ATC CCC ACT TTT CCT CTT GC
	<i>TP53ex2-r</i>	reverse	TCC CAC AGG TCT CTG CTA GG
3	<i>TP53ex3-f</i>	forward	CAT GGG ACT GAC TTT CTG C
	<i>TP53ex3-r</i>	reverse	GGG ACT GTA GAT GGG TGA A
4a	<i>TP53ex4a-f</i>	forward	TGA CTG CTC TTT TCA CCC ATC
	<i>TP53ex4a-r</i>	reverse	AGA TGA CAG GGG CCA GGA G
4b	<i>TP53ex4b-f</i>	forward	CTC CTG GCC CC TGT CAT CT
	<i>TP53ex4b-r</i>	reverse	CCC CTC AGG GCA ACT GA C
5a	<i>TP53ex5-1f</i>	forward	TTT GCC AAC TGG CCA AGA CC
	<i>TP53ex5-1r</i>	reverse	TCA GTG AGG AAT CAG AGG CC
5b	<i>TP53ex5-2f</i>	forward	GTA CTC CCC TGC CCT CAA CAA
	<i>TP53ex5-2r</i>	reverse	TTC CAC TCG GAT AAG ATG CTG
6	<i>TP53ex6f</i>	forward	AGG CCT CTG ATT CCT CAC TG
	<i>TP53ex6r</i>	reverse	AGA GAC CCC AGT TGC AAA CC
7	<i>TP53ex7f</i>	forward	GGC CTC ATC TTG GGC CTG TG
	<i>TP53ex7r</i>	reverse	GTG TGC AGG GTG GCA AG TG G

8	<i>TP53</i> ex8f	forward	AAT GGG ACA GGT AGG ACC TG
	<i>TP53</i> ex8r	reverse	ACC GCT TCT TGT CCT GC TTG
9	<i>TP53</i> ex9-f	forward	CCT TTC CTT GCC TCT TTC CT
	<i>TP53</i> ex9-r	reverse	CCA CTT GAT AAG AGG TCC CAA G
10	<i>TP53</i> ex10-f	forward	CTC CCC CTC CTC TGT TGC T
	<i>TP53</i> ex10-r	reverse	AGG GGC TGA GGT CAC TCA C
11	<i>TP53</i> ex11-f	forward	TGT CAT CTC TCC TCC CTG CT
	<i>TP53</i> ex11-r	reverse	CAG TGG GGA ACA AGA AGT GG
<b>Nicht kodierende Regionen</b>			
1	<i>TP53</i> ex1-f	forward	AAG TCTA GAG CCA CCG TCC A
	<i>TP53</i> ex1-r	reverse	ACC CCC AAA CTC GCT AAG TC
11_2	<i>TP53</i> ex11_2-f	forward	TAA AAT GGG GTA AGG GAA GA
	<i>TP53</i> ex11_2-r	reverse	CCC TTC TGT CTT GAA CAT GA
11_3	<i>TP53</i> ex11_3-f	forward	GTC TAC CTC CCG CCA TAA AA
	<i>TP53</i> ex11_3-r	reverse	TCC TAC TCC CCA TCC TCC TC
11_4	<i>TP53</i> ex11_4-f	forward	GAC TTC CAT TTG CTT TGT CC
	<i>TP53</i> ex11_4-r	reverse	GCC AGC AT TTC ACA GAT ATG
11_5	<i>TP53</i> ex11_5-r	forward	CCT CAC TGT TGA ATT TTC TC
	<i>TP53</i> ex11_5-f	reverse	TGA CAA CTC CCT CTA CCT AA
11_6	<i>TP53</i> ex11_6-f	forward	TCT ACA GTT GGG CAG CTG GT
	<i>TP53</i> ex11_6-r	reverse	AAG ATC ACG CCA CTC CAC TC
11_7	<i>TP53</i> ex11_7-f	forward	CCC TGG AGG ATT TCA TCT CT
	<i>TP53</i> ex11_7-r	reverse	AAC CTG TGG TCC CAG CTA CT
11_8	<i>TP53</i> ex11_8-f	forward	GGA GTG GAG TGG CGT GAT CT
	<i>TP53</i> ex11_8-r	reverse	AGG CTG AGA CAG GTG GAT CG
11_9	<i>TP53</i> ex11_9-f	forward	CTC CTG GGC TCA GGC GAT CC
	<i>TP53</i> ex11_9-r	reverse	AGC CTG CAC TGG CGT TCA CC

**Tabelle 4.3:** Sequenzen der Primer für die Mutationsanalyse von *TP53* in LN229 GBM-Zellen. Zur Nomenklatur der Primer: ex + Nr.: Nr. des Exons, *f*: „forward“-Primer, *r*:- “reverse“-Primer.

#### 4.6.1 Silberfärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Glasplatten voneinander separiert und die Gele einer Silberfärbung unterzogen. Diese Methode, erstmals 1981 beschrieben, ist eine spezifische und sensitive, nicht-radioaktive Darstellung von DNS in Polyacrylamidgelen. Die Detektionsgrenze lag bei 1 bis 10 pg/mm<sup>2</sup> DNS. Grundlage des Nachweises war die unspezifische Anlagerung von Silbernitrat an die DNS und anschließende Anfärbung des Produktes durch Reduktion mit Formaldehyd<sup>111, 112</sup>.

Die Gele wurden in verschiedenen Färbeschritten bearbeitet: nach initialer Fixation mit 10 % Ethanol und einem Zwischenwaschschritt mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte eine pH-Einstellung mit Salpetersäure für ca. 30 Sekunden. Nach einem erneuten Waschschritt mit ddH<sub>2</sub>O wurde eine 2 %-ige Silbernitratlösung aufgetragen und für ca. 30 Minuten mit dem Gel unter Lichtschutz inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Entwicklung mit Natriumkarbonat und Formaldehyd, bis Banden sichtbar waren. Die Entwicklung wurde durch erneute Zugabe von 10%-iger Essigsäure gestoppt. Nach einem erneuten Waschschritt mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel auf Filterpapier gezogen und auf einem Vakuum-Geltrockner für ca. 2 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Gele beschriftet und ausgewertet.

#### 4.6.2 *Isolierung der Einzelstrang-DNS aus dem Polyacrylamidgel*

Aberrante Banden wurden aus dem nassen Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Diese waren entweder Mutation oder Polymorphismus und wurde zur endgültigen Charakterisierung sequenziert. Die Probe wurde in 100 µl Dilutionspuffer gegeben und für 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Die weitere Extraktion erfolgte entsprechend der Anleitung des QIAEX II-Kit.

#### 4.6.3 *Aufreinigung der Proben und Sequenzierung*

Als Grundlage der Sequenzierungsanalyse diente die Methode nach Sanger et al.<sup>113</sup>, deren Grundprinzip einer PCR-Reaktion mit induzierten Kettenabbrüchen durch den Einsatz von ddNTPs ohne 3'-Hydroxygruppe entspricht. Diese ddNTPs ohne 3'-Hydroxygruppe verhindern die Elongation der DNS-Kette.

Der verwendete Sequenzierungsansatz wurde doppelt ausgeführt und enthielt entweder 0,5 µl 20 µM forward bzw. 0,5 µl 20 µM reverse Primer (Tabelle 4.3), 2–4 µl spezifische DNS-Fragmente Probe aus der SSCP-Analyse, Taq-Polymerase, 1,5 µl 5 x Buffer (bestehend aus 400 mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9), "BigDye" mit fluoreszenzmarkierten ddNTP (inklusive ddNTPs ohne 3'-Hydroxygruppe, 2',3'-Dideoxynukleotide) und Taq Polymerase. Die PCR mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Minuten wurde anschließend für 25 Zyklen durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 15 s, primerspezifisches „Annealing“ für 10 s und einer Elongation für 4 min bei 60°C. Das PCR-Produkt wurde am Ende der Zyklen auf 4°C abgekühlt.

Bei dieser Cycle-sequencing-PCR entstanden durch das Gemisch aus normalen dNTP und ddNTP (2',3'-Didesoxynukleotide) fluoreszenzmarkierte DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge.

Zur Aufreinigung des Cycle-sequencing-Produktes erfolgte die Filtration durch Sephadex gefüllte Spin-Röhrchen. Hierfür wurde für ca. 1 Stunde je Probe 55 mg Sephadex in 750 µl ddH<sub>2</sub>O gequollen. Anschließend wurden 750 µl des Gemisches in Spin-Röhrchen pipettiert und für 2 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Das Eluat in wurde anschließend einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen, bei 65°C in Thermomixer eingetrocknet und in 2 µl Ladepuffer eluiert.

In dem verwendeten semiautomatischen Sequenzierer wurden die DNS-Fragmente elektrophoretisch separiert. Das Gel lief entlang einem stationären Laser, der durch die jeweiligen Terminatoren (ddNTP mit Farb-Markierungen) optisch angeregt und das Signal rechnergestützt verarbeitet. Die folgende Darstellung erläutert das Prozedere.

Für die Herstellung des 4,5 % Poylacrylamidgels wurden 18 g Harnstoff, 7,5 ml 30%-ige Acrylamidlösung, 6 ml 10 x TBE und 23 ml ddH<sub>2</sub>O vermischt, anschließend nach Vakuumfiltration mit 35 µl Ammoniumpersulfat und 20 µl Temed zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die Proben zeitlich versetzt appliziert, als Laufpuffer diente 1 x TBE. Vor der Probenapplikation wurden diese bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und auf Eis gelagert. Mit der im System verwendeten Software Data Collection Version 1.2 und des Data Analysis Programms Version DI-7.1, (Applied Biosystems), dem zusätzlichen Editierungsprogrammen Chromas (Version 1.1 Technelysium), Editseq (Version 5.0 DNASTar Inc.) und Seqman II (Version 5.0 DNASTar Inc.) konnten die Sequenzen der Proben mit den Referenzproben (Buffy-coat-Proben) verglichen werden.

