

Aus der Abteilung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
(Leiter: Univ.- Prof. Dr. med. James F. Beck)  
und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie:  
Peter Holtz Research Center of Pharmacology and Experimental Therapeutics  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer)  
der Medizinischen Fakultät  
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Validierung von Protein-Kinase C $\eta$   
und Bcl-XL als Resistenzfaktoren der  
Lungenadenokarzinomzelllinie A459

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2003

vorgelegt von:  
Katrin Ahlbrecht  
geb. am: 09.10.1976  
in: Kassel

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. James F. Beck  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Karl Welte  
3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. rer. nat. Reinhard Walther  
Ort, Raum: Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie, Hörsaal  
Tag der Disputation: 20. Februar 2004

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. James F. Beck für meine Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die außergewöhnlich fürsorgliche Betreuung und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und wertvollen Impulse, die unkomplizierte und großzügige Hilfe bei allen auftretenden Problemen. Ihm habe ich die Freude an meiner Arbeit zu verdanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer. Er hat mein Interesse an der Pharmakologie und dem dazugehörigen Institut geweckt und mich stets positiv motiviert.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Klaus Brischwein für die detaillierte Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen und der Durchflußzytometrie zu Beginn dieser Arbeit.

In gleichem Masse gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Sonnemann für die weitere Betreuung und praktische Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Cornelia Müller für die Durchführung und Unterstützung in den Western Blot Analysen.

Ich danke Jennifer Gänge, Ulrike Glawe und Christine Stötzer für die vielzähligen kleinen Unterstützungen im Labor.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Dr. rer. nat. Volker Gekeler und Altana Pharma AG Konstanz, dass sie die Gapmer Antisense Oligonukleotide und die Sequenzen der Primer und Sonden für die Taq Man PCR ® für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

**Meiner Mutter**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Zellzyklus und Mechanismen der Tumorentstehung.....	1
1.2	Apoptose und Caspasen.....	4
1.3	Therapie maligner Tumorerkrankungen mit Zytostatika.....	8
1.3.1	Das Vinca-Alkaloid Vincristin.....	8
1.3.2	Das Taxan Paclitaxel (Taxol®).....	9
1.4	Der Immunmodulator Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	10
1.4.1	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).....	11
1.5	Zytostatika-Resistenz in malignen Tumorzellen.....	12
1.5.1	Die Protein-Kinase C Familie (PKC).....	13
1.5.2	Protein-Kinase C $\eta$ (PKC $\eta$ ).....	15
1.5.3	Protein-Kinase C (PKC) und Zytostatika-Resistenz.....	16
1.6	Das antiapoptotische Mitglied der Bcl-2 Familie Bcl-XL.....	18
1.7	Mechanismus der Antisense Oligonukleotide.....	19
<b>2.</b>	<b>Material.....</b>	<b>21</b>
2.1	Allgemein verwendete Reagenzien.....	21
2.2	Reagenzien für die Zellkultur.....	21
2.2.1	Kulturmedium.....	21
2.2.2	Reagenzien für die Vitalitätsbestimmung nach der Trypanblau Methode.....	22
2.2.3	Mycoplasmentest.....	22
2.2.4	Reagenzien zum Einfrieren von Zellen.....	22
2.3	Antisense Desoxyoligonukleotid gapmer- Moleküle (gapmer- AODNs) für die Targetvalidierung in A549 Zellen.....	22
2.4	Reagenzien für die Molekularbiologie.....	23
2.4.1	Allgemein benötigte Lösungen für die Molekularbiologie.....	23
2.4.2	Reagenzien für die RNA-Isolation.....	24
2.4.3	Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese.....	24
2.4.4	Reagenzien für die Realtime PCR (Taq Man PCR®).....	24
2.5	Reagenzien für die Western Blot Analyse von PKC $\eta$ und Bcl-XL.....	26

2.5.1	Reagenzien für die Protein-Isolation .....	26
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.5.3	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen.....	27
2.5.4	Reagenzien zur Proteindetektion von PKC $\eta$ und Bcl-XL .....	28
2.6	Reagenzien für funktionelle Tests .....	29
2.6.1	Zytostatika .....	29
2.6.2	Reagenzien für den Caspase-3-Aktivitäts-Test.....	29
2.6.3	Reagenzien für die Durchflußzytometrie.....	30
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1	Zellkultivierung .....	31
3.1.1	Zelllinie.....	31
3.1.2	Auftauen und Kultivieren der Zellen.....	31
3.1.3	Einfrieren der Zellen.....	31
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität (Trypanblau).....	32
3.1.5	Mycoplasmentest .....	32
3.1.6	Gapmer-AODN-Behandlung von A549 Zellen zur Targetvalidierung .....	33
3.2	Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	35
3.2.1	Isolierung der RNA.....	36
3.2.2	Überprüfung der RNA Qualität .....	36
3.2.3	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	36
3.2.4	Realttime PCR (Taq Man PCR®).....	37
3.2.5	Prizip der Realttime PCR (Taq Man PCR®).....	37
3.2.6	Auswertung der Realttime PCR (Taq Man® PCR).....	38
3.2.7	Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA in der Realttime PCR (Taq Man PCR®).....	40
3.3	Western Blot Analyse der PKC $\eta$ und des Bcl-XL auf Proteinebene.....	41
3.3.1	Prinzip der Western Blot Analyse .....	41
3.3.2	Gewinnung der Proteinproben für PKC $\eta$ und Bcl-XL .....	42
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.3.5	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen.....	43
3.3.6	Proteindetektion von PKC $\eta$ und Bcl-XL.....	44

3.4	Funktionelle Versuche .....	45
3.4.1	Kultivierung unter Zytostatikaapplikation.....	45
3.5	Caspase-3-Aktivitäts-Test.....	46
3.5.1	Prinzip des Caspase-3-Aktivitäts-Testes .....	46
3.5.2	Caspase-3-Aktivitäts-Test.....	46
3.6	Durchflußzytometrie.....	47
3.6.1	Prinzip der Durchflußzytometrie .....	47
3.6.2	Zelltod Analysen in der Durchflußzytometrie mit Propidiumjodid .....	48
3.7	Test zur Aufnahme der gapmer-AODNs mit der Durchflußzytometrie.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
4.1	Test zur Aufnahme FITC-markierter gapmer-ODNs in die Lungenadenokarzinomzelllinie A549.....	50
4.2	Genexpressionsanalysen mit der Realtime PCR (Taq Man PCR ®) nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen PKC $\eta$ .....	51
4.3	Genexpressionsanalysen mit der Realtime PCR Taq Man PCR ®) nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL .....	52
4.4	Western Blot Analysen der PKC $\eta$ auf Proteinebene nach gapmer- AODN- Behandlung der Zellen.....	53
4.5	Western Blot Analysen des Bcl-XL auf Proteinebene nach gapmer- AODN-Behandlung .....	53
4.6	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung.....	54
4.6.1	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol oder Vincristin.....	54
4.6.2	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin.....	55
4.6.3	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$ und TRAIL.....	56

4.6.4	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN Behandlung gegen Bcl-XL gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$ und TRAIL.....	57
4.7	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie.....	59
4.7.1	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol® oder Vincristin .....	59
4.7.2	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin.....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
5.1	Genexpressionsanalysen mittels Realtime PCR (Taq Man PCR®) und Western Blot Analysen nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ oder Bcl-XL.....	62
5.2	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test .....	62
5.2.1	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ gapmer-AODNs in Kombination mit Taxol® oder Vincristin.....	63
5.2.2	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin .....	65
5.2.3	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$ oder TRAIL .....	66
5.2.4	Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit TNF $\alpha$ oder TRAIL .....	67
5.3	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie.....	68
5.3.1	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen	



	PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol® oder Vincristin.....	68
5.3.2	Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin .....	69
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>74</b>
	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>86</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

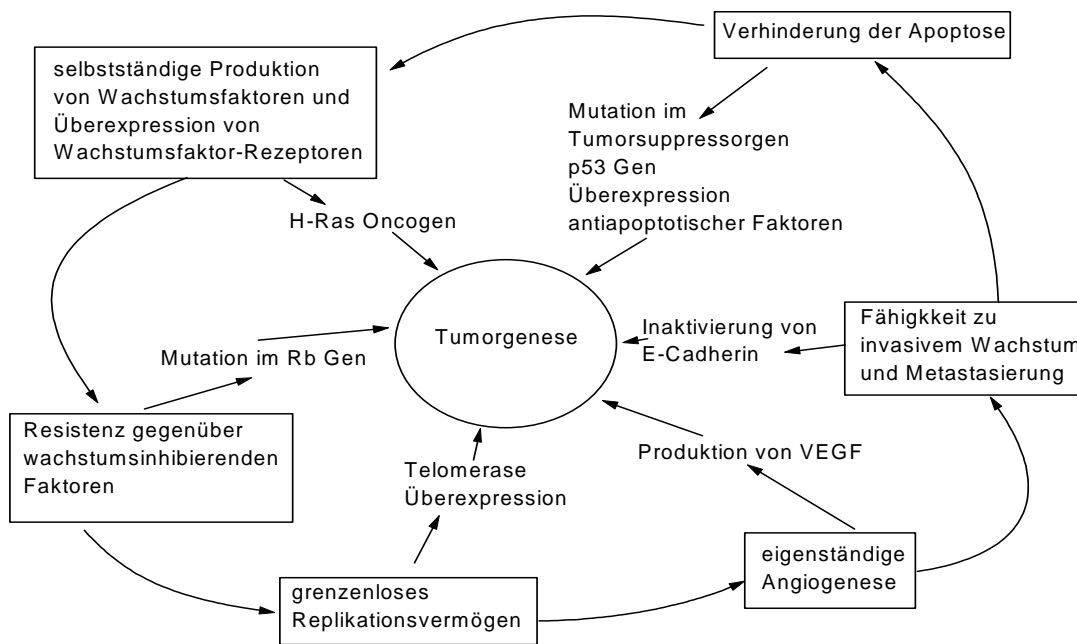
# 1 Einleitung

## 1.1 Zellzyklus und Mechanismen der Tumorentstehung

Für die Lebensvorgänge eines vielzelligen Organismus ist der kontrollierte Ablauf des Zellzyklus und der Apoptose (programmierter Zelltod) von wesentlicher Bedeutung. Der Teilungsprozess einer Zelle ist eng mit Wachstum, Differenzierung und Regeneration von Geweben assoziiert. Ein feinreguliertes Enzymsystem von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) interagiert mit zellzyklusspezifisch regulierten Proteinen, den Cyclinen [Fang et al., 1991; Rosenblatt et al., 1992] und kontrolliert so den Verlauf im Zellzyklus. Das Fortschreiten des Zellzyklus wird durch Rückkopplungskontrollen überwacht, die auf das Zellzyklussystem an bestimmten Stellen hemmend einwirken können [Murray et al., 1992; Hartwell et al., 1989]. Beispielsweise wird in einem Gewebsverband gesunder Zellen eine übermäßige Teilung durch Kontaktinhibition unterbunden. Es befindet sich der überwiegende Teil dieser Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase. Ein erneuter Übergang in die G<sub>1</sub>-Phase kann durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Mitogene ausgelöst werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, durch bestimmte Stimuli die Apoptose (programmierter Zelltod) einzuleiten (siehe 1.2). Überwiegend in den teilungsaktiven Zellzyklusphasen befinden sich schnell proliferierende Zellarten, wie embryonale Zellen, epitheliale Zellen, hämatopoetische Zellen und Tumorzellen. Fehlregulationen in den Kontrollsystemen, die Proliferation, Apoptose und Gewebshomöostase regulieren, werden in derzeitigen Studien mit für die Entstehung malignen Tumorwachstums verantwortlich gemacht [Hanahan und Weinberg, 2000]: Tumorzellen sind in der Lage, eigene Wachstumsfaktoren zu synthetisieren und somit die eigene Proliferation durch einen positiven "feed back" Mechanismus autokrin zu stimulieren [Übersicht in Hanahan und Weinberg, 2000]. Ein weiterer Mechanismus ist die Überexpression von transmembranären Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wodurch eine erhöhte Sensibilität gegenüber normalen Wachstumsfaktorkonzentrationen erreicht wird [Übersicht in Hanahan und Weinberg, 2000]. Darüber hinaus können Verschiebungen im Expressionsmuster von Zelloberflächenrezeptoren (Integrine) zu Gunsten derer mit wachstumsstimulierenden Eigenschaften eine vermehrte Proliferation der Zellen generieren [Lukashev und Werb, 1998; Giancotti und Ruoslahti, 1999]. Liganden-aktivierbare Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrine können ihre wachstumsstimulierenden Effekte über den SOS-Ras-Raf-MAPK-

Signaltransduktionsweg vermitteln [Aplin et al., 1998; Giancotti und Ruoslati, 1999]. Ein Gen, das nach Mutation unkontrolliertes Wachstum bewirkt hat, wird auch als Protooncogen bezeichnet. Es mutiert dann zu einem Oncogen wie beispielsweise das *ras* Protooncogen, das bei der Hälfte der Colonkarzinome in Form eines Oncogens vorliegt [Kinzler und Vogelstein, 1996]. Dem erhöhten Ansprechen auf Wachstumsfaktoren steht eine verminderte Ansprechbarkeit gegenüber antiproliferativen Faktoren gegenüber. Viele dieser antiproliferativen Signale werden beispielsweise über das Retinoblastomprotein (pRb) und seine Verwandten p107 und p130 reguliert. Das Retinoblastomagenprodukt (pRb) blockiert als Tumorsuppressor in einem hypophosphorylierten Zustand durch Modulation spezieller Signaltransduktionskaskaden den Übergang aus der G<sub>1</sub>Phase in die S Phase [Weinberg, 1995]. TGF $\beta$  verhindert die Phosphorylierung von pRb, die zu dessen Inaktivierung führen würde. Der antiproliferative Effekt von pRb wird somit u.a. durch TGF $\beta$  unterstützt [Hanahan und Weinberg, 2000]. Mutationen im Bereich des pRb Gens oder des TGF $\beta$  Rezeptors sind einige Beispiele, die in Tumorzellen zu einer verminderten Wirkung der antiproliferativen Effekte führen können [Hanahan und Weinberg, 2000]. Ein weiterer Mechanismus der Entstehung malignen Tumorwachstums überwindet die Limitation der Zellteilungen, die typischerweise in nicht malignen Zellen u.a. durch Telomerasemangel und durch den damit verbundenen progredienten Abbau der Telomere an den Chromosomenden vorgegeben ist. 85-90 % aller malignen Zellen weisen dagegen eine Überexpression des Telomeraseenzym auf, das die Telomere durch Anfügen von Hexanucleotidrepeats vor dem Zerfall schützt [Bryan und Cech, 1999]. Darüber hinaus zeigt sich die Angiogenese in Tumorgewebe als fester Bestandteil der malignen Tumorentstehung. Inhibitoren (Thrombospondin-1) und Aktivatoren ("VEGF", vascular endothelial growth factor), die über transmembranäre Rezeptoren in Endothelzellen des Tumorgewebes die Angiogenese regulieren, wurden beschrieben [Hanahan und Weinberg, 2000]. Im Mausmodell konnten Neovaskularisation und Tumorwachstum durch Anti-VEGF Antikörper vermindert werden [Kim et al., 1993]. Eine weitere Komponente der malignen Entwicklung eines Tumorgewebes ist die Fähigkeit invasiv zu wachsen und zu metastasieren. Zell zu Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs, cell-cell adhesion molecules), die der Gruppe der Cadherine angehören, sowie die Integrine, die eine Verbindung zu der Extrazellulären Matrix (EZM) herstellen, sorgen für die lokale Fixierung von Gewebszellen. In epithelalem Tumorgewebe wurde beispielsweise eine Mutation im E-Cadherin oder  $\beta$

Catenin mit folgendem Funktionsverlust festgestellt [Christofori und Semb, 1999]: Eine Überexpression von E-Cadherin führte in Tumorzellkulturen und im Mausmodell zu einer Verminderung des invasiven Wachstums und der Metastasierung [Christofori und Semb, 1999]. Weitere die Metastasierung und das invasive Wachstum begünstigende Faktoren sind die Überexpression extrazellulärer Proteasen und die Suppression korrespondierender Inhibitoren [Hanahan und Weinberg, 2000]. Von wesentlicher Bedeutung bei der Oncogenese ist neben den bisher genannten Mechanismen die Inaktivierung von Apoptoseprozessen. Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, der es u.a. einem Zellsystem ermöglicht, geschädigte Zellen zu eliminieren. Beispielsweise wird durch DNA-Schäden der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert [Hartwell and Weinert, 1989] und so das Tumorsuppressorgen p53 vermehrt exprimiert [Hartwell and Kastan, 1994]. Dies bewirkt einen G<sub>1</sub>-Arrest der Zelle, um DNA-Reparaturen vor erneuter Teilung zu ermöglichen. Bei insuffizienter DNA-Reparatur kann über p53 vermittelte Signale unter Beteiligung Bcl-2 homologer Proteine die Apoptose induziert werden [Lowe et al., 1993; Kastan et al., 1991; Kuerbitz et al., 1992]. Bei der Mehrzahl maligner Tumorerkrankungen Erwachsener liegt eine Mutation im p53 Gen vor [Prokocimer et al., 1994; Imamura et al., 1994]. p53 mutierte Zellen teilen sich trotz DNA-Schäden. Akkumulation von weiteren Mutationen und Transformation in maligne Zellen sind die Folge [Yin et al., 1992; Harvey et al., 1991]. Auch eine Überexpression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie (siehe 1.6) führt zu einem Abbruch der apoptotischen Signaltransduktionskaskade. Geschädigte Zellen sterben nicht ab und Mutationen können beispielsweise nach erneutem Teilungsprozess auf Tochterzellen übertragen werden. Nicht nur für die Tumorentstehung, sondern auch für die Therapie und das Verständnis der Chemoresistenz maligner Tumorzellen gewinnt der Prozess der Apoptose zunehmend an Bedeutung.



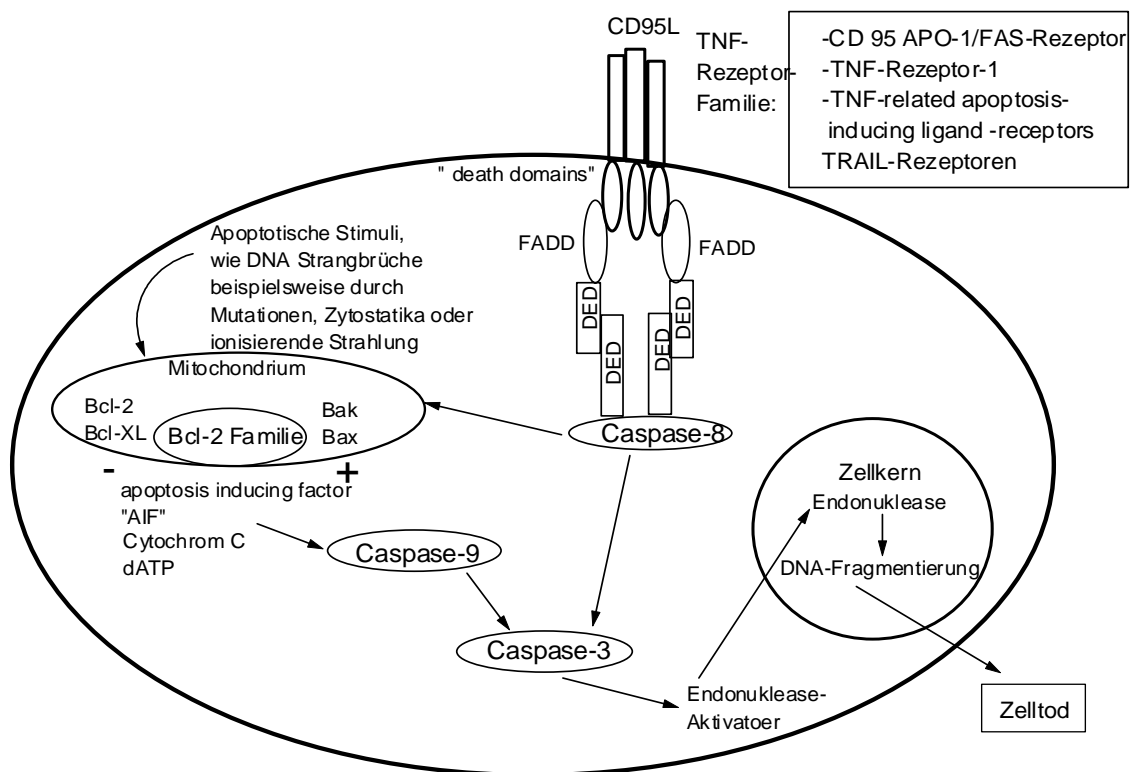
**Abb. 1:** Schematische Darstellung von Mechanismen der Tumorentstehung und Beispiele molekularbiologischer Veränderungen. Modifiziert nach [Hanahan und Weinberg, 2000]

## 1.2 Apoptose und Caspasen

Die Apoptose ist eine spezielle Art von Zelltod. Sie wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Diese Bezeichnung rührt daher, dass Zellen über ein bestimmtes Netzwerk von Enzymen und Proteinen verfügen, die sich auf bestimmte Stimuli hin in einer definierten Abfolge gegenseitig oder auch autokatalytisch nacheinander aktivieren und Prozesse auslösen können, an deren Ende der Zelltod steht. Dieser programmierte Zelltod ist beispielsweise in der Embryogenese, der Gewebshomöostase und der Funktion des Immunsystems von Bedeutung [Cory und Adams, 2002]. Fehlregulationen in diesem Prozess liegen verschiedenen Krankheiten wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, degenerativen Erkrankungen und Tumorerkrankungen (siehe 1.1) zu Grunde [Cory und Adams, 2002]. Im Gegensatz zur Zellnekrose ist die Apoptose ein aktiver, energieverbrauchender Prozess (siehe Tab. 1). Der intrazelluläre ATP-Gehalt ist mitentscheidend darüber, ob eine Zelle den Weg der Apoptose oder Nekrose einschlägt [Leist et al., 1997; Eguchi et al., 1997]. Von zentraler Bedeutung ist die Aktivierung von Caspasen, die nur im Falle der Apoptose, nicht aber der Nekrose beobachtet wird [Übersicht in Kroemer, 1999]. Das Enzymsystem der Caspasen gehört

zur Gruppe der Proteasen. Gemeinsames Merkmal der Proteasen ist die Synthese als noch inaktive Precursor-Protease. Gewöhnlich wird die Precursor-Protease durch Proteolyse in die aktive Form überführt. Die Proteolyse kann durch eine weitere Protease oder durch Autokatalyse erfolgen. Darüber hinaus sind Inhibitoren bekannt, welche die Aktivität der Proteasen inhibieren können. Die proteolytische Aktivität einer Protease kann spezifisch sein. Bei den Caspasen besteht eine Spezifität für die Spaltung nach der Aminosäure Aspartat [Thornberry and Lazebnik, 1998]. Des weiteren entstehen durch weitere Substratspezifitäten die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Caspasen: Von der Spaltungsstelle in Richtung des NH<sub>2</sub>-terminalen Endes fungieren jeweils vier Aminosäuren als Wiedererkennungssequenz an dem Substrat für eine bestimmte Caspasespezies [Thornberry et al., 1997]. Eine Funktion der Caspasen ist beispielsweise die Inaktivierung von Proteinen, welche die Zelle vor dem Eintreten in die Apoptose schützen: Ein Beispiel ist die Spaltung von I<sup>CAD</sup>/DFF45 [Enari et al., 1998, Liu et al., 1997], einem Inhibitor der Nuclease CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), die eine wesentliche Rolle in der DNA-Fragmentierung spielt. Des weiteren wird das DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) durch Caspasen gespalten [Cohen et al., 1997; Lippke et al., 1996]. Darüber hinaus ist die Spaltung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie beobachtet worden, die zur Entstehung von Fragmenten führt, welche die Signaltransduktionskaskaden in Richtung Apoptose vorantreiben können [Xue und Horvitz, 1997; Cheng et al., 1997; Adams und Cory 1998]. Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind wesentlich an einem von derzeit zwei beschriebenen Hauptwegen der apoptotischen Kaskade beteiligt (siehe Abb. 2). Ein Weg verläuft über die Mitochondrien und mündet in die Aktivierung von Caspase-9. Als Reaktion beispielsweise auf zytotoxische Agenzien kann eine Permeabilitäts-erhöhung der Mitochondrienmembran u.a. zur Freisetzung von intramitochondrialen Proteinen wie beispielsweise Cytochrom C führen, die Procaspase-9 in ihre aktive Form überführen können. Mitglieder der Bcl-2 Familie (siehe 1.6) entscheiden durch das Verhältnis der proapoptotischen gegenüber der antiapoptotischen Mitgliedern mit darüber, ob es zur Freisetzung dieser Proteine kommt [Reed, 1994]. Neben Cytochrom C ist APAF-1 ein weiterer Cofaktor, der dazu beiträgt, dass Procaspase-9 in Caspase-9, die aktive Form, überführt wird [Li et al., 1997; Übersicht in Thornberry und Lazebnik 1998]. Caspase-9 und ATP führen zur Aktivierung von Caspase-3, die eine zentrale Rolle in der apoptotischen Kaskade einnimmt, da sie einen Endonuklease-Aktivator aktiviert, der im Zellkern die typische

DNA-Fragmentierung bewirkt [Liu et al., 1996; Liu et al., 1997; Zou et al., 1997]. Der zweite Hauptweg verläuft über die Aktivierung von Procaspase-8 durch Aktivierung von Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie [Übersicht in Ashkenazi und Dixit 1998] (siehe 1.4): Bindet ein extrazellulärer Ligand wie CD95L (Fas) an einen membranständigen Rezeptor der TNF-Rezeptor Familie wie beispielsweise an den CD95L-Rezeptor, kommt es durch Trimerisierung des Rezeptors zu einer Zusammenlagerung seiner "death domains". Ein intrazelluläres Adapter-Molekül FADD ("Fas-associated death domain") [Chinnaiyan et al., 1995] bindet mit seiner eigenen "death domain" an die zusammengelagerten "death domains" des Rezeptors. FADD enthält des weiteren eine " death effector domain" (DED) (siehe Abb. 2) die an eine analoge Domäne von Procaspase-8 [Boldin et al., 1996] binden kann. Darüber hinaus kann sie an eine weitere Domäne von Caspase 8 binden, der CARD ("Caspase recruitment domain"). Dies führt zu einer Konformationsänderung von Procaspase-8 mit der Folge einer autokatalytischen Aktivierung [Muzio et al., 1998] zur Caspase-8, die ihrerseits "downstream" Caspasen aktiviert wie beispielsweise Caspase-3. Darüber hinaus wurde auch eine Signaltransduktionskaskade ausgehend von Caspase-8 über Spaltung von Bid zu tBid über die Mitochondrien beschrieben [Übersicht in Hengartner, 2000].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der zwei Hauptwege der apoptotischen Kaskade. Modifiziert nach Ashkenazi und Dixit, 1998; Thornberry und Lazebnik, 1998; Cory und Adams, 2002; Kroemer, 1999.

