

Aus der Medizinischen Klinik A der Universität Düsseldorf
Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Haas

**Nicht-steroidale Antiphlogistika induzieren in Karzinom-Zellen Apoptose und
Zellzyklus-Arrest über eine Aktivierung von MDA-7/IL24, GADD45 α und GADD45 γ**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Akos Gabor Czibere

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang H. M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Norbert Gattermann

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Krauspe

Meinen Eltern.

Für die Unterstützung und die Freiheiten, die sie mir gewährt haben.

0.	INHALTSVERZEICHNIS	4-10
1.	EINLEITUNG	11-29
1.1	Krebserkrankungen	11
1.1.1	Epidemiologie.....	12
1.1.2	Ätiologie.....	14
1.1.3	Therapieoptionen bei Krebserkrankungen.....	14
1.2	Nicht-steroidale Antiphlogistika	15
1.2.1	Allgemeiner Wirkmechanismus und Stoffwechsel nicht-steroidaler Antiphlogistika.....	15
1.2.2	Übersicht über den Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika.....	16
1.2.3	Bisheriger Einsatz und Erfolge nicht-steroidaler Antiphlogistika in der Krebstherapie.....	16
1.3	Zellteilung	19
1.3.1	Regulation des Zellzyklus und Aufgabe des G2/M-Checkpointes.....	20
1.4	Apoptose	23
1.4.1	Ablauf der Apoptose und Aufgabe der c-Jun NH ₂ -terminale Kinase.....	24
1.5	Growth-Arrest-and-DNA-Damage-Inducible-Gene-45	26
1.5.1	GADD45 und Apoptose.....	26
1.5.2	GADD45 und Zellzyklus.....	27
1.6	Melanoma-Differentiation-Associated-Gene-7 / Interleukin 24	28
1.7	Fragestellung	29

2.	MATERIAL UND METHODEN	30-67
2.1	Material	30-43
2.1.1	Allgemeine Reagenzien, Materialien und Geräte	30
2.1.2	Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)	32
2.1.3	Zelllinien und Medien	34
2.1.4	RT-PCR Primer	40
2.1.5	siRNA-Oligonukleotide für Transfektionen	41
2.1.6	siRNA-Konstrukte für die Lentivirus Herstellung	41
2.1.7	Antikörper für Western Blots	42

2.2	Methoden	43-67
2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	43
2.2.2	Behandlung der Zelllinien mit nicht-steroidalen Antiphlogistika	43
2.2.3	Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Zytometrie	44
2.2.4	Bestimmung der Zellproliferation	44
2.2.5	Bestimmung der Apoptoserate	46
2.2.6	Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	47
2.2.7	Isolation der Ribonukleinsäure (RNA), Reverse Transkription und in vitro-Transkription (IVT)	48
2.2.7.1	Isolation, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	48
2.2.7.2	First-Strand cDNA-Synthese.....	49
2.2.7.3	Second-Strand cDNA-Synthese.....	49
2.2.7.4	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation zur Aufreinigung des cDNA-Doppelstranges.....	49
2.2.7.5	Synthese der Biotin markierten cRNA (IVT – in vitro-Transkription).....	50
2.2.7.6	Aufreinigung, Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung des IVT-Produktes.....	51
2.2.7.7	Fragmentierung der cRNA.....	51
2.2.8	Affymetrix GeneChip® Arrays	52
2.2.8.1	High-density Oligonukleotid-Arrays.....	52
2.2.8.2	Eigenschaften des verwendeten HG-U133A GeneChips®.....	54
2.2.8.3	Hybridisierung der Proben auf die HG-U133A GeneChips®.....	54
2.2.8.4	Waschen und Färben der GeneChips®.....	55
2.2.8.5	Scannen der GeneChip® Arrays.....	55
2.2.8.6	Analyse und Normalisierung der GeneChip® Daten.....	55

2.2.9	Gesamt-RNA Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR.....	58
2.2.10	Herstellung und Transfektion der siRNA-Oligonukleotide.....	60
2.2.11	Lenti- (LV-siRNA) und Adenovirus (AdCMV) Vektoren, Herstellung und Infektion der Zellen.....	61
2.2.12	Gewinnung des Gesamtproteins der Zellen und Western Blot.....	63
2.2.12.1	Gewinnung der Proteinextrakte ganzer Zellen.....	63
2.2.12.2	Bestimmung der Konzentration des Gesamtproteins.....	63
2.2.12.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine.....	63
2.2.12.4	Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran.....	64
2.2.12.5	Blocken des Transfers.....	64
2.2.12.6	Inkubation mit dem Primären und Sekundären Antikörper.....	64
2.2.12.7	Detektion der Antikörperreaktion.....	65
2.2.13	Funktionelle Kinase Assays.....	66
2.2.13.1	c-Jun NH ₂ -Terminal-Kinase Assay.....	66
2.2.13.2	CDK1-Kinase Assay.....	67

3.	ERGEBNISSE	68-103
3.1	Effekt von Sulindac Sulfid auf DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen	68
3.1.1	Zahl der vitalen Prostatakarzinom-Zellen nimmt nach Sulindac Sulfid Gabe ab.....	68
3.1.2	Sulindac Sulfid hemmt die Proliferation von Prostatakarzinom-Zellen.....	70
3.1.3	Sulindac Sulfid induziert Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen.....	71
3.1.4	Sulindac Sulfid blockiert den Zellzyklus der Prostatakarzinom-Zellen in der G2-Phase.....	72
3.2	Gen-Expressionsprofil von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen nach Sulindac Sulfid Behandlung	74
3.2.1	RT-PCR und Western Blot der mRNA und Proteine der in der Gen- Expressionsanalyse differentiell exprimierten Gene.....	75
3.3	Rolle von GADD45 und JNK bei der Apoptose in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen nach Sulindac Sulfid Gabe	79
3.3.1	JNK vermittelt die Sulindac Sulfid-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom- Zellen.....	79
3.3.2	Die Aktivierung der JNK ist ein wichtiger Schritt für die Sulindac Sulfid vermittelte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen.....	80
3.3.3	GADD45 α und GADD45 γ kontrollieren die Sulindac Sulfid-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen.....	81
3.3.4	GADD45 α und GADD45 γ kontrollieren die Sulindac Sulfid vermittelte JNK Aktivierung und die damit verbundene Apoptose in Prostatakarzinom- Zellen.....	82
3.4	Sulindac Sulfid vermittelt einen G2/M Zellzyklus-Arrest in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen via GADD45α und GADD45γ	84

3.5	MDA-7/IL24 steuert die GADD45α und GADD45γ vermittelte Apoptose und den Eingriff in den Zellzyklus durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.....	86
3.5.1	Die alleinige MDA-7/IL24-Überexpression mit einem Adenovirus-Vektor reicht aus, um in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen Apoptose zu induzieren.....	86
3.5.2	MDA-7/IL24 vermittelt, zumindest teilweise, die Sulindac Sulfid induzierte Apoptose in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.....	87
3.5.3	MDA-7/IL24 induziert den Sulindac Sulfid vermittelten Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.....	88
3.5.4	MDA-7/IL24 vermittelt die GADD45 α - und GADD45 γ -Expression in DU145 Prostatakarzinom-Zellen.....	89
3.5.5	MDA-7/IL24 kontrolliert die Sulindac Sulfid-vermittelte GADD45 α - und GADD45 γ -Überexpression in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.....	91
3.6	Wirkung von Sulindac Sulfid auf Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen.....	93
3.6.1	Sulindac Sulfid führt zu einer gesteigerten Apoptoserate in verschiedenen Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen.....	93
3.6.2	Sulindac Sulfid führt zu einer erhöhten Expression von MDA-7/IL24, GADD45 α und GADD45 γ in verschiedenen Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen.....	95
3.7	Weitere nicht-steroidale Antiphlogistika induzieren Apoptose via MDA-7/IL24 Expression in Prostatakarzinom-Zellen.....	98
3.7.1	Apoptoseinduktion in Prostatakarzinom-Zellen durch verschiedene nicht-steroidale Antiphlogistika.....	98
3.7.2	MDA-7/IL24 Induktion in Prostatakarzinom-Zellen durch verschiedene nicht-steroidale Antiphlogistika.....	99
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	103

4.	DISKUSSION	104-113
4.1	Interpretation der Ergebnisse	104
4.2	Schlussfolgerungen	113
5.	ZUSAMMENFASSUNG	114
6.	ABSTRACT	115
7.	DANKSAGUNG	116
8.	LITERATURVERZEICHNIS	117-125
9.	CURRICULUM VITAE	126

1. EINLEITUNG

1.1 Krebserkrankungen

Die Bezeichnung "Krebs" (karkinoma [gr]) wurde im 5. Jahrhundert v. Chr. von Hippokrates eingeführt. Hippokrates verglich die langen Venen, die von manchen Brusttumoren ausgingen, mit den Beinen eines Krebses und schloss daraus, dass ein Tumor ein eigenständiges Wesen ist. Auch im Neuen Testament taucht das Wachstumsverhalten bösartiger Tumore sinnbildlich auf. Paulus warnt vor ketzerischen Widersachern, deren "Wort um sich frisst wie der Krebs" (2. Timotheusbrief, Kap. 2, Vers 17).

Heute bezeichnet man gemeinhin bösartige Geschwülste als Krebs, beziehungsweise Neoplasien oder Tumore. Im ICD-10 (International Classification of Diseases, Tenth Revision, 1992) gibt es in der Kategorie „bösartige Neoplasien“ 98 verschiedene Erkrankungstypen, die zum Beispiel aufgrund des beteiligten Gewebes noch weiter untergliedert werden, so dass dem Krankheitsbild „Krebs“ weit über 100 verschiedene Krankheitsformen zugeordnet sind. Zu den allgemeinen Merkmalen bösartiger Neubildungen zählen vor allem die Entdifferenzierung, eine ungehemmte, autonome Proliferation als Folge eines gestörten Gleichgewichtes zwischen kontrollierter Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelltod sowie invasives Wachstum und die Fähigkeit der Metastasenbildung.

Man unterscheidet entsprechend dem betroffenen Gewebstyp das von den epithelialen Zellen der Haut, Schleimhaut und Organe ausgehende Karzinom sowie die vom mesenchymalen Stütz- und Bindegewebe ausgehenden Sarkome, die entsprechend ihrer Herkunft aus Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fett-, oder faserbildendem Gewebe hervorgehen. Auch Zellen des blutbildenden und des lymphatisch-retikulären Systems, die nicht in einem Gewebeverband zusammenhängen, können zu Krebszellen entarten.

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland stellen Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Ein bedeutender Risikofaktor für das Auftreten einer Krebserkrankung ist ein fortgeschrittenes Lebensalter. Bei der immer weiter zunehmenden Lebenserwartung in den Industrieländern wird dieser auch weiterhin an Bedeutung gewinnen. Die Zahl der Krebsneuerkrankungen für das Jahr 1998 bezifferte sich auf etwa 350000, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind (Abbildung 1).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Karzinomen liegt das Prostatakarzinom bei der männlichen Bevölkerung mit 18,7% aller Neuerkrankungen auf dem ersten Platz. Magen- und Nierenkarzinome folgen mit 5,6% sowie 4,9% im unteren Drittel der Statistik. In der weiblichen Bevölkerung rangiert das Mammakarzinom mit 25,9% aller Neuerkrankungen mit großem Abstand auf dem ersten Platz. Magenkarzinome folgen hier ebenfalls im unteren Drittel der Statistik mit 5,1% aller Neuerkrankungen.

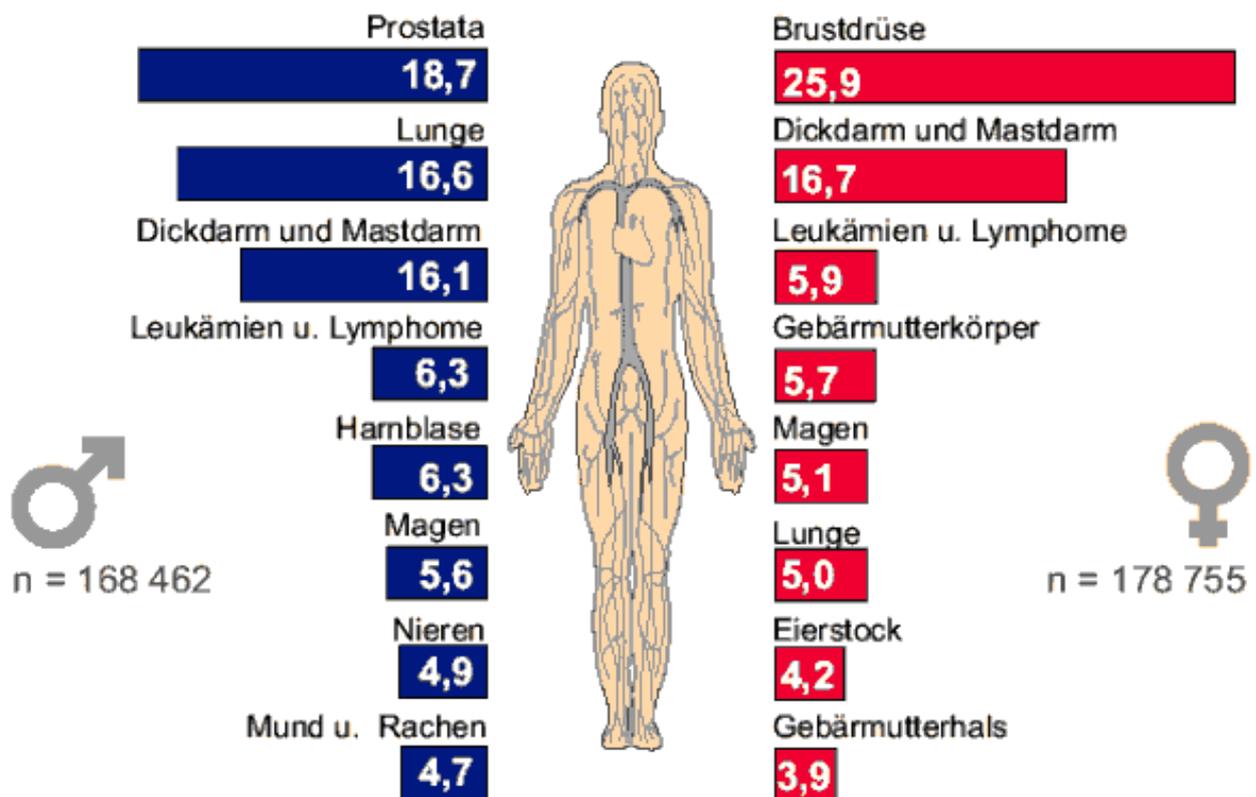


Abbildung 1. Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland, Neuerkrankungsfälle.

Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002

Bei den Krebserkrankungen mit der höchsten Mortalität (1998, Abbildung 2) ist bei Männern das Bronchialkarzinom mit 26,4% der krebsbedingten Todesfälle führend, gefolgt von Kolonkarzinomen mit 12,6%. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Karzinomen liegt das Prostatakarzinom auf Rang 3 mit 10,5% aller Todesfälle. Magen-, sowie Nierenkarzinome machen 6,5% sowie 3,4% aller Todesfälle aus. Bei den Frauen war 1998 mit einem Anteil von 17,1% das Mammakarzinom führende krebsbedingte Todesursache. Magenkarzinome folgen bei der weiblichen Bevölkerung mit 6,6%.

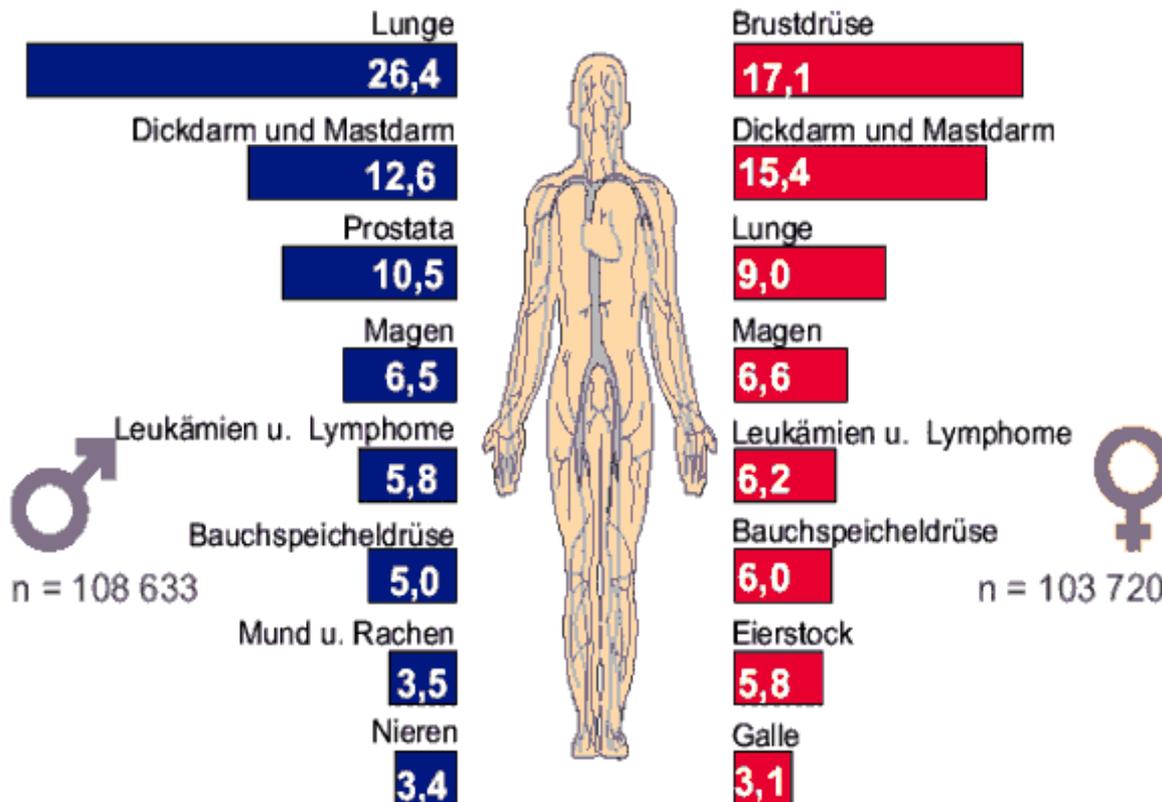


Abbildung 2. Prozentuale Anteile der häufigsten krebsbedingten Todesursachen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland.

Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002

In Deutschland steigt zwar die absolute Zahl der Todesfälle durch Krebs, die altersbereinigte Mortalität geht jedoch in Westdeutschland für Frauen seit den 50ern und Männer seit Mitte der 90er Jahre zurück. Ausnahmen bilden hier Anstiege der altersbereinigten Mortalität in einzelnen Diagnosegruppen, wie zum Beispiel Lungenkrebs bei Frauen. Dieser insgesamt rückläufige Trend ist vor allem auf verbesserte Diagnostik und eine stetige Verbesserung der Behandlungsmethoden zurückzuführen.

1.1.2 Ätiologie

Bei der Entstehung von Tumoren wirken mehrere Faktoren zusammen, daher spricht man von einer multifaktoriellen Genese. Die zwei Hauptsäulen sind angeborene genetische Faktoren sowie exogene Einflussfaktoren, die so genannten Kanzerogene. Kanzerogene wirken direkt auf die DNA einer Zelle und können die darin gespeicherten genetischen Informationen durch Mutation störend beeinflussen. Dies kann dann zu einer bösartigen Transformation der Zelle führen. Wichtige Faktoren die das Krebsrisiko erhöhen sind: 1. Chemische Kanzerogene (Tabakrauch, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, zytostatische Medikamente), 2. Energiereiche Strahlen (ionisierende und UV-Strahlen), 3. Viren (Hepatitis-B- und C-Viren, HPV), 4. Immundefekte (Immunsuppression durch Medikamente oder Bestrahlung, AIDS), 5. Ernährungsweise und andere spezifische Verhaltensweisen (Alkohol, geräucherte und fettreiche Nahrung, Kinderlosigkeit, späte erste Schwangerschaft).

1.1.3 Therapieoptionen bei Krebserkrankungen

Die kurative Behandlung zielt auf eine frühzeitige Beseitigung möglichst aller Tumorzellen aus dem Körper. Hauptmaßnahmen sind die chirurgische Entfernung des Tumors bis in das gesunde Gewebe unter Einbeziehung der regionalen Lymphknoten, die Strahlenbehandlung durch exakt auf die Geschwulst gerichtete, optimal dosierte ionisierende Strahlen (Röntgenbehandlung, Neutronen-, Radium- oder Kobaltbestrahlung, Einpflanzung von Radionukliden) und die Chemotherapie mit zytostatischen Mitteln, die die Vermehrung von Krebszellen hemmt.

Alle diese Therapien sind jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, so dass der Bedarf an wirksamen, gut verträglichen Therapeutika groß ist.

1.2 Nicht-steroidale Antiphlogistika

Als nicht-steroidale Antiphlogistika bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Substanzen, die allesamt Derivate organischer Säuren sind. Sie wirken antiphlogistisch, antirheumatisch, antipyretisch und analgetisch. Nach chemischen Kriterien können die gebräuchlichen nicht-steroidalen Antiphlogistika in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Salicylsäurederivate (Acetylsalicylsäure)
- Indenderivate (Sulindac)
- Anthranilsäurederivate (Flufenaminsäure)
- Pyrazolonderivate (Ibuprofen)

1.2.1 Allgemeiner Wirkmechanismus und Stoffwechsel nicht-steroidaler Antiphlogistika

Die meisten nicht-steroidalen Antiphlogistika vermitteln ihre Wirkung durch Blockierung der Cyclooxygenasen (COX-1 und/oder COX-2) mit konsekutiver Hemmung der Prostaglandinsynthese. Nicht-steroidale Antiphlogistika weisen eine gute orale Bioverfügbarkeit und eine hohe Plasmaproteinbindung auf. Als schwache Säuren besitzen sie eine hohe Penetrationsfähigkeit im sauren Milieu der Entzündungsgebiete. Sie werden von mikrosomalen Enzymen in der Leber biotransformiert, bevor sie glukuronidiert und sulfatiert ausgeschieden werden. Nicht-steroidale Antiphlogistika sollten nur für einen begrenzten Zeitraum angewendet werden. Längere Therapien sind aufgrund der Nebenwirkungen häufig nicht möglich. Je nach Affinität zu den unterschiedlichen Cyclooxygenasen unterscheiden sich die einzelnen Substanzen in ihren Nebenwirkungen. Dazu zählen vor allem Magen-Darm-Geschwüre, die durch verminderte Bildung von Prostaglandin E₂ mit erhöhter Säuresekretion und verringerter Schleimsekretion entstehen. Desweiteren Blutungen im Magen-Darm-Trakt durch Hemmung der Thromboxansynthese mit der Folge verminderter Plättchenaggregationen und verzögerter Blutgerinnung. Nephrotoxizität durch verminderte Bildung von vasodilatatorischem Prostaglandin E₂ und Prostacyclin sowie Asthma durch vermehrte Leukotrien-Synthese, welche eine starke bronchokonstriktorische Wirkung besitzen.

1.2.2 Übersicht über den Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika

Nicht-steroidale Antiphlogistika werden für zahlreiche Indikationen eingesetzt: Bei Schmerzen zur Analgesie, bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises als anti-inflammatorisches Agens und bei kardiovaskulären Erkrankungen zur Gerinnungshemmung als auch zur Prophylaxe von Embolien.

