

Aus der Abteilung Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
(geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Holger Lode)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Thema: Suppression Apoptose-inhibierender Faktoren in der  
Tumorzelllinie A549 mit Antisense- Desoxyoligonukleotiden  
in Kombination mit der zytotoxischen Wirkung von Zytokinen**

**Inaugural-Dissertation**  
**zur**  
**Erlangung des akademischen**  
**Grades**  
**Doktor der Medizin**  
**(Dr. med.)**  
**der**  
**Medizinischen Fakultät**  
**der**  
**Ernst-Moritz-Arndt-Universität**  
**Greifswald**  
**2009**

|                |                 |
|----------------|-----------------|
| vorgelegt von: | Steffen Meißner |
| geboren am:    | 27.04.1978      |
| in:            | Rostock         |

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer, Direktor am Institut für  
Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Beck

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Hochhaus, Klinik für Innere Medizin II,  
Universitätsklinikum Jena

Ort: Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Greifswald

Tag der Disputation: 25. August 2010

## Inhaltsverzeichnis

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.       | Einleitung  | 6  |
| 1.1.     | Zellzyklus und Tumorentstehung                                      | 6  |
| 1.1.1.   | Zellzyklus  | 6  |
| 1.1.2.   | Tumorentwicklung  | 7  |
| 1.2.     | Apoptose und Caspasen   | 8  |
| 1.2.1.   | Apoptose  | 8  |
| 1.2.2.   | Funktion der Caspasen in der Apoptose                               | 9  |
| 1.2.3.   | Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose                           | 10 |
| 1.2.3.1. | Der mitochondriale Signalweg  | 11 |
| 1.2.3.2. | Der Death-Receptor-Weg  | 11 |
| 1.3.     | Regulation der Apoptose durch die Mitglieder der Bcl-2-Familie      | 12 |
| 1.3.1.   | Struktureigenheiten und Funktionen der Bcl-2-Familie                | 13 |
| 1.3.2.   | Bcl-2 und Bcl-xL  | 13 |
| 1.4.     | Die Proteinkinase-C-Familie (PKC)                                   | 15 |
| 1.4.1.   | Struktur der Proteinkinase-C  | 15 |
| 1.4.2.   | Proteinkinase-C-eta (PKC-eta)                                       | 16 |
| 1.5.     | Die Zytokine TNF-alpha und TRAIL                                    | 17 |
| 1.5.1.   | Der Immunmodulator Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)             | 18 |
| 1.5.2.   | TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)                       | 18 |
| 1.6.     | Chemoresistenz bei der Tumorthherapie und TRAIL                     | 19 |
| 1.7.     | Antisense-Oligodesoxynukleotide (AODN)                              | 20 |
| 1.8.     | Die Tumorzelllinie A549   | 23 |
| 1.9.     | Aufgabenstellung  | 23 |
| 2.       | Material und Methoden   | 25 |
| 2.1.     | Material  | 25 |
| 2.1.1.   | Reagenzien für die Zellkultur                                       | 25 |
| 2.1.2.   | Mycoplasmentest   | 26 |
| 2.1.3.   | Reagenzien für die Vitalitätsbestimmung nach der Trypanblau Methode | 26 |
| 2.1.4.   | Reagenzien zum Einfrieren von Zellen                                | 26 |
| 2.1.5.   | Reagenzien für die Transfektion                                     | 26 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.1.6.   | Reagenzien für die RNA-Isolation                               | 27 |
| 2.1.7.   | Reagenzien für die Realtime PCR (TaqMan PCR®)                  | 27 |
| 2.1.8.   | Reagenzien für die Western Blot Analyse von PKC-eta und Bcl-xL | 27 |
| 2.1.8.1. | Reagenzien für die Protein-Isolation                           | 27 |
| 2.1.8.2. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                            | 28 |
| 2.1.8.3. | Elektronentransfer von Proteinen auf Membranen                 | 28 |
| 2.1.8.4. | Reagenzien zur Proteindetektion von Bcl-xL und PKC-eta         | 29 |
| 2.1.9.   | Reagenzien für funktionelle Tests                              | 30 |
| 2.1.9.1. | Zytokine   | 30 |
| 2.1.9.2. | Reagenzien für den Caspase-Aktivitätstest                      | 30 |
| 2.1.10.  | Reagenzien für Zellzyklusanalysen                              | 31 |
| 2.2.     | Methoden   | 31 |
| 2.2.1.   | Zellkultivierung   | 31 |
| 2.2.1.1. | Auftauen und Kultivieren der Zelllinie A549                    | 31 |
| 2.2.1.2. | Einfrieren der Zellen  | 32 |
| 2.2.1.3. | Mycoplasmentest  | 32 |
| 2.2.2.   | Gapmer-AODN-Behandlung   | 33 |
| 2.2.3.   | Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse.       | 35 |
| 2.2.3.1. | Isolierung der RNA   | 35 |
| 2.2.3.2. | RNA-Konzentrationsbestimmung                                   | 36 |
| 2.2.4.   | TaqMan®-PCR Technik  | 36 |
| 2.2.5.   | Western Blot Analyse des Bcl-xL und PKC-eta auf Proteinebene   | 42 |
| 2.2.5.1. | Prinzip der Western-Blot-Analyse                               | 42 |
| 2.2.5.2. | Gewinnung der Proteinproben                                    | 42 |
| 2.2.5.3. | Bestimmung der Proteinkonzentration                            | 42 |
| 2.2.5.4. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                            | 43 |
| 2.2.5.5. | Elektronentransfer von Proteinen auf Membranen                 | 43 |
| 2.2.5.6. | Proteindetektion von Bcl-xL und PKC-eta                        | 44 |
| 2.3.     | Funktionelle Versuche  | 45 |
| 2.3.1.   | Kultivierung unter Zytostatikaapplikation                      | 45 |
| 2.3.2.   | Caspase-Aktivitätstests  | 45 |
| 2.4.     | Zellzyklusanalyse  | 47 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.     | Ergebnisse   | 49 |
| 3.1.   | Genexpressionsanalysen mittels Realtime PCR (Taq Man PCR®)   | 49 |
| 3.1.1. | Genexpressionsanalysen nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-xL                                    | 49 |
| 3.1.2. | Genexpressionsanalysen nach gapmer-AODN-Behandlung<br>der Zellen gegen PKC-eta                     | 50 |
| 3.2.   | Expressionsanalysen mittels Western Blot   | 51 |
| 3.2.1. | Bcl-xL-Proteinanalyse  | 51 |
| 3.2.2. | PKC-eta-Proteinanalyse   | 52 |
| 3.3.   | Funktionelle Analysen nach Transfektion von A549 Zellen<br>mit Gapmer-AODNs                        | 53 |
| 3.3.1. | TRAIL-induzierte Caspase-3-Aktivierung   | 53 |
| 3.3.2. | TRAIL-induzierte Caspase-9-Aktivierung   | 56 |
| 3.3.3. | TNF-alpha-induzierte Caspase-3-Aktivierung   | 59 |
| 3.4.   | Auswertung der Zellzyklusanalyse   | 60 |
| 3.4.1. | Zellschädigung unter TRAIL-Applikation   | 60 |
| 3.4.2. | Bcl-2 in der Zellzyklusanalyse   | 63 |
| 3.4.3. | Zellzyklusanalyse unter TNF-alpha-Applikation  | 64 |
| 4.     | Auswertung und Diskussion  | 66 |
| 4.1.   | Einsatz von Antisense-Oligodesoxynukleotiden zur Herabsetzung<br>intrazellulärer Resistenzfaktoren | 67 |
| 4.2.   | Auswirkungen der Suppression von Bcl-xL<br>bei Anwendung des Zytokins TRAIL                        | 68 |
| 4.3.   | Auswirkungen der Suppression von PKC-eta<br>bei Anwendung des Zytokins TRAIL                       | 71 |
| 4.4.   | Auswirkungen der Suppression von PKC-eta, Bcl-xL und Bcl-2 bei<br>Anwendung des Zytokins TNF-alpha | 73 |
| 4.5.   | Zusammenfassung  | 74 |
|        | Literaturverzeichnis   | 76 |
|        | Abkürzungen  | 90 |
|        | Danksagung   | 93 |
|        | Lebenslauf   | 94 |
|        | Erklärung  | 95 |

# 1. Einleitung

## 1.1. Zellzyklus und Tumorentstehung

### 1.1.1. Zellzyklus

Mehrzellige Organismen benötigen für ihre Organisation und Entwicklung einerseits die Möglichkeit, Gewebe und Zellen gezielt wachsen und sich differenzieren zu lassen, sowie andererseits bei Bedarf wieder zu zerstören. In der Wachstums- und Entwicklungsphase durchschreitet die einzelne Zelle deshalb einen Zellzyklus (Tab. 1) bestehend aus Mitose (M) und Interphase, wobei sich die Interphase weiter in eine so genannte präsynthetische Phase (G1), die Synthesephase (S) und eine postsynthetische Phase (G2) aufteilt. Zellen können auch in eine Ruhephase (G0) übertreten, in der sie sich nicht an Zellteilung und DNA-Replikation beteiligen.

**Tab. 1:** Die Phasen des Zellzyklus und ihre charakteristischen Merkmale

Der Zellzyklus der Zelle ist in zwei Phasen gegliedert: Nach der Mitose (Kernteilung) kommt die Zelle in die Interphase (Zwischenphase). Die Interphase wird in die G1-, S- und G2-Phase aufgeteilt.

Mitose-Phase : Teilung der Chromosomen, des Zellkerns (Karyokinese) und der Zelle (Cytokinese).

G1-Phase (Interphase) : postmitotische Phase oder Präsynthesephase: Im Anschluss an die Mitose beginnt die Zelle wieder zu wachsen, Zellbestandteile (Cytoplasma oder Cytosol, Zellorganellen) werden nachgebildet und ausdifferenziert. Die Vorbereitung auf die folgende Synthese erfolgt durch Produktion von mRNA für Histone und Replikationsenzyme (DNA-Polymerasen, Ligasen).

Synthese-Phase (Interphase): Reduplikation (Replikation) der DNA, Produktion der Histone, Vorbereitung der Zellteilung.

G2-Phase (Interphase) : prämitotische Phase oder Postsynthesephase: Das Endoplasmatische Retikulum wird eingeschmolzen, die Zelle bereitet sich auf die Mitose vor. In Geweben lösen sich die Zellkontakte zu den Nachbarzellen, die Zelle rundet sich ab und vergrößert sich durch Flüssigkeitsaufnahme. Es werden verstärkt RNA-Moleküle und zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert, um die nachfolgende Mitose vorzubereiten.

G0-Phase (Ruhephase) : Zelle nimmt nicht am Zellzyklus teil und übt gewebespezifische Funktionen aus. Einstieg in die G1-Phase möglich

Um einen geordneten Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten, greift der Organismus auf ein System von Kontrollmechanismen und Signalkaskaden zurück, bei denen bestimmte Proteine aus der Gruppe der cyclin-abhängigen Proteinkinasen (cdk) eine wichtige Rolle spielen [Fang et Newport 1991, Massague 2004, Morgan 1997]. Darüber hinaus sind Rückkopplungsmechanismen notwendig, um den Ablauf des Zellzyklus entsprechend den erwünschten Funktionen des Gewebes innerhalb von Zellverbänden und Organen zu bremsen, zum Stoppen zu bringen oder wieder aufzunehmen [Gerard et al. 2001, Murray 1992].

### 1.1.2. Tumorentwicklung

Falls die Zellteilung hemmenden Systeme ausfallen, kann eine unkontrollierte Zellproliferation zur Entstehung eines Tumors beitragen. Krebszellen weisen in ihrer DNA häufig mehrere Gendefekte auf, die in Zuständigkeitsbereichen für Zellproliferation, den so genannten Protoonkogenen, für ein enthemmtes Zellwachstum sorgen können. Ein Beispiel hierfür ist das ras-Protoonkogen, das bei der Hälfte der Kolonkarzinome zu einem Onkogen mutiert ist [Kinzler et Vogelstein 1996]. Mutationen in Bereichen für Wachstumshemmung/Tumorsuppression können den Abbruch des Zellwachstums unterbinden, als Beispiele sind hier Defekte im Retinoblastom-Gen [Harbour et Dean 2000] oder im Tumorsuppressor-Gen p53 erwähnt [Woods et Vousden 2001]. Eine fehlerhafte Steuerung dieser Gene oder ihrer Produkte resultiert ebenfalls in unphysiologischer Zellteilung, wie es sich z.B. bei der Produktion des Retinoblastom-Proteins unter Kontrolle des Faktor TGF $\beta$  (Transforming growth factor beta) zeigen lässt [Fynan et Reiss 1993].

Jedoch bedarf die Ausbildung eines Tumors noch weiterer Voraussetzungen, um tatsächlich auszureifen und den Organismus zu stören. So muss sich die Tumorzelle mit ausreichend Wachstumsfaktoren selbst versorgen. Die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren lässt sich an normalen Zellkulturen erkennen, die sich nur bei Anwesenheit von exogenen Faktoren und für die Zellteilung notwendigen Substraten vermehren. Viele lösliche Wachstumsfaktoren werden durch eine Zellart produziert, um eine andere Zellart zu stimulieren. Viele Krebszellen erlangen die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren zu produzieren, die zur Selbststimulation führen und somit einen positiven Feedback-Mechanismus auslösen. Die Produktion von PDGF (Platelet derived growth factor) und TGF- $\alpha$  (Tumor growth factor alpha) in Glioblastomen und Sarkomen soll hier als Beispiel genannt werden [Guo et al. 2003]. Gelegentlich finden sich auch erhöhte Mengen von wachstumsfaktorsensiblen Rezeptoren in der Zellwand, wie man es beim HER2/neu-Rezeptor in Brusttumoren kennt

[Slamon et al. 1987], oder die Rezeptoren sind so verändert, dass sie ohne entsprechendes Signal von außen wachstumsfördernde Impulse in den Zellkern leiten.

Wachstumsfördernde Vorgänge werden aber nicht nur durch die oben genannten Rezeptoren in die Zelle geleitet, sondern können auch über bestimmte Integrine, zellwandständige Proteine mit Kontakt zu anderen Zellen und extrazellulären Substanzen, angeregt werden. Einige Tumorzellen weisen vermehrt Integrine mit zellteilungsfördernder Wirkung auf, während die hemmenden Proteine in ihrer Anzahl vermindert sind [Giancotti et Ruoslathi 1999, Lukashev et Werb 1998].

Nach all diesen Möglichkeiten der Tumorzellen, ihr Wachstum zu fördern, ist es jedoch von entscheidender Rolle für das Fortbestehen, dass sie sich nun im Kampf mit dem Abwehrsystem des Organismus nicht gleich wieder zerstören lassen [Cordon-Cardo et Prives 1999], die normalerweise vorhandene Grenze von Zellteilungen durch den effizienten Einsatz von Telomerasen zu umgehen [Shay et Bacchetti 1997] und sich mit ausreichend Nährstoffen über eigene Blutgefäße versorgen zu lassen [Folkman 1992].

## 1.2. Apoptose und Caspasen

### 1.2.1. Apoptose

Um den schädigenden Effekt autonomer, unkontrolliert wachsender Zellen aufzuheben, entwickelte sich in vielzelligen Organismen ein genetisches Programm des natürlichen Zelltodes, der als programmierter Zelltod bezeichnet wird und meist in der morphologischen Form der Apoptose auftritt. Die erste Beschreibung und der Begriff Apoptose stammen von der Arbeitsgruppe Kerr et al. 1972, die den geordneten Zerfall einer Zelle mit der griechischen Bezeichnung des herbstlichen Blätterfalls vergleichen. Der programmierte Zelltod spielt eine wesentliche Rolle bei der Immunabwehr und bei der Abwehr von potentiell schädigenden Zellen und ist notwendig für die Entwicklung, Reifung und Aufrechterhaltung von Gewebe bei Vielzellern [Bijl et al. 2001, Debatin 2001, Domen 2000, Zörnig et al. 2001]. Die Apoptose einer Zelle ist durch bestimmte morphologische Veränderungen gekennzeichnet (Tab. 2) und ist ein Energie verbrauchender Prozess, weswegen der Energielieferant Adenosintriphosphat (ATP) durch seine Konzentration im Zellplasma mitentscheidend ist, ob eine Zelle überhaupt geordnet und „programmiert“ sterben kann [Leist et al. 1997].



**Tab. 2:** Morphologische Merkmale der Apoptose

| Morphologische Kriterien   | Physiologische Kriterien  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Ausstülpung der Kernmembran ohne Verlust der Membranintegrität, Veränderung der Membranzusammensetzung</li><li>• Kondensation von Chromatin und Aggregation der DNA entlang der Kernmembran</li><li>• Definierte DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen</li><li>• Bei Autophagozytose Bildung zyttoplasmatischer Vakuolen</li><li>• Rasches Abschnüren apoptotischer Körperchen und Schrumpfen der Zelle</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Meist Tod von einzelnen Zellen oder Zellgruppen durch Aktivierung von physiologischen Botenstoffen</li><li>• Energie verbrauchender Prozess (ATP abhängig), Notwendigkeit des Vorkommens von zytosolischen synthetisierten Proteinen</li><li>• Phagozytose der Zellen oder Zellreste durch Mitglieder der monozytären Fresszellen wie z.B. Makrophagen</li><li>• Ausbleiben einer Entzündungsreaktion</li></ul> |

Die für die Apoptose wichtigen Proteine liegen als inaktive Vorstufen im Zellplasma vor und werden bei Bedarf in ihre aktiven Formen umgewandelt. Die Auslösung der Umwandlung erfolgt durch intrazellulären Stress und durch Botenstoffe, die sich an Rezeptoren anlagern und eine Kaskade bewirken [Guimaraes et Linden 2004, Zörnig et al. 2001]. Der Großteil dieser Prozesse mündet dabei in die Maschinerie der Caspasen, welche Proteine aus der Gruppe der Cysteinproteasen darstellen, die letztendlich für das Zerlegen der Zelle in ihre Bestandteile verantwortlich sind [Cryns et Yuan 1998, Zhivotovsky et al. 1997]. Die Apoptose kann schematisch in drei Schritte unterteilt werden, die Induktion, die Regulation und die Termination.

### 1.2.2. Funktion der Caspasen in der Apoptose

Caspasen sind generell die ausführenden Bestandteile der Apoptose bei Vielzellern. Sie gehören zu einer homologen Gruppe von Cysteinproteasen, die inaktiv im Zellplasma liegen und nach Aktivierung Substrate spezifisch nach Aspartat-Sequenzen innerhalb eines Tetrapeptids spalten [Thornberry et al. 1997]. Caspasen werden entsprechend ihrer Substratpräferenz, Substraterkennung und Strukturähnlichkeiten in Untergruppen gegliedert.

14 Mitglieder der Caspasen sind bisher identifiziert worden, die an verschiedenen Aufgaben wie z.B. der Reifung von Zytokinen [Zörnig et al. 2001] beteiligt sind, wobei der größte Anteil jedoch essentielle Funktionen in der Zelltodmaschinerie übernimmt.

Bei Inaktivierung der Caspasen durch Pharmazeutika oder deren Elimination aus der Zelle kommt es zum Verlangsamten oder Ausbleiben des Zelltodes [Earnshaw et al. 1999]. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch Spaltung mittels anderer Caspasen innerhalb der Apoptose-Kaskade, durch Selbstaktivierung oder durch andere Proteinasen wie z.B. Granzym B [Zörnig et al. 2001]. So genannte Initiatorcaspasen (Caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -14), die am Anfang eines Prozesses stehen, werden via Oligomerization oder Autokatalyse prozessiert [Thornberry et al. 1997], während Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) am Ende des Prozesses im Wesentlichen von den Initiatorcaspasen gespalten und aktiviert werden [Herr et Debatin 2001]. Die Aktivität der Effektorcaspasen, allen voran Caspase-3, ist insgesamt wesentlich höher als die meist in Vorstufen ruhenden Initiatorcaspasen.

Für die Caspasen sind über 100 Substrate bekannt, bei denen eine Spaltung zur Inaktivierung von zahlreichen Proteinen und zum Erscheinungsbild des programmierten Zelltodes führt [Liu et al. 1998]. Von großer Bedeutung ist die Aktivierung der caspase-activated DNase (CAD) durch die Effektorcaspase-3, indem sie eine hemmende Untereinheit, ICAD, abtrennt [Enari et al. 1998, Sakahira et al. 1998] und die aktivierte DNase nun die DNA zwischen den Nukleosomen in spezifische Basenpaare zerlegt [Wyllie 1980]. Das Auftrennen des für die Struktur der Kernmembran wichtigen Lamins resultiert im Schrumpfen der Membran. Das Spalten eines Proteins aus der Familie der p21-aktivierten Kinasen, das PAK2, bewirkt das Ausstülpen und Abschnüren von Vesikeln [Rao et al. 1996, Rudel et Bokoch 1997]. Die Caspase-3 verursacht durch das Spalten von Proteinen des Zytoskeletts, wie z.B. Fodrin und Gelsolin, welche die Form der Zelle erhalten, den Zusammenbruch der Zellstruktur [Khotakota et al. 1998].

### 1.2.3. Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose

Im Hinblick auf die Tumorthherapie-induzierte Apoptose lassen sich auf molekularer Ebene zwei apoptotische Signalwege unterscheiden: der mitochondriale und der Todesrezeptor (Death-Receptor-) Signalweg.

### **1.2.3.1. Der mitochondriale Signalweg**

Bedeutend für die Funktion des Mitochondriums ist die doppelte Membran als Abgrenzung gegenüber dem Zellplasma. Ausgelöst durch zytotoxische Chemotherapeutika [Green 1998] und/oder Proteine aus der Bcl-2-Familie [Antonsson et Martinou 2000, Luo et al. 1998] kommt es zum Austritt von Cytochrom-c durch die äußere Mitochondrienmembran in das Zellplasma. Die Freisetzung kommt durch Porenbildung in der Membran oder Anschwellen bis zum Platzen zustande [Kroemer et Reed 2000]. Die eigentliche Hauptfunktion des Cytochrom-c ist die oxidative Energiegewinnung [Moore et Pettigrew 1990, Pettigrew et Moore 1987]. Das Cytochrom-c verbindet sich im Zytosol mit den freien Faktoren Apaf-1 („apoptotic protease-activating factor-1“) und Caspase-9, die zusammen das so genannte Apoptosom bilden, welches dann seinerseits hauptsächlich die Effektor-Caspase-3 und die Caspasen 6 und 7 aktiviert [Li et al. 1997]. Letztendlich kommt es durch die Endonuklease-Aktivierung im Zellkern zur typischen DNA-Fragmentierung.

Zusätzlich zum Cytochrom werden noch 2 weitere wichtige Faktoren aus dem Mitochondrium entlassen. Zum einen handelt es sich um das Protein Smac/DIABLO, welches die Apoptose fördert, indem es Caspase-hemmende Faktoren, nämlich die „Inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP's), bindet und neutralisiert [Du et al. 2000]. Zum anderen wird der selbst apoptotisch wirkende AIF (apoptosis-inducing factor) freigelassen, dessen genaue Wirkmechanismen noch nicht bekannt sind, der aber Caspase-unabhängig agiert [Hengartner 2000].

### **1.2.3.2. Der Death-Receptor-Weg**

Dieser Signalweg ist von der Aktivierung von Rezeptoren der CD95- Familie abhängig [Medema et al. 1997]. Die Rezeptoren liegen in löslicher Form im Zellplasma vor oder sind in der Zellwand verankert, wo sie hochsensitiv auf äußere Signale reagieren [Nagata 1997]. Nach Bindung von Signalen wie CD95-L, dem Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) oder „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) kommt es an intrazellulär liegenden Anteilen der Rezeptoren zur Tri-Merisierung und Selbstaktivierung sowie zur Anlagerung von Adaptorproteinen wie z.B. FADD oder TRADD. Der gebildete Komplex, DISC, kann an bestimmten Abschnitten der Adaptorproteine, den Death-effector-domains (DED), die Caspase-8 binden und spalten [Herr et Debatin 2001]. Die Caspase-8 als Initiator-Caspase setzt daraufhin die Kaskade der Effektormechanismen in Gang, wobei die

Aktivierung der Caspase-3 die wichtigste Rolle spielt. Darüber hinaus aktiviert die Caspase-8 das Protein tBid, welches als Mitglied der Bcl-2-Familie Einfluss auf den mitochondrialen Signalweg mit der Ausschüttung von Cytochrom c hat [Luo et al. 1998, Li et al. 1998]. Dieser Weg wird als Bindeglied zwischen dem Todesrezeptor-vermittelten und dem mitochondrialen Weg beschrieben.

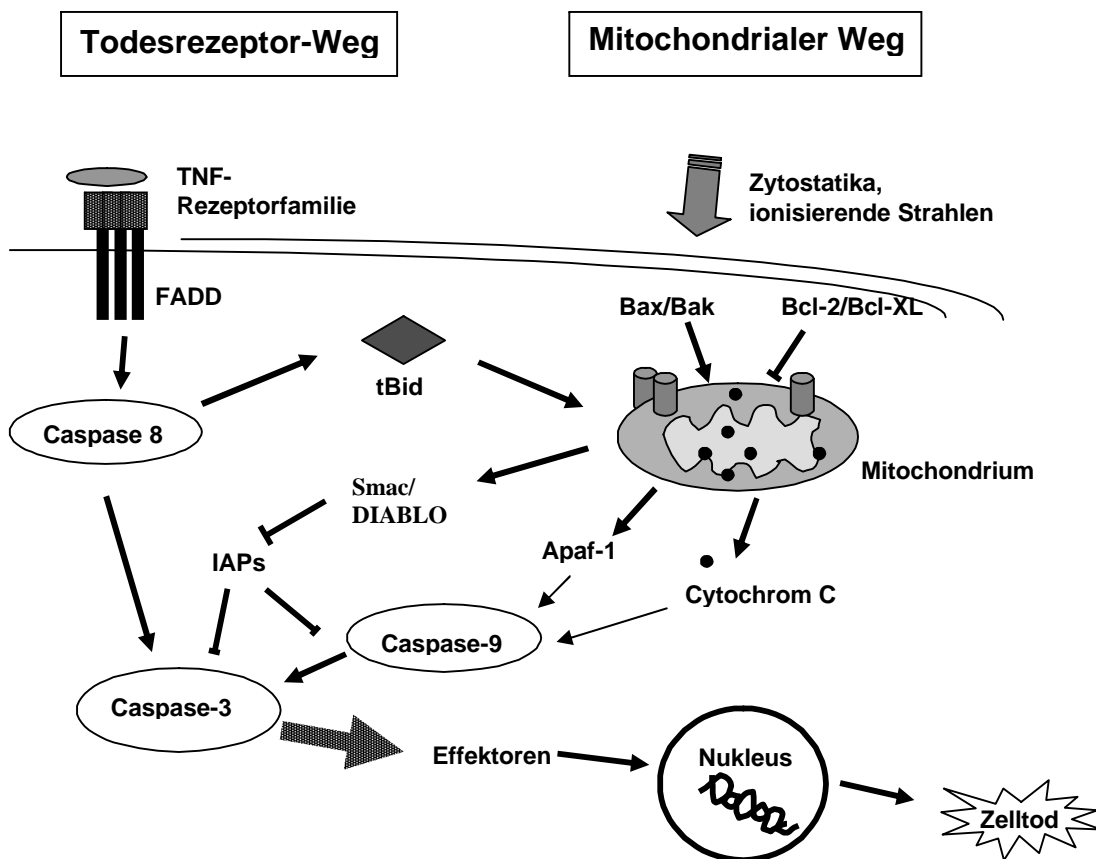


Abb. 1: Schematische Darstellung der zwei Hauptwege der apoptotischen Kaskade. Modifiziert nach Zörnig et al. 2001

### 1.3. Regulation der Apoptose durch die Mitglieder der Bcl-2-Familie

Bei den Bcl-2-Proteinen handelt es sich um apoptoseregulierende Signalgeber der Zellen, die zum einen Teil den Zelltod fördern oder zum anderen Teil hemmen können. Namensgebend für diese Proteingruppe ist das Onkogen Bcl-2, das oft in B-Zell-Lymphomen mit der t(14:t18)-Translokation überexprimiert wird [Tsujiimoto et al. 1985].