Morphologische Kriterien	
Apoptose	Nekrose
Ausstülpung der Kernmembran ohne Verlust der Membranintegrität Veränderung der Membransymmetrie	Verlust der Membranintegrität
Aggregation der DNA an der Kernmembran Kondensation von Zellkern und Zytoplasma	Ausflockung des Chromatins
Schrumpfen der Zelle und Abschnüren apoptotischer Körperchen	Anschwellen der Zelle, Mitochondrien und Lysosomen mit nachfolgender Zellyse
definierte DNA-Fragmente (185bp) durch Endonukleaseverdau	DNA-Abbau ohne definierte Fragmentlängen
Physiologische Kriterien	
Apoptose	Nekrose
streng kontrollierter Prozess	unkontrollierter Prozess, meist durch chemische oder physikalische Schädigung
aktiver Prozess, ATP-abhängig	passiver Prozess, kein Energieverbrauch
meist Tod von Einzelzellen durch physiologische Stimuli induziert	Tod von Zellgruppen durch nicht-physiologische Störung hervorgerufen
keine Entzündungsreaktion	Entzündungsreaktion
Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Zellen Endphase <i>in-vitro</i> : „sekundäre Nekrose“ durch Schwellen und Platzen der apoptotischen Körperchen	Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile

**Tab. 1** Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose unter morphologischen und physiologischen Kriterien [Cohen 1993].



### 1.3 Therapie maligner Tumorerkrankungen mit Zytostatika

Bei der Therapie von soliden Tumoren werden standardisierte Protokolle angewendet. Abhängig von Lokalisation und Tumorstadium werden operative Eingriffe, ionisierende Strahlung und Chemotherapie miteinander kombiniert. Die Chemotherapie ist sowohl in dem Behandlungskonzept nicht lokal kontrollierbarer solider Tumoren als auch in dem der Leukämien ein fester Bestandteil. In diesen Konzepten wird versucht, den Chemoresistenzen der Tumorzellen durch Kombination von Zytostatika mit verschiedenen Wirkmechanismen in zueinander definierten Zeitabständen entgegenzuwirken. Die verschiedenen Stoffgruppen der Chemotherapeutika greifen an unterschiedlichen Stellen im Zellzyklus an. Langsam proliferierende Tumoren, bei denen sich die Mehrzahl der Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase befindet, sind der Chemotherapie schlecht zugänglich, da die Angriffsstellen wie beispielsweise DNA oder Enzyme nicht in offener Form vorliegen oder nicht exprimiert sind. In den teilungsaktiven Zellzyklusphasen können die Zytostatika ihre jeweiligen "targets" besser erreichen und beispielsweise zu DNA-Strangbrüchen führen, die ihrerseits die Apoptose induzieren. Der Prozess der Apoptose gewinnt zunehmende Bedeutung in der Entwicklung onkologischer Therapien und dem Verständnis der Resistenzmechanismen (siehe 1.5), da gezeigt werden konnte, dass Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung über apoptosevermittelnde Signaltransduktionswege ihre Wirkung entfalten können [Fisher et al., 1994; Hickman et al., 1996]. Im Folgenden werden die Wirkmechanismen der in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika besprochen.

#### 1.3.1 Das Vinca-Alkaloid Vincristin

Vincristin (cellcristin, FARMISTIN®, Vincristin-biosyn, Vincristin Bristol, Vincristin Liquid, Lilly, Vincristinsulphat HEXAL®, Vincristin-Sulfat GRY®) bildet zusammen mit Vinblastin (cellblastin, Velbe®, Vinblastin R.P., Vinblastinsulphat GRY®) die Gruppe der Vinca-Alkaloide, die ursprünglich aus dem Immergrün *Catharanthus rosea* isoliert wurden. Vindesin (Eldesine®) und Vinorelbin (Navelbine®) stellen partialsynthetische Formen des Vinblastin dar [Mutschler, 2001a]. Auf Grund ihres Wirkmechanismus gehören die Vinca-Alkaloide der Gruppe der Mitosehemmstoffe an:

- primär zytotoxische Wirkung durch Hemmung der Depolimerisation der

Tubulinmoleküle, vor allem des Spindelapparates. Daraus resultiert ein Metaphase-Arrest in sich teilenden Zellen [Jordan et al., 1991]

- Störung weiterer mikrotubulinabhängiger Prozesse, wie beispielsweise :  
DNA-, RNA- und Proteinsynthese [Cline, 19968; Creasey et al, 1965],  
Chemotaxis, intrazelluläre Transporte, Bewegung von Organellen  
(Mitochondrien, sekretorische Granula, v.a in Nervenzellen) und Erhaltung  
der Zellstruktur durch Hemmung der Aggregaten von Tubulinmolekülen.

Wesentliche Indikationen für Vincristin stellen die akuten lymphatischen Leukämien, Lymphome, Melanome, Brustkrebs und ZNS-Tumoren dar. Das weniger toxische Vinblastin wird bei Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin), anderen malignen Lymphomen und dem Karposi-Sarkom bei AIDS eingesetzt. Vindesin wird bevorzugt zur Behandlung von Melanomen und Bronchialkarzinomen angewandt. Vinorelbin wird bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und beim metastasierten Mammakarzinom eingesetzt. Trotz der engen chemischen Verwandtschaft der Vinca-Alkaloide zeigen sich erhebliche Unterschiede in den oben genannten Wirkspektren, der Pharmakokinetik und der Toxizität. Die Plasmahalbwertszeit beträgt beispielsweise für Vinblastin ca. 24 Stunden und für Vincristin 85 Stunden. Die Substanzen werden biliär und renal eliminiert. Die Richtdosen betragen bei Vincristin einmal wöchentlich pro m<sup>2</sup> Körperoberfläche 1,4 mg, bei Vinblastin 6 mg , bei Vindesin 3 mg und bei Vinorelbin 30 mg. Im Gegensatz zu Vinblastin, Vindesin und Vinorelbin, steht bei Vincristin oft nicht so sehr die Knochenmarkstoxizität, sondern oft die neurotoxische Wirkung (periphere Neuropathie) als dosislimitierender Faktor im Vordergrund, [Mutschler, 2001a].

### **1.3.2 Das Taxan Paclitaxel (Taxol®)**

Paclitaxel (Taxol®) und das durch Seitenketten-Modifikation hergestellte Docetaxel (Taxotere®) sind die bislang einzigen therapeutisch genutzten Wirkstoffe aus der Gruppe der Taxane. Verschiedene Eibenarten bilden Taxane. Aus der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* kann Paclitaxel (Taxol®) isoliert werden. Es wird derzeit besonders in der Therapie solider Tumoren (metastasiertes Ovarial- und Mamma Karzinom nach Versagen einer Standardtherapie, Melanom und Karposi-Sarkom)

eingesetzt. Docetaxel ist beim metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom indiziert. Paclitaxel wird heute aus europäischen Eibenarten wie beispielsweise *Taxus baccata* partialsynthetisch hergestellt, um dem Bedarf gerecht werden zu können [Mutschler, 2001a]. Auch Paclitaxel und Docetaxel gehören der Gruppe der Mitosehemmstoffe an:

- Blockierung des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>-Phase bzw. M-Phase.
- Verhinderung der Desaggregation des Spindelapparates.

In der G<sub>2</sub>-Phase zum Stofftransport gebildete Spindeln können nicht mehr umgebaut werden, insbesondere entstehen in der Mitosephase keine Kernspindeln mehr [Mutschler, 2001a].

Paclitaxel wird zu 90% an Plasmaproteine gebunden. 2-13% erscheinen unverändert im Harn. Der größere Anteil wird über CYP3A4 hydroxyliert. Die Halbwertszeit beträgt 6-13 Stunden. Die Dosierung beträgt als i.v. Infusion 175mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Nach drei Wochen ist eine Wiederholung der Therapie möglich. Unverträglichkeitsreaktionen wurden beobachtet und können durch Prämedikation mit Dexamethason oder Antihistaminika vermieden werden. Bekannte Resistenzmechanismen beruhen auf der Bildung von P-Glykoprotein und einer Strukturveränderung der  $\beta$ -Untereinheit des Tubulindimers. Die Dosierung für Docetaxel beträgt 60-100mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche als einstündige Infusion alle drei Wochen. Auch bei dieser Anwendung ist eine Prämedikation mit Dexamethason sinnvoll [Mutschler, 2001a].

#### **1.4 Der Immunmodulator Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) sind Mitglieder der Familie der Zytokine, die eine wesentliche Rolle in der Funktionskette des Immunsystems spielen [Cosman, 1994]. Die Mitglieder dieser Familie interagieren mit speziellen Rezeptoren, die sich in der Gruppe der TNF-Rezeptorfamilie zusammenfassen lassen [Smith et al., 1994]. Die Signaltransduktionswege können einerseits Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Zellen auslösen, andererseits aber auch ihre Apoptose einleiten

[Cosmann, 1994]. Zu den Apoptose-vermittelnden Rezeptoren zählen insbesondere der TNF-Rezeptor-1, der CD95(Apo-1/Fas), der TRAMP (Apo-3,DR3, WSL) [Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996; Bodmer et al., 1997] und CAR 1 [Brojatsch et al., 1996]. TNF $\alpha$  kommt eine zentrale Stellung als proinflammatorisches Zytokin in der Pathogenese rheumatoiden Arthritis zu [Mutschler, 2001b]. Die Produktion von TNF $\alpha$  wurde in der Mäuse-makrophagenähnlichen Zelllinie J774.1 nach Aktivierung durch Lipopolysaccharide (LPS) [Karahashi et al., 1998] beobachtet. In Leber und Milz konnte im Mausmodell die LPS induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung inhibiert werden [Matsui et al., 2002]. Die Produktion in aktivierten Makrophagen [Sampson, 1996; Walczak, 1997] und die Involvierung in den Prozess der Apoptose peripherer T-Lymphozyten [Zheng et al., 1995; Sytwu et al., 1996] sprechen für die immunmodulatorische Wirkung von TNF $\alpha$  und dessen wesentlicher Beteiligung an der Apoptose. Auf der Induktion der Apoptose durch TNF $\alpha$  beruhen potentielle Ansätze in der Tumorthherapie. Beispielsweise konnte in den humanen myeloiden Leukämie Zelllinien U937 und HL-60 gezeigt werden, dass die Induktion der extrinsischen apoptotischen Kaskade durch Bryostatin 1 und den "cyclindependent kinase (CDK) inhibitor" Flavopiridol (FP) im Wesentlichen auf der erhöhten Freisetzung von TNF $\alpha$  beruht [Cartee et al., 2003].

#### **1.4.1 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)**

Der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ist ein Mitglied der TNF-Familie der Zytokine [Wiley et al., 1995]. Im Gegensatz zur lokal begrenzten Expression von TNF und CD95 Ligand (CD95L) wird die mRNA von TRAIL in einer Vielfalt von Geweben exprimiert [Wiley et al., 1995]. Unter den Mitgliedern der TNF-Familie der Zytokine ist TRAIL am engsten mit dem CD95L verwandt und induziert die Apoptose wie CD95L in einer Vielzahl von Zelllinien und besonders in aktivierten T-Lymphozyten [Übersicht in Walczak, 1997]. NF- $\kappa$  B zeigte sich als wesentlicher Regulator der TRAIL Expression in Lymphozyten [Baetu et al., 2002]. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-Liganden-Familie, induziert TRAIL apoptotische Reaktionen vorzugsweise in Tumorzelllinien und nicht in normalem Geweben [Baetu et al., 2002]. Dies könnte in der Expression unterschiedlicher Rezeptoren für TRAIL begründet sein. Verschiedene Rezeptoren für TRAIL wurden identifiziert. Zwei von

ihnen, TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 enthalten zytoplasmatische “death domains“ und induzieren Apoptose (siehe Abb.2), während zwei weitere, TRAIL-R3/DcR1 und TRAIL-R4/DcR2 weder “death domains“ besitzen noch Apoptose induzieren [Baetu et al., 2002]. Viele Tumorzelllinien exprimieren überwiegend TRAIL-R1 und TRAIL-R2 [Baetu et al., 2002]. Hierin können potentielle Ansätze gesehen werden, TRAIL in die Therapie maligner Tumorerkrankungen mit einzubeziehen, um das Spektrum antineoplastisch wirksamer Substanzen zu erweitern und durch die Diversifizierung Resistenzmechanismen zu umgehen.

## **1.5 Zytostatika-Resistenz in malignen Tumorzellen**

Zytostatika-Resistenzen stellen ein zentrales Problem in der Therapie maligner Tumorerkrankungen dar. Patienten die sich bereits in einer vollständigen Remission einer malignen Tumorerkrankung befanden, erleiden auf Grund einzelner chemoresistenter Zellen oftmals ein Rezidiv der Erkrankung, das sich meist erheblich resistenter zeigt als die Grunderkrankung. Diese resistenten Zellen existieren entweder bereits bei der Erstdiagnose oder entstehen erst im Laufe der Therapie [Bellamy et al., 1990; Gottesman et al., 1993a]. Zur Zeit werden zwei Hauptarten der Resistenzmechanismen beschrieben: Durch die sogenannten “upstream events“ schützen sich die Zellen über eine verstärkte Detoxifizierung beispielsweise durch Überexpression von ABC-Transportern (ATP-binding cassette Transporter) mit der Folge eines erhöhten Zytostatika-Effluxes oder einer schnelleren Zytostatika-Umverteilung in tiefere Zellkompartimente. Darüber hinaus kann eine Suppression von Molekülen, die den chemotherapeutischen Substanzen als Ziel dienen, zur Resistenz führen. Durch “downstream events“ wird der Prozess der Apoptose moduliert. Apoptoseinduzierende Faktoren werden supprimiert und apoptoseinhibierende Signale verstärkt exprimiert oder aktiviert. Als “upstream events“ wurden beispielsweise erhöhte Expressionen des P-Glykoproteins (Pgp), das zu den ABC-Transportern gehört [Shapiro 1995], in Ovarial-, Mammakarzinomen, in Sarkomen und in verschiedenen Leukämieformen beobachtet [Cumber et al., 1990; Chan et al., 1990; Verrelle et al., 1991; Campos et al., 1992]. Das für Pgp kodierende Gen konnte erstmals in CHO-Zellen (chinese hamster ovary) nachgewiesen werden und wurde als MDR1 Gen (Multi Drug Resistance 1 Gen) bezeichnet [Juliano et al., 1976; Pastan et al., 1987]. Eine

Korrelation zwischen der Expression der MDR1-mRNA und dem Ansprechen auf die Chemotherapie wurde an Blasten von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) festgestellt [Ma et al., 1987; Pirker et al., 1991; Sato et al., 1990]. Des Weiteren wurden beispielsweise die Alteration des Tubulin-Moleküls, die zur Resistenz gegenüber Vinca-Alkaloiden und Taxanen führt [Gupta et al., 1982; Gupta, 1990], oder die Alteration der Topoisomerase II, die eine Resistenz gegenüber Anthracyclinen und Epipodophyllotoxinen hervorruft [Beck et al., 1990; De Isabella et al., 1991; Morrow und Cowan, 1990] beobachtet. Die apoptosemodulierenden "downstream events", wie beispielsweise die Überexpression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 [Reed, 1995] oder Bcl-XL [Fennell et al., 2001; Luo et al., 2000], gewinnen gegenüber den "upstream events" in den Resistenz-Modellen zunehmend an Bedeutung, da sowohl Chemotherapeutika als auch ionisierende Strahlung in die Aktivierung des Prozesses der Apoptose münden [Fisher et al., 1994; Hickman 1996]. Modulation des apoptotischen Prozesses stellt einen potentiellen Ansatzpunkt in der Therapie dar [Ferreira et al., 2002]. Eine wichtige Funktion als Modulator der Apoptose wurde der Protein-Kinase C (PKC) Familie in derzeitigen Studien zugeschrieben [Cartee and Kucera, 2000]. Dies wurde unter anderem dadurch abgeleitet, dass PKC-Aktivatoren einen Resistenzphänotyp generieren können und PKC-Inhibitoren Zellen gegen Zytostatika stark sensibilisieren. In dieser Arbeit wurden zwei resistenzrelevante Faktoren untersucht: PKC  $\eta$  und Bcl-XL. Sie werden im Folgenden beschrieben.

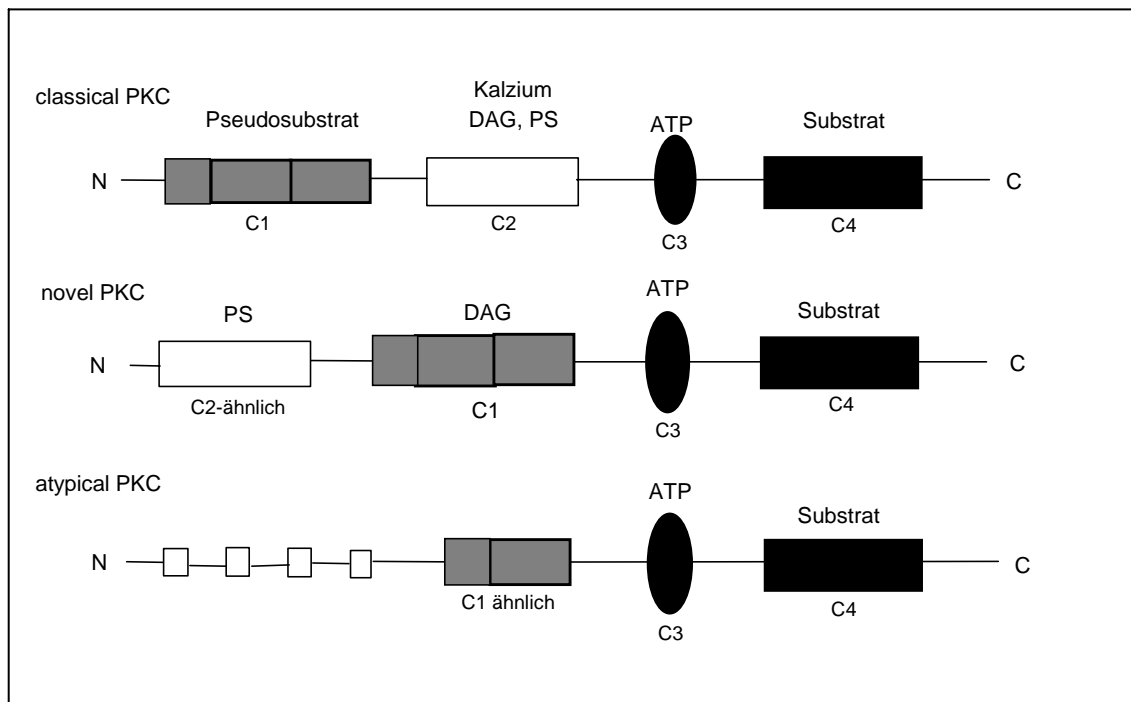
### **1.5.1 Die Protein-Kinase C Familie (PKC)**

Die Protein-Kinase C Familie besteht aus zwölf Mitgliedern von Serin/Threonin-Protein-Kinasen. Man kann sie bezüglich ihrer Struktur und biochemischen Eigenschaften in drei Gruppen einteilen [Newton, 1997; Mellor und Parker, 1998], (siehe Tab. 2). Die Isoenzyme der PKC-Familie sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Signaltransduktion der Kontrolle der Genexpression, der Zellproliferation und der Differenzierung, beteiligt [Nishizuka, 1992; Nishizuka, 1995; Newton, 1995]. Die Expression der einzelnen Isoformen, die unterschiedliche Verteilung in den verschiedenen Geweben und die Aktivierung durch differente Kofaktoren lassen vermuten, dass die einzelnen PKC-Isoenzyme unterschiedliche

biologische Funktionen in den Signaltransduktionswegen ausüben und unabhängig voneinander reguliert werden. Die Einteilung in die drei Untergruppen beruht im Wesentlichen auf den Unterschieden in den regulatorischen Domänen (siehe Abb. 3).

Subklasse	Aktivatoren	Vorkommen	Referenz
“classical“ PKC			
$\alpha$	Ca <sup>2+</sup> ; DAG; PS; FFA; lysoPC	ubiquitär	Nishizuka 1988 Nishizuka 1992
$\beta_1$	"	einzelne Gewebe	s.o.
$\beta_2$	"	viele Gewebe	s.o.
$\gamma$	"	Gehirn	s.o.
“novel“ PKC			
$\delta$	DAG; PS	ubiquitär	s.o.
$\epsilon$	DAG; PS; FFA; PIP <sub>3</sub>	ubiquitär	s.o.
$\eta$	DAG; PS; PIP <sub>3</sub> ; Cholesterinsulphat	Haut, Zunge, Ösophagus Magen, Trachea, Bronchus Herz	Kashiwagi, 2002 Nishizuka, 1992
$\theta$	?	Muskel, T-Zelle	
“atypical“ PKC			
$\iota$	?	viele Gewebe	Nishizuka, 1992 Selbie, 1993
$\zeta$	PS; FFA; PIP <sub>3</sub> ; Ceramid	ubiquitär	Nishizuka, 1988 Nishizuka, 1992
$\lambda$	PS		
“PKD“			
PKC $\mu$	DAG	?	Dekker 1995

**Tab. 2:** Einteilung der PKC-Isoenzyme nach ihren Aktivatoren: DAG: Diacylglycerol; PS: Phosphatidylserin; FFA: cis-ungesättigte Fettsäuren; lysoPC: Lyso-Phosphatidsäure; PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat nach [Newton, 1997; Mellor und Parker, 1998].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der PKC-Subfamilien anhand der konservierten Regionen (C1-C4), modifiziert nach [Goekjian et al., 1999].

Die konservierte katalytische Domäne besteht aus der Substrat- und ATP-Bindestelle (C3 und C4) und ist mit der regulatorischen Domäne (C1 und C2) verbunden. Durch zwei Kopien cysteinreicher Sequenzen mit Zink-Finger-Motiven erhalten die C1-Domäne der “classical PKC“ (cPKC) und der “novel PKC“ (nPKC) einen DNA-Bindeproteincharakter. Diese Sequenzen entsprechen den Bindungsstellen für DAG und Phorbol ester. Die fehlende Aktivierbarkeit der “atypical“ PKC (aPKC) ist auf ihre C1-Domäne zurückzuführen, die weder DAG noch Phorbol ester binden kann. Ein struktureller Unterschied der C2-Domäne der cPKC gegenüber derer der aPKC und nPKC bewirkt die Kalziumunabhängigkeit der beiden Letztgenannten [Mellor et al., 1998].