1.2.3 Bisheriger Einsatz und Erfolge nicht-steroidaler Antiphlogistika in der Krebstherapie

In der Vergangenheit wurden für immer mehr Medikamente aus der Gruppe nicht-steroidaler Antiphlogistika positive Effekte bei der Therapie und Prävention von Krebserkrankungen nachgewiesen (Umar et al., 2003; Harris et al. 2005). Eine Reihe von Studien lieferten Hinweise zu epidemiologischen Zusammenhängen zwischen der regelmässigen Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika, zum Beispiel Aspirin, und der verzögerten Entwicklung bestimmter Tumore, zum Beispiel Kolon-, Rektum- und Mammakarzinome (Altinoz and Korkmaz, 2004; Baron et al., 2003; Coogan et al., 1996; Luk, 1996; Rao et al., 2004; Sandler et al., 2003; Saji et al., 2004; Taketo, 1998a; Taketo, 1998b). Es sind in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt worden, in denen nicht-steroidale Antiphlogistika zur Behandlung und Prävention von Krebserkrankungen eingesetzt wurden. Deren Ergebnisse zwar uneinheitlich, aber dennoch mit positiver Tendenz waren (Dang et al., 2004; Milella et al., 2004; Reardon et al., 2005). Durch den kombinierten Einsatz von Sulindac Sulfid und Celecoxib beispielsweise, konnte die Zahl kolorektaler Polypen bei FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) Patienten deutlich reduziert werden (Giardiello et al., 2002; Phillips et al., 2002; Sinicrope et al., 2004). In einer weiteren Studie mit Celecoxib konnten bei Prostatakarzinompatienten die PSA (Prostata spezifisches Antigen) Spiegel reduziert oder zumindest auf ihrem Ausgangsniveau stabilisiert werden (Pruthi et al., 2004). In einer placebokontrollierten, randomisierten Studie konnte Sulindac Sulfid den PSA-Anstieg bei Prostatakarzinom Patienten deutlich verlangsamen (Goluboff et al., 2001). In den USA beginnen ausserdem verschiedene Phase-II Studien mit Sulindac Sulfid zur Behandlung bösartiger Tumore, so zum Beispiel in Kombination mit Docetaxel bei metastasierten Mammakarzinomen oder in Kombination mit Tamoxifen bei Desmoid-Tumoren. Kürzlich abgeschlossen - aber noch nicht publiziert - ist eine Phase-II Studie bei der die Kombination von Sulindac Sulfid und Hochdosis-Chemotherapie bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen

erprobt wurde. Auch in zahlreichen Tier- und in vitro Modellen mit Krebszelllinien bei denen nicht-steroidale Antiphlogistika eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Medikamente In-vivo und In-vitro starke antineoplastische Effekte aufweisen. So führte Sulindac Sulfid bei Prostatakarzinom-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate (Basler and Piazza, 2004; Lin and Nelson, 2003; Mann and DuBois, 2004; Peek, 2004; Riedl et al., 2004; Sabichi and Lippman, 2004). Celecoxib und Exisulind wurden erfolgreich zur Behandlung von Prostatakarzinomen im Mausmodell eingesetzt (Gupta et al., 2004; Narayanan et al., 2004) und Flurizan führte sogar zur Heilung von Mäusen mit intestinalen Tumoren (Wechter et al., 1997). Im Hamstermodell konnte zudem mit verschiedenen nicht-steroidalen Antiphlogistika die Ausbreitung von Pankreaskarzinomen unterdrückt werden (Drago and Murray, 1984; Liu et al., 2000; Molina et al., 1999; Nishikawa et al., 2004).

Es ist bekannt, dass zahlreiche Tumorzellen eine erhöhte COX-2-Expression aufweisen. Daher wurde zunächst angenommen, dass auch die anti-proliferativen Effekte der nicht-steroidalen Antiphlogistika durch Hemmung dieser Cyclooxygenase vermittelt werden (Basler and Piazza, 2004; Bishop-Bailey et al., 2002; Lin and Nelson, 2003; Mann and DuBois, 2004; Peek, 2004; Riedl et al., 2004; Sabichi and Lippman, 2004). In jüngster Zeit mehrten sich jedoch Hinweise, dass Signalwege unabhängig von COX-2 die entscheidende Rolle bei der Wirkung nicht-steroidaler Antiphlogistika auf Krebszellen spielen (Zha et al., 2004). Desweiteren wurden bei zahlreichen nicht-steroidalen Antiphlogistika auch Effekte auf die Angiogenese und Metastasenbildung entdeckt (Masferrer, 2001; Tuettenberg et al., 2005; Wang and Zhang, 2005). Es scheint jedoch in erster Linie die Fähigkeit der Apoptoseinduktion zu sein, über die nicht-steroidale Antiphlogistika ihre Krebshemmende Wirkung entfalten (Lin and Nelson, 2003; Mann and DuBois, 2004; Peek, 2004; Riedl et al., 2004; Sabichi and Lippman, 2004).

Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch weiterhin unverstanden. Viele der untersuchten nicht-steroidalen Antiphlogistika unterscheiden sich in ihren Affinitäten zu den verschiedenen Cyclooxygenasen und sind chemisch betrachtet gänzlich unterschiedliche Präparate. Auch zahlreiche Nebenwirkungen, lange bekannte (Magenblutungen und Thrombozytenaggregationshemmung), wie neu auftretende (erhöhtes Herzinfarktisiko bei Celecoxib), erschweren die klinische Erprobung dieser Substanzen. Die Identifikation der Gene und Proteine, welche die anti-Tumor-Effekte nicht-steroidaler Antiphlogistika vermitteln, könnte helfen spezifischere Medikamente zu entwickeln und die antineoplastische Wirkung der Präparate zu steigern.

1.3 Zellteilung

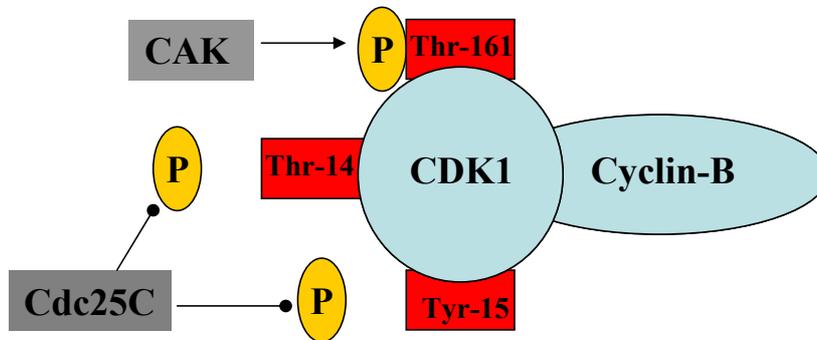
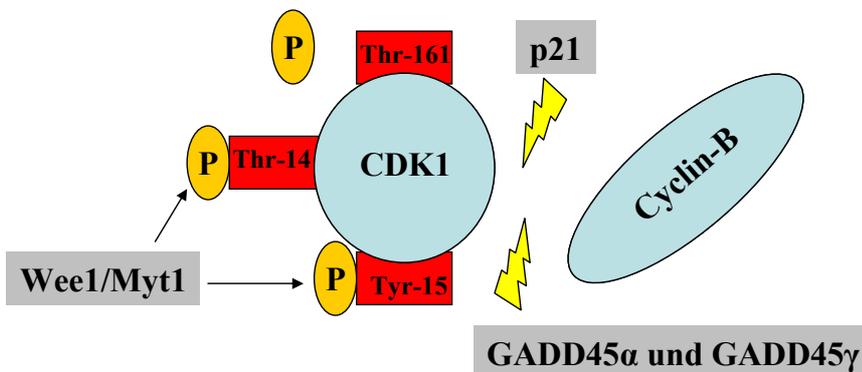
Die Zellteilung besteht aus zwei aufeinander folgenden Prozessen. Der Replikation der DNA und der anschließenden Verteilung der Chromosomensätze auf zwei Tochterzellen. Ursprünglich wurde daher die Zellteilung in lediglich zwei Phasen eingeteilt: Der Mitose und der darauf folgenden Interphase. Die Mitose selbst wird eingeteilt in:

- a.) Prophase: Das Erbmaterial beginnt sich zu ordnen und nach und nach werden die Chromosomen sichtbar
- b.) Metaphase: Die Chromosomen liegen homolog, paarweise in der Äquatorialebene zusammen
- c.) Anaphase: Die Chromosomenpaare werden getrennt. Von jedem Paar wird ein Chromosom vom Spindelfaserapparat zum einen Pol, das homologe Chromosom zum anderen Pol gezogen
- d.) Telophase: Die Chromosomen sind an den jeweiligen Polen

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Interphase wird nur eine Größenzunahme der Zelle beobachtet. Mit differenzierteren Methoden kann die Interphase in eine G1-, S- und G2-Phase unterteilt werden. In der G1-Phase bereitet die Zelle die Replikation der DNA vor, in der S-Phase findet diese dann statt und in der G2-Phase wird der Eintritt in die Mitose, auch M-Phase genannt, vorbereitet. Ruhende Zellen können aus der G1-Phase in eine sogenannte Ruhephase, G0-Phase, übertreten. Dies ist der Zustand den die meisten nicht-proliferierenden Zellen im menschlichen Körper einnehmen. Abbildung 3 zeigt die einzelnen Stadien des Zellzyklus.

CDKs mit Zyklinen (Cyclins) in Komplexen gebunden vorliegen (Arellano and Moreno, 1997; King et al., 1994). Das spezifische Cyclin-Protein für die CDK1 ist das Cyclin-B. Dieser CDK1/Cyclin-B Komplex bildet den G2/M-Checkpoint. Dieser wiederum unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen (Abbildung 4). Voraussetzung für die unabdingbare Cyclin-B-Bindung an die CDK1 ist eine Phosphorylierung an Threonin-161 (wird durch CAK (CDK7/Cyclin-H Komplex) vermittelt), (Jeffrey et al., 1995; Paulovich and Hartwell, 1995). Wee1 und Myt1 können die CDK1 an Tyrosin-15 und beziehungsweise oder Threonin-14 phosphorylieren und sie somit deaktivieren. Die Dephosphorylierung dieser beiden Stellen, verbunden mit einer Aktivierung der CDK1 und Progression des Zellzyklus obliegt Cdc25C (Lew and Kornbluth, 1996). Zusammengefasst bedeutet dies: CDK1 muss an Threonin-161 phosphoryliert und an Tyrosin-15 und Theronin-14 dephosphoryliert vorliegen, um aktiv zu sein und der Zelle die Progression von der G2-Phase in die Mitose zu ermöglichen. Ausserdem gibt es eine Reihe verschiedener CDK1-Inhibitoren (cyclin-kinase-inhibitor, CKI), bei denen zwei große Proteinfamilien unterschieden werden; die INK4-Familie und die Cip/Kip-Familie, wobei aus letzterer p21 (Waf1, Cip1) erwähnt werden soll. p21 kann durch Störung der CDK1/Cyclin-B Bindung die CDK1 deaktivieren und ein Fortschreiten der Zellteilung in der G2-Phase verhindern (Hengst et al., 1998). Ist die CDK1-Kinase aktiv, phosphoryliert sie bestimmte Zielproteine, insbesondere Histon-H1, was ebenfalls entscheidend für die Zellzyklusprogression ist.

Bei bösartigen Krebserkrankungen kann es durch Mutationen zu fundamentalen Änderungen der Regulationsmechanismen des Zellzyklus kommen. Kontrollinstanzen die in der gesunden Zelle Sorge tragen, dass sich keine Zellen mit defekten Chromosomensätzen oder sonstigen Schäden teilen können, greifen nicht mehr. Es kommt zu fortlaufender Teilung und somit zu ungehemmter Proliferation solch mutierter Zellen. Es wurden im Zusammenhang mit malignen Neoplasien Mutationen bei Genen die für CDKs, Cyclins, CKIs sowie für Checkpoint assoziierte Proteine kodieren festgestellt (Sheer and Squire, 1996).

A**G2/M-Checkpointkinase aktiv, Progression möglich**G2-Phase  Mitose**B****G2/M-Checkpointkinase deaktiviert, keine Progression möglich**G2-Phase   Mitose
 phosphoryliert

 dephosphoryliert


Stört direkt die CDK1/Cyclin-B-Bindung

Abbildung 4. Regulation der G2/M-Checkpoint-Kinase, CDK1/Cyclin-B.

A zeigt die CDK1-Kinase an Threonin-161 phosphoryliert, an Threonin-16 und Tyrosin-15 dephosphoryliert und im Komplex mit Cyclin-B. In dieser Konstellation ist die G2/M-Checkpoint-Kinase aktiv und eine Progression der Zelle von der G2-Phase in die Mitose ist möglich.

B zeigt die CDK-1-Kinase an Threonin-16 und Tyrosin-15 phosphoryliert sowie eine Unterbrechung der Cyclin-B-Bindung. In dieser Form ist die G2/M-Checkpoint-Kinase deaktiviert und die Zellen akkumulieren in der G2-Phase.

1.4 Apoptose

In den letzten zehn Jahren gab es einen beinahe exponentiellen Anstieg an Publikationen, die sich mit dem Prozess der Apoptose beschäftigten. Es wurden nahezu 30 neue Moleküle und Proteine beschrieben, die ausschließlich der Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose, dienen. Zudem wurden einer ganzen Reihe von Proteinen denen Aufgaben in der DNA Replikation, Transkription oder Reparaturvorgängen zugeschrieben wurden, ebenfalls mit der Apoptose in Verbindung gebracht. Erstmals wurde Apoptose 1972 von John Kerr beschrieben (Kerr et al., 1972). Er schilderte in diesem Artikel die einzelnen, wie programmiert ablaufenden Schritte des zellulären Sterbens. Verglichen mit der Nekrose schwillt die Zelle nicht an, sondern die Zellmembran schrumpft und es kommt wiederholt zur Bläschenbildung innerhalb der Zelle, bis diese schließlich in mehrere kleine Teile zerfällt.

Die Apoptose spielt nicht nur, wie zuerst vermutet, während der Embryogenese eine zentrale Rolle, sie ist vielmehr ein biologischer Basisprozess, der bis zum Lebensende eines Menschen weitergeht (Hinchliffe et al., 1981; Hurler et al., 1988; Oppenheim et al., 1985).

Eine der wichtigsten Aufgaben der Apoptose ist die Erhaltung des zellulären Gleichgewichtes, der so genannten Homeostase zwischen alten und neuen Zellen eines Organismus. Über fünf Billionen Zellen bilden schätzungsweise den menschlichen Körper. Manche dieser Zellen leben so lange wie der Organismus dem sie angehören: Nervenzellen beispielsweise, oder Skelettmuskelzellen, Zellen in der Niere oder die Zellen der Schweißdrüsen. Andere Zellen haben nur eine kurze Lebensdauer, weil sie sich schneller verbrauchen und durch neue ersetzt werden müssen: Zellen der Harnblase etwa existieren durchschnittlich 66 Tage, Hautzellen leben rund 20 Tage, die Zotten der Darmwand erneuern alle drei bis fünf Tage ihre Zellen und manche weiße Blutkörperchen überstehen nur wenige Minuten. Alle diese Zellen gehen nach Vollendung ihrer Tätigkeit in die Apoptose. Eine Deregulation der Apoptosesteuerung kann also dazu führen, dass Zellen akkumulieren die eigentlich nicht mehr gebraucht werden oder Zellen vorzeitig sterben, die noch wichtig für den Organismus gewesen wären. Eine gesteigerte Apoptose ist charakteristisch bei AIDS (Terai et al., 1991) und neurodegenerativen Krankheiten, wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Loo et al., 1993). Das Ausbleiben der Apoptose ist ein wichtiger pathophysiologischer Schritt bei der Entstehung von Tumoren (Strasser et al., 1990; Strasser et al., 1994), Autoimmunkrankheiten (Strasser et al., 1991) und viralen Infektionen mit Herpes- oder Adenoviren (Levine et al., 1993). Die vesikalen Fragmente apoptotischer Zellen werden von Makrophagen aufgenommen. Dabei kommt es weder zu einer inflammatorischen

Reaktion, noch zu einer Beeinträchtigung der phagozytierenden Zellen (Savill and Fadok, 2000).

1.4.1 Ablauf der Apoptose und Aufgabe der c-Jun NH₂-terminale Kinase

Die Zelle schrumpft zunächst aufgrund iso-osmotischer Ionenverluste aus dem Zytoplasma und verliert ihren Zell-Zell-Kontakt (Bortner et al., 1997; Gomez-Angelats et al., 2000; Hughes et al., 1997). Ferner rundet sie sich ab und löst sich von der perizellulären Matrix (Vaux, 1993). Das endoplasmatische Retikulum weitet sich und bildet Vesikel, die mit den Membranen verschmelzen (Bläschenbildung der Plasmamembran). Das Chromatin kondensiert am Rande des Zellkerns zu einer typischen halbmondförmigen Struktur (Pyknosis), (Wyllie et al., 1984) und das Zytoskelett kollabiert. Im nächsten Schritt werden Zellkern und Zytoplasma zu „apoptotic bodies“ fragmentiert (cell blebbing oder Karyorrhexis). Die apoptotischen Körperchen behalten ihre osmotischen Gradienten, so dass sie nicht lysiert werden (Fesus et al., 1991). Die apoptotischen Zellen werden nach Präsentation so genannter „eat me“-Signale von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert (Savill and Fadok, 2000). Biochemisch sind apoptotische Zellen durch die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials charakterisiert. Es kommt zu einer intrazellulären Ansäuerung der Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und der Externalisierung von Phosphatidylserin in der Membran-Doppelschicht. Während bei der gesunden Zelle Phosphatidylserin nur auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite vorkommt, findet bei der apoptotischen Zelle eine Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran statt. Bestimmte zelluläre Proteine werden einer selektiven Proteolyse unterzogen. Die Spaltung von Strukturproteinen, wie zum Beispiel Fodrin ist möglicherweise für die Reorganisation der zellulären Morphologie während der Apoptose verantwortlich. Im Zellkern werden spezifische calcium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke spalten. Die typische internukleosomale DNA-Fragmentierung ist eine Folge der Caspase-3 Aktivierung mit konsekutiver Aktivierung der Endonuklease CAD (Caspase-activated DNase), (Enari et al., 1998).

Die Steuerung des programmierten Zelltodes ist komplex. Ein möglicher Signalweg über den Apoptose in den Zellen ausgelöst werden kann, scheint über die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) zu verlaufen. Die JNK wird dabei durch die Mapkinasekinase 4 (MEKK4) aktiviert (Zerbini et al., 2004), in den Nukleus transloziert und phosphoryliert dort ihrerseits den

Transkriptionsfaktor c-Jun (Abbildung 5). Dieser aktiviert Caspase-3 und leitet so den programmierten Zelltod ein (Li et al., 2004).

1.5 Growth-Arrest-and-DNA-Damage-Inducible-Gene-45

GADD45 (Growth-Arrest-and-DNA-Damage-Inducible-Gene-45) ist ein Gen, welches durch DNA-Schäden, DNA-Schädel-Verursachende Agenzien oder anderen zellulären Stress induziert wird. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein multifunktionelles Protein mit einem Molekulargewicht von 18kD (drei Isoformen mit 80% homologen Sequenzen in der zentralen Region, GADD45 α (Fornace et al., 1989), GADD45 β (Abdollahi et al., 1991) und GADD45 γ (Beadling et al., 1993; Zhang et al., 1999), dem eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, der Apoptose und der Stabilisierung der Chromatinstruktur nachgewiesen wurde (Carrier et al., 1999; Hollander et al., 1999; Zerbini et al., 2004).

GADD45 kann beispielsweise durch p53 über verschiedene Signalwege aktiviert werden. Bei ionisierender Strahlung kommt es zu einer direkten Bindung von p53 an den GADD45-Promoter, während bei der Behandlung mit Methylmethoxysulfonat (MMS), UVC und bei Serumangel eine transkriptionelle Induktion von GADD45 durch p53 mittels direkter Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beobachten ist. Dabei wurde WT-1 (Wilms Tumor 1) als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Induktion von GADD45 durch p53 übermittelt (Zhan et al., 1999b). Auch wurde gezeigt das GADD45 in Tumorzellen nicht nur über p53, sondern auch zum Beispiel über NF- κ B in seiner Transkription gesteuert wird (Zerbini et al., 2004). Dabei führt eine Hemmung der erhöhten NF- κ B-Expression zu einer Aktivierung von GADD45 α und GADD45 γ mit konsekutiver Apoptoseinduktion in den Zellen. Ein deutlicher Hinweis, dass GADD45 eine zentrale Rolle bei der Regulation von Leben und Tod in der Zelle zuteil kommt.

1.5.1 GADD45 und Apoptose

Die Funktion von GADD45 bei der Auslösung von Apoptose wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Hollander et al. beobachteten 1999 eine GADD45-unabhängige Apoptose in Mauszellen (Hollander et al., 1999), während verschiedene andere Arbeiten einen Zusammenhang zwischen Apoptose und GADD45 in ähnlichen Modellen zeigten (Sheikh et al., 2000). Es wurde mittlerweile gezeigt, dass GADD45 über eine Aktivierung der JNK Apoptose auslösen kann (Abbildung 5), (Zerbini et al., 2004).

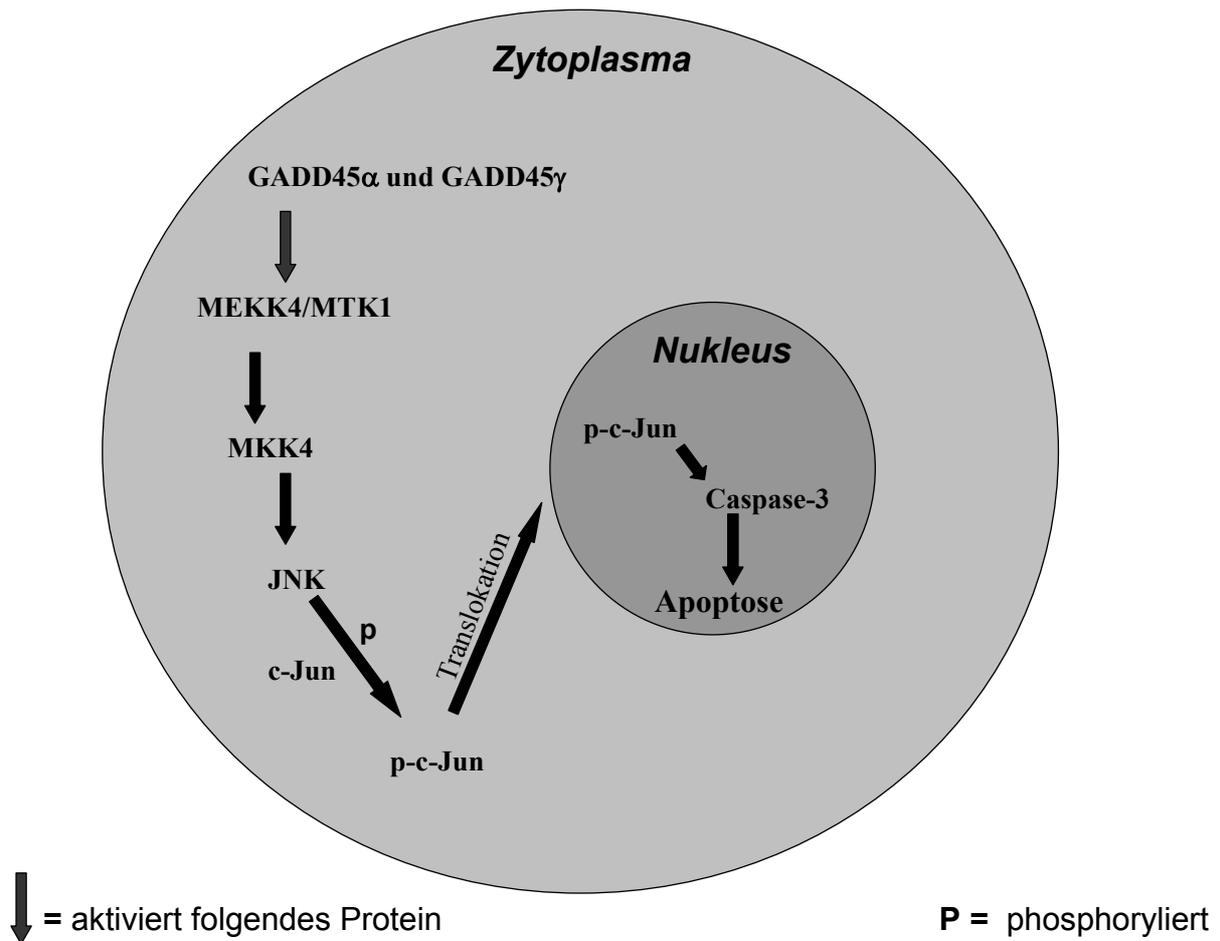


Abbildung 5. Apoptoseinduktion über die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) via GADD45 α und GADD45 γ .