### 1.3.1. Struktureigenheiten und Funktionen der Bcl-2-Familie

Allen gemein ist, dass ihre Struktur 4 zueinander homologe Domänen aufweist (BH1, BH2, BH3, BH4), die in ihren  $\alpha$ -helicalen Segmenten übereinstimmen [Reed et al. 1996]. Während die apoptosehemmenden Moleküle (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1) meist in allen 4 Domänen konstant bleiben, spielt bei den proapoptotischen (Bax, Bak, Bid, Bik) Mitgliedern die weitgehend konstante BH3-Domäne die wichtige Rolle der „death domain“ [Gross et al. 1999, Kelekar et Thompson 1998]. Die Aktivierung der Caspasen über die Mitochondrien wird im Wesentlichen durch diese Proteine gesteuert, wobei offensichtlich das Verhältnis von apoptosefördernden zu apoptosehemmenden Mitgliedern über die Ausschüttung des Cytochrom-c und die Einleitung des Zelltodes entscheidet [Cory et Adams 2002, Oltvai et al. 1993].

Als wesentlicher Angriffspunkt der Proteine gilt die äußere Membran des Mitochondriums über die hydrophobe Reaktionsgruppe am terminalen Carboxylende [Ngyen et al. 1993]. Nach Anlagerung in die Mitochondrienmembran kommt es zur Konformationsänderung und Oligomerization, wodurch kleine leitfähige Kanäle entstehen können [Rudel et Bokoch 1997]. Diese Kanäle werden durch Rekrutierung von mitochondrialen Außenmembranmolekülen wie z.B. VDAC-protein (voltage dependent anion channel) vergrößert, was nach räumlicher Strukturumlagerung zur Öffnung eines leitfähigen Kanals (PTP-permeability transition pore) führt [Du et al. 2000]. Es existieren Modelle, bei denen Bcl-2-Proteine über die Regulation von oxidativen Vorgängen und Ionenaustausch Membranrisse herbeiführen, die genügend Platz für den Austritt von großen Proteinen wie Cytochrom c lassen [Hengartner 2000].

### 1.3.2. Bcl-2 und Bcl-xL

In Experimenten wurde gezeigt, dass apoptosehemmende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL sich an den oben erwähnten PTP anlagern und sein Öffnen verhindern [Kroemer 1999]. Die Aktivierung des proapoptotischen Bax wird durch Bcl-2 und Bcl-xL verhindert, was eine Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran erschwert [Gross et al. 1999]. Weiterhin wurde bei Überexpression von Bcl-2 eine Hemmung der Einlagerung von Bax in die Mitochondrienmembran festgestellt [Murphy et al. 1999]. Die genannten Mechanismen gehen mit einer deutlich reduzierten Cytochrom-c und Smac/DIABLO Ausschüttung einher, welche als wesentliche Effektoren der Apoptose agieren.

Bcl-2 und Bcl-xL blockieren oder zumindest reduzieren die Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6, -7 und der Caspase-8 und -9 unter anderem durch Zusammenlagerung mit Proteinen wie z.B. Raf-1 protein Kinase, R-ras [Earnshaw et al. 1999, Zörnig et al. 2001]. Die ausgesprochen komplizierte Regulation der Bcl-2-Familie zeigt sich an den zahlreichen Netzwerken von Faktoren, welche z.B. einen Einfluss auf das Bcl-xL-Gen über STAT und NF- $\kappa$ B haben und das Bcl-2-Gen über das Rb/p53-System regulieren [Cory et Adams 2002, Grad et al. 2000, Mayo et al. 2003, Zörnig et al. 2001]. Aufgrund ihrer Wirkungsweise und Funktion sind die Proteine Bcl-2 und Bcl-xL beteiligt an der Tumorentstehung und Resistenzentwicklung von Zellen gegenüber Zytostatika. Bei erhöhter Bcl-2 Expression im Mausmodell lässt sich eine Anhäufung von B-lymphoiden Tumoren nachweisen [McDonnell et al. 1989]. Bei Coexpression von Bcl-2 und Myc konnte in Studien ein Anstieg von Lymphomen oder Brustkrebs bei Mäusen verzeichnet werden [Jager et al. 1997, Strasser et al. 1990]. Eine andere Arbeit zeigte, dass Bcl-xL in malignen myeloischen Zellen im Gegensatz zu nicht malignen Zellen unter Umgehung des Jak-Kinase-Signalwegs verstärkt das Überleben von Leukämiezellen ohne weitere Überlebensfaktoren für die Zellen ermöglichte [Pakham et al. 1998]. Weitere Studien wiesen auf eine Erhöhung der Tumoresistenz gegenüber Chemotherapeutika bei Überexpression von Bcl-2 und Bcl-xL hin [Raffo et al. 1995, Tu et al. 1998].

Nicht einheitliche Ergebnisse gibt es bei der Herunterregulation von Bcl-2 und Bcl-xL. Einige Arbeiten an Prostatakarzinomzelllinien und Kleinzelligen- sowie Nichtkleinzelligen Lungentumorzelllinien [Gleave et al. 1999, Zangemeister-Wittke et al. 2000] zeigten eine Verbesserung der Chemosensibilität, während andere Untersuchungen zumindest bei Bcl-2 keinen Effekt erzielen konnten [Raffo et al. 2004]. Im Hinblick auf diese Datenlage ist die Wirkung der Suppression von Bcl-2 und Bcl-xL auf die nichtkleinzellige Lungenkarzinomzelllinie A549 in der vorliegenden Doktorarbeit ein wichtiger Untersuchungsaspekt.

## 1.4. Die Proteinkinase-C-Familie (PKC)

Die Regulation zahlreicher Stoffwechselfvorgänge und ein wesentlicher Anteil der Signaltransduktion sind abhängig von der Phosphorylierung von Proteinen. Enzyme wie z.B. die Familie der Proteinkinasen sind durch derartige Prozesse an der Weiterleitung zellulärer Signale maßgeblich beteiligt. Bei Energie-verbrauchenden Prozessen wird eine Phosphat-Gruppe von ATP auf Substrate oder weitere Kinasen übertragen.

### 1.4.1. Struktur der Proteinkinase-C

Die Einteilung der Protein-C-Kinasen bezieht sich auf ihre biochemische Wirkungsweise [Mellor et Parker 1998]. Die Subgruppen bestehen aus phorbolsterstimulierbaren und Calcium-abhängigen, so genannten „konventionellen“ PKCs, phorbolsterstimulierbaren und Calcium-unabhängigen „novel“ PKCs sowie den „atypischen“ Calcium-unabhängigen und nicht phorbolsterstimulierbaren Proteinkinasen. Zusätzlich wird ein Enzym, die PKD, der Gruppe der Proteinkinasen-C angerechnet, mit PKC-ähnlichen regulatorischen Elementen bei jedoch strukturellen Abweichungen der katalytischen Domäne [Dekker et al. 1995]. Die Proteinkinasen bestehen im Wesentlichen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 4 konservierten (C-) Regionen und 5 variablen (V-) Regionen. Die konservierte katalytische Domäne besteht aus Substrat- und ATP-Bindungsstelle (C3 und C4) und wird durch die Domäne C1 und C2 reguliert [Parker et al. 1986]. Für die „konventionellen“ und „novel“ PKCs sind die doppelten Kopien cysteinreicher Sequenzen in der C1-Region typisch, die als Bindungsstellen von DAG und Phorbolestern dienen. Die „atypischen“ Isoenzyme besitzen nur eine C1-Domäne ohne Bindefähigkeit von DAG oder Phorbolster. Die C2-Region besitzt bei den „konventionellen“ PKC-Isoenzymen eine asparaginreiche Calcium- und Phospholipidbindestelle, die in den „novel“ und „atypischen“ Proteinkinasen in modifizierter Form vorliegt und damit zu einer Calciumunabhängigkeit der beiden letztgenannten Gruppen führt [Mellor et Parker 1998]. Die Einteilung der bekannten Mitglieder der PKC-Isoenzyme ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tab. 3:** Einteilung der bekannten 12 Mitglieder 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 [Mellor et Parker 1998, Newton 1995].

| Subklasse             | Aktivatoren                                       | Referenz                           |
|-----------------------|---|------------------------------------|
| „konventionelle“ PKCs |   |                                    |
| α                     | Ca <sup>2+</sup> ; DAG; PS; FFA; lysoPC           | Nishizuka 1988<br>Nishizuka 1992   |
| β <sub>1</sub>        | "   | s.o.                               |
| β <sub>2</sub>        | "   | s.o.                               |
| γ                     | "   | s.o.                               |
| „novel“ PKCs          |   |                                    |
| δ                     | DAG; PS   | s.o.                               |
| ε                     | DAG; PS; FFA; PIP <sub>3</sub>                    | s.o.                               |
| η                     | DAG; PS; PIP <sub>3</sub> ;<br>Cholesterinsulphat | Kashiwagi, 2002<br>Nishizuka, 1992 |
| θ                     | ?   |                                    |
| „atypische“ PKCs      |   |                                    |
| ι                     | ?   | Nishizuka, 1992<br>Selbie, 1993    |
| ζ                     | PS; FFA; PIP <sub>3</sub> ; Ceramid               | Nishizuka, 1988<br>Nishizuka, 1992 |
| λ                     | PS  |                                    |
| PKC μ                 | DAG   | Dekker 1995                        |

### 1.4.2. Proteinkinase-C-eta (PKC-eta)

Die Isoform PKC-eta wurde aus der cDNA der Maus isoliert auf dem Chromosom 12 und dem Chromosom 14 des Menschen zugeordnet [Osada et al. 1990]. Als „novel“ PKC besitzt sie die Zink-Finger-artige, cysteinreiche C1-Region, die nicht Calcium-aktivierbare C2-Region und die ATP- bzw. Substrat-bindende C3- und C4-Region [Newton 1995, Osada et al. 1990]. Als relativ Gewebe-spezifisches Enzym kommt sie vor allem im Epithel in der Haut, Zunge, Magen und Ösophagus und im Tracheobronchialbaum vor. In den Zellen liegt die Proteinkinase in der Perinuklearregion und am endoplasmatischen Retikulum vor [Chida et al. 1994]. Sie wird vor allem in sich differenzierendem Plattenepithel exprimiert und deutet damit auf die vermutete Funktion für die Gewebsdifferenzierung hin [Kashiwagi et al. 2002, Koizumi et al. 1993]. In Astrozytomzelllinien induzierte PKC-eta die Proliferation nach Aktivierung durch TPA [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].

Die PKC- $\eta$  kann in anderen Zellen an der Tumorentstehung beteiligt sein. So wurde in Proben von Prostatakarzinomen ein signifikant höher exprimierter Anteil der Proteinkinase als in benignen Prostatahyperplasien [Koren et al. 2004] festgestellt. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen PKC- $\eta$ -Expression und Tumorprogression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit einem dreifachen Anstieg der PKC- $\eta$  in Tumoren mit der Gewebsdifferenzierung Grad 3 und 4 gegenüber Tumoren Grad 1 und 2 nachgewiesen werden [Brenner et al. 2003].

In Studien der Arbeitsgruppe Beck et al. korrelierten Expressionsgrade mit dem Chemoresistenzgrad und der Expression Resistenz-vermittelnder Gene in Tumorproben von Patienten: bei Mammakarzinom [Beck et al. 1998a], bei metastasiertem Ovarialkarzinom in Tumorzellen aus Aszitesproben [Beck et al. 1998b] und bei AML-Blasten [Beck et al. 1996]. Ferner korrelierte in diesen Proben das Expressionsniveau von PKC- $\eta$  signifikant mit der Differenzierung der Mammakarzinomzellen [Beck et al. 1998a]. Von anderen Autoren wurde beschrieben, dass die PKC- $\eta$ -mRNA-Expression in wenig differenzierten Kolonkarzinomen oder invasiven Mammakarzinomen geringer ist als in Adenomen und normalem Gewebe [Doi et al. 1994, Masso-Welch et al. 2001]. Weitere Studien mit Mammakarzinomzelllinien stellten die Proteinkinase als Inhibitor der apoptotischen Kaskade dar, die Überexpression von PKC- $\eta$  führte zur Inhibierung der durch TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose über die Hemmung der Caspase-8- und -7-Aktivierung. [Akkaraju et Basu 2000].

In Glioblastomzelllinien inhibiert PKC- $\eta$  die durch UV- und ionisierende Strahlung induzierte Apoptose durch Suppression der Aktivierung von Caspase-9 [Hussaini et al. 2002]. In normalen Keratinozyten kann die UV-Strahlen-induzierte Caspase-3-Aktivierung durch Überexpression der PKC- $\eta$  reduziert werden [Matsumura et al. 2003].

Die bisherigen Untersuchungen legen eine gewebsspezifische und möglicherweise nicht immer einheitliche Auswirkung oder Regulation der PKC- $\eta$  nahe, stellen aber in jedem Fall einen Ansatz zur Beeinflussung von Tumorzellen dar.

## 1.5. Die Zytokine TNF- $\alpha$ und TRAIL

Tumornekrosefaktoren (TNF) sind Zytokine in der Funktionskette des Immunsystems. Die Mitglieder dieser Familie interagieren mit speziellen Rezeptoren, die sich in der Gruppe der TNF-Rezeptorfamilie zusammenfassen lassen. Die Signaltransduktionswege können

einerseits die Proliferation, Differenzierung oder Aktivierung von Zellen auslösen, andererseits aber auch ihre Apoptose einleiten [Cosman 1994, Smith et al. 1994]. Zu den die Apoptose einleitenden bzw. teilweise hemmenden Rezeptoren gehören der TNF-Rezeptor-1, der CD95(Apo-1/Fas), der TRAMP (Apo-3, DR3, WSL) [Zörnig et al. 2001] und CAR 1 [Brojatsch et al. 1996], sowie die Rezeptoren des TNF-related Apoptosis inducing Ligand TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) [Degli-Esposti et al. 1997a, Degli-Esposti et al. 1997b, MacFarlane et al. 1997, Marsters et al. 1997, Sheridan et al. 1997]. Zellen mit vermindertem mitochondrialem Apoptoseweg - und damit weitgehender Zytostatikaresistenz - scheinen mehr oder weniger weiterhin der Rezeptorvermittelten Apoptose zugänglich zu sein. Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz ist vor allem das Zytokin TRAIL ein Hoffnungsträger.

### 1.5.1. Der Immunmodulator Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)

TNF-alpha wurde unter anderem in der makrophagenähnlichen Zelllinie J774.1 nach Aktivierung der Zellen durch Lipopolysaccharide vermehrt gefunden [Karahashi et Amano1998]. Die Produktion von TNF-alpha in aktivierten Makrophagen [Sampson et Chaplin 1996] und die Involvierung in den Prozess der Apoptose peripherer T-Lymphozyten [Sytwu et al. 1996, Zheng et al. 1995] sind Beispiele für die immunmodulatorische Wirkung und die aktive Rolle in der Apoptose. Versuche mit den humanen myeloiden Leukämie Zelllinien U937 und HL-60 zeigten, dass die Induktion der extrinsischen apoptotischen Kaskade durch Bryostatin 1 und den "cyclin dependent kinase inhibitor" Flavopiridol im Wesentlichen auf der erhöhten Freisetzung von TNF-alpha beruht [Cartee et al. 2003]. Die Induktion der Apoptose durch TNF-alpha wurde als Möglichkeit für die Tumorthherapie angesehen.

### 1.5.2. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

Der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ist ein Mitglied der TNF-Familie. Im Gegensatz zur lokal begrenzten Expression von TNF und dem CD95 Liganden wird die mRNA von TRAIL in zahlreichen Geweben exprimiert [Wiley et al. 1995]. Es besteht eine hohe strukturelle Verwandtschaft zwischen TRAIL und dem CD95L. TRAIL induziert die

Apoptose wie CD95L in einer Vielzahl von Zelllinien und besonders in aktivierten T-Lymphozyten [Walczak et Kramer 2000]. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-Liganden-Familie induziert TRAIL apoptotische Reaktionen vorzugsweise in Tumorzelllinien und nicht in normalen Geweben [Ashkenazi et Divit 1998, Baetu et Hiscott 2002]. Dies könnte in der Expression unterschiedlicher Rezeptoren für TRAIL begründet sein. Verschiedene Rezeptoren für TRAIL wurden identifiziert. Zwei von ihnen, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 enthalten zytoplasmatische "death domains" und induzieren Apoptose, während zwei weitere, TRAIL-R3 und TRAIL-R4 weder "death domains" besitzen noch Apoptose induzieren [Ashkenazi et Divit 1998, Baetu et Hiscott 2002]. Günstigerweise besitzen Tumorzelllinien überwiegend TRAIL-R-1 und TRAIL-R2 Rezeptoren [Baetu et Hiscott 2002]. Insbesondere scheint TRAIL-R2 bei DNA schädigender Bestrahlung oder Chemotherapie ein Ziel des p53-Pfades zu sein [Wu et al. 2000].

Die Fähigkeit der Apoptoseinduktion in Kombination mit Chemotherapeutika scheint besonders bei Krebszellen mit dem p53-Wildtyp ihre Wirkung zu entfalten, während auch Zellen mit mutiertem p53 durch TRAIL zerstört werden können [Kim et al. 2000, Kim et al. 2001]. Aufgrund seiner relativen Gewebsspezifität hofft man, TRAIL als zusätzlichen antineoplastisch wirksamen Wirkstoff in die Therapie maligner Tumorerkrankungen mit einzubeziehen und durch Kombination mit anderen Chemotherapeutika Tumorresistenzen zu umgehen.

## 1.6. Chemoresistenz bei der Tumorthherapie und TRAIL

Die Resistenzentwicklung ist ein großes Problem in der klinischen Anwendung der Chemotherapie. Die Behandlung mit Chemotherapeutikasubstanzen kann zeitweise das Tumorstadium begrenzen, häufig jedoch verlieren die Reagenzien ihre Effektivität gegenüber den Tumorzellen. Zum anderen kann eine Resistenz der Tumorzellen schon vor Beginn der Therapie vorhanden sein. Bei zahlreichen Zelllinien, die mit antineoplastischen Substanzen behandelt wurden (Vincaalkaloide oder Anthrazykline zum Beispiel), entwickeln sich häufig Resistenzen gegen ganze Zytostatikaklassen, obwohl die Selektion der Zellen nur mit einer dieser Substanzen durchgeführt wurde [Chen 1986]. Die konventionelle Chemotherapie induziert die Kaskade der Apoptose nur indirekt, so dass sich bessere und effektivere Ergebnisse durch eine direkte Aktivierung der Apoptose erhoffen lassen. In Anbetracht dessen ist TRAIL ein viel versprechender Kandidat, da er bei den meisten Krebszellen den Zelltod induziert und die normalen Zellen häufig ausspart [Younes A. et al

2003]. Bei einigen Krebsarten scheitert die zytotoxische Antwort von TRAIL jedoch bei seiner alleinigen Anwendung. In einer Studie mit primären Zellen von Leukämiepatienten erwirkte TRAIL nur in 25% eine relevante Induktion der Apoptose [Baader et al. 2005]. Insbesondere hepatozelluläre Tumore sind gegenüber TRAIL hoch resistent [Kim Y.S. et al 2002]. In einigen Untersuchungen konnte die Aktivität von TRAIL durch die Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika verstärkt werden. Zum Beispiel konnte ein synergistischer Effekt in der Zelltodinduktion durch Cisplatin und TRAIL in Kombination bei Nichtkleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) [Munshi et al. 2002] und bei Androgen-unabhängigem Prostatakrebs beobachtet werden [Frese et al. 2002]. Dieselben Mechanismen, die Tumorzellen vor der Wirkung der Chemotherapie und TRAIL schützen, werden jedoch auch zum Schutz der normalen Zellen herangezogen. Daraus lässt sich ableiten, dass neben einer Sensibilisierung von Krebszellen gegenüber TRAIL auch z.T. normale Zellen durch die Therapie betroffen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Sensibilisierung von gesunden Keratinozyten gegenüber TRAIL bei der zusätzlichen Anwendung von Cyclohexamid und MG115 [Leverkus et al. 2000 und 2003]. Es sollte deswegen sorgfältig nach Kombinationstherapien mit TRAIL gesucht werden, die sowohl eine effektive wie auch sichere Anwendung ermöglichen.

## 1.7. Antisense-Oligodesoxynukleotide (AODN)

Die Antisense-Technologie kann eine spezifische und effektive Methode zur Hemmung der Genexpression sein. Die Anwendung der Antisense-Technologie ermöglicht es, die Übertragung einer Information von DNA-Ebene auf die Protein-Ebene zu unterbinden bzw. einzuschränken und somit die Expression eines bestimmten Proteins zu hemmen.

Ein Antisense-Oligonukleotid besteht aus einer kurzkettigen synthetischen Nukleinsäure mit einer frei wählbaren Abfolge von Basen. Bestimmte Abschnitte der Basenabfolge der Antisense-Oligodesoxynukleotide (AODN) sind komplementär zur Basenabfolge der Ziel-mRNA. Der Wirkungsmechanismus der AODNs beruht auf ihrer Bindung an die Ziel-RNA über die Watson-Crick-Basenpaarung, einer Ausbildung eines RNA-DNA-Heteroduplex mit nachfolgender RNase-H-Aktivierung. Die ubiquitär vorkommende RNase-H spaltet dann ihrerseits mRNA, wobei entsprechend der Funktion des Enzyms die komplementäre DNA des Heteroduplex intakt bleibt. Das Oligodesoxynukleotid (ODN) wird wieder freigesetzt und kann weitere mRNA binden [Dias et Stein 2002, Tamm et al. 2001].

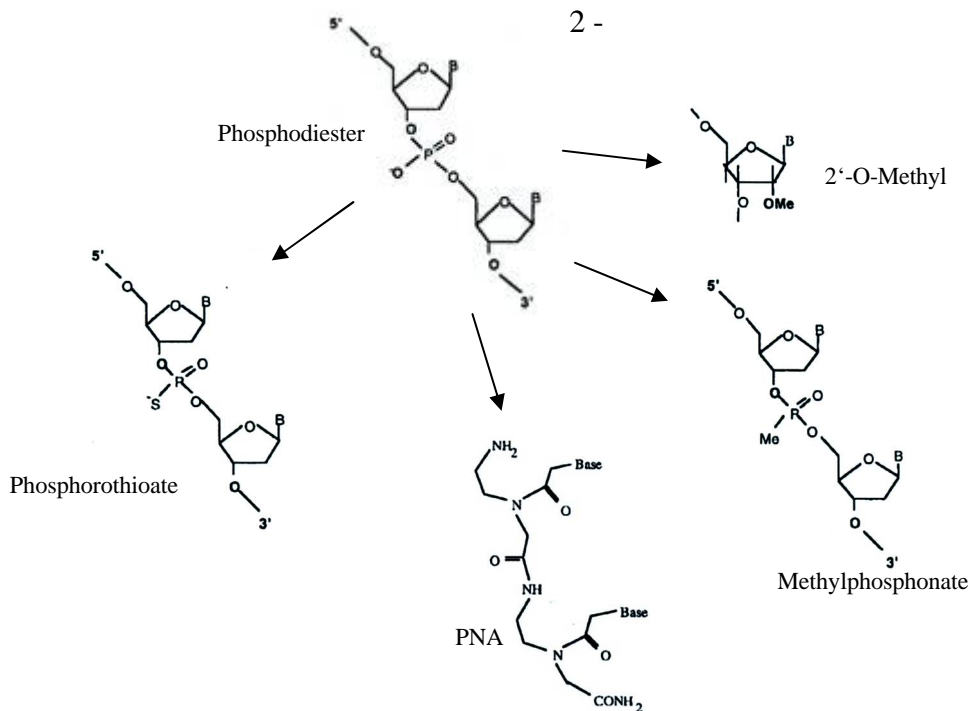
Aufgrund der anionischen Natur von Nukleotiden werden die reinen Oligonukleotide nicht oder kaum von Zellen aufgenommen. Die zelluläre Aufnahme von Antisensemolekülen kann einerseits über aktive Transporter erfolgen, zum anderen über Pinocytose und Endocytose [de Diesbach et al. 2000, Loke et al. 1989]. Da diese Transportmöglichkeiten jedoch nicht überall vorhanden sind und hohe Dosen der reinen Oligonukleotide wegen ihrer Affinität zu Heparin bindenden Molekülen [Guvakova et al. 1995, Khaled et al. 1996, Rockwell et al. 1997] toxische Wirkungen besitzen, sind für die suffiziente Aufnahme in lebende Zellen Trägersubstanzen notwendig.

Experimentell werden derzeit hauptsächlich verschiedene kationische Trägerlipide verwendet, die mit den ODNs Komplexe bilden und sie auf diese Weise in die Zellen einschleusen. Beispiele hierfür sind Lipofectin®, FuGENE® oder Superfect®. Wichtig ist hier das richtige Verhältnis aus Trägermolekül und ODN, das experimentell ermittelt werden muss. Für die Transfektion sollte die niedrigste wirksame Trägermolekül-Konzentration verwendet werden, um unspezifische Nebeneffekte bei höheren Dosen zu vermeiden [Lebedeva et al. 2000a, Stein 2001].

Ein wesentliches Problem in der Anwendung der Antisense Oligonukleotide stellt die nicht ausreichende Spezifität der Suppression der Proteine dar [Dias et Stein 2002]. Strukturelle Besonderheiten der Antisense-ODN sind zu beachten, da zum Teil durch die räumlich-sterische Anordnung der Antisense-Moleküle an der Ziel-RNA die Aktivität der RNase deutlich unterschiedlich ausfallen kann [Lima et al. 1997]. Ein weiteres Problem stellt die chemische Struktur der AODNs dar. So kann es zu unspezifischen toxischen Effekten kommen und die Estherbestandteile können durch Nucleasen relativ schnell abgebaut werden.