### 1.5.2 Protein-Kinase C $\eta$ (PKC $\eta$ )

Die Protein-Kinase C $\eta$  (PKC $\eta$ ) gehört der Gruppe der “novel“ PKC an (siehe Tab. 2). Ihre Sequenz wurde 1990 von einer cDNA aus Mäusehaut isoliert [Osada et al., 1990], dem humanen Chromosom 14 (14q22-23) und dem Mausechromosom 12 (12C3-D2)



zugeordnet [Quan und Fisher 1999; Chida et al., 1998]. Sie besitzt eine hohe Homologie zu PKC $\epsilon$  und enthält wie auch die classical PKCs, Zink-Finger-ähnliche cysteinreiche Sequenzen in der C1 Domäne, die dieser Kinase DNA-Bindeproteincharakter verleihen (siehe Abb 2). Diese Sequenzen entsprechen den Bindungsstellen für DAG und Phorbolster. PKC $\eta$  kann durch Diacylglycerol (DAG), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) und Cholesterinsulphat aktiviert werden (siehe Tab. 2). In humanen Keratinozyten ist PKC $\eta$  im Zytoplasma, insbesondere in der perinukleären Region lokalisiert, nicht jedoch im Kern [Kashiwagi et al., 2002]. Immunelektronenmikroskopisch konnte PKC $\eta$  im rauen endoplasmatischen Reticulum (RER) lokalisiert werden. Welche einzelnen Funktionen PKC $\eta$  ausübt, ist bisher nur ansatzweise aufgeklärt worden. Dabei zeigte sich jedoch bereits, dass PKC $\eta$  in unterschiedlichen Zellarten sehr unterschiedliche Effekte hervorrufen kann und an verschiedenen Signaltransduktionswegen wie beispielsweise dem Ras/MAPK-, dem Tyrosinkinase-, dem PKC $\mu$ /PKD- und dem cyclin/cdk Signaltransduktionsweg beteiligt ist [Kashiwagi et al., 2002]. An kurzzeitig kultivierten Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass PKC $\eta$  insbesondere den Prozess der Differenzierung fördert [Ohba et al., 1998; Kashiwagi et al., 2002]. In Glioblastomzelllinien induzierte PKC $\eta$  die proliferative Antwort auf TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) [Hussaini et al., 2000]. Während der frühen Entwicklung von B-Zellen spielt sie eine wesentliche Rolle in der Regulation der Zellteilung und der Induktion der Apoptose [Kashiwagi et al., 2002]. Dem gegenüber stehen neuere Beobachtungen, in denen PKC $\eta$  eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben wird [Basu, 1998; Akkaraju und Basu, 2000; Hussaini et al., 2002; Matsumura et al., 2003] und sie somit wesentliche Bedeutung in der Zytostatika-Resistenz bestimmter Tumorzellen haben könnte (siehe 1.5.3).

### **1.5.3 Protein-Kinase C (PKC) und Zytostatika-Resistenz**

Eine bedeutende Rolle der PKC in der Onkogenese [Caponigro et al., 1997] und in der Resistenzentwicklung von Tumorzellen konnte sowohl bezüglich der “upstream events“ als auch der “downstream events“ (siehe 1.5) gezeigt werden. Beispielsweise wird die Expression resistenzrelevanter Proteine der “upstream events“ wie der Gluthathion-S-Transferase, der Topoisomerase I und II, der dTMP-Synthase, der Proteine Fos und Jun, sowie des MDR-1 codierten Pgp unter anderem durch Phosphorylierung durch PKC-

Isoenzyme reguliert [Pommier et al., 1990; Chambers et al., 1993; Rushmore et al., 1993; Corbett et al., 1993; O'Brian et al., 1996; Lin et al., 1997]. Auch konnte durch den Einsatz von PKC-Aktivatoren in Pgp-überexprimierenden Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von Pgp und eine verminderte Zytostatikaakkumulation hervorgerufen werden [Fine et al., 1988; Gottesman et al., 1993]. Darüber hinaus konnte unter Anwendung von PKC-Inhibitoren eine erhöhte Zytostatikaakkumulation in Zelllinien beobachtet werden [Chambers et al., 1992; Bates et al., 1993; Sampson et al., 1993]. Neuere Studien zeigen, dass einzelne PKC-Isoformen sich an der Regulation der Apoptose beteiligen und damit für die "downstream events" von wesentlicher Bedeutung sind: Beispielsweise sensibilisiert eine Inaktivierung der PKCs Tumorzellen für die Zytostatika-induzierte Apoptose, wohingegen ihre Überexpression diese verhindert [Cartee und Kucera, 2000]. Eine besondere Rolle wird dem "novel"-Isoenzym PKC $\eta$  zugeschrieben. Ihre Expressionsgrade korrelieren mit dem Zytostatika-Resistenzgrad und der Expression resistenzrelevanter Gene in Tumorproben von Patienten mit Mammakarzinom [Beck et al., 1998a], bei metastasiertem Ovarialkarzinom in Tumorzellen aus Aszitesproben [Beck et al., 1998b] und in AML Blasten [Beck et al., 1996]. Die Expressionshöhe von PKC $\eta$  korreliert signifikant mit der Differenzierung der Mammakarzinomzellen in diesen Proben. Diese Korrelation wurde auch in anderen Studien im Bezug auf das Mammakarzinom [Masso-Welch et al., 2001] und das Colonkarzinom [Doi et al., 1994] gefunden. Eine besondere Bedeutung lassen neuere Studien vermuten, in denen sich PKC $\eta$  als effektiver Inhibitor der apoptotischen Kaskade darstellt: Überexpression von PKC $\eta$  in Mammakarzinomzelllinien führte zu Inhibition der durch TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose über Inhibition der Aktivierung von Caspase-8 und -7 [Basu, 1998; Akkaraju und Basu, 2000]. In Glioblastomzelllinien inhibierte PKC $\eta$  die durch UV- und ionisierende Strahlung induzierte Apoptose durch Suppression der Aktivierung von Caspase-9 [Hussaini et al., 2002]. Darüber hinaus zeigte sich PKC $\eta$  auch als effektiver Aktivator von Raf-1 [Schönwasser et al., 1989], das wesentlich an der Entwicklung von Chemoresistenz beteiligt ist [Weinstein-Oppenheimer et al., 2001]. In dieser Arbeit sollten die Einflüsse von PKC $\eta$  auf die Apoptose durch ihre Suppression mittels der Antisense Oligonukleotid-Technik in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 untersucht werden.

## 1.6 Das antiapoptotische Mitglied der Bcl-2 Familie Bcl-XL

Die Bcl-2 Familie ist eine Gruppe von Proteinen, die an der Regulation der Apoptose wesentlich beteiligt sind (siehe auch 1.1). Die Proteine Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 und A1 üben antiapoptotische Funktionen aus, während Bax und Bak proapoptotische Mitglieder, wie auch die "BH-3 only" Proteine Bad, Bik und Bid darstellen [Gross et al., 1999]. Dem Verhältnis der pro- und antiapoptotischen Mitglieder zueinander wird mittlerweile eine Schlüsselrolle in der Regulation zwischen Zellüberleben und Apoptose zugeordnet [Yang et al., 1996; Reed et al., 1996]. Das Bcl-2-Gen wurde in B-Zell-Lymphomen an der chromosomalen Translokationsstelle t(14;18) entdeckt [Tsujimoto et al., 1985]. Das Protein ist an der Mitochondrienmembran lokalisiert [Hockenbery et al., 1990]. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Bcl-2 und auch Bcl-XL mit der "mitochondrial permeability transition (PT) pore" interagieren und dessen Öffnen verhindern [Übersicht in Guido Kroemer, 1999]. Von den Mitochondrien aus fördern oder inhibieren die jeweiligen Bcl-2 Familienmitglieder unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C, das mit APAF-1 interagiert und so Caspase-9 aktivieren kann. Auf diesem Weg wird die Apoptose dann weiter über Caspase-7 und -3 aktiviert [Li et al., 1997]. Eine besondere Rolle wurde dem zellulären Faktor Bid zugeschrieben, da beobachtet wurde, dass er in Hepatozyten die über Anti-Fas-Antikörper ausgelöste Apoptose erleichtert [Yin et al., 1999] und somit auch Einfluss auf den rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg der Apoptose nimmt. Es wurde zudem ein Anstieg der Bcl-XL Konzentration als Reaktion auf ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika beobachtet und daher ein Zusammenhang zur "Multi Drug Resistance" postuliert [Choi et al., 1995; Zhan et al., 1996; Tu et al., 1998]. Darüber hinaus ist Bcl-XL in einer Vielzahl verschiedener Karzinomarten exprimiert [Übersicht in Grad et al., 2000]. Zwischen Bcl-XL und Bcl-2 besteht große Homologie [Übersicht in Grad et al., 2000]. Die Regulation von Bcl-XL und Bcl-2 ist jedoch unterschiedlich, was sich in einer inversen Korrelation zwischen Bcl-XL und Bcl-2 Konzentrationen widerspiegelt [Übersicht in Grad et al., 2000]. Es existiert bisher kein Modell, nach dem die Expression von Bcl-XL vorhergesagt werden kann. Bisher konnten lediglich Teile des komplizierten zellulären Signalnetzwerkes für die Bcl-2 homologen Proteine aufgeklärt werden: 1.) STAT, Rel/NF- $\kappa$ B und die Ets-Transkriptionsfaktor-Familie sind an der Regulation des Bcl-XL Gens beteiligt [Übersicht in Grad et al., 2000]. 2.) aktiviertes Ras, Integrin und Vitronectin können ebenfalls auf die Expression Einfluss

nehmen [Übersicht in Grad et al., 2000]. 3.) Bcl-2 kann über das Rb/Arf/p53 Netzwerk reguliert werden [Cory et al., 2002]. 4.) Auch die Überexpression des Bcl-2-Gens kann Ursache ungehemmten Wachstums entarteter Zellen sein. 5.) Eine Translokation t(14,18) des Bcl-2 Gens in eine Region, die unter dem Einfluss eines starken Promotors steht, kann der Überexpression zu Grunde liegen [Tujimoto et al., 1985; Yang et al., 1996]. In dieser Arbeit sollte die Wirkung der Suppression von Bcl-XL durch die Antisense Oligonukleotid-Technik auf die apoptotische Reaktion der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 im Vergleich zur Suppression von PKC $\eta$  untersucht werden.

## 1.7 Mechanismus der Antisense Oligonukleotide

Die Anwendung der Antisense Oligonukleotide ermöglicht es, die Übertragung der Information von DNA-Ebene auf die Protein-Ebene zu unterbinden bzw. einzuschränken. Dadurch kann eine Targetvalidierung interessanter Zielmoleküle, die beispielsweise Zytostatikaresistenz vermitteln gewährleistet werden. Spezifische Therapieansätze adjuvanter Chemotherapien unter Einsatz von Antisense Oligonukleotiden sind denkbar und werden bereits im Einzelfall blind geprüft. In Versuchen am zellfreien System konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression durch Unterbinden der Translation mittels einer einsträngigen Nukleinsäure, die komplementär zur mRNA ist, moduliert werden kann [Paterson et al., 1977]. 1978 konnte die Anwendung synthetischer Oligonukleotide komplementär zum 3'Ende des "Rous sarcoma virus" die Bildung neuer Viren in Gewebezellkulturen von Hühner-Fibroblasten inhibieren und die maligne Transformation der Zellen verhindern [Zamecnik und Stephenson, 1978]. Dieser Mechanismus beruht auf der Hybridisierung der Oligonukleotide mit der komplementären mRNA und folgender Aktivierung von RNase-H, die ihrerseits die mRNA spaltet, wodurch das Oligonukleotid freigesetzt wird und weitere mRNA-Moleküle binden kann [Tamm et al., 2001; Dias und Stein, 2002], bis es selbst durch intrazelluläre Endonukleasen und Exonukleasen abgebaut wird [Wickstrom, 1986; Akhtar et al., 1991; Eder et al., 1991]. Diese Mechanismen der Antisense Oligonukleotide der spezifischen Suppression bzw. "downregulation" eines Proteins findet eine weite Anwendung sowohl in in-vitro Studien als auch in klinischen Studien. Beispielsweise wird das erste kommerzialisierte Antisense Oligonukleotid

(Vitravene) in der Therapie der Cytomegalivirus Retinitis angewandt [Orr, 2001; Roehr, 1998]. Gegen Bcl-2 gerichtete Antisense Oligonukleotide konnten in der Therapie des Malignen Melanoms bereits Erfolge erzielen [Jansen et al., 2000]. Bei der Therapie des in Mäuse transplantierten nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms fanden gegen die mRNA von PKC $\alpha$  gerichtete Antisense Oligonukleotide zunächst erfolgversprechende Anwendung [Geiger et al., 1998]. Die Aufnahme der Antisense Oligonukleotide erfolgt bevorzugt in Tumorzellen, weniger jedoch in nicht maligne entartete Zellen [Tamm et al., 2001; Seitz et al., 2002]. Für die Aufnahme der Antisense Oligonukleotide werden verschiedene Wege beschrieben: 1.) Aktiver Transport über einen Transporter, dessen Aktivität von der Temperatur, Struktur und Konzentration abhängig ist [Loke et al., 1989], 2.) Pinocytose und Endocytose [de Diesbach, et al., 2000]. Um die Aufnahme zu erleichtern, stehen diverse Carrier wie beispielsweise Lipofectin, Eufectin, Cytofectin oder Lipofectamin zur Verfügung. Es bleibt jedoch letztlich ungeklärt, warum die Aufnahme bevorzugt in Tumorzellen erfolgt. Ein Problem in der Anwendung der Antisense Oligonukleotide besteht in der nicht ausreichenden selektiven Suppression einzelner Proteine [Benimetskaya et al., 1998] und den unspezifischen toxischen Effekt [Vaerman et al., 1997], der mit der chemischen Struktur in Zusammenhang stehen kann. Diese wurde mehrfach modifiziert, um diesen Problemen entgegen zu wirken: Zunächst wurden einsträngige 13-25 Basenlängen DNA-Molekülen durch eine methyl-Gruppe chemisch modifiziert. Dies kam der Stabilität zu Gute, reduzierte jedoch die Löslichkeit. Von den Methylphosphonaten über die Phosphorothioate, die eine weite Anwendung fanden, und die "PNAs", die an Stelle des Phosphat-Ribose-Rückrades ein Polyamid-Rückrad aufwiesen, bis hin zu 21-23 Basenlängen doppelsträngigen "siRNA" Molekülen, reichte die Palette der Modulationsversuche [Dias und Stein, 2002]. Durch sie konnte eine gewisse Minderung der oben genannten Probleme erzielt werden. Weitere Studien mit 2'-O-methyl-Oligonukleotiden, die unmodifizierte desoxy – "gaps" enthielten, konnten zeigen, dass eine Länge von vier Basen ausreicht, um die Ziel-mRNA durch RNase-H zu spalten [Inoue et al., 1987]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Antisense Desoxyoligonukleotid gapmere (gapmer-AODNs) eine signifikant höhere Antisense-Aktivität und geringere Toxizität gegenüber den auf Phosphothioat basierenden Antisense Oligonukleotiden besitzen [Monia et al., 1993]. In dieser Arbeit wurden gapmer-AODNs gegen PKC $\eta$  und Bcl-XL verwendet.

## 2. Material

### 2.1 Allgemein verwendete Reagenzien

Die Chemikalien wurden über die Universitäts-Apotheke Greifswald bezogen, die betreffenden weiteren Bezugsquellen sind in Klammern aufgeführt.

- PBS:

NaCl	9000 mg/ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	210 mg/ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	726 mg/ml

### 2.2 Reagenzien für die Zellkultur

Ham's F12K Medium, Glutamin, Penicillin G, Streptomycinsulphat, fetales Kälberserum (FKS), sowie Trypsin wurden von Biochrom KG Berlin bezogen.

#### 2.2.1 Kulturmedium

- Rezeptur eines Nährmediums auf Ham's F12K - Basis:

FKS	10 %
L-Glutamin	2 mM
PenicillinG Na	100 U/ml
Streptomycinsulphat	100 µg/ml

- Rezeptur eines Nährmediums auf Optimem-Basis (1)/(2)

(1)FKS / (2)FKS hitzeinaktiviert (30 min/56°C)	10 %
Pencillin G Na	100 U/ml
Streptomycinsulphat	100 µg/ml

75 ml Zellkulturflaschen und Sechslöcherkulturplatten wurden von NUNC Wiesbaden bezogen.

### **2.2.2 Reagenzien für die Vitalitätsbestimmung nach der Trypanblau-Methode**

Trypanblau (in PBS)	0,5 %
Trypsin-Lösung (in PBS)	
Trypsin	0,05 % (w/v)
EDTA	0,02 % (w/v)

### **2.2.3 Mycoplasmentest**

Mycoplasmen PCR ELISA (Boehringer, Mannheim)

### **2.2.4 Reagenzien zum Einfrieren von Zellen**

FKS  
Dimethylsulfoxid (DMSO)  
1,5 ml Kryo-Röhrchen von NUNC Wiesbaden

## **2.3 Antisense Desoxyoligonukleotid gapmer-Moleküle (gapmer-AODNs) für die Targetvalidierung in A549 Zellen**

Die Antisense Desoxyoligonukleotid gapmer-Moleküle gapmer-AODNs wurden freundlicherweise von Altana (Konstanz) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Sie wurden in Stammlösungen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Um die größte Effizienz der Suppression zu erreichen, wurden verschiedene Sequenzen komplementär zu PKC $\eta$ , Bcl-XL oder Bcl-2 randomisiert ausgewählt. Mittels Realtime

PCR (Taq Man PCR®) wurde die Effektivität der Suppression ermittelt. Es zeigte sich bei folgenden Sequenzen und Positionen auf der mRNA die stärkste Suppression von PKC $\eta$  und Bcl-XL durch die jeweiligen gapmer-AODNs:

PKC $\eta$  2 gapmer-AODN: 5'-CCTCCTTGCACATTCCGAAG-3' (Position 1673)

PKC $\eta$  7 Gapmer-AODN: 5'-AGGCCCGTACAGCATTTTCCT-3' (Position 1762)

Bcl-XL gapmer-AODN: 5'-CTACGCTTTCCACGCACAGT-3

Als Kontrolle diente: PKC $\eta$  2 inverses-gapmer:5'-GAAGCCTTACACCGTTCCTCC-3', das keine Änderung der Expression einer der untersuchten Zielmoleküle bewirkte.

Alle gapmer-AODNs wiesen eine Länge von 20 Basen auf und waren an den Basen 1-5 und 16-20 mit 2'-O-methoxyethyl-Resten auf einer Phosphorothioat-Basis modifiziert.

- Inkubationsreagenz:

Lipofectin (GIBCO)	1 mg/ml
--------------------	---------

## 2.4 Reagenzien für die Molekularbiologie

### 2.4.1 Allgemein benötigte Lösungen für die Molekularbiologie

- Ethanol, 70 %
- Tris-EDTA (TE)-Puffer
 

10 mM Tris	1,2 g/L
1 mM EDTA (250 mM)	4 ml/L
pH 7,5 mit HCl	
- Ethidiumbromid-Färbelösung
 

(in sterilem Wasser)	1 $\mu$ g/ml
----------------------	--------------



## 2.4.2 Reagenzien für die RNA-Isolation

Die RNA wurde mit dem RNeasy MiniKit® von Qiagen™ isoliert. Folgende Komponenten sind enthalten:

PufferRW1 (Wasch-Puffer)  
 Puffer RTL (Lyse -Puffer)  
 RPE Puffer (Wasch-Puffer[auf 55ml Puffer 44ml Ethanol])  
 RNase freies Wasser  
 (Zusammensetzung der Komponenten by Qiagen™)

## 2.4.3 Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese

Es wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose gegossen

- Elektrophoresepuffer für RNA-Proben

Na-Phosphat (pH 7,0)	10 mM
Formaldehyd	6 %

- RNA-Ladepuffer, vor Gebrauch frisch angesetzt:

Na-Phosphat 1M	100 µl
Formaldehyd in wässriger Lösung, 37%	160 µl
Formamid	500 µl
Glycerin	100 µl
Bromphenolblau	0,25 %

## 2.4.4 Reagenzien für die Realtime PCR (Taq Man PCR®)

Für das angewandte Gold RT-PCR® Ein-Schritt-Protokoll wurden folgende Komponenten verwendet:

*TaqManUniversal MasterMix(UMM)* Applied Biosystems

Reverse Transkriptase MuLV-RT	12,50 U
RNase-Inhibitor	20,00 U
RNase-freies Wasser	
10x TaqMan® Puffer A	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung	5,5 mM
dATP	300 µM
dCTP	300 µM
dGTP	300 µM
dUTP	600 µM
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	1,25 U
Primer 1	300 nM
Primer 2	300 nM
Sonde	100 nM

- Primer und Sonden für PKC $\eta$  und Bcl-XL mit Sequenzen und Positionen auf der mRNA:

PKC $\eta$  vorwärts Primer: 5'-ATGCTGTACGGGCCTTGCA-3'

(Position 1748)

PKC $\eta$  rückwärts Primer: 5'-CGTGACCACAGAGCATCTCATAGA-3'

(Position 1794)

Sonde: 5'-FAM-AACACGCCCATTGCCACCAGTCTA-TAMRA-3'

(Position 1767)

Bcl-XL vorwärts Primer: 5'-TGGA ACTCTATGGGAACAATGCA-3'

(Position 709)

Bcl-XL rückwärts Primer: 5'-TCAGGAACCAGCGGTTGAAG-3'

(Position 761)

Sonde: 5'-FAM-CCTGGCCCTTTCGGCTCTCGG-TAMRA-3'

(Position 736)

Die Sequenzen der Primer und Sonden für PKC $\eta$  und Bcl-XL wurden von Altana Konstanz freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Primer und Sonden wurden bei Metabion Martinsried, Deutschland käuflich erworben. Die 18S rRNA wurde als

endogene Kontrolle herangezogen, um trotz der Unterschiede im Gehalt der Gesamt-RNA zwischen den einzelnen Proben, eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen. Taq Man® 18 s rRNA Primer und VIC markierte Sonden wurden von Applied Biosystems bezogen und laut der Handhabungsanweisungen des Herstellers angewendet.

## **2.5 Reagenzien für die Western Blot Analyse von PKC $\eta$ und Bcl-XL**

### **2.5.1 Reagenzien für die Protein-Isolation**

- Reagenzien für Wasch-und Lyseschritte:

PBS

RIBA-Puffer: 40mM Tris-HCL (pH-7,4)

150 mM NaCl

1% Triton X 100

0,5 % Na Desoxycholat

0,1 % SDS

mit Protease-Inhibitor (Protease – Mix, Roche/Mannheim)

- Reagenzien für die Proteinbestimmung

Fertigreagenz (Pierce, Rockford/IL,USA)

Lösung A: 0,2 M NaOH-Lösung mit Natriumcarbonat,

Natriumbicarbonat, Natriumtartrat und Bicinchoninsäure

Lösung B: wässrige Kupfersulfatlösung

### **2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

- Sammelgel:

Polyacrylamid

5 %

Tris-HCl ( pH 6,8 )	0,125 mM
SDS	10 %

- Trenngel:

Polyacrylamid	8,5 %
Tris-HCl ( pH 8,3 )	0,38 mM
SDS	10 %

- Ladepuffer:

2 ml	Tris-HCl ( pH 6,8 )	0,625 M
5 ml	Glycerol	
2 ml	SDS	10 %
0,5 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol	
0,1 ml	Bromphenolblau-Lösung	1 % (w/v)
	in Ethanol und 2,4 ml H <sub>2</sub> O bidest	

- Elektrophoresepuffer:

10fach konzentrierte Stammlösung wurde stets frisch bereitet	
Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
Glyzin	192 mM
SDS	0,2 %

### 2.5.3 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen

PVDF-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland)

- Elektrophoresepuffer:

Tris-HCl ( pH 8,3)	5
mM	
Glyzin	38 mM
SDS	0,2 %
Methanol	20 % (w/v)

- Waschpuffer:

Tris-HCl (pH 6,7)	62,5 mM
-------------------	---------

- |   |                   |           |
|---|-------------------|-----------|
|   | β-Mercaptoethanol | 100 mM    |
| • TBS/T-Puffer:   |                   |           |
|   | Tris-HCl (pH 7,5) | 4 mM      |
|   | NaCl              | 100 mM    |
|   | Tween 20          | 0,05 %    |
| • TBS-Puffer mit Magermilchpulver (Sigma/Deisenhofen Deutschland) |                   |           |
|   |                   | 5 % (w/v) |

#### 2.5.4 Reagenzien zur Proteindetektion von Bcl-XL und PKCη

- Inkubationspuffer:
 

PBS-Puffer	
Rinderserumalbumin	0,5 %
  
- Antikörper:
 

Kaninchen Anti-PKCη polyklonaler Antikörper
Verdünnung: 1: 5000
(Santa Cruz Biotechnologie Heidelberg, Deutschland)
Maus Anti Bcl-XL monoklonaler Antikörper
Verdünnung: 1: 1000
(Santa Cruz Biotechnologie Heidelberg, Deutschland)
Ziege-Anti-Kaninchen (schwere Immunglobulin-Kette)
Peroxidase konjugierter monoklonaler Antikörper
Verdünnung: 1: 25. 000
(Dianova/Hamburg Deutschland)
Ziege-Anti-Maus-Peroxidase konjugierter monoklonaler
Antikörper
Verdünnung: 1:25.000;
(Dianova/Hamburg Deutschland)

- TBS/T-Puffer: 0,05 %
- Detektionslösungen:
  - ECL-System (Amersham/Braunschweig)
  - „Luminol“-Lösung
  - „Enhancer“-Lösung

## 2.6 Reagenzien für funktionelle Tests

### 2.6.1 Zytostatika

Die Zytostatika Taxol und Vincristin wurden über die Universitätsapotheke Greifswald bezogen, TNF $\alpha$  und TRAIL bei Peprotech (USA, Rocky Hill NJ). Sie wurden als Stammlösungen zu 100  $\mu$ M (Taxol), 1 mM (Vincristin), 10  $\mu$ g/ml (TNF $\alpha$ ) und 10  $\mu$ g/ml (TRAIL) angesetzt. Außer Vincristin, das bei +4 °C aufbewahrt wurde, wurden die Stammlösungen bei –20°C eingefroren. Als Lösungsmittel für die Stammlösung diente steriles Wasser.