GADD45 α und GADD45 γ aktivieren die MEKK4/MTK1 Mapkinasekinase, was wiederum über MKK4 vermittelt zu einer Aktivierung der JNK führt. Diese phosphoryliert dann c-Jun, welches daraufhin in den Nukleus transloziert wird und dort über eine Aktivierung von Caspase-3 Apoptose induziert.

1.5.2 GADD45 und Zellzyklus

GADD45 spielt sowohl beim G1- als auch beim G2-Phasen-Kontrollpunkt eine Rolle (Sheikh et al., 2000).

Im G1-Phasen-Kontrollpunkt hat GADD45 eine nachgeschaltete Funktion und wird von p53 aktiviert und kann somit keinen G1-Arrest unabhängig von p53 auslösen. Im G2-Phasenkontrollpunkt kann GADD45 zum Einen über eine Aktivierung von p21 eine Störung der CDK1/Cyclin-B-Bindung herbeiführen, zum Anderen den CDK1/Cyclin-B Kinasekomplex direkt Zerstören (Abbildung 4) und so über beide Wege einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase herbeiführen (Jin et al., 2000).

1.6 Melanoma-Differentiation-Associated-Gene-7 / Interleukin 24

Ein neues, bei Krebszellen proliferationshemmendes Gen, ist das zuerst in humanen Melanom-Zellen HO-1 entdeckte, Melanoma-Differentiation-Associated-Gene-7 / Interleukin 24 (MDA-7/IL24), (Jiang et al., 1995; Jiang et al., 1996; Sarkar et al., 2002b; Su et al., 2003). Es zeigte sich, dass Melanom-Zellen die mit IFN- β oder Mezerin behandelt wurden, sich ausdifferenzierten und ein Proliferationsstop erreicht wurde. Dies ging mit einer transkriptionellen Erhöhung von MDA-7/IL24 einher.

Aufgrund struktureller Verwandtschaft und der Interaktion mit dem IL20-Rezeptorkomplex wurde MDA-7/IL24 der IL-10-Familie, der Zytokine zugeordnet (Huang et al., 2001; Kotenko, 2002; Wang et al., 2002).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass MDA-7/IL24 bei einer ganzen Reihe von Karzinomzellen zur Apoptoseinduktion führen kann, ohne dabei Zellen gesunden Ursprungsgewebes anzugreifen (Lebedeva et al., 2003; Su et al., 2003). Es mehren sich zudem Hinweise, dass MDA-7/IL24 Einfluss auf den Zellzyklus in der G2-Phase nehmen kann (Saito et al., 2005). Aufgrund dieser selektiven Effekte auf Karzinomzellen wurden bereits klinische Phase-I Studien mit replikations-inkompetenten Adenoviren, die MDA-7/IL24 exprimieren, durchgeführt (Mhashilkar et al., 2001a; Mhashilkar et al., 2001b).

1.7 Fragestellung

Welche molekulargenetischen Signalkaskaden liegen der hemmenden Wirkung von Sulindac Sulfid auf Prostatakarzinom-Zellen zugrunde und lassen sich diese auf andere Karzinomentitäten übertragen? Können diese Signalwege auch von anderen, strukturell unterschiedlichen nicht-steroidalen Antiphlogistika aktiviert werden und gibt es eventuell gar einen universellen Signalweg über den nicht-steroidale Antiphlogistika ihr Krebs-Hemmenden Effekte ausüben?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Reagenzien, Materialien und Geräte

0,25% Trypsin mit 1 mM EDTA	Gibco BRL, Rockville, MD, USA	No. 25200-056
10xPBS (Phosphat gepuffertes NaCl)	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 161-0780EDU
10xTris Buffered Saline	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 170-6435EDU
10xTris/Glycine Buffer	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 161-0734EDU
1xTAE Puffer	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA	No. 9869
3 M Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, D	No. S7899
96-loch Platten für RT-PCR	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA	No. MLP-9651
Advantage 2 PCR Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA	No. K1910-1
Agarose	Sigma-Aldrich, München, D	No. A5939
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, München, D	No. A2706
ATP	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 9804
Fettfreies Milchpulver	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 170-6404
BSA, Bovines-Serum-Albumin	Gibco BRL, Rockville, MD, USA	No. 15561-020
Zellyse-Puffer (10X)	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 9803
cRNA Fragmentierungs-Puffer	Ambion, Austin, TA, USA	No. 8740
DEPC-Wasser	Ambion, Austin, TA, USA	No. 9920
DMSO	Sigma-Aldrich, München, D	No. 8418
DNA Ligase	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	No. M0208S
DNA Polymerase-Mix	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	No. M0267S
dNTP-Mix	Promega, Madison, WI, USA	No. U1515
DTT	Sigma-Aldrich, München, D	No. 78152
ECL Advance Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiberg, D	No. RPN2135
EDTA	Sigma-Aldrich, München, D	No. E7889
ELISA-Lese-Gerät Victor 2	Perkin-Elmer, Milano, I	No. 1420
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D	No. 5407 000.317
Eppendorf MasterCycler®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D	No. 5332 000.014
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, D	No. R8382
Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich, München, D	No. E8751

Glykogen	Ambion, Austin, TA, USA	No. 9510
HighYield RNA Transcript Labeling	Enzo, Farmingdale, NY, USA	No. 900182
JNK Inhibitor II	EMD Biosciences, San Diego, CA, USA	No. 420119
MES Free Acid Monohydrate	Sigma-Aldrich, München, D	No. M5287
MES Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, D	No. M3885
Methanol	Sigma-Aldrich, München, D	No.M1775
CDK1-Substrat-Cocktail	Upstate, Charlottesville, VA, USA	No. 20-125
NaCl, RNase und DNase frei	Ambion, Austin, TA, USA	No. 9760
Natriumzitat	Sigma-Aldrich, München, D	No. W302600
PBS (Phosphat gepuffertes NaCl)	Gibco BRL,Rockville, MD, USA	No. 10010-015
Phase-Lock-Gel-Tubes	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D	No. PI-188233
Phenol	Ambion, Austin, TA, USA	No. 9732
Photometer DU600	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA	No. n/a
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, München, D	No. P4170
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, D	No. P2714-1BTL
Protein Standard high range	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 161-0303
Protein Standard low range	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 161-0304
QIAquick PCR-Reinigungs-Kit	Qiagen, Hilden, D	No. 28104
Reaktions-Puffer-A	Promega, Madison, WI, USA	No. M1665
Ready Gel Tris-HCl Gel 10%	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 161-1101
RNase A	Worthington Bio., Lakewood, NJ, USA	No. LS005649
RNase H	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	No. M0297S
SDS, Sodium Dodecyl Sulphat	Promega, Madison, WI, USA	No. H5113
SYBR Green II	FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA	No. S7586
T7-(dT)24 Primer Mix	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	No. S1273S
Taq DNA Polymerase in Puffer A	Promega, Madison, WI, USA	No. M1868
Tris-HCL	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	No. 77-86-1
TRIzol Reagenz	Gibco BRL,Rockville, MD, USA	No. 15596-018
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, München, D	No. 93595-50ML
Tween20	Sigma-Aldrich, München, D	No. E28320
Verschlusskappen für 96-loch Platten	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA	No. TCS-0803
Vibrationsrüttler	Viktor Recker, Berlin, D	No. n/a
Wasser, PCR-Grade	Bio Whittaker, Rockland, ME, USA	No. 16-001Y
Western Blot Elektrophorese-Modul	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 165-3302EDU
Western Blot Transfer-Kammer	Bio Rad, Hercules, CA, USA	No. 170-3930EDU
Zentrifuge	Hereaues, Newtown, CT, USA	No. 564736473

2.1.2 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)

*Alle NSAIDs von Sigma-Aldrich, München, D, außer *LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA*

Wirkstoff:	Sulindac Sulfid	Sulindac Sulfon
Name:	Clinoril	Clinoril, Exisulind
Konzentration:	50 µM	200 mM
Formel:	C ₂₀ H ₁₇ FO ₂ S	C ₂₀ H ₁₇ FO ₄ S
No.	S-3131	S-1438
Anmerkung:	Derivate von Sulindac sulfoxid (Clinoril), Merck, Darmstadt	
Name:	Aspirin	Diclofenac
Wirkstoff:	Azetylsalicylsäure	Diclofenac Natrium Salz
Konzentration:	5 mM	200 mM
Formel:	C ₉ H ₈ O ₄	C ₁₄ H ₁₀ C ₁₂ NNaO ₂
No.	A2093	D6899
Name:	Ibuprofen	Meloxicam
Wirkstoff:	a-Methyl-4-(isobutyl)phenylazetat	4-Hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxamid 1,1-dioxid-Natrium
Konzentration:	200 mM	40 mM
Formel:	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₄ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ₂ Na
No.	I7905	M3935
Name:	Naproxen	NS-398
Wirkstoff:	6-Methoxy-a-methyl-2-naphthalenazetat	N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methansulfonamid
Konzentration:	200 mM	200 mM
Formel:	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅ S
No.	N8280	N194
Name:	Ebselen	Acetaminophen (Paracetamol)
Wirkstoff:	2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-1	N-Acetyl-4-aminophenol
Konzentration:	50 mM	1 mM
Formel:	C ₁₃ H ₉ NOSe	C ₈ H ₉ NO ₂
No.	E3520	A3035
Name:	Flurbiprofen	Flufenaminsäure
Wirkstoff:	(±)-2-Fluoro-a-methyl-4-biphenylazetat	N-3(-[Trifluoromethyl]phenyl)anthranil Säure
Konzentration:	20 nM	200 mM
Formel:	C ₁₅ H ₁₃ FO ₂	C ₁₄ H ₁₀ F ₃ NO ₂
No.	F8514	F9005

Name:	Celebrex*	Finasterid*
Wirkstoff:	Celecoxib	Finasterid
Konzentration:	50 mM	50 mM
Formel:	$C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$	$C_{23}H_{36}N_2O_2$
No.	89437-26-7	98319-26-7

2.1.3 Zelllinien und Medien

Humane Prostatakrebszellen

Name:	CW22 (22RV1)
Ursprung:	androgen-sensitives Karzinom
Medium:	40% RPMI 1640 + 40% Dulbecco's MEM + 20% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 438
Referenzen:	Cancer Res (54); 1994 Wainstein et al.

Name:	LNCAP
Ursprung:	supraklavikuläre Lymphknoten Metastase bei androgen-sensitivem Karzinom
Medium:	85-90% RPMI 1640 + 10-15% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC256
Referenzen:	Cancer Res (43); 1983 Horoszewicz et al.

Name:	DU145
Ursprung:	ZNS Metastase eines Prostatakarzinoms
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 261
Referenzen:	Models for Prostate Cancer (na.); 1980 Mickey et al.

Name:	PC-3
Ursprung:	Knochenmetastase eines Grad IV. Karzinoms
Medium:	45% Ham's F12 + 45% RPMI 1640 + 10% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 465
Referenzen:	Invest Urol (17); 1979 Kaighn et al.

Name:	CW19
Ursprung:	Prostatakarzinom
Medium:	40% RPMI 1640 + 40% Dulbecco's MEM + 20% FBS
Bestellnummer:	Zur Verfügung gestellt von Dr. Steven P. Balk, BIDMC, HMS, Boston, MA, USA
Referenzen:	keine Angaben

Humane Brustkrebszellen

Name:	MDA231 [MDA-MB-231]
Ursprung:	Pleurametastase bei Adenokarzinom
Medium:	90% Leibovitz's L-15 mit 2 mM L-glutamin, 10% FBS
Bestellnummer:	ATCC HTB-26
Referenzen:	Cancer Res (40); 1980 Brinkley et al.

Name:	MCF-7 [MCF7]
Ursprung:	Pleurametastase bei Adenokarzinom, Östrogensensitiv
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% FBS + 1 mM + Natriumpyruvat + 10 µg/ml bovines insulin
Bestellnummer:	DSMZ ACC 115
Referenzen:	J Natl Cancer Inst (51); 1973 Soule et al.

Name:	SKBR3 [SK-BR-3]
Ursprung:	Pleurametastase bei Adenokarzinom
Medium:	90% McCoy's 5a mit 1,5 mM L-glutamin, 10% FBS
Bestellnummer:	ATCC HTB-30
Referenzen:	Plenum Press (na) 1975; Fogh et al.

Name:	MDA453 [MDA-MB-453]
Ursprung:	CMP-Syndrom
Medium:	90% Leibovitz's L-15 + 10% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 65
Referenzen:	In vitro (14) 1978; Cailleau et al.

Name:	MDA435 [MDA-MB-435]
Ursprung:	Brüstdrüsenkarzinom
Medium:	90% Leibovitz's L-15 + 10% FBS
Bestellnummer:	zur Verfügung gestellt von Dr. Luiz F. Zerbini, BIDMC, HMS, Boston, MA, USA
Referenzen:	keine Angaben

Humane Magenkrebszellen

Name:	Kato [Kato III]
Ursprung:	supraklavikuläre und axilläre Lymphknoten Metastasen
Medium:	80% IMDM ,20% FBS
Bestellnummer:	ATCC HTB-103
Referenzen:	Jpn J Exp Med (48); 1978 Sekiguchi et al.

Name:	SNU1
Ursprung:	Adenokarzinom der Magenschleimhaut eines Patienten
Medium:	90% RPMI1640, 10% Hitzeinaktiviertes FBS
Bestellnummer:	KCLB 00001
Referenzen:	Cancer Res (50) 1990; J Nat'l Cancer Inst (83) 1991

Name:	SNU16
Ursprung:	Adenokarzinom der Magenschleimhaut einer Patientin
Medium:	90% RPMI1640, 10% Hitzeinaktiviertes FBS
Bestellnummer:	KCLB 00016
Referenzen:	Cancer Res (50) (1990) J Nat'l Cancer Inst (83); 1991

Name:	NCI [NCI-N87]
Ursprung:	Lebermetastase
Medium:	90% RPMI 1640 mit 2 mM L-glutamin, 1,5 g/L Natriumbikarbonat 4,5 g/L Glukose, 10 mM HEPES und 1,0 mM Natriumpyruvat, 10% FBS
Bestellnummer:	ATCC CRL-5822
Referenzen:	Cancer Res (50); 1990 Park Jet al.

Name:	AGS
Ursprung:	Adenokarzinom der Magenschleimhaut
Medium:	90% Ham's F12K mit 2 mM L-glutamin, 1,5 g/L Natriumbikarbonat, 10% FBS
Bestellnummer:	ATCC CRL-1739
Referenzen:	New Drugs (1); 1983 Barranco et al.

Humane Nierenkrebszellen

Name:	Caki [Caki-1]
Ursprung:	klarzelliges Nierenkarzinom
Medium:	90% McCoy's 5A + 10% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 142
Referenzen:	J Natl Cancer Inst (58); 1977 Fogh et al.

Name:	A704 [A-704]
Ursprung:	Adenokarzinom
Medium:	90% MEM (EBSS) + 10% FBS + 2mM L-Glutamine + 1mM Natriumpyruvat + 1% nicht-essentielle Aminosäuren
Bestellnummer:	ECACC No. 93020513
Referenzen:	J Natl Cancer Inst (51); 1973

Name:	ACHN
Ursprung:	Adenokarzinom
Medium:	90% MEM, 2 mM L-glutamin, 1.5 g/L Natriumbikarbonat 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 1,0 mM Natriumpyruvat, 10% FBS
Bestellnummer:	ATCC CRL-1611
Referenzen:	keine Angaben

Name:	A498
Ursprung:	Karzinom Zellen, nicht näher bezeichnet
Medium:	90% MEM (mit Earle's Salzen) + 10% FBS
Bestellnummer:	DSMZ ACC 55
Referenzen:	J Natl Cancer Inst (51); 1973 Giard et al.

Name:	UOK [UOK-121LN]
Ursprung:	Karzinomzellen, nicht näher bezeichnet
Medium:	90% McCoy's 5A + 10% FBS
Bestellnummer:	zur Verfügung gestellt von Dr. Luiz F. Zerbini, BIDMC, HMS, Boston, MA, USA
Referenzen:	keine Angaben

Kontrollzellen, keine bösartigen Tumore

Name: **MS-1 (MILE SVEN 1)**
Ursprung: Mus Musculus; Langerhanszellen, Pankreas, gesund
Medium: 95 % DMEM mit 4 mM L-glutamin, 1,5 g/L Natriumbikarbonat
4,5 g/L Glukose, 5% FBS
Bestellnummer: ATCC CRL-2279
Referenzen: PNAS USA (94); 1997 Arbiser et al.

Name: **F12 [MCF-12F]**
Ursprung: menschliches Brustdrüsengewebe, gesund
Medium: 95%, 1:1 Mixtur von DMEM und Ham's F12, mit 0,04 mM Ca²⁺
20 ng/ml EGF, 100 ng/ml Cholera Toxin, 0,01 mg/ml Insulin
500 ng/ml Hydrokortison, 5% Chelex-behandeltes Pferdeserum
Bestellnummer: ATCC CRL-10783
Referenzen: US Patent No. 5,206,165 vom 27. April 1993 Pauley et al.

Name: **293 [HEK293]**
Ursprung: Nierenzellen, kein Karzinomursprung
Medium: 90 % MEM mit 2 mM L-glutamine, Earle's BSS mit 1.5 g/L Natriumbikarbonat
0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1.0 mM Natrumpyruvat
10% Hitzeinaktiviertes Pferdeserum
Bestellnummer: ATCC CRL-1573
Referenzen: PNAS USA (93) ; 1996 Xie et al.

Adressen der Zelllinienbanken

ATCC

American Tissue Culture Collection, LGC Promochem

Email: atcc.de@lgcpromochem.com, URL: <http://www.atcc.org>

DSMZ

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

Email: dsmzmutz@gbf-braunschweig.de, URL: <http://www.dsmz.de>

ECACC

ECACC European Collection of Cell Cultures

Email: ecacc@camr.org.uk, URL: <http://www.ecacc.org>

KCLB

Korean Cell Line Bank

Email : kclb@cellbank.snu.ac.kr, URL: <http://cellbank.snu.ac.kr/index.htm>

Kulturmedien

Bezug über die Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

RPMI 1640	No. 21875042
Leibovitz's L-15	No. 41300021
IMDM Iscove's modified Dulbecco's medium	No. 12440046
McCoy's 5a	No. 36600-021
MEM Minimum Essential Medium	No. 10370047
DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium	No. 1195032
Ham's F12	No. 11765013
Ham's F10	No. 12390027

Zusätze zu den Kulturmedien

*Bezug über die Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D, außer * über Sigma-Aldrich, München, D*

FBS, Fetales Rinder Serum	No. 16000044
Pferdeserum	No. 16050122
L-Glutamin	No. 0855113SA
Natriumpyruvat	No. 8901840
Natriumbikarbonat	No. 11810033
Bovines Insulin	No. 13007018
EGF, Epidermal Growth Factor	No. 13247051
Nicht-essentielle Aminosäuren	No. 11140
Cholera-Toxin	No. 13170014
Hydrokortison	No. H5885-1VL*
Ca ²⁺	No. 03379-1EA*
Penicillin und Streptomycin	No. 15070BLK

2.1.4 RT-PCR Primer

GADD45 α

sense 5'-GCCTGTGAGTGAGTGCAGAA-3'; antisense 5'-ATCTCTGTCGTCGTCCTCGT-3'

GADD45 β

sense 5'-TCGGATTTTGCAATTTCTCC-3'; antisense 5'-GGATGAGCGTGAAGTGGATT-3'

GADD45 γ

sense 5'-CTGCATGAGTTGCTGCTGTC-3'; antisense 5'-TTCGAAATGAGGATGCAGTG -3'

MDA-7/IL24

5'-CAAAGCCTGTGGACTTTAGCC-3'; antisense 5'-GAATAGCAGAAACCGCCTGTG-3'

humane GAPDH (hGAPDH)

sense 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'; antisense 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide für Transfektionen

GFP (grün-fluoreszierendes-Protein)	siRNA 5'-GCAAGCTGACCCTGAAGTTC-3'
GADD45α	siRNA 5'-AACGTCGACCCCGATAACGTG-3'
GADD45γ	siRNA 5'-AACGAGGACGCCTGGAAGGAT-3'
MDA-7/IL24	siRNA 5'-AACTTTGTTCTCATCGTGTCA-3'

2.1.6 siRNA-Konstrukte für die Lentivirus Herstellung

GADD45 α
5'-CTGTCTAGACAAAAACGTCGACCCCGATAACGTGTCTCTTGAACACGTTAT
CGGGGTCGACGGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'

GADD45 γ
5'-CTGTCTAGACAAAAACGAGGACGCCTGGAAGGATTCTCTTGAATCCTTCCA
GGCGTCCTCGGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'

MDA-7/IL24
5'-CTGTCTAGACAAAAAACTTTGTTCTCATCGTGTGCATCTCTTGAATGGGTCCAC
ATTCATCAACGGGGATCTGTGGTCTCATACA-3'

2.1.7 Antikörper für Western Blots

Primäre Antikörper

GADD45 α	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	No. sc-792
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Rabbit-IgG	
GADD45 β	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	No. sc-8776
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Goat-IgG	
GADD45 γ	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	No. sc-8778
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Goat-IgG	
p-c-Jun	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 9261
Verdünnung: 1:1000;	Isotyp: Rabbit-IgG	
Cdc25C	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 9522
Verdünnung: 1:1000;	Isotyp: Rabbit-IgG	
Cyclin B1	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 4135
Verdünnung: 1:500,	Isotyp: Mouse-IgG	
Cyclin B2	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	No. sc-5235
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Goat-IgG	
p21	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 2946
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Mouse-IgG	
p-Histon-H1	Upstate, Charlottesville, VA, USA	No. 06-597
Verdünnung: 1:500;	Isotyp: Rabbit-IgG	

Sekundäre Antikörper

Anti-Rabbit-HRP	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. 7074
Verdünnung: 1:1000	Isotyp: Goat-IgG	
Anti-Goat-HRP	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	No. sc-2384
Verdünnung: 1:1000	Isotyp: Bovine-IgG	
Anti-Mouse-HRP	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	No. sc-2371
Verdünnung: 1:1000	Isotyp: Bovine-IgG	

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in ihren spezifischen Medien in Brutschränken (HERAcell 150, Heraeus, Newtown, CT, USA, No. 51022872) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Petrischalen mit Gas-permeablen Verschlüssen gewährleisteten den Gasaustausch. Adhärente Zellen wurden nach einem kurzen Waschvorgang mit PBS (Phosphat-Buffered-Saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄) durch dreiminütige Inkubation bei 37°C mit 0,1% Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Petrischalen abgelöst. Für die Experimente wurden nur Zellen verwendet, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

2.2.2 Behandlung der Zelllinien mit nicht-steroidalen Antiphlogistika

Alle Substanzen der verwendeten nicht-steroidalen Antiphlogistika wurden zur Herstellung einer Stammlösung in DMSO oder Ethanol gelöst und in den bereits weiter oben angegebenen Konzentrationen zu den Zellen hinzugegeben. Behandelt wurde immer, soweit nicht anders im Text spezifiziert, für die Dauer von 24 Stunden. Um DMSO- oder Ethanol-Effekte auf die Zellen auszuschliessen, wurden die Kontrollen mit den entsprechenden DMSO-, beziehungsweise Ethanol-Konzentrationen behandelt. Es wurde mit definierten Zellzahlen gearbeitet, die Zellzahl wurde mit einem Neubauer-Zytometer bestimmt, siehe 2.2.3.