Um diesen Problemen entgegen wirken zu können, wurde die chemische Struktur im Laufe der Zeit mehrfach modifiziert. Die ersten chemisch modifizierten Oligonukleotide besaßen Methylphosphonate. Durch den Ersatz eines Sauerstoffatoms durch eine Methylgruppe verbesserte sich zwar die Stabilität, jedoch reduzierte sich die Löslichkeit der Moleküle. So reichte die Palette der weiteren Modifikationen von den Methylphosphonaten über die Phosphorothioate bis hin zu den Peptide nucleic acids (PNAs), die anstelle des Phosphat-Ribose-Rückgrats ein Polyamid-Rückgrat aufwiesen [Dias et Stein 200, Stein 2001].

Die in dieser Arbeit verwendeten AODNs gegen PKC- $\eta$  und Bcl-xL gehören der 2. Generation an, sind Chimere und werden auch als Gapmere bezeichnet (Abb. 2).



**Abb. 2: Verschiedene chemische Modifikationen von Antisense-Oligonucleotiden.**  
 B: Base, PNA: Peptide nucleic acid. Modifiziert nach Dias und Stein, 2002.

Durch eine Kombination aus Phosphorothioat-ODN und Methoxyethyl-ODN kann sowohl eine gute Affinität zur mRNA als auch eine gute, aber nicht zu starke RNase-H Aktivierung erreicht werden.

Die Gapmere bestehen aus einem Phosphorothioat-Rückgrat über die gesamte Sequenz und 2'-Methoxyethyl-Modifikationen an den jeweils endständigen 5 oder 6 Basen. Durch die Modifikation der jeweils 5 oder 6 letzten Nukleotide mit einer 2'-O-Methyl Gruppe wird die Bindungsaffinität zur mRNA erhöht. Es entsteht ein „gap“ aus acht bis zehn zentralen, nicht alkylierten Nukleotiden, die die RNase-H-Kompetenz vermitteln. Der Antisense-Effekt korreliert in diesem Fall mit der Affinität der AODN zur mRNA [Monia 1993]. Es handelt sich um Phosphorothioate mit einer Länge von 20 Basen, was in etwa einer optimalen Molekülgröße entspricht [Stein 2001]. Die Phosphorothioate sind stabiler gegenüber Nucleasen, besitzen eine höhere Löslichkeit gegenüber Methylphosphaten sowie eine relativ geringe unspezifische Eigenwirkung. Klinisch finden AODN-Medikamente bereits Anwendung, so ist Formivirsen (Vitravene) eine lokale Behandlung der CMV-Retinitis [Marwick 1998]. Auch für die chronisch lymphatische Leukämie und das Multiple Myelom existieren Behandlungsschemata im Rahmen der Chemotherapie in Kombination mit einem Bcl-2-AODN [Buchele 2003].

## 1.8. Die Tumorzelllinie A549

Meine Arbeit wurde an der Tumorzelllinie A549 durchgeführt, bei der es sich um menschliche alveoläre basale Epithelzellen handelt. Die Zelllinie stammt ursprünglich von einem 48 Jahre alten männlichen Kaukasier und kann Lecithin synthetisieren. Die Tumorzellen enthalten gelegentlich Einschlusskörperchen ohne bekannte humane Pathogene. Die Tumorzellen gehören zur Gruppe der Nichtkleinzelligen Lungenkarzinome und fallen unter die Subdivision der squamösen epithelialen Zellen [Giard D.J. et al 1973]. Sie zeichnen sich meist durch einen Verlust der Heterozygotie am Suppressorgen p53 aus. Neben Adenokarzinomen gehören die squamösen Lungenkarzinome zu den häufigsten primären malignen Lungentumoren, außerdem werden die squamösen Karzinome wie der Kleinzellige Lungenkrebs am stärksten mit Rauchen in Verbindung gebracht [Herbst et al. 2008]. Die Therapie der Nichtkleinzelligen Karzinome am Menschen besteht in der chirurgischen Resektion wenn möglich, eine Tumorverkleinerung kann durch die Bestrahlung erreicht werden. Um vorhandene Metastasen zu verkleinern oder eine weitere Streuung von Tumorzellen zu unterdrücken, werden gängigerweise Carboplatin und Paclitaxel eingesetzt, eine vollständige Therapie ist mit Chemotherapeutika bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich.

## 1.9. Aufgabenstellung

Die Behandlung von Tumoren beinhaltet die operative Entfernung, die Strahlentherapie und die Chemotherapie, um die Lebenszeit und die Lebensqualität von betroffenen Patienten zu verbessern. Die Therapierbarkeit einer Tumorerkrankung wird durch das Stadium der Erkrankung und durch die Überlebenseigenschaften der Tumorzellen bestimmt. Häufig ist eine vollständige chirurgische Resektion nicht möglich und die Strahlentherapie mit ihren zahlreichen Komplikationen eignet sich nicht zur Behandlung aller malignen Erkrankungen. Die Chemotherapie als Behandlungskonzept wird zur primären oder begleitenden Maßnahme eingesetzt und erweitert sich aufgrund intensiver Forschung, weswegen sie auch als wesentlicher Hoffnungsträger im Kampf gegen den Krebs angesehen wird.

Neben der Suche nach verträglicheren Substanzen liegt ein großer Teil der Forschung bei der Überwindung von Tumorresistenzen und einer besseren Wirksamkeit gegen Tumorzellen. Einen Angriffspunkt der Chemotherapeutika auf molekularer Ebene stellen die Apoptose, die eine Form des „programmierten Zelltods“ beinhaltet, und mit ihr

apoptosemodulierende Faktoren dar. Die Einleitung der Apoptose wird von einem Geflecht verschiedener Proteine mit gegensätzlichen Funktionen gesteuert. Die Überlebenschance von Tumorzellen beruht dementsprechend auf einer Produktion von Proteinen, die sie vor der Apoptose und somit auch vor chemotherapeutischen Wirkstoffen schützt.

Eine wichtige Gruppe apoptosemodulierender Proteine stellen Mitglieder der Bcl-2-Familie dar, wovon das Protein Bcl-xL, einen zentralen Aspekt in dieser Arbeit einnimmt. Weitere interessante Zielmoleküle sind Isoformen der Proteinkinase C, die ebenfalls mit der Resistenzentwicklung von Tumoren in Zusammenhang gebracht werden. Die Arbeitsgruppe um Prof. Beck erzielte bereits erste viel versprechende Ergebnisse auf diesem Gebiet. Es wurde ein effizientes System zur Suppression der Expression von Bcl-2, Bcl-xL und PKC-eta mit so genannten Antisense-Oligonukleotiden (Antisense-Gapmer-ODN-Technologie) an Karzinomzelllinien entwickelt. Versuche zur Wirksamkeit klassischer Zytostatika zeigten, dass die Gapmer-vermittelte Suppression von PKC-eta und Bcl-xL die Wirkung von Vincristin und Taxol signifikant verbessert [Sonnemann et al. 2004].

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Wirkung von TRAIL als zytotoxisches Agens zu überprüfen und eine Methode zur Zellsensibilisierung gegenüber dem Zytokin zu finden. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Resistenzfaktoren Bcl-xL und PKC-eta in einer Karzinomzelllinie durch die von der Arbeitsgruppe J. Beck etablierte Antisense-Gapmer-AODN-Methode unterdrückt. In einem 2. Schritt wurde die Wirksamkeit von Zytokinen, insbesondere TRAIL, gegen die vorbehandelten Tumorzellen in vitro gemessen. Die Untersuchungen wurden exemplarisch an der Zelllinie A549 vorgenommen. Die Analysen erfolgten mit verschiedenen Methoden wie Caspase-3-Aktivitätstests oder der Quantifizierung apoptotischer Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers.



## 2. Material und Methoden

Die für die Versuchsreihen notwendigen Chemikalien wurden über die Universitätsapotheke Greifswald bezogen, die jeweiligen Hersteller sind in Klammern aufgeführt.

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Reagenzien für die Zellkultur

- Ham's F12K Medium (Biochrom AG)
- Optimem 1 with Glutamax-I (GIBCO)
- Glutamin (Biochrom AG)
- Penicillin G (Biochrom AG)
- Streptomycinsulphat (Biochrom AG)
- fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom AG)
- Trypsin EDTA Lösung (Biochrom AG)
- PBS (Biochrom AG)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Wak Chemie)
  
- Rezeptur eines Nährmediums auf Ham's F12K - Basis:
  - FKS 10 %
  - L-Glutamin 2 mM
  - Penicillin G 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

Die von uns verwendeten 75 ml-Zellkulturflaschen und Sechslöchkulturplatten werden von NUNC Wiesbaden vertrieben.

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

### 2.1.2. Mycoplasmentest

- Mycoplasmen PCR ELISA (Boehringer, Mannheim)

### 2.1.3. 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)

### 2.1.4. Reagenzien zum Einfrieren von Zellen

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

### 2.1.5. Reagenzien für die Transfektion

- Lipofectin® Reagent (Invitrogen) 1 mg/ml
- Gapmer-Antisense-Oligodesoxynukleotide (Altana Pharma, Konstanz):  
PKC-eta-AODN (PKCETA7GAP1 2132)  
Bcl-xL- AODN (BYKMOE41BCLXLCS 1254)  
Bcl-2- AODN (NOV2009GAP1 2070)  
Kontroll-Bcl-xL-Inv-AODN (BYKMOE41INV 2043)

## 2.1.6. Reagenzien für die RNA-Isolation

- RNeasy® Mini Kit (Zusammensetzung der Komponenten bei Qiagen™):
  - Puffer RW1 (Wasch-Puffer)
  - Puffer RLT (Lyse-Puffer)
  - RPE Puffer (Wasch-Puffer [auf 55ml Puffer 44ml Ethanol])
  - RNase-freies Wasser

## 2.1.7. Reagenzien für die Realtime PCR (TaqMan PCR®)

- TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems):
  - AmpliTaq® DNA Polymerase
  - dNTPs
  - dUTP
  - Puffer Komponenten (zum Bsp. MgCl<sub>2</sub>)
  - Passive Referenz
  - Multi Scribe™ Reverse Transkriptase
  - RNase Inhibitor
- Primer und Sonden für PKC-eta, Bcl-xL (Metabion, Martinsried)

## 2.1.8. Reagenzien für die Western Blot Analyse von PKC-eta und Bcl-xL

### 2.1.8.1. Reagenzien für die Protein-Isolation

- Reagenzien für Wasch- und Lyseschritte:
  - PBS
  - RIBA-Puffer:
    - 40 mM 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 Natriumbicarbonat,

Natriumcarbonat, Natriumtartrat, Bicinchoninsäure

Lösung B: wässrige Kupfersulfatlösung

### 2.1.8.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Sammelgel:

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Polyacrylamid     | 5 %      |
| Tris-HCl (pH 6,8) | 0,125 mM |
| SDS               | 10 %     |

- Trenngel:

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Polyacrylamid     | 8,5 %   |
| Tris-HCl (pH 6,8) | 0,38 mM |

- Ladepuffer:

|   |           |
|---|-----------|
| 2 ml Tris-HCl (pH 6,8)                        | 0,625 M   |
| 5 ml Glycerin                                 |           |
| 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 |           |

### 2.1.8.3. Elektronentransfer von Proteinen auf Membranen

- PVDF-Membran (Millipore, Eschborn)

- Elektronentransfer-Puffer:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Tris-HCl (pH 8,3) | 5 mM       |
| Glycin            | 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) 5 % (w/v)

#### 2.1.8.4. Reagenzien zur Proteindetektion von Bcl-xL und PKC-eta

- Inkubations-Puffer:
  - PBS-Puffer
  - Rinderserumalbumin 0,5 %
  
- TBS/T-Puffer 0,005 %
  
- Antikörper gegen Zielproteine (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg):
  - monoklonaler Kaninchen-Anti-PKC-eta-AK (Verdünnung 1:5000)
  - monoklonaler Maus-Anti-Bcl-xL-AK (Verdünnung 1:1000)
  - monoklonaler Maus-Anti-Bcl-2-AK (Verdünnung 1:500)
  
- Detektionslösungen:
  - ECL-System (Amersham, Braunschweig)
  - „Luminol“-Lösung
  - „Enhancer“-Lösung

## 2.1.9. Reagenzien für funktionelle Tests

### 2.1.9.1. Zytokine

- TRAIL Peprotech (USA, Rocky Hill NJ), Tebu-Bio (Offenbach) 10 µg/ml
- TNF-alpha Peprotech (USA, Rocky Hill NJ) 10 µg/ml

Als Lösungsmittel für die Stammlösungen diente steriles Wasser.

Die Stammlösungen wurden bei -20 °C eingefroren.

### 2.1.9.2. Reagenzien für den Caspase-Aktivitätstest

- 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-Substrat    | 25 µg/ml |
| EDTA                | 1 mM     |
| CHAPS               | 0,1 %    |
| Saccharose (pH 7,2) | 10 %     |

- Caspase-3-Substrat: Ac-DEVD-AFC (Bachem, Heidelberg)

- Caspase-9-Substrat: Ac-LEHD-AFC (Bachem, Heidelberg)

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

## 2.1.10. Reagenzien für Zellzyklusanalysen

- Glucose-Propidiumjodid Lösung:

|                |         |          |
|----------------|---------|----------|
| Glucose in PBS |         | 1 %      |
| Propidiumjodid | (Sigma) | 50 µg/ml |
| RNase A        | (Roche) | 50 µg/ml |
| • Ethanol      | (Roth)  | 70 %     |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkultivierung

#### 2.2.1.1. Auftauen und Kultivieren der Zelllinie A549

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zum Auftauen wurden die Zellen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt, in 10 ml supplementiertem Improved MEM Zinc Option Medium (Optimem) resuspendiert und bei 3000 Umdrehungen in der Zentrifuge (Rotixa 50 RS, Fa. Hettich) bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml Improved MEM Zinc Option Medium aufgenommen und in eine  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche mit 19 ml des gleichen Mediums oder einer Nährlösung auf Ham's F12K-Basis überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem 5%igen Anteil von  $\text{CO}_2$ . Je nach Teilungsrate wurden die Zellkulturen bei einer Dichte von 85-95 % entweder nach 48 h oder 72 h passagiert. Dazu wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Nach kurzem Schwenken wurde 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung wieder abgenommen und 5-8 min unter Kulturbedingungen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 9ml Improved MEM Zinc Option Medium hinzugesetzt und ein Zehntel des Volumens der Zellsuspension zur weiteren Kultivierung unter den oben genannten Bedingungen in eine neue Kulturflasche überführt.

### **2.2.1.2. Einfrieren der Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet, die Suspension 10 min lang bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert und das verbleibende Zellsediment vorsichtig mit 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 930 µl fetalem Kälberserum (FKS) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in zwei Schritten mit zuerst 6 h bei –20 °C, dann permanent bei –80 °C.

### **2.2.1.3. Mykoplasmentest**

Die Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen stellt bei langwierigen Zellkulturen ein verbreitetes Problem dar, da es zu Veränderungen des Zellmetabolismus, des Wachstums, der Vitalität und der Morphologie kommt, was letztendlich bei den Untersuchungen zu nicht mehr reproduzierbaren Ergebnissen führt. Überträger für die Mykoplasmen sind das FKS und die Zellkulturen sowie das Laborpersonal. Die Anwesenheit von Mykoplasmen geht häufig ohne mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellen einher. Viele der Mykoplasmenarten besonders in kontinuierlich geführten Zelllinien zerstören dabei ihre Wirte nicht. Die Mykoplasmen sind mikroskopisch nur schlecht zu erkennen, die beobachteten Effekte der Mykoplasmenkontamination in Zellkulturen können durch mykoplasmatistische Genprodukte, Enzyme und Toxine, bzw. Verbrauch von Zellnährmedium oder pH-Wert-Veränderungen zustande kommen. Zur Detektion der Mykoplasmen wurde das PCR-ELISA-Kit der Fa. Boehringer-Mannheim verwendet. Die Tests zum Mykoplasmenausschluß erfolgten in einem Abstand von 4-6 Wochen durch Mitarbeiter des hämatologisch-onkologischen Labors in der Kinderklinik der EMAU Greifswald.

#### Prinzip der Mykoplasmen-PCR-ELISA:

Als erstes erfolgt die Anreicherung der Mycoplasmen im zellfreien Überstand, die basische Lyse der Mycoplasmen und Neutralisation des Lysats, danach die Amplifizierung einer konservierten und Mykoplasmen-spezifischen Region der DNA in Anwesenheit eines Digoxigenin-markierten dUTP und der Einbau des markierten dUTP in das Amplikon. Das markierte Amplikon wird durch NaOH denaturiert. Im Weiteren wird das einzelsträngige PCR-Produkt mit einer biotinmarkierten Sonde hybridisiert und an einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte fixiert. Die Detektion des immobilisierten Amplikons erfolgt durch einen Antikörper gegen Digoxigenin mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase und dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).



### 2.2.2. Gapmer-AODN-Behandlung

Teil der Untersuchungen ist es gewesen, die vermuteten Resistenzfaktoren PKC-eta, Bcl-xL oder Bcl-2 durch Anwendung von Antisense-Gapmer-Oligonukleotiden (Gap-AODNs) in der Zelllinie A549 zu supprimieren. Sie wurden in Stammlösungen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Kryoröhrchen aufbewahrt. Als Kontrolle dienten ein inverses, nicht supprimierendes Gapmer-AODN von Bcl-xL sowie die unbehandelten Zellen. Der Aufbau der Gapmer-AODNs ist in der Tabelle 4 aufgeschlüsselt.

**Tab. 4:** Sequenzen der Gapmer-AODNs. Es handelt sich um Moleküle mit einer Länge von 20 Nukleotiden mit einem Phosphorothiatgrundgerüst und fünf bis sechs 2'-alkoxy-modifizierten Riboseresten am 3'- und 5'-Ende.

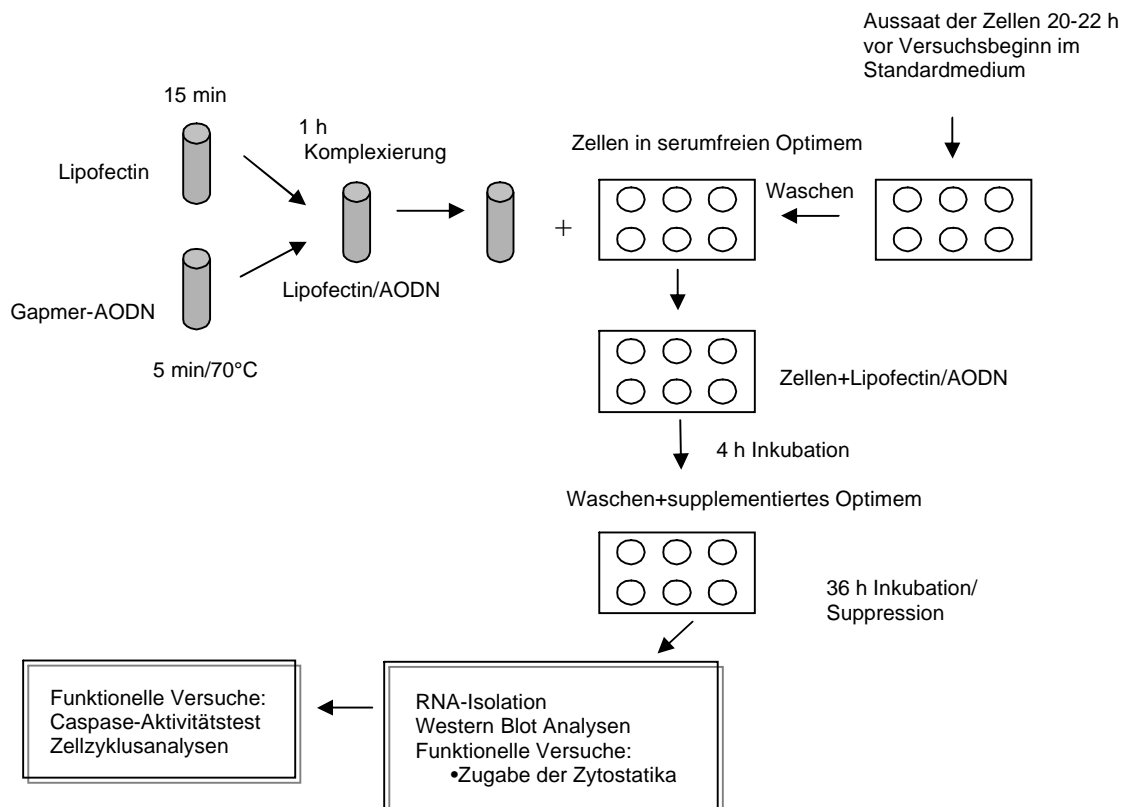
| Protein            | AODN                       | Hybridisierungsposition auf der Ziel-mRNA |
|--------------------|----------------------------|---|
| PKC-eta            | 5'-AGGCCCGTACAGCATTTCCT-3' | 1762                                      |
| Bcl-xL             | 5'-CTACGCTTCCACGCACAGT-3'  | 483                                       |
| Bcl-2              | 5'-AATCCTCCCCCAGTTCACCC-3' | 422                                       |
| inverses<br>Bcl-xL | 5'-TAACCACTCAGCCTAGCGTC-3' |   |

Eine Voraussetzung für jegliche Zellversuche war eine Vitalität der Zellen von mindestens 95 %, überprüft mit der Trypanblau-Methode. Die Zellen wurden 20-22 h vor Versuchsbeginn in supplementiertem Optimum in Sechslöchkulturplatten mit einer Dichte von ca. 0,1 Mio. Zellen/Loch ausgesät. Die Zellen sollten sich zu Versuchsbeginn in der Kulturplatte zu etwa 50-60 % ausgebreitet haben.

Für die Suppressionsversuche wurden die gapmer-AODNs mit Lipofectin zur Komplexierung gebracht. Pro Loch der Sechslöchkulturplatten wurden 100  $\mu\text{l}$  des Gemisches 10-fach konzentriert zu 900  $\mu\text{l}$  FKS-freiem Optimum gegeben. Das benötigte Lipofectin wurde steril aus dem Originalröhrchen entnommen, in Polyesterlörhrchen überführt und mehrfach auf- und abpipettiert zum Auflösen von Sedimenten. Danach verblieb es für 15 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die Gapmer-AODNs-Stammlösungen je gapmer-AODN 10-fach konzentriert angesetzt und in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß überführt, für 5min auf  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren

wurden je 96,5 µl eines 200 nM Gapmer-AODN-Ansatzes zu 3,5 µl Lipofectinaliquot gegeben. Die Bestandteile wurden vorsichtig gemischt und 1h zur Komplexierung bei Raumtemperatur belassen.

Die Zellen in den 6-Lochplatten für die Untersuchungen wurden in dieser Zeit mit serumfreiem Optimum vorbereitet. Der Medium-Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 0,9 ml serumfreies Optimum zum Waschen hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden 900 µl serumfreies Optimum in jedes Plattenloch gegeben. Nach Ablauf der Stunde für den Lipofectin-gapmer-Komplex wurde je 100 µl Aliquot zu einem Loch der Sechslochkulturplatte gegeben. Durch kurzes, vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Gemisches über den Zellrasen erreicht. Das ganze inkubierte für 4 h bei 37 °C. Danach wurde der Medium-Überstand in der 6-Lochplatte wieder abgesaugt und zur weiteren Kultivierung wurden 2 ml supplementiertes Optimum mit 10 % Hitze-inaktiviertem FKS in jedes Loch gegeben. Nach 36 h wurden die Zellen entweder zur RNA- Isolation mit Trypsin/EDTA geerntet oder für die funktionellen Versuche mit Zytokinen versehen (Abbildung 3).



**Abb. 3:** Ablauf der Behandlung der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 mit gapmer-AODNs in Kombination mit Lipofectin sowie der anschließenden molekularbiologischen Analysen und der funktionellen Versuche

### 2.2.3. Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde eine Realtime RT-PCR (Taq Man® PCR) durchgeführt und mittels des Abi Prism 7700 (Applied Biosystems, Langen) 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.

#### 2.2.3.1. Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die konfluenten Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Sechslöcherkulturplatten abgelöst und zentrifugiert. Prinzipiell werden hier die Zellen mit einem Guanidinisothiocyanat- und  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Puffer lysiert, was die Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Durch Zugabe von 70%igem Ethanol zum homogenisierten Lysat werden die Nukleinsäuren ausgefällt. Nach Bindung der RNA auf der Quarzmembran werden Kontaminationen mit Waschpuffer entfernt und die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

#### Protokoll zur Isolation der RNA entsprechend den Herstellerangaben:

Die Zellen werden mit 350  $\mu$ l RLT-Puffer® lysiert und in einer 0,5 mm Durchmesser Kanüle homogenisiert. 350  $\mu$ l 70%iger Ethanol werden hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die 700  $\mu$ l Probe wird in eine RNeasy mini spin® Säule mit einem 2ml Sammelgefäß überführt und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen, 700  $\mu$ l RW1® Puffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert und das Filtrat abermals verworfen. Die Säule wird mit 500  $\mu$ l RPE® Puffer durch Zentrifugation wie oben beschrieben gewaschen und der Durchfluss verworfen. 500  $\mu$ l RPE® Puffer werden in die Säule gegeben, 2 min bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert und das Filtrat mit dem Sammelgefäß verworfen. Die Säule wird in ein 1,5 ml Sammelgefäß gestellt, 40  $\mu$ l RNase-

freies Wasser direkt auf die RNeasy® Membran pipettiert und für eine Minute bei 10000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Das erhaltende Eluat muss bei -80 °C aufbewahrt werden.