### 2.6.2 Reagenzien für den Caspase-3-Aktivitäts-Test

- Lysepuffer:
 

Tris-HCl	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaHPO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	130 mM
Triton X 100	1 %
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 mM
- Caspase-AFC- Puffer
 

HEPES (pH 7,5)	20 mM
Glycerol	10 %
NaCl	100 mM

DTT	2 mM
Caspase-3-Substrat	25 µg/ml
EDTA	1 mM
CHAPS	0,1 %
Saccharose	10 %
pH 7,2	

- Caspase-3-Substrat:

Ac-DEVD-AFC ( Bachem, Heidelberg, Deutschland)

0,5 mg/ml in PBS lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.6.3 Reagenzien für die Durchflußzytometrie

- Fluoreszenzfarbstoff für Apoptose-Tests:

Propidiumjodid (Sigma/Aldrich Deisenhofen)

als Stammlösung in PBS (1 mg/ml) 2 µg/ml

- Test zur Aufnahme der gapmer-AODN in die Zellen:

FITC markierte Antisense-gapmere

Freundlicherweise von Altana (Konstanz)

zur Verfügung gestellt

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultivierung**

#### **3.1.1 Zelllinie**

Die Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurde bezogen von ATCC (Rockville, MD, USA)

#### **3.1.2 Auftauen und Kultivieren der Zellen**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Zellen wurden in  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut, in 10 ml supplementiertem Ham's-F12K Medium resuspendiert und bei 2100 Umdrehungen pro min in der Zentrifuge Rotixa 50 RS von Hettich bei  $4^{\circ}\text{C}$  10 min abzentrifugiert. Das verbleibende Zellsediment wurde in 1 ml supplementiertem Ham's-F12K Medium aufgenommen und in eine  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche in 24 ml des gleichen Mediums überführt. Bei  $37^{\circ}\text{C}$ , in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem 5%-igem Anteil von  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen kultiviert. Je nach Teilungsrate wurden die Zellkulturen entweder nach 48 h oder 72 h passagiert. Dazu wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die verbleibenden Zellen mit 2,5 ml Trysin/EDTA überschichtet und 8-10 min unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 7,5 ml supplementiertes Ham's-F12K Medium hinzugefügt und ein Zehntel des Volumens der Zellsuspension zur weiteren Kultivierung unter den oben genannten Bedingungen in eine neue Kulturflasche überführt.

#### **3.1.3 Einfrieren der Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet, 10 min bei 2100 Umdrehungen pro min in der Zentrifuge Rotixa 50 RS von Hettich bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, das verbleibende Zellsediment vorsichtig mit 70  $\mu\text{l}$  DMSO und 930  $\mu\text{l}$



FKS resuspendiert und in ein 1,5 ml Kryo-Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte in zwei Schritten: Erst 6 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  dann entgültig bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität (Trypanblau)**

Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der Zellen wurden in einer Neubauerzählkammer (Gesamtfläche  $9\text{ mm}^2$ , Höhe  $0,1\text{ mm}$ ) durchgeführt. Hierzu wurden  $0,5\text{ ml}$  Zellsuspension und  $0,5\text{ ml}$  Trypanblau-Lösung  $4\%$  (w/v) in PBS gemischt,  $5\text{-}15\text{ min}$  unter Kulturbedingungen inkubiert und die Zählkammer damit beschickt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Mittelwert aus 4 Quadranten (bestehend aus 16 Kleinquadranten) gebildet. Er entspricht der Zellzahl in  $0,1\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension. Der Anteil der blaugefärbten Zellen in einem Quadranten entspricht dem Anteil der toten Zellen in  $0,1\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension. Die Vitalität wurde ausgedrückt in Prozent der lebenden Zellen in der Zellsuspension.

### **3.1.5 Mycoplasmentest**

Der Mykoplasmentest wurde freundlicherweise in dem Hämatologisch-/Onkologischen Labor der Kinderklinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität von Frau Christine Stötzer durchgeführt.

Mycoplasmen können als Kontaminanten von Zellkulturen auftreten. Als Ursprung von Mycoplasmeninfektionen bei Zellkulturen kommen unter anderem das Kulturmediensupplement Kälberserum, das Laborpersonal sowie die Zellen der Zellkultur selbst in Betracht. Die Anwesenheit von Mycoplasmen ist nicht immer mikroskopisch erkennbar. Viele Mycoplasmenarten, besonders in kontinuierlich geführten Zelllinien wachsen langsam, ohne ihre Wirtszellen zu zerstören. Die Anwesenheit der Mykoplasmen kann jedoch zu veränderten Physiologie der Zellen führen, Genprodukte der Mykoplasmen (Enzyme, Toxine) können zu pH-Wert-Veränderungen führen und so wichtige Rahmenbedingungen für Metabolismus und Wachstum der Zellen verändern. Dies zeigt sich in Veränderungen der Vitalität, Morphologie sowie DNA-, RNA- und Proteinsynthese der Zellen. Die Folge sind nichtreproduzierbare Ergebnisse. Um die oben genannten Komplikationen zu

verhindern, wurden die für diese Arbeit verwendeten Zellen im Abstand von 4-6 Wochen auf Kontamination durch Mycoplasmen untersucht. Hierzu wurde der Mycoplasmen - PCR-ELISA Kit der Firma Boehringer-Mannheim verwendet. Dieser Test basiert auf der Amplifikation mycoplasmenspezifischer DNA-Sequenzen in der PCR und anschließender Detektion der amplifizierten DNA im ELISA. Im Prinzip besteht der Mycoplasmen-PCR-ELISA aus 5 Schritten:

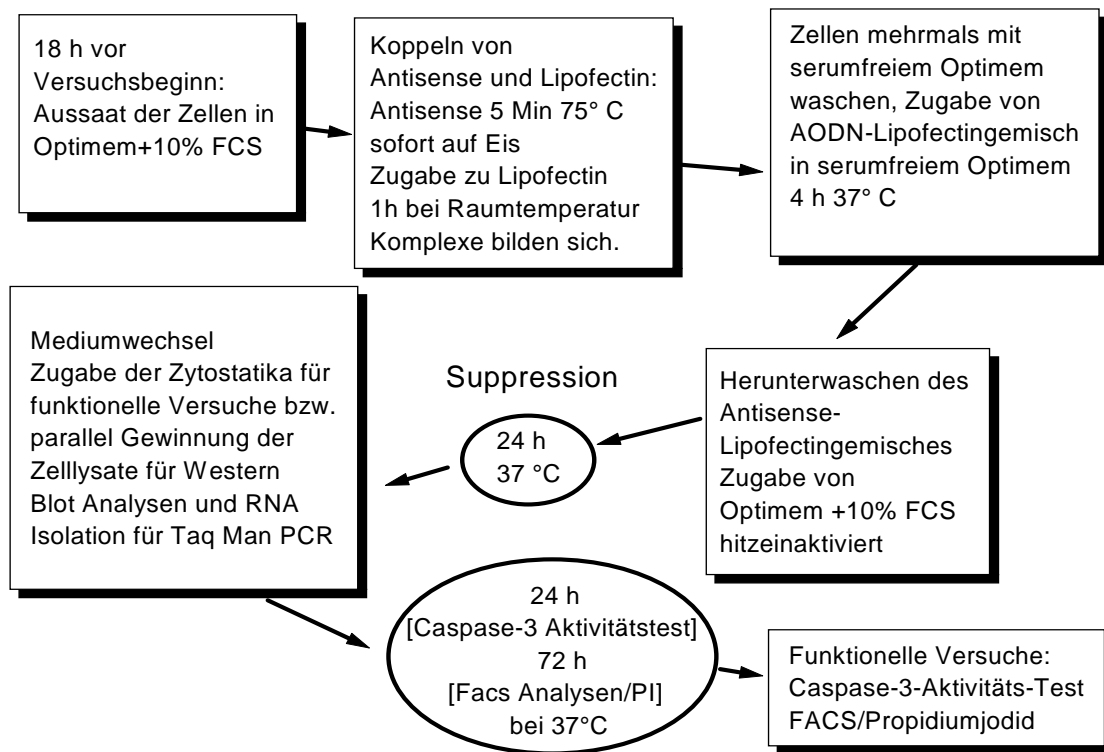
- 1: Anreicherung der Mycoplasmen in zellfreiem Überstand, basische Lyse der Mycoplasmen und Neutralisation des Lysats.
- 2: Amplifikation einer konservierten und Mycoplasmen spezifischen Region der DNA in Anwesenheit eines Digoxigenen markierten dUTP und Einbau des markierten dUTP in das Amplikon.
- 3: Denaturierung des markierten Amplikons durch NaOH.
- 4: Hybridisierung des einzelsträngigen PCR-Produktes an eine Biotin-markierte Sonde und Immobilisierung an eine streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte.
- 5: Detektion des immobilisierten Amplikons anhand eines Antikörpers gegen Digoxigenin, gekoppelt an eine Meerettich-Peroxidase und an das sensitive Peroxidase-Substrat 3,3',5,5', Tetramethylbenzidin (TMB).

Die detaillierte Vorgehensweise zur Durchführung des Mycoplasmentests ist der Anleitung des Herstellers zu entnehmen.

### **3.1.6 Gapmer-AODN-Behandlung von A549 Zellen zur Targetvalidierung**

In diesen Experimenten wurde versucht, die Suppression von PKC $\eta$ , Bcl-XL oder Bcl-2 durch Anwendung von Antisense Desoxyoligonukleotid gapmer-Molekülen (gapmer-AODNs) in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 zu erreichen. Die gapmer-AODNs wurden freundlicher Weise von Altana (Konstanz) zur Verfügung gestellt und, wie unter 2.3 beschrieben, synthetisiert. Als Kontrolle dienten ein Desoxyoligonukleotid - inverses-gapmer der PKC $\eta$  2 und die unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden 18 h vor Versuchsbeginn in supplementiertem Optimen (1) in Sechslöcherkulturplatten in einer Dichte von 0,1 Mio. Zellen/Loch ausgesät. Die Zellen sollten sich zu Versuchsbeginn in der Kulturplatte zu höchstens 50 % ausgebreitet haben. Eine weitere Voraussetzung für jegliche Zellversuche war eine Vitalität der Zellen von mindestens 95% nach der

Trypanblau-Methode. Für die Suppressionsversuche wurden die gapmer-AODNs mit Lipofectin zur Komplexierung gebracht. Das Mischungsverhältnis gapmer-AODNs/Lipofectin betrug in der Endkonzentration 0,2  $\mu\text{M}$  / 3,5  $\mu\text{g/ml}$ . Pro Loch der Sechslochkulturplatten wurden 100  $\mu\text{l}$  des Gemisches 20fach konzentriert zu 1900  $\mu\text{l}$  serumfreiem Optimem gegeben. Zunächst wurde die benötigte Lipofectin-Gesamtmenge in ein steriles Polysterolröhrchen gegeben und 20 mal mit der Pipette resuspendiert. 7  $\mu\text{l}$  des 1 mg/ml konzentrierten Lipofectins wurden für jeden Ansatz in ein Polysterolröhrchen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Währenddessen wurden die gapmer-AODNs-Stammlösungen je gapmer-AODN 20fach konzentriert angesetzt und je 93  $\mu\text{l}$  in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 5 min auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde je ein 93  $\mu\text{l}$  gapmer-AODN-Ansatz zu einem Lipofectinaliquot gegeben, vorsichtig gemischt und eine Stunde zur Komplexierung bei Raumtemperatur belassen. Die Zellen wurden in dieser Zeit durch zweimaliges Waschen mit serumfreiem Optimem vorbereitet. Dazu wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und 1,5 ml serumfreies Optimem hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Zuletzt wurden 1,9 ml serumfreies Optimem hinzugegeben. Nach Ablauf der einen Stunde wurde je ein Aliquot des gapmer-AODNs-Lipofectingemisches zu einem Loch der Sechslochkulturplatte gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine gleichmäßige Verteilung des Gemisches über den Zellrasen erreicht. Die Inkubation erfolgte 4 h unter Zellkultivierungsbedingungen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und zur weiteren Kultivierung 2 ml suplementiertes Optimem (2) in jedes Loch gegeben. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen nach 24 h entweder zur RNA-Isolation mit Trypsin/EDTA geerntet oder für die funktionellen Versuche mit Zytostatika versehen (siehe Abb.4).



**Abb. 4:** Ablauf der Behandlung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 mit gapmer-AODNs in Kombination mit Lipofectin und der anschließenden molekularbiologischen Analysen und funktionellen Versuche.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde eine Realtime PCR (Taq Man® PCR) durchgeführt und mittels Abi Prism 7700 (Applied Biosystems, Langen Germany) sequence-detection system (Taq Man®) quantifiziert. In dem verwendeten Ein-Schritt-Protokoll der Taq Man® PCR erfolgte die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase (MuLV RT) und die quantitative Amplifikation mit der AmpliTaq Gold® Polymerase in einem Schritt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNAsen wurde generell mit Handschuhen und RNase freiem Wasser gearbeitet. Es wurden sterile wattierte Pipettenspitzen und sterile Reaktionsgefäße verwendet. Für die RNA Isolation und die Taq Man® PCR wurden räumlich getrennte Arbeitsplätze und Pipettensätze verwendet.

### 3.2.1 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA wurde der RNeasy® Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden mit 350 µl RLT-Puffer® lysiert und in einer 0,5 mm Durchmesser Kanüle homogenisiert. 350 µl 70%iger Ethanol wurde hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die 700 µl Probe wurde in eine RNeasy mini spin® Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß überführt und 15 Sekunden bei 8000 g (10000 rpm) zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, 700 µl RW1® Puffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert und das Filtrat abermals verworfen. Mit 500 µl RPE® Puffer wurde die Säule durch Zentrifugieren wie oben gewaschen und der Durchfluß verworfen. 500 µl RPE® Puffer wurden in die Säule gegeben, diese 2 min bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert und das Filtrat mit dem Sammelgefäß verworfen. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Sammelgefäß gestellt, 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy® Membran pipettiert und für eine min bei 8000 g 10000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt.

### 3.2.2. Überprüfung der RNA Qualität

Zur RNA-Qualitätskontrolle wurde die denaturierende Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Der RNA-Ladepuffer wurde jeweils vor Versuchsbeginn frisch zubereitet. Nach Zugabe der RNA (1 µg RNA in 8 µl RNA-Ladepuffer) wurden die Proben 10 min auf 70°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Gele 10 min mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Qualität der RNA kann an der Intaktheit der ribosomalen 18S- und 28S-Banden überprüft werden. Des weiteren wurde die Qualität der RNA anhand des 18S RNA Signals nach Ablauf der Realtime PCR (Taq Man®) kontrolliert.

### 3.2.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA-Proben wurde photometrisch ermittelt (Gene Quant II, Pharmacia). Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht im Falle von RNA ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm ungefähr einer Konzentration von 37 µg/ml. Zur Messung wurde eine UV-Licht durchlässige

Quarzküvette (Ultra-Mikro-Quarzküvette, Bender + Hohbein, Ulm) eingesetzt. Das Messvolumen betrug 50 µl. Als Leerwert und Verdünnungsmittel für RNA-Proben (1:5) diente RNase-freies Wasser. Die Reinheit der RNA-Isolierung wurde anhand des Quotienten aus Absorptionsmessung bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) überprüft. Dieser Quotient liegt bei sehr reinen Nucleinsäure-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigungen durch Proteine oder EDTA an.

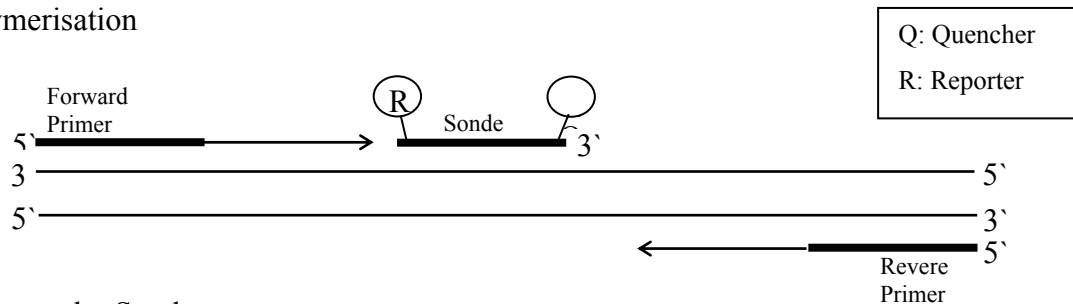
### **3.2.4 Realtime PCR (Taq Man PCR®)**

### **3.2.5 Prinzip der Realtime PCR (Taq Man PCR®)**

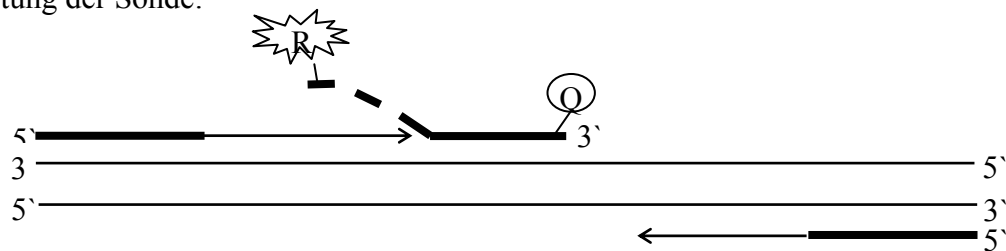
Die konventionelle PCR ermöglicht eine Quantifizierung einer Sequenz in einer DNA (cDNA) Probe, wenn die Zyklenzahl so gewählt wird, dass die Amplifikation sich noch im linearen Bereich befindet. Diese Zyklenzahl wird für jede Sequenz durch Bestimmung der Bandenintensität in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach unterschiedlichen Zyklenzahlen ermittelt. So kann eine vergleichende Expressionsanalyse verschiedener Sequenzen erfolgen oder das Expressionniveau einer Sequenz in verschiedenen Proben ermittelt werden. Bei der Realtime PCR (Taq Man PCR®) ermöglicht ein bei jeder Amplifikation abgegebenes Fluoreszenzsignal zu jedem Zeitpunkt der Reaktion die Ermittlung der Amplifikationsmenge anhand der Gesamt-Fluoreszenz ( $\Delta$ RN-Wert). Das Signal kann fortlaufend gemessen werden und die Intensität steigt mit Zunahme der Produktmenge. Das Prinzip des Fluoreszenzsignals beruht auf der räumlichen Trennung eines speziellen Farbstoffes (Quencherfarbstoffes, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin [TAMRA]) von einem Reporterfarbstoff (Fluorochrom VIC/FAM) dessen Fluoreszenzsignal bei räumlicher Nähe durch den Quencherfarbstoff unterdrückt wird. Erst bei der räumlichen Trennung kann das Signal des Reporterfarbstoffes gemessen werden. Die beiden Farbstoffe sind an eine Sonde, welche aus einem kurzen DNA-Fragment besteht, gebunden. Die Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) der Sonde entspricht etwa der, der Primer einer konventionellen PCR. Ihre Bindungsstelle liegt zwischen den Primerpaaren. Durch die Position des Reporterfarbstoffes am 5'-Ende und des Quencherfarbstoffes am 3'-Ende erfolgt bei Spaltung der Sonde durch eine Taq-Polymerase die räumliche Trennung der Farbstoffe. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'-

3'-Exonucleaseaktivität und kann bei der Elongation des PCR-Produktes die Sonde abbauen.

Polymerisation



Spaltung der Sonde:



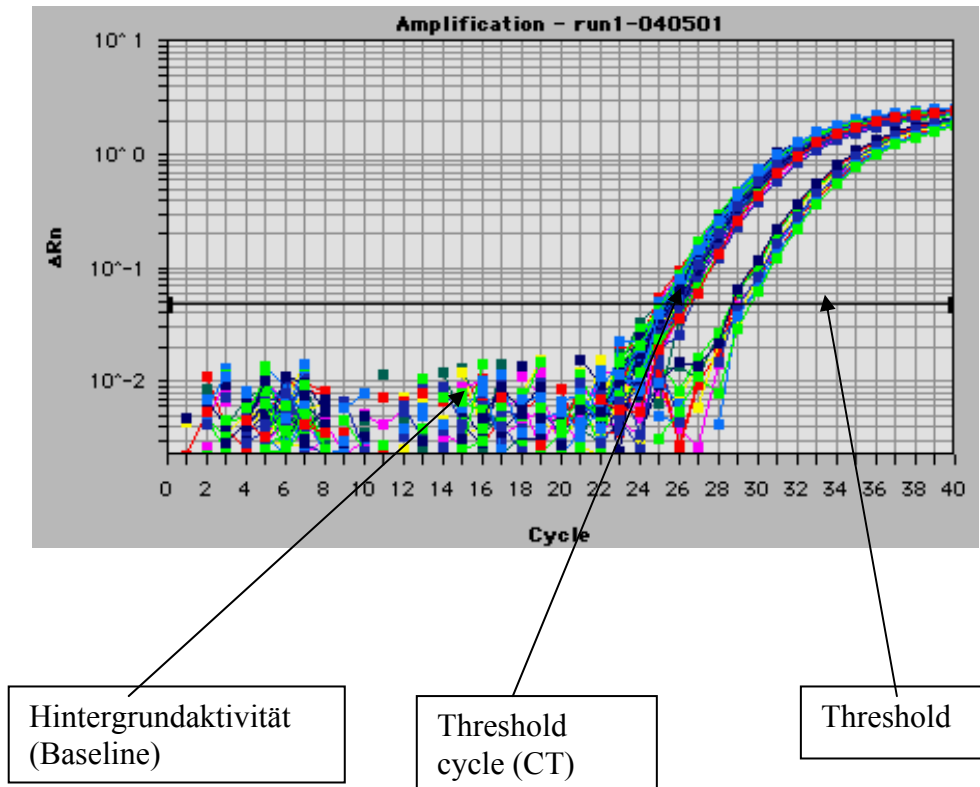
Ende des Zyklus



Abb. 5: Prinzip der Taq Man® PCR

### 3.2.6 Auswertung der Realtime PCR (Taq Man® PCR)

Werden die nach jedem Zyklus gemessenen Signale ( $\Delta$ RN-Wert) gegen die Zykluszahl aufgetragen erhält man eine Darstellung des Reaktionsverlaufes (Amplificationplot) der einzelnen Ansätze. Es kann die Hintergrundaktivität der Sonde (Baseline) bestimmt werden. Für eine Auswertung auf Grund der Fluoreszenzintensität ist es notwendig, dass ihr Anstieg im linearen Bereich liegt. Dies ist der Fall, wenn die Fluoreszenzintensitäten der Ansätze die Baseline um ein Zehnfaches übersteigen. Dieser Intensitätswert wird als Schwelle (Threshold), der Zyklus, in dem diese erreicht wird als Schwellenzyklus (Threshold Cycle[CT]) bezeichnet.



**Abb. 6:** Amplificationplot

Um die Effizienz der Suppressionsversuche zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit die  $d\Delta CT$ -Auswertungsmethode gewählt. Hierbei wurde die 18S RNA als vergleichendes Referenzgen in jeder Probe mit amplifiziert, um trotz unterschiedlicher Gesamt-RNA-Expressionsraten der einzelnen Proben eine vergleichende Quantifizierung zu ermöglichen.

Berechnung der  $d\Delta CT$  Werte:

Zielsequenz CT – 18S RNA CT =  $\Delta CT$  Zielsequenz

Kontroll CT – 18S RNA CT =  $\Delta CT$  Kontrolle

$\Delta CT$  Zielsequenz -  $\Delta CT$  Kontrolle =  $d\Delta CT$

Die  $d\Delta CT$ -Werte wurden als negativer Exponent der Basis 2 gesetzt und somit die Kontrolle gleich 1 bzw. 100 % gesetzt.