2.2.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Zytometrie

Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Abalm Medizinbedarf, Dilsberg, D, No. BRA 717806) bestimmt. Als Farbstofflösung diente Trypanblau (0,5% in physiologischer Kochsalzlösung, Sigma-Aldrich, München, D, No. 93595-50ML), welches die Beurteilung der Zellviabilität erlaubt. Vitale Zellen schließen den Farbstoff aus und imponieren unter dem Mikroskop ungefärbt, während tote Zellen die Fähigkeit der Trypanblauexklusion aufgrund von geschädigten Zellmembranen verloren haben und blau erscheinen. Die zu zählende Zellsuspension wurde in einem definierten Mischungsverhältnis (1:5 Verdünnung) in Trypanblau aufgenommen, gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die lebenden Zellen in allen vier Kammerquadranten wurden bei einhundert- bis einhundertsechzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen, D) gezählt. Der Mittelwert dieser Zählung wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert.

2.2.4 Bestimmung der Zellproliferation

Es wurde der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA, No. G3582) Kit verwendet. Der Assay verwendet ein Tetrazolium basiertes Substratgemisch (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) und phenazine ethosulfate, PES) (Owen Substanz) welches von viablen, proliferierenden Zellen zu einem farbigen Formazan Produkt reduziert wird. Die Umwandlung läuft über NADH/NADPH-abhängige Dehydrogenase-Enzyme aktiver Zellen (Berridge and Tan, 1993). Der Farbumschlag kann dann bei 490 nm Wellenlänge quantifiziert werden. Die Menge des entstandenen Formazan Produktes ist direkt proportional zur Anzahl viabler, proliferierender Zellen. Zur Durchführungen dieses Experimentes wurden die zu untersuchenden Zellen wie oben bereits beschrieben, gewaschen und mit Trypsin gelöst. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension auf Mikrotiterplatten verteilt. Hinzugegeben wurden dann 20 µl der MTS-Lösung und das Gemisch dann bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 1-4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Intensität des Farbumschlages gemessen und quantifiziert. Um den Hintergrund auszugleichen, der durch das verwendete Medium entstehen kann, wurden als Leerkontrolle 100 µl des jeweiligen Mediums ohne Zellen

hinzugegeben und mit MTS-Substrat versetzt. Dieser Hintergrundwert wurde dann von den anderen Werten subtrahiert.

2.2.5 Bestimmung der Apoptoserate

Eukaryote Zellen können nach morphologischen und biochemischen Kriterien auf zweierlei Wegen den Tod finden. Zum Einen durch Apoptose, zum Anderen durch Nekrose. Die Nekrose ist charakterisiert durch eine Zunahme der Permeabilität der Zellmembran, gefolgt von einem gesteigerten Wassereinstrom in die Zellen, welche anschwellen und innerhalb weniger Minuten platzen. Bei der Apoptose hingegen, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, kommt es erst zu Ausstülpungen der Zellmembran (Zeiosis), Kondensation des Zytoplasmas und zu einer Aktivierung verschiedener endogener Endonukleasen und Proteasen. Es kommt also vor der Zerstörung der Zellmembran bereits zu einer Degradation der Kern-DNA, welche normalerweise eng mit den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 verbunden ist.

Um die Apoptose der Zellen zu messen, wurde der Cell Death Detection ELISApplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kit eingesetzt. Der Assay basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immuno-Assays mit monoklonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Kern-Histone. Nachdem die Zellen, entsprechend ihrer Spezifikationen behandelt waren, wurden jeweils 10^4 dieser Zellen gewonnen und für den Assay eingesetzt. Zur Untersuchung der Apoptose wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation mit 200xg für 10 Minuten), der Überstand verworfen und anschließend 200 μ l Lyse-Puffer (im Kit enthalten, „Lysis-Buffer“) zu dem Pellet hinzugegeben. Das Gemisch wurde dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zell-Lyse wurden 20 μ l des Überstandes pipettiert und auf die Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Hinzu wurden 80 μ l des Immunoreagens (Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD Antikörper im 1:1 Mischungsverhältnis) gegeben und das Ganze dann für 2 Stunden auf einem Schüttler (300 rpm) bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung entfernt und die Mikrotiterplatte wurde 3x mit dem Inkubations-Puffer (im Kit enthalten, „Incubation-Buffer“) gewaschen. Nun wurden 100 μ l der ATBS-Lösung (im Kit enthalten) in die einzelnen Löcher der Mikrotiterplatte pipettiert und der Ansatz für 15 Minuten auf einem Schüttler (300 rpm) bei Zimmertemperatur inkubiert. Das ATBS wird von den gebundenen Antikörpern, deren Menge von der Anzahl apoptotischer Zellen abhängt, in einer Farbreaktion umgesetzt, die bei 405 nm gemessen und quantifiziert werden kann. Als Positiv-Kontrollen dienten die im Kit enthaltenen DNA-Histon-Komplexe. Als Leerkontrolle diente Lyse-Puffer.

2.2.6 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist das Messen der Fluoreszenz von einzelnen Zellen. Ursprünglich aus der Immunologie-Forschung hervorgegangen, wird diese Methode heute weit darüber hinaus verwendet, da praktisch jeder zellulärer Parameter, der sich in Fluoreszenzintensität ausdrücken lässt, mit ihr erfasst werden kann. Das Messgerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem Laserlicht-Generator und einem optischen System mit den Komponenten Messstrahl-Aufbereitung, Messkammer und Emissionsstrahl-Bearbeitung. Letztere umfasst 5 optische Detektoren und eine elektronische Nachbearbeitung inklusive Analog-Digital-Wandler. Die Zellen werden durch ein Drucksystem ins Flüssigkeitssystem eingeschleust, hydrodynamisch fokussiert, in einer Kolonne durch die Messkammer geschleust und in den Abfall geleitet. Die engste Stelle in der Messkammer hat einen Durchmesser von 120 µm. In selbiger werden die Zellen mit monochromatischem Laserlicht angeleuchtet, und das Streulicht wird durch 1 Photodiode und 4 Photomultiplier registriert. Anhand des Vorwärtsstreulichtes erhält man Informationen über die Grösse der gemessenen Zelle. Anhand des Seitwärtsstreulichtes erfährt man etwas über ihre Granularität. Ausserdem wird das emittierte Fluoreszenzlicht in drei Messbereichen (entsprechend den Farben gelbgrün, orange und rot) gemessen. Die Messwerte werden digitalisiert und einem von 1024 (bzw. wahlweise 256) Messkanälen zugeordnet.

Mit Hilfe dieser Technik lässt sich auch bestimmen wie viele Zellen einer Gesamtpopulation in den einzelnen Phasen des Zellzyklus sind. Für die von uns durchgeführte Zellzyklus-Analyse wurden die DU145 und PC-3 Zellen für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid oder DMSO als Kontrolle behandelt. In manchen Experimenten wurden PC-3 Zellen vor der Sulindac Sulfid Gabe mit siRNA-Lentiviren, entsprechend 2.2.11, infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, das jeweilige Kulturmedium erneuert und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen, mit Trypsin gelöst und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen /ml verdünnt. Dann wurde 2x mit 4°C kaltem PBS plus 2% FBS gewaschen und dann in 70% Ethanol für 60 Minuten bei 4°C fixiert. Hiernach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Propidium-Iodid-Färbelösung (50 µg/ml Propidium Iodid, 3,8 mM Natriumtrisphosphat in PBS und 50 µl RNase A) für 3 Stunden bei 4°C gefärbt. Es wurden jeweils 10^4 Zellen mittels eines „BD FACScan™ Flow Cytometers“ (Becton Dickinson, Heidelberg, D) analysiert und mit Hilfe der „BD CellQuest Software“ (Becton Dickinson, Heidelberg, D, No. 342182) ausgewertet.

2.2.7 Isolation der Ribonukleinsäure (RNA), Reverse Transkription und in vitro-Transkription (IVT)

2.2.7.1 Isolation, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der RNA

Zunächst wurden die Zellen wie im Text angegeben für die jeweilige Dauer mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Dann wurden mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend in 600 µl RLT-Puffer (enthält 1% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Zum Aufreinigen der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D, No. 74104) verwendet. Die RNA-Proben wurden 2 Minuten lang bei 37°C aufgetaut und anschließend durch Pipettieren gut vermischt. Als erster Schritt wurden mit Hilfe des QIAshredder (Qiagen, Hilden, D, No. 79654) Kits die Zellen mechanisch aufgeschlossen und dabei nichtlösliche Zellreste herausgefiltert. Dazu wurden die 600 µl Zelllösung auf eine Shredder-Säule gegeben und 2 Minuten mit 12000xg zentrifugiert. Als nächstes wurden 600 µl 70% Ethanol hinzugegeben. Die Probe wurde sukzessive auf eine RNeasy-Säule aufgetragen, jeweils 15 Sekunden bei 12000xg zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Dann wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Zentrifugiert wurde bei den ersten beiden Waschschrritten für 15 Sekunden bei 12000xg und beim dritten Mal für 2 Minuten mit 15000xg. In einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 15000xg wurde die Säule von Flüssigkeitsresten befreit. Jeweils 50 µl DEPC-Wasser wurden zum Eluieren auf die Säulen pipettiert. Im letzten Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 12000xg wurde die RNA in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt.

Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde das Gemisch 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnt und mittels Photometrie (DU600, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) quantifiziert. Daraus konnte die Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt werden (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm, 1 OD = 40 µg/ml).

Zur Qualitätskontrolle diente der photometrische Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}:A_{280}$). Der Wert sollte idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Es wurden nur RNA-Proben weiterverarbeitet die innerhalb dieses Bereiches lagen. Als weitere Kontrolle der Reinheit der RNA-Isolation wurde selbige in neutralen Agarosegelen (1% Agarose in 1xTAE-Puffer mit Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleinsäuren) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Es wurde 1 µg RNA pro Probe aufgetragen.

2.2.7.2 First-Strand cDNA-Synthese

Es können zwischen 5-40 µg RNA zur First-Strand-Synthese (Erst-Strang-Synthese) eingesetzt werden. Es wurden von allen Proben 10 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC-Wasser verwendet. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl T7-(dT)₂₄-Primer (100 pmol/µl, Sequenz: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3') zu der RNA-Lösung gegeben, das Gemisch bei 70°C für 10 Minuten inkubiert, anschließend 5 Sekunden zentrifugiert und für 2 Minuten auf Eis gestellt. Für die First-Strand-Synthese, in der an die vorhandene RNA ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wird, wurde das Superscript Choice System (Gibco BRL, Rockville, MD, USA, No. 18090-019) verwendet. Zu den 11 µl der mit dem Primer hybridisierten RNA wurden 4 µl 5xFirst-Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT (Endkonzentration 0,01M) und 1 µl 10 mM dNTP (Endkonzentration 0,5 mM) gegeben und der Ansatz bei 42°C für 2 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl der Reversen Transkriptase Superscript RT II wurde das Gemisch bei 42°C für 60 Minuten inkubiert.

2.2.7.3 Second-Strand cDNA-Synthese

In der Second-Strand-Synthese (Zweit-Strang-Synthese) wird aus dem komplementären cDNA-Strang ein DNA-Doppelstrang gebildet, wobei der ursprüngliche RNA-Strang abgebaut wird. Der Mastermix für die Synthese wurde wie folgt hergestellt: zu 91 µl DEPC-Wasser wurden 30 µl 5xSecond-Strand-Puffer, 3 µl dNTP (10 mM, Endkonzentration 0,2 mM), 1 µl E. coli (Escherichia-coli-Bakterium) DNA-Ligase (10 u/µl), 4 µl E. coli DNA Polymerase I (10 u/µl) und 1 µl RNase H (2 u/µl) gegeben. Zu diesen 130 µl kommt der komplette Ansatz aus der First-Strand-Synthese. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 16°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

2.2.7.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation zur Aufreinigung des cDNA-Doppelstranges.

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die doppelsträngige cDNA aufgereinigt. „Phase-Lock-Gel-Röhrchen“ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D, No. PI-188233) erleichtern die Trennung der organischen von der wässrigen, cDNA-haltigen, Phase durch eine Gelschicht, die sich zwischen die beiden Phasen legt. Dazu wurden die „Phase-Lock-Gel-

Röhrchen“ zunächst für 1 Minute bei 13000xg zentrifugiert. Der komplette Ansatz der Second-Strand-Synthese wurde in die so vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 166 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; gesättigt mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) wurde der Ansatz gemischt und 2 Minuten mit 12000xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurde das gleiche Volumen 7,5 M NH₄OAc, 1 µl GlycoBlue[®] (Ambion, Austin, TX, USA, No. 9515) (zur Anfärbung des Pellets) und 2,5 Volumenteile 100% Ethanol zu der Probe hinzugegeben. Das ganze wurde kurz gemischt und für 30 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig pipettiert und das Pellet in 0,5 ml 80% Ethanol gelöst. Der Ansatz wurde dann bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Jetzt wurde der Überstand vorsichtig pipettiert und das Pellet anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 11 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.2.7.5 Synthese der Biotin markierten cRNA (IVT - in vitro-Transkription)

Bei der in vitro-Transkription (IVT) wird die doppelsträngige cDNA wieder in cRNA umgeschrieben. Dabei werden neben unmarkierten, auch mit Biotin gekoppelte Nukleotide verwendet, die später zum Markieren der RNA-Moleküle dienen. Bei den vorangegangenen Syntheseschritten wurden die mRNA-Moleküle im Verhältnis 1:1 umgeschrieben. Die IVT-Reaktion stellt eine 30-100fache, lineare Amplifikation dar (Lipshutz, 1999). Diese Linearität ist eine Voraussetzung für eine sinnvolle Quantifizierung der Expressionsniveaus betrachteter Transkripte. Die gesamte Methode zur Amplifikation heterogener Populationen von antisense- bzw. komplementärer RNA (cRNA) unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase wurde erstmalig von Van Gelder (Van Gelder, 1990) beschrieben. Für die in vitro-Transkription wurde das ENZO High-Yield (HY) RNA Biotin Transcript Labeling Kit (Enzo, Farmingdale, NY, USA, No. 900182) verwendet. Der zur Transkription erforderliche Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: jeweils 4 µl Biotin markierte Ribonukleotide, ATP, GTP, CTP, UTP, Bio-UTP und Bio-CTP, 4 µl HY Reaktions-Puffer, 4 µl DTT, 4 µl RNase-Inhibitor-Mix, 2 µl T7 RNA Polymerase-Mix. Zum Ansatz wurden 1,5 µl der gereinigten Doppelstrang cDNA gegeben. Anschließend wurde das Gemisch bei 37°C für 6 Stunden inkubiert.

2.2.7.6 Aufreinigung, Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung des IVT-Produktes

Die synthetisierte cRNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit gereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die cRNA 1:50 mit DEPC-Wasser verdünnt und mit dem Photometer DU600 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) quantifiziert. Daraus konnte die Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt werden (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm, 1 OD = 40 µg/ml).

Zur Qualitätskontrolle diente der photometrische Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}:A_{280}$). Der Wert sollte idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Es wurden nur cRNA-Proben weiterverarbeitet, die innerhalb dieses Bereiches lagen. Zur weiteren Kontrolle der cRNA wurde selbige in neutralen Agarosegelen (1% Agarose in 1xTAE-Puffer mit Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleinsäuren) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Es wurde 1 µg cRNA pro Probe aufgetragen.

2.2.7.7 Fragmentierung der cRNA

Bevor die markierte RNA auf die Microarrays hybridisiert werden kann, muss sie fragmentiert werden. Dabei entstehen RNA-Fragmente mit einer Größe von 35 bis 200 Basenpaaren. Diese kleinen Fragmente ermöglichen eine bessere Hybridisierung auf den GeneChip[®] als große Fragmente. Für die Fragmentierung werden 15 µg der cRNA in einem Volumen von maximal 16 µl benötigt, die Konzentration sollte 0,6 µg/µl nicht unterschreiten. Wurde diese Konzentration nicht erreicht, mussten die IVT-Produkte durch Ethanol-Präzipitation konzentriert werden. Zu 8 µl der cRNA wurden 2 µl Fragmentierungs-Puffer (5x Fragmentierungs-Puffer: 200 mM Tris-Acetat, pH 8,1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) gegeben und der Ansatz für 35 Minuten bei 95°C inkubiert. Um Kondenswasser im Reaktionsgefäß zu sammeln, wurde die Probe für 10 Sekunden zentrifugiert und bis zur anschließenden Hybridisierung auf Eis aufbewahrt.

2.2.8 Affymetrix GeneChip® Arrays

2.2.8.1 High-density Oligonukleotid-Arrays

DNA-Hybridisierungsarrays bieten die Möglichkeit, Genexpressionsanalysen in genomischen Maßstab durchzuführen. Als Gene werden in diesem Zusammenhang die DNA-Sequenzen definiert, die in der Zelle in mRNA transkribiert werden und Proteine kodieren. Intron- und Promotorsequenzen sowie andere funktionelle Elemente auf DNA-Ebene, die nach heutiger Definition Bestandteile eines Gens sind, werden bei dieser funktionellen Genexpressionsanalyse nicht betrachtet. Weiterhin wird mit Hybridisierungsarrays die Expression von ESTs (Expressed Sequence Tags) untersucht, also von Produkten der Transkription, deren Sequenz bekannt, aber deren Zuordnung zu einem Gen oder Protein nicht definiert ist (Schuler, 1997; Schuler et al., 1996). Hybridisierungsarrays zeichnen sich durch eine Konstruktion aus, bei der auf einer festen Matrix die genspezifischen Sequenzen (Sonde, engl. probe) immobilisiert werden und mit markierter RNA (Probe, engl. sample, target) hybridisiert werden.

Hintergrund für die Genexpressionsanalyse mit Hybridisierungsarrays ist die Theorie, dass, je stärker die Expression eines Genes ist, desto größer die Menge markierter hybridisierter RNA und folglich desto größer das zu detektierende Signal ist. Hierbei können jedoch nur relative Transkriptionsniveaus und keine absoluten Mengen oder gar die genaue Kopienzahl bestimmt und miteinander verglichen werden. Eine Voraussetzung der Genexpressionsanalyse ist die Linearität aller experimentellen Schritte. Nur so lassen sich reproduzierbare Aussagen über das Expressionsniveau bestimmter Gene machen und miteinander vergleichen. Bei den Syntheseschritten zur First- und Second-Strand-Synthese handelt es sich um 1:1 Umschreibungen der eingesetzten RNA. Die IVT hingegen ist eine lineare Amplifikation. Ebenso besteht zwischen der Menge an fluoreszenzmarkierter Probe und der detektierten Signalintensität ein linearer Zusammenhang (Freeman et al., 2000). Die in dieser Untersuchung verwendeten high-density Oligonukleotid-Arrays, GeneChip®, (Lipshutz et al., 1999; Lockhart et al., 1996) unterscheiden sich in einigen Eigenschaften grundlegend von anderen Hybridisierungsarrays. Im Gegensatz zu anderen Arrays werden bei diesem System die Sonden in situ auf dem Chip synthetisiert. Hierzu wird eine kombinierte Methode aus Nukleotidsynthese und Photolithographie verwendet. Die Photolithographie ist der Halbleiterindustrie entlehnt und erlaubt die gezielte schrittweise Synthese der Oligonukleotide, Base für Base, an definierten Positionen auf dem Array (Fodor et al., 1993;

Fodor et al., 1991; McGall et al., 1996). Durch diese Technik ist man in der Lage, bis zu 300.000 unterschiedliche Sonden auf einer Fläche von nur 1,28 cm x 1,28 cm zu synthetisieren. Dabei werden pro Sonde auf einer Fläche von 20 µm x 20 µm 1×10^6 bis 1×10^7 Kopien eines Oligonukleotides erzeugt (Schadt et al., 2000).

Die Synthese von Oligonukleotiden mit mehr als 25 Basen Länge ist bereits problematisch. Da diese Sondenlänge jedoch immer noch keine hochspezifische Hybridisierung der Ziel-RNA zulässt, werden für jedes zu detektierende Gen bis zu 40 verschiedene Sonden, in ihrer Gesamtheit als Sondensatz (probe-set) bezeichnet, verwendet. Die Sonden sind unter anderem so ausgewählt, dass sie sich, wenn möglich, nicht überlappen. Die Hälfte dieser Sonden stellen die genspezifischen Sonden (perfect match probe, PM) dar. Zu jeder genspezifischen Sonde gibt es genau eine Sonde, bei der an Position 13 des Oligonukleotides eine homomere Base ausgetauscht wurde (mismatch probe, MM). Die Idee der Mismatch-Sonden ist, Hintergrundsignale (zum Beispiel durch Eigenschaften des Scanners verursachtes Rauschen der Signale) oder unspezifische Interaktionen (zum Beispiel Kreuzhybridisierung oder unspezifische Hybridisierungen) zu quantifizieren und mit dem PM-Signal zu verrechnen (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997). Oligonukleotid-Arrays haben den Vorteil, dass die Sonden sequenzspezifisch aus dem gesamten Genom gezielt ausgewählt werden können, wodurch sich Kreuzhybridisierungen minimieren lassen, ein Problem, welches bei den cDNA-Hybridisierungsarrays mit 1 bis 2kb langen Sonden besteht (Golub, 2001a; Golub, 2001b).

Das „Gene Chip Instrument System“ der Firma Affymetrix besteht aus vier Gerätekomponten. Eine zentrale Computerplattform dient der Steuerung der übrigen Geräte sowie der Analyse der erhobenen Messdaten. Im Hybridisierungssofen werden die mit der Probe beladenen GeneChips[®] unter Temperierung und Rotation hybridisiert. Die sogenannte Fluidics-Station ist ein automatisiertes System, in dem vier GeneChips[®] gleichzeitig nach einem definierten Programm gewaschen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Der konfokale Laserscanner „Gene Array Scanner“ (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) ist mit einem Argonlaser ausgestattet. Er regt die auf dem GeneChip[®] gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe der markierten und hybridisierten Nukleinsäuren an und misst das emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 570 nm. Gescannt werden die GeneChips[®] mit einer Auflösung von 3 µm (Pixelgröße).