Eine Gegenüberstellung mit der Originalsequenz aus der Internetdatenbank (<http://genome.ucsc.edu>) wurde zusätzlich durchgeführt. Beide sequenzierten DNS-Stränge aus dem Doppelansatz mit forward bzw. reverse Primer wurden ausgewertet, um nicht lesbare Bereiche zu überbrücken bzw. auch Daten aus dem Gegenstrang zu erhalten. Durch die Darstellung in dem unter Abschnitt 5.1 sichtbaren Chromatogramm wurde das Ergebnis der Editierung

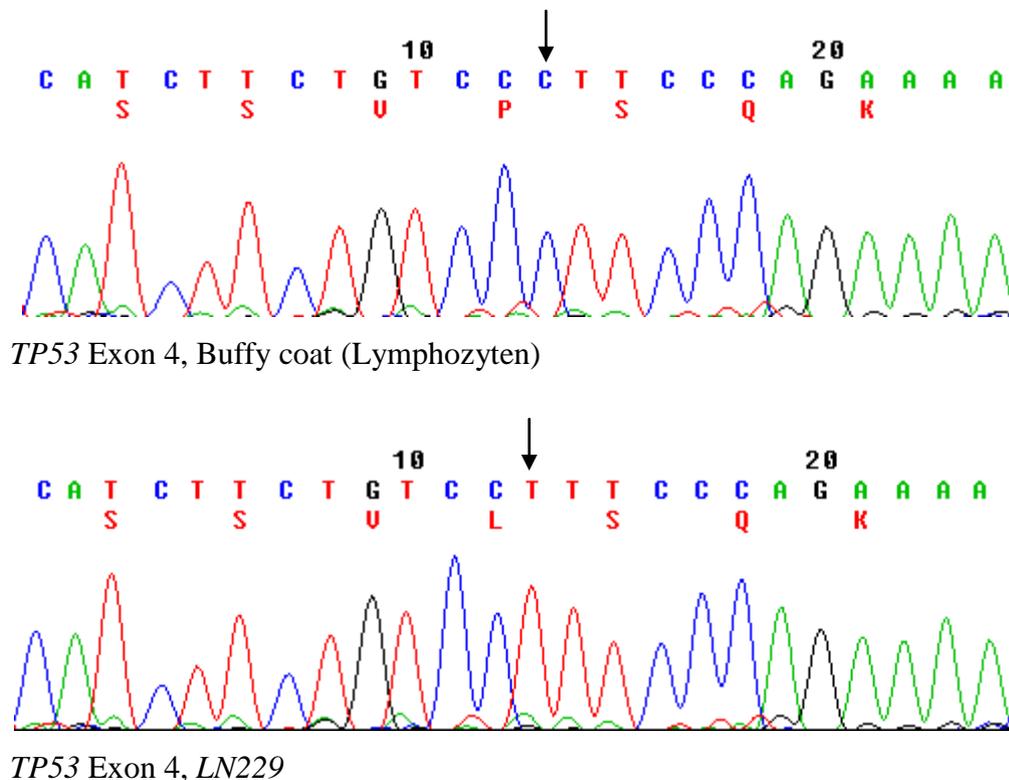
erkennbar. Als Mutation oder Polymorphismus wurden nur Veränderungen der Basenabfolge in beiden komplementären Strängen gegenüber der Originalsequenz angesehen.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Ergebnis der Mutationsanalyse

Wir untersuchten die DNS der Zelllinie *LN229* in den Exonen 1 bis 11 des Genes *TP53* auf somatische Mutationen. Wir konnten eine Mutationen im Exon 4 mit Basenaustausch im Codon 98 an Position 1 des Sequenzierungsproduktes von Cytosin zu Thyminid (C→T) nachweisen. Die resultierende Änderung in der Proteinsequenz von Prolin zu Lysin wurde bereits von Ishi et al. beschrieben<sup>77</sup> und entsprach dem vorveröffentlichten Mutationsstatus für *TP53*.

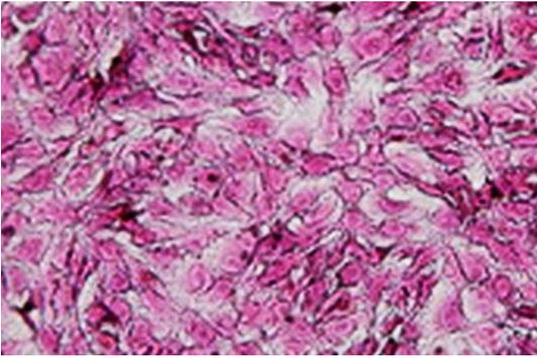
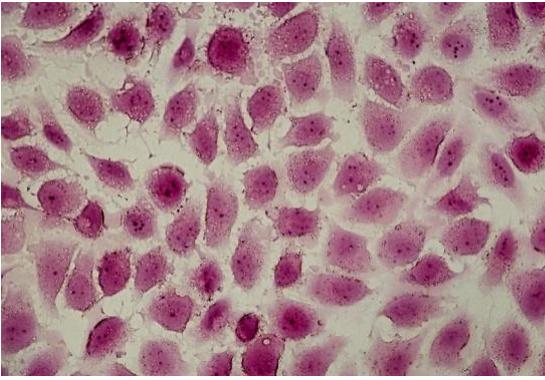
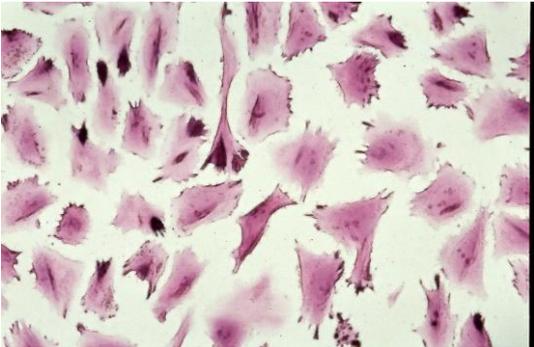
Abbildung 5.1 zeigt eine Chromatographie mit Austausch der Base Cytosin gegen Thyminid.



**Abbildung 5.1:** Chromatogramm der *TP53*-Mutation in der *LN229*- Zelllinie im Vergleich zur Buffy coat-Kontrolle (Lymphozyten); dargestellt ist in der oberen Reihe der Basenaustausch von Cytosin durch Thyminid (Pfeil) und in der unteren Reihe der Proteinaustausch von Prolin durch Lysin.

## 5.2 Morphologische Kontrolle der Zellschädigung nach zytostatischer Behandlung

Ein weiterer Bestandteil der Untersuchungen war die morphologische Überprüfung der Zellen im Ausgangszustand vor, während und nach zytostatischer Behandlung mit CDDP und VCR. Die Zellen wurden unter dem Zweiphasenlichtmikroskop nach HE – Färbung mit 100-facher Vergrößerung fotodokumentiert (Abbildung 5.2).

<p><u>LN229-GBM-Zellen vor Behandlung</u></p> 	<p>LN229 Zellen bildeten nach 2 Tagen Wachstum einen konfluenten Zellverband von polygonalen Zellen mit großem Zellkern und prominenten Nucleoli.</p>
<p><u>LN229-GBM-Zellen nach Behandlung mit Cisplatin (CDDP)</u></p> 	<p>Nach 8-stündiger Behandlung mit CDDP (5 mM) zeigten die Zellen vermindertes Wachstum, Zellablösung von der Unterlage, Abrundung der Zellen mit Kondensation des Zytoplasmas, Anschwellen der Zelleiber und Reduktion der Zell-Zellverbindungen.</p>
<p><u>LN229-GBM-Zellen nach Behandlung mit Vincristin (VCR)</u></p> 	<p>Nach 8-stündiger Behandlung mit VCR (0,1 mM) kam es zu einer Verringerung des Zellwachstums mit sägezahnartig konfigurierten Zellwänden, rückläufigen Zell-Zellkontakten, Anschwellen der Zelleiber und vermehrten Zellen in Lösung.</p>

**Abbildung 5.2** Morphologische Kontrolle der Zellschädigung nach zytostatischer Behandlung (100-fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Das morphologische Bild der Zellschädigung war für das jeweilige schädigende Agens charakteristisch. Beispielsweise lockerte sich der Zellverband unter VDR ebenfalls auf, die Zellen runden sich nicht ab, sondern bildeten durch Verlust des Zytoskelettes eine Art Sägezahnmuster.

### 5.3 *ING1* mRNA-Expressionverhalten nach DNS-Schädigung durch CDDP

#### 5.3.1 *Unterschiedliche Expression der ING1-Isoformen nach DNS-Schädigung durch CDDP in LD50-Dosierung*

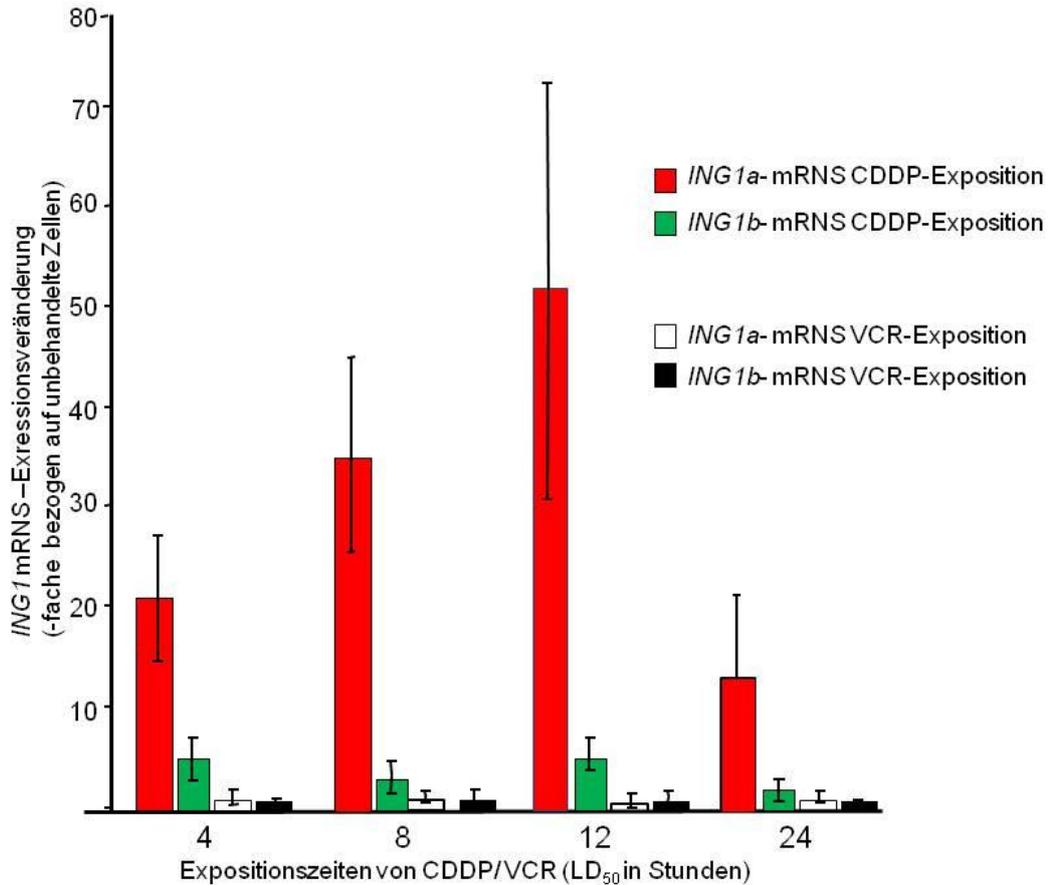
Nach zahlreichen Behandlungen der Zelllinie LN229 mit CDDP und VCR erfolgte bei mindestens drei Experimenten die Messung der mRNA-Expression der *ING1*-Spleiss-Varianten mittels Realtime-PCR im LightCycler (siehe Abschnitt 4.3).