### 3.2.7 Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA in der Realtime PCR (Taq Man PCR®)

In dieser Arbeit wurden die Bestandteile des Taq Man PCR® Master Mixes von Applied Biosystems verwendet. Die Sequenzen der Primer und der Sonden wurden von Altana (Konstanz) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Primer und Sonden wurden bei Metabion (Martinsried) kommerziell erworben. Aus dem Protokoll der Taq Man PCR® wurde das Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-PCR® gewählt, bei welchem die Reverse Transkription und die Amplifikation in einem Reaktionsgefäß zeitlich direkt hintereinander ablaufen. Die Synthese der cDNA aus RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase MuLV-RT (Applied Biosystems) durchgeführt. Diese DNA-Polymerase besitzt sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität und synthetisiert an einzelsträngigen RNA-Templates cDNA. Zur Einleitung der Reversen Transkription wurden in dieser Gold RT-Taq Man PCR® die gleichen Primer wie für die Amplifikation verwendet. In Vorversuchen wurden die optimalen Konzentrationsverhältnisse von Primern und Sonde ermittelt. Dabei wurden die Konzentrationsverhältnisse gewählt, welche den niedrigsten CT-Wert und den höchsten  $\Delta$ RN-Wert ergaben. Es ergab sich folgende Zusammensetzung eines 25  $\mu$ l Ansatzes in RNase-freiem Wasser:

5 ng RNA,

12,5  $\mu$ l 2x Taq Man Master Mix (Applied Biosystems),

100 nM Sonde,

300 nM von jedem Primer,

1,25  $\mu$ l 20x 18S rRNA,

Alle Messungen wurden als Dreifachansatz durchgeführt.

Die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase ist eine chemisch modifizierte Form der rekombinanten Ampli Taq (Thermus aquaticus) DNA Polymerase. Das Enzym wird erst durch eine 9-12 minütige Inkubation bei 95°C irreversibel in seine aktive Form überführt. Hier entsprechen die Eigenschaften und Leistungsdaten denen der Ampli Taq DNA Polymerase, wodurch konventionelle PCR Protokolle übertragbar werden, zumal die Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) der Sonde im Bereich derer der

Primer liegt. Das Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT Taq Man PCR® enthält folgende Schritte:

Reverse Transkription	48°C für 30 min
AmpliTaq Gold-Aktivierung	95°C für 10 min
40 Zyklen:	
Denaturierung	95°C, 15 sec
Annealing der Primer/Sonde und Polymerisation	60°C, 1 min

### **3.3 Western Blot Analyse der PKC $\eta$ und des Bcl-XL auf Proteinebene**

#### **3.3.1 Prinzip der Western Blot Analyse**

Nach Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Elektrotransfer auf Membranen werden die Zielproteine durch spezifische Antikörper markiert. Ein zweiter, Peroxidase-konjugierter Antikörper, der gegen Teile der spezifischen Antikörper gerichtet ist, macht die Zielproteine detektierbar: Die Peroxidase erzeugt durch Oxidation von Substraten aus einer zugeführten Detektionslösung eine Lumineszenz, (Licht mit bestimmter Wellenlänge) die zur Schwärzung des aufgelegten Hyperfilmes führt. Durch Entwicklung der Filme und Digitalisierung der Signale mit einer Videokamera kann eine densitometrische Auswertung mit entsprechender Software erfolgen.

Die Western Blot Analysen wurden ab 3.3.3 freundlicherweise in dem Labor von Frau Dr.Cornelia Müller der Universitäts-Kinder-Klinik Greifswald der Ernst-Moritz-Arndt-Universität von Frau Ulrike Glave durchgeführt. Die Western Blot Analysen des Bcl-XL wurden von Beginn an freundlicherweise von Steffen Meißner (Peter Holtz Research Center of Pharmacology and experimentel Therapeutics, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) durchgeführt.

### 3.3.2 Gewinnung der Proteinproben für PKC $\eta$ und Bcl-XL

Aus Suppressionsversuchen für Bcl-XL und PKC $\eta$  wurden je 7 Löcher (ca  $1,4 \times 10^6$  Zellen) von Sechslochkulturplatten benötigt, um eine ausreichende Menge an Protein für die Western Blot Analyse zu erhalten. Als Kontrolle dienten auch hier die mit dem PKC $\eta$  2 inversen-gapmer-ODN behandelten und die unbehandelten Zellen. 24 h nach gapmer-AODN-Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Zellen sofort auf Eis gestellt. Je Sequenz wurden je drei Löcher mit 20  $\mu$ l gekühltem Lyse-Puffer versetzt, 15 min auf Eis belassen, dann die bereits lysierte Zellschicht mit einem Gummischaber vorsichtig abgeschabt und mit einer Pipette in das nächste Loch überführt. Alle Lysate wurden nach mehrfacher Wiederholung dieses Schrittes bis in das 7. Loch überführt. Nach weiteren 15 min wurde die lysierte Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerten Proben wurden aufgetaut, auf Eis gehalten und 45 sec mit Ultraschallwellen (Bronson Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company/Danbury, CT, USA) auf Stufe II behandelt. Anschließend wurde die Probe 5 min in kochendem Wasser erhitzt, wieder auf Eis gestellt, abzentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Fertigreagenzien (Pierce, Rockford/IL, USA). Dazu wurden je 25  $\mu$ l des Lysates in ein Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Costar/Kümmerling) pipettiert und mit 200  $\mu$ l eines Gemisches der Reagenzien A und B im Verhältnis 50/1, versetzt. Aus einer 5%igen Albumin-Lösung wurde eine Standard-Reihe mit 8 Konzentrationsstufen von 25  $\mu\text{g/ml}$  bis 2000  $\mu\text{g/ml}$  mitgeführt. Die Proben wurden 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und dann in einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) mit dem Programm BCA-Proteinbestimmung bei einer Wellenlänge von 390/510 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden an Hand einer Eichgeraden der mitgeführten Standard-Reihe bestimmt.

### **3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das Volumen der Proteinlösungen der Zellysate aus den Suppressiosversuchen wurden so gewählt, dass je 60 µg Protein in ein Eppendorfgefäß überführt werden konnten. Mit gleichem Volumen an Lade-Puffer wurden die Proben aufgefüllt, 5 min in siedendem Wasser erhitzt und auf Eis gestellt. Nach Abkühlung wurden die Aliquots je Zielprotein auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel mit den Kontrollproben aufgetragen. An die 3 cm lange Sammelstrecke der Gele schloss sich ein Trenngel von 10 cm Länge an. Aus einer 10fach konzentrierten Stammlösung wurde der Elektrophorese-Puffer frisch angesetzt. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Spannung von 120 V, bei Erreichen der Proben des Trenngels mit konstanter Spannung von 240 V durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde Rainbow RPN 800 (Amersham, Buckinghamshire, England) aufgetragen.

### **3.3.5 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen**

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten vorsichtig abgelöst und je 10 min in Elektrotransfer-Puffer gelegt. Währenddessen wurden PVDF-Membranen (Millipore/Eschborn, Deutschland) mit Methanol benetzt, einmal mit zweifach destiliertem Wasser für 10 min in Elektrotransfer-Puffer gelegt. Der Elektrotransfer erfolgte über 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA. Dazu wurden die vorbereiteten Filter auf die Gele gelegt und beides zusammen je Zielprotein in eine Transferkammer (Biorad, München, Deutschland) eingespannt. Nach beendetem Elektrotransfer wurden die Filter zunächst einmal 10 min bei Raumtemperatur und anschließend zweimal mit TBS/T-Puffer gewaschen. Für die AK-Inkubation wurden die Filter durch eine 1stündige Inkubation mit TBS-Puffer von 5 % (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur abgesättigt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.

### 3.3.6 Proteindetektion von PKC $\eta$ und Bcl-XL

Im Anschluss an den Elektrotransfer der Proteine auf die Filter wurden diese je Zielprotein in Inkubationspuffer unter Zugabe der entsprechenden Antikörper bei +4 °C über Nacht inkubiert.

Anti-PKC $\eta$ polyklonaler Antikörper: Verdünnung 1:5000; Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Anti-Bcl-XL monoklonaler Antikörper: Verdünnung 1:1000; Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Anti Kaninchen IgG: Peroxidase-konjugierter-monoklonaler Antikörper: Verdünnung: 1:25.000; Dianova, Hamburg, Germany
Anti Maus IgG Peroxidase-konjugierter monoklonalerAntikörper: Verdünnung: 1:25.000; Dianova, Hamburg, Germany

**Tab. 3:** Konzentration der Antikörper:

Es folgten ein Waschschrift für 1 min und drei über 15 min in 50 ml TBS/T-Puffer. Die Inkubation mit dem zweiten Peroxidasekonjugierten-monoklonalen Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:25.000 in 20 ml 0,05 % TBS/T Puffer über 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Filter dreimal in 50 ml 0,05 % TBS/T-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion von PKC $\eta$  und Bcl-XL erfolgte mit dem ECL-System (Amersham, Biosciences, Freiburg, Deutschland). Hierzu wurden die Lösungen „Luminol“ und „Enhancer“ 1:1 gemischt und die Filter damit benetzt. Unter Lichtschutz wurden die benetzten Filter in einer Röntgenfilmkassette mit einer Klarsichtfolie und dem Hyperfilm-ECL (Amersham, Biosciences, Freiburg, Deutschland) abgedeckt. Die Entwicklung erfolgte nach Inkubationszeiten zwischen 30 sec und 10 min nach Standardbedingungen. Die Digitalisierung der Signale erfolgte durch die CS1-Videokamera (Cybertech, Berlin), die densitometrische Auswertung mit der WINCAM-Software (Cybertech, Berlin).

### 3.4 Funktionelle Versuche

In den funktionellen Versuchen sollten zwei Parameter untersucht werden:

Die Veränderung der Caspase-3-Aktivität nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen und folgender Inkubation unter Zytostatika bezogen auf ein Loch einer Sechslöcherkulturplatte als Maß für die sich in apoptotischer Reaktion befindenden Zellen (siehe Einleitung).

Die unterschiedliche Anfärbbarkeit der DNA durch Propidiumjodid nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen, bezogen auf  $2 \times 10^4$  Zellen, als Zeichen des Verlustes der Membranintegrität, welcher als sehr spätes Apoptose-Merkmal und Nekrosezeichen gewertet werden kann.

Die Aufnahme der gapmer-AODNs in die Zellen wurde durch Verwendung FITC-markierter gapmer-AODNs geprüft.

#### 3.4.1 Kultivierung unter Zytostatikaapplikation

In Vorversuchen wurden durch die Bestimmung der  $IC_{50}$  Bereiche der verwendeten Zytostatika mit der Durchflußzytometrie die eingesetzten Konzentrationsstufen ermittelt (siehe Tab. 4).

Taxol	nM	0 10 30 100
Vincristin	nM	0 30 100 300
TNF alpha	ng/ml	0 3 10 30 100
TRAIL	ng/ml	0 3 10 30 100

**Tab 4:** Konzentrationen der verwendeten Zytostatika nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen

24 h nach den Suppressionsversuchen wurde der Überstand von den Sechslöcherkulturplatten abgesaugt und die Zellen mit 2 ml frischem supplementiertem

Optimum (2) pro Loch versetzt. 20 µl einer 100fach konzentrierten Zytostatikalösung der jeweiligen Konzentrationsstufe wurden in jedes Loch pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Kulturplatte sollte eine gleichmäßige Verteilung der Zytostatikalösung über die Zellen erreicht werden. Es folgte im Falle des Caspase-3-Aktivitäts-Testes eine 24stündige, bei der Analyse mittels Durchflußzytometrie eine 72stündige Inkubation unter Zellkulturbedingungen.

### **3.5 Caspase-3-Aktivitäts-Test**

#### **3.5.1 Prinzip des Caspase-3-Aktivitäts-Testes**

Caspase-3 gehört zu der ICE/CED-3 Cystein-Protease Familie, die wesentlich an der Signalkaskade der Apoptose beteiligt sind (siehe Einleitung), indem sie die Proteolyse wichtiger Proteine wie z.B. im Falle der Caspase-3 der poly(ADP ribose) Polymerase (PARP) einleiten. PARP wird am C-terminalen Ende von Asp-216 durch Caspase-3 gespalten. Die davorliegende Sequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) ist ein hochspezifisches Substrat für Caspase-3. Ac-DEVD-AFC ist ein synthetisches Substrat für Caspase-3, in welchem diese Sequenz von PARP(DEVD) an ein Molekül (AFC) gekoppelt ist, welches bei Abspaltung Licht bestimmter Wellenlänge (Fluoreszenz) freisetzt. Diese Fluoreszenz kann an einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen werden und als Maß für die Caspase-3-Aktivität gewertet werden.

#### **3.5.2 Caspase-3-Aktivitäts-Test**

In Optimierungsversuchen wurde ermittelt, dass infolge einer Zeitspanne von 24 h nach Zytostatikaapplikation eine maximale Caspase-3-Aktivität unter sonst gleichbleibenden Bedingungen gemessen werden konnte. Die Zellen aus Suppressionsversuchen und folgender 24 h Inkubation unter Zytostatika wurden mit Trypsin/EDTA geerntet, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde auf Eis gehalten und verbleibende Überstandreste durch vorsichtiges Abtrocknen des Röhrchens mit einem Papiertuch ohne Berühren des Zellpellets entfernt. Unter Hinzugabe von 100 µl Lyse

Puffer wurden die Zellen 15 min lysiert. Der Caspase-Puffer wurde stets erst vor dem jeweiligen Experiment mit 2 mM DTT versetzt und bei 4°C gehalten. Für die Stammlösung aus Caspase-Puffer und Substrat wurden 100 µl Caspase Puffer und 10 µl des bei -20°C aufbewahrten und lichtgeschützt aufgetauten Caspase-3-Substrates AFC multipliziert mit der Anzahl der Proben angesetzt, gut gemischt und lichtgeschützt auf Eis gehalten. Die inzwischen lysierten Proben wurden mit 110 µl dieser Stammlösung versetzt, 5 mal auf und ab pipettiert und 210 µl in eine 96-Loch Multititerplatte überführt. Ein Leerwert mit Wasser an Stelle der Proben und ein Leerwert von 210 µl Wasser wurden mitgeführt. Die Platte wurde bei 37°C für 2 h inkubiert und dann die Fluoreszenz an einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen. Die gemessene Fluoreszenz je Probe ist ein Maßstab für die Caspase-3-Aktivität der Zellen eines Loches der Sechslöcherkulturplatte.

### **3.6 Durchflußzytometrie**

#### **3.6.1 Prinzip der Durchflußzytometrie**

Durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ermöglicht die Durchflußzytometrie Analysen einer einzelnen Zelle aus einer Zellsuspension mittels eines von einer Seite auf die Zelle gerichteten Laserstrahls. Die Veränderungen des Laserstrahls hinter der Zelle lässt Rückschlüsse auf die Morphologie oder Fluoreszenzeigenschaft der Zelle ziehen. Eine starke Streuung des Lichtes spricht für eine starke Granularität der Zelle (SSC, Side Scatter). Die Größe der Zelle lässt sich durch das nicht abgelenkte, gerade an der Zelle vorbeischießende Licht bestimmen (FSC-Forward Scatter). Fluoreszenzeigenschaften, also Farben werden in den Kanälen der unterschiedlichen Wellenlängen gemessen (z.B. rot FL-2 Kanal mit einer Emission von 620nm, grün FL-1 mit einer Emission von 525nm) Detektorplatten nehmen das Spektrum des Laserlichtes hinter der Zelle, für unterschiedliche Wellenlängen getrennt auf und übertragen es in elektrische Signale. Dies ermöglicht die Auswertung der gemessenen Signale mit einer speziellen Software in der z. B. in einem zweidimensionalen Koordinatensystem der oben genannten Parameter jede analysierte Zelle einem Punkt entspricht. Die Punktwolke entspricht dann der gemessenen



Zellpopulation. In wenigen Sekunden können einige 1000 Zellen auf diese Weise analysiert werden.

### **3.6.2 Zelltod-Analysen in der Durchflußzytometrie mit Propidiumjodid**

In Vorversuchen wurde ermittelt, infolge welcher Zeitspanne nach Zytostatikaapplikation ein gleichmäßiger Verlust der Zellmembranintegrität in den eingesetzten Zytostatikakonzentrationsbereichen unter sonst gleichbleibenden Bedingungen gemessen werden konnte. Folglich wurden für die Propidiumjodidanalyse die Zellen aus Suppressionsversuchen nach 72 h Inkubation unter Zytostatika mit Trypsin/EDTA geerntet. Dazu wurde der Überstand für jedes Loch der Sechslöchkulturplatte getrennt in 15 ml Röhrchen überführt, jedes Loch mit 2,5 ml Trypsin/EDTA überschichtet und 8 min unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die adhären wachsenden Zellen durch vorsichtiges Klopfen an der Platte gelöst, mit 1 ml des jeweiligen Überstandes versetzt, gewaschen und die gesamte Zellsuspension in das dazugehörige 15 ml überführt. Bei 2100 U und 4°C wurden die Zellen 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet mit 0,5 ml supplementierten HAMS Medium resuspendiert, in ein FACS Röhrchen überführt und auf Eis gehalten. Je 10 min vor der Analyse einer Probe am Durchflußzytometer (Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland) wurden die Röhrchen mit 1 µl einer 1 mg/ml konzentrierten Propidiumjodidlösung versetzt, durch Auf- und Abpipettieren und Vortexen gemischt. Als Kontrolle für die Propidiumjodidmessung wurde je ein Röhrchen ohne Propidiumjodid mitgeführt. Die Einstellungen am Durchflußzytometer wurden so gewählt, dass die ungefärbte Kontrollpopulation der Zellen im FSC ungefähr zwischen 300 und 700, im FL2-Kanal nicht über  $10^2$  zu liegen kam. Mit derselben Einstellung wurden dann die mit Propidiumjodid versetzten Ansätze gemessen. Es wurden 20000 Zellen mit einer Flussrate von ca. 1000/sec gemessen. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil eines Ansatzes an Propidiumjodid-negativen Zellen (FL2 unter  $10^2$ ) ausgewählt, der dem prozentualen Anteil lebender Zellen des Ansatzes, also eines Loches der Sechslöchkulturplatte gleichgesetzt werden kann.

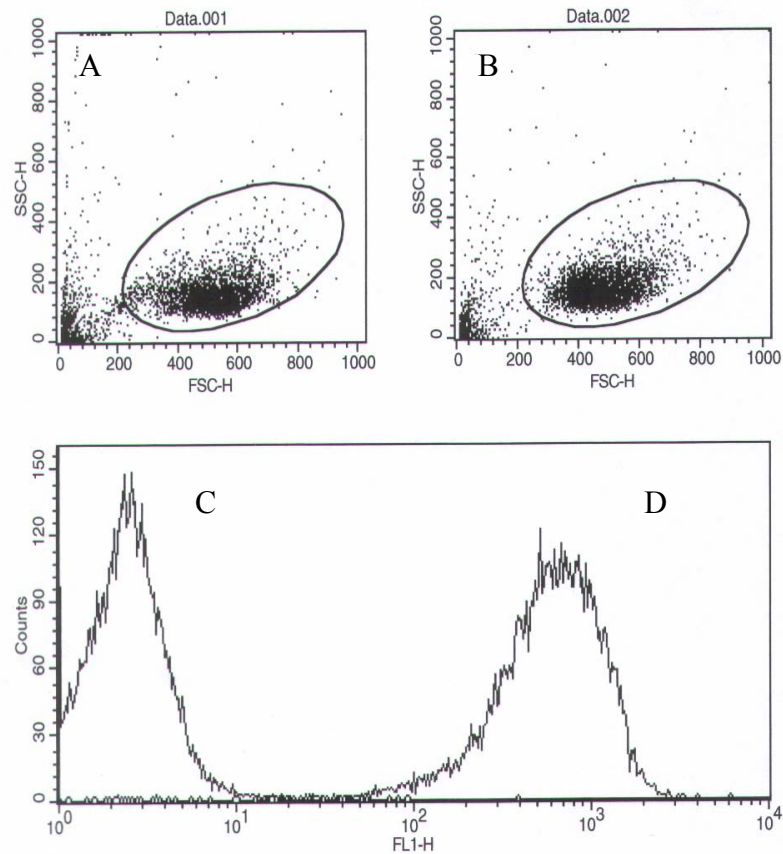
### **3.7 Test zur Aufnahme der gapmer-AODNs mit der Durchflußzytometrie**

Die Zellen wurden wie bei der gapmer-AODN-Behandlung, jedoch mit FITC-markierten gapmer-AODNs inkubiert, mit Trypsin/EDTA geerntet und in die FACS-Röhrchen überführt. Die Messung am Durchflußzytometer erfolgte wie in 3.6.2. Zusätzlich wurde der FL1-Kanal aufgenommen, dessen Wellenlängenspektrum unter den zur Verfügung stehenden Kanälen die größte Übereinstimmung mit der Fluoreszenz des FITC-markierten Farbstoffes aufweist. Für die rote Fluoreszenz wurde der FL-3 Kanal gewählt, um die beim FL2-Kanal vorhandenen Überschneidungen des Wellenlängenspektrums mit dem des FITC-markierten Farbstoffes zu vermeiden. Die Einstellungen am Gerät wurden so gewählt, dass sich die ungefärbten Kontrollzellen bei der Einstellung  $y=FL3$  und  $x=FL1$  im linken unteren Quadranten jeweils unter  $10^2$  befanden. Der prozentuale Anteil der FITC-positiven Zellen einer Probe wurde in der Einstellung  $y = FL1$  /  $x = FSC$  ermittelt. Dazu wurde die Region über  $FL1 = 10^2$  als FITC positiv definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Test zur Aufnahme FITC-markierter gapmer-ODNs in die Lungenadenokarzinomzelllinie A549

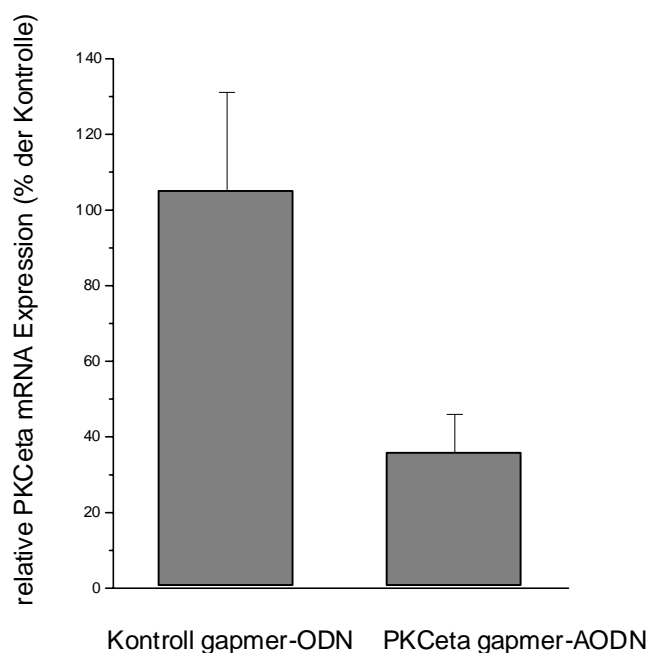
Die Behandlung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 mit FITC-markierten gapmer-ODNs zeigte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz der behandelten Zellen gegenüber der Fluoreszenz der mit unmarkierten gapmer-ODNs behandelten Zellen im FL-1 Kanal (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Aufnahme FITC-markierter gapmer-ODNs in die Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach Behandlung der Zellen mit FITC-markierten gapmer-ODNs. (Behandlung der Zellen siehe 3.1.6). A: Kontrollpopulation behandelt mit unmarkierten gapmer-ODNs, B: Zellpopulation behandelt mit FITC-markierten gapmer-ODNs, C: Fluoreszenz der Zellen behandelt mit unmarkierten gapmer-ODNs im FL-1 Kanal (grün) Mittelwert:2,8, D: Fluoreszenz der Zellen behandelt mit FITC-markierten gapmer-ODNs im FL-1 Kanal (grün) Mittelwert: 674.

## 4.2 Genexpressionsanalysen mit der Realtime PCR (Taq Man PCR ®) nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen PKC $\eta$

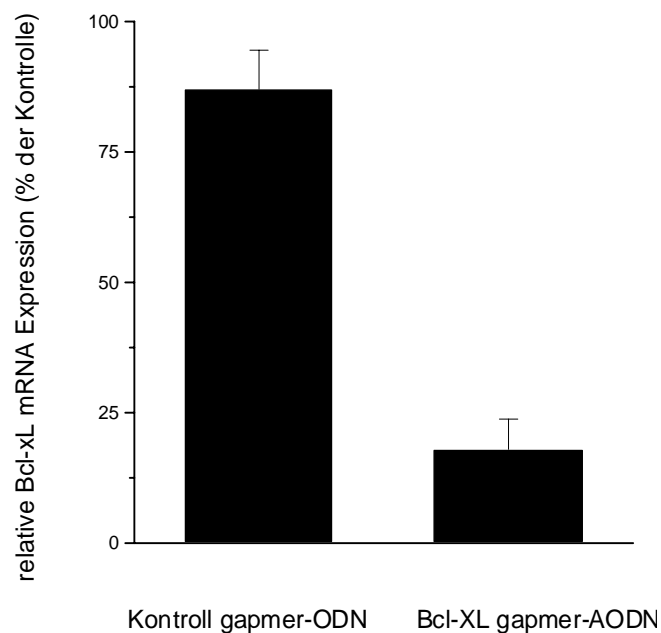
In diesem Versuchsabschnitt wurde die Supprimierbarkeit von PKC $\eta$  auf mRNA-Ebene durch Anwendung der gapmer-AODNs (200 nM) in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 untersucht. Die RNA wurde 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen geerntet. Die Expressionsrate in den unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt und die der mit gapmer-AODN behandelten Zellen jeweils darauf bezogen. Es zeigte sich eine Reduktion der mRNA um 64 % in den mit PKC $\eta$  gapmer-AODNs behandelten Zellen. Das Kontroll gapmer-ODN zeigte im Vergleich zu völlig unbehandelten Zellen keine Effekte (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** Expressionsanalysen von PKC $\eta$  mittels Realtime PCR (Taq Man PCR ®) in Lysaten der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM PKC $\eta$  gapmer-AODN bzw. 200 nM Kontroll gapmer-ODN. Die Abb. zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängig durchgeführten Bestimmungen, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Expression in unbehandelten Zellen.