2.2.8.2 Eigenschaften des verwendeten HG-U133A GeneChips®

Für die Analyse der differentiellen Genexpression von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom Zellen die für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) behandelt wurden, kam der Affymetrix HG-U133A Humane Genome GeneChip® zum Einsatz. Der Affymetrix GeneChip® HG-U133A detektiert mit seinen 22.308 Sondensätzen 13.220 bekannte Gene und 5.413 EST-Cluster. Jeder Sondensatz setzt sich aus je elf PM- und MM-Sonden zusammen. Die Sequenzen, auf denen die Sonden beruhen, entstammen der UniGene Database (Build 133, 20.04.2001) und wurden zusätzlich mit Daten aus zwei weiteren, öffentlich zugänglichen Datenbanken ergänzt (Washington University EST Trace Repository und University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Database). Es wurden je zwei GeneChips® pro Gruppe mit cRNA aus unabhängigen biologischen Ansätzen hybridisiert. Konkret bedeutet dies: Je 2 GeneChips® für DMSO behandelte DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen und je 2 GeneChips® für Sulindac Sulfid behandelte DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen, was einer Gesamtzahl von 8 GeneChips® entspricht.

2.2.8.3 Hybridisierung der Proben auf die HG-U133A GeneChips®

Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden zuerst eine 12xMES Lösung (1,22 M MES (2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure), 0,89 M MES-Natriumsalz, in Wasser, pH 6,5) und ein 2xHybridisierungspuffer (100 mM MES, 1 M [Na⁺], 20 mM EDTA, 0.01% Tween20) hergestellt. Beide Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurden zu 15 µg fragmentierter cRNA (Endkonzentration 0,05 µg/µl) 15 µl Eukaryote Hybridisierungs-Kontrolle (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, No. 900449, Endkonzentration 100 pM), 5 µl Kontroll-Oligonukleotide B2 (3 nM, Endkonzentration 50 pM), 3 µl Hering Sperma DNA (3 nM, Endkonzentration 0,1 mg/ml), sowie 3 µl acetyliertes BSA (50 mg/ml, Endkonzentration 0,5 mg/ml) gegeben. Um unlösliche Partikel in der Hybridisierungslösung zu sedimentieren, wurde selbige 5 Minuten bei 99°C und anschließend 5 Minuten bei 45°C erhitzt. Vor der Inkubation auf den Arrays wurde die fragmentierte cRNA-enthaltende Hybridisierungslösung für 2 Minuten bei 13000xg zentrifugiert. Die Arrays wurden auf Raumtemperatur erwärmt, mit 200 µl des 1xHybridisierungspuffers befüllt und für 10 Minuten bei 45°C unter Rotation im Hybridisierungssofen präinkubiert. Nach

Entnahme des Puffers wurden die Arrays mit 200 µl der Hybridisierungslösung befüllt und im Hybridisierungsofen für 16 Stunden bei 45°C inkubiert.

2.2.8.4 Waschen und Färben der GeneChips®

Nach der Inkubation wurde die Hybridisierungslösung entfernt. Die Arrays wurden mit 200 µl des Puffers Non-Stringent-Wasch-A befüllt (6xSSPE (20xSSPE Stock aus 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA), 0,01% Tween20, 0,005% Antifoam) und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Desweiteren wurde der Puffer Stringent-Wasch-B hergestellt (100 mM MES, 0,1 M [Na⁺], 0,01% Tween20). Für die Herstellung der SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin) wurde zuerst ein 2xFärbe-Puffer hergestellt (200 mM MES, 2 M [Na⁺], 0,1% Tween20, 0,01% Antifoam). Zu 400 µl 2xFärbe-Puffer wurden 360 µl H₂O, 32 µl acetyliertes BSA (50 mg/ml) und 8 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) gegeben. Die SAPE-Lösung muss lichtgeschützt verwahrt werden. In der Fluidics-Station des Systems wurden die hybridisierten Arrays mit der SAPE-Lösung für 30 Minuten bei 25°C inkubiert und automatisch mit den beiden Lösungen Non-Stringent-Wasch-A und Stringent-Wasch-B gewaschen (Waschprogramm EukGE-WS1).

2.2.8.5 Scannen der GeneChip® Arrays

Die gewaschenen Arrays wurden bei 570 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) bei einer Auflösung von 3 µm insgesamt zweimal gescannt. Die gemessenen Lichtintensitäten aus beiden Bildern wurden automatisch pro Pixel gemittelt und das endgültige Bild des Arrays gespeichert.

2.2.8.6 Analyse und Normalisierung der GeneChip® Daten

Die Bilder der gescannten GeneChips® stellen die Rohdaten eines jeden Experimentes dar. Die fundamentalen Analyseschritte für jeden einzelnen GeneChip® sind die Aufteilung des Bildes in ein Raster, die Korrektur des Hintergrundes, die Skalierung für die nachfolgenden Chip-zu-Chip Vergleiche und die statistische Berechnung des singulären Signals für jedes Gen, das als relatives Maß der Expressionsstärke steht. Für die HG-U133A GeneChips® erstellt die Affymetrix Software (Affymetrix Microarray Suite 4.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für jedes Bild eine Liste aller auf dem Array vorhandenen SONDENSÄTZE

beziehungsweise Gene und macht neben dem Signalwert eine Angabe darüber, ob das Gen exprimiert (P, present) oder nicht exprimiert (A, absent) ist. Aus diesen Messwerten wird schliesslich für jedes Gen ein Einzelwert, das Signal berechnet. Dieses Signal macht eine relative Angabe über die ursprüngliche Menge eines Transkriptes und repräsentiert somit die Expressionsstärke eines Gens.

Nichtbiologische Faktoren können zur Variabilität der Daten in vielen biologischen Experimenten führen. Diese spielen auch bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression mit vielen einzelnen experimentellen Schritten eine Rolle. Bereits geringe Variationen an Menge und Qualität der hybridisierten Proben, der Menge an verwendeten Färbereagenzien oder weitere Abweichungen der experimentelle Bedingungen können insgesamt, trotz aller Standardisierungen der Methoden und Protokolle, die Hybridisierungsintensitäten beeinflussen. Um verlässlich verschiedene GeneChip[®] Experimente miteinander vergleichen zu können, müssen die Unterschiede nichtbiologischen Ursprungs minimiert und die Datensätze vor der vergleichenden Analyse normalisiert werden. Die der Normalisierung zugrunde liegende Annahme ist, dass das gesamte Signal eines GeneChips[®] (nicht notwendigerweise die Verteilung der individuellen Fluoreszenzintensitäten von Sondensätzen), über verschiedene Hybridisierungsexperimente betrachtet, vergleichbar, das heisst ungefähr gleich sei. Diese Annahme ist vertretbar, da mit jeder Hybridisierungslösung dieselbe RNA-Menge auf einen Chip gebracht wird. Weiterhin wird vorausgesetzt, dass die betrachteten Variablen, also die Fluoreszenzintensitäten aller Sondensätze auf einem Chip, regelmäßig verteilt sind.

Die Skalierung ist eine mathematische Methode um Unterschiede zu minimieren, die durch die Probenbearbeitung, die Hybridisierungsbedingungen, die Färbung oder durch unterschiedliche Herstellungschargen der GeneChips[®] zustande kommen können. Die Skalierung ermöglicht den direkten Vergleich verschiedener GeneChips[®] miteinander, sofern sie vom selben Chiptyp sind. Für die Skalierung werden alle vorhandenen Sondensätze berücksichtigt. Alle Einzelsignale eines GeneChips[®] werden zu einem bereinigten Mittelwert (Trimmed Mean Signal) zusammengefasst. Für diesen bereinigten Mittelwert werden vor der Berechnung die extremen Minima und Maxima entfernt. Der bereinigte Mittelwert wird dann auf eine vom Anwender zu definierende Gesamtintensität (Target Signal) korrigiert. Der hierfür erforderliche Skalierungsfaktor (Scale Factor, SF) ermittelt sich demnach aus: $\text{Target Signal} = \text{Scale Factor} \times \text{Trimmed Mean Signal}$. Die Idee für diese Art der Skalierung ist die Annahme, alle GeneChips[®] hätten in etwa die gleiche Gesamthelligkeit beziehungsweise eine gleiche mittlere Helligkeit. Alle GeneChips[®] in diesem Experiment wurden auf dieselbe

mittlere Targetintensität (Wert 500, Empfehlung Affymetrix) unter Berücksichtigung aller vorhandenen Sondensätze normalisiert.

Das Ziel unserer GeneChip[®] Experimente bestand in erster Linie darin, Unterschiede in der Genexpression der DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid aufzudecken. Für die statistische Auswertung nutzten wir die Statistikfunktionen von Microsoft Excel, wobei wir die Expressionsprofile der mit Sulindac Sulfid und der DMSO behandelten Zellen gegenüberstellten. Da von jeder Probengruppe zwei GeneChips[®] angefertigt wurden, wurden für jede Gruppe Mittelwert, Standardabweichung und die Korrelationskoeffizienten berechnet. Diese Mittelwerte wurden genutzt um den Faktor der differentiellen Expression in den behandelten Gruppen zu ermitteln.

2.2.9 Gesamt-RNA Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR

Um die differentiellen Expressionsniveaus einzelner in den GeneChip[®] Experimenten ermittelten Gene zu verifizieren, führten wir RT-PCRs durch.

Bei der herkömmlichen „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) sind zu Beginn der Amplifikation Primer und Enzyme im Überfluss vorhanden. Die Amplifikation läuft zu Beginn konstant exponentiell ab. Der Punkt an dem die Amplifikation von der Exponentiellen Phase in die lineare und schliesslich in die Plateau Phase übergeht ist sehr variabel, sogar bei Wiederholungsexperimenten identischer Ansätze. Ursächlich scheint hierfür eine Renaturierung der PCR-Produkte mit zusätzlichem Primer-Verbrauch zu sein (Zugabe von weiterem Enzym oder Substrat hat keinen Effekt auf die PCR Kinetik). Um genaue quantitative Aussagen machen zu können, dürfen nur die Daten verwendet werden, die während der exponentiellen Phase der Amplifikation erhoben werden, ist doch nur diese Phase der Amplifikation reproduzierbar.

Bei der Real-time-PCR (RT-PCR) ist es möglich, quantitative Daten für jede Probe nach jedem einzelnen Zyklus zu erheben. Der Fluoreszenz-Farbstoff „SYBR-Green“ bindet an Doppelstrang-DNA. Mit zunehmender Akkumulation des PCR-Produktes nimmt auch dessen Fluoreszenz zu. Eine Standard Kurve, bei der RNA bekannter Konzentration eingesetzt wird (hGAPDH-Plasmid, freundlicherweise von Dr. Luiz F. Zerbini, BIDMC Genomics Center, HMS, Boston, MA, USA zur Verfügung gestellt), kann zur Bestimmung unbekannter RNA-Konzentrationen herangezogen werden.

Die zur RT-PCR verwendete RNA wurde von den zu untersuchenden Zellen immer aus neuen Versuchsansätzen gewonnen. Das bedeutet, dass für jede RT-PCR Untersuchung bisher unbehandelte Zellen, wie im Text beschrieben, mit den entsprechenden Substanzen für die jeweilige Dauer behandelt wurden. Die RNA-Aufbereitung wurde nach der bereits in 2.2.7.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Zwecks cDNA-Synthese wurden die Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences, Freiberg, D, No. 27-9264-01) verwendet. Die Beads enthalten bereits alle nötigen Puffer, Oligos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase/DNase-freies BSA und die Reverse Transkriptase (M-MuLV). Es wurde zu 2 µg RNA ein entsprechendes Volumen DEPC-Wasser bis zu einem Zielvolumen von 32 µl hinzugegeben. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 65°C denaturiert, anschließend kurz gemischt und auf Eis gestellt. Das gesamte Volumen wurde dann auf die Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads gegeben und zunächst 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die

Beads und die Probe gut vermischt hatten, wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dem fertigen Produkt wurden noch 33 µl DEPC-Wasser hinzugegeben.

Der Ansatz für die RT-PCR setzte sich aus 2,5 µl Reaktions-Puffer-A (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0 at 25°C) und 1% Triton X-100), 2 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTP, 1,25 µl SYBR Green II, 0,2 µl Taq DNA Polymerase und je 0,25 µl sense- und antisense-Primer, sowie 2 µl cDNA zusammen. Die Amplifikation erfolgte auf einem „MJ Research DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System“ (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA, No. CFD-3200). Es wurde folgendermassen amplifiziert: Zunächst Denaturierung bei 95°C für 3 Minuten, dann Inkubation für 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 52°C, 1 Minute bei 72°C und 5 Sekunden bei 79°C, dann wurde das Fluoreszenzsignal gelesen und die Schritte wurden, bis auf den ersten, insgesamt vierzigmal wiederholt. Dann wurde 5 Minuten bei 72°C inkubiert und schliesslich die Schmelzkurve im Bereich von 40°C bis 96°C erstellt. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal hierbei alle 0,5°C bei einer Verweildauer von 5 Sekunden. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf 10°C gekühlt. Von jeder Probe wurde neben dem zu untersuchenden Gen, noch eine RT-PCR mit hGAPDH durchgeführt. Anhand der Expression dieses so genannten Housekeeping-Gens (Wird in allen Zellen immer in gleichem Maße exprimiert) konnten dann die Expressionsniveaus der untersuchten Gene in den einzelnen Proben miteinander verglichen werden. Die quantitativen Daten für die einzelnen Proben wurden mit den Statistikfunktionen von Microsoft Excel bearbeitet.

2.2.10 Herstellung und Transfektion der siRNA-Oligonukleotide

siRNA steht für silence interfering RNA und dient der gezielten Ausschaltung von Genen auf RNA-Ebene. siRNA ist ein posttranskriptioneller Silencing-Mechanismus, der bei vielen Organismen von Pflanzen über Pilze bis hin zu Säugern zu finden ist. Doppelsträngige-RNA (dsRNA) ist normalerweise nicht im Zytoplasma der Zellen vorhanden, da alle natürlich vorkommenden RNAs einsträngig sind (mRNA, tRNA). Nur nach einer Infektion eines RNA-Virus kommt dsRNA vor, nämlich die doppelsträngige virale-RNA. Die Zelle hat hiergegen einen Abwehrmechanismus: die RNase-Dicer. Sie spaltet die lange dsRNA in kürzere Teilstücke und kann somit die Virenattacke abwenden. Handelt es sich aber nicht um eine Sequenz die zellfremd ist, sondern um eine Sequenz, die auch als normale mRNA vorkommt, so geschieht folgendes: Die kleinen Teilstücke (siRNA) werden von einem RNA-induced-silencing-complex (RISC) gebunden, hierdurch wird der RISC aktiviert. RISC bindet an die Ziel-mRNA (Target) deren Sequenz komplementär ist zur der im RISC gebundenen siRNA. Die Ziel-mRNA wird gespalten und ist somit den natürlichen Verdauungsvorgängen in der Zelle schutzlos ausgeliefert. Ein RISC-Komplex mit einer siRNA ist in der Lage den Verdau mehrerer mRNA-Moleküle zu bedingen. Das bedeutet, das Signal zum mRNA-Verdau wird amplifiziert. Als siRNA können chemisch synthetisierte RNA-Stücke oder siRNA kodierende Plasmide benutzt werden.

Die siRNA-Oligos (GFP, GADD45 α , GADD45 γ , MDA-7/IL24) in dieser Arbeit wurden alle als HPP-Grade (High-Performance Purity) siRNA-Oligos von Qiagen (Hilden, D) bezogen. Um die Spezifität der Oligos zu überprüfen, wurde die Ausschaltung der jeweiligen Gene bei gleichzeitiger co-Transfektion von GFP, GADD45 α , GADD45 γ und MDA-7 exprimierenden Vektoren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Luiz F. Zerbini, BIDMC Genomics Center, HMS, Boston, MA, USA) mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene und Western Blot (nicht für MDA-7/IL24, da kein funktionierender Antikörper existierte) auf Protein-Ebene überprüft. Es kamen letztendlich nur Oligos zum Einsatz, die zu einer signifikanten Reduktion der Transkription und Translation der jeweiligen Gene führten.

Bei der Transfektion wurde besonders darauf geachtet, dass die Konfluenz der Zellen in den Petrischalen bei 50-70% lag. Es wurde das TransIT-TKO Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet (Mirus, Madison, WI, USA, No. MIR2154). Als Kontrolle diente in den Experimenten jeweils die siRNA gegen GFP.

2.2.11 Lenti- (LV-siRNA) und Adenovirus (AdCMV) Vektoren, Herstellung und Infektion der Zellen

Die siRNA-Lentivirus-Konstrukte für GADD45 α (LV-siGADD45 α), GADD45 γ (LV-siGADD45 γ) und MDA-7/IL24 (LV-siMDA-7/IL24) wurden nach dem von Singer und Rubinson (Rubinson et al., 2003; Tiscornia et al., 2003) publizierten Verfahren mit Hilfe von Dr. Luiz F. Zerbini (BIDMC Genomics Center, HMS, Boston, MA, USA) hergestellt.

Für die Herstellung der siRNA-Lentivirus Konstrukte wurden Vesicular stomatitis virus G envelope protein-pseudotyped Lentiviren verwendet. Die siRNA-Konstrukte bestanden aus Oligonukleotiden mit einer Länge von 83 Basen. Es wurde eine XbaI-Region am 5'-Ende, gefolgt von der spezifischen siRNA-Oligonukleotid-Sequenz, einem kurzen Platzhalter (Spacer) und einer partiellen Sequenz des H1-RNA-Promoters am 3'-Ende verwendet. Das ganze wurde mit Hilfe einer Standard-PCR (Clontech, Advantage 2 PCR Kit) mit den siRNA-Oligos, T3-Primer und pSuper-like-Plasmiden hergestellt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (QIAquick PCR-Reinigungs-Kit, Qiagen, Hilden, D, No. 28104), mit XbaI verdaut und schliesslich in das 3'-LTR-NheI-Ende eines CMV-GFP-Lentivirus-Vektors geklont. Die Vektorkonzentration wurde mit Hilfe eines p24-gag ELISA (Alliance, Du Pont/NEN) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Durch die Kombination mit GFP (grün-fluoreszierendes-Protein) fluoreszieren infizierte Zellen im Dunkelfeld-Mikroskop grün, was eine visuelle Kontrolle der erfolgreichen Infektion erlaubte. Der siRNA-Lentivirus für GFP, LV-siGFP, in den Experimenten stets als Kontrolle infiziert, wurde freundlicherweise von Dr. Oded Singer (Salk Institute, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Um die Spezifität der LV-siRNA-Konstrukte zu testen, wurden die zu Untersuchenden Zellen mit den entsprechenden Lentiviren infiziert und GFP, GADD45 α , GADD45 γ und MDA-7/IL24 exprimierenden Vektoren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Luiz F. Zerbini, BIDMC Genomics Center, HMS, Boston, MA, USA) co-transfiziert. RNA und Proteinextrakte dieser Zellen wurden dann mittels RT-PCR und Western Blot auf die verbliebene Transkription, sowie Translation dieser Gene untersucht. Die Adenoviren mit dem Zytomegalievirus-Promoter (CMV), die für β -Galaktosidase (AdCMV_ β -Galaktosidase) und MDA-7/IL24 (AdCMV_MDA-7/IL24) kodieren wurden nach dem bereits veröffentlichten Verfahren (Zerbini et al., 2003) von Dr. Luiz F. Zerbini hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Infektion wurden die Zellen so ausplattiert, das sie eine Konfluenz von 50-70% zum Infektionszeitpunkt erreichten. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Viren mit einem MOI

(multiplicity of infections) von 1000 in ihrem spezifischen, serumfreien Medium infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und frisches, serumhaltiges Medium hinzugegeben. Nach weiteren 48 Stunden konnten die Zellen weiterverarbeitet werden.

2.2.12 Gewinnung des Gesamtproteins der Zellen und Western Blot

2.2.12.1 Gewinnung der Proteinextrakte ganzer Zellen

Die Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend in 150 µl Lyse-Puffer (110 µl 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin plus 40 µl Protease-Inhibitor) lysiert. Mit einem Kunststoff-Spatel wurden die adhären Zellen abgekratzt und mit dem Puffer vermischt. Das Gemisch wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4°C mit 12000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.2.12.2 Bestimmung der Konzentration des Gesamtproteins

Die Konzentration des Gesamtproteins wurde mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Protein-Assay Kit II, Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 500-0002) bestimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve, für die Proteine bekannter Konzentration (BSA 0,5 µg/µl) eingesetzt werden, können die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Zur Durchführung des Assays wurden 160 µl steriles Wasser, 2 µl Probe und 40 µl der Bradford-Assay Lösung vermischt. Der entstehende Farbumschlag ist proportional zur Menge des Proteins. Dieser kann photometrisch bei 590 nm quantifiziert werden. Als Leerkontrolle diente der Ansatz ohne Zugabe von Proteinen.

2.2.12.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Bevor ein Protein spezifisch mit einem Western Blot nachgewiesen werden kann, muss das Gesamtprotein elektrophoretisch nach Molekulargewichten in einem Polyacrylamidgel (SDS-PAGE Ready Gel Tris-HCl Gel 10%, Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 161-1101) (Laemmli, 1970) aufgetrennt werden. Zu 30 µl Proteinextrakt (50 µg Protein je Probe wurden mit dem Lyse-Pufferauf ein Volumen von 30 µl justiert) wurden 10 µl Loading Dye (Bromophenol Blue, Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 161-0404) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung wurde das Gemisch in die Gel-Taschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte dann mit einem Western Blot

Electrophoresis Module (Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 165-3302EDU) bei 110V für 60 Minuten. Als Laufpuffer diente 1xTris-Glycerin-SDS-Puffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 M Glycin, 1% SDS, pH 8,3). Das Molekulargewicht der Proteine wird durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke mit denen von Standardproteinen ermittelt.

2.2.12.4 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Um den immunologischen Nachweis der in dem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, muss zunächst deren Transfer auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran (Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 162-0212EDU) erfolgen, die die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen fixiert. Dies erfolgte bei 4°C nach dem Semidry-Verfahren in einer Western-Blot-Transfer-Apparatur (Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 170-3930EDU) für 1 Stunde bei 110V (entspricht in etwa 1 mA/cm² Membran) in 1xTransfer-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol). Der Aufbau erfolgt nach dem Sandwichprinzip, beginnend bei der Anode der Kammer, einer Wattelage (Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 170-3933EDU) zwei Lagen Filterpapier (2 mm) (Bio Rad, Hercules, CA, US, No. 170-3932EDU), Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel, zwei Lagen Filterpapier, einer Wattelage und der Kathode. Sowohl die Watte als auch das Filterpapier wurden zuvor in 1xTransfer-Puffer equilibriert. Die Nitrozellulosemembran wurde für mindestens 2 Minuten in Methanol eingelegt.

2.2.12.5 Blocken des Transfers

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Transfermembran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und somit zur Reduktion des Hintergrundes bei der Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Blockpuffer (5% fettfreies Milchpulver, Bio Rad, Hercules, CA, USA, No. 170-6404 in 100 ml destilliertes Wasser) inkubiert.

2.2.12.6 Inkubation mit dem Primären und Sekundären Antikörper

Die Membran wurde mit dem jeweiligen primären Antikörper in der oben angegebenen Verdünnung in 10 ml 2% BSA bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit Wasch-Puffer (1xPBS-Puffer plus 2 ml

Tween20) für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in 10 ml Blockpuffer in der entsprechenden Konzentration auf die Membran gegeben und für 60 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde erneut für jeweils 5 Minuten mit dem Wasch-Puffer gewaschen.

2.2.12.7 Detektion der Antikörperreaktion

Die Detektion der Antikörperreaktion beruht auf Chemilumineszenz, da der sekundäre Antikörper mit „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrates erfolgt die enzymatische Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid, wobei die Oxidation des Luminols eine Lichtemission bewirkt. Dazu wurde die Membran 1 Minute mit der ECL Lösung (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, D, No. RPN2135) inkubiert, in Haushaltsfolie eingeschlagen und schliesslich mit dem AlphaEase FluorChemTM Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) sichtbar gemacht und digital aufgezeichnet.