Nach Behandlung mit CDDP konnte, verglichen mit dem Nullstundenniveau, ein Maximum der  $p33^{ING1b}$ -mRNA-Expression nach 8 Stunden Behandlungsdauer nachgewiesen werden. Hier wurde eine ca. 20-fache Expression gegenüber der unbehandelten Probe erreicht (siehe Abbildung 5.3). Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit CDDP auf 12 bzw. 24 Stunden führte zu einem reproduzierbaren Abfall der *ING1b*-Expression (im Vergleich zum 8-Stunden-Niveau).

Für die mRNA von  $p47^{ING1a}$  wurde ein Expressionsmaximum nach 12 Stunden Behandlung mit CDDP erzeugt. Die mRNA-Expression erreichte mehr als das 50-fache in Bezug auf die unbehandelte Probe.

Durch die Behandlung mit Vincristin konnte zu keinem Behandlungszeitpunkt eine Erhöhung des  $p33^{ING1b}$ - oder  $p47^{ING1a}$ -mRNA-Expressionsniveau gezeigt werden. Sowohl im Abgleich mit dem Housekeeping-Gen  $\beta_2$ -Mikroglobulin als auch dem *RPL13a*-Gen waren diese Ergebnisse reproduzierbar (siehe Abbildung 5.3).

Die Experimente wurden drei- bis viermal wiederholt. Die Messreihen mit dem gemeinsamen *ING1* Exon 2 zeigten keine als signifikant einstuftbaren Expressionsänderungen und flossen somit nicht in die Auswertungen ein.



**Abbildung 5.3:** Darstellung des Expressionsprofils nach DNS-Schädigung durch CDDP (VCR=Kontrolle) mit LD<sub>50</sub>: Dargestellt ist das Expressionsverhalten der mRNA-ING1-Spleißvarianten der LN229-Zellen mit den entsprechenden Behandlungszeiten nach der Messung in der Realtime-PCR. (modifiziert nach <sup>86</sup>).

### 5.3.2 Unterschiedliche mRNA-Expression der ING1-Spleißvarianten nach DNS-Schädigung durch unterschiedliche CDDP-Dosierungen

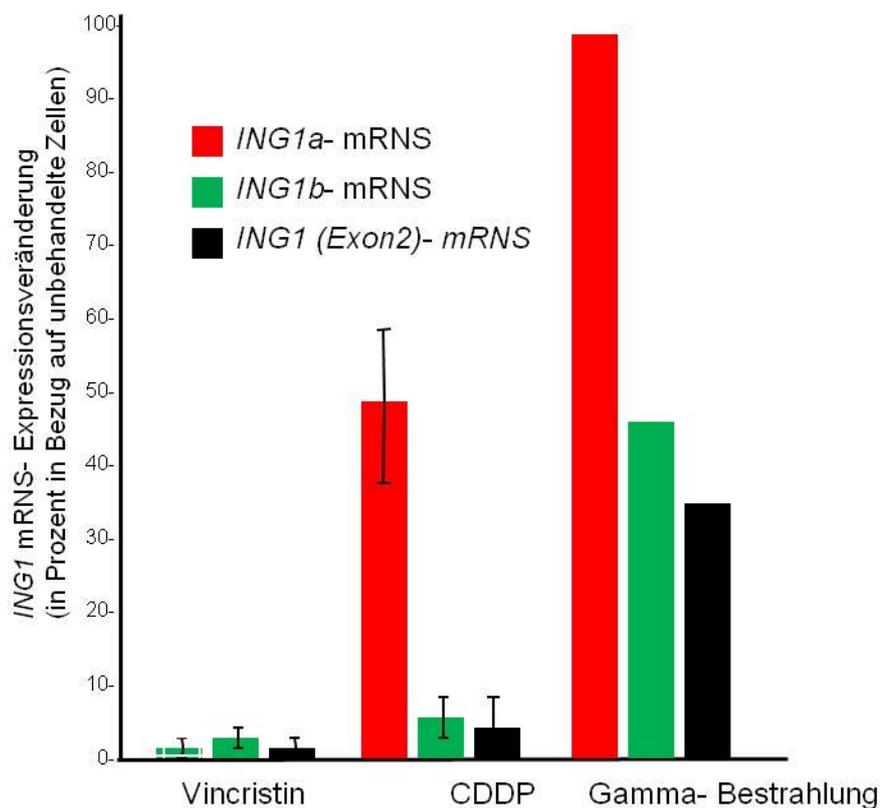
In einem weiteren Versuchsaufbau wurden die Zellen mit der halben LD<sub>50</sub>-CDDP-Dosis wie im Abschnitt 4.2.6 inkubiert und geerntet. Ziel war es, eine mögliche Dosisabhängigkeit bezüglich der möglichen *ING1*-Antwort darzustellen.

Die Expressionsanalysen ergaben, dass die *ING1*-Isoformen  $p33^{ING1b}$ -mRNS und  $p47^{ING1a}$ -mRNS nicht signifikant in ihrem Expressionsniveau erhöht waren. Dem gegenüber zeigten sich bei einer Verdopplung der LD<sub>50</sub>-Dosis für CDDP deutlich erhöhte mRNA-Niveaus für das Expressionsmaximum von  $p33^{ING1b}$  nach 8 Stunden bzw. nach 12 Stunden für  $p47^{ING1a}$ . Somit ließ sich eine Dosis-abhängige Expressionsantwort der *ING1*-Spleißvarianten ableiten.

Eine Halbierung der Vincristindosierung bzw. auch eine Verdoppelung der Dosis ergab für die Spleißvarianten  $p33^{ING1b}$ -RNS und  $p47^{ING1a}$ -RNS keine Veränderung des Expressionsniveaus.

### 5.3.3 $p47^{ING1a}$ -mRNS wird nach Gamma-Bestrahlung bevorzugt induziert

Nach Bestrahlung mit 20 Gy Gesamtdosis konnten gesteigerte Expressionsniveaus für  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  gezeigt werden, die jeweiligen Level lagen über denen der Behandlung mit Vincristin. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung zeigte sich ein Maximum der Expression der Spleißform  $p47^{ING1a}$  mit einer ca. 100fach erhöhten Expressionsrate über dem Normalniveau, während  $p33^{ING1b}$  ein Expressionsmaximum um das Dreifache nach 12 Stunden Ruhephase aufwies, im Vergleich mit der Nullkontrolle (unbehandelte Zellkultur) (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4:** Vergleich der  $ING1$ -mRNS Expression in  $LN229$ -GBM-Zellen nach achtstündiger DNS-Schädigung durch Gamma-Bestrahlung (20 Gy) oder CDDP-Behandlung bzw. respektive Mitosehemmung mit VCR (jeweils Expositionsdosis LD50) nach der Messung in der

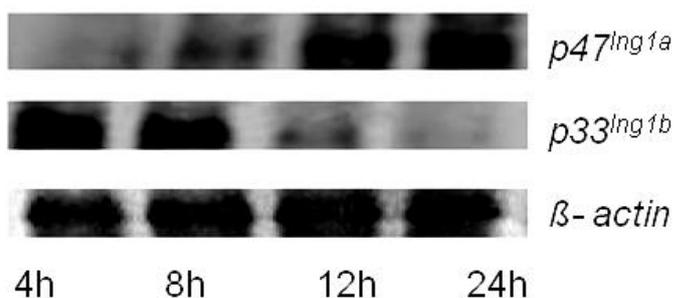
Realtime-PCR (modifiziert <sup>86</sup>). Die Experimente wurden drei- bis fünfmal für die Behandlung mit CDDP und VCR wiederholt (einmal mit Gamma-Strahlung).

#### 5.4 DNS-Schädigung durch CDDP beeinflusst die Proteinspiegel der ING1-Isoformen $p33^{ING1b}$ und $p47^{ING1a}$ in malignen Gliomzellen unterschiedlich

Unter dem Ergebnis, dass eine DNS-Schädigung im Experiment eine Veränderung in der Expression der *ING1*-mRNS induziert, wurde eine Expressionsanalyse durch einen Westernblot durchgeführt. Die in Abschnitt 5.3 dargestellten Transkriptionsprofile ließen sich auch auf der Translationsebene, das heißt bei der Proteinexpression, in zeitlich ähnlicher Form nachweisen.

Die Abbildung 5.5 zeigt, dass unter dem Einfluss von Cisplatin der  $p47^{ING1a}$  Protein-Spiegel deutlich erhöht ist. Dies entspricht auch der vorher beschriebenen Induktion dieser Isoform auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitt 5.3)

Auch eine schwächere Expression von  $p33^{ING1b}$  unter Cisplatineinwirkung konnte entsprechend der Induktion auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Vermutlich wird die Translation der  $p33^{ING1b}$  Isoform negativ beeinflusst.