### 4.3 Genexpressionsanalysen mit der Realtime PCR (Taq Man PCR<sup>®</sup>) nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL

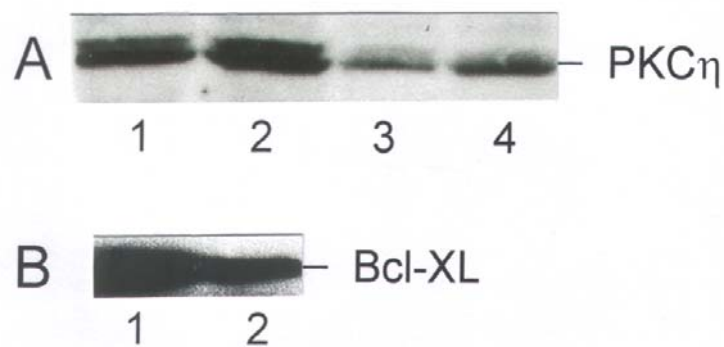
In diesen Expressionsanalysen wurde die Suppression von Bcl-XL 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM Bcl-XL gapmer-AODNs in A549 Zellen auf mRNA-Ebene untersucht. Es zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine Reduktion der mRNA um 82 %. In den mit Kontroll gapmer-ODNs behandelten Zellen konnte keine signifikante Suppression beobachtet werden (siehe Abb. 9). Die Expressionswerte der mit gapmer-AODNs behandelten Zellen wurden als prozentualer Anteil der Expressionswerte der unbehandelten Zellen dargestellt (siehe Abb. 9).



**Abb. 9:** Expressionsanalysen von Bcl-XL mittels Realtime PCR (Taq Man PCR<sup>®</sup>) in Lysaten der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM Bcl-XL gapmer-AODN bzw. 200 nM Kontroll gapmer-ODN. Die Abb. zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängig durchgeführten Bestimmungen, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Expression in unbehandelten Zellen.

#### 4.4 Western Blot Analysen der PKC $\eta$ auf Proteinebene nach gapmer- AODN-Behandlung der Zellen

Auch auf Proteinebene wurde die Supprimierbarkeit von PKC $\eta$  durch Anwendung der gapmer-AODNs-Technik mittels Western Blot Analysen untersucht werden. Es zeigte sich eine deutliche Minderung des Proteins in den mit 200 nM PKC $\eta$  7 gapmer-AODN behandelten Zellen gegenüber des Proteins der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen (siehe Abb. 10 A). Die Western Blot Analysen der PKC $\eta$  wurden ab 3.3.3 freundlicherweise in dem Labor von Frau Dr.Cornelia Müller der Universitäts-Kinder-Klinik Greifswald der Ernst-Moritz-Arndt-Universität von Frau Ulrike Glave durchgeführt.



**Abb. 10:** Western Blot Analysen der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung. Die Auftrennung des jeweiligen Gesamtproteins (60  $\mu$ g) erfolgte über ein 10%iges Polyacrylamidgel: **A:** 1 und 2: nach gapmer-ODN-Behandlung mit 200 nM Kontroll gapmer-ODN, 3 und 4: nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM PKC $\eta$  7 gapmer-AODN. **B:** 1: nach gapmer-AODN-Behandlung mit Bcl-XL gapmer-AODN, 2: nach gapmer-ODN-Behandlung mit Kontroll gapmer-ODN.

#### 4.5 Western Blot Analysen des Bcl-XL auf Proteinebene nach gapmer-AODN-Behandlung

Bei der Anwendung von Bcl-XL gapmer-AODNs in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurde die Suppression von Bcl-XL ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des Proteins nach Anwendung von 200 nM Bcl-XL-gapmer-AODN gegenüber des Proteins der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten

Zellen (siehe Abb. 10 B). Dieses Experiment wurde freundlicherweise von Steffen Meißner (Peter Holtz Research Center of Pharmacology and experimental Therapeutics, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt.

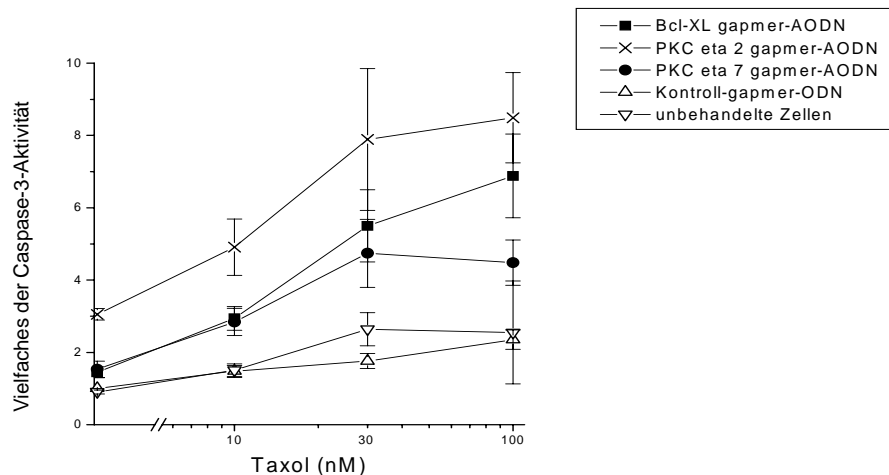
#### **4.6 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung**

In diesen Analysen wurde die Höhe der Caspase-3-Aktivität in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 als Parameter für die Menge der sich in apoptotischer Reaktion befindenden Zellen erfasst. Die Messung erfolgte pro Loch einer Sechslöcherkulturplatte nach 24stündiger Inkubation unter Zytostatika, welche 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen mit je 200 nM der entsprechenden gapmer-AODNs hinzugefügt wurden (siehe Abb. 4). Zur Darstellung der einzelnen Caspase-3-Aktivitäten wurde der Nullwert der Kontrolle gleich 1 gesetzt und alle Werte entsprechend umgerechnet. Die Signifikanztestung der Daten erfolgte mittels T-Test.

##### **4.6.1 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol oder Vincristin**

Es zeigte sich bei Verwendung von PKC $\eta$  gapmer-AODNs in Kombination mit Taxol gegenüber der Kontrolle für alle Werte eine signifikante, dosisabhängige Caspase-3-Aktivitätssteigerung. Die Signifikanztestung mittels T-Test ergab Werte von  $p < 0,05$  bis  $p < 0,0001$ . Bei Inkubation mit 100 nM Taxol 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN konnte eine Vervielfachung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle um 3,7 ( $p = 0,005$ ) für das PKC $\eta$  7 gapmer-AODN um 2,0 beobachtet werden ( $p < 0,0001$ ). In den mit Kontroll-ODN behandelten Zellen zeigten sich keine Effekte (siehe Abb. 11). Auch bei Inkubation mit Vincristin zeigte sich für alle Konzentrationsstufen bei Verwendung der PKC $\eta$  gapmer-AODNs eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Der T-Test ergab Werte von  $p < 0,05$  bis  $p < 0,0005$ . Die Inkubation mit 300 nM Vincristin führte bei Anwendung des PKC $\eta$  2 gapmer-AODN zu einer Vervielfachung der

Caspase-3-Aktivität um 3,6 ( $p < 0,01$ ), bei PKC $\eta$  7 gapmer-AODN um 2,6 ( $p < 0,005$ ). Es zeigte sich keine wesentliche Caspase-3-Aktivitätssteigerung in den mit Kontroll-ODN behandelten (siehe Abb. 12).



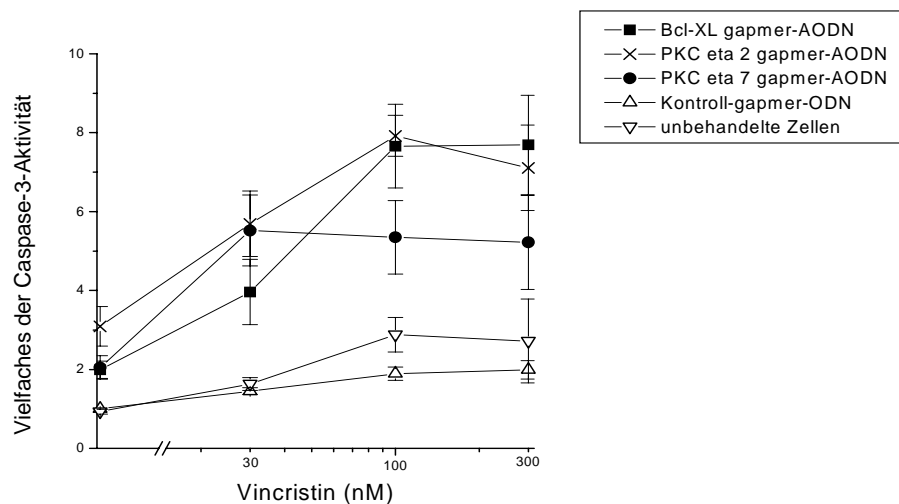
**Abb. 11:** Caspase-3-Aktivität der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 24 h Inkubation mit Taxol welches 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde: Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-13 unabhängigen Experimenten mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, PKC $\eta$  7 gapmer-AODN und Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A459 Zellen (Die Caspase-3-Aktivität bei 0 nM Taxol der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt).

#### 4.6.2 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol oder Vincristin

Auch bei der Anwendung von Bcl-XL gapmer-AODNs konnte in Kombination mit Taxol eine dosisabhängige Caspase-3-Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Für alle Caspase-3-Aktivitätswerte zeigten sich die Unterschiede zur Kontrolle im T-Test signifikant:  $p < 0,005$  bis  $p < 0,0005$ . Die Inkubation mit 100 nM Taxol 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit Bcl-XL gapmer-AODNs führte zu einer Vervielfachung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle um 3,0 ( $p < 0,0005$ ). Die Behandlung der Zellen mit Kontroll gapmer-ODN zeigte keine Effekte (siehe Abb. 11). Die Kombination der gapmer-AODN-Behandlung mit Vincristin führte wie bei Taxol zu



einer signifikanten, dosisabhängigen Steigerung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle mit Werten von  $p < 0,0005$  bis  $p < 0,0001$ . Bei 300 nM Vincristin wurde eine Vervielfachung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle um das 3,9fache ( $p < 0,0001$ ) beobachtet. Auch hier zeigte die Kontroll gapmer-ODN-Behandlung der Zellen keine Effekte (siehe Abb. 12).

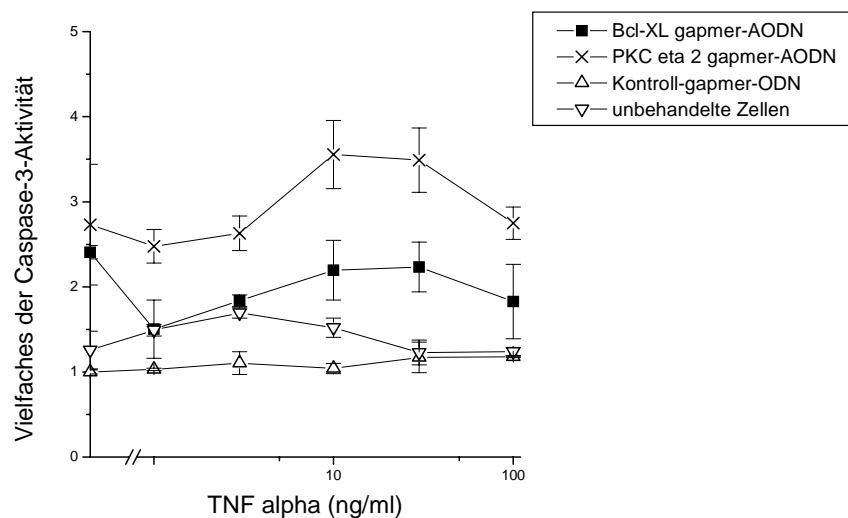


**Abb. 12:** Caspase-3-Aktivität der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 24 h Inkubation mit Vincristin welches 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde: Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4-10 unabhängigen Experimenten mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, PKC $\eta$  7 gapmer-AODN und Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A459 Zellen (Die Caspase-3-Aktivität bei 0 nM Vincristin der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt).

#### 4.6.3 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$ und TRAIL

Eine nicht für alle Konzentrationen signifikante Caspase-3-Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrolle wurde bei Anwendung von PKC $\eta$  gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$  beobachtet. Es zeigte sich lediglich bei 3 ng/ml TNF $\alpha$  eine Signifikanz von  $p < 0,05$ . Bei Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und Suppression durch PKC $\eta$  2 gapmer-AODN zeigte sich eine Verstärkung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle um das 3,4fache. In den mit Kontroll gapmer-ODN

behandelten Zellen wurde keine wesentliche Caspase-3-Aktivitätssteigerung beobachtet (siehe Abb. 13). Auch bei Inkubation mit TRAIL zeigte sich bei Verwendung der PKC $\eta$  gapmer-AODNs eine leichte Steigerung der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Die Inkubation mit 10 ng/ml TRAIL führte zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität um das 3,7fache. Die Anwendung der Kontroll gapmer-ODN führte zu keiner Caspase-3-Aktivitätssteigerung gegenüber der in den unbehandelten Zellen (siehe Abb. 14).

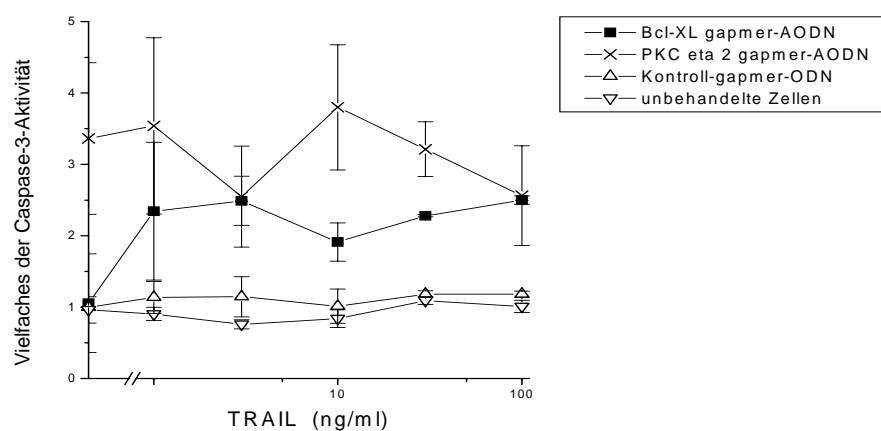


**Abb. 13:** Caspase-3-Aktivität der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 24 h Inkubation mit TNF $\alpha$  welcher 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 2 unabhängigen Experimenten mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A459 Zellen (Die Caspase-3-Aktivität der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen ohne TNF $\alpha$  wurde gleich 1 gesetzt).

#### 4.6.4 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$ und TRAIL

Bei Anwendung von Bcl-XL gapmer-AODNs in Kombination mit TNF $\alpha$  konnte eine leichte Caspase-3-Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Sie zeigte sich bei Anwendung von 3 ng/ml signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Anwendung der

Kontroll gapmer-ODNs führte nicht zu einer Steigerung der Caspase-3-Aktivität (siehe Abb.13). Die Inkubation mit TRAIL zeigte eine signifikante Steigerung der Caspase-3-Aktivität bei Anwendung der Bcl-XL gapmer-AODNs gegenüber der Kontrolle. Im T-Test zeigten sich Werte von  $p < 0,05$  bis  $0,01$ . In Kombination mit 10 ng/ml TRAIL zeigte sich eine Caspase-3-Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrolle um das 1,9fache ( $p < 0,05$ ). In den mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen zeigte sich keine Auswirkung auf die Aktivität der Caspase-3 (siehe Abb. 14).



**Abb. 14:** Caspase-3-Aktivität der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 24 h Inkubation mit TRAIL welcher 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde: Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus 2 unabhängigen Experimenten mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A549 Zellen (Die Caspase-3-Aktivität der mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen ohne TRAIL wurde gleich 1 gesetzt).

Bei allen Versuchen zeigte sich bereits in den ohne Zytostatika behandelten Zellen eine zum Teil signifikante Caspase-3-Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrolle und den unbehandelten Zellen. Dies konnte besonders bei Anwendung des PKC $\eta$  2 gapmer-AODN aber auch bei PKC $\eta$  7 gapmer-AODN und Bcl-XL gapmer-AODN beobachtet werden (siehe Abb.11-14). In den jeweils höchsten Konzentrationsstufen der Zytostatika zeigte sich ein erneuter Abfall der Caspase-3-Aktivität, insbesondere in Kombination mit PKC $\eta$  gapmer-AODNs und bei Bcl-XL-gapmer-AODNs (siehe Abb.11-14).

## **4.7 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie**

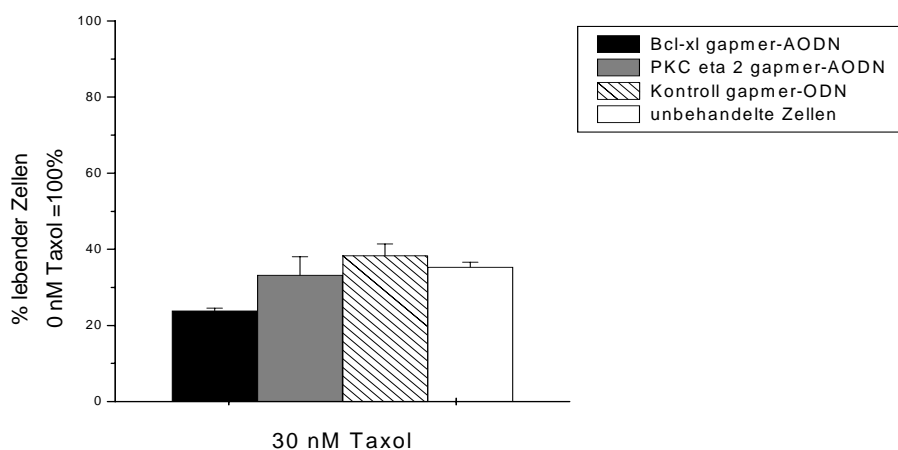
In diesem Versuchsabschnitt wurde die Aufnahme von Propidiumjodid nach Verlust der Zellmembranintegrität in die Zellen mit folgender Anfärbbarkeit der DNA durch Propidiumjodid untersucht. Die nichtanfärbbaren Zellen wurden als vitale Zellen gewertet (siehe 3.6.2). Der Test erfolgte im Anschluss an einen Suppressionsversuch mit jeweils 200 nM der entsprechenden gapmer-AODNs und einer 72h Inkubation unter Zytostatika welche 24 h nach erfolgter gapmer-AODN-Behandlung appliziert wurden (siehe Abb. 4). Zur Signifikanztestung wurde der T-Test angewandt.

### **4.7.1 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol oder Vincristin**

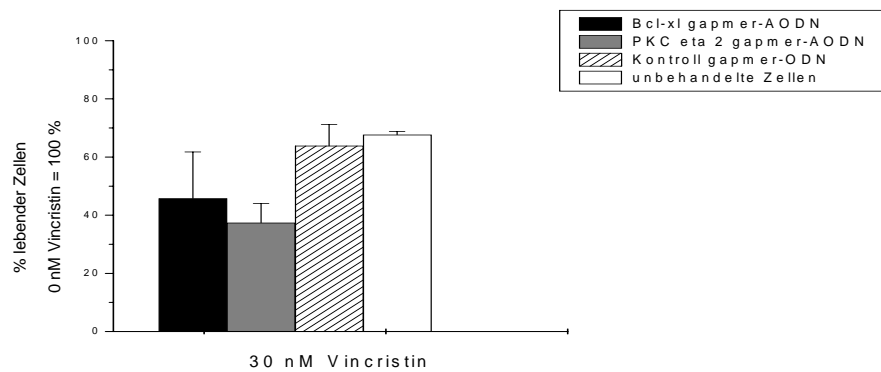
Die Inkubation mit 30 nM Taxol führte bei Suppression durch PKC $\eta$  2 gapmer-AODN zu einer signifikanten Minderung des Anteils lebender Zellen gegenüber des Anteils lebender Zellen in den mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb.15). Die Behandlung mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN in Kombination mit 30 nM Vincristin führte gegenüber der Kontrolle zu einer Minderung der vitalen Zellen um 26,4 % ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 16).

#### 4.7.2 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol oder Vincristin

Bei Suppression mit Bcl-XL gapmer-AODN und anschließender Inkubation mit 30 nM Taxol zeigte sich eine signifikante Minderung des Anteils der lebenden Zellen gegenüber der Kontrolle um 14,5 % ( $p=0,05$ ) (siehe Abb.15). Auch bei Anwendung von Bcl-XL gapmer-AODN und anschließender Inkubation mit 30 nM Vincristin zeigte sich ein signifikanter Effekt: Es wurde eine Reduktion des Anteils der lebenden Zellen gegenüber der Kontrolle um 18 % ( $p<0,05$ ) beobachtet (siehe Abb.16).



**Abb. 15:** Propidiumjodid-Analyse in der Durchflußzytometrie der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 72 h Inkubation mit 30 nM Taxol, welches 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde: Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A549 Zellen (der prozentuale Anteil lebender Zellen der jeweiligen Proben ohne Taxol wurde gleich 100 % gesetzt).



**Abb. 16:** Propidiumjodid-Analyse in der Durchflußzytometrie der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach 72stündiger Inkubation mit 30 nM Vincristin welches 24 h nach gapmer-AODNs-Behandlung der Zellen hinzugefügt wurde: Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils PKC $\eta$  2 gapmer-AODN, Bcl-XL gapmer-AODN, Kontroll gapmer-ODN und unbehandelte A459 Zellen (der prozentuale Anteil lebender Zellen der jeweiligen Proben mit 0 nM Vincristin wurde gleich 100 % gesetzt).

Bei den Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie zeigten sich in den Ansätzen ohne Zytostatika die Unterschiede im Anteil lebender Zellen in den mit gapmer-AODN behandelten Zellen gegenüber den mit Kontroll gapmer-ODN behandelten Zellen stets auch signifikant.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Genexpressionsanalysen mittels Realtime PCR (Taq Man PCR®) und Western Blot Analysen nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ oder Bcl-XL**

Die Anwendung der gapmer-AODNs gegen PKC $\eta$  in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 führte zu einer deutlichen Suppression der PKC $\eta$  sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Dies zeigte sich in einer Reduktion der mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 64 % in der Realtime PCR (Taq Man PCR®) und einer deutlichen Minderung des Proteins in der Western Blot Analyse, wohingegen die Behandlung mit Kontroll gapmer-ODN keine Effekte zeigte (siehe 4.2 und 4.4). Bei der gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL zeigte sich ebenfalls eine effektive Suppression des Bcl-XL auf mRNA-Ebene und Proteinebene, die sich in einer Reduktion der mRNA gegenüber der mRNA der unbehandelten Zellen um 82 % und einer deutliche Reduktion des Proteins in der Western Blot Analyse zeigte (siehe 4.3 und 4.5). Der Nachweis der oben genannten Suppressionen der beiden Proteine stellt eine wesentliche Voraussetzung dar, um sicherzustellen, dass der Phänotyp der Caspase-3-Aktivierung mit einer spezifischen Suppression des Zielmoleküls einhergeht und damit auch sehr wahrscheinlich durch die verminderte Aktivität verursacht wurde.

### **5.2 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test**

Als Bewertungsmaßstab, ob die Suppression eines der Zielmoleküle Tumorzellen signifikant sensibilisiert, wurde ein Endpunkt der apoptotischen Signaltransduktionskaskade, die Caspase-3-Aktivität gemessen (siehe Abb. 2). Die Aktivitätsniveaus von Caspase-3 in der Zellsuspension wurde als Maß für die sich in apoptotischer Reaktion befindenden Zellen gewertet. Bei allen Versuchsabschnitten in denen gapmer-AODNs gegen PKC $\eta$  oder Bcl-XL angewandt wurden, zeigte sich bereits in den ohne Zytostatika behandelten Zellen eine deutliche Caspase-3-aktivierende Wirkung der supprimierten Targets (siehe Abb. 11-14): Die Suppression von PKC $\eta$  oder Bcl-XL führte zu einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle.