2.2.13 Funktionelle Kinase Assays

2.2.13.1 c-Jun NH₂-terminale-Kinase Assay

Es wurde der SAPK/JNK Assay Kit (Cell Signaling, Beverly, MA, USA, No. 9810) verwendet. Den zu untersuchenden Zellen wurde wie vorher bereits in 2.2.10 beschrieben das Gesamtprotein extrahiert und dessen Konzentration bestimmt. Es wurden jeweils 250 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die im Gesamtprotein enthaltene c-Jun-Kinase (JNK) wurde zunächst mit 2 µg c-Jun-Fusion-Beads immunopräzipitiert. Bei der Inkubation über Nacht bindet die Kinase über einen Antigen-Antikörper Komplex an die Agarose Beads, so dass die anderen Proteine durch Waschen des Ansatzes entfernt werden können. Gewaschen wurden die Beads einmal mit Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin) und zweimal mit Kinase-Puffer (25 mM Tris (pH 7,5), 5 mM β-Glycerolphosphat, 2 mM DTT, 0,11 mM Na₃VO₄, und 10 mM MgCl₂). Zwischen jedem Waschschrift wurde bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Durchführung der eigentlichen Kinase-Reaktion, der phosphorylierung von c-Jun, wurden die Beads in 50 µl Kinase-Puffer mit 200 µM ATP gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl 3xSDS-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde ein Western Blot mit dem Reaktionsprodukt durchgeführt, siehe 2.2.10. Der verwendete primäre Antikörper war p-c-Jun (Cell Signaling, Beverly, MA, USA).

2.2.13.2 CDK1-Kinase Assay

Wie bereits in 2.2.10 beschrieben, wurde den zu untersuchenden Zellen das Gesamtprotein extrahiert und dessen Konzentration bestimmt. Für den CDK1-Kinase Assay setzten wir 500 µg Gesamtprotein je Probe ein. Daraus wurde die CDK1-Kinase mit 2 µg Agarose konjugierten Anti-CDK1-Antikörperbeads bei 4°C über Nacht immunopräzipitiert (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA, No. sc-54). Anschließend wurden die Beads einmal mit Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin) und zweimal mit Kinase-Puffer (25 mM Tris (pH 7,5), 5 mM β-Glycerolphosphat, 2 mM DTT, 0,11 mM Na₃VO₄, und 10 mM MgCl₂) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Durchführung der eigentlichen Kinase-Reaktion, der Phosphorylierung von Histon-H1, wurden dem Ansatz 50 µl Kinase-Puffer, 200 µM ATP und 30 µl CDK1-Substrat Cocktail ((Upstate, Charlottesville, VA, USA, No. 20-125) 2 mg/ml Histon-H1 in 20 mM MOPS, pH 7,2, 25 mM β-Glycerophosphat, 5 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM dithiothreitol) hinzugefügt und das ganze 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl 3xSDS-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde ein Western Blot mit dem Reaktionsprodukt durchgeführt, siehe 2.2.10. Verwendeter primärer Antikörper war hier p-Histon-H1 (Upstate, Charlottesville, VA, USA, No. 06-597).

3. ERGEBNISSE

3.1 Effekt von Sulindac Sulfid auf DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

Um zunächst einen allgemeinen Eindruck von der Wirkung Sulindac Sulfides zu bekommen, wurden die Prostatakarzinom-Zellen, DU145 und PC-3, mit 50 μM Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Sulindac Sulfid führte bei den behandelten Prostatakarzinom-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl vitaler Zellen, bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation, verbunden mit einer Erhöhung der Apoptoserate und einem Arrest der Zellteilung in der G2-Phase.

3.1.1 Zahl der vitalen Prostatakarzinom-Zellen nimmt nach Sulindac Sulfid Gabe ab

Bei DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen, die mit 50 μM Sulindac Sulfid über einen Zeitraum von 24 Stunden behandelt wurden, nahm die Anzahl vitaler Zellen deutlich ab. Um den Effekt zu quantifizieren, wurden die Zellen, wie in II.2.3 beschrieben, mit Trypanblau-Lösung vermischt. Mit einer Neubauer-Zählkammer konnte dann die Anzahl vitaler Zellen ermittelt werden (Abbildung 1). Bei den DU145 Zellen kam es zu einer Reduktion vitaler Zellen um Faktor 6; 960000 vitalen Zellen in der DMSO-Kontrolle standen lediglich 167500 vitale Zellen in der mit Sulindac Sulfid behandelten Kultur gegenüber. Bei den PC-3 Zellen reduzierte sich die Anzahl vitaler Zellen von 675000 auf nur noch 33500 Zellen, was einer Abnahme vitaler Zellen um Faktor 20 entspricht.

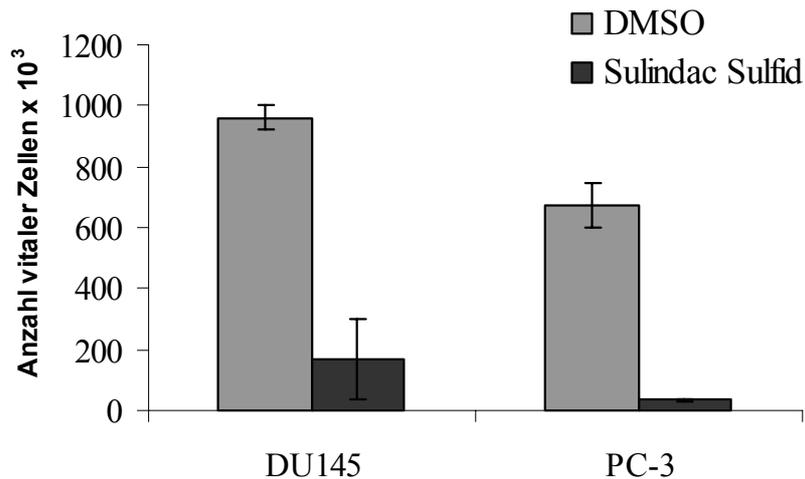


Abbildung 1. Zytometrische Analyse der Zellviabilität mittels Neubauer-Zählkammer. DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist die Anzahl der viablen Zellen in der behandelten (50 μ M Sulindac Sulfid) und der unbehandelten (DMSO) Kultur. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus fünf voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.1.2 Sulindac Sulfid hemmt die Proliferation von Prostatakarzinom-Zellen

Mit Hilfe eines Proliferationsassays, beschrieben in II.2.4, wurde der Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Proliferationsrate der Prostatakarzinom-Zellen DU145 und PC-3 untersucht. Die Zellen wurden erneut mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 24 und 48 Stunden (Abbildung 2). Es lies sich für die Sulindac Sulfid behandelten DU145 Zellen nach 24 Stunden eine Abnahme der Proliferationsrate auf 56% und nach 48 Stunden auf 39% des Kontrollansatzes feststellen. Bei den PC-3 Karzinom-Zellen die Sulindac Sulfid erhielten, reduzierte sich die Proliferation nach 24 Stunden auf 54% und nach 48 Stunden auf 39% des Kontrollniveaus.

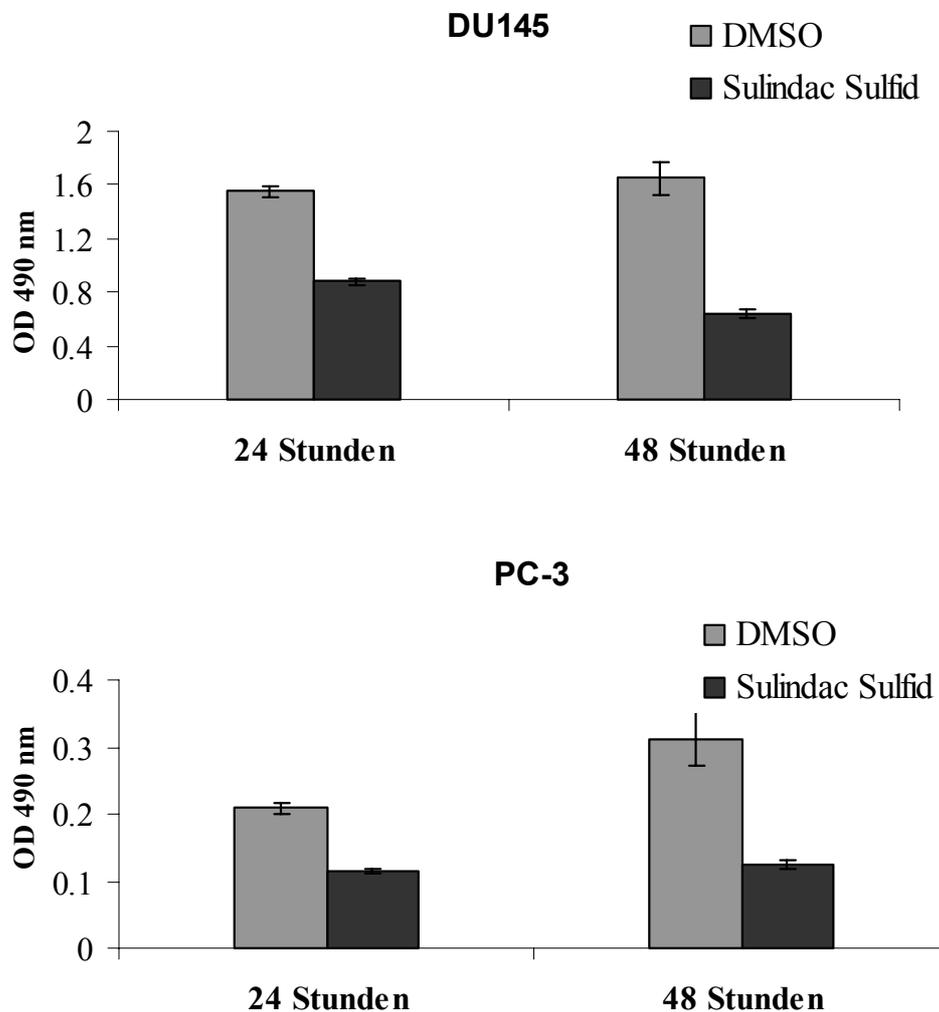


Abbildung 2. Proliferations Assay von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt, anschließend wurde der CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA, No. G3582) durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus fünf voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.1.3 Sulindac Sulfid induziert Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass Sulindac Sulfid bei Prostatakarzinom-Zellen die Anzahl der vitalen Zellen reduziert und die Proliferationsgeschwindigkeit der Karzinom-Zellen senkt, ging es darum die Ursache hierfür herauszufinden. Nekrose konnte als eine der Möglichkeiten ausgeschlossen werden, da die Sulindac Sulfid behandelten Zellen zu keinem Zeitpunkt Nekrose-Zeichen im Licht-Mikroskop erkennen liessen. Daher wurden erneut DU145 und PC-3 Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) als Kontrolle für 24 Stunden behandelt und zur Messung der Apoptose die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt, siehe II.2.5, (Abbildung 3). Sulindac Sulfid führte in DU145 Zellen zu einer 12-fachen Apoptoseinduktion verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Bei den PC-3 Karzinom-Zellen kam es zu einer 24-fach erhöhten Apoptoserate bei den Sulindac Sulfid behandelten Zellen verglichen mit den DMSO-Kontrollen.

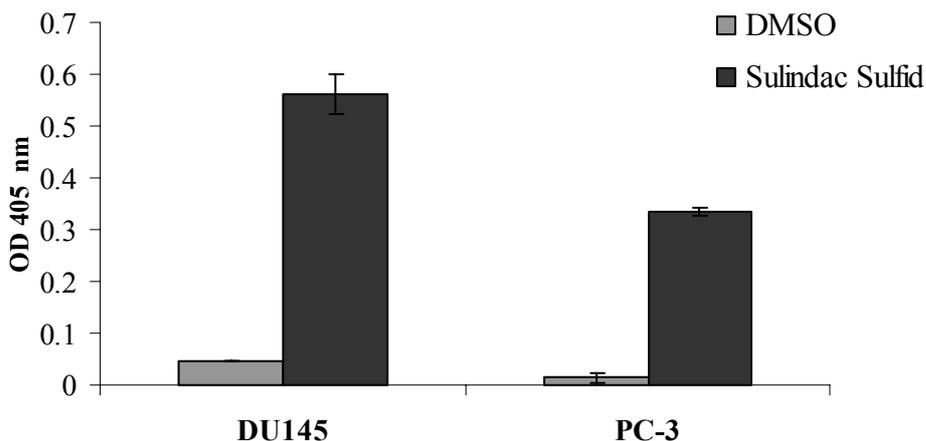


Abbildung 3. Apoptose-ELISA von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden jeweils mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe des Cells Death Detection ELISApplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] von fünf voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.1.4 Sulindac Sulfid blockiert den Zellzyklus der Prostatakarzinom-Zellen in der G2-Phase

Als eine weitere Erklärung für eine reduzierte Proliferation kommt, neben Nekrose und Apoptose, auch eine Veränderung der Zellteilung in Frage. Um herauszufinden, ob dies bei den behandelten Zellen der Fall war, wurde eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus durchgeführt, siehe II.2.6, (Abbildung 4). DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) behandelt. Anschließend wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Es zeigte sich, dass die mit Sulindac Sulfid behandelten Zellen im direkten Vergleich zu denen, die lediglich DMSO erhielten, deutlich in der G2-Phase akkumulierten. Bei den DU145 Zellen war der Anteil der Zellen in der G2-Phase 17-fach, bei den PC-3 Zellen 7-fach erhöht verglichen mit den DMSO-Kontrollen.

	DU145				PC-3		
	G1	G2	S		G1	G2	S
DMSO	49,4	0,0	50,6	%	42,9	4,1	53,0
Sulindac Sulfid	35,1	17,6	47,2		34,5	27,5	38,0

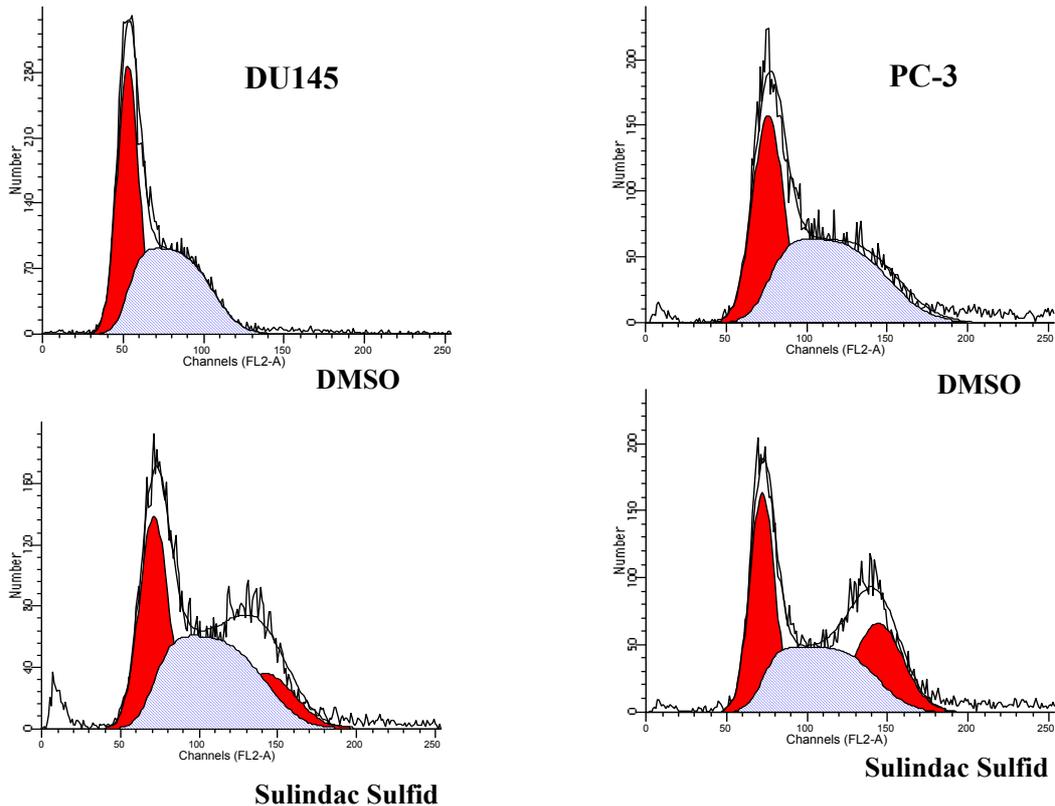


Abbildung 4. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von Sulindac Sulfid behandelten DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden jeweils mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Nach weiterer 24stündiger Inkubation wurde die Zellzyklusanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen im FACS nach ihrem DNA-Gehalt sortiert. Die obige Tabelle zeigt die prozentualen Anteile aller analysierten Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Die Abbildung darunter stellt diese Verteilung schematisch dar. Die erste Rote Spitze repräsentiert die Zellen in der G1-Phase, der schraffierte Teil die Zellen in der S-Phase und die zweite Rote Spitze stellt den Anteil der Zellen in der G2-Phase dar. Die Werte in der Tabelle sind Mittelwerte aus drei biologisch unabhängigen Experimenten, die Abbildungen sind exemplarisch ausgewählt.

3.2 Gen-Expressionsprofil von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen nach Sulindac Sulfid Behandlung

Nachdem demonstriert wurde, dass Sulindac Sulfid bei Prostatakarzinom-Zellen zu einer erheblichen Steigerung der Apoptose und zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus führt, interessierte als nächstes die Frage nach den hierfür verantwortlichen Genen. Zu diesem Zweck wurde eine Genexpressionsanalyse, siehe II.2.7 und II.2.8, von DU145 und PC-3 Zellen durchgeführt, die für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) als Kontrolle behandelt wurden. Insgesamt fanden sich 3469 Gene die durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid in den Prostatakarzinom-Zellen mindestens um Faktor 2 differentiell exprimiert wurden.

Bei der weiterführenden Analyse wurde vor allem auf diejenigen Gene Wert gelegt, die in Zusammenhang mit Apoptose, Zellzyklus-Alterationen oder beidem stehen und in beiden Zelllinien in ihrer Expression verändert waren (Tabelle 1). Eines dieser differentiell exprimierten Gene war das Growth-Arrest-and-DNA-Damage-Inducible-Gene-45, GADD45. Es existieren drei verschiedene Formen, GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ . Es fand sich eine Erhöhung der Transkription für GADD45 α in DU145 und PC-3 Zellen um Faktor 33 sowie um Faktor 4. GADD45 β wurde nicht signifikant in seiner Expression verändert. Für GADD45 γ kam es in den PC-3 Zellen zu einer transkriptionellen Erhöhung der Expression um Faktor 2, im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen. Desweiteren kam es durch Sulindac Sulfid zu einer transkriptionellen Hemmung verschiedener Zellzyklus-relevanter Gene wie Cyclin B1, Cyclin B2, Cdc25A, Cdc25C.

Ein weiteres Gen, das unsere Aufmerksamkeit erregte, war das Melanoma-Differentiation-Associated-Gene-7, MDA-7/IL24, das die höchste differentielle Expression aller Gene aufwies. In DU145 Zellen kam es durch die Sulindac Sulfid Behandlung zu einer Induktion um Faktor 121 und in PC-3 Zellen um Faktor 45.

Tabelle 1.

Auswahl einiger durch die Sulindac Sulfid Behandlung differentiell exprimierter Gene

<i>Locus Link</i>	<i>Sulindac Sulfid induziert</i>	<i>Faktor</i>	<i>SD</i>	<i>Faktor</i>	<i>SD</i>
	Growth arrest and DNA damage	DU145		PC-3	
1647	GADD45 α	32,9	13,20	3,8	0,50
4616	GADD45 β	1,3	0,37	1,5	0,17
10912	GADD45 γ	0,6	0,21	2,2	0,68
	Zellzyklus relevante Gene	DU145		PC-3	
2309	Forkhead Box O3A	9,2	6,40	4,7	1,40
1051	C/EBP β	1,7	0,03	2,7	0,16
1054	C/EBP γ	6,9	1,48	3,5	0,31
1026	p21	4,6	0,56	3,2	0,46
	Interleukine	DU145		PC-3	
11009	MDA-7/IL24	121,3	77,50	45	1,33
3570	Interleukin 6 (IL6)	1,4	4,00	9,8	0,28
<i>Locus Link</i>	<i>Sulindac Sulfid inhibiert</i>	<i>Faktor</i>	<i>SD</i>	<i>Faktor</i>	<i>SD</i>
	Zellzyklus relevante Gene	DU145		PC-3	
993	Ccd25A	1,3	0,45	4,7	0,01
995	Cdc25C	1,2	0,50	3,3	0,05
983	CDK1	2,1	0,23	8,6	0,02
891	Cyclin B1	3,0	0,03	5,8	0,02
9133	Cyclin B2	4,0	0,05	4,9	0,02

DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) der Faktoren (Faktor) differentieller Gen-Expression. Es wurden von jedem Ansatz zwei biologisch unabhängige GenChips[®] analysiert.

3.2.1 RT-PCR und Western Blot der mRNA und Proteine der in der Gen-Expressionsanalyse differentiell exprimierten Gene

Um die durch die Affymetrix GeneChips[®] gewonnenen Daten zu verifizieren, wurde von den Schlüsselgenen die für Apoptose und Zellzyklus-Effekte verantwortlich gemacht wurden RT-PCRs und Western Blots durchgeführt, II.2.9 und II.2.12. Dazu wurden erneut DU145 und PC-3 Zellen für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) als Kontrolle behandelt. RT-PCR des GADD45 α -Genes zeigte in DU145 Zellen eine Erhöhung der Transkription um Faktor 17 und in den PC-3 Zellen um Faktor 6. Für GADD45 γ zeigte sich eine Erhöhung der Transkription in DU145 und PC-3 Zellen um

Faktor 2 und Faktor 3 (Abbildung 5). Auf Proteinebene konnte auch eine deutliche Zunahme der Translation beider Gene festgestellt werden. GADD45 β wurde erneut nicht signifikant differentiell durch die Sulindac Sulfid Behandlung exprimiert (Abbildung 6).