#### **2.2.3.2. RNA-Konzentrationsbestimmung**

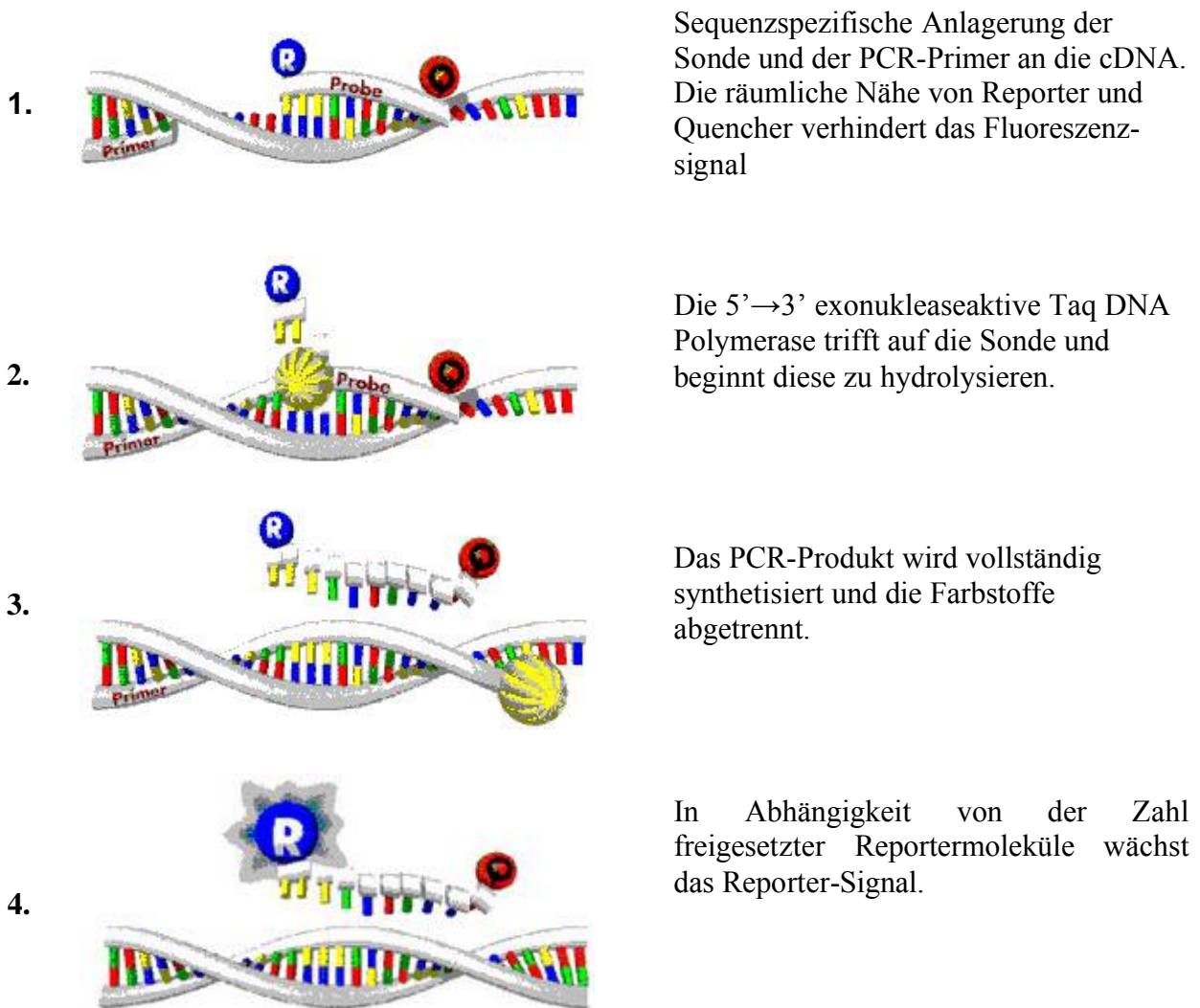
Die Konzentration der gewonnenen RNA-Proben wird photometrisch mittels Gene Quant II (Pharmacia) ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 einer RNA-Konzentration von 37 µg/ml. Zur Messung wird eine UV-Licht-durchlässige Quarzküvette mit einem Messvolumen von 100 µl eingesetzt. Als Leerwert und Verdünnungsmittel für die RNA-Proben (2,5:97,5) dient RNase-freies Wasser. Die Reinheit der RNA-Isolierung wird anhand des Quotienten aus Absorptionsmessung bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) überprüft. Dieser Quotient liegt bei sehr reinen Nukleinsäure-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine oder EDTA hin.

#### **2.2.4. TaqMan®-PCR Technik**

Bei der Realtime PCR handelt es sich um eine PCR-Methode zur Detektion genomischer DNA und cDNA. Es ist eine, durch spezifische Primer definierte, enzymatische In-vitro-Replikation, bei der eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Im Unterschied zu einer herkömmlichen PCR ist durch die Verwendung einer fluoreszierenden Sonde eine simultane Amplifikation und Detektion des Amplikons und damit eine Beobachtung des Verlaufs der PCR im Reaktionsgefäß möglich. Bei der konventionellen PCR kommt es wegen des linearen Arbeitsaufwands zum Nachweis der entstandenen PCR-Produkte zu einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Deshalb wurde die Entwicklung eines so genannten homogenen Assays, bei dem die Vervielfältigung sowie der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind, angestrebt. Erst mit den von Lee und Mitarbeitern 1993 bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden wurde es möglich, den Abbau der Sonde ohne aufwendiges Processing zu detektieren [Lee et al. 1993].

Der beschriebene TaqMan®PCR Assay nutzt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase. Hierbei wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff

(Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Im ersten Schritt der PCR lagern sich Sonde und Primer sequenzspezifisch an die Matrize der cDNA an (Abbildung 4). Ist die Sonde also intakt, gibt sie kein Fluoreszenzsignal ab.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Sondendegradierung während eines TaqMan™-Laufes (aus der Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie)

In der Extensionsphase erreicht die AmpliTaq-Gold-Polymerase die an den DNA-Doppelstrang gebundene Sonde, es entsteht zunächst eine Y-förmige Sekundärstruktur. Diese aktiviert die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase und die Sonde wird Base für Base

hydrolysiert, während das PCR-Produkt vollständig synthetisiert wird. Reporter und Quencher werden jetzt räumlich voneinander getrennt und es wird ein Signal durch den Reporterfarbstoff erzeugt. Dieses Fluoreszenzsignal wird entsprechend der Anreicherung von PCR-Produkten mit jedem PCR-Zyklus stärker. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des Abi Prism 7700 Sequence-Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

Für Messungen wurden die Bestandteile des TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mixes von Applied Biosystems verwendet. 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 werden in dieser Gold RT-Taq Man PCR® die gleichen Primer wie für die Amplifikation verwendet. Die 18s rRNA wird als endogene Kontrolle herangezogen, um bei unterschiedlicher Menge an Gesamt-RNA einzelner Proben eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen.

Die zur Amplifizierung verwendete AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase ist eine chemisch modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq-(*Thermus aquaticus*)DNA-Polymerase. Sie ist bei Raumtemperatur inaktiv und wird erst in einer der PCR vorgeschalteten Aktivierung (10 min bei 95 °C) in den reaktiven Zustand überführt.

### **Programmparameter und Reaktionsansatz**

Der Reaktionsansatz für eine Probe enthält die aufgeführten Bestandteile in der jeweils angegebenen Menge:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| TaqMan® Master Mix ohne UNG         | 10 µl  |
| MultiScribe and RNase Inhibitor Mix | 0,5 µl |
| Primer FW (300 nM)                  | 1,2 µl |
| Primer RV (300 nM)                  | 1,2 µl |
| Sonde (100nM)                       | 0,4 µl |
| RNA-Probe                           | 2,0 µl |
| 20 x 18s rRNA Mix                   | 1,0 µl |
| RNase-freies Wasser ad              | 20 µl  |

Nachfolgend sind Primer- und Sondendesign für die untersuchten Zielmoleküle aufgelistet.

Primerdesign:

|                |                                   |
|----------------|-----------------------------------|
| Primer PKC-eta | FW 5'-ATGCTGTACGGGCCTGCA-3'       |
|                | RV 5'-CGTGACCACAGAGCATTCATAGA-3'  |
| Primer Bcl-xL  | FW 5'-TGGA ACTCTATGGGAACAATGCA-3' |
|                | RV 5'-TCAGGAACCAGCGGTTGAAG3'      |

Sondendesign:

|               |   |
|---------------|---|
| Sonde PKC-eta | 5'-FAM-AACACGCCCATTTGCCACCAGTCTA-TAMRA-3' |
| Sonde Bcl-xL  | 5'-FAM-CCTGGCCCTTTCGGCTCTCGG-TAMRA-3'     |

Die Sequenzen der Primer (FW-Vorwärts Primer, RV-Rückwärts Primer) und der Sonden wurden von Altana Pharma (Konstanz) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Primer und Sonden wurden bei Metabion (Martinsried) kommerziell erworben.

Das Ein-Schritt-Protokoll (Tabelle 5) der Gold RT Taq Man PCR® enthält folgende Schritte:

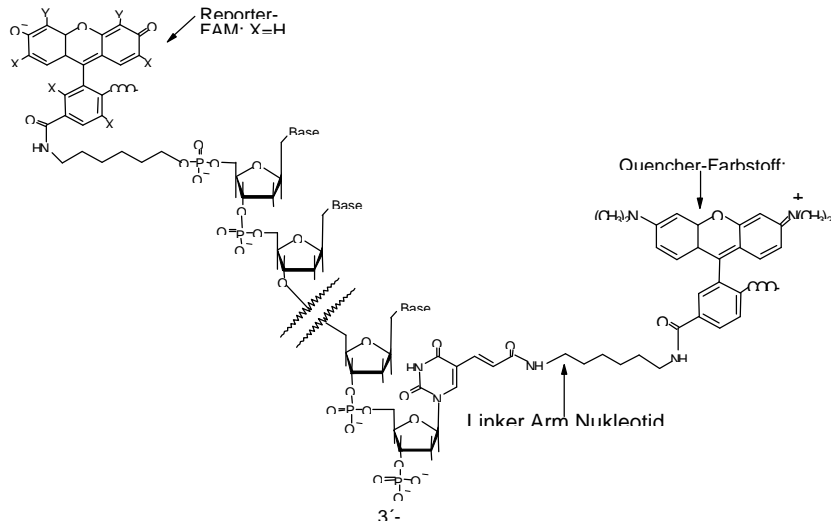
**Tab. 5: Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT Taq Man PCR®.**

| Schritt                                       | Temperatur (°C) | Zeit t | Anmerkungen                                |
|---|-----------------|--------|--|
| Hold  | 48              | 30 min | ► Reverse Transkription                    |
| Hold  | 95              | 10 min | ► Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase |
| Denaturierung                                 | 95              | 15 s   | ► Anzahl der Zyklen: 40                    |
| Annealing der Primer/Sonde und Polymerasition | 60              | 1 min  |  |

### Aufbau der Sonden

Die Reporterfarbstoffe FAM (6-Carboxyfluorescein) oder VIC sind kovalent an das 5'-Ende der Sonde gebunden. Der Quencher TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) wird über ein Linker-Arm-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden (Abbildung 5). Neben

dem Referenz- und Quencher-Farbstoff ist essentieller Bestandteil einer TaqMan®-Sonde ein 3'-OH-blockierendes Phosphat, welches die Extension der Sonde am 3'-Ende während der PCR unterdrückt.

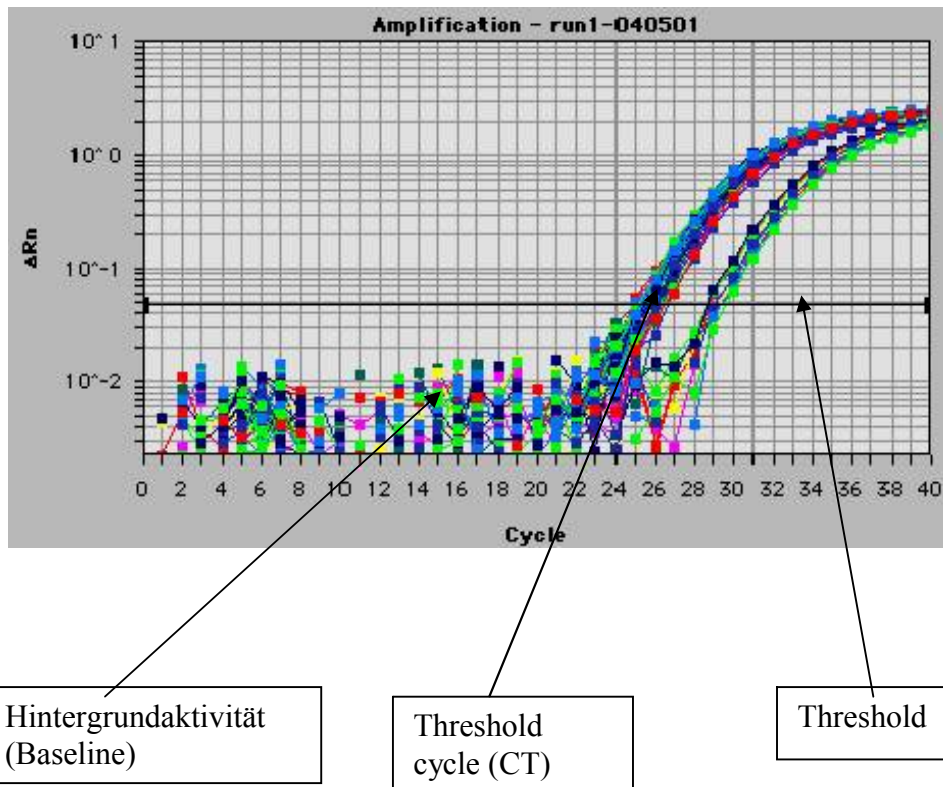


**Abb. 5: Chemische Struktur einer TaqMan™ PCR-Sonde.**  
(aus der Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie)

### Auswertung der Realltime RT-PCR(TaqMan PCR®)

Werden die nach jedem Zyklus gemessenen Signale ( $\Delta R_n$ -Werte) gegen die Zykluszahl aufgetragen, so erhält man eine Darstellung des Reaktionsverlaufes der einzelnen Ansätze. Es wird zudem die Hintergrundaktivität (Baseline) der Sonde bestimmt. Für eine Auswertung auf Grund der Fluoreszenzintensität ist es notwendig, dass ihr Anstieg im linearen Bereich liegt. Dafür müssen die Fluoreszenzintensitäten der Ansätze die Baseline um ein Zehnfaches übersteigen. Dieser Intensitätsgrenzwert wird als Schwellenwert (Threshold), der entsprechende Zyklus als Schwellenzyklus (Threshold Cycle[CT]) bezeichnet (Abbildung 6).





**Abb. 6: Amplifikationsdiagramm**

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

Berechnung der  $d\Delta CT$  Werte:

$$\begin{array}{lcl} \text{Zielsequenz CT} & - & 18s \text{ RNA CT} & = & \Delta \text{ CT Zielsequenz} \\ \text{Kontroll CT} & - & 18s \text{ RNA CT} & = & \Delta \text{ CT Kontrolle} \\ \Delta \text{ CT Zielsequenz} & - & \Delta \text{ CT Kontrolle} & = & d\Delta CT \end{array}$$

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

## 2.2.5. Western Blot Analyse des Bcl-xL und PKC-eta auf Proteinebene

### 2.2.5.1. Prinzip der Western-Blot-Analyse

Hierbei werden mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmte Zielproteine nach Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes und Elektrotransfers auf Membranen durch spezifische Antikörper markiert. Ein zweiter, Peroxidase-konjugierter Antikörper richtet sich gegen Teile der spezifischen Antikörper und macht die Zielproteine durch Oxidation von Substraten aus einer zugeführten Detektionslösung detektierbar. Die Peroxidase erzeugt eine Lumineszenz, die zur Schwärzung des aufgelegten Hyperfilmes führt. Nach Entwicklung der Filme und Digitalisierung der Signale mit einer Videokamera kann eine densitometrische Auswertung mit der entsprechenden Software erfolgen.

### 2.2.5.2. Gewinnung der Proteinproben

Die Zellen wurden auch für diese Versuche in 6-Loch-Kulturplatten mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Loch ausgesät und nach 20-24 Stunden mit je 200 nM ODN transfiziert. Für Proben aus Suppressionsversuchen mit Bcl-xL und PKC-eta wurden je 3 Löcher von Sechslöcherkulturplatten benötigt, um eine ausreichende Menge an Protein für die Western Blot Analyse zu erhalten. Als Kontroll-Proben dienten die mit dem Bcl-xL-inversen-Gapmer-ODN behandelten und die nicht mit Antisense behandelten Zellen. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS aus den jeweils drei gleich behandelten Wells zusammen geerntet und in ein Röhrchen (1,5 ml) pipettiert und zentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet kann bei -20 °C eingefroren und gelagert werden.

### 2.2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Probengewinnung wurden die bei -20 °C gelagerten Zellpellets zunächst aufgetaut und auf Eis kühl gehalten, dann 45 sec mit Ultraschallwellen behandelt (Bronson Sonifier B-12 auf Stufe II, Branson Sonic Power Company, Danbury/CT, USA). Anschließend wurde die Probe 5min 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 µl des Lysates in ein Loch einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Costar/Kümmerling) pipettiert und mit 200 µl eines

Gemisches der Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1, versetzt. Die Proben wurden 30min bei 37 °C inkubiert und dann in einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) mit dem Programm BCA-Proteinbestimmung bei einer Wellenlänge von 390/510 nm gemessen. Aus einer 5%igen Albumin-Lösung wurde eine Standard-Reihe mit 8 Konzentrationsstufen von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml mitgeführt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Eichgeraden der mitgeführten Standard-Reihe bestimmt.

#### **2.2.5.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben ermöglichte es, das Volumen der Proteinlösungen der Zellysate aus den Suppressionsversuchen mit je 60 µg Protein in ein Eppendorfgefäß aufzuteilen. Mit gleichem Volumen an Lade-Puffer wurden die Proben aufgefüllt, 5 min lang in siedendem Wasser erhitzt und dann auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die Aliquots pro Zielprotein auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel mit den Kontrollproben aufgetragen. Das Gel bestand aus einer 3 cm langen Sammelstrecke und einem anschließenden Trenngel mit 10 cm Länge. Aus einer 10fach konzentrierten Stammlösung wurde der Elektrophorese-Puffer frisch angesetzt. Für die Proben wurde die Elektrophorese zunächst mit einer Spannung von 120 V angesetzt und beim Erreichen des Trenngels mit konstanter Spannung von 240 V weitergeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde Rainbow RPN 800 (Amersham, Buckinghamshire, GB) verwendet.

#### **2.2.5.5. Elektronentransfer von Proteinen auf Membranen**

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

### 2.2.5.6. Proteindetektion von Bcl-xL und PKC-eta

Im Anschluss an den Elektronentransfer der Proteine wurden die Zielproteine in Inkubationspuffer unter Zugabe entsprechender Antikörper (Tabelle 6) bei +4 °C über Nacht inkubiert.

**Tab. 6: Antikörper des jeweiligen Zielproteins.** Die Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, bezogen.

| Protein | Antikörper                                     | Verdünnung |
|---------|--|------------|
| PKC-eta | Kaninchen Anti-PKC-eta polyklonaler Antikörper | 1:5000     |
| Bcl-xL  | Maus Anti-Bcl-xL monoklonaler Antikörper       | 1:1000     |

Es folgten ein Waschschrift über eine Minute und drei Waschschrift über 15 min in 50 ml TBS/T-Puffer. Die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten monoklonalen Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:25000 in 20 ml 0,05 % TBS/T-Puffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur (Tabelle 7).

**Tab. 7: Peroxidase-konjugierte monoklonale Antikörper.** Die Peroxidase-konjugierten monoklonalen Antikörper wurden von Dianova, Hamburg, bezogen.

| Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper | Verdünnung |
|---|------------|
| Anti Kaninchen IgG                              | 1:25.000   |
| Anti Maus IgG                                   | 1:25.000   |

Anschließend wurde die Membran dreimal in 50 ml 0,05 % TBS/T-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion von Bcl-xL und PKC-eta erfolgte mit dem ECL-System (Amersham, Biosciences, Freiburg). 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) abgedeckt. Die Entwicklung der Filmkassette erfolgte nach Inkubationszeiten zwischen 30 sec und 10 min unter Standardbedingungen. Die densitometrische Auswertung der digitalisierten Signale erfolgte freundlicherweise durch Labormitarbeiter der onkologischen Abteilung der Kinderklinik EMAU Greifswald.

## 2.3. Funktionelle Versuche

Bei den funktionellen Untersuchungen ging es um die Messung von Markern der Apoptose sowie der eigentlichen Zellvitalität bzw. des Status im Zellzyklus.

Als Parameter für die sich in apoptotischer Reaktion befindenden Zellen wurden die Veränderungen der Caspase-Aktivität nach Gapmer-AODN-Behandlung und nachfolgender Zytokininkubation herangezogen und mit unbehandelten und Kontroll-Gapmer-versetzten Proben verglichen.

Das Auftreten von hypodiploiden Zellen nach Behandlung der Zellen wurde als Marker für die Änderung der Zellteilungsfähigkeit herangezogen.

### 2.3.1. Kultivierung unter Zytostatikaapplikation

In Vorversuchen wurden zunächst die optimal einzusetzenden Konzentrationsstufen der verwendeten Zytokine, die Kinetik einer ausreichenden RNA-Suppression sowie die optimale Einwirkdauer der Zytokine im Caspase-3-Test ermittelt (Tabelle 8).

**Tab. 8: Applikationsschema der Zytokine in den Vorversuchen.**

| Zytostatikum/Zytokin | Eingesetzte Konzentrationsstufen |   |    |    |     |       |
|----------------------|----------------------------------|---|----|----|-----|-------|
| TNF- $\alpha$        | 0                                | 3 | 10 | 30 | 100 | ng/ml |
| TRAIL                | 0                                | 3 | 10 | 30 | 100 | ng/ml |

Als geeignetes Schema für den Versuchsablauf an der Zelllinie A549 wurde schließlich eine Antisense-Inkubations-Zeit von 36 h, danach eine Einwirkdauer von TRAIL über 3,5 h und die Verwendung der Zytokinkonzentration mit 0 ng/ml, 30 ng/ml und 100 ng/ml herangezogen.

### 2.3.2. Caspase-Aktivitätstests

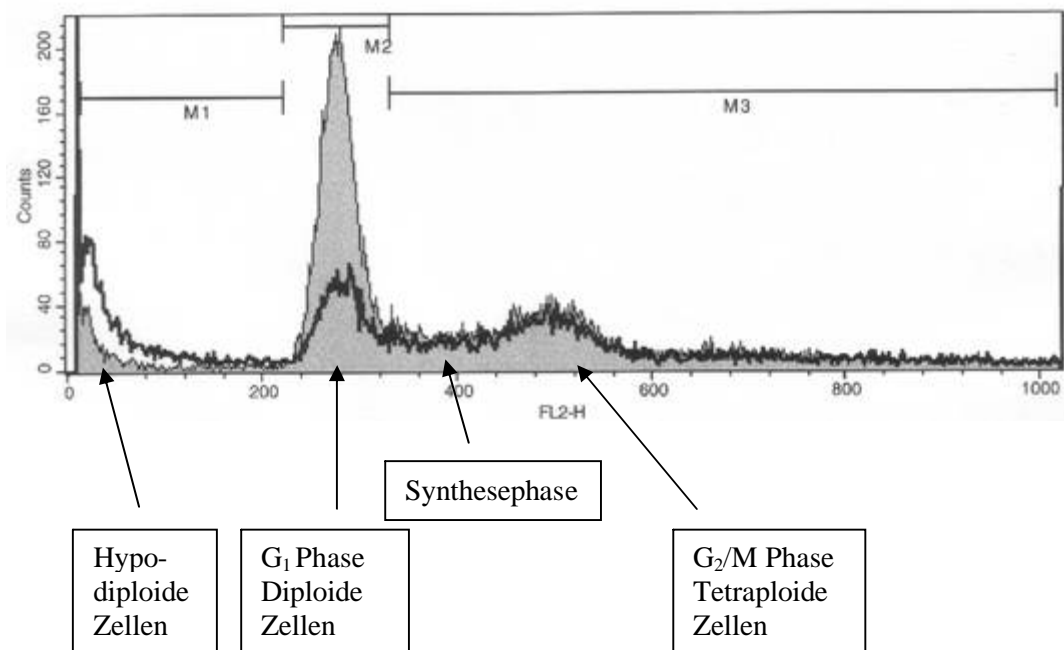
Das Prinzip eines Caspase-Aktivitätstests beruht auf der spezifischen, enzymatischen Abspaltung eines Florenz-Farbstoffes (Trifluoromethylcoumarin, AFC) von einem Caspase-Substrat. Die Messungen erfolgten am Wallac Viktor Fluorometer bei einer Wellenlänge zur Anregung/Emission von 390/510 nm. Die Caspasen 3 und 9 gehören zu der ICE/CED-3

Cystein-Protease-Familie, die wie in der Einleitung dargestellt, wesentliche Bestandteile und Vollstrecker der Signalkaskade der Apoptose sind. Die Effektor-Caspase-3 ist für die Proteolyse wichtiger Zellproteine, speziell auch der PARP (poly-ADP ribose-Polymerase) zuständig. PARP als Enzym in der DNA-Reparatur wird durch die Caspase-3 am C-terminalen Ende von Asp-216 gespalten [Cohen 1997]. Ac-DEVD-AFC ist ein synthetisches Substrat für die Caspase-3, in welchem eine Sequenz von PARP(DEVD) an ein Molekül (AFC) gekoppelt ist, welches bei Abspaltung mit bestimmter Wellenlänge fluoresziert. Die Caspase-9 ist Teil des mitochondrialen Wegs der Apoptose über die JNK/SAPK-Signalkaskade und spaltet nach Bindung und Aktivierung durch Apaf-1 die Pro-Caspasen 3, 6 und 7 [Srinivasula et al. 1998]. Bei der Untersuchung im Caspase-9-Aktivitätstest dient die Verbindung des AFC mit dem synthetischen Substrat Ac-LEHD-AFC als Fluoreszenzquelle.

Die Tumorzelllinie A549 wurde zunächst in 6-Loch-Kulturplatten mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well ausgesät und nach optischer Beurteilung auf Konfluenz nach 20-22 h mit 200 nM AODN transfiziert. Nach einer weiteren Inkubation der Zellen für 36 h wurde mit der TRAIL- bzw. TNF-alpha-Behandlung der Zellen begonnen. Danach wurden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA geerntet und zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abpipettiert, das Zellsediment auf Eis gehalten und verbleibende Überstandreste vorsichtig mittels einer Pipette entfernt. Nach Zugabe von 100 µl Lyse-Puffer wurden die Zellen 10 min lysiert. Der Caspase-Puffer wurde vor dem jeweiligen Experiment mit 2 mM DTT (DL-threo-1,4 Dimercapto-2,3-butandiol, Reduktionsmittel) versetzt und bei 4 °C gehalten. Das Zelllysate wurde anschließend mit 110 µl des frisch angesetzten Caspase-AFC-Puffers gemischt und in eine optische Mikrotiterplatte (96-Well) gegeben. Innerhalb von zwei Stunden bei 37 °C wurde das im Caspasepuffer enthaltene spezifische Substrat von der zuständigen Caspase gespalten und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Zur Messung der Aktivität der Caspase-3 wurde wie oben erwähnt das spezifische Substrat Ac-DEVD-AFC verwendet, für die Caspase-9-Aktivitätsbestimmung wurde Ac-LEHD-AFC verwendet. Es wurden ein Leerwert mit 100 µl Lysepuffer und 110 µl Caspase-AFC-Puffer und zur Kontrolle ein Leerwert von 210 µl Wasser mitgeführt. Die Leerwerte des Lysepuffer-Caspase-Puffer-Mix wurden von den Werten der Zelllysate abgezogen, die Caspase-Aktivität wurde schließlich als relatives Verhältnis der Emissionen von behandelten zu unbehandelten Zellen angegeben.