Dies ist vermutlich auf den Verlust der antiapoptotischen Wirkung der beiden Proteine zurückzuführen, wodurch die Zellen bereits ohne Zytostatika gegenüber dem spontanen Eintreten einer apoptotischen Reaktion aktiviert wurden. Darüber hinaus wurde nahezu in allen Experimenten in den mit der höchsten Zytostatikakonzentration behandelten Zellen ein erneutes Absinken der Caspase-3-Aktivität beobachtet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Caspase-3 durch die hohe Toxizität dieser Konzentrationsbereiche schneller aktiviert und das Maximum der Aktivität bereits vor dem Zeitfenster der Messung erreicht wurde. Darüber hinaus könnte der toxische Effekt einen Teil der Zellen so stark geschädigt haben, dass der aktive energieverbrauchende Prozess der Apoptose, der mit Transkriptionsaktivität einhergeht, nicht mehr eingeleitet werden könnte. Des Weiteren ist es möglich, dass einige Zellen bei diesen Konzentrationen bereits direkt in die Nekrose (siehe Tab. 1) übergingen. Der Caspase-3-Aktivitäts-Test ist unter folgendem Hintergrund zu bewerten: Er zeigt die Aktivität der Caspase-3 der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt an. Die Aktivierung der Caspase-3 ist jedoch ein Teil des aktiven energieverbrauchenden Prozesses der Apoptose, dessen Ablaufgeschwindigkeit von vielen Faktoren abhängt, wie beispielsweise der Zytostatikadosis. Das Maximum der Aktivierung wird je Dosis zu einem differenten Zeitpunkt erreicht, so dass man mit einer Messung nicht alle Aktivitätsmaxima erreicht. Um dennoch einen Vergleich zu ermöglichen, wurde hier der Zeitpunkt 24 h nach Zytostatikaapplikation gewählt, da die meisten Konzentrationen, zu einem Maximum der Caspase-3-Aktivität nach dieser Zeitspanne führten. Daher können die Unterschiede der Caspase-3-Aktivität bei Suppression verschiedener Targets trotz der hier beobachteten Mechanismen verglichen und bewertet werden, sofern die in Optimierungsversuchen ermittelten Rahmenbedingungen für die Experimente je Zytostatikum konstant gehalten werden.

### **5.2.1 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ gapmer-AODNs in Kombination mit Taxol® oder Vincristin**

In diesen Experimenten wurde die Funktion der PKC $\eta$  im Bezug auf die Resistenz der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 gegenüber Taxol® untersucht. Es zeigte sich bei Suppression von PKC $\eta$  durch gapmer-AODNs eine signifikante Sensibilisierung der Zellen gegenüber Taxol®. Dies zeigte sich in einem signifikanten Anstieg der Caspase-



3-Aktivität um das 3,7fache gegenüber der Kontrolle ( $p=0,005$ ) bei Anwendung des PKC $\eta$  2 gapmer-AODN in Kombination mit 100 nM Taxol® (siehe Abb. 11), so wie auch unter dem PKC $\eta$  7 gapmer-AODN um das 2,0fache ( $p<0,0001$ ). Altana Konstanz konnte in einer "Microarray"-Analyse zeigen, dass nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$  das globale Expressionsmuster der Zellen unverändert bleibt, also keine weiteren RNA-Spezies durch die Suppression von PKC $\eta$  unterdrückt werden (persönliche Mitteilung Altana, Konstanz). Da die Sensibilisierung der Zellen gegenüber Taxol also nicht auf einer verminderten Expression von Resistenzfaktoren beruht, müssen andere Mechanismen ursächlich sein. Eine mögliche Ursache der Sensibilisierung gegenüber Taxol® wäre durch verminderte Phosphorylierung von Pgp und folglich vermehrter Taxol®-Akkumulation in den Zellen denkbar, da Taxol® ein Substrat von Pgp ist [Huang, et al., 1997] und PKC's an der Phosphorylierung von Pgp beteiligt sind [Chambers et al., 1993]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PKC-Aktivatoren die Transkription des Pgp-Gens steigern [Chaudhary und Roninson, 1992], wohingegen PKC-Inhibitoren die Zytostatika-induzierte Pgp-Transkription in Zelllinien unter bestimmten Bedingungen hemmen [Chaudhary und Roninson, 1993]. Des Weiteren wurde jedoch die Wirkung des PKC-Inhibitors Staurosporin auf die Pgp-Aktivität auch unabhängig von der PKC-Aktivität nachgewiesen [Wielinga et al., 1997], was eine direkte Interaktion des Inhibitors mit Pgp vermuten lässt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Pgp eine untergeordnete Rolle spielt [Germann et al., 1996]. Die Effekte der Suppression von PKC $\eta$  scheinen also nicht in Zusammenhang mit der Funktion von Pgp zu stehen. Wahrscheinlicher ist dagegen eine Beeinflussung des apoptotischen Prozesses: Die Suppression von PKC $\eta$  könnte ihre inhibierende Wirkung auf den Ablauf der Apoptose wie beispielsweise in Mammakarzinomzelllinien [Basu, 1998; Akkaraju und Basu 2000] durch Inhibition der Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-7 oder in Glioblastomzelllinien [Hussaini et al., 2002] durch Inhibition der Aktivierung von Caspase-9 aufheben und so den Prozess der Apoptose erleichtern. Die verminderte enzymatische Aktivität der PKC $\eta$  nimmt folglich keinen Einfluss auf die Expression bestimmter Proteine oder Resistenzfaktoren, sondern eher auf ihre Funktion. Auch die Rolle von PKC $\eta$  in Bezug auf die durch Vincristin ausgelöste apoptotische Reaktion der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurde in diesen Experimenten untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikante Sensibilisierung der Zellen gegenüber Vincristin. Die Anwendung von PKC $\eta$  2 gapmer-AODN in Verbindung mit 300 nM Vincristin führte zu einer signifikanten Caspase-3-

Aktivitätserhöhung gegenüber der Kontrolle um 3,6 ( $p < 0,01$ ) (siehe Abb. 12). Die Caspase-3-Aktivitätserhöhung durch PKC $\eta$  7 gapmer-AODN und 300 nM Vincristin zeigte sich gegenüber der Kontrolle um das 2,6fache erhöht ( $p < 0,005$ ) (siehe Abb. 12). Die deutlicheren Effekte durch das PKC $\eta$  2 gapmer-AODN könnte darauf zurückzuführen sein, dass das PKC $\eta$  2 gapmer-AODN neben PKC $\eta$  auch die PKC-Isoenzyme alpha und theta supprimiert (persönliche Mitteilung von Altana, Konstanz, Deutschland). Wie auch bei Kombination mit Taxol kann die Sensibilisierung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 auf den Einfluss der Suppression von PKC $\eta$  auf die Funktion von bestimmten Proteinen zurückzuführen sein, wie beispielsweise Caspase-8 und Caspase-7 in Mammakarzinomzelllinien [Basu, 1998; Akkaraju und Basu 2000] oder Caspase-9 in Glioblastomzelllinien [Hussaini et al., 2002].

### **5.2.2 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin**

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Funktion von Bcl-XL im Bezug auf die Taxol®-induzierte Apoptose in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 untersucht. Nach gapmer-AODN-Behandlung mit Bcl-XL gapmer-AODN und anschließender Inkubation unter beispielsweise 100 nM Taxol® (siehe Abb. 4) wurde ein Caspase-3-Aktivitäts-Test durchgeführt. Auch die Suppression von Bcl-XL sensibilisierte die Zellen signifikant gegenüber Taxol®. Dies zeigte sich in einem signifikanten Caspase-3-Aktivitätsanstieg um das 3,0fache ( $p < 0,0005$ ) (siehe Abb. 11). Das antiapoptotische Bcl-XL ist in einer Vielzahl von Karzinomarten exprimiert [Übersicht in Grad, et al., 2000]. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die Suppression von Bcl-XL zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Prozess der Apoptose führt. Auch die in dieser Arbeit beobachtete Sensibilisierung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 gegenüber Taxol® beruht auf der Suppression von Bcl-XL, wodurch das Verhältnis der antiapoptotischen Faktoren gegenüber der proapoptotischen Faktoren zu Gunsten der proapoptotischen Faktoren verschoben wird. Entscheidend für diese Arbeit war der parallele Ansatz der gapmer-AODN-Technik gegen Bcl-XL und PKC $\eta$  in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 um die bereits etablierte Wirkung der Suppression von Bcl-XL mit der Wirkung der Suppression von PKC $\eta$  zu vergleichen. Die Effekte

der Suppression von Bcl-XL in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurden in diesem Versuchsabschnitt auch in Verbindung mit Vincristin untersucht. Die Suppression von Bcl-XL hatte einen deutlichen proapoptotischen Effekt zur Folge, der sich in einer signifikanten Caspase-3-Aktivitätserhöhung gegenüber der Kontrolle um das 3,9fache äußerte ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abb. 12). Wie auch bei Taxol beruht die Sensibilisierung gegenüber Vincristin auf der Suppression von Bcl-XL durch die gapmer-AODN-Behandlung und der folgenden proapoptotischen Wirkung.

### **5.2.3 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ in Kombination mit TNF $\alpha$ oder TRAIL**

Auch der Einfluss von PKC $\eta$  auf den Rezeptor-vermittelten Weg der Apoptose wie beispielsweise durch den Immunmodulator TNF $\alpha$  wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Suppression von PKC $\eta$  in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 in Kombination mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  zeigte einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität gegenüber der Kontrolle um das 3,4fache bei Anwendung des PKC $\eta$  2 gapmer-AODN (siehe Abb. 13). Diese Caspase-3-Aktivitätserhöhung gegenüber der Kontrolle spricht für eine Sensibilisierung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 gegenüber TNF $\alpha$ . In vorangegangenen Studien wurde ihre Resistenz gegenüber der Wirkung von TNF $\alpha$  beschrieben [Nakata et al., 1995]. Die hier gezeigte Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF $\alpha$  durch Suppression von PKC $\eta$  könnte auf der verringerten enzymatischen Aktivität der PKC $\eta$  beruhen, die dazu führen könnte, dass bestimmte Proteine der apoptotischen Kaskade weniger in ihrer Funktion beeinflusst würden und somit der apoptotische Prozess besser ablaufen könnte, wie beispielsweise Caspase-8 und Caspase-7 in Mammakarzinomzelllinien [Basu, 1998; Akkaraju und Basu 2000] oder Caspase-9 in Glioblastomzelllinien [Hussaini et al., 2002]. Neben der Wirkung von PKC $\eta$  auf die TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose wurde auch die Wirkung von PKC $\eta$  auf die TRAIL (TNF $\alpha$ -related apoptosis-inducing factor) -induzierte Apoptose untersucht. Es zeigte sich auch gegenüber TRAIL eine Sensibilisierung der Zellen, die sich in einer Caspase-3-Aktivitätserhöhung gegenüber der Kontrolle um das 3,7fache auswirkte (siehe Abb. 14). Auch für diese Sensibilisierung können die oben genannten Mechanismen postuliert werden. Darüber hinaus wurde in einigen

Ewingsarkomzelllinien eine erhöhte Resistenz gegenüber TRAIL beobachtet [van Valen et al., 2000] und eine Korrelation zwischen der Expression von PKC $\eta$  und der Resistenz in diesen Zellen gefunden [Beck et al., persönliche Mitteilung].

#### **5.2.4 Funktionelle Analysen durch Caspase-3-Aktivitäts-Test nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit TNF $\alpha$ oder TRAIL**

Wie auch bei den vorangegangenen Versuchen sollte in den Experimenten bezüglich TNF $\alpha$  und TRAIL die Auswirkung der Suppression von Bcl-XL in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 untersucht werden. Die Anwendung des gapmer-AODNs gegen Bcl-XL führte zu einer Sensibilisierung gegenüber 10 ng/ml TNF $\alpha$ , die jedoch geringer ausfiel, als diejenige bei Suppression von PKC $\eta$ . Es wurde eine Caspase-3-Aktivitätserhöhung gegenüber der Kontrolle um 2,1 beobachtet (siehe Abb. 13). Auch in Kombination mit TNF $\alpha$  kann die Sensibilisierung der Lungenadenokarzinomzelllinie A459 auf die Suppression von Bcl-XL zurückgeführt werden. Der apoptotische Prozess wird durch das Überwiegen der proapoptotischen Faktoren gegenüber der antiapoptotischen Faktoren erleichtert. Auch im Bezug auf die TRAIL-induzierte Apoptose wurde die Suppression von Bcl-XL in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 mittels gapmer-AODNs in diesen Versuchen durchgeführt. Sie resultierte in einer gegenüber der Kontrolle um das 1,9fache signifikant erhöhten Caspase-3-Aktivität bei 10 ng/ml TRAIL ( $p < 0,05$ ). Auch die Sensibilisierung der Zellen gegenüber TRAIL ist auf das Ausbleiben der antiapoptotischen Wirkung von Bcl-XL bei dessen Suppression zurückzuführen.

Die Versuchsabschnitte bezüglich TNF $\alpha$ , und TRAIL wurden am Ende dieser Arbeit durchgeführt und sind als Ausblicke für weitere Experimente zu werten. Es sollte untersucht werden, ob das in dieser Arbeit primär unter Taxol® und Vincristin angewendete System auch für TNF $\alpha$  und TRAIL erfolgversprechende Ansätze zeigt. Die Experimente 4.6.3 und 4.6.4 zeigen erste Hinweise, dass die Suppression von PKC $\eta$  oder Bcl-XL auch in Kombination mit TNF $\alpha$  und TRAIL Auswirkungen auf den

apoptotischen Prozess hat. Dies muss jedoch in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

### **5.3 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie**

In diesen Versuchsabschnitten wurden Zellen der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 nach gapmer-AODN-Behandlung anhand der Anfärbbarkeit ihrer DNA durch Propidiumjodid infolge des Verlustes der Zellmembranintegrität in vitale und abgestorbene Zellen mit der Durchflußzytometrie unterschieden. Die nicht anfärbbaren Zellen wurden als vitale Zellen gewertet (siehe auch 3.4 und 3.6). Der Anteil der vitalen Zellen in den mit "Zielsequenz"-gapmer-AODNs behandelten Zellen gegenüber dem Anteil der vitalen Zellen in den mit Kontroll gapmer-AODNs behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen wurde als Bewertungsmaßstab für den Effekt der Suppression von PKC $\eta$  oder Bcl-XL herangezogen. Wie auch bei dem Maximum der Caspase-3-Aktivitätserhöhung müssen auch bei diesem Test die optimalen Bedingungen für den Zeitpunkt der einmaligen Messung und die Zytostatikadosis erst ermittelt werden. Es zeigte sich, dass nach einer 72 h Inkubation unter 30 nM Taxol® oder 30 nM Vincristin das Maximum der Aufnahme von Propidiumjodid in die Zellen in allen Proben zu beobachten war.

#### **5.3.1 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen PKC $\eta$ in Kombination mit Taxol® oder Vincristin**

In den Ergebnissen der Durchflußzytometrie zeigte sich die im Caspase-3-Aktivitätstest beobachtete Sensibilisierung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 gegenüber Taxol® schwächer ausgeprägt. Die Anwendung des PKC $\eta$  2 gapmer-AODNs in Kombination mit 30 nM Taxol® führte zu einer signifikanten Reduktion des Anteils der lebenden Zellen gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb.15). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Caspase-3-Aktivitätstests, zeigt jedoch gleichzeitig, dass diese Methode dem erstgenannten Test unterlegen ist, da die notwendige Inkubationszeit von

72 h unter Taxol® ohne Mediumwechsel zu erschwerten Zellkulturbedingungen und möglicherweise zu einer erhöhten Toxizität von Taxol® führt. Diese trägt dazu bei, dass in allen Proben ein bestimmter Anteil der Zellen in die Nekrose übertritt. In diesen Zellen findet kein adäquater Zellmetabolismus mehr statt, so dass der energieverbrauchende Prozess der Apoptose nicht mehr ablaufen kann. Somit zeigt auch die Suppression von PKC $\eta$  geringere Effekte, da sie vermutlich gerade auf den Prozess der Apoptose Einfluss nimmt. Die in den Caspase-3-Aktivitätstests beobachteten Unterschiede werden demzufolge bei dieser Methode reduziert. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie in den Experimenten an der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 unter Anwendung von Vincristin zeigten deutlichere Unterschiede in den Anteilen der lebenden Zellen der einzelnen Proben gegenüber der Verwendung von Taxol® (siehe Abb. 15 und 16). Bei Suppression von PKC $\eta$  durch PKC $\eta$  2 gapmer-AODN in Kombination mit 30 nM Vincristin zeigte sich eine signifikante Reduktion des Anteils der vitalen Zellen gegenüber der Kontrolle um 26 % ( $p < 0,05$ ). Diese deutlicheren Unterschiede könnten auf einer verminderten Toxizität von Vincristin gegenüber Taxol® in Kombination mit der langen Inkubationszeit zurückzuführen sein. Dies würde sich darin erklären, dass weniger Zellen direkt in die Nekrose übergingen und dadurch energieverbrauchende Vorgänge im Zellmetabolismus wie beispielsweise der Prozess der Apoptose besser ablaufen könnten. Die Suppression von PKC $\eta$  zeigt demzufolge wieder deutliche Effekte, da sie wahrscheinlich gerade in diesen Prozess eingreift.

### **5.3.2 Funktionelle Analysen mit Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-XL in Kombination mit Taxol® oder Vincristin**

Die Suppression von Bcl-XL in Kombination mit Taxol® zeigte in den Versuchen mittels Durchflußzytometrie gegenüber der Suppression von PKC $\eta$  deutlichere signifikante Effekte. Bei Anwendung von 30 nM Taxol® zeigte sich eine Reduktion der vitalen Zellen gegenüber der Kontrolle um 14,2 % ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 16). Dies könnte darauf beruhen, dass die Suppression von Bcl-XL in Teile des Prozesses der Apoptose eingreift, die auf weniger Energie angewiesen sind und auch noch unter unzulänglichen Zellkulturbedingungen ablaufen können. Die Suppression von Bcl-XL

zeigt folglich auch bei der unter diesen Bedingungen erhöhten Toxizität von Taxol® deutliche Effekte. Die Auswirkung der Suppression von Bcl-XL in Kombination mit 30 nM Vincristin in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 zeigte sich als deutlich verstärkt gegenüber der Wirkung bei Kombination mit Taxol®. Im Vergleich zu der Auswirkung der Suppression von PKC $\eta$  in Kombination mit Vincristin erwies sie sich jedoch als deutlich geringer (siehe Abb. 16). In den mit Bcl-XL gapmer-AODN behandelten Zellen wurde eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen um 18 % ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle beobachtet (bei Suppression von PKC $\eta$  um 26 %). Die Unterschiede zwischen den Effekten der Suppression von PKC $\eta$  bzw. Bcl-XL in Kombination mit Vincristin oder Taxol® sprechen einerseits für eine deutliche Sensibilisierung der Zellen gegenüber Vincristin durch Suppression von Bcl-XL, andererseits für die effektivere Suppression von PKC $\eta$  bei optimierten Zellkulturbedingungen. Diese waren nach 72stündiger Inkubation nur in Kombination mit Vincristin, nicht jedoch mit Taxol vorhanden. Die deutlichere Auswirkung auf den apoptotischen Prozess durch Suppression von PKC $\eta$  im Vergleich zu Bcl-XL könnte einerseits darauf beruhen, dass die enzymatische Aktivität von PKC $\eta$  Einfluss auf weitere Faktoren hat, wohingegen Bcl-XL ein Faktor in einer Signaltransduktionskaskade ist, der weniger komplexe Auswirkungen auf weitere Faktoren besitzt. Andererseits könnte die stärkere Wirkung der Suppression von PKC $\eta$  darauf beruhen, dass das hier angewandte PKC $\eta$  2 gapmer-AODN auch weitere PKC-Isoformen supprimiert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Suppression von PKC $\eta$  oder Bcl-XL in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 zur Sensibilisierung gegenüber Taxol und Vincristin sowie etwas weniger ausgeprägt gegenüber TNF $\alpha$  und TRAIL führt. Die gapmer-AODN-Technik zeigte sich durch die hohe Spezifität bei sehr geringer Toxizität als geeignete Methode, diese Suppression im Zellkulturmodell zu erreichen. Ob diese Methode in der klinischen Anwendung Relevanz erreicht, wie es bereits für Antisense Oligonukleotide gegen andere PKC-Isoformen gezeigt wurde [Übersicht in Tamm et al., 2001] bleibt offen. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität von PKC $\eta$  könnte ein weiterer therapeutischer Ansatz sein. Die Entwicklung eines Hemmstoffes gegen Bcl-XL hingegen könnte erschwert sein, da es sich hier um eine Protein-Protein Wechselwirkung handelt, wohingegen zur Hemmung von PKC $\eta$  ein aktives Zentrum zur Verfügung steht. Welche Rolle PKC $\eta$  als Resistenzfaktor im einzelnen spielt, kann

nur durch weitere detaillierte Aufschlüsselungen ihrer einzelnen Funktionen belegt werden.



## 6 Zusammenfassung

Krebs in einem fortgeschrittenen, disseminierten Stadium kann nur durch eine systemisch wirksame Therapie beeinflusst werden. Die Wirkung von Zytostatika auf die meisten Krebsarten ist begrenzt, oft kann die Krebserkrankung lediglich aufgehalten werden, eine Heilung ist im fortgeschrittenen Stadium nur selten und in speziellen Fällen möglich.

Die Aufklärung tumorspezifischer Determinanten der Zytostatika- und Zytokin-Resistenz stellt daher einen wichtigen experimentellen Ansatz für zukünftige Therapieverbesserungen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Suppression der zellulären Faktoren PKC $\eta$  und Bcl-XL eine Zytokin- und Zytostatikasensibilisierung zur Folge hat. PKC $\eta$  wurde untersucht, da 1.) PKC-Aktivatoren den Phänotyp einer Zytostatikaresistenz generieren können, 2.) PKC-Inhibitoren Tumorzellen gegen Zytokine und Zytostatika sensibilisieren, 3.) gezeigt wurde, dass besonders das PKC-Isoenzym  $\eta$  mit einer Zytostatika- und Zytokin-Resistenz korreliert und 4.) PKC $\eta$  eine antiapoptotische Funktion bei der UV-Licht- und Zytokin-Resistenz schon zugeordnet werden konnte.

Darüber hinaus wurde mit Bcl-XL zum Vergleich ein bereits etablierter antiapoptotisch wirkender Faktor untersucht.

PKC $\eta$  und Bcl-XL wurden in der Lungenkarzinomzelllinie A549 mit spezifischen gapmer Antisense Oligonukleotiden (AODN's) supprimiert. Als Kontrolle wurde ein unspezifisches AODN verwendet. Die spezifische Suppression von PKC $\eta$  und Bcl-XL wurde 1.) auf RNA-Ebene mit der Taq Man PCR <sup>®</sup> und 2.) auf Proteinebene mit der Western Blot Analyse nachgewiesen.

Die funktionellen Testungen an der behandelten Zelllinie umfaßten 1.) die Aktivierung von Caspase-3 und 2.) die Anfärbung des Zellkerns mit Propidiumjodid.

Es konnte gezeigt werden, dass die Suppression von Bcl-XL und PKC $\eta$  eine signifikante Sensibilisierung gegen die Zytostatika Vincristin und Taxol und gegen die Zytokine TRAIL und TNF $\alpha$  zur Folge hat. Die Versuche zeigen, dass die Inhibition von Bcl-XL und PKC $\eta$  einen Therapienutzen im Rahmen adjuvanter Chemotherapien von

Krebspatienten aufweisen könnte, wenn diese Faktoren bevorzugt in malignen Geweben exprimiert oder bevorzugt in malignen Geweben supprimiert werden.

**Literatur:**

J. M. Adams and S. Cory. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 (5381):1322-1326, 1998.

S. Akhtar, R. Kole, and R. L. Juliano. Stability of Antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci.* 49 (24):1793-1801, 1991.

G. R. Akkaraju and A. Basu. Overexpression of protein kinase C-eta attenuates caspase activation and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 279 (1):103-107, 2000.

A. E. Aplin, A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol.Rev.* 50 (2):197-263, 1998.

A. Ashkenazi and V. M. Dixit. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281 (5381):1305-1308, 1998.

T. M. Baetu and J. Hiscott. On the TRAIL to apoptosis. *Zytokine Growth Factor Rev.* 13 (3):199-207, 2002.

A. Basu. The involvement of novel protein kinase C isozymes in influencing sensitivity of breast cancer MCF-7 cells to tumor necrosis factor-alpha. *Mol.Pharmacol.* 53 (1):105-111, 1998.

S. E. Bates, J. S. Lee, B. Dickstein, M. Spolyar, and A. T. Fojo. Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry* 32 (35):9156-9164, 1993.

J. Beck, R. Handgretinger, T. Klingebiel, R. Dopfer, M. Schaich, G. Ehninger, D. Niethammer, and V. Gekeler. Expression of PKC isozyme and MDR-associated genes in primary and relapsed state AML. *Leukemia* 10 (3):426-433, 1996.

J. Beck, B. Bohnet, D. Brugger, P. Bader, J. Dietl, R. J. Scheper, R. Kandolf, C. Liu, D. Niethammer, and V. Gekeler. Multiple gene expression analysis reveals distinct differences between G2 and G3 stage breast cancers, and correlations of PKC eta with MDR1, MRP and LRP gene expression. *Br.J.Cancer* 77 (1):87-91, 1998a.

J. F. Beck, B. Bohnet, D. Brugger, J. Dietl, R. J. Scheper, P. Bader, D. Niethammer, and V. Gekeler. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 18 (2A):701-705, 1998b.