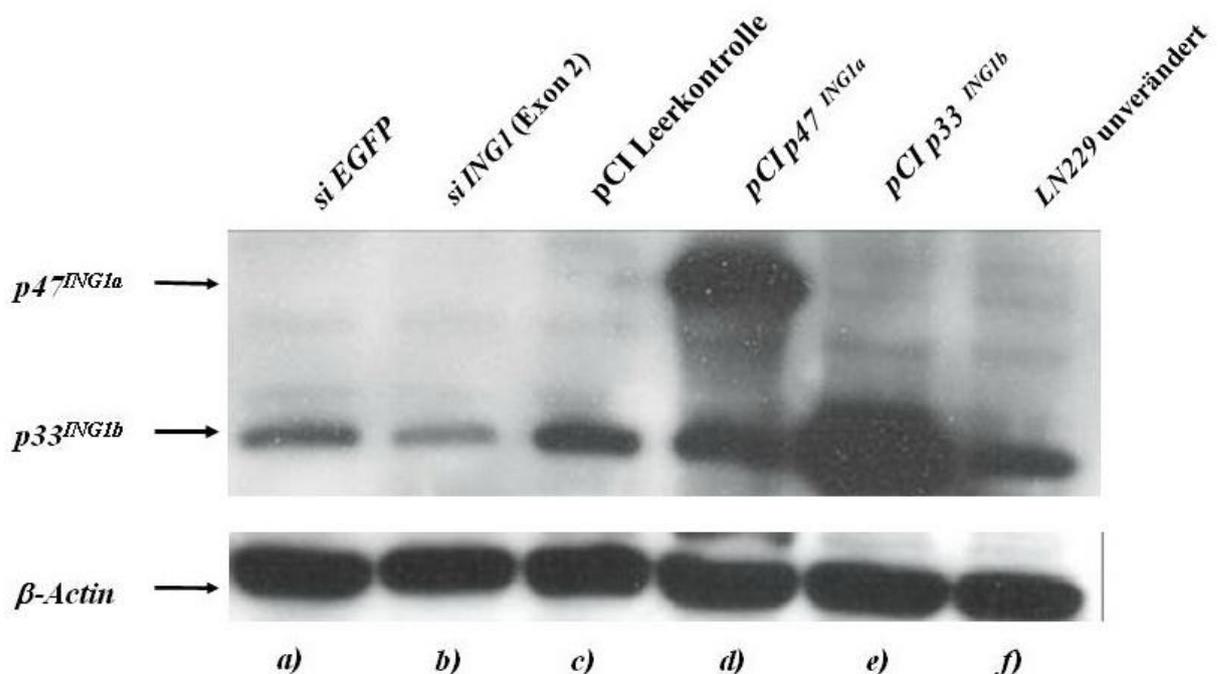


**Abbildung 5.5:** Expressionsanalyse der *ING1*-Isoformen nach Behandlung mit der LD<sub>50</sub>-Dosis von CDDP. Dargestellt ist die Westernblotanalyse der Proteinextrakte von LN229-Zellen mit den entsprechenden Behandlungszeiten. Verwendet wurden die im Abschnitt 4.4 beschriebenen Cab I-IV-Antikörper für die Visualisierung der Isoformen  $p47^{ING1a}$  und  $p33^{ING1b}$  (obere Streifen). Als Kontrolle diente das Hauskeepinggen  $\beta$ -Actin (unterer Streifen), um den gleichmäßigen Einsatz der Proteinmenge nachweisen zu können. (modifiziert nach <sup>86</sup>)

#### 5.4.1 Reduzierte *ING1*-Proteinspiegel in malignen Gliomzellen nach Transfektion mit siRNS

Ausgehend von der Hypothese, dass eine reduzierte *ING1*-Expression das Wachstums- und Apoptoseverhalten von GBM-Zellen nach Cisplatinbehandlung verändert (siehe Abschnitt 3), wurden die Zellen mit siRNS gegen das gemeinsame Exon 2 aller *ING1*-Isoformen transfiziert (siehe Abschnitt 4.2.3).

Die Abbildung 5.6 zeigt einen Westernblot für die Zelllinie, die mit einer gegen das Exon 2 gerichteten siRNS behandelt wurde. Hier konnte keine Expression der *ING1*-Isoformen  $p47^{ING1a}$  und  $p33^{ING1b}$  dargestellt und der „knock down“ bestätigt werden.



**Abbildung 5.6:** Darstellung der Verminderung der *ING1*-Proteine nach Transfektion von LN229-Zellen mit *siING1(Exon2)*: Dargestellt wird die „Knock down-Zelllinie“ *siING1(Exon 2)* [b] ohne eine Expression beider Isoformen  $p47^{ING1a}$  und  $p33^{ING1b}$ . Die Bahn [f] zeigt den Westernblot einer unveränderten Zelllinie LN229.

Als Vergleich wurde *siEGFP* [a] bzw. si-RNS-Leervektor *pCI Leerkontrolle* [c] als methodische Kontrolle gegenübergestellt eine Expression beider Isoformen geschah nicht. Als Gegenkontrolle wurden in den Vektor *pCIp47<sup>ING1a</sup>* und *pCIp33<sup>ING1b</sup>* [d und e] (siehe Absatz 4.2) eingeschleust und so eine Überexpression erreicht. (modifiziert nach <sup>86</sup>)

## 5.5 Zellzyklus unter dem Einfluss der Zytostatika/ „*ING1* knock down“ führt zu einer Beschleunigung der Apoptose der Gliomzellen in Reaktion auf CDDP-induzierte DNS-Schäden

Um die Auswirkung des „*ING1*-knock down“ zu analysieren, wurden die Expositionsversuche mit CDDP wiederholt, um bei einer FACS-Zellzyklusanalyse den Apoptoseanteil gegenüber den anderen Zellzykluszuständen zu bestimmen. Die Zellpopulation in der SubG<sub>1</sub>-Phase entsprach diesem Anteil (siehe 4.5.).

Die Abbildung 5.7 a und b stellen die Zytogramme für Behandlung mit bzw. ohne CDDP dar. Die mit dem *siEGFP-RNS*-Vektor transfizierten Zellen fungierten als Kontrolle gegenüber den Zellen, welche als „*ING1*-knock down“-Zellen mit einem *siING1*-RNS-Vektor versehen wurden. Die Zellen wurden gegebenenfalls 12 Stunden mit CDDP behandelt (LD50) und anschließend nach 0, 24, 48 oder 72 Stunden Erholungszeit analysiert.

In Abbildung 5.7 a ließ sich darstellen, dass die SubG<sub>1</sub>-Phase nach 48 Stunden CDDP-Exposition der *siEGFP*-RNS-transfizierten Zellen (Bild Nr. 7) mit einer Fraktion vom 64 % erreicht wurde, verglichen mit den unbehandelten Zellen befanden zum gleichen Zeitpunkt 5 % in der SubG<sub>1</sub>-Phase. Dagegen erreichten die *siING1*- Zellen, dargestellt in der Abbildung 5.7 b, die SubG<sub>1</sub>-Phase nach 12 Stunden mit einer Anteil von 61 %, während sich die nicht behandelten Zellproben in 8 % in der SubG<sub>1</sub>-Phase befanden (Bild 6). Der Vergleich mit den *siEGFP*-RNS-transfizierten Zellen (Abbildung 5.7 a Bild 6) stellte einen SubG<sub>1</sub>- Anteil von 8 % dar.

Dieses Ergebnis zeigte einen beschleunigten Eintritt der Zellen mit reduzierter *ING1*-Expression in die Apoptose.

Zusätzlich zeigte sich, dass *siING1*- Zellen im Zytogramm zwei deutliche Spitzen erzeugten, während in der *siEGFP*-Kontrolle nur eine Hauptspitze aufwies wurde. Vermutlich befand sich ein wesentlicher Teil der „*ING1*-knock down“-Zellen in der G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>-Phase, ein Hinweis auf einen beschleunigten Zellzyklus, der eine schnellere Induktion von Apoptose als Reaktion auf CDDP ermöglichte.

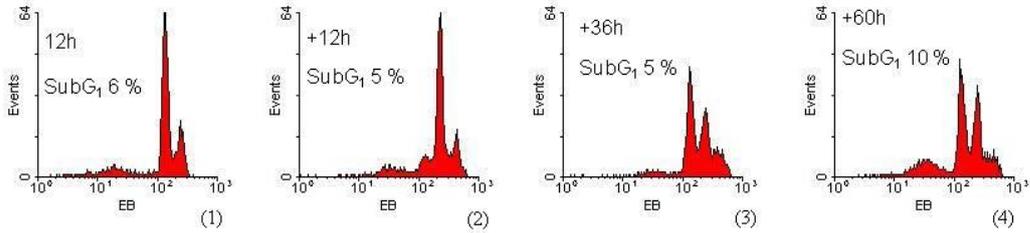
Zusammen mit der bevorzugten Induktion von *p47<sup>ING1a</sup>* bei cisplatin-erzeugten DNS-Schäden, führte ein Defizit dieser Isoform zur einen schnelleren Zellwachstum. Eine weitere Interpretation

ist auch, dass „*ING1*-knock down“-Zellen in der G2-Phase verzögert wurden, da die Chromatinkondensation während der Mitose beeinflusst wurde (siehe Abschnitt 2).

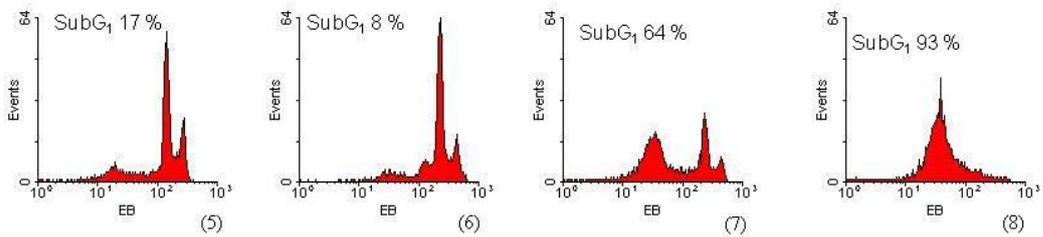
Die experimentellen Daten wurden in drei unabhängigen Analysen bestätigt.