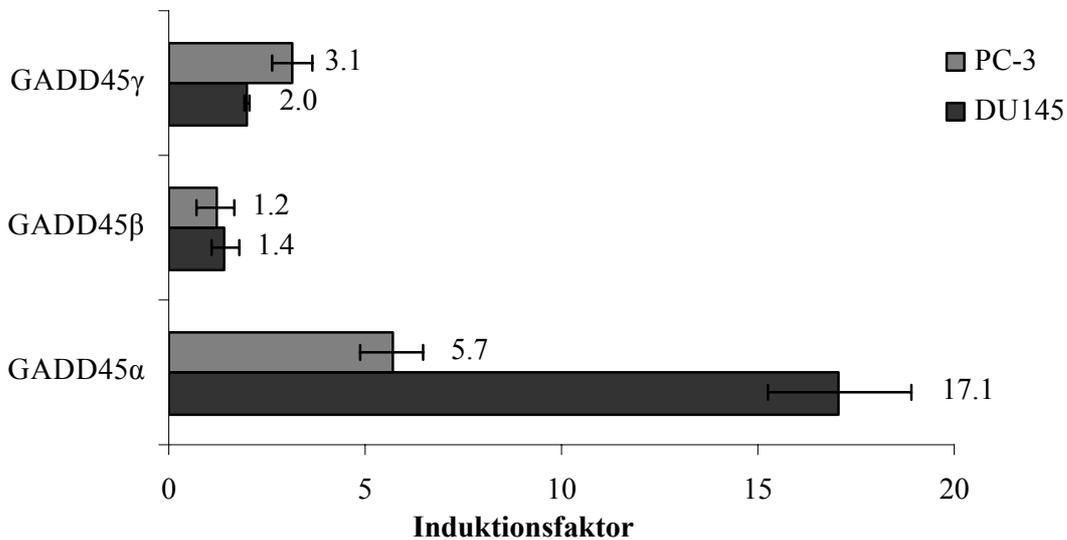


Abbildung 5. RT-PCR von GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) der jeweiligen Gene durch die Sulindac Sulfid Behandlung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

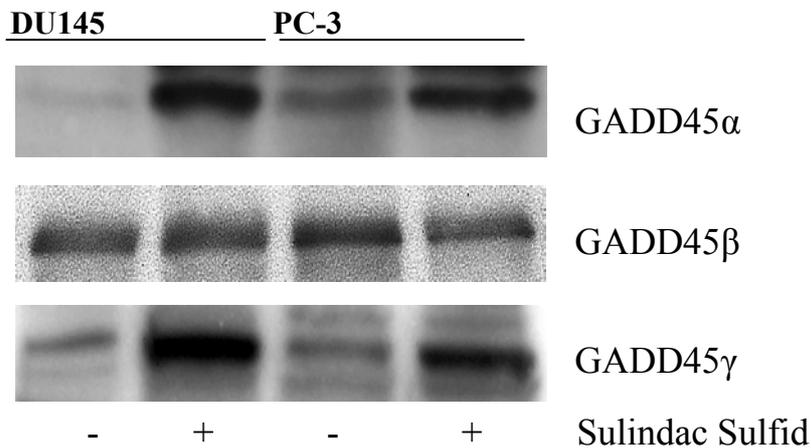


Abbildung 6. Western Blot von GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit dem Gesamtprotein wurden dann Western Blots durchgeführt.

Auch für MDA-7/IL24 wurden RT-PCRs durchgeführt und es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid in DU145 Zellen die Transkription um Faktor 117 und in PC-

3 Zellen um Faktor 33 anstieg (Abbildung 7). Es konnte kein Western Blot durchgeführt werden, da kein funktionierender Antikörper für MDA-7/IL24 erhältlich war.

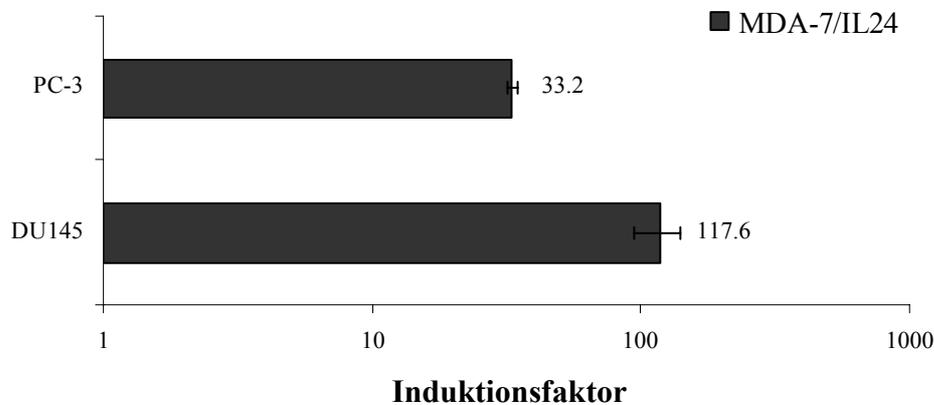


Abbildung 7. RT-PCR von MDA-7/IL24 in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) von MDA-7/IL24 durch die Sulindac Sulfid Behandlung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

Für Interleukin 6 (IL6) wurden ebenfalls RT-PCRs durchgeführt und es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid die Transkription in DU145 Zellen um Faktor 3 und in PC-3 Zellen um Faktor 25 zunahm, verglichen mit den DMSO-Kontrollen (Abbildung 8).



Abbildung 8. RT-PCR von Interleukin 6 (IL6) in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) von IL6 durch die Sulindac Sulfid Behandlung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

Für die weiteren Zellzyklus-relevanten Gene, die in den GeneChip® Experimenten aufgrund der Sulindac Sulfid Behandlung eine veränderte Transkription zeigten, wurden Western Blots durchgeführt (Abbildung 9). Hier korrelierte eine verminderte Transkription der Gene Cyclin B1, Cyclin B2 und Cdc25C in den GeneChip® Experimenten mit einer verminderten Translation selbiger, wohingegen p21, das durch die Sulindac Sulfid Gabe in den Zellen vermehrt exprimiert wurde, auch auf Proteinebene in höherer Konzentration vorlag.

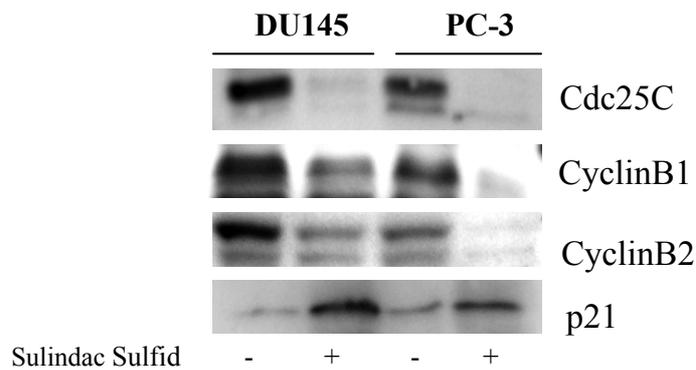


Abbildung 9. Western Blot von Zellzyklus relevanten Genen in DU145 und PC-3 Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit dem Gesamtprotein der Zellen wurden dann die Western Blots durchgeführt.

3.3 Rolle von GADD45 und JNK bei der Apoptose in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen nach Sulindac Sulfid Gabe

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GADD45 α und GADD45 γ durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene, in deutlich höheren Konzentrationen in den Zellen vorkommen, wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss diese Expressionserhöhung auf die beobachtete Apoptose in den Prostatakarzinom-Zellen hatte. Zudem war von Interesse, ob die c-Jun-NH₂-terminal-Kinase (JNK), ein möglicher Signaltransduktionsweg der GADD45 α - und GADD45 γ -vermittelten Apoptose, in den Prostatakarzinom-Zellen aktiviert wird.

Es zeigte sich das die Sulindac Sulfid induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen durch eine Aktivierung der JNK zustande kommt. Diese JNK-Aktivierung ist wiederum abhängig von der GADD45 α - und GADD45 γ -Induktion.

3.3.1 JNK vermittelt die Sulindac Sulfid-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen

Es wurde zunächst untersucht, ob die JNK in der Sulindac Sulfid vermittelten Apoptose eine Rolle spielt. Dazu wurden erneut DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder einer äquivalenten DMSO-Konzentration als Kontrolle für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde das Gesamtprotein gesammelt und die Aktivität der JNK bestimmt, siehe II.13.1 (Abbildung 10). Es fand sich eine deutlich höhere Aktivität der JNK und ein damit verbundener Anstieg phosphorylierten c-Juns, dem Substrat der JNK, in den mit Sulindac Sulfid behandelten Zellen, verglichen mit den Zellen, die mit DMSO behandelt wurden.

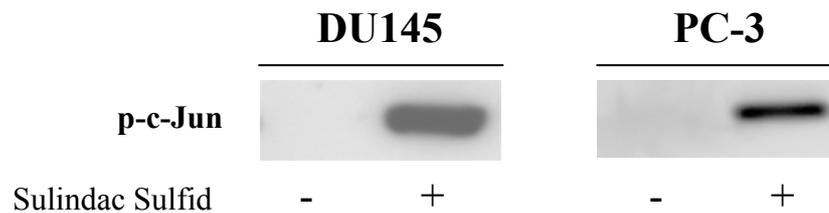


Abbildung 10. JNK Assay von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit dem Gesamtprotein wurde nach Immunopräzipitation der JNK der Kinase-Assay durchgeführt.

3.3.2 Die Aktivierung der JNK ist ein wichtiger Schritt für die Sulindac Sulfid vermittelte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen

Um zu sehen, ob die Sulindac Sulfid-vermittelte Zunahme der Apoptose tatsächlich von der erhöhten JNK-Aktivität abhängt, wurden DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit 50 µM Sulindac Sulfid, DMSO (äquivalente Konzentration) und 50 µM Sulindac Sulfid plus eines Inhibitors der JNK (40 nm) behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate der Zellen (Abbildung 11) bestimmt. Erneut kam es bei Sulindac Sulfid behandelten Zellen zu einer Induktion der Apoptose. Bei DU145 Zellen um Faktor 35, sowie bei PC-3 Zellen um Faktor 14, verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Interessanterweise konnte durch Zugabe des JNK-Inhibitors die Sulindac Sulfid vermittelte Apoptose in DU145 Zellen um 56% und in den PC-3 Zellen um 40% reduziert werden.

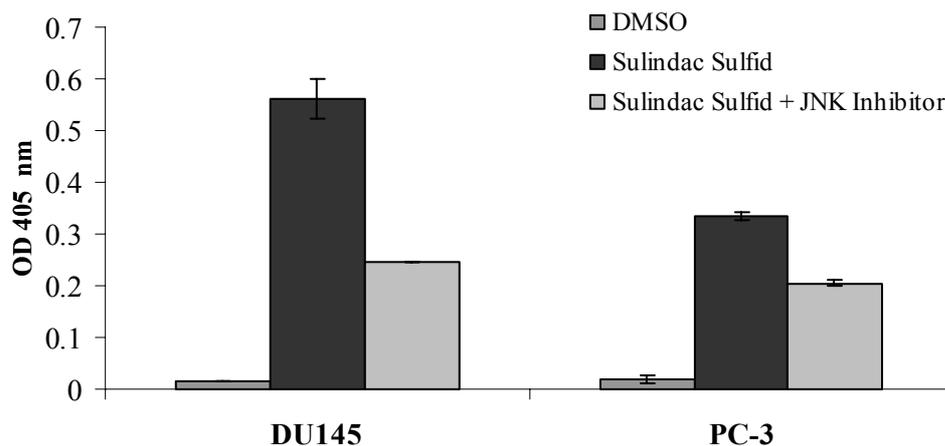


Abbildung 11. Apoptose ELISA von DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden mit 50 μ M Sulindac Sulfid, DMSO oder 50 μ M Sulindac Sulfid plus eines Inhibitors der JNK für 24 Stunden inkubiert. Mit Hilfe des Cells Death Detection ELISApplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits wurde dann die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.3.3 GADD45 α und GADD45 γ kontrollieren die Sulindac Sulfid-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen

Um einen möglichen Einfluss von GADD45 α und GADD45 γ auf die Sulindac Sulfid induzierte Aktivierung der JNK und der Apoptose zu untersuchen, wurden eben diese beiden Gene gezielt in PC-3 Zellen mit Hilfe der siRNA-Technik, siehe II.2.11, ausgeschaltet. Dazu wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der die entsprechenden siRNA-Stränge für GADD45 α (LV-siGADD45 α), GADD45 γ (LV-siGADD45 γ), sowie GFP (LV-siGFP; grünfluoreszierendes-Protein) enthält. Die Infektion von Karzinom-Zellen mit LV-siGFP war als Kontrolle nötig, um einen eventuellen Effekt auf die Zellen zu demaskieren, der lediglich durch den Infektionsprozess oder den Gentransfer mit der dadurch verbundenen Transkription der siRNA verbunden war. Nach erfolgter Infektion wurden die Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde die Apoptoserate der Zellen gemessen (Abbildung 12). Es zeigte sich in den mit Sulindac Sulfid behandelten LV-siGFP (GADD45 α - und GADD45 γ -Expression möglich) PC-3 Prostatakarzinom-Zellen eine Apoptoseinduktion um Faktor 14, im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen. Die Karzinom-Zellen die nicht in der Lage waren GADD45 α oder GADD45 γ zu transkribieren (LV-siGADD45 α und LV-siGADD45 γ), wurden ebenfalls mit 50 μ M Sulindac Sulfid für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Es zeigte sich, im Vergleich zu den mit dem LV-siGFP infizierten Zellen, die

ebenfalls 50 μ M Sulindac Sulfid erhalten hatten, eine 98%ige Reduktion der Apoptoserate in LV-siGADD45 α Zellen und eine 83%ige Reduktion der Apoptose in LV-siGADD45 γ Zellen.

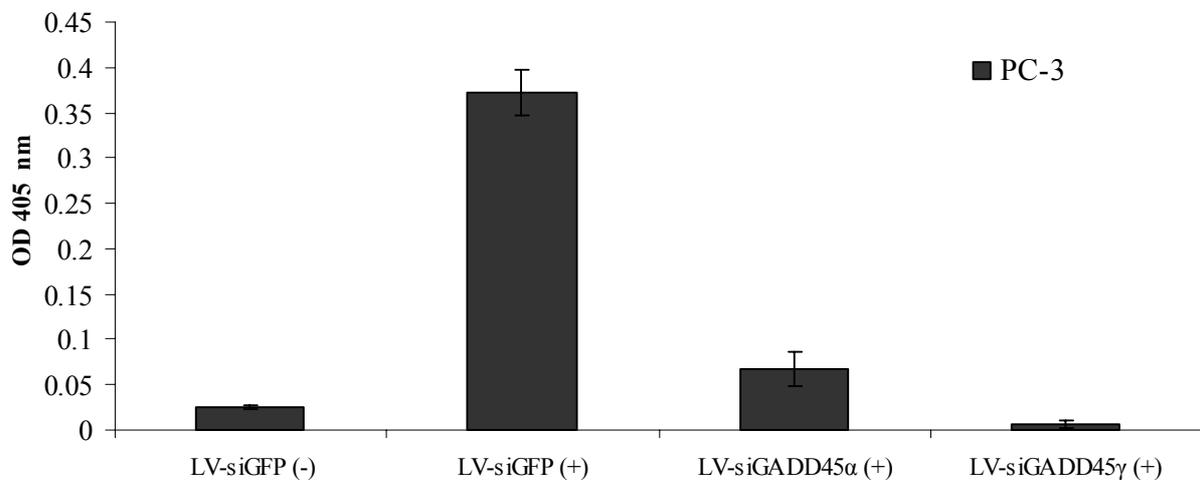


Abbildung 12. Apoptose ELISA von LV-siRNA infizierten und mit Sulindac Sulfid behandelten PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden siRNA-Lentiviren (LV-siGFP, LV-siGADD45 α und LV-siGADD45 γ) infiziert und nach erfolgreichem Ausschalten der gewünschten Gene (GADD45 α , GADD45 γ , GFP) für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit Hilfe des Cells Death Detection ELISApplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits wurde dann die Apoptoserate der Zellen ermittelt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.3.4 GADD45 α und GADD45 γ kontrollieren die Sulindac Sulfid vermittelte JNK Aktivierung und die damit verbundene Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen

Es wurde bisher gezeigt, dass die Behandlung der DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit Sulindac Sulfid unter anderem zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt. Diese Apoptose ist sowohl abhängig von der Zunahme der GADD45 α - und GADD45 γ -Expression, als auch von einer Aktivierung der JNK. Die nächste Frage, die gestellt wurde war nun, ob die Aktivierung der JNK von den beiden GADD45 Genen gesteuert wird. Dazu wurden wieder die GADD45 α - und GADD45 γ -Gene in den DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit Hilfe der siRNA-Lentiviren, siehe II.2.11, ausgeschaltet. Im folgenden wurden die Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) behandelt und es wurde die Aktivität der JNK gemessen, siehe II.2.13.1 (Abbildung 13). Es zeigte sich im Kinase-Assay eine erneute Zunahme phosphorylierten c-Juns bei den Sulindac Sulfid behandelten LV-siGFP (Kontrolle, GADD45 α und GADD45 γ nicht inhibiert) Prostatakarzinom-Zellen

verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Allerdings zeigte der Kinase-Assay nur eine geringe Erhöhung der JNK-Aktivität und damit der Menge an phosphoryliertem c-Jun in den LV-siGADD45 α (GADD45 α ausgeschaltet) und LV-siGADD45 γ (GADD45 γ ausgeschaltet) Prostatakarzinom-Zellen.

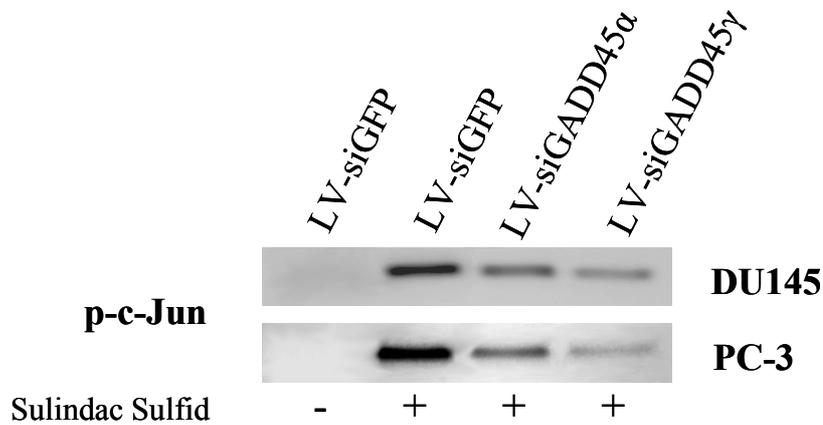


Abbildung 13. JNK Assay LV-siRNA infizierter und mit Sulindac Sulfid behandelter Prostatakarzinom-Zellen DU145 und PC-3.

Die Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden siRNA-Lentiviren (LV-siGFP, LV-siGADD45 α und LV-siGADD45 γ) infiziert und nach erfolgreichem Ausschalten der gewünschten Gene (GADD45 α , GADD45 γ , GFP) für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit dem Gesamtprotein wurde nach Immunopräzipitation der JNK der Kinase-Assay durchgeführt.

3.4 Sulindac Sulfid vermittelt einen G2/M Zellzyklus-Arrest in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen via GADD45 α und GADD45 γ

Wie bereits oben gezeigt, wurden verschiedene Proteine die für die Progression der Zellen von der G2- in die M-Phase von Bedeutung sind durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid vermindert synthetisiert.

Zellzyklus-Checkpoints bestehen aus Proteinkinasen, den CDK/Cyclin Komplexen. Die katalytische Untereinheit dieser Komplexe, die Cyclin-abhängige Kinase (CDK), ist nur aktiv, wenn sie mit der regulatorischen Cyclin Untereinheit verbunden ist. Der G2/M-Checkpoint wird hauptsächlich von dem CDK1/Cyclin-B Komplex gebildet. Nur wenn dieser Komplex aus CDK1 und dem dazugehörigen Cyclin B (Cyclin B1 oder Cyclin B2) aktiv ist, kann die Zelle in die Mitose eintreten. Es gibt eine Vielzahl regulatorischer Proteine die auf diesen Proteinkomplex einwirken können.

Es war vor allem interessant, welche Rolle GADD45 bei dem Sulindac Sulfid vermittelten G2-Arrest spielt. Dazu wurden erneut GADD45 α und GADD45 γ mit Hilfe der siRNA-Lentiviren in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen ausgeschaltet, die Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) als Kontrolle behandelt und die Aktivität der CDK1-Kinase untersucht, siehe II.2.13.2 (Abbildung 14). Es kam durch die Sulindac Sulfid Behandlung zu einer deutlichen Hemmung der Histon-H1-Phosphorylierung, dem Substrat der aktiven CDK1-Kinase, bei den LV-siGFP Prostatakarzinomzellen (GADD45 α - und GADD45 γ -Transkription nicht ausgeschaltet) verglichen mit den DMSO-Kontrollen.

Bei den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen die nicht in der Lage waren GADD45 α und GADD45 γ in erhöhter Konzentration zu transkribieren (LV-siGADD45 α und LV-siGADD45 γ), war wiederum, ähnlich den DMSO-Kontrollen, ein deutlich höherer Anteil von phosphoryliertem Histon-H1 zu finden verglichen mit Zellen die GADD45 α und GADD45 γ vermehrt exprimieren konnten (LV-siGFP).

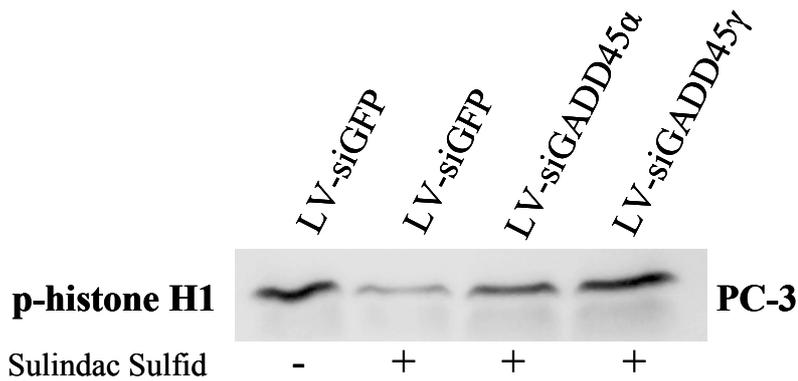


Abbildung 14. CDK1-Kinase Assay LV-siRNA infizierter und mit Sulindac Sulfid behandelter PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die PC-3 Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden siRNA-Lentiviren (LV-siGFP, LV-siGADD45 α und LV-siGADD45 γ) infiziert und nach erfolgreichem Ausschalten der gewünschten Gene (GADD45 α , GADD45 γ , GFP) für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Mit dem Gesamtprotein wurde nach Immunopräzipitation der CDK1-Kinase der Kinase-Assay durchgeführt.

3.5 MDA-7/IL24 steuert die GADD45 α und GADD45 γ vermittelte Apoptose und den Eingriff in den Zellzyklus durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

Nachdem die 118-fache (DU145), sowie 33-fache (PC-3) Erhöhung der Transkription von MDA-7/IL24 mittels RT-PCR bestätigt war, ging es um die Frage, ob MDA-7/IL24 auch funktionell eine Bedeutung zukommt.

MDA-7/IL24 ist das übergeordnete Schlüsselgen bei den Sulindac Sulfid vermittelten karzinomhemmenden Effekten. Durch die Erhöhung der MDA-7/IL24-Transkription kommt es zu einer Induktion der GADD45 α - und GADD45 γ -Gene. Diese steuern dann die Sulindac Sulfid vermittelte Apoptose und den Zellzyklus-Arrest.

3.5.1 Die alleinige MDA-7/IL24-Überexpression mit einem Adenovirus-Vektor reicht aus, um in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen Apoptose zu induzieren

Als erstes interessierte, ob die alleinige Überexpression von MDA-7/IL24 in Prostatakarzinom-Zellen ausreicht, um in diesen Zellen Apoptose auszulösen. Daher wurden DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit den Adenovirus Konstrukten die für MDA-7/IL24, AdCMV_MDA-7/IL24, und β -Galaktosidase, AdCMV_ β -Galaktosidase, kodieren infiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48, 72 und 96 Stunden inkubiert und es wurde die Apoptoserate der Zellen gemessen (Abbildung 15). Für DU145 zeigte sich nach 48 Stunden eine Apoptoseinduktion um Faktor 3, nach 72 Stunden um Faktor 5 und nach 96 Stunden um Faktor 7. In PC-3 Prostatakarzinom-Zellen kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate nach 48 Stunden um Faktor 4, nach 72 Stunden ebenfalls um Faktor 4 und nach 96 Stunden um Faktor 6.