## 2.4. Zellzyklusanalyse

In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 7) haben die Zellkerne einen unterschiedlichen DNA Gehalt, der spezifisch für die einzelnen Phasen des Zellzyklus ist. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung. Durch diesen Prozess nimmt der DNA-Gehalt von apoptotischen Zellen im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen ab. Durch das Anfärben mit einem DNA-spezifischen Farbstoff wird der DNA-Gehalt der Einzelzellen zytometrisch im Durchfluss quantifizierbar. Propidiumjodid ist zur DNA-Analyse gut geeignet, da es in stöchiometrischen Verhältnissen in die DNA interkaliert und so der DNA-Gehalt der Zellen erfasst werden kann. In einem linearen Histogramm werden die Höhe des DNA-Fluoreszenzsignals auf der x-Achse und die Anzahl der gemessenen Teilchen auf der y-Achse je nach Fluoreszenzintensität gegeneinander aufgetragen.



**Abb. 7:** Darstellung einer typischen Zellzyklusanalyse. Hypodiploide Zellen weisen eine DNA-Fragmentation auf und sind typisch für Zellen in der Apoptose. (aus Einführung in das FACSCalibur®)

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer (FACSCalibur®, Becton Dickinson Company, Heidelberg) ermöglicht die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen mittels eines von einer Seite auf die Zelle gerichteten

Laserstrahls. Über die Veränderungen des Laserstrahls hinter der Zelle lassen sich Rückschlüsse auf die Morphologie oder Fluoreszenzeigenschaft der Zelle ziehen. Hierbei hängt das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hauptsächlich von der Granularität der Zelle ab (SSC, Side Scatter). Gerade an der Zelle vorbei scheinendes, nicht abgelenktes Licht ist ein Maß für die Zellgröße (FSC, Forward Scatter). Die Fluoreszenzeigenschaften werden in den Kanälen der unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Detektorplatten nehmen dann das Spektrum des Laserlichtes hinter der Zelle für unterschiedliche Wellenlängen getrennt auf und übertragen es in elektrische Signale. Die Auswertung der gemessenen Signale erfolgt mit der entsprechenden Software. Die entstehende Punktwolke entspricht dann der gemessenen Zellpopulation. In wenigen Sekunden können einige 1000 Zellen auf diese Weise analysiert werden.

Die Tumorzelllinie A549 wurde zunächst in 6-Loch-Kulturplatten mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well ausgesät und nach optischer Beurteilung auf Konfluenz nach 20-22 h mit 200 nM AODN transfiziert. Nach einer weiteren Inkubation der Zellen für 36 h erfolgte die TRAIL- bzw. TNF-alpha-Behandlung der Zellen für 12 h. Die Zellen wurden danach mit Trypsin/EDTA geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 70 % Ethanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens 30 min fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500 ml einer Glucose/Propidiumjodid-Lösung resuspendiert, in FACS Röhrchen überführt und 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Zum indirekten Nachweis der Beteiligung der Caspasen am TRAIL-vermittelten Zelltod wurde der pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk in einer separaten Messung eine Stunde vor der TRAIL-Behandlung mit einer Dosierung von 15  $\mu\text{M}$  appliziert. Zuletzt erfolgte die Messung am FACSCalibur®.



### **3. Ergebnisse**

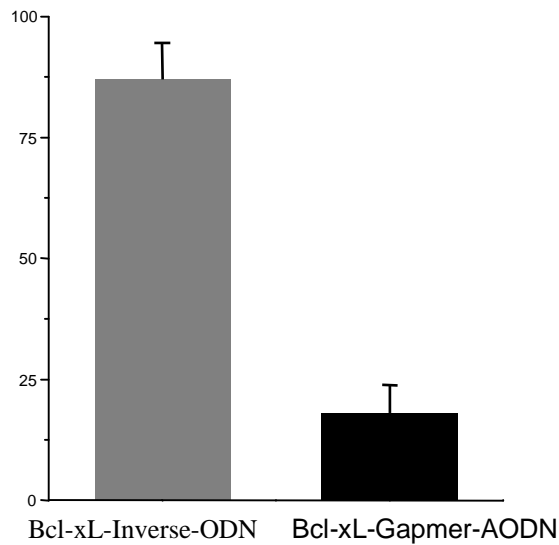
#### **3.1. Genexpressionsanalysen mittels Realtime-PCR (Taq Man PCR®)**

Nach der erfolgreichen Etablierung der Antisense-Gapmer-Transfektion in Vorarbeiten wurde die Verifizierung einer ausreichenden Suppression der Genexpression für die Proteine PKC- $\epsilon$  und Bcl-xL notwendig. Ziel der Suppression war eine Reduktion der spezifischen mRNA der Proteine um mindestens 65 %, die sich in anderen Arbeiten mit der Antisense-Technik der Arbeitsgruppe unter Prof. J. Beck als effizient herausstellte. Die wesentliche Durchführung der Genexpressionsanalysen erfolgte durch die Labormitarbeiterin des Research Centers of Pharmacology and Experimental Therapeutics, EMAU, Jennifer Gänge.

##### **3.1.1. Genexpressionsanalysen nach gapmer-AODN-Behandlung gegen Bcl-xL**

Zunächst wurde die Suppression von Bcl-xL 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM Bcl-xL-Antisense-Oligodesoxynukleotid in A549 Zellen auf mRNA-Ebene untersucht. Die Expressionswerte der mit gapmer-AODNs behandelten Zellen wurden als prozentualer Anteil der Expressionswerte der unbehandelten Zellen dargestellt (Abbildung 8). Nach Relativierung der m-RNA Expression gegen 18s-rRNA zeigte sich gegenüber unbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der mRNA um 82 %. In den mit Kontroll-Bcl-xL-Invers-Oligodesoxynukleotid behandelten Zellen kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen.

Relative Bcl-xL-mRNA-Expression (in %, Vergleich zu unbehandelten Proben)

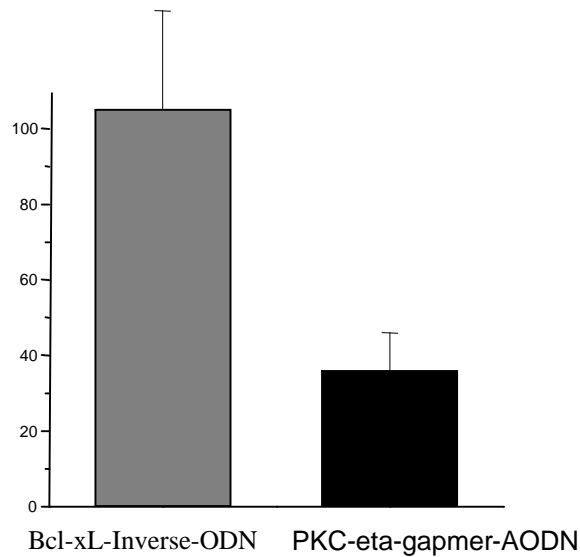


**Abb. 8:** Quantifizierung der Bcl-xL-mRNA mittels Realtime PCR (Taq Man PCR®) in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM Bcl-xL-Gapmer-AODN bzw. 200 nM Kontroll-gapmer-ODN (Bcl-xL-Invers-ODN). Die Abb. zeigt Mittelwerte + SD von 4 unabhängig durchgeführten Bestimmungen, wobei die Expression unbehandelter Zellen nach Normalisierung auf 18s-rRNA als 100 % angenommen wird.

### 3.1.2. Genexpressionsanalysen nach gapmer-AODN-Behandlung der Zellen gegen PKC-eta

Weiterhin wurde die Suppression von PKC-eta 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM PKC-eta-AODN in A549 Zellen auf mRNA-Ebene untersucht. Die Expressionswerte der mit gapmer-AODNs behandelten Zellen wurden wiederum als prozentualer Anteil der Expressionswerte der unbehandelten Zellen dargestellt. Nach Relativierung der mRNA Expression gegen 18s-rRNA zeigte sich gegenüber unbehandelten Zellen eine Reduktion der mRNA um 64 %. In der Kontrolle mit Bcl-xL-Invers-Oligodesoxynukleotid behandelten Zellen kam es bei dieser Versuchsreihe zu keiner Suppression (Abbildung 9).

Relative PKC-eta-mRNA-Expression (in %, Vergleich zu unbehandelten Proben)



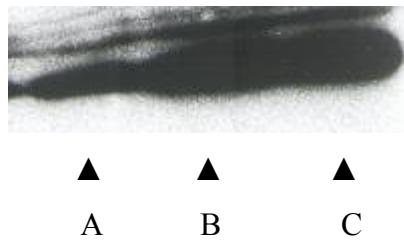
**Abb. 9:** Quantifizierung der PKC-eta-mRNA mittels Realtime PCR (Taq Man PCR ®) in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 24 h nach gapmer-AODN-Behandlung mit 200 nM PKC-eta-Gapmer-AODN bzw. 200 nM Kontroll-gapmer-ODN(Bcl-xL-Invers-ODN). Die Abb. zeigt Mittelwerte + SD von 4 unabhängig durchgeführten Bestimmungen, wobei die Expression unbehandelter Zellen nach Normalisierung auf 18s-rRNA als 100 % angenommen wird.

### 3.2. Expressionsanalysen mittels Western Blot

Die Aussagen der Proteinanalysen entsprachen in dieser Versuchsreihe weitgehend den Ergebnissen der Analysen auf mRNA-Ebene. Bei einer signifikanten Gen-Suppression zeigte sich auch eine relevante Reduktion des Proteins in den Zellen. Die Transfektion mit dem Kontroll-AODN erbrachte keine Absenkung einer Proteinmenge im Zytosol (Abbildung 10).

#### 3.2.1. Bcl-xL - Proteinanalyse

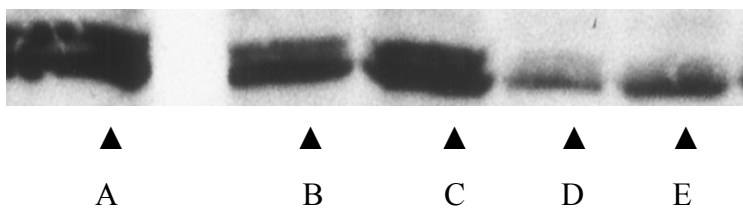
Die Menge des Proteins ist anhand der Größe der Strichbreite abzuschätzen. Bei der Anwendung von 200 nM Bcl-xL-gapmer-AODN zeigte sich dabei eine deutliche Reduktion des Proteins im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Das Kontroll-gapmer-AODN blieb ohne Effekt auf der Proteinebene (Abbildung 10).



**Abb. 10:** Western Blot Analysen 24 h nach Anwendung von Bcl-xL-Gapmer-AODNs in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549. Die Auftrennung des jeweiligen Gesamtproteins (60 µg) erfolgte über ein 10%iges Polyacrylamidgel  
A: nach Bcl-xL-Gapmer-AODN-Behandlung, B: A549 unbehandelt,  
C: nach Bcl-xL-Invers-ODN

### 3.2.2. PKC-eta - Proteinanalyse

Nach der Applikation von 200 nM PKC-eta-gapmer-AODN konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion des Proteins nachgewiesen werden im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Das Kontroll-gapmer-AODN blieb erwartungsgemäß weitgehend ohne Effekt (Abbildung 11). Bei der Versuchsreihe der Western-Blot-Analysen der PKC-eta stand freundlicherweise die MTA Frau Ulrike Glave tatkräftig zur Seite.



**Abb. 11:** Western Blot Analysen 24 h nach Anwendung von PKC-eta-Gapmer-AODNs in der Lungenadenokarzinomzelllinie A549. Die Auftrennung des jeweiligen Gesamtproteins (60 µg) erfolgte über ein 10%iges Polyacrylamidgel  
A: unbehandelt, B und C: nach Behandlung mit 200 nM Bcl-xL-Invers-gapmer-ODN,  
D und E: nach Behandlung mit 200 nM PKC-eta-7-gapmer-AODN

### 3.3. Funktionelle Analysen nach Transfektion von A549 Zellen mit Gapmer-AODNs

Dieser Teil der Untersuchungen soll klären, ob die unter 3.1. und 3.2. beschriebene Suppression von Bcl-xL und PKC-eta nach Gapmer-AODN-Behandlung in den A549-Zellen zu einer höheren Effektivität der beiden Zytokine TRAIL und TNF-alpha führt. Da die erwünschten zytotoxischen Wirkungen von Chemotherapeutika sowie Zytokinen vor allem auf deren Fähigkeit beruhen, die Apoptose auszulösen, erscheinen Methoden zur Messung der apoptotischen Reaktion von Zellen als zweckmäßig. Als Parameter für die Quantifizierung der apoptotischen Kaskade wurden die Faktoren Caspase-3 und Caspase-9 herangezogen. Aus organisatorischen Gründen erfolgten 2 Untersuchungsreihen im Abstand von ca. 3-6 Monaten, wofür eine Passage mit neu aufgetauten Zellen benötigt wurde. Von Interesse ist möglicherweise, ob dieser Fakt zu unterschiedlichem Verhalten der Zellen führt.

#### 3.3.1. TRAIL-induzierte Caspase-3-Aktivierung

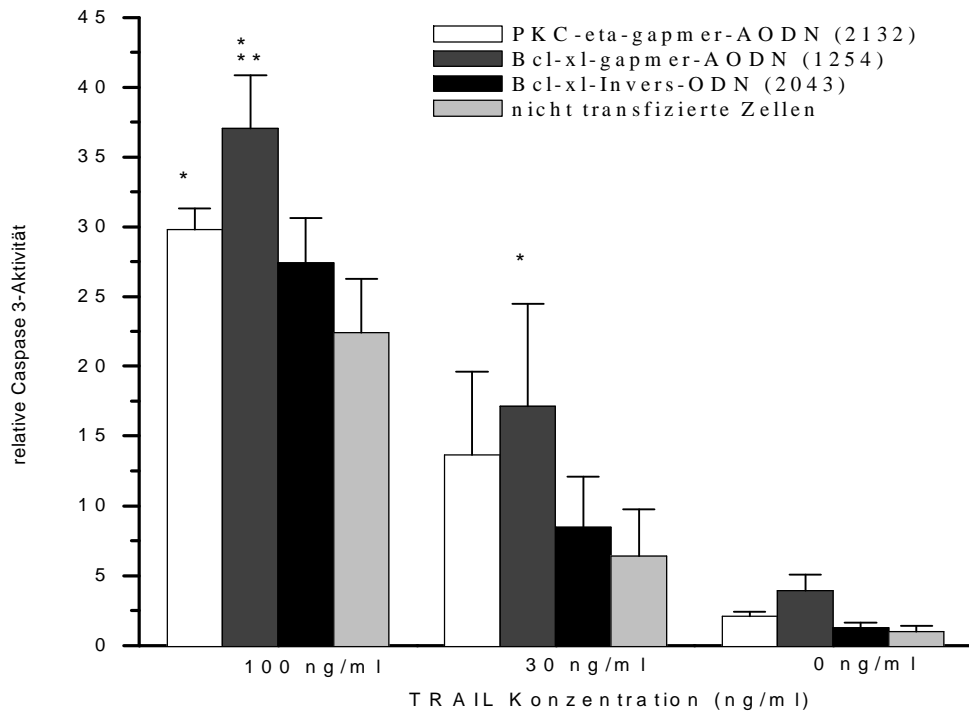
Ohne TRAIL-Zugabe zeigt die Aktivität der Caspase-3, die der Abbildung 12 und 13 zu entnehmen ist, in der 1. und 2. Versuchsreihe auch bei Vorbehandlung mit den entsprechenden Gapmer-AODNs nur sehr geringe Werte.

Die alleinige Gabe von TRAIL (Vergleich der nicht transfizierten Zellen bei 0, 30 und 100 ng/ml) bewirkte in der ersten Versuchsreihe (Abbildung 12) bei Einsatz von 30ng/ml TRAIL eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität um das 6,4fache, bei 100 ng/ml TRAIL um das 20,5fache. Die Wirkung des TRAIL erhöhte sich bei Konzentrationssteigerung von 30ng/ml auf 100ng/ml um das 3,5fache. Die Differenzen sind statistisch signifikant. Die Ergebnisse wurden mit dem Student-T-Test bei  $p=0,05$  auf Signifikanz überprüft.

Die Verwendung von Bcl-xL- und PKC-eta-Gapmer-AODN in Kombination mit TRAIL führte zu einer zusätzlichen, dosisabhängigen Caspase-3-Aktivitätssteigerung. Bei 30ng/ml TRAIL war in der Gruppe der mit Bcl-xL-Gapmer-AODN-behandelten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (nur TRAIL-behandelt) eine Aktivitätssteigerung der Caspase-3 um das 2,7fache zu verzeichnen, bei 100 ng/ml um das 1,7fache.

Hinsichtlich der PKC-eta-Suppression ergab sich eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bei einer TRAIL-Konzentration von 100 ng/ml. In jedem Fall war bei Gapmer-AODN-Vorbehandlung und zusätzlicher 100 ng/ml TRAIL-Zugabe die höchste Caspase-3-Aktivität messbar.

Effekt von TRAIL auf die Caspase 3-Aktivität  
in A549-Zellen nach Gapmer-AODN-Behandlung



**Abb.12:** 1. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 3,5 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 5 Experimenten.

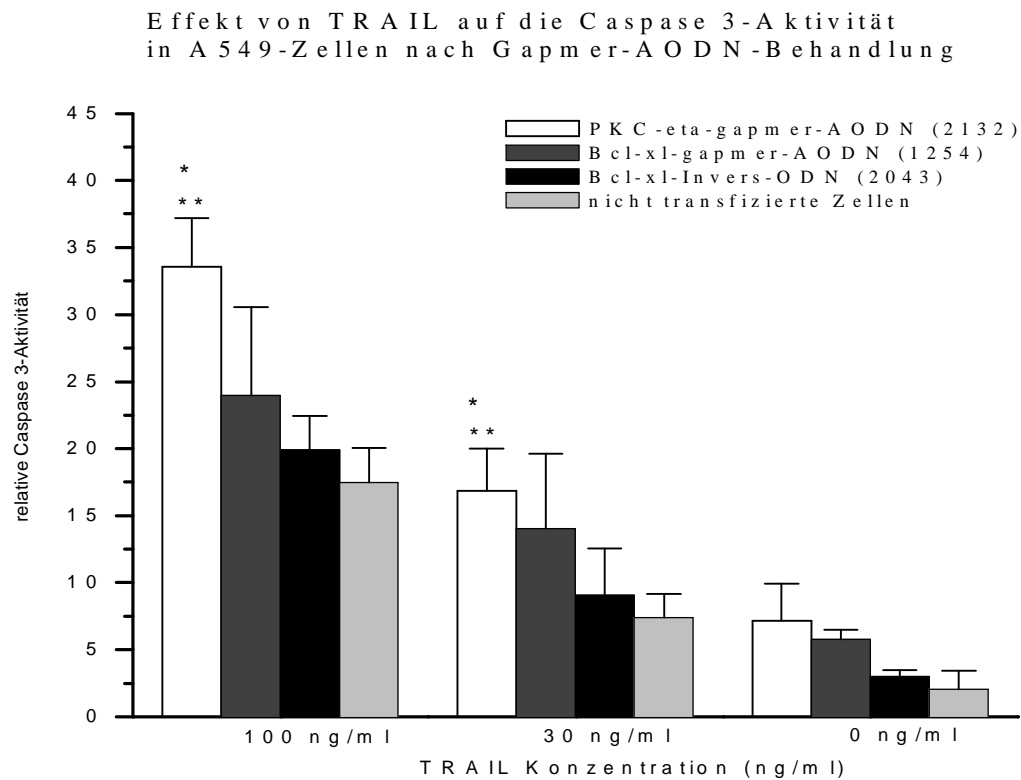
\* signifikant zu nicht transfizierten Zellen

\*\* signifikant zu Bcl-xL-Invers-ODN

In der Versuchsreihe zum zweiten Zeitpunkt stellte sich in allen Experimenten nach Gapmer-AODN-Vorbehandlung eine etwas geänderte Konfiguration der Messergebnisse dar (Abbildung 13). Deutlich signifikant war die Aktivitätssteigerung der Caspase-3 bei Suppression von PKC-eta bereits bei 30 ng/ml TRAIL-Applikation gegenüber den unbehandelten Zellen und dem Kontroll-antisense. Die Behandlung mit dem PKC-eta-Gapmer-AODN bewirkte gegenüber nicht transfizierten Zellen (nur TRAIL) bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml einen Anstieg der Caspase-Aktivität um das 2,3fache, bei 100 ng/ml TRAIL konnte ein Anstieg um den Faktor 1,9 ermittelt werden. Im Vergleich zu den mit dem Kontroll-ODN-behandelten Zellen ergab sich bei 30 ng/ml TRAIL eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität um das 1,86fache und bei 100 ng/ml um das 1,7fache. Obwohl eine Tendenz erkennbar war, wies die Suppression von Bcl-xL unerwartet keine signifikante Steigerung des Apoptosemarkers auf, weder im Vergleich zu den unbehandelten

noch zu den mit Bcl-xL-Invers-ODN-behandelten Zellen. Es zeigte sich bei der Behandlung mit dem Bcl-xL-gapmer-AODN ein Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml um das 1,9fache, bei 100 ng/ml TRAIL konnte ein Anstieg um das 1,4fache ermittelt werden.

Wiederum keine wesentlichen Unterschiede gab es im Vergleich der unbehandelten Zellen zu den mit Kontroll-ODN behandelten Proben.



**Abb.13:** 2. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2 µM AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 3,5 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 5 Experimenten.

\* signifikant zu nicht transfizierten Zellen

\*\* signifikant zu Bcl-xL-Invers-ODN

### 3.3.2 TRAIL-induzierte Caspase-9-Aktivierung

Die Aktivierung der Caspase-9 kann als mitochondrialer Weg nach TRAIL-Applikation die Caspase-3 aktivieren. Ihre Aktivität stellt somit einen Marker für die Apoptose auf diesem speziellen Weg dar. Interessant ist nun, ob es zu einem Synergieeffekt von TRAIL und Proteinsuppression kommt. In kinetischen Voruntersuchungen wurde für die optimale Caspase-9 Aktivierung eine Inkubationszeit für TRAIL von 4h ermittelt. Auch bei der TRAIL-induzierten Caspase-9-Aktivierung wurden 2 Versuchsreihen im Abstand von 3-6 Monaten durchgeführt.

Die alleinige Gabe von TRAIL zeigt beim Vergleich der unbehandelten (nicht transfizierten) Zellen im Kontakt mit 0, 30 bzw. 100 ng/ml TRAIL in der ersten Versuchsreihe (Abbildung 14) eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität bei 30 ng/ml TRAIL um das 2,6fache und bei 100 ng/ml TRAIL um das 4,4fache. Die Wirkung des TRAIL erhöhte sich beim Vergleich der TRAIL-Konzentrationen von 30 ng/ml und 100 ng/ml um das ca. 1,7fache.

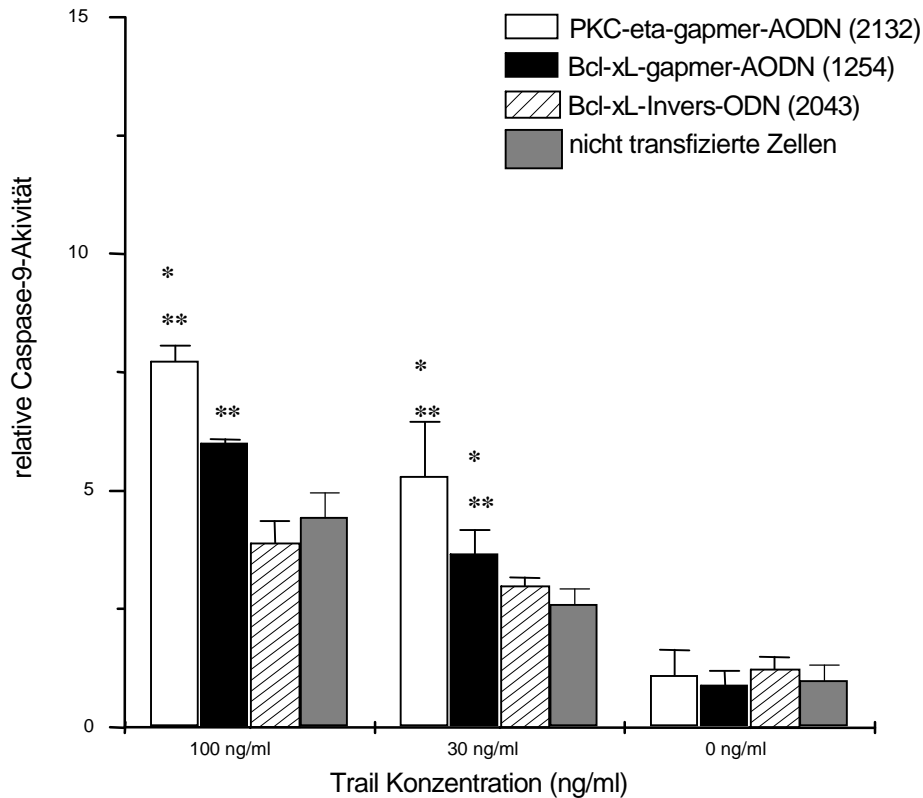
In der 2. Versuchsreihe (Abbildung 15) vervielfachte sich die Caspase-Aktivität bei separater TRAIL-Applikation um das 1,7fache (30 ng/ml TRAIL) bzw. um das 3,4fache (100 ng/ml TRAIL).

Die Behandlung mit dem PKC-eta-gapmer-AODN führte im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu einer signifikanten Caspase-9-Aktivitätserhöhung für die TRAIL-Konzentration von 30 ng/ml und 100 ng/ml sowohl in der 1. wie auch in der 2. Versuchsreihe. So wurde in der 1. Gruppe (Abbildung 14) ein Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml um das 2,0fache, bei 100 ng/ml TRAIL ein Anstieg um das 1,6fache ermittelt. Im Vergleich zu den Kontroll-ODN- (Bcl-xL-Invers-ODN) behandelten Zellen ergab sich bei 30 ng/ml TRAIL eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität um das 2,2fache, bei 100 ng/ml TRAIL um das 2,3fache.

Bei der Behandlung mit dem Bcl-xL-gapmer-AODN kam es in der 1. Versuchsreihe (Abbildung 14) zu einem Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml auf das 1,5fache. Bei 100 ng/ml TRAIL konnte ein Anstieg auf das 1,3fache ermittelt werden. Im Vergleich zu den mit Kontroll-ODN- (Bcl-xL-Invers-ODN) behandelten Zellen ergab sich bei 30 ng/ml TRAIL eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität auf das 1,7fache und bei 100 ng/ml TRAIL auf das 1,86fache.