Kinetik der Kontrollen mit *siEGFP* veränderten LN299-Zellen

Ohne CDDP-Exposition:



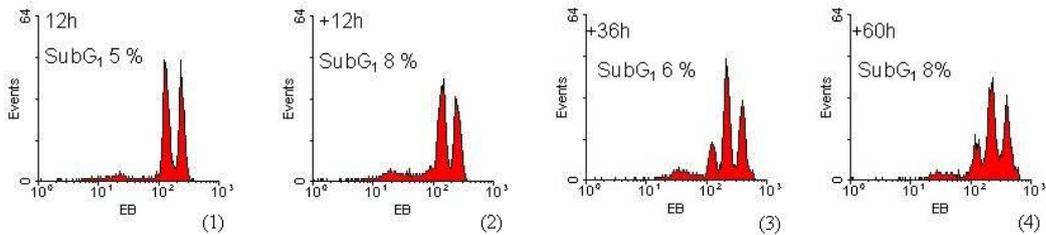
CDDP-Exposition:



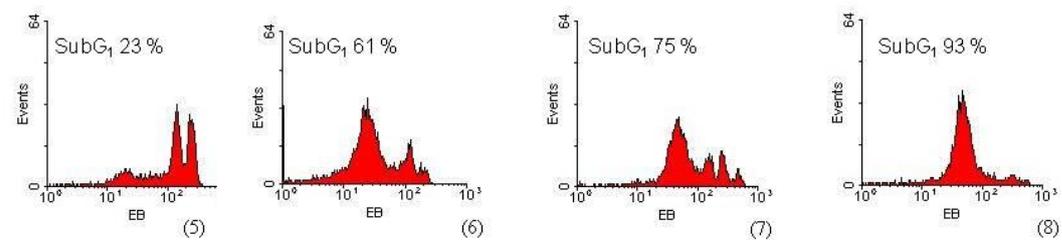
a)

Kinetik der Kontrollen mit *siING1* veränderten LN299-Zellen

Ohne CDDP-Exposition:



CDDP-Exposition:



b)

**Abbildung 5.7:** Kinetik der veränderten *LN299*-Zellen („*ING1* knock down“ und *siEGFP*-Kontrolle): Die Zytogramme zeigten den DNS-Gehalt der Zellen in logarithmischer Darstellung nach Ethidiumbromidfärbung (EB) unter BrdU/ Hoechst-Einfluss nach der Durchflusszytometrie (siehe 4.5). Die Bilder 1-4 in den Darstellungen a) und b) stehen für die Versuche ohne CDDP bzw. die Bilder 5-8 mit CDDP-Exposition. Zellen mit einem DNS-Gehalt unter  $10^2$  befinden sich in Apoptose, da intakte Zellen ein vergleichbar höheres Volumen hatten. Die Spitzen in den Bildern a) 2, 4, 6 stehen beispielsweise für die Zellen in der  $G_2$  oder  $G_1$ -Phase (von rechts nach links). (modifiziert nach <sup>86</sup>)

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Wertung der Methoden

#### 6.1.1 *Die Zellkulturmethode*

Bei der Zellkultur handelt es sich um ein Versuchsmodell, das Zellverhalten *in vitro* abbildet, welches mitunter kein reelles Abbild in einem komplexen Organismus geben kann. Die Kulturbedingungen, das Wachstumsverhalten, die Ernährungslösungen oder andere Steuerungsmechanismen wie CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft u. ä. können sich in der Kultur von Abläufen im lebenden Organismus (*in vivo*) unterscheiden. Ebenso kann eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen die Ergebnisse beeinflussen.<sup>114</sup> Possinger konnte eine vergleichbare Wirksamkeit einer zytostatischen Behandlung zwischen einer *in vitro*- und *in vivo*-Testung belegen<sup>115</sup>.

Bei der Durchführung der Experimente wurden konfluent wachsende Zellen verwendet. Problematisch könnte die Interpretation der Ergebnisse aus gewonnenen Daten bei Experimenten in Zellkultur gewertet werden. Da das Wachstum in den Kulturflaschen durch die Kontaktinhibition gestört wird und der programmierte Zelltod in den kultivierten Zellen ausgelöst werden könnte. Häufiges Passagieren oder ein Kultivieren von Zellen über längere Zeiträume kann jeweils zu einer Selektion von Zellen aufgrund ihrer genotypischen oder phänotypischen Eigenschaften führen. In der Folge unterscheiden sich die Zellen von denen, die aufgrund ihrer Charakteristika ursprünglich für die Experimente ausgewählt wurden.

Um solche systematischen Fehler zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit jedes Experiment unabhängig vom anderen mindestens 2-mal wiederholt und anschließend jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Der Einfluss eines kulturspezifischen Selektionsdrucks wurde durch die Verwendung einer Zellkultur erreicht, welche nur geringe Zeitabstände zwischen den Passagen aufwies.

#### 6.1.2 *Die LN229-Zelllinie*

Maßgeblich wird das Ergebnis durch die Auswahl der Modellzelllinie LN229 bestimmt, die exemplarisch für die Eigenschaften eines GBM stehen sollte.

Unsere Mutationsanalyse bestätigte die vorbeschriebene Mutation im *TP53*-Gen im Codon 98<sup>77</sup>.

Andere Autoren<sup>81</sup> räumen ein, dass die Zellen über die Zeit einen genetischen Drift vollziehen können und Gene in auch standardisierten Zelllinien ständiger Veränderung unterliegen. Die Mutationsrate in Tumorzellen mit hoher Wachstumsrate ist generell als erhöht anzusehen<sup>116</sup>. Wichtig war diese Erkenntnis vor allem, weil mit einem Modell gearbeitet werden sollte, welches mit dem aus vorangehenden Arbeiten vergleichbar ist.

### 6.1.3 *Die Arbeit mit Nukleinsäuren*

Die Gewinnung und Verarbeitung von RNS ist sehr viel aufwendiger als die der DNS, da RNS fragiler ist als DNS und zusätzlich den ubiquitär vorhandenen RNAsen ausgesetzt ist.

Für eine Expressionsanalyse wurde die totale RNS verwendet, um eine Verfälschung durch die alleinige Verwendung der mRNA zu vermeiden, da durch posttranskriptionelle Regulierungsmechanismen der Gehalt von mRNA für die einzelnen *ING1*-Isoformen verändert werden kann.

Speziell mRNA steht im Zellzyklus nur für kurze Zeit zur Verfügung. Autoren schätzen ihre funktionelle Halbwertszeit auf ca. 2 min. Diese wird nicht nur durch die Geschwindigkeit ihrer Generation sondern auch durch ihren Abbau bestimmt<sup>66, 75</sup>.

Das Tragen von Einmalhandschuhen, die Verwendung eines gesonderten Pipettensatzes und eigens für den Umgang mit RNS bestimmter Plastikmaterialien wie spezielle Reaktionsgefäße o. ä. und ein gesonderter RNS-Arbeitsplatz ist eine Grundvoraussetzung für ein effektives, RNase-freies Arbeiten. Daher wurde diese Arbeitsweise im Rahmen dieses Projektes strikt beibehalten.

### 6.1.4 *Die PCR-Techniken*

Das Detektionslimit für ein PCR-Produkt liegt maximal bei 2-10 Kopien. Es ist abhängig von der Auswahl der Primer und dem Target und nur minimal von der Auswahl der Sonden. Das Detektionslimit für eine Realtime-PCR unter Verwendung von Taqman-Sonden liegt bei 10-50 Kopien, bei SYBR Green dagegen bei einem Limit von 200-400 Kopien. Spezifische Sonden sind in der Beschaffung sehr kostspielig und für die Fragestellung war das Erreichen von einem De-

tektionslimit unter 200 Kopien nicht notwendig. Große Unterschiede zwischen den beiden Methoden (SYBRGreen und den spezifischen Sonden) waren im Rahmen der Arbeit und Zielstellung nicht feststellbar, so dass die Realtime-PCR mit beiden Markern gleichwertig durchgeführt werden konnte.<sup>117</sup>

Die unterschiedlichen Primer besitzen unterschiedliche Reaktionsoptima, welche durch die sequenzspezifischen Wechselwirkungen bestimmt werden. Die Basenzusammensetzung der Primer muss folgender Anforderung genügen: der G/C-Gehalt sollte bei ca. 60 % liegen. Das hat folgende Begründung:

Die Annealingtemperatur  $T_a$  liegt normalerweise zwischen 40°C und 60°C und ist abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers sowie der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur  $T_m$ .

Für Primer bis zu einer Länge von etwa 20 Nukleotiden findet sich bei Mülhardt<sup>94</sup> eine einfache Formel zur Berechnung von  $T_m$ :

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T})^{94}$$

Mit der Formel nach Rychlik et al. (1990) kann aus  $T_m$  die optimale  $T_a$  ermittelt werden:

$$T_{a_{\text{opt}}} = 0,3 \times T_{m_{\text{Primer}}} + 0,7 \times T_{m_{\text{Produkt}}} - 14,9.^{96, 117}$$

Aber auch die Kinetik der Darstellung in der LightCycler-Software kann zwischen den Spleißvarianten Unterschiede zeigen, wenn z. B. der Anstieg des Graphen flacher oder steiler verläuft, so dass die Verwendung von sequenzgleichen Eichreihen für die Wertung der verschiedenen Amplifikate zwingend nötig war. Die Plasmidform der Amplifikate können die Kinetik ebenfalls beeinflussen. Da nur eine signifikative Expressionsveränderung dargestellt werden sollte, ist dieses Phänomen als gleichbleibender systematischer „Störfaktor“ in allen Messungen gleich und verzerrt die Aussage nicht.