W. T. Beck. Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treat.Rev.* 17 Suppl A:11-20, 1990.

W. T. Bellamy, W. S. Dalton, and R. T. Dorr. The clinical relevance of multidrug resistance. *Cancer Invest* 8 (5):547-562, 1990.

- L. Benimetskaya, G. B. Takle, M. Vilenchik, I. Lebedeva, P. Miller, and C. A. Stein. Cationic porphyrins: novel delivery vehicles for Antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 26 (23):5310-5317, 1998.
- J. L. Bodmer, K. Burns, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schroter, K. Becker, A. Wilson, L. E. French, J. L. Browning, H. R. MacDonald, and J. Tschopp. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity.* 6 (1):79-88, 1997.
- M. P. Boldin, T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev, and D. Wallach. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85(6):803-815, 1996.
- J. Brojatsch, J. Naughton, M. M. Rolls, K. Zingler, and J. A. Young. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 87 (5):845-855, 1996.
- T. M. Bryan and T. R. Cech. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11 (3):318-324, 1999.
- L. Campos, D. Guyotat, E. Archimbaud, P. Calmard-Oriol, T. Tsuruo, J. Troncy, D. Treille, and D. Fiere. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79 (2):473-476, 1992.
- F. Caponigro, R. C. French, and S. B. Kaye. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anticancer Drugs* 8 (1):26-33, 1997.
- L. Cartee and G. L. Kucera. Protein kinase C modulation and anticancer drug response. *Cancer Invest* 18 (8):731-739, 2000.
- L. Cartee, S. C. Maggio, R. Smith, H. M. Sankala, P. Dent, and S. Grant. Protein Kinase C-dependent Activation of the Tumor Necrosis Factor Receptor-mediated Extrinsic Cell Death Pathway Underlies Enhanced Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells Exposed to Bryostatin 1 and Flavopiridol. *Mol.Cancer Ther.* 2 (1):83-93, 2003.
- T. C. Chambers, B. Zheng, and J. F. Kuo. Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol.Pharmacol.* 41 (6):1008-1015, 1992.
- T. C. Chambers, J. Pohl, R. L. Raynor, and J. F. Kuo. Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 268 (7):4592-4595, 1993.
- H. S. Chan, P. S. Thorner, G. Haddad, and V. Ling. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J.Clin.Oncol.* 8 (4):689-704, 1990.
- P. M. Chaudhary and I. B. Roninson. Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol.Res.* 4 (7):281-290, 1992.

- P. M. Chaudhary and I. B. Roninson. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J.Natl.Cancer Inst.* 85 (8):632-639, 1993.
- E. H. Cheng, D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J. M. Hardwick. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278 (5345):1966-1968, 1997.
- K. Chida, T. Nakada, H. Otsuka, T. Kuroki, and H. Satoh. Assignment of protein kinase C eta (Pkch) to mouse chromosome band 12C3- D2 by in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* 82 (1-2):30-31, 1998.
- A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81 (4):505-512, 1995.
- A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, G. L. Yu, R. H. Lyons, M. Garg, D. R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni, and V. M. Dixit. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274 (5289):990-992, 1996.
- M. S. Choi, L. H. Boise, A. R. Gottschalk, J. Quintans, C. B. Thompson, and G. G. Klaus. The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur.J.Immunol.* 25 (5):1352-1357, 1995.
- G. Christofori and H. Semb. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem.Sci.* 24 (2):73-76, 1999.
- M. J. Cline. Effect of vincristine on synthesis of ribonucleic acid and protein in leukaemic leucocytes. *Br.J.Haematol.* 14 (1):21-29, 1968.
- G. M. Cohen. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 326 ( Pt 1):1-16, 1997.
- J. J. Cohen. Apoptosis. *Immunol.Today* 14 (3):126-130, 1993.
- A. H. Corbett, A. W. Fernald, and N. Osheroff. Protein kinase C modulates the catalytic activity of topoisomerase II by enhancing the rate of ATP hydrolysis: evidence for a common mechanism of regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 32 (8):2090-2097, 1993.
- S. Cory and J. M. Adams. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat.Rev.Cancer* 2 (9):647-656, 2002.
- D. Cosman. A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12 (5):440-455, 1994.
- W. A. Creasey and M. E. Markiw. Biochemical effects of the vinca alkaloids. 3. The synthesis of ribonucleic acid and the incorporation of amino acids in Ehrlich ascites cells in vitro. *Biochim.Biophys.Acta* 103 (4):635-645, 1965.
- P. M. Cumber, A. Jacobs, T. Hoy, J. Fisher, J. A. Whittaker, T. Tsuruo, and R. A. Padua. Expression of the multiple drug resistance gene (mdr-1) and epitope masking in chronic lymphatic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 76 (2):226-230, 1990.

- P. de Diesbach, C. Berens, F. N'Kuli, M. Monsigny, E. Sonveaux, R. Wattiez, and P. J. Courtoy. Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res.* 28 (4):868-874, 2000.
- L. V. Dekker, R. H. Palmer, and P. J. Parker. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 5 (3):396-402, 1995.
- N. Dias and C. A. Stein. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol.Cancer Ther.* 1 (5):347-355, 2002.
- S. Doi, D. Goldstein, H. Hug, and I. B. Weinstein. Expression of multiple isoforms of protein kinase C in normal human colon mucosa and colon tumors and decreased levels of protein kinase C beta and eta mRNAs in the tumors. *Mol.Carcinog.* 11 (4):197-203, 1994.
- P. S. Eder, R. J. DeVine, J. M. Dagle, and J. A. Walder. Substrate specificity and kinetics of degradation of Antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res.Dev.* 1 (2):141-151, 1991.
- Y. Eguchi, S. Shimizu, and Y. Tsujimoto. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57 (10):1835-1840, 1997.
- M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662):43-50, 1998.
- F. Fang and J. W. Newport. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 66 (4):731-742, 1991.
- D. A. Fennell, M. V. Corbo, N. M. Dean, B. P. Monia, and F. E. Cotter. In vivo suppression of Bcl-XL expression facilitates chemotherapy- induced leukaemia cell death in a SCID/NOD-Hu model. *Br.J.Haematol.* 112 (3):706-713, 2001.
- C. G. Ferreira, M. Epping, F. A. Kruyt, and G. Giaccone. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin.Cancer Res.* 8 (7):2024-2034, 2002.
- R. L. Fine, J. Patel, and B. A. Chabner. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 (2):582-586, 1988.
- D. E. Fisher. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78 (4):539-542, 1994.
- T. Geiger, M. Muller, N. M. Dean, and D. Fabbro. Antitumor activity of a PKC-alpha Antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. *Anticancer Drug Des* 13 (1):35-45, 1998.
- U. A. Germann, T. C. Chambers, S. V. Ambudkar, T. Licht, C. O. Cardarelli, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P- glycoprotein expressed in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 271 (3):1708-1716, 1996.
- F. G. Giancotti and E. Ruoslahti. Integrin signaling. *Science* 285 (5430):1028-1032, 1999.

- P. G. Goekjian and M. R. Jirousek. Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development. *Curr.Med.Chem.* 6 (9):877-903, 1999.
- H. R. Goodfellow, A. Sardini, S. Ruetz, R. Callaghan, P. Gros, P. A. McNaughton, and C. F. Higgins. Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 271 (23):13668-13674, 1996.
- M. M. Gottesman. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 53 (4):747-754, 1993.
- M. M. Gottesman and I. Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu.Rev.Biochem.* 62:385-427, 1993.
- J. M. Grad, X. R. Zeng, and L. H. Boise. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr.Opin.Oncol.* 12 (6):543-549, 2000.
- A. Gross, J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13 (15):1899-1911, 1999.
- R. S. Gupta, T. K. Ho, M. R. Moffat, and R. Gupta. Podophyllotoxin-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells. Alteration in a microtubule-associated protein. *J.Biol.Chem.* 257 (2):1071-1078, 1982.
- R. S. Gupta. Microtubules, mitochondria, and molecular chaperones: a new hypothesis for in vivo assembly of microtubules. *Biochem.Cell Biol.* 68 (12):1352-1363, 1990.
- D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57-70, 2000.
- L. H. Hartwell and T. A. Weinert. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 (4930):629-634, 1989.
- L. H. Hartwell and M. B. Kastan. Cell cycle control and cancer. *Science* 266 (5192):1821-1828, 1994.
- D. M. Harvey and A. J. Levine. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* 5 (12B):2375-2385, 1991.
- M. O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 (6805):770-776, 2000.
- J. A. Hickman. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur.J.Cancer* 32A (6):921-926, 1996.
- D. Hockenbery, G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 (6299):334-336, 1990.
- I. M. Hussaini, L. R. Karns, G. Vinton, J. E. Carpenter, G. T. Redpath, J. J. Sando, and S. R. VandenBerg. Phorbol 12-myristate 13-acetate induces protein kinase ceta-specific proliferative response in astrocytic tumor cells. *J.Biol.Chem.* 275 (29):22348-22354, 2000.

- I. M. Hussaini, J. E. Carpenter, G. T. Redpath, J. J. Sando, M. E. Shaffrey, and S. R. VandenBerg. Protein kinase C-eta regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation. *Neuro.-oncol.* 4 (1):9-21, 2002.
- J. Imamura, I. Miyoshi, and H. P. Koeffler. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 84 (8):2412-2421, 1994.
- H. Inoue, Y. Hayase, S. Iwai, and E. Ohtsuka. Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett.* 215 (2):327-330, 1987.
- B. Jansen, V. Wacheck, E. Heere-Ress, H. Schlagbauer-Wadl, C. Hoeller, T. Lucas, M. Hoermann, U. Hollenstein, K. Wolff, and H. Pehamberger. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 Antisense therapy. *Lancet* 356 (9243):1728-1733, 2000.
- M. A. Jordan, D. Thrower, and L. Wilson. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* 51 (8):2212-2222, 1991.
- R. L. Juliano and V. Ling. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim.Biophys.Acta* 455 (1):152-162, 1976.
- H. Karahashi and F. Amano. Structure-activity relationships of lipopolysaccharide (LPS) in tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and induction of macrophage cell death in the presence of cycloheximide (CHX) in a murine macrophage-like cell line, J774.1. *Biol.Pharm.Bull.* 21 (10):1102-1105, 1998.
- M. Kashiwagi, M. Ohba, K. Chida, and T. Kuroki. Protein Kinase Ceta (PKCeta): Its Involvement in Keratinocyte Differentiation. *J.Biochem.(Tokyo)* 132 (6):853-857, 2002.
- M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51 (23 Pt 1):6304-6311, 1991.
- K. J. Kim, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, and N. Ferrara. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362 (6423):841-844, 1993.
- K. W. Kinzler and B. Vogelstein. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (2):159-170, 1996.
- J. Kitson, T. Raven, Y. P. Jiang, D. V. Goeddel, K. M. Giles, K. T. Pun, C. J. Grinham, R. Brown, and S. N. Farrow. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384 (6607):372-375, 1996.
- G. Kroemer. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem.Soc.Symp.* 66:1-15, 1999.
- S. J. Kuerbitz, B. S. Plunkett, W. V. Walsh, and M. B. Kastan. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (16):7491-7495, 1992.



- M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J.Exp.Med.* 185 (8):1481-1486, 1997.
- P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (4):479-489, 1997.
- J. K. Lin, Y. C. Chen, Y. T. Huang, and S. Y. Lin-Shiau. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J.Cell Biochem.Suppl* 28-29:39-48, 1997.
- J. A. Lippke, Y. Gu, C. Sarnecki, P. R. Caron, and M. S. Su. Identification and characterization of CPP32/Mch2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *J.Biol.Chem.* 271 (4):1825-1828, 1996.
- X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86 (1):147-157, 1996.
- X. Liu, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89 (2):175-184, 1997.
- S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J. S. Cohen, and L. M. Neckers. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 (10):3474-3478, 1989.
- S. W. Lowe, H. E. Ruley, T. Jacks, and D. E. Housman. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74 (6):957-967, 1993.
- M. E. Lukashev and Z. Werb. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8 (11):437-441, 1998.
- D. Luo, S. C. Cheng, H. Xie, and Y. Xie. Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem.Cell Biol.* 78 (2):119-126, 2000.
- D. D. Ma, R. D. Scurr, R. A. Davey, S. M. Mackertich, D. H. Harman, G. Dowden, J. P. Isbister, and D. R. Bell. Detection of a multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1 (8525):135-137, 1987.
- S. A. Marsters, J. P. Sheridan, C. J. Donahue, R. M. Pitti, C. L. Gray, A. D. Goddard, K. D. Bauer, and A. Ashkenazi. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr.Biol.* 6 (12):1669-1676, 1996.
- P. A. Masso-Welch, J. S. Winston, S. Edge, K. M. Darcy, H. Asch, M. M. Vaughan, and M. M. Ip. Altered expression and localization of PKC eta in human breast tumors. *Breast Cancer Res.Treat.* 68 (3):211-223, 2001.
- T. Matsui, T. Kondo, Y. Nishita, S. Itadani, S. Nakatani, N. Omawari, M. Sakai, S. Nakazawa, A. Ogata, H. Mori, K. Terai, W. Kamoshima, H. Ohno, T. Obata, H. Nakai,

- and M. Toda. Highly potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production. Part I. Discovery of new chemical leads and Their structure-Activity relationships. *Bioorg.Med.Chem.* 10 (12):3757-3786, 2002.
- M. Matsumura, N. Tanaka, T. Kuroki, M. Ichihashi, and M. Ohba. The eta isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 303 (1):350-356, 2003.
- H. Mellor and P. J. Parker. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* 332 ( Pt 2):281-292, 1998.
- B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, P. D. Cook, and S. M. Freier. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as Antisense inhibitors of gene expression. *J.Biol.Chem.* 268 (19):14514-14522, 1993.
- C. S. Morrow and K. H. Cowan. Multidrug resistance associated with altered topoisomerase II activity-- topoisomerases II as targets for rational drug design. *J.Natl.Cancer Inst.* 82 (8):638-639, 1990.
- A. W. Murray. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359 (6396):599-604, 1992.
- E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting. a: Immunbiologika („Biologicals“), b: Kapitel 12.4 Mitosehemmerstoffe. E. Mutschler, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001. a: 251-254, b: 895-897.
- M. Muzio, B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J.Biol.Chem.* 273 (5):2926-2930, 1998.
- A. C. Newton. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* 270 (48):28495-28498, 1995.
- A. C. Newton. Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9 (2):161-167, 1997.
- Y. Nishizuka. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334 (6184):661-665, 1988.
- Y. Nishizuka. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258 (5082):607-614, 1992.
- Y. Nishizuka. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9 (7):484-496, 1995.
- M. L. O'Brien and K. D. Tew. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur.J.Cancer* 32A (6):967-978, 1996.
- M. Ohba, K. Ishino, M. Kashiwagi, S. Kawabe, K. Chida, N. H. Huh, and T. Kuroki. Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated

- introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* 18 (9):5199-5207, 1998.
- R. M. Orr. Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 3 (3):288-294, 2001.
- S. Osada, K. Mizuno, T. C. Saido, Y. Akita, K. Suzuki, T. Kuroki, and S. Ohno. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J.Biol.Chem.* 265 (36):22434-22440, 1990.
- I. Pastan and M. Gottesman. Multiple-drug resistance in human cancer. *N.Engl.J.Med.* 316 (22):1388-1393, 1987.
- B. M. Paterson, B. E. Roberts, and E. L. Kuff. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 (10):4370-4374, 1977.
- R. Pirker, J. Wallner, K. Geissler, W. Linkesch, O. A. Haas, P. Bettelheim, M. Hopfner, R. Scherrer, P. Valent, L. Havelec, and . MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J.Natl.Cancer Inst.* 83 (10):708-712, 1991.
- Y. Pommier, D. Kerrigan, K. D. Hartman, and R. I. Glazer. Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 265 (16):9418-9422, 1990.
- M. Prokocimer and V. Rotter. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood* 84 (8):2391-2411, 1994.
- T. Quan and G. J. Fisher. Cloning and characterization of the human protein kinase C-eta promoter. *J.Biol.Chem.* 274 (40):28566-28574, 1999.
- J. C. Reed. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J.Cell Biol.* 124 (1-2):1-6, 1994.
- J. C. Reed. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 9 (2):451-473, 1995.
- J. C. Reed, H. Zha, C. Aime-Sempe, S. Takayama, and H. G. Wang. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv.Exp.Med.Biol.* 406:99-112, 1996.
- B. Roehr. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J.Int.Assoc.Physicians AIDS Care* 4 (10):14-16, 1998.
- J. Rosenblatt, Y. Gu, and D. O. Morgan. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (7):2824-2828, 1992.
- T. H. Rushmore and C. B. Pickett. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J.Biol.Chem.* 268 (16):11475-11478, 1993.

- K. E. Sampson, C. L. Wolf, and I. Abraham. Staurosporine reduces P-glycoprotein expression and modulates multidrug resistance. *Cancer Lett.* 68 (1):7-14, 1993.
- L. E. Sampson and D. J. Chaplin. The influence of oxygen and carbon dioxide tension on the production of TNF alpha by activated macrophages. *Br.J.Cancer Suppl* 27:S133-S135, 1996.
- H. Sato, H. Preisler, R. Day, A. Raza, R. Larson, G. Browman, J. Goldberg, R. Vogler, H. Grunwald, A. Gottlieb, and . MDR1 transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia. *Br.J.Haematol.* 75 (3):340-345, 1990.
- D. C. Schonwasser, R. M. Marais, C. J. Marshall, and P. J. Parker. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal- regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol.Cell Biol.* 18 (2):790-798, 1998.
- L. A. Selbie, C. Schmitz-Peiffer, Y. Sheng, and T. J. Biden. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J.Biol.Chem.* 268 (32):24296-24302, 1993.
- A. B. Shapiro and V. Ling. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 270 (27):16167-16175, 1995.
- C. A. Smith, T. Farrah, and R. G. Goodwin. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76 (6):959-962, 1994.
- H. K. Sytwu, R. S. Liblau, and H. O. McDevitt. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* 5 (1):17-30, 1996.
- I. Tamm, B. Dorken, and G. Hartmann. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 358 (9280):489-497, 2001.
- N. A. Thornberry, T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, and D. W. Nicholson. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 272 (29):17907-17911, 1997.
- N. A. Thornberry and Y. Lazebnik. Caspases: enemies within. *Science* 281 (5381):1312-1316, 1998.
- Y. Tsujimoto, J. Cossman, E. Jaffe, and C. M. Croce. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 (4706):1440-1443, 1985.
- Y. Tu, S. Renner, F. Xu, A. Fleishman, J. Taylor, J. Weisz, R. Vescio, M. Rettig, J. Berenson, S. Krajewski, J. C. Reed, and A. Lichtenstein. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res.* 58 (2):256-262, 1998.
- J. L. Vaerman, P. Moureau, F. Deldime, P. Lewalle, C. Lammineur, F. Morschhauser, and P. Martiat. Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. *Blood* 90 (1):331-339, 1997.

- F. Van Valen, S. Fulda, B. Truckenbrod, V. Eckervogt, J. Sonnemann, A. Hillmann, R. Rodl, C. Hoffmann, W. Winkelmann, L. Schafer, B. Dockhorn-Dworniczak, T. Wessel, J. Boos, K. M. Debatin, and H. Jurgens. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int.J.Cancer* 88 (2):252-259, 2000.
- P. Verrelle, F. Meissonnier, Y. Fonck, V. Feillel, C. Dionet, F. Kwiatkowski, R. Plagne, and J. Chassagne. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 83 (2):111-116, 1991.
- H. Walczak, M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, and C. T. Rauch. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16 (17):5386-5397, 1997.
- R. A. Weinberg. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 (3):323-330, 1995.
- C. R. Weinstein-Oppenheim, C. F. Henriquez-Roldan, J. M. Davis, P. M. Navolanic, O. A. Saleh, L. S. Steelman, R. A. Franklin, P. J. Robinson, M. McMahon, and J. A. McCubrey. Role of the Raf signal transduction cascade in the in vitro resistance to the anticancer drug doxorubicin. *Clin.Cancer Res.* 7 (9):2898-2907, 2001.
- E. Wickstrom. Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J.Biochem.Biophys.Methods* 13 (2):97-102, 1986.
- P. R. Wielinga, M. Heijn, H. J. Broxterman, and J. Lankelma. P-glycoprotein-independent decrease in drug accumulation by phorbol ester treatment of tumor cells. *Biochem.Pharmacol.* 54 (7):791-799, 1997.
- S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and . Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 3 (6):673-682, 1995.
- D. Xue and H. R. Horvitz. Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 390 (6657):305-308, 1997.
- E. Yang and S. J. Korsmeyer. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88 (2):386-401, 1996.
- X. M. Yin, K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth, and S. J. Korsmeyer. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400 (6747):886-891, 1999.
- Y. Yin, M. A. Tainsky, F. Z. Bischoff, L. C. Strong, and G. M. Wahl. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles.
- P. C. Zamecnik and M. L. Stephenson. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75 (1):280-284, 1978.

Q. Zhan, I. Alamo, K. Yu, L. H. Boise, B. Cherney, G. Tosato, P. M. O'Connor, and A. J. Fornace, Jr. The apoptosis-associated gamma-ray response of BCL-X(L) depends on normal p53 function. *Oncogene* 13 (10):2287-2293, 1996.

L. Zheng, G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch, and M. J. Lenardo. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377 (6547):348-351, 1995.

H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 (3):405-413, 1997.

## Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
AFC	Amino-4-trifluoromethyl coumarin
AODN	“Antisense“-Desoxyoligonukleotide
AP-1	Transkriptionfaktor, aktiviert in akuter Phase
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-associated death promoter
Bak	Bcl-2-homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	“B-cell lymphomogene”
Bcl-w	Bcl-2l
Bcl-XL	“long splicing variant of a Bcl-2 related gene”
BH-3	Bcl-2 Homologiedomäne
Bid	BH-3 interacting death agonist
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CD	“cluster of differentiation”
CD95	Apoptose Rezeptor (Synonyme: APO-1 oder Fas)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (“copy deoxyribonucleic acid”)
CYP3A4	Cytochrom P 3A4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	(-)-1,4-L-Dithio-L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene

---

FSC	foreward-scatter
G	Guanosin
h	Stunde
IC <sub>50</sub>	Inhibiting concentration of 50%
ICE/CED-3	Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme/ <i>Caenorhabditis elegans</i>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Jun	Jun oncogene
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	Nuclear-Factor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pgp	P-Glykoprotein
PI	Propidiumjodid
PK	Protein-Kinase
PKC	Protein-Kinase C (c:classical; n: novel; a: atypical)
Ras	Rat sarcoma virus oncogene
Raf	Murine leukaemia viral oncogene
Rel/ NF- $\kappa$ B	Reticuloendotheliosis oncogene Nuclear-Factor $\kappa$ B
RNA	Ribonukleinsäure (“ribonucleic acid”)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SSC	side-scatter
SOS	son of sevenless protein
STAT	Signal transducers and activators of transcription



T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquatius ( hitzeresistenter Bakterienstamm)
TGF $\beta$	Tumor-Growth-Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R1/DR4	TRAIL Receptor 1/Death Receptor 4
TRAIL-R2/DR5	TRAIL Receptor 2/Death Receptor 5
TRAIL-R3/DcR1	TRAIL Receptor 3/Decoy Receptor 1
TRAIL-R4/DcR2	TRAIL Receptor 4/Decoy Receptor 2
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit
(w/v)	Gewicht pro Volumen
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

# Lebenslauf

Name: Katrin Ahlbrecht  
Geburtstag: 09.10. 1976  
Geburtsort: Kassel

## Schulische Laufbahn:

1983-96 Freie Waldorfschule Kassel  
1996 Abitur

## Studium:

1996-laufend Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt  
Universität Greifswald (EMAU)  
1999 Physikum  
2000 Erstes Staatsexamen  
2002 Zweites Staatsexamen  
2002-laufend Praktisches Jahr  
10/02-02/03 Chirurgische Ambulanz EMAU Greifswald  
02/03-05/03 Innere Medizin Klinik B  
Bereich Pneumologie und Infektiologie  
EMAU Greifswald  
05/03-09/03 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Abt. Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
EMAU Greifswald

## Promotion:

2000-2003 in der Abteilung Pädiatrische Onkologie und  
Hämatologie unter der Leitung von Prof. Dr.  
med. James F. Beck am Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie: Peter Holtz  
Research Center of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics der Ernst-Moritz-  
Arndt-Universität Greifswald, Direktor: Prof.  
Dr. rer. nat. H. K. Kroemer.

Thema: Validierung von Protein-Kinase C $\eta$  und Bcl-XL  
als Resistenzfaktor der Lungenadenokarzinom-  
zelllinie A549

Wissenschaftliche

Hilfskraft:

10/01-03/02

in der Abteilung Pädiatrische Onkologie und  
Hämatologie unter der Leitung von Prof. Dr.  
med. James F. Beck am Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie: Peter Holtz  
Research Center of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics der Ernst-Moritz  
Arndt-Universität Greifswald, Direktor: Prof.  
Dr. rer. nat. H. K. Kroemer.