Effekt von TRAIL auf die Caspase-9-Aktivität  
in A549-Zellen nach Gapmer-AODN-Behandlung



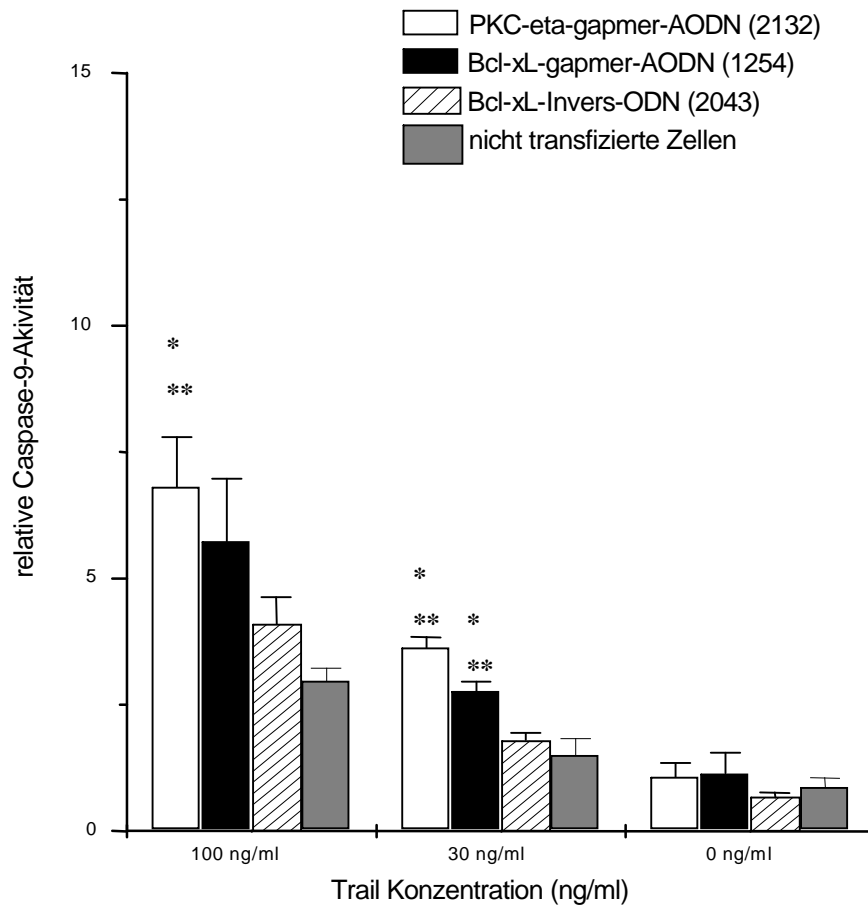
**Abb.14:** 1. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 4h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.  
\* signifikant zu nicht transfizierten Zellen  
\*\* signifikant zu Bcl-xL-Invers-ODN

Die Ergebnisse der 2. Versuchsreihe sind in Abbildung 15 wiedergegeben. Es zeigte sich bei der Behandlung mit dem Bcl-xL-gapmer-AODN ein Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml auf das 1,85fache, bei 100 ng/ml TRAIL konnte ein Anstieg auf das 1,9fache ermittelt werden. Ein Vergleich mit den Kontroll-ODN- (Bcl-xL-Invers-ODN) behandelten Zellen ergab bei 30 ng/ml TRAIL eine Erhöhung der Caspase-Aktivität um das 1,5fache und bei 100 ng/ml TRAIL auf das 1,4fache.

Die Behandlung mit dem PKC-eta-gapmer-AODN bewirkte einen Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen bei einer TRAIL-Dosis von 30 ng/ml um das 2,4fache, bei 100 ng/ml TRAIL konnte eine Steigerung um das 2,3fache ermittelt werden. Der Vergleich mit den Kontroll-ODN- (Bcl-xL-Invers-ODN) behandelten Zellen

ergab bei 30 ng/ml TRAIL eine Vervielfachung der Caspase-Aktivität um das 2,0fache und bei 100 ng/ml TRAIL um das 1,66fache.

Effekt von TRAIL auf die Caspase-9-Aktivität  
in A549-Zellen nach Gapmer-AODN-Behandlung



**Abb.15:** 2. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 4 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

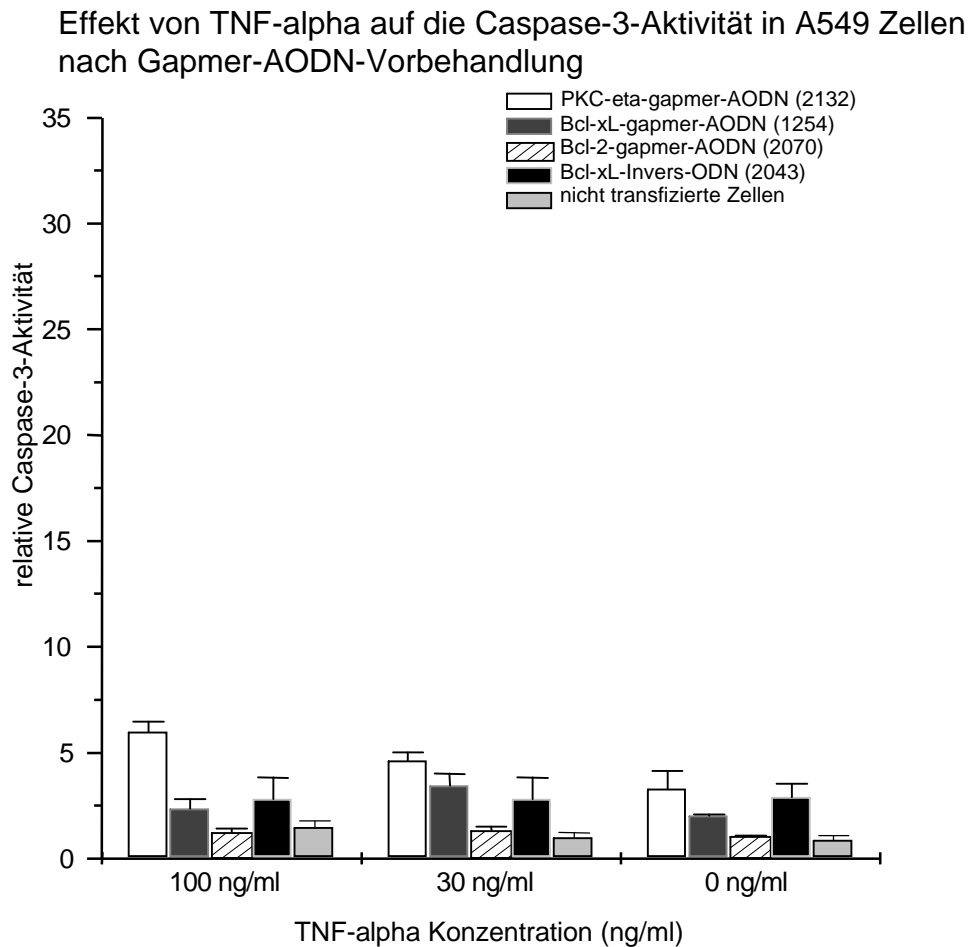
\* signifikant zu nicht transfizierten Zellen

\*\* signifikant zu Bcl-xL-Invers-ODN

Zwischen den Ergebnissen der unbehandelten Zellen und denen der mit dem Bcl-xL-Invers-ODN behandelten Zellen ließen sich keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

### 3.3.3 TNF-alpha-induzierte Caspase-3-Aktivierung

Bei diesen Experimenten wurde untersucht, inwieweit die Applikation des Zytokins TNF-alpha in Kombination mit der Suppression der Proteine Bcl-xL, Bcl-2 und PKC-eta zu einem möglichen synergistischen Effekt führt. Es konnte in dieser Versuchsreihe (Abbildung 16) jedoch keine relevante Wirkung des TNF-alpha nachgewiesen werden.



**Abb.16:** TNF-alpha wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 3,5 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

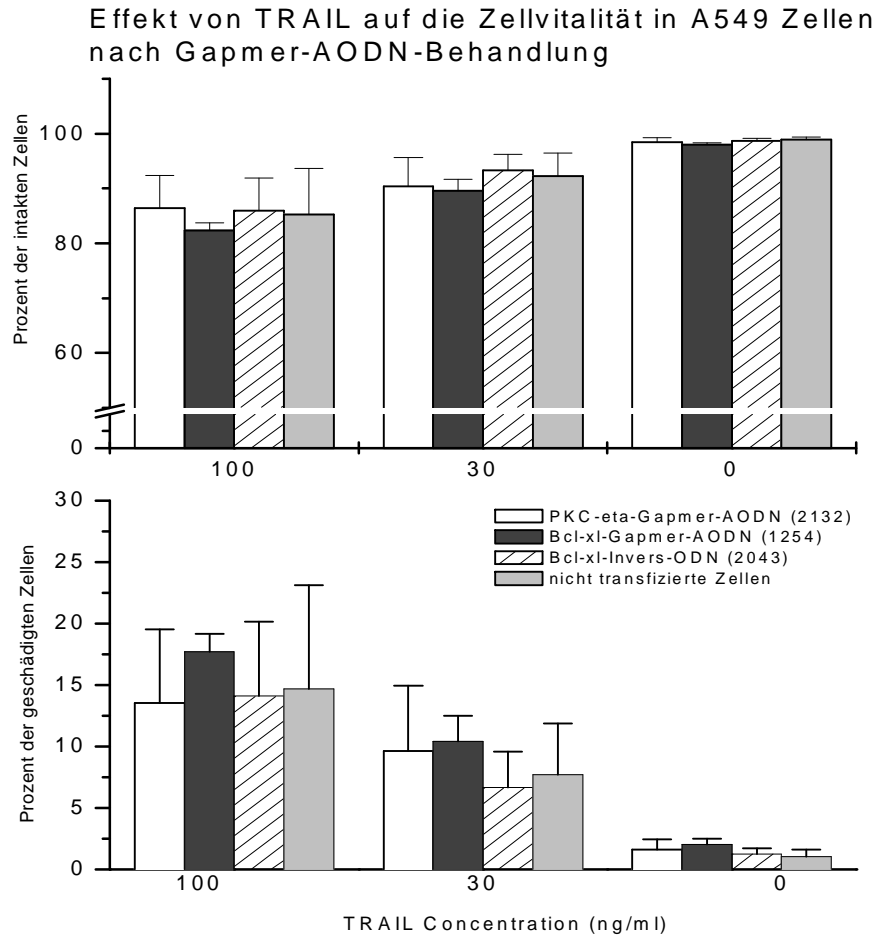
### 3.4. Auswertung der Zellzyklusanalyse

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Caspase-3- bzw. 9-Aktivitätstests, in denen die Apoptose-Aktivität gemessen wurde, gibt die Zellzyklusanalyse den tatsächlichen Zellschaden im Rahmen der Apoptose quantitativ wieder. Auch bei diesen Untersuchungen wurden, wie schon unter 3.3.2. beschrieben, 2 Versuchsreihen mit jeweils separater Zellpassage im Abstand von ca. 3-6 Monaten durchgeführt (Abbildungen 17 und 18).

#### 3.4.1. Zellzyklusanalyse nach TRAIL-Applikation

Die alleinige Vorbehandlung der Tumorzellen mit Gapmer-AODNs (0 ng/ml TRAIL) hatte in der 1. Versuchsreihe keine messbare Auswirkung auf die Vitalität der Zellen. In der Zellzyklusanalyse ließ sich lediglich eine relativ lineare Zunahme der sterbenden Zellen im Zusammenhang mit einer erhöhten TRAIL-Konzentration nachweisen. Abbildung 17 stellt diese Veränderungen dar. Der Effekt von TRAIL in Kombination mit dem Bcl-xL-gapmer-AODN bewirkte in den ersten Versuchen im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Steigerung der toten Zellen von knapp 2 % auf ca. 10 % bei 30 ng/ml TRAIL und auf ca. 17 % bei 100 ng/ml.

Die Vorbehandlung mit dem PKC-eta-gapmer-AODN bewirkte eine Steigerung der geschädigten Zellen von knapp 2 % (ohne TRAIL) auf 10 % bei 30 ng/ml und auf 14 % bei 100 ng/ml. In den Kontrollgruppen (nicht transfizierte oder mit Bcl-xL-Invers-ODN-behandelte Zellen) wurden nach TRAIL-Behandlung ähnliche Steigerungsraten ermittelt.

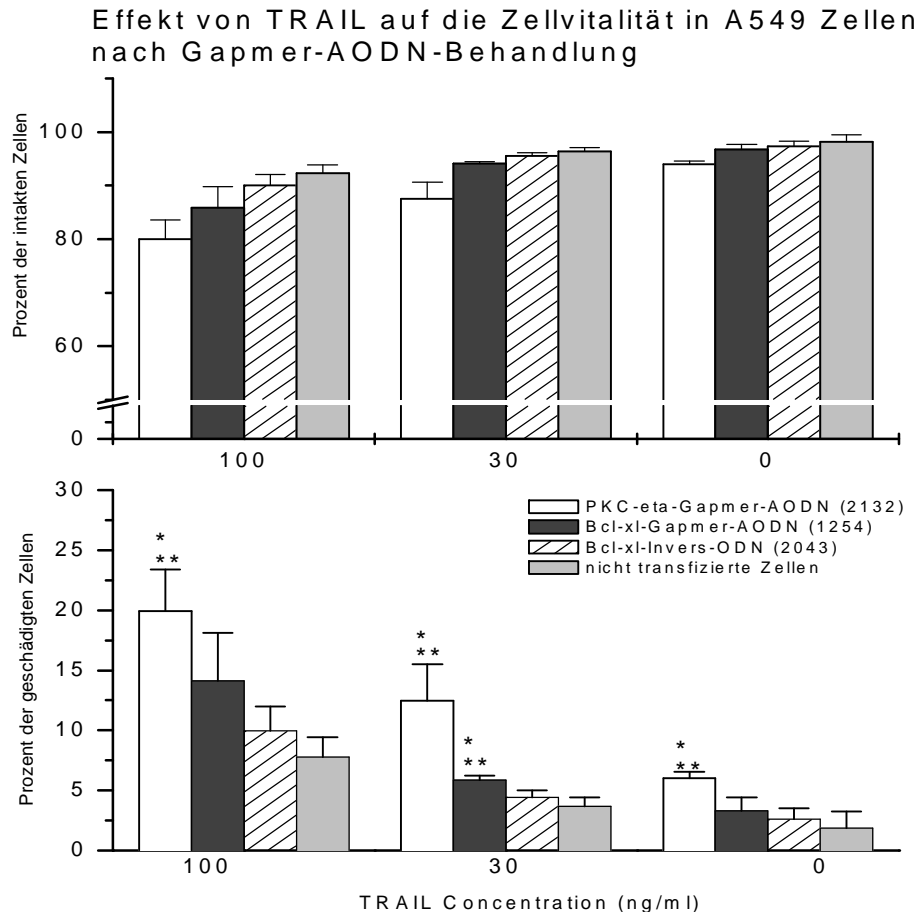


**Abb.17:** 1. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 12 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

Die in der 2. Versuchsreihe später mit Bcl-xL-gapmer-AODN behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen nur eine leicht erhöhte Zellschädigung ohne statistische Signifikanz. Statistisch signifikant erhöhte Messergebnisse konnten jedoch bei der Vorbehandlung mit PKC-eta-Antisense erzielt werden. Die Abbildung 18 gibt die Ergebnisse der 2. Untersuchungsreihe wieder. Der Effekt von TRAIL in Kombination mit dem Bcl-xL-gapmer-AODN bewirkte im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Steigerung der toten Zellen von knapp 3 % auf ca. 6 % bei 30 ng/ml TRAIL und ca. 14 % bei 100 ng/ml.

Bei Vorbehandlung mit dem PKC-eta-gapmer-AODN bewirkte eine Konzentrationssteigerung von TRAIL (0, 30, 100 ng/ml) eine Erhöhung der abgestorbenen Zellen von knapp 6 % auf 12 % bei 30 ng/ml und auf 20 % bei 100 ng/ml. Die Kontrollen

(nicht transfizierte Zellen oder mit Bcl-xL-Invers-ODN behandelte Zellen) zeigten eine Steigerung der prozentualen Zellschädigung durch TRAIL-Gabe von 2 % bzw. 3 % auf 4 % bei 30 ng/ml und auf 8 % bzw. 10 % bei 100 ng/ml.

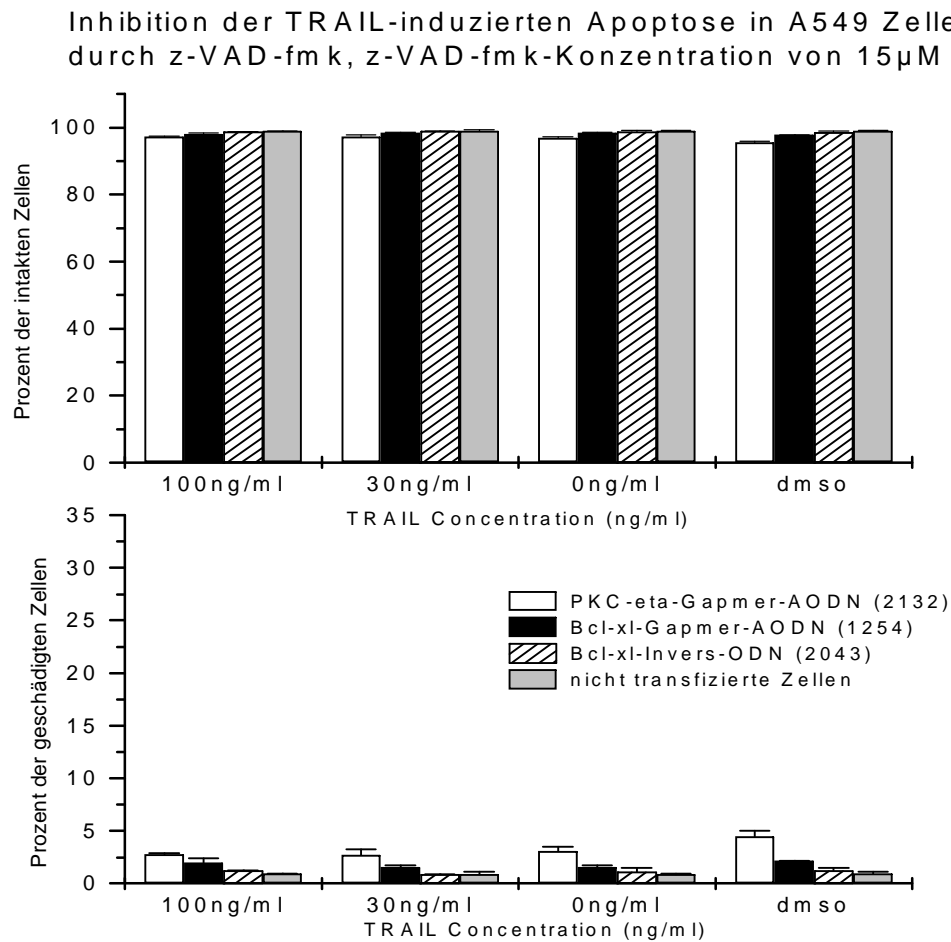


**Abb.18:** 2. Versuchsreihe: TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 12 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 4 Experimenten.

\* signifikant zu nicht transfizierten Zellen

\*\* signifikant zu Bcl-xL-Invers-ODN

Weiterhin wurde mit der Zellzyklusanalyse überprüft, ob die zellschädigende Wirkung des Zytokins TRAIL auch tatsächlich Folge einer Aktivierung von Caspasen ist. Hierzu wurde in Versuchen zusätzlich 1 h vor Applikation des Zytokins TRAIL den Proben der pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk hinzugesetzt. Erwartungsgemäß konnte das Absterben der Zellen dadurch weitgehend vollständig verhindert werden. Abbildung 19 demonstriert somit die spezifische apoptotische Wirkung von TRAIL über die Aktivierung von Caspasen.

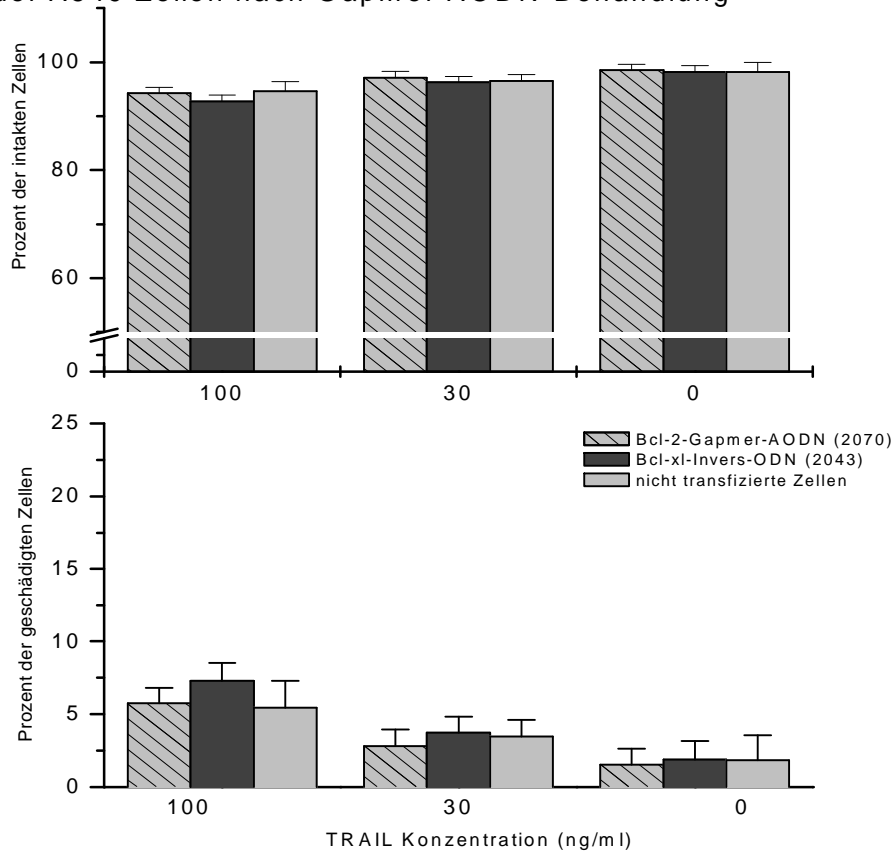


**Abb. 19:** 15  $\mu$ M pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk wurde 1 h vor der TRAIL-Applikation hinzugefügt. Die Angaben sind Mittelwerte von 2 Experimenten.

### 3.4.2. Bcl-2 in der Zellzyklusanalyse

in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Beck mit der Applikation von Vincristin als schädigendes Agens konnte an der Zelllinie A549 keine wesentliche Wirkung in der Kombination mit Bcl-2-antisense-Transfektion erzielt werden. Jetzt sollte ein möglicher Effekt bei Anwendung von TRAIL untersucht werden. Eine Zellzyklusanalyse mit Bcl-2-Antisense-Behandlung in Kombination mit der TRAIL-Gabe konnte jedoch keine Synergieeffekte nachweisen. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse.

Effekt von TRAIL bei Bcl-2-Suppression auf das Überleben der A549 Zellen nach Gapmer-AODN-Behandlung



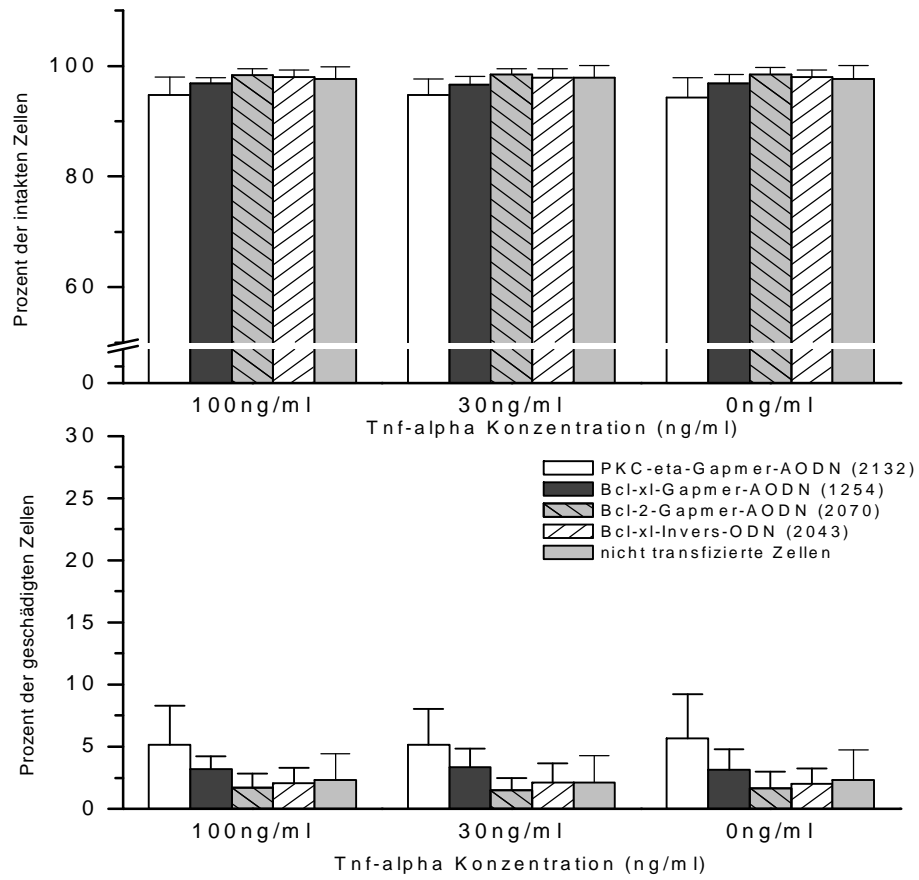
**Abb. 20:** TRAIL wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 12 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

### 3.4.3. Zellzyklusanalyse unter TNF-alpha-Applikation

Die in unseren Untersuchungen fehlende Wirkung des TNF-alpha auf die Caspase-3-Aktivität (siehe 3.3.3) spiegelt sich konsequenter Weise in den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse der A549-Zellen wider. Die Abbildung 21 lässt keinen relevanten Effekt des Zytokins auf die Anzahl geschädigter Zellen erkennen.



### Effekt von Tnf-alpha auf das Überleben von A549 Zellen nach Gapmer-AODN-Behandlung



**Abb. 21:** TNF-alpha wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 ng/ml 36 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu$ M AODNs appliziert, die Zellen inkubierten dann für 12 h. Die Angaben sind Mittelwerte von 3 Experimenten.