Eine weitere Fehlerquelle liegt bei der Herstellung der Eichreihen. Nach jedem Verdünnungsschritt ist eine gute Vermischung der Probe notwendig und die Proben sind mindestens 15 Minuten nach jedem Schritt stehen zu lassen. Bei Verdünnungen bis zu 10<sup>2</sup>/µl oder gar 10/µl ist ande-

renfalls mit einem zu großen Fehler zu rechnen. Oft muss die Erstellung mehrfach wiederholt werden, da sich in der Überprüfung mit dem LightCycler zumeist in den niedrigen Konzentrationen Ungenauigkeiten zeigen. Im Fall dieser Arbeit war eine Verdünnung bis zu  $100^2/\mu\text{l}$  ausreichend und diese wurde auf diesen Tiefstwert beschränkt.<sup>117</sup>

#### 6.1.5 *Die Proteinanalyse-Techniken*

Bei einem Westernblot handelt es sich um eine qualitative und semiquantitative Bestimmung spezifischer Proteine in einem Zelllysate. Dementsprechend handelt es sich eher um die Abschätzung einer Expression als um eine exakte Mengenbestimmung, die mit dieser Methode nicht möglich ist. Besonders die Abschätzung der Isoform  $p47^{ING1a}$  war bei insgesamt geringer Expression des Proteins auf den Film schwierig. Für die gewünschte Aussage in dieser Arbeit ist die Wahl dieser Methode jedoch angemessen. Entsprechend wurde auf eine Software-gestützte Dichtebestimmung der Banden in dieser Arbeit verzichtet.

#### 6.1.6 *Die Reduktion der ING1-Expression in LN229-Zellen mittels siRNS*

Trotz stabiler siRNS-Transfektion der Zellen zeigte sich in der Westernblotanalyse nach mehreren Passagierungen der transfizierten Zellen, dass diese ihre ursprünglichen *ING1*-Proteinspiegel zurückbildeten. Es ist demnach wahrscheinlich, dass sich die noch in der Kultur befindlichen, nicht transfizierten Zellen trotz dem Einsatz von Puromycin weiter vermehrt und die siRNS-transfizierten Zellen möglicherweise verdrängt haben. Es wäre auch denkbar, dass die Zellen ihre Resistenz gegenüber Puromycin aus anderen Gründen verloren haben. Somit wurden in dieser Arbeit nur frühe Passagen von transfizierten LN229-Zellen verwendet.

### 6.2 **Prüfung der aufgestellten Hypothesen**

Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Hinblick auf die Hypothesen (siehe 3) diskutiert werden.

1.) Die endogene Expression der *ING1*-Isoformen  $p33^{ING1b}$  und  $p47^{ING1a}$  wird durch DNS-Schädigung von GBM-Zellen in diesen unterschiedlich induziert.

Wie im Abschnitt 5.3 dargestellt, zeigt der Einfluss von Cisplatin (CDDP) und einer Bestrahlung mit Gamma-Strahlen eine deutliche Veränderung des Expressionsverhaltens der mRNA- und der

Proteinexpression von *ING1* (Abschnitt 5.4) in malignen Gliomzellen. Es zeigte sich ein expositionszeitlicher Anstieg der Expression der *ING1*-Isoform *p47<sup>INGa</sup>*.

2) Eine reduzierte *ING1*-Expression verändert das Wachstums- und Apoptoseverhalten von GBM-Zellen nach Cisplatinbehandlung

In der Zellzyklusanalyse zeigte sich ein zeitlich früherer Eintritt der Zellen, die eine verminderte Expression von *ING1*-Genprodukten aufwiesen, in die SubG<sub>1</sub>-Phase mit resultierender Apoptose. In mehreren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine DNS-Schädigung durch CDDP bzw. Gammabestrahlung in *TP53*-defizienten Gliomzellen der Zelllinie *LN229* zu verminderter *ING1*-Expression führt, und eine verminderte *ING1*-Expression zu einer Erhöhung der Apoptoserate nach CDDP-Behandlung dieser Zellen erzeugt (siehe Abschnitt 5.5).

Somit sind die o. g. Hypothesen bestätigt (siehe Abschnitt 3).

### 6.3 Wissenschaftliche Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Frühere Beobachtungen in malignen Gliomen zeigten reduzierte Expression von *ING1* bei fehlender *ING1*-Mutation<sup>68, 118</sup>. Dies kann u. a. durch Promotorhypermethylierung, wie sie für *ING1* in Ovarialtumorzellen festgestellt wurde<sup>56</sup>, verursacht sein. Die Vielzahl CpG-Inseln dieser Promotor-nahen Regionen machen die Hypermethylierung des *ING1*-Promoters als epigenetisch bedingte Ursache für eine alterierte Expression in Tumorzellen wahrscheinlich<sup>56, 69</sup>. Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, dass eine verminderte Expression von *ING1* mit einer geringen Tumorprogression in malignem Gliomen korreliert und somit die Hypothese der Funktion *ING1* als Typ II Tumorsuppressorgen unterstützt wird<sup>70</sup>.

In dieser Arbeit induzierte die Behandlung von *LN229*-Glioblastomzellen mit DNS-schädigenden Agenzien wie CDDP die *ING1*-Isoform *p47<sup>ING1a</sup>*. *ING1*-Induktion nach DNS-Schädigung wurde auch von anderen Untersuchern, z. B. nach UV-Bestrahlung von Melanomzellen, jedoch nicht normalen Fibroblasten, beschrieben<sup>119</sup>.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass im Gegensatz zu anderen Tumorzellarten, in denen die *p33<sup>ING1b</sup>*-Isoform Apoptose induzierend ist<sup>55</sup>, in malignen Gliomzellen wie *LN229*, eher *p47<sup>ING1a</sup>* die Variante ist, die an der Vermittlung von Zelltod nach Behandlung mit DNS-schädigenden

Chemotherapeutika beteiligt ist. Diese Tatsache lässt sich mit der Beobachtung in Verbindung bringen, dass die Isoform  $p47^{ING1a}$  mit Histon-Deacetylasen (HDAC) zusammenarbeitet, welche Genexpression, und damit auch die Expression proapoptotischer Proteine, supprimieren.  $p33^{ING1b}$  hingegen interagiert mit Histon-Acetylasen (HAT), welche zur Genaktivierung beitragen<sup>63</sup>. Zahlreiche Arbeiten belegen die Interaktion von ING1-Proteinen mit HDAC<sup>120, 121</sup>. Die  $p47^{ING1a}$ -Isoform fördert dabei die Deacetylierung der Histone. In der Folge kommt es zu einer konsekutiv gesteigerten Ausbildung von heterochromatischen Regionen in der DNS. Dadurch wird diese wiederum schlechter zugänglich für die zerstörenden Adduktbildungen mit CDDP. Somit könnte das Hochregulieren von  $p47^{ING1a}$  nach CDDP-Behandlung eine Schutzreaktion der Gliomzellen vor DNS-Schädigung sein.

Entsprechend führte eine reduzierte *ING1a*-Expression in unserem Modell zu einer Sensibilisierung von GBM-Zellen mit *TP53*-Mutation für die Behandlung mit CDDP. Demnach könnte, unabhängig vom *TP53*-Status der Zelle, die individuelle Bestimmung der *ING1a/ING1b*-Ratio oder auch der absoluten *ING1a*-Spiegel in malignen Gliomen deren individuelle Sensibilität gegenüber einer CDDP-Behandlung voraussagen.

Wird ein erniedrigter  $p47^{ING1a}$ -Spiegel als prädiktiver Marker für größere Sensitivität gegenüber Cisplatin erwiesen, ist es denkbar, dass diese zusätzlich bei den verschiedenen in der Untersuchung befindlichen Formen von HDAC-Inhibitoren Relevanz besitzen. Sowohl HDAC-Inhibitoren als auch ein erniedrigter  $p47^{ING1a}$ -Spiegel fördert die Bildung von Euchromatin und diese Veränderungen erhöhen die Apoptosesensibilität der Zelle<sup>122, 123</sup>.

Daher könnte die Kenntnis der *ING1*-Expression eine Voraussage über die relative Empfindlichkeit einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und HDAC-Inhibitoren in der Therapie von Patienten mit GBM machen<sup>124</sup>.

## 7. LITERATUR

1. Haroun RI, Clatterbuck RE, Gibbons MC et al. Extreme drug resistance in primary brain tumors: in vitro analysis of 64 resection specimens. *J Neurooncol* 2002;58(2):115-123.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC)/ WHO Classification of Tumours; 2007.
3. Riede U, Schaefer H. Allgemeine und spezielle Pathologie. 4.Auflage ed. Stuttgart; New York: Thieme; 1999.
4. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends. 2012.
5. Weller M. [Chemotherapy for brain tumors in adult patients]. *Nervenarzt* 2008;79(2):231-241.
6. Brown M, Schrot R, Bauer K, Letendre D. Incidence of first primary central nervous system tumors in California, 2001-2005. *J Neurooncol* 2009;94(2):249-261.
7. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
8. May P, Soussi T. The role of p53 in normal cells and in cancer development. *Pathol Biol (Paris)* 1997;45(10):781-784.
9. Deimling A., Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* 2011;21(1):74-87.
10. Berlit P. Klinische Neurologie. 3., erweiterte und vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag ; 2012.
11. Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Target Oncol* 2010;5(3):161-165.
12. Yan H, Parsons DW, Jin G et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765-773.

13. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P et al. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54(1):91-95.
14. Deimling A., Nagel J, Bender B et al. Deletion mapping of chromosome 19 in human gliomas. *Int J Cancer* 1994;57(5):676-680.
15. Poeck K, Hacke W. *Neurologie*. 11. Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001.
16. Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO). Interdisziplinäre S 2 – Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters. München, Bern, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag; 2004.
17. Linn J, Wiesmann M, Brückmann H. *Atlas Klinische Neuroradiologie des Gehirns*. 1 ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag ; 2011.
18. Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10(5):459-466.
19. Grossman SA, Ye X, Piantadosi S et al. Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin Cancer Res* 2010;16(8):2443-2449.
20. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-996.
21. Buckner JC, Ballman KV, Michalak JC et al. Phase III trial of carmustine and cisplatin compared with carmustine alone and standard radiation therapy or accelerated radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group 93-72-52 and Southwest Oncology Group 9503 Trials. *J Clin Oncol* 2006;24(24):3871-3879.
22. Grossman SA, O'Neill A, Grunnet M et al. Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 2394

88. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1485-1491.

23. Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK et al. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999;354(9172):34-39.
24. Kramm CM, Chase M, Herrlinger U et al. Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy. *Hum Gene Ther* 1997;8(17):2057-2068.
25. Huszthy PC, Goplen D, Thorsen F et al. Oncolytic herpes simplex virus type-1 therapy in a highly infiltrative animal model of human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1571-1580.
26. Chiocca EA, Aghi M, Fulci G. Viral therapy for glioblastoma. *Cancer J* 2003;9(3):167-179.
27. Aghi M, Chiocca EA. Gene therapy for glioblastoma. *Neurosurg Focus* 2006;20(4):E18.
28. Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* 2000;26(6):449-462.
29. Specenier P. Bevacizumab in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12(1):9-18.
30. Reardon DA, Wen PY, Desjardins A, Batchelor TT, Vredenburgh JJ. Glioblastoma multiforme: an emerging paradigm of anti-VEGF therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(4):541-553.
31. Ali SA, McHayleh WM, Ahmad A et al. Bevacizumab and irinotecan therapy in glioblastoma multiforme: a series of 13 cases. *J Neurosurg* 2008;109(2):268-272.
32. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Kirkpatrick JP et al. Addition of bevacizumab to standard radiation therapy and daily temozolomide is associated with minimal toxicity in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;82(1):58-66.

33. Lai A, Tran A, Nghiemphu PL et al. Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme  
26. *J Clin Oncol* 2011;29(2):142-148.
34. Weller M. [Neurooncology]. *Nervenarzt* 2003;74(12):1139-1149.
35. Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A et al. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol* 1999;97(5):525-532.
36. Laws ER, Parney IF, Huang W et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 2003;99(3):467-473.
37. Chang SM, Parney IF, McDermott M et al. Perioperative complications and neurological outcomes of first and second craniotomies among patients enrolled in the Glioma Outcome Project. *J Neurosurg* 2003;98(6):1175-1181.
38. Kreth FW, Warnke PC, Scheremet R, Ostertag CB. Surgical resection and radiation therapy versus biopsy and radiation therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1993;78(5):762-766.
39. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Trans Stud Coll Physicians Phila* 1988;10(1-4):83-94.
40. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998;280(5366):1036-1037.
41. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14(4):415-420.
42. Shah S, Smith H, Feng X, Rancourt DE, Riabowol K. ING function in apoptosis in diverse model systems. *Biochem Cell Biol* 2009;87(1):117-125.
43. Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, Johnston RN, Garkavtsev I. A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res* 1997;57(7):1255-1258.

44. Menendez C, Abad M, Gomez-Cabello D, Moreno A, Palmero I. ING proteins in cellular senescence. *Curr Drug Targets* 2009;10(5):406-417.
45. Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Exp Cell Res* 2006;312(7):951-961.
46. Vieyra D, Toyama T, Hara Y, Boland D, Johnston R, Riabowol K. ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Res* 2002;62(15):4445-4452.
47. Bernstein C, Bernstein H, Payne C. Cell immortality: maintenance of cell division potential. *Prog Mol Subcell Biol* 2000;24:23-50.
48. Cheung KJ, Jr., Mitchell D, Lin P, Li G. The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 2001;61(13):4974-4977.
49. Tamannai M, Farhangi S, Truss M et al. The inhibitor of growth 1 (ING1) is involved in trichostatin A-induced apoptosis and caspase 3 signaling in p53-deficient glioblastoma cells. *Oncol Res* 2010;18(10):469-480.
50. Tallen G, Riabowol K, Wolff JE. Expression of p33ING1 mRNA and chemosensitivity in brain tumor cells. *Anticancer Res* 2003;23(2B):1631-1635.
51. Zeremski M, Horrigan SK, Grigorian IA, Westbrook CA, Gudkov AV. Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somat Cell Mol Genet* 1997;23(3):233-236.
52. Soliman MA, Riabowol K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci* 2007;32(11):509-519.
53. Kichina JV, Zeremski M, Aris L et al. Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 2006;25(6):857-866.
54. Shinoura N, Muramatsu Y, Nishimura M et al. Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* 1999;59(21):5521-5528.

55. Tong WG, Wierda WG, Lin E et al. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* 2010;5(6):499-508.
56. Shen DH, Chan KY, Khoo US et al. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2005;26(4):855-863.
57. Scott M, Boisvert FM, Vieyra D, Johnston RN, Bazett-Jones DP, Riabowol K. UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res* 2001;29(10):2052-2058.
58. Bunce MW, Gonzales ML, Anderson RA. Stress-ING out: phosphoinositides mediate the cellular stress response. *Sci STKE* 2006;2006(360):e46.
59. Huang W, Zhang H, Davrazou F et al. Stabilized phosphatidylinositol-5-phosphate analogues as ligands for the nuclear protein ING2: chemistry, biology, and molecular modeling. *J Am Chem Soc* 2007;129(20):6498-6506.
60. Gozani O, Karuman P, Jones DR et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 2003;114(1):99-111.
61. Pena PV, Hom RA, Hung T et al. Histone H3K4me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor. *J Mol Biol* 2008;380(2):303-312.
62. Skowyra D, Zeremski M, Neznanov N et al. Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* 2001;276(12):8734-8739.
63. Vieyra D, Loewith R, Scott M et al. Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* 2002;277(33):29832-29839.
64. Gunduz M, Demircan K, Gunduz E, Katase N, Tamamura R, Nagatsuka H. Potential usage of ING family members in cancer diagnostics and molecular therapy. *Curr Drug Targets* 2009;10(5):465-476.

65. Garkavtsev I, Demetrick D, Riabowol K. Cellular localization and chromosome mapping of a novel candidate tumor suppressor gene (ING1). *Cytogenet Cell Genet* 1997;76(3-4):176-178.
66. Alberts B. *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokio: VCH; 1997.
67. Sutherland HG, Mumford GK, Newton K et al. Large-scale identification of mammalian proteins localized to nuclear sub-compartments. *Hum Mol Genet* 2001;10(18):1995-2011.
68. Tallen G, Kaiser I, Krabbe S et al. No ING1 mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma. *Int J Cancer* 2004;109(3):476-479.
69. Feng X, Hara Y, Riabowol K. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):532-538.
70. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):1054-1065.
71. Abad M, Moreno A, Palacios A et al. The tumor suppressor ING1 contributes to epigenetic control of cellular senescence. *Aging Cell* 2011;10(1):158-171.
72. Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):2014-2019.
73. Voigt W, Dietrich A, Schmoll HJ. [Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues]. *Pharm Unserer Zeit* 2006;35(2):134-143.
74. Serke M. [Pharmacologic treatment of bronchial cancer. Part 1: Standards]. *Pneumologie* 2006;60(8):493-508.
75. Lewin B. *Gene : Lehrbuch d. molekularen Genetik*. 1. Auflage ed. Weinheim ; Basel (Schweiz) ; Cambridge ; New York: VCH; 1988.

76. Kramm C, Wolff J. Hochgradig maligne Gliome und Ponsgliome im Kindes- und Jugendalter. [http://www.awmf.org/leitlinien/uploads/tx\\_szleitlinien/025-023.pdf](http://www.awmf.org/leitlinien/uploads/tx_szleitlinien/025-023.pdf), 2008.
77. Ishii N, Maier D, Merlo A et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999;9(3):469-479.
78. Diserens AC, De TN, Martin-Achard A, Gaide AC, Schnegg JF, Carrel S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol* 1981;53(1):21-28.
79. Fruehauf JP, Brem H, Brem S et al. In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4523-4532.
80. Xu GW, Mymryk JS, Cairncross JG. Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin. *J Neurooncol* 2005;74(2):141-149.
81. Park CM, Park MJ, Kwak HJ et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *Int J Oncol* 2006;28(1):119-125.
82. Schlapbach R, Fontana A. Differential activity of bcl-2 and ICE enzyme family protease inhibitors on Fas and puromycin-induced apoptosis of glioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1997;1359(2):174-180.
83. Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(7):1966-1970.
84. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-811.
85. SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;59:223-239.

86. Tallen UG, Truss M, Kunitz F et al. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (ING1) tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Neurooncol* 2008;86(1):23-30.
87. Tallen G, Mock C, Gangopadhyay SB, Kangarloo B, Krebs B, Wolff JE. Overcoming cisplatin resistance: design of novel hydrophobic platinum compounds. *Anticancer Res* 2000;20(1A):445-449.
88. Ambrook J, Fritsch EF MT. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
89. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.
90. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-491.
91. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992;24:17-27.
92. Nedelman J, Heagerty P, Lawrence C. Quantitative PCR with internal controls. *Comput Appl Biosci* 1992;8(1):65-70.
93. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(24):9717-9721.
94. Mühlhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Stuttgart,Jena,Lübeck,Ulm: Gustav Fischer Verlag; 1999.
95. Clifton SW, Mitreva M. Strategies for Undertaking Expressed Sequence Tag (EST) Projects. *Methods Mol Biol* 2009;533:1-20.
96. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990;18(21):6409-6412.

97. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999;75(2-3):291-295.
98. Steele BK, Meyers C, Ozbun MA. Variable expression of some "housekeeping" genes during human keratinocyte differentiation. *Anal Biochem* 2002;307(2):341-347.
99. Wellmann S, Taube T, Paal K et al. Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 2001;47(4):654-660.
100. Higa S, Yoshihama M, Tanaka T, Kenmochi N. Gene organization and sequence of the region containing the ribosomal protein genes RPL13A and RPS11 in the human genome and conserved features in the mouse genome. *Gene* 1999;240(2):371-377.
101. Gussow D, Rein R, Ginjaar I et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 1987;139(9):3132-3138.
102. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004;32(12):e103.
103. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 1999;17(8):804-807.
104. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001;31(5):1106-1.
105. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2011;699:1-29.
106. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56(3-4):350-360.
107. Gilligan D, Mort C, McMillan TJ, Peacock JH, Titley J, Ormerod MG. Application of a bromodeoxyuridine-Hoechst/ethidium bromide technique for the analysis of radiation-induced cell cycle delays in asynchronous cell populations. *Int J Radiat Biol* 1996;69(2):251-257.