## 4. Auswertung und Diskussion

Die Entwicklung der Resistenz von Krebszellen ist ein Hauptproblem bei der effektiven Chemotherapie. Chemotherapie-sensible Krebszellen, die initial einer einfachen Therapie zugänglich sind, können nach einer kurzen Zeit innerhalb einer Behandlungsperiode ihre Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Chemotherapeutika deutlich erhöhen [Minko et al. 1999]. Dies kommt u.a. durch die Überexpression von bestimmten Proteinen zustande, die einen Membran-gebundenen und ATP-verbrauchenden Transporter bilden. Der Abstrom intrazellulärer Mengen an Chemotherapeutika verringert deutlich die zytotoxische Wirkung dieser Stoffe und kann selbst bei Überschreiten der maximal tolerierten Chemotherapiedosis das Überleben von Tumorzellen ermöglichen [Gottesman et al. 2002].

Das Membranprotein P-glycoprotein (P-gp) als wesentlicher Anteil eines solchen Transporters wird durch das humane MDR1-Gen codiert. Die Überexpression des MDR1-Gens führt in Tumorzellen zu einer breiten Kreuzresistenz gegenüber verschiedenen zytotoxischen Reagenzien. Mehrere Ansätze zur Überwindung dieses Resistenzfaktors einschließlich der Verwendung von so genannten Antisense-Oligodesoxynukleotiden wurden in der Vergangenheit entwickelt [Alahari et al. 1998, Kostenko et al. 2002]. Jedoch bewirkt die damit erreichte intrazelluläre Erhöhung der Chemotherapeutika nicht die erhoffte Verbesserung der Krebsbehandlung.

Vom jetzigen Standpunkt aus gesehen stellt die Vermeidung der Apoptose durch die Hochregulation von antiapoptotischen zellulären Faktoren den Hauptgrund für das Tumorzellüberleben dar. Im Wesentlichen sind hier Mitglieder der Bcl-2-Familie für die Regulation der Apoptose-Kaskade zuständig. Mit der verstärkten Expression der antiapoptotischen Proteine wird der Zelltod durch Blockade der Cytochrom-c-Ausschüttung und die fehlende Aktivierung so genannter Effektorcaspasen verhindert (siehe Einleitung).

In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung der Antisense-ODN-Methode effektiv die Proteinexpression und damit auch die Chemoresistenz beeinflussen kann [DeMendes et al. 2000, Konopleva et al. 2000]. In mehreren Arbeiten wurde die Rolle der Proteinkinase-C- $\epsilon$  als weiterer wichtiger Modulator der Apoptose beschrieben [Cartee et Kucera 2000]. So wird beispielsweise die Expression resistenzrelevanter Proteine über eine Phosphorylierung durch die PKC-Isoenzyme reguliert. Zu diesen Proteinen gehören die Gluthathion-S-Transferase, die Topoisomerase I und II, die dTMP-Synthase, die Transkriptionsfaktoren Fos und Jun sowie der Membrantransporter P-glycoprotein [Mellor et Parker 1998].

Studien weisen auf den Zusammenhang zwischen einzelnen PKC-Isoformen und der Regulation der Apoptose hin [Cartee et al. 2003]. So kann die Inaktivierung der PKC in Tumorzellen die Zytostatika-induzierte Apoptose steigern und die PKC-Überexpression in Tumorzellen die Apoptose verhindern.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche synergetische Effekte von Apoptose-aktivierenden Zytokinen in Kombination mit der Suppression der Resistenzfaktoren Bcl-2-Protein, Bcl-xL-Protein und PKC-eta in der nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie A549 zu untersuchen.

#### 4.1. Einsatz von Antisense-Oligodesoxynukleotiden zur Herabsetzung intrazellulärer Resistenzfaktoren

Nach der Aufschlüsselung von zellulären Faktoren, die für Chemoresistenzen zuständig sind, können Verfahren zur möglichen Beeinflussung und erhofften Resistenzsenkung der Tumorzellen entwickelt werden. Um die Effekte letztendlich einem Faktor zuzuordnen, braucht man spezifische molekularbiologische Verfahren zur Ausschaltung bzw. Regulation der Zielfaktoren. Für die Beeinflussung und Suppression der Protein-Level von Bcl-xL und PKC-eta kommt am ehesten die Methode der Transfektion einer Zelllinie mit Antisense-Oligonukleotiden in Frage. Antisense-ODNs ermöglichen die Expression eines bestimmten Proteins einzuschränken, indem sie die Übertragung von Informationen von DNA-Ebene auf Protein-Ebene blockieren.

Obwohl weit verbreitet, sind die Antisense-Phosphorothioate aufgrund ihrer verschiedenen unspezifischen und z.T. toxischen Effekte problematisch in ihrer Verwendung [Dias et Stein 2002]. Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurden so genannte Zweitgenerations-Gapmer-AODNs verwendet. Es handelt sich um circa 20 Nukleotide lange Phosphorothioate, so genannte Gapmere, die sich zum einen durch eine Phosphorothioat-Modifikation über die gesamte Länge von 20 Basen auszeichnen, zum anderen enthalten sie als zusätzliche Modifikation an den jeweils 5 letzten Nukleotiden eine 2'-O-Methyl-Gruppe, die ihre Bindungsaffinität zur mRNA deutlich erhöht. Während die modifizierten endständigen Nukleotide eine hohe Affinität zur Ziel-mRNA, also eine spezifische Bindung vermitteln, sorgt ein 10 Basenpaare langes Stück aus unmodifizierten Phosphorothioat-Nukleotiden in der Mitte des Moleküls für eine gute, aber nicht zu starke RNase-H-Aktivierung [Monia et al. 1993].

In unserer Versuchsreihe wurden insbesondere das Bcl-xL-AODN und das PKC-eta7-AODN erfolgreich eingesetzt. Wie im Kapitel 3.1 dargestellt, konnte für Bcl-xL-Antisense eine Reduktion der mRNA um 82 % erreicht werden. Die Anwendung des PKC-eta-Antisense führte zu einer Reduktion der Ziel-mRNA um ca. 65 %. Die Zellen wurden zuvor mit 200 nM AODN transfiziert und die Expression der Messenger-RNA 24 h nach dem Start der Transfektion mittels der Methode der RT-PCR gemessen.

Um zu überprüfen, ob die gesenkte Expression von Bcl-xL und PKC-eta auch mit einer korrelierenden Erniedrigung der zellulären Proteinmenge einherging, führten wir eine Westernblot-Analyse unter den gleichen Kulturbedingungen wie für die Realtime PCR (RT-PCR) an der Zelllinie A549 durch. Es ergab sich dabei eine weitgehend direkte Korrelation zwischen der supprimierten mRNA von Bcl-xL und PKC-eta und entsprechend abgesenkten zellulären Proteinmengen (siehe Kapitel 3.2.) Das von uns eingesetzte Kontroll-ODN (Bcl-xL-Invers-ODN) zeigte weder auf der Expressionsebene noch auf der Proteinebene relevante Effekte gegenüber nicht transfizierten Zellen.

Der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden am Menschen bedarf noch weiterer Entwicklungen, da bisher noch keine vollständig effiziente Transfektion möglich ist und z.T. unspezifische Nebenwirkungen auftreten [Raffo et al. 2004]. Klinische Studien mit einem Bcl-2-AODN liefen bereits bei der Therapie von verschiedenen Tumoren in Kombination mit Chemotherapeutika [Jansen et al. 2000, Buchele 2003]. Viel versprechend könnte der klinische Einsatz von PKC-eta-Antisense bei Brustkrebs und Ovarialkarzinomen werden [Beck et al. 1998a, Beck et al. 1998b].

## 4.2.            Auswirkungen der Suppression von Bcl-xL oder Bcl-2 bei Anwendung des Zytokins TRAIL

Eine potentiell wirkungsvolle neue Substanz im Kampf gegen Krebs stellt der Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) dar. Das Zytokin mit strukturellen Verwandtschaften zu den bekanntesten Mitgliedern der TNF-Familie, namentlich TNF-alpha und Fas-ligand, induziert über seine spezifischen so genannten Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 die Formation des DISC-Komplexes, der nach Rekrutierung der zytosolischen Caspase-8 sein proteolytisches Zentrum aktiviert [Sprick et al. 2000, Kishkel et al. 2000]. Hiernach kommt es infolge einer Kaskade von Enzymproteolysen, einschließlich der Aktivierung der Effektorcaspase-3, zum Abbau von intrazellulären Substraten, der in der Apoptose der Zelle endet. Weiteren Rezeptoren für TRAIL, auch Decoy-Rezeptoren genannt,

fehlen per se enzymatisch aktive intrazelluläre Bestandteile. Sie sollen deshalb an der Regulation der Apoptose mitwirken. Allerdings ist der genaue Regulationsmechanismus unklar und die Rolle der Decoy-Rezeptoren bei der Resistenzentwicklung gegenüber TRAIL noch nicht abschließend geklärt.

Die in TRAIL gesetzten Hoffnungen basieren auf Arbeiten, die eine besonders hohe Aktivierung der Apoptose in Tumorzellen und nicht in normalen Zellen nachwiesen [Walczak et al. 1998, Evdokiou et al. 2002]. Allerdings wurden derartige Ergebnisse durch andere Arbeiten eingeschränkt, die insbesondere in normalen Hepatozyten und Prostatazellen eine Apoptoseaktivierung zeigten [Jo et al. 2000, Nesterov et al. 2002, Lawrence et al. 2001]. Nichtsdestotrotz lassen Untersuchungen, bei denen TRAIL in Kombination mit anderen Reagenzien Chemoresistenzen von Tumorzellen überwinden konnte [Frese et al. 2002, Nebbioso et al. 2005], auf einen möglichen klinischen Nutzen des Einsatzes von TRAIL hoffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Kofaktor zur Überwindung der Chemoresistenz die Suppression der Proteine Bcl-xL und Bcl-2 mittels der Antisense-Transfektion gewählt. Grundlage für diese Kombination von Zytokin und Suppression von antiapoptotischen Proteinen ist die Annahme, dass durch den Wegfall der apoptosehemmenden Wirkung von Bcl-xL und Bcl-2 auf den Cytochrom-c-Austritt durch die Mitochondrienmembran (siehe Kapitel 1.3 und 1.4) die zytotoxische Wirkung von TRAIL über den mitochondrialen Weg der Apoptose verstärkt würde. In unseren Versuchen konnte eine spezifische und effiziente Herabregulation des Proteins Bcl-xL durch die Transfektion mit dem entsprechenden AODN gewährleistet werden.

Als Marker für die Apoptoseaktivität kann die Caspase-3 herangezogen werden, da sie einer der wesentlichen Endpunkte einer Kaskade nach Zellschädigung ist und die Apoptose messbar macht sowohl über den mitochondrialen Weg als auch über den Weg der transmembranen Rezeptoren.

Die Beurteilung der apoptotischen Aktivität der Zellen im Caspase-3-Test bei Bcl-xL-Suppression in Kombination mit TRAIL in einer Konzentration von 30 ng/ml ergab in der 1. Versuchsreihe einen Anstieg der Caspase-Aktivität gegenüber nur mit TRAIL behandelten Zellen um den Faktor 2,7. Bei der Erhöhung der TRAIL-Konzentration auf 100 ng/ml konnte lediglich ein Anstieg um das 1,7fache ermittelt werden.

In der zeitlich versetzten 2. Versuchsreihe ca. 3-6 Monate nach Abschluss der 1. Versuchsreihe unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen mit neuer Zellpassage der A549-Zellen wurde bei einer Zytokinkonzentration von 30 ng/ml ein Anstieg der Caspase-

Aktivität der transfizierten Zellen gegenüber nicht transfizierten Zellen um das 1,9fache gemessen, bei 100 ng/ml TRAIL lag der Steigerungsfaktor bei 1,4. Auffällig war hierbei, dass die Kombination der Faktoren Zytokin und Proteinsuppression zwar zu einer Verstärkung der Apoptose führte, jedoch mit steigender TRAIL-Konzentration der Effekt der Transfektion offenbar zunehmend in den Hintergrund tritt. Das Zusammenspiel scheint also nur in einem begrenzten Rahmen zu einer mäßig ausgeprägten Synergie zu führen.

Der Einsatz der Kontrolle mit Bcl-xL-Invers-ODN führte in allen Tests bei allen Konzentrationen von TRAIL zu einer minimalen, nicht relevanten Erhöhung der Caspase-3 gegenüber den nicht transfizierten Proben.

Die Messung der Caspase-9 stellt hauptsächlich die Apoptose-Kaskade über den mitochondrialen Weg dar. Bei unseren Caspase-9-Aktivitätstests zeigte sich in der 1. Versuchsreihe ein synergistischer Effekt bei TRAIL-Konzentrationen von 30 und 100 ng/ml mit einem Anstieg der Caspase-9-Aktivität in den mit Bcl-xL-Gapmer-AODNs-vorbehandelten Zellen um das 1,3fache im Vergleich zur nur mit TRAIL behandelten Kontrollgruppe. In der 2. Versuchsreihe lag dieser Faktor jeweils bei 1,9. Damit zeigte sich im Gegensatz zu den Caspase-3-Testreihen, die sämtliche Apoptosewege widerspiegeln, auch bei steigender TRAIL-Konzentration eine gleich bleibende Synergie von TRAIL-Applikation und Suppression des Bcl-xL-Proteins bei Aktivierung der Mitochondrien. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Caspase-9 sehr spezifisch im mitochondrialen Weg der Apoptose wirkt. Weiterhin liegt durch den Vergleich der Resultate aus den Caspase-3 und Caspase-9-Versuchen die Vermutung nahe, dass mit zunehmender TRAIL-Konzentration der mitochondriale Apoptoseweg zur Caspase-3-Aktivierung immer weiter in den Hintergrund tritt. Insgesamt muss jedoch festgestellt werden, dass synergistische Effekte geringer ausfielen als erhofft, zumal andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ebenfalls an der nichtkleinzelligen Tumorzelllinie und an einer Prostatakarzinomzelllinie in Kombination von Chemotherapeutika mit AODN wesentlich vielversprechendere Ergebnisse erbrachten [Sonnemann et al. 2004a, Sonnemann et al. 2004b].

Nachdem nun die Aktivität der Apoptose mehrfach gemessen wurde, interessierte uns schließlich der tatsächliche Zellschaden an den Proben. Die Zellzyklusanalyse gibt einen quantitativen Aufschluss über das Absterben der behandelten Zellen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die alleinige Vorbehandlung der Tumorzelllinie mit Gapmer-AODNs nur unwesentlich die Vitalität der Zellen beeinflusst. Durch zusätzliche Gabe von TRAIL wurde der Effekt verstärkt. Mit steigender Konzentration ließ sich tendenziell eine höhere Anzahl abgestorbener Zellen auszählen. Der synergistische Effekt von

Gapmer-AODN-Vorbehandlung und TRAIL-Applikation erwies sich allerdings nur in der 2. Versuchsreihe bei 30 ng/ml TRAIL für die Bcl-xL-Gapmer-AODN-Vorbehandlung als statistisch signifikant.

Für das Protein Bcl-2 ließen sich in der Zellzyklusanalyse keine signifikanten Effekte nachweisen, was für eine geringe Bedeutung des Proteins in der Tumorzelllinie A549 spricht.

Um abschließend zu überprüfen, ob die Wirkung von TRAIL spezifisch an Caspasen gebunden ist, wurde der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk in der Zellzyklusanalyse zur Unterbindung sämtlicher Aktivitäten von Caspasen und damit abhängiger Apoptoseaktivierung eingesetzt. Die Messungen ergaben eine vollständige Aufhebung der Zellschädigung durch TRAIL alleine oder in Kombination mit Bcl-xL-AODN.

Die Ergebnisse untermauern damit, dass die zellschädigende Wirkung des Zytokins TRAIL tatsächlich ursächlich über die Aktivierung von Caspasen eingeleitet wird.

Dass die Anzahl geschädigter Zellen nicht direkt mit der in unseren Untersuchungen nachgewiesenen Höhe der Caspase-3- und -9-Aktivität korreliert, liegt mit Sicherheit auch daran, dass zum Überleben der Tumorzellen ein komplexerer Mechanismus greift, der die verstärkte Caspase-Aktivität zu überwinden versucht.

#### 4.3.        Auswirkungen der Suppression von PKC-eta bei               Anwendung des Zytokins TRAIL

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Familie von 12 Serin-Threonin-Proteinkinasen, der eine wesentliche Rolle in der Apoptoseregulation angedacht wird. Studien wiesen z.B. nach, dass eine Inaktivierung von PKC Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika oder anderen zytotoxischen Reagenzien sensibilisierte und dass die Überexpression dieser Kinasen die Apoptose verhindert [Cartee et Kucera 2000, Cartee et al. 2003]. Im speziellen Fall der PKC-eta konnte gezeigt werden, dass zelluläre Expressionsmengen mit der Ausprägung von Chemoresistenzen im Brustkrebs, in Ovarialkarzinomen [Masso-Welch 2001, Beck et al. 1998a, Beck et al. 1998b] und bei Blasten der AML korrelieren [Beck et al. 1996].

Die eigentlichen Aufgaben der PKC-eta werden in Differenzierungsprozessen von Epithelzellen gesehen [Kashiwagi et al. 2002, Ohba et al. 1998]. Das Interesse an der PKC-eta wurde durch die Erkenntnis geweckt, dass sie z.B. bei Überexpression in Brustkrebszelllinien die Wirkung des Zytokins TNF-alpha über eine Inhibition der Caspasen-7 und -8 und damit die Apoptoseaktivierung durch TNF-aktivierte Todesrezeptoren aufhebt [Akkaraju et Basu 2000]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PKC-eta durch eine Hemmung der Caspase-9-

Aktivierung die zytotoxische Wirkung von UV- und Gammastrahlung blockiert [Hussaini et al. 2002] und dass die Apoptose bei Überexpression zusätzlich durch eine Hemmung der Caspase-3 gestoppt wird [Matsumura et al. 2003]. Die antiapoptotische Wirkung durch die PKC-eta kann auch über Förderung zusätzlicher Resistenzfaktoren entfaltet werden. So konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinkinase Raf1 verstärkt aktiviert wird, was zu einer deutlich erhöhten Chemoresistenz führte [Schönwasser et al. 1998]. Aufgrund dieser Erkenntnisse über die Verbindung von Chemoresistenzen durch Interaktion der PKC-eta mit Teilen der Caspase-Kaskade war es in unserer Arbeit von Interesse, Effekte der Suppression dieses Moleküls in Kombination mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL auf das Überleben von Tumorzellen zu testen.

Zunächst wurde eine spezifische und effiziente Herabregulation des Proteins PKC-eta durch die Transfektion mit dem entsprechenden AODN gewährleistet. Danach wurde die Wirkung der Proteinsuppression auf die Apoptoseaktivität in der Zelle nach TRAIL-Gabe untersucht, analog zur Untersuchung von Bcl-xL wieder mit dem Caspase-3- und dem Caspase-9-Test.

Prinzipiell kann für alle hier aufgeführten funktionellen Analysen nach Transfektion von A549-Tumorzellen mit Gapmer-AODNs festgestellt werden, dass ohne die TRAIL-Zugabe die Caspase-Aktivitäten trotz Vorbehandlung mit den entsprechenden AODNs in allen Gruppen sehr niedrig liegen. Sie unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollgruppen. Demzufolge führt die alleinige Gabe von AODNs in der verwendeten Zelllinie zu keiner relevanten Steigerung der Caspase-Aktivitäten.

Nach TRAIL-Applikation steigt die Caspase-Aktivität signifikant auch in der Kontrollgruppe an, d.h. auch die separate TRAIL-Behandlung führt zu einer Erhöhung der Caspase-3- und -9-Aktivitäten. In Kombination mit PKC-eta-Gapmer-AODN ist jedoch ein deutlicher synergistischer Effekt erkennbar, der mit erhöhter TRAIL-Konzentration an Wirksamkeit zunimmt.

Die gleiche Versuchsreihe, nur 3-6 Monate später an neu passagierten Tumorzellen durchgeführt, zeigt in der Tendenz ähnliche Resultate wie die vorangegangenen Untersuchungen. Allerdings differieren die absoluten Werte und statistischen Signifikanzen teilweise beachtlich. Dieser Fakt lässt vermuten, dass für die Wirksamkeit der angewandten Substanzen nicht dieselben alleine verantwortlich sind. Auch die Ausgangssituation des Wirtes, also der Tumorzellen, scheint eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit bestimmter Substanzen zu spielen. Mögliche minimale Veränderungen bzw. Anpassungen der



Tumorzellen führen demzufolge unter Umständen zu differierenden Sensibilitäten und Erfolgen in der Tumorthherapie.

Die Zellzyklusanalyse gab die quantitative Analyse über das Absterben der behandelten Zellen wieder. In der 1. Versuchsreihe konnte im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen kein signifikanter Synergieeffekt bei gleichzeitiger PKC- $\eta$ -AODN- und TRAIL-Behandlung gemessen werden. Die 2. Versuchsreihe stellte sich etwas überzeugender dar. Hier zeigte sich bereits initial (TRAIL-Konzentration 0 ng/ml) eine Differenz zwischen der nur mit Antisense behandelten und der nicht transfizierten Probe. Unbehandelt lag die Zahl der geschädigten Zellen bei knapp 2 %, nach AODN-Transfektion bei 6 %. Mit einer TRAIL-Konzentration von 30 ng/ml konnte der Zelltod von knapp 4 % bei unbehandelten auf ca. 12 % bei transfizierten Zellen gesteigert werden. Die TRAIL-Konzentration von 100 ng/ml verursachte bei nicht transfizierten Zellen einen Zelltod von ca. 8 %, bei transfizierten Zellen eine Steigerung auf 20 %.

Korrelierend mit der Caspase-3- und -9-Aktivität ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Höhe der Beeinflussung zwischen den 1. und den 2. Zellreihen, wobei in der späteren Untersuchung eine spürbare Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber einer PKC- $\eta$ -Suppression erreicht werden konnte. Die Effekte dieser Sensibilisierung lagen sogar höher als die Effekte bei der Bcl-xL-Suppression. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PKC- $\eta$  einen bedeutenden Resistenzfaktor der Apoptosekaskade darstellt, jedoch zumindest in der Zelllinie A549 bei unterschiedlichen Zellpassagen in sehr unterschiedlicher Ausprägung.

#### 4.4.            Auswirkungen der Suppression von PKC- $\eta$ , Bcl-xL und Bcl-2 bei Anwendung des Zytokins TNF- $\alpha$

In unseren Untersuchungen konnte kein Einfluss des Zytokins TNF- $\alpha$  auf die Caspase-3-Aktivität und somit die apoptotische Leistung der Tumorzelle nachgewiesen werden, weder bei alleiniger Inkubation von TNF- $\alpha$  noch bei Vorbehandlung mit den entsprechenden Gapmer-AODNs. Zu bemerken ist auch, dass in den kinetischen Voruntersuchungen bei einer TNF- $\alpha$ -Inkubationszeit von bis zu 24 Stunden kein Maximum einer Zytokin-Wirkung erkennbar war. Die Tumorzelllinie A549 reagiert bei diesen Versuchsreihen also nicht sensitiv auf das Zytokin TNF- $\alpha$ . Die fehlende Wirkung des TNF- $\alpha$  auf die Caspase-3-Aktivität spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse wider. Ein Einfluss auf die Anzahl geschädigter Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

## 4.5. Zusammenfassung

Tumorzellen nutzen die Möglichkeit der Hochregulation von antiapoptotischen Faktoren oder die Herunterregulation von proapoptotischen Proteinen, um dem Zelltod durch Apoptose zu entgehen. Für die Anwendung der Chemotherapie maligner Erkrankungen bedeutet dies ein schwerwiegendes Problem. Die auftretende Resistenzentwicklung richtet sich häufig gegen ein breites Spektrum der gängigen Zytostatika. Zahlreiche Arbeiten der molekularbiologischen Forschung in der Medizin befassen sich daher mit der Identifikation von zellulären Resistenzfaktoren und deren potentiellen Ausschaltung.

Die Verwendung der Antisense-Technologie stellt ein nützliches Werkzeug der Forschung dar und kann im Gegensatz zu anderen Methoden mögliche Resistenzfaktoren relativ spezifisch und effizient unterdrücken [Dias et Stein 2002]. Jedoch ist diese Methode nicht unumstritten aufgrund ihrer verbliebenen unspezifischen Nebeneffekte.

In dieser Arbeit verwendete ich chimäre Antisense-Oligodesoxynukleotide der weiterentwickelten 2. Generation, deren unerwünschte Effekte deutlich reduziert werden konnten und die in meinen Versuchen erfolgreich zur effizienten Suppression von Resistenzfaktoren in der A549 Zelllinie eingesetzt wurden.

Ich konnte demonstrieren, dass die Ausschaltung der Resistenzfaktoren Bcl-xL und PKC-eta eine relevante Sensibilisierung gegenüber dem Zytokin TRAIL bewirken kann. Dies zeigte sich zum einen anhand der synergistischen Effekte in der Messung der durch TRAIL provozierten Caspase-3- und -9-Aktivierung. Zum anderen konnte teilweise auch eine Synergie in der Zellzyklusanalyse nachgewiesen werden.

Im Weiteren konnte ich nachweisen, dass TRAIL seine Aktivierung der Apoptose ausschließlich über die Aktivierung von Caspasen regelt. Der pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk blockierte auch nach Suppression von Bcl-xL oder PKC-eta jegliche Effekte des TRAIL hinsichtlich einer Zellschädigung.

Im Gegensatz zur Kombination von Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen Bcl-xL oder PKC-eta mit TRAIL waren die Suppression von Bcl-2 und die Apoptoseaktivierung durch TNF-alpha nicht wirksam. Es konnte keine Auswirkung auf das Zellsterben durch die Suppression von Bcl-2 nachgewiesen werden, was für eine geringe Bedeutung dieses Proteins in der A549-Zelllinie für die Apoptoseregulation spricht.

Der Einsatz von TNF-alpha bewirkte in den A549-Zellen ebenfalls keine relevante Aktivierung der Apoptose, die Zelllinie ist also weitgehend resistent gegen dieses Agens. Eine

mögliche Erklärung wäre, dass TNF in seiner Hauptfunktion als Immun- und Entzündungsregulator grundsätzlich keine Apoptose in A549-Zellen auslöst.

Die Zukunft der Forschung zur Bekämpfung von Chemoresistenzen wird in den Aufgaben liegen, zum einen weitere Teile der Zellresistenz zu identifizieren und ihre Funktionsweisen zu beleuchten, zum anderen tumorspezifisch einzelne oder mehrere Resistenzfaktoren auszuschalten, um in der Kombination mit zellschädigenden Wirkstoffen wie z.B. Chemotherapeutika, Zytokinen oder Bestrahlung letztendlich im Kampf gegen maligne Erkrankungen zu gewinnen.

## Literaturverzeichnis

- Alahari S.K., DeLong R., Fisher M.H., Dean N.M., Villet P., Juliano R.L.:  
Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 419-428 (1998)
- Antonsson B., Martinou J-C.:  
The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256: 50-57 (2000)
- Ashkenazi A., Divit V.M.:  
Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308 (1998)
- Akkaraju G.R., Basu A.:  
Overexpression of Protein Kinase C-eta attenuates caspase activation and Tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 103-107 (2000)
- Baader E., Toloczko A., Fuchs U. Schmid I., Beltinger C., Ehrhardt H., Debatin K.M., Jeremias I.:  
Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects. *Cancer Res.* 65: 7888-95 (2005)
- Baetu T.M., Hiscott J.:  
On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 199-207 (2002)
- Beck J., Bohnet B., Brugger D., Bader P., Dietl J., Scheper R.J., Kandolf R., Liu C., Niethammer D., Gekeler V.:  
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 (1998)
- Beck J.F., Bohnet B., Brugger D., Dietl J., Scheper R.J., Bader P., Niethammer D., Gekeler V.:  
Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 18 (2A):701-705 (1998)
- Beck J., Handgretinger R., Klingebiel T., Dopfer R., Schaich M., Ehninger G., Niethammer D., Gekeler V.:  
Expression of PKC isozyme and MDR-associated genes in primary and relapsed state AML. *Leukemia* 10 (3):426-433 (1996)
- Bijl M., Limburg P.C., Kallenberg C.G.:  
New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. *Neth. J. Med.* 59: 66-75 (2001)
- Bojes H.K., Suresh P.K., Mills E.M., Spitz D.R., Sim J.E., Kehrer J.P.:  
Bcl-2 and bcl-xl in peroxide-resistant A549 and U87MG cells. *Toxicol. Sci.* 42: 109-116 (1998)

Brenner W., Farber G., Herget T., Wiesner C., Hengstler J.G., Thuroff J.W.:  
Protein Kinase C eta is associated with progression of renal cell carcinoma (RCC).  
*Anticancer Res.* 23: 4001-4006 (2003)

Brojatsch J., Naughton J., Rolls M.M., Zingler K., Young J.A.:  
CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-  
sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 87: 845-855 (1996)

Buchele T.:  
Proapoptotic therapy with Oblimersen (bcl-2 antisense oligonucleotide) – review of  
preclinical and clinical results. *Onkologie* 26: 60-69 (2003)

Cartee L., Kucera G.L.:  
Protein kinase C modulation and anticancer drug response.  
*Cancer Invest* 18: 731-739 (2000)

Cartee L., Maggio S.C., Smith R., Sankala H.M., Dent P., Grant S.:  
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: 83-93 (2003)

Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B.:  
Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in *mdr1* (P-  
glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.  
*Cell* 47: 381-389 (1986)

Chida K., Sagara H., Suzuki Y., Murakami A., Osada S., Ohno S., Hirose K.,  
Kuroki T.:  
The eta isoform of Protein Kinase C is localised on rough endoplasmatic reticulum.  
*Moll. Cell. Biol.* 14: 3782-3790 (1994)

Cohen G.M.:  
Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997)

Cordon-Cardo C., Prives C.:  
At the crossroads of inflammation and tumorigenesis.  
*J. Exp. Med.* 190: 1367-1370 (1999)

Cory S., Adams J.M.:  
The bcl2-family: regulators of the cellular life-or-death switch.  
*Nature Rev. Cancer* 2: 647-656 (2002)

Cosman D.:  
A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 12: 440-455 (1994)

Cryns V., Yuan J.:  
Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551-1570. (1998)

Debatin K.M.:  
Cell death in T- and B-cell development. *Ann. Hematol.* 80: B29-B31 (2001)

Degli-Eposti M.A., Dougall W.C., Smolak P.J., Waugh J. Y., Smith C.A., Goodwin R.G.: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- $\kappa$ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7: 813-820 (1997a)

Degli-Eposti M.A., Smolak P.J., Walczak H., Waugh J., Huang C.P., DuBose R.F., Goodwin R.G., Smith C.A.: Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186: 1165-1170 (1997b)

Dekker L.V., Palmer R.H., Parker P.J.: The Protein Kinase C and Protein Kinase C related gene families. *Current Opinion in Structural Biol.* 5: 396-402 (1995)

DeMendes D.E., Hudon N., McIntosh N., Mayer L.D.: Molecular and pharmacokinetics properties associated with the therapeutics of bcl-2 antisense oligonucleotide F3139 combined with free and liposomal doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 6: 2891-2902 (2000)

Dias N., Stein C.A.: Antisense oligonucleotides: basic concept and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* 1: 347-355 (2002)

Diesbach de P., Berens C., N'Kuli F., Monsigny M., Sonveaux E., Wattiez R., Courtoy P.J.: Identification purification and partial characterization of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res.* 28: 868-874 (2000)

Doi S., Goldstein D., Hug H., Weinstein I.B.: 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: 197-203 (1994)

Domen J.: The role of apoptosis in regulating hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Immunol. Res.* 22: 83-94 (2000)

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.: Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 102 (1): 33-42 (2000)

Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.: Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383-424 (1999)

Ehlers S.: Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 2): ii37-ii42 (2003)

Ehlers S., Kutsch S., Ehlers E.M., Benini J., Pfeffer K.:  
Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55<sup>-/-</sup> mice is dependent on T cells and IL-12. *J. Immunol.* 165: 483-492 (2000)

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S.:  
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50 (1998)

Evdokiou A., Bouralexis S., Atkin G.J., Chai F., Hay S., Clayer M., Findlay D.M.:  
Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* 99: 491-504 (2002)

Fang F, Newport JW.:  
Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 66: 731-742 (1991)

Folkman J.:  
The role of angiogenesis in tumor growth.  
*Semin Cancer Biol* (3):65-71 (1992)

Frese S., Brunner T., Gugger M., Uduehi A., Schmid R.A.:  
Enhancement of Apo2L/TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines by chemotherapeutic agents without correlation to the expression level of cellular protease caspase-8 inhibitory protein. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123: 168-174 (2002)

Fynan T.M., Reiss M.:  
Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- $\beta$  and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncogen.* 4: 493-540 (1993)

Gerard I., Vousden E., Vousden K.H.:  
Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348 (2001)

Giard, DJ, Aaronson, SA, Todaro, GJ, Arnstein, P, Kersey, JH, Dosik, H, Parks, WP:  
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1417-1423 (1973)

Giancotti F.G., Ruoslathi E.:  
Integrin signaling. *Science* 281: 1309-1312 (1999)

Gleave M.E., Miyake H., Goldie J., Nelson C., Folcher A.:  
Targeting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides. *Urology* 54: 36-46 (1999)

Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E.:  
Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev. Cancer* 2: 48-58 (2002)

- Grad J.M., Zeng X.R., Boise L.H.:  
Regulation of bcl-xl: a little bit of this and a little bit of STAT.  
*Curr. Opin. Oncol.* 12: 543-549 (2000)
- Green D.R., Reed J.C.:  
Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312 (1998)
- Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J.:  
Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis.  
*Genes Dev.* 13: 1899-1911 (1999)
- Guimaraes C.A., Linden R.:  
Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles.  
*Eur. J. Biochem.* 271: 1638-1650 (2004)
- Guo P., Hu B., Gu W., Xu L., Wang D., Huang H.S.U., Cavenee W.K., Cheng S.-Y.:  
Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating  
Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting  
Pericyte Recruitment. *Am. J. Pathol.* 162: 1083-1093 (2003)
- Guvakova M.A., Yakubov L.A., Vlodavsky I., Tonkinson J.L., Stein C.A.:  
Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic Fibroblast growth factor, inhibit its  
binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on  
extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 270: 2620-2627 (1995)
- Harbour J.W., Dean D.C.:  
The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms.  
*Genes Dev.* 14: 2393-2409 (2000)
- Hengartner M.O.:  
The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776 (2000)
- Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M.:  
Molecular Origins of cancer. Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 359:1367-80 (2008)
- Herr I., Debatin K.M.:  
Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98 (9): 2603-2614 (2001)
- Hsu H., Huang J., Shu H.B., Baichwal V., Goeddel D.V.:  
TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling  
complex. *Immunity* 4: 387-396 (1996)
- Hussaini I.M., Carpenter J.E., Redpath G.T., Karns L.R., Vinton G., Sando J.J., Shaffrey  
M.E., Vandenberg S.R.:  
Protein Kinase C-eta regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced  
apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation.  
*Neuro-Oncol.* 4: 9-21 (2002)



- Hussaini I.M., Carpenter J.E., Redpath G.T., Karns L.R., Vinton G., Sando J.J., Vandenberg S.R.:  
Phorbol 12-myristate 13-acetate induces Protein Kinase C eta-specific proliferative response in astrocytic tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275: 22348-22354 (2000)
- Ip M.M.:  
Altered expression and localization of PKC eta in human breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 68: 211-233 (2001)
- Jager R., Herzer U., Schenkel J., Weiher H.:  
Overexpression of bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* 15: 1787-1795 (1997)
- Jansen B., Wacheck V., Heere-Ress E., Schlagbauer-Wadl H., Hoeller C., Lucas T., Hoermann M., Hollenstein U., Wolff K., Pehamberger H.:  
Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 356:1728-1733 (2000)
- Jo M., Kim T.H., Seol D.W.:  
Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* 6: 564-567 (2000)
- Karahashi H., Amano F.:  
Structure-activity relationships of lipopolysaccharide (LPS) in tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and induction of macrophage cell death in the presence of cyclohexamide (CHX) in a murine macrophage-like cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1102-1105 (1998)
- Kashiwagi M., Ohba M., Chida K., Kuroki T.:  
Protein Kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation. *J. Biochem. (Tokyo)* 132: 853-857 (2002)
- Kelekar A., Thompson C.B.:  
Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 8: 324-330 (1998)
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.:  
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257 (1972)
- Khaled Z., Benimetskaya L., Zeltser R., Khan T., Sharma H.W., Narayanan R., Stein C.A.:  
Multiple mechanisms may contribute to the cellular anti-adhesive effects of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 24: 737-745 (1996)
- Khotakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Koths K., Kwiatkowski D.J., Williams L.T.:  
Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298 (1997)

Kim K.H., Fischer M.J., Xu S.Q., El-Deiry W.S.:

Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 6: 335-346 (2000)

Kim K.H., Takimoto R., Dicker D.T., Chen Y.H., Gazitt Y., El-Deiry W.S.:

Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not in normal cell lines. *Int. J. Oncol.* 18: 241-247 (2001)

Kim Y.S., Schwabe R.F., Qian T., Lemasters J.J., Brenner D.A.:

TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology* 36: 1498-508 (2002)

Kinzler K.W., Vogelstein B.:

Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159-170 (1996)

Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Show P., Kim K.J., Ashkenazi A.: Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12: 611-620 (2000)

Koizumi H., Kohno Y., Osada S., Ohno S., Ohkawara A., Kuroki T.:

Differentiation-associated localisation of nPKC  $\epsilon$ , a Ca<sup>++</sup>-independent Protein Kinase C, in normal human skin and skin diseases. *J. Invest. Dermatolog.* 101: 858-863 (1993)

Konopleva M., Tari A.M., Estrov Z., Harris D., Xie Z., Zhao S., Lopez-Berestein G., Andreef M.:

Liposomal bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood* 15: 3929-3938 (2000)

Koren R., Meir D.B., Langzam L., Dekel Y., Konichezky M., Baniel J., Livine P.M., Gal R., Sampon S.R.:

Expression of Protein Kinase C isoenzymes in benign hyperplasia and carcinoma of prostate. *Oncol. Rep.* 11: 321-326 (2004)

Kostenko E.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A.:

Downregulation of P-glycoprotein/MDR1 mRNA level in human KB cells by antisense oligonucleotide conjugates. RNA accessibility in vitro and intracellular antisense activity. *Biophys. Acta* 1576: 143-147 (2002)

Kroemer G.:

Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem. Soc. Symp.* 66: 1-15 (1999)

Kroemer G., Reed J.C.:

Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6: 513-519 (2000)

Lawrence D., Shahrokh Z., Marsters S.:

Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* 7: 383-385 (2001)

- Lebedeva I., Benimetskaya L., Stein C.A., Vilenchik M.:  
Cellular delivery of antisense oligonucleotides.  
*Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 101-119 (2000a)
- Lee L.G., Connell C. R., Bloch W.:  
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.  
*Nucl. Acids Res.* 21: 3761-3766 (1993)
- Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S., Nicotera P.:  
Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J.Exp.Med.* 185:1481-1486 (1997)
- Leverkus M., Neumann M., Mengling T., Mengling T., Rauch C.T., Bröcker E.B., Krammer P.H., Walczak H:  
Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* **60**: 553–9 (2000)
- Leverkus M., Sprick M.R., Wachter T., Mengling T., Baumann B., Serfling E., Bröcker E.B., Goebeler M., Neumann M., Walczak H.:  
Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation  
*Mol. Cell. Biol.* 23: 777–90 (2003)
- Li H., Zhu H., Xu C., Yuan J.:  
Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94: 491-501 (1998)
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.:  
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489 (1997)
- Lima W.F., Mohan V., Crooke S.T.:  
The influence of antisense oligonucleotide-induced RNA structure on Escherichia coli Rnase H1 activity. *J. Biol. Chem.* 272: 18191-18199 (1997)
- Liu X., Li P., Widlak P., Zou H., Luo X., Garrard W.T., Wang X.:  
The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8461-8466 (1998)
- Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J.S., Neckers L.M.:  
Characterization of oligonucleotide transport into living cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 3474-3478 (1989)
- Lukashev M.E., Werb Z.:  
ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour.  
*Trends Cell Biol.* 8: 437-441 (1998)

- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X.:  
Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface receptors. *Cell* 94: 481-490 (1998)
- MacFarlene M., Ahmad M., Srinivasula S.M., Fernandes-Alnemri T., Cohen G.M., Alnemri E.S.:  
Identifikasi and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272: 25417-25420 (1997)
- Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., Ashkenazi A.:  
A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7: 1003-1006 (1997)
- Marwick C.:  
First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *JAMA* 280: 871 (1998)
- Massague J.:  
G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298-306 (2004)
- Masso-Welch P.A., Winston J.S., Edge S., Darcy K.M., Asch H., Vaughan M.M.,  
Matsumura M., Tanaka N., Kuroki T., Ichihashi M., Ohba M.:  
The eta isoform of Protein Kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 350-356 (2003)
- Mayo M.W., Denlinger C.E., Broad R.M., Yeung F., Reilly E.T., Shi Y., Jones D.R.:  
Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 278: 18980-18989 (2003)
- McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P., Korsmeyer S.J.:  
Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 78-88 (1989)
- Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E.:  
FLICE is activated by association with CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO. J.* 16: 2794-2804 (1997)
- Mellor H., Parker P.J.:  
The extended Protein Kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281-292 (1998)
- Minko T., Kopeckova P., Kopecek J.:  
Chronic exposure to HPMA copolymer bound adriamycin does not induce multidrug resistance in human ovarian carcinoma cell line. *J. Control. Release* 59: 133-148 (1999)
- Monia, B. P., Lesnik, E. A., Gonzales, C., Lima, W. F., McGee, D., Guinosso, C. J., Kawasaki, A. M., Cook, P. D., Freier, S. M.:  
Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-Desoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* 268: 14514-14522 (1993)

Moore G.R., Pettigrew G.W.:

*Cytochromes c. Evolutionary, Structural, and Physicochemical Aspects.*  
SpringerVerlag, Berlin - Heidelberg - New York. (1990)

Morgan D.O.:

Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors.

*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291 (1997)

Munshi A., McDonnell T.J., Meyn R.E.:

Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells.

*Cancer Chemother. Pharmacol.* 50: 46-52 (2002)

Murphy K.M., Streips U.N., Lock R.B.:

Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrom c release and is inhibited by bcl-2. *Oncogene* 18: 5991-5999 (1999)

Murray A.W.:

Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls.

*Nature* 359: 599-604 (1992)

Nagata S.:

Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365 (1997)

Nebbioso A., Clarke N., Voltz E., Germain E., Ambrosino C., Bontempo P., Alvarez R., Schiavone E.M., Ferrara F., Bresciani F., Weisz A., Lera A. R de, Gronemeyer H., Altucci L.:

Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nature Med.* 11: 77-84 (2005)

Nesterov A., Ivashenko Y., Kraft A.S.:

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 21: 1135-1140 (2002)

Newton A.C.:

Protein Kinase C: structure, function, and regulation.

*J. Biol. Chem.* 270: 28495-28498 (1995)

Ngyen M., Millar D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., Shore G.C.:

Targeting of bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268: 25265-25268 (1993)

Ohba M., Ishino K., Kashiwagi M., Kawabe S., Chida K., Hugh N.H., Kuroki T.:

Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of Protein kinase C.

*Moll. Cell Biol.* 18: 5199-5207 (1998)

Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.:

Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619 (1993)

Osada S., Mizuno K., Saido T.C., Akita Y., Suzuki K., Kuroki T., Ohno S.:  
A phorbol ester receptor/protein kinase, n PKC eta, a new member of the Protein Kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265: 22434-22440 (1990)

Pakham G., White E.L., Eischen C.M., Young H., Parganas E., Ihle J.N., Grillot D.A.M., Zambetti G.P., Nunez G., Cleveland J.L.:  
Selective regulation of bcl-xl by a jak kinase-dependent pathway is bypassed in murine haematopoietic malignancies. *Genes Dev.* 12: 2475-2487 (1998)

Parker P.J., Coussens L., Totty N., Rhee L., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M.D., Ullrich A.:  
The complete primary structure of Protein Kinase C – the major phorbol ester receptor. *Science* 233: 853-859 (1986)

Pettigrew G.W., Moore G.R.:  
*Cytochromes c. Biological Aspects.*  
SpringerVerlag, Berlin - Heidelberg - New York. (1987)

Raffo A., Lai J.C., Stein C.A., Miller P., Scaringe S., Khvorova A., Benimetskaya L.:  
Antisense RNA downregulation of bcl-2 expression in DU145 prostate cancer cells of G3139 (Oblimersen). *Clin. Cancer Res.* 10: 3195-3206 (2004)

Raffo A.J., Perlman H., Chen M.W., Day M.L., Streitman J.S., Buttyan R.:  
Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res.* 55: 4438-4445 (1995)

Rao L., Perez D., White E.:  
Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis.  
*J. Cell. Biol.* 135: 1441-1455 (1996)

Reed J.C., Zha H., Aime-Sempe C., Takayama S., Wang H.G.:  
Structure-function analysis of bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406: 99-112 (1996)

Roach D.R., Bean A.G., Demangel C., France M.P., Briscoe H., Britton W.J.:  
TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* 168: 4620-4627 (2002)

Rockwell P., O'Connor W.J., King K., Goldstein N.I., Zhang L.M., Stein C.A.:  
Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6523-6528 (1997)

Rudel T., Bokoch G.M.:  
Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574 (1997)

Rudin C.M., Kozloff M., Hoffmann P.C., Edelman M.J., Karnauskas R., Tomek R., Szeto L., Vokes E.E.:  
Phase-I-study of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, combined with carboplatin and etoposide in patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22: 1110-1117 (2004)

Sakahira H., Enari M., Nagata S.:  
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.  
*Nature* 391: 96-99 (1998)

Sampson L.E., Chaplin D.J.:  
The influence of oxygen and carbon dioxide tension on production of TNF alpha by  
activated macrophages. *Br. J. Cancer Suppl.* 27: 5133-5135 (1996)

Schönwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J.:  
Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase  
pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes.  
*Mol. Cell Biol.* 18:790-798 (1998)

Shay J.W., Bacchetti S.:  
A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33: 787-791 (1997)

Sheridan J.P., Marsters S.A., Pitti R.M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D.,  
Ramakrishnan L., Gray C.L., Baker K., Wood W.I., Goddard A.D. Godowski P.,  
Ashkenazi A.:  
Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.  
*Science* 277: 818-821 (1997)

Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.:  
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-  
2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182 (1987)

Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G.:  
The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and  
death. *Cell* 76: 959-962 (1994)

Sonnemann J., Gekeler V., Ahlbrecht K., Brischwein K., Liu C., Bader P., Muller C.,  
Niethammer D., Beck J.F.:  
Down-regulation of Proteine Kinase C eta by antisense Oligonucleotides sensitises A549  
lung cancer cells to vincristine and paclitaxel. *Cancer Lett.* 209: 177-185 (2004)

Sonnemann J, Gekeler V, Sagrauske A, Müller C, Hoffmann H-P, Beck J.:  
Apoptotic responsiveness of PC-3 prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related  
apoptosis-inducing ligand (TRAIL): differential effects of Bcl-xL and Bcl-2 down-  
regulation . *INT. J. ONCOL.* 2004, 25:1171-1181

Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E.:  
FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential  
for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12: 599-609 (2000)

Srinivasula S.M., Ahmed M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S.:  
Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization.  
*Moll. Cell* 7: 949-957 (1998)

Stanger B.Z., Leder P., Lee T.H., Kim E., Seed B.:  
RIP. A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in  
yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523 (1995)

Stein C.A.:

The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed.  
*J. Clin. Invest.* 108: 641-644 (2001)

Strasser A., Harris A.W., Bath M.L., Cory S.:

Novel primitive lymphoid tumors induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348: 331-333 (1990)

Sytwu H.K., Liblau R.S., McDewitt H.O.:

The roles of Fas/Apo-1(CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 5: 17-30 (1996)

Tamm T., Dorken B., Hartmann G.:

Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 358: 489-497 (2001)

Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T., Nicholson D.W.:

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: 17907-17911 (1997)

Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M.:

Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.  
*Science* 228: 1440-1443 (1985)

Tu Y., Renner S., Xu F., Fleishman A., Taylor J., Weisz J., Vescio R., Rettig M., Berenson J., Krajewski S., Reed J.C., Lichtenstein A.:

Bcl-xL expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance.  
*Cancer Res.* 58: 256-262 (1998)

Walczak H., Krammer P.H.:

The CD95 (Apo-1/Fas) and the TRAIL (Apo-2L) apoptosis systems.  
*Exp. Cell Res.* 256: 58-66 (2000)

Walczak H., Miller R.E., Ariail K.:

Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo.  
*Nat. Med.* 5: 157-163 (1998)

Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A.:

Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 3: 673-682 (1995)

Woods D.B., Vousden K.H.:

Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 264: 56-66 (2001)

Wu G.S., Kim K., El-Deiry W.S.:

Killer/Dr5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 465: 143-151 (2000)



Wyllie A.H.:

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556 (1980)

Younes A., Kadin M.E.:

Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 21: 3526–3534 (2003)

Zangemeister-Wittke U., Leech S.H., Olie R.A., Simoes-Wüst A.P., Gantschi O., Luedke G.H., Natt F., Häner R., Martin P., Hall J., Nalin C.M., Stahel R.A.:

A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xl expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 6: 2547-2555 (2000)

Zheng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H., Leonardo M.J.:

Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377: 348-351 (1995)

Zhivotovsky B., Burgress D.H., Vanags D.M., Orrenius S.:

Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 481-488 (1997)

Zörnig M., Hueber A.-O., Baum W., Evan G.:

Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1551: F1–F37 (2001)

## Abkürzungen

|                  |  |
|------------------|--|
| A                | Adenosin   |
| Abb.             | Abbildung  |
| AFC              | Amino-4-trifluoromethyl coumarin                                       |
| AODN             | “Antisense“-Oligodesoxynukleotid                                       |
| AP-1             | Transkriptionsfaktor, Aktivierung in der akuten 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-xL           | “long splicing variant of a Bcl-2 related gene“                        |
| BH-3             | Bcl-2 Homologiedomäne  |
| Bid              | BH-3 interacting death agonist   |
| 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  |
| 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                         |
| mg                  | Milligramm   |
| min                 | Minute   |
| ml                  | Milliliter   |
| mM                  | Millimolar   |
| mRNA                | messenger Ribonukleinsäure                               |
| NF- $\kappa$ B      | Nuclear-Factor $\kappa$ B                                |
| nM                  | Nanomolar  |
| ODN                 | Oligodesoxynukleotid                                     |
| PAGE                | Polyacrylamidgelelektrophorese                           |
| PBS                 | phosphat-buffered saline                                 |
| PCR                 | Polymerasekettenreaktion                                 |
| Pgp                 | P-Glykoprotein   |
| PI                  | Propidiumjodid   |
| PK                  | Protein-Kinase   |
| PKC                 | Protein-Kinase C   |
| 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                                    |
| SEM                 | standard error of the mean                               |
| SSC                 | side-scatter   |
| STAT                | Signal transducers and activators of transcription       |
| T                   | Thymin   |
| Tab.                | Tabelle  |
| Taq                 | Thermus aquaticus ( hitzeresistenter Bakterienstamm)     |
| tBid                | truncated Bid  |
| TGF $\beta$         | Tumor-Growth-Factor $\beta$                              |
| TNF-alpha           | Tumor-Nekrose-Faktor-alpha                               |
| TNFR                | Tumor-Nekrose-Faktor -Rezeptor                           |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| 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      |
| (w/v)         | Gewicht pro Volumen                   |
| $\mu\text{g}$ | Mikrogramm                            |
| $\mu\text{M}$ | Mikromolar                            |

## Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. James F. Beck für die Möglichkeit, wissenschaftlich zu arbeiten und die Anregungen und Hinweise bei den Experimenten und Auswertungen bedanken. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Sonnemann für die intensive Betreuung, das sehr gute Arbeitsklima und die sehr wertvolle und hilfreiche Unterstützung in allen Belangen der wissenschaftlichen Arbeit. Herzliche Grüße und vielen Dank gehen auch an Frau Jennifer Gänge, die mir eine wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche war und für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima sorgte.

Bei Frau Christine Stötzer möchte ich mich für die Durchführung der Mykoplasmentests im Hämatologisch-/Onkologischen Labor der Kinderklinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität bedanken. Ebenso geht mein Dank an Frau Ulrike Glawe für die Hilfe bei der Durchführung von Proteinexpressionsanalysen an der Kinderklinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für die Geduld und jegliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

Name: Meißner, Steffen

Geburtsdatum: 27.04.1978

Geburtsort: Rostock

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984-1990 Grundschule in Rostock

1990-1997 Goethe-Gymnasium Rostock

1994-1995 Highschool-Jahr in Bryson-City, NC, USA

1997 Abitur

Ersatzdienst:

1997-1998 Zivildienst an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Hochschulausbildung:

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2005 3. Staatsexamen und Erteilung der Approbation als Arzt

Wissenschaftliche Hilfskraft:

10/02-08/03 am Peter-Holtz-Research-Center Greifswald

Ärztliche Tätigkeit:

2005-2007 Assistenzarzt / Arzt in Weiterbildung für diagnostische und  
interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Leipzig AöR

Seit 2007 Assistenzarzt / Arzt in Weiterbildung am Institut für diagnostische  
und interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Rostock

Qualifikationen:

- Englisch fließend in Wort und Schrift
- Umgang mit elektronischen Medien geläufig

Promotionsarbeit:

am Peter-Holtz-Research-Center Greifswald,  
AG Pädiatrische Onkologie und Hämatologie unter der Leitung  
von Prof. Dr. med. James F. Beck zum Thema:  
Suppression Apoptose-inhibierender Faktoren in der  
Tumorzelllinie A549 mit Antisense- Desoxyoligonukleotiden in  
Kombination mit der zytotoxischen Wirkung von Zytokinen

# Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angaben der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

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.

.....

Rostock, 21.12.09