108. Ormerod MG, Kubbies M. Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain. *Cytometry* 1992;13(7):678-685.
109. Orita M, Murakami Y, Ishihara K, Sekiya T. Loss of heterozygosity at polymorphic chromosomal loci in patients with malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1989;92(5 Suppl):280S-283S.
110. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2766-2770.
111. Deimling A., Bender B, Louis DN, Wiestler OD. A rapid and non-radioactive PCR based assay for the detection of allelic loss in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19(6):524-529.
112. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991;48(1):137-144.
113. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24:104-108.
114. Lindl T. Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 4., überarb. und erw. Aufl. ed. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag/ Gustav Fischer; 2000.
115. Possinger K, Hartenstein R, Ehrhart H. [Resistance testing of cytostatic agents on human tumors (author's transl)]. *Klin Wochenschr* 1976;54(8):349-355.
116. Höfler H, Sarbia M, Werner, M. Allgemeine Onkogenese und Tumorpathologie. In: Siewert J-R, editor. *Praxis der Viszeralchirurgie*. 2. Auflage ed. Heidelberg; Berlin: 2006.
117. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawa K., editors. *Rapid Cycler Real-time PRC, Methods and Applications*. Heidelberg: Springer Press; 2001:21-34.

118. Veyra D, Senger DL, Toyama T et al. Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9(16 Pt 1):5952-5961.
119. Cheung KJ, Jr., Li G. p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* 2002;279(2):291-298.
120. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 2006;21(1):51-64.
121. Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 2002;22(3):835-848.
122. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):38-51.
123. Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 2006;32(3):157-165.
124. Coles AH, Marfella CG, Imbalzano AN et al. p37Ing1b regulates B-cell proliferation and cooperates with p53 to suppress diffuse large B-cell lymphomagenesis. *Cancer Res* 2008;68(21):8705-8714.

## 9. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

„Ich, Frank Kunitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Erniedrigte Expression des Tumorsuppressors Inhibitor of Growth 1" (ING1) sensibilisiert Glioblastomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den \_\_\_\_\_

Frank Kunitz

## 10. ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Frank Kunitz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikation:

Tallen UG, Truss M, **Kunitz F**, Wellmann S, Unryn B, Sinn B, Lass U, Krabbe S, Holtkamp N, Hagemeyer C, Wurm R, Henze G, Riabowol KT, von Deimling A. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (*ING1*) tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Neurooncol.* 2008 Jan;86(1):23-30.

Der aktive Anteil an dieser Publikation kann mit ca. 50 % abgeschätzt werden.

Folgende methodisch-experimentellen und auswertenden Aufgaben wurden ausgeführt:

- Kultivierung und Vorbereitung zu den Expositionsversuchen der Zelllinien 100 %
- RNS-Isolierung, cDNS-Synthese, PCR, RT-PCR, Realtime-PCR und Primerdesign (inklusive Transformation, Bakterienzüchtung, Plasmidextraktion zur Eichreihenerstellung) 100%
- Mutationsanalyse und Sequenzierung für TP53 100%
- Proteinanalyse: Proteinextraktion und -Konzentrationsbestimmung, Westernblot 90%
- Zellzyklusanalyse/ Durchflusszytometrie (nur Vorbereitung, Durchführung und Auswertung in externer Durchführung) 50%
- Transfektion der Zelllinie LN229 mit siRNS (externe Durchführung) 0%
- Gammastrahlung (externe Durchführung) 0%
- Anteil an wissenschaftlicher Auswertung und Diskussion 50 %

---

Ort, Datum, Stempel und Unterschrift des betreuenden Hochschullehrers

---

Ort, Datum und Unterschrift des Doktoranden

## 11. **LEBENS LAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.







## 12. PUBLIKATIONEN

### **Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit sind Bestandteil dieser Publikation:**

Tallen UG, Truss M, **Kunitz F**, Wellmann S, Unryn B, Sinn B, Lass U, Krabbe S, Holtkamp N, Hagemeyer C, Wurm R, Henze G, Riabowol KT, von Deimling A. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (*ING1*) tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. *J Neurooncol.* 2008 Jan;86(1):23-30.

---

Schuck SD, Mueller H, **Kunitz F**, Neher A, Hoffmann H, Franken KL, Repsilber D, Ottenhoff TH, Kaufmann SH, Jacobsen M. Identification of T-cell antigens specific for latent mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One.* 2009;4(5):e5590.

**Kunitz F**, Brodhun B, Hauer B, Haas W, Loddenkemper R. Die aktuelle Tuberkulosesituation in Deutschland und die Auswirkungen der globalen Situation. *Pneumologie* 2007; 61: 467-477.

B. Brodhun, **F. Kunitz**, D. Altmann, R. Loddenkemper, W. H. Haas: Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland und weltweit, *Pneumologie* 2006, 3:257-265

Mueller W, Lass U, Wellmann S, **Kunitz F**, von Deimling A. Mutation analysis of DKK1 and in vivo evidence of predominant p53-independent DKK1 function in gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005 Mar;109(3):314-20. Epub 2005 Jan 25.

#### Wissenschaftlich-redaktionelle Arbeit:

Was man über die Tuberkulose wissen soll- Eine Informationsschrift für Patienten und ihre Angehörigen (6. Aufl., 2007)

29. Informationsbericht, 2005 und 30. Informationsbericht, 2007 des Deutschen Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK)

Hauer B, **Kunitz F**, Sagebiel D, Niemann S, Diel R, Loddenkemper R. Untersuchungen zur Tuberkulose in Deutschland: Molekulare Epidemiologie, Resistenzsituation und Behandlung (überarbeiteter Abschlussbericht zur DZK-Studie) 2007

Kongressbeiträge (Auswahl)

**Kunitz F**, Sagebiel D, Hauer B, Diel R, Loddenkemper R. Tuberkulosepatienten in Deutschland: Sozialer Hintergrund und Risikofaktoren- Vergleich zwischen in Deutschland und im Ausland Geborenen. (Abstract) Pneumologie 2008; 62: S121 (Suppl. 2)

Diel R, **Kunitz F**, Hauer B, Loytved G, Loddenkemper R. Umgebungsuntersuchungen des Öffentlichen Gesundheitsdienstes in Deutschland: Ergebnisse der multizentrischen Fingerprintingstudie des DZK. (Abstract) Pneumologie 2008; 62: S150 (Suppl. 2)

**Kunitz F**, Loddenkemper R. Epidemiologische Risikofaktoren der Tuberkulose (TB) in Deutschland. 48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 14.-17.3.2007, Mannheim. Kongresszeitung "Current congress" (Thieme-Verlag) 2007

**Kunitz F**, Sagebiel D, Loddenkemper R, Study Group of Public Health Offices. Risk factors for TB in Germany, investigation of epidemiological parameters. TSRU Meeting 5.-7.04.2006, Peking. (Abstract) TSRU Progress Report 2006, published by KNCV Tuberculosis Foundation, Den Haag/Niederlande

DGNN-Kongreß 11/2003: Hoffmann A, Hartmann C, Laß U, **Kunitz F**, Plösser M, von Deimling A: Evaluation of p190aRhoGap as putative 19q13.3 tumour suppressor gene in oligodendrogial tumours. (Präsentation)

### 13. DANKSAGUNG

Herrn Prof. von Deimling<sup>1</sup> danke ich, dass er mir die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut ermöglicht hat und mir stets zur Seite stand.

Mein inniger Dank gilt meiner Mentorin, Frau PD Dr. Tallen, welche mich trotz einer beachtlichen geografischen Distanz in der Endphase dieser Arbeit durchgehend geduldig begleitet und meinen wissenschaftlichen Blick maßgeblich geprägt hat. Ihr habe ich einen Großteil meines grundlegenden Wissen zum experimentellen und wissenschaftlichen Arbeiten zu verdanken. Frau Lass danke ich für die vielen Kleinigkeiten, Kniffe und Tricks, die ich von ihr im Labor erlernen konnte. Des Weiteren bin ich besonders Frau Dr. Sinn und Herrn Dr. Wurm<sup>2</sup> für die Möglichkeit der Durchführung der Bestrahlung und den großzügigen Zugang zu ihren labortechnischen Ressourcen und ihre stete fachliche Hilfe bei der Beantwortung strahlenspezifischer Fragestellungen zum Dank verpflichtet.

Den Herren Dr. Truss und Dr. Hagemeyer<sup>3</sup> danke ich für die Durchführung der Transfektion der Zelllinie LN229.

Ich danke Ms. Boland von der SACRI Hybridoma Facility (Calgary) für die Bereitstellung der *ING1* monoklonalen Antikörper. Herr Dr. Wellmann war<sup>4</sup> für die Einführung in die Thematik der Realtime-PCR verantwortlich und konnte mir stets hilfreich bei der Lösung von Problemen zur Seite stehen. Herrn Prof. Riabowol<sup>5</sup> für seine konstruktive und anspornende Hilfestellung im Hintergrund.

Alle Anstrengung und Bemühungen wären ohne den Rückhalt und die unermüdliche Zusprache meiner Ehefrau nicht erfolgreich gewesen. Ihr gehört der größte Anteil meines Dankes.

---

<sup>1</sup> Abteilung für Neuropathologie des Pathologisches Instituts des Universitätsklinikum Heidelberg

<sup>2</sup> Klinik für Strahlentherapie, Charité-Universitätsmedizin-Berlin; Campus Mitte (Berlin),

<sup>3</sup> Abteilung für Pädiatrie, Labor für Molekulare Biologie, Charité-Universitätsmedizin-Berlin, Campus Mitte (Berlin),

<sup>4</sup> Universitäts Kinderklinik (Basel, Schweiz)

<sup>5</sup> Abteilung für Onkologie, Medizinische Fakultät, Universität of Calgary, (Calgary, AB, Kanada)