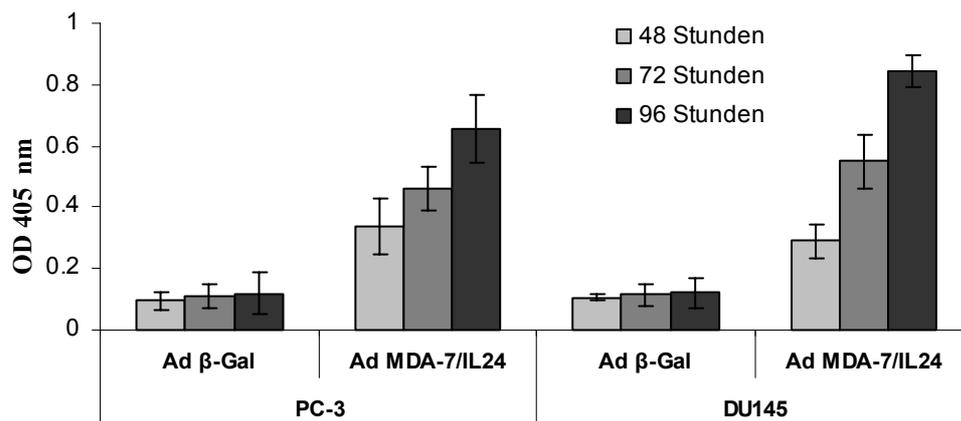


Abbildung 15. Apoptose ELISA von Adenovirus infizierten DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden zunächst mit den AdCMV_β-Galaktosidase (Ad β-Gal, Kontrolle) und AdCMV_MDA-7/IL24-Viren (Ad MDA-7/IL24) infiziert und für 48, 72, sowie 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Cells Death Detection ELISaplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [± Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.5.2 MDA-7/IL24 vermittelt, zumindest teilweise, die Sulindac Sulfid induzierte Apoptose in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

Als nächstes wurde die Rolle von MDA-7/IL24 bei der Apoptoseinduktion durch Sulindac Sulfid untersucht. Daher wurde diesmal die Expression von MDA-7/IL24 und GFP (grünfluoreszierendes-Protein) in den Kontrollen, mit Hilfe der siRNA-Lentiviren (LV-siMDA7/IL24, LV-siGFP) ausgeschaltet. Nach erfolgreichem Gentransfer wurden die PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit 50 μM Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) für 24 Stunden behandelt und deren Apoptoserate wurde untersucht (Abbildung 16). Es zeigte sich eine deutliche Apoptoseinduktion um Faktor 7 in den Sulindac Sulfid behandelten LV-siGFP PC-3 Prostatakarzinom-Zellen (MDA-7/IL24-Expression nicht gehemmt). Bei den Prostatakarzinom-Zellen die nicht in der Lage waren MDA-7/IL24 zu transkribieren (LV-siMDA-7/IL24), kam es durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid lediglich zu einer Apoptoseinduktion um Faktor 3, was einer Reduktion der Apoptoserate von 56% entspricht.

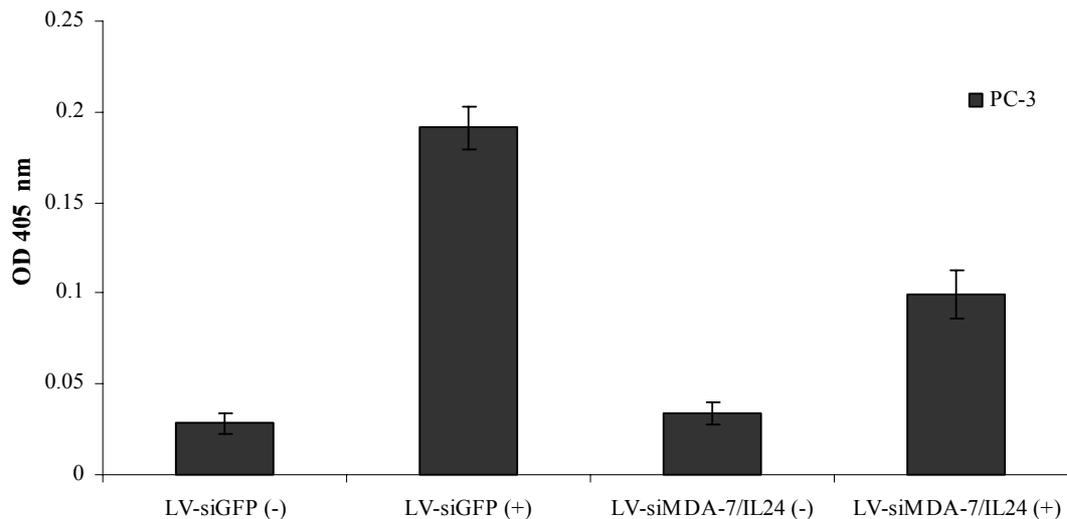


Abbildung 16. Apoptose ELISA von LV-siRNA infizierten und mit Sulindac Sulfid behandelten PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden siRNA-Lentiviren (LV-siGFP, LV-siMDA-7/IL24) infiziert und nach erfolgreichem Ausschalten der gewünschten Gene (MDA-7/IL24, GFP) für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe des Cells Death Detection ELISApplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits die Apoptoserate der Zellen bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.5.3 MDA-7/IL24 induziert den Sulindac Sulfid vermittelten Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MDA-7/IL24, neben GADD45 α und GADD45 γ , eines der Schlüsseltgene bei der Sulindac Sulfid induzierten Apoptose ist, ging es darum herauszufinden, ob es auch Einfluss auf die Sulindac Sulfid vermittelten Zellzyklus-Veränderungen hat. Daher wurden erneut MDA-7/IL24 und GFP für die Kontrollen, gezielt mit Hilfe der siRNA-Lentiviren ausgeschaltet. Nach erfolgreicher Infektion wurden die PC-3 Prostatakarzinom-Zellen mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) für 24 Stunden behandelt. Dann wurde das Medium der Zellen ausgetauscht, selbige für weitere 24 Stunden inkubiert und eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse durchgeführt (Tabelle 2). Es ist deutlich zu erkennen, dass Sulindac Sulfid bei LV-siGFP PC-3 Prostatakarzinom-Zellen (MDA-7/IL24-Expression nicht gehemmt) zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase führt. Im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen, wo sich zum Zeitpunkt der Analyse nur 2,8% der Prostatakarzinom-Zellen in der G2-Phase befanden,

akkumulierten diese auf 23,6% durch die Sulindac Sulfid Behandlung. Dies entspricht einer Zunahme von Zellen in der G2-Phase um Faktor 8.

Bei den PC-3 Prostatakarzinom-Zellen die nicht in der Lage waren MDA-7/IL24 vermehrt zu exprimieren (LV-siMDA-7/IL24) befanden sich bei den DMSO-Kontrollen 6,9% der Zellen in der G2-Phase. Durch Zugabe von Sulindac Sulfid akkumulierten diese jedoch nur auf 9,4%. Dies ist ein Anstieg der Zellzahl in der G2-Phase um Faktor 1,4. Dies entspricht insgesamt einer 60%igen Reduktion des Sulindac Sulfid vermittelten G2-Zellzyklus-Arrestes bei ausgeschalteter MDA-7/IL24 Transkription.

Tabelle 2.

Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

PC-3	%		
	G1-Phase	G2-Phase	S-Phase
siGFP (-)	45,1	2,8	52,1
siGFP (+)	28,5	23,6	35,0
siMDA-7/IL24 (-)	44,4	6,9	48,7
siMDA-7/IL24 (+)	43,5	9,4	47,1

Die Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden siRNA-Lentiviren (LV-siGFP, LV-siMDA-7/IL24) infiziert und nach erfolgreichem Ausschalten der gewünschten Gene (MDA-7/IL24, GFP) für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid (+) oder DMSO (-) behandelt. Nach weiterer 24stündiger Inkubation wurde die Zellzyklusanalyse via FACS durchgeführt. Die gezeigten Zahlen sind der prozentuale Anteil aller analysierten Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5.4 MDA-7/IL24 vermittelt die GADD45 α - und GADD45 γ -Expression in DU145 Prostatakarzinom-Zellen

Um herauszufinden ob MDA-7/IL24 die Expression von GADD45 α und GADD45 γ eventuell beeinflusst, wurden DU145 Prostatakarzinom-Zellen erneut mit den Adenovirus Konstrukten die für MDA-7/IL24 (AdCMV_MDA-7/IL24), sowie β -Galaktosidase (AdCMV_ β -Galaktosidase) als Kontrollen, kodieren infiziert. Nach erfolgreicher Infektion wurden die Zellen für 72, sowie 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurden mittels RT-PCR die Expressionsniveaus von GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ untersucht (Abbildung 17).

Durch Infektion der DU145 Prostatakarzinom-Zellen mit den AdCMV_MDA-7/IL24-Viren (exprimiert MDA-7/IL24) ergab sich für GADD45 α nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden eine Erhöhung der Transkription um Faktor 5,5 und um Faktor 13,5 nach 96-stündiger Inkubationszeit verglichen mit den AdCMV_ β -Galaktosidase (exprimiert β -Galaktosidase) infizierten Zellen. Für GADD45 γ kam es bei den AdCMV_MDA-7/IL24-Virus infizierten Zellen zu einer Induktion der Transkription nach 72 Stunden um Faktor 2 und nach 96 Stunden um Faktor 4,2 verglichen mit den AdCMV_ β -Galaktosidase infizierten Zellen. GADD45 β wurde nur minimal durch die erhöhte MDA-7/IL24-Expression in seiner Transkription verändert.

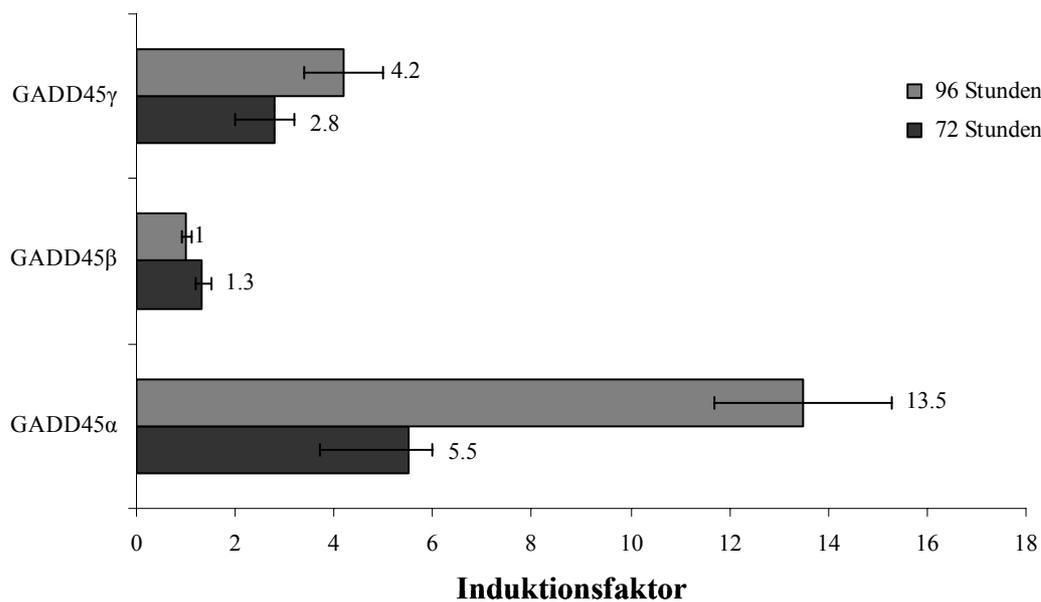


Abbildung 17. RT-PCRs von GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ in DU145 Prostatakarzinom-Zellen bei gesteigerter MDA-7/IL24 Expression.

Die DU145 Zellen wurden zunächst mit den AdCMV_ β -Galaktosidase (Kontrolle) und AdCMV_MDA-7/IL24-Viren (MDA-7/IL24) infiziert und für 72, sowie 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mittels RT-PCR die Expression der GADD45 α , β und γ Gene in beiden Gruppen untersucht. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) von GADD45 α , β und γ durch die gesteigerte MDA-7/IL24-Expression (Infektion mit AdCMV_MDA-7/IL24-Viren) verglichen mit den Expressionsniveaus in den AdCMV_ β -Galaktosidase (Kontrolle) infizierten Zellen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.5.5 MDA-7/IL24 kontrolliert die Sulindac Sulfid-vermittelte GADD45 α - und GADD45 γ -Überexpression in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass die Sulindac Sulfid vermittelten Effekte auf die Prostatakarzinom-Zellen abhängig von der erhöhten MDA-7/IL24-Expression sind und das sowohl Apoptose, als auch Zellzyklus-Arrest durch GADD45 α und GADD45 γ gesteuert werden, wurde nun untersucht, ob es den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen möglich ist GADD45 α und GADD45 γ zu transkribieren, wenn MDA-7/IL24 gezielt in den Zellen ausgeschaltet wird. Dazu wurde erneut die siRNA-Technik genutzt. Mit Hilfe der LV-siMDA-7/IL24 wurde die Transkription von MDA-7/IL24 in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen ausgeschaltet. Die Kontrollen wurden mit LV-siGFP (grün-fluoreszierendes-Protein) infiziert. Nach Infektion der PC-3 Prostatakarzinom-Zellen wurden selbige für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) behandelt. Dann wurden RT-PCRs für GADD45 α und GADD45 γ durchgeführt (Abbildung 18). Es zeigte sich bei den mit 50 μ M Sulindac Sulfid behandelten PC-3 Prostatakarzinom-Zellen deren MDA-7/IL24-Expression intakt war (LV-siGFP), eine Induktion von GADD45 α um Faktor 6,5 und von GADD45 γ um Faktor 3,5 verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Bei Prostatakarzinom-Zellen die nicht in der Lage waren MDA-7/IL24 vermehrt zu exprimieren (LV-siMDA-7/IL24), beobachteten wir bei den Sulindac Sulfid behandelten Zellen eine nicht signifikante Erhöhung der Transkription von GADD45 α um Faktor 1,8 und von GADD45 γ um Faktor 1,4 verglichen mit den DMSO-Kontrollen.

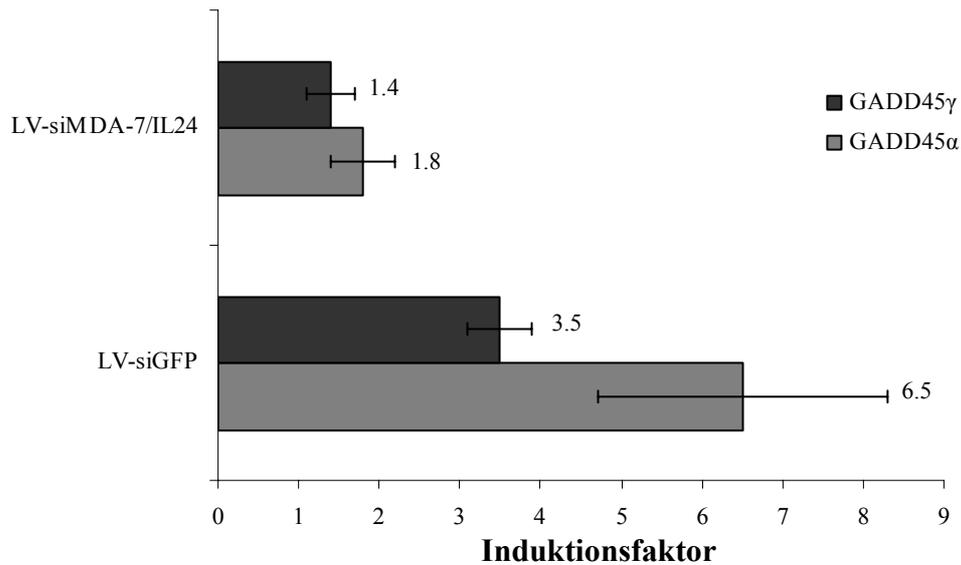


Abbildung 18. RT-PCRs für GADD45 α und GADD45 γ in PC-3 Prostatakarzinom-Zellen.

Die PC-3 Zellen wurden zunächst mit den siRNA Lentiviren gegen MDA-7/IL24 (LV-siMDA-7/IL24) und GFP (LV-siGFP) infiziert und anschließend für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Nach der RNA-Extraktion wurde mit Hilfe der RT-PCR die Expression der GADD45 α und GADD45 γ Gene überprüft. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Expression (Induktionsfaktor) von GADD45 α und GADD45 γ durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid, sowohl bei intakter (LV-siGFP), also auch bei aufgehobener (LV-siMDA-7/IL24) MDA-7/IL24 Transkription verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.6 Wirkung von Sulindac Sulfid auf Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen

Es wurde untersucht, ob Sulindac Sulfid auch in anderen Karzinom-Zellen eine ähnliche Wirkung wie in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen hat. Daher wurden weitere 18 Zelllinien die von verschiedenen Prostata- (CW19, CW22, LNCAP, DU145, PC3), Brust- (MDA231, MCF-7, SKBR3, MDA453, MDA435), Magen- (Kato, SNU1, SNU16, NCI, AGS), sowie Nierenkarzinomen (Caki, UOK, A704, ACHN, A498) gewonnen wurden mit 50 μ M Sulindac Sulfid für 24 Stunden behandelt. Weitere 3 Zelllinien die von nicht-neoplastischem Gewebe (Pankreas (MS-1), Brustdrüse (F12), und Nierenparenchym (HEK293)) stammen, wurden ebenfalls mit der angegebenen Konzentration Sulindac Sulfid behandelt. Es zeigte sich, dass Sulindac Sulfid bei insgesamt 15 der 20 Karzinomzelllinien zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose führte. Dies ging einher mit einer deutlichen Steigerung der MDA-7/IL24-Transkription und einer damit verbundenen Zunahme der GADD45 α - und GADD45 γ -Expression.

3.6.1 Sulindac Sulfid führt zu einer gesteigerten Apoptoserate in verschiedenen Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen

Die Prostatakarzinom-Zellen CW19, CW22, LNCAP, DU145, PC-3; die Brustkarzinom-Zellen MDA231, MCF-7, SKBR3, MDA453, MDA435; die Nierenkarzinom-Zellen Caki, UOK, A704, ACHN, A498; die Magenkarzinom-Zellen Kato, SNU1, SNU16, NCI, AGS sowie Zellen gesunden Gewebes, MS-1 (Pankreas), F12 (Brustdrüse) HEK293 (Nierenparenchym) wurden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO (äquivalente Konzentration) für 24 Stunden behandelt (Abbildung 19). Danach wurde die Apoptose in den behandelten Zellen untersucht und es fand sich eine Steigerung der Apoptoserate bei Prostatakarzinom-Zellen CW19 um Faktor 6, bei LNCAP um Faktor 3, bei DU145 um Faktor 13, bei PC-3 um Faktor 6. Bei den Brustkarzinom-Zellen kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate bei MCF-7 um Faktor 3, bei SKBR3 um Faktor 5, bei MDA453 um Faktor 7, bei MDA435 um Faktor 6. Bei den Nierenkarzinom-Zellen kam es zu Steigerung der Apoptoserate bei Caki um Faktor 4, bei UOK um Faktor 6, bei ACHN um Faktor 2, bei A498 um Faktor 4. Bei den Magenkarzinom-Zellen kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate bei Kato um Faktor 6, bei SNU1 um Faktor 2, bei AGS um Faktor 7. Bei den Prostatakarzinom-Zellen CW22, den Brustkarzinom-Zellen MDA231, den Nierenkarzinom-

Zellen A704, den Magenkarzinom-Zellen SNU16 und NCI, sowie allen Zellen gesunden Gewebes, MS-1, F12, HEK293, kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptoserate.

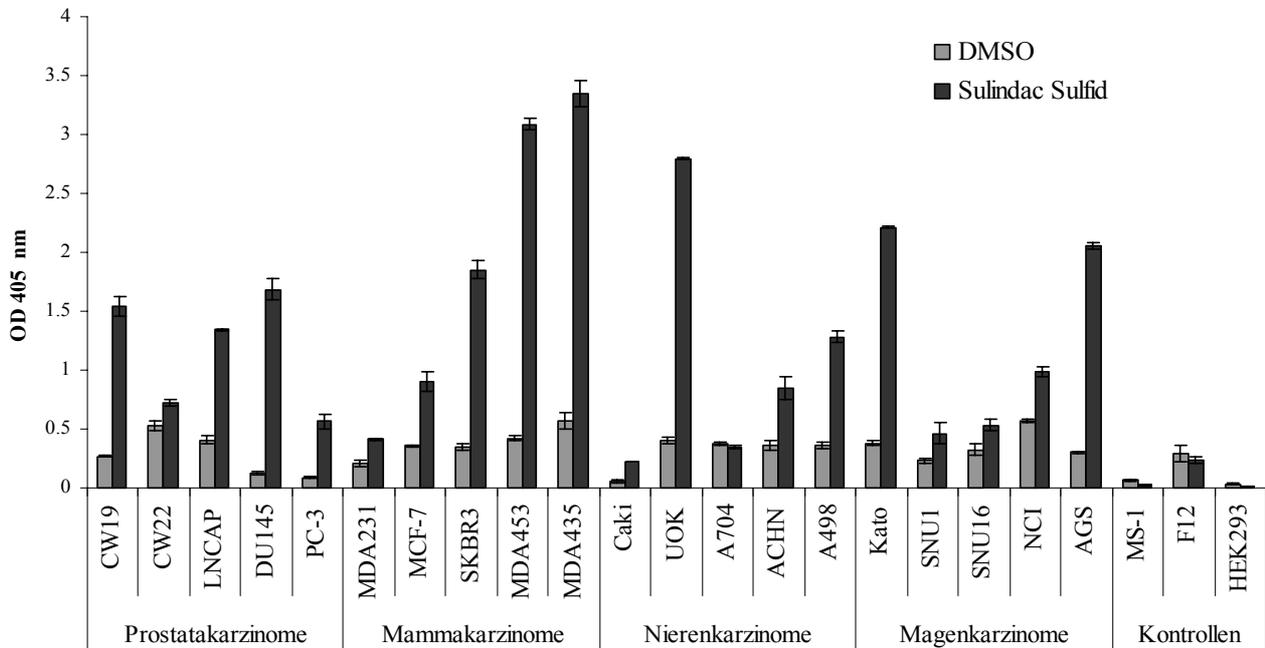


Abbildung 19. Apoptose-ELISA verschiedener mit Sulindac Sulfid und DMSO behandelter Karzinomzelllinien und gesunder, nicht neoplastischer Kontrollen.

Die Zellen wurden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO für 24 Stunden behandelt. Dann wurde mit Hilfe des Cells Death Detection ELISaplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits die Apoptoserate der Zellen ermittelt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.6.2 Sulindac Sulfid führt zu einer erhöhten Expression von MDA-7/IL24, GADD45 α und GADD45 γ in verschiedenen Prostata-, Magen-, Brust-, sowie Nierenkarzinom-Zellen

Es war von Interesse, ob die Sulindac Sulfid vermittelte Apoptoseinduktion in den verschiedenen Prostata- (CW19, LNCAP, DU145, PC-3), Magen- (Kato, SNU1, AGS), Brust- (MCF-7, SKBR3, MDA453, MDA435), sowie Nierenkarzinom-Zellen (UOK, ACHN, A498) mit einer gesteigerten MDA-7/IL24-, GADD45 α - und GADD45 γ -Expression einhergeht. Daher wurden jeweils 2 Karzinom-Zellen jeder Entität bei denen es durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid zu einer gesteigerten Apoptoserate kam, je eine Zelllinie jeder Entität bei der es zu keiner signifikanten Apoptoseinduktion kam und 2 Zelllinien die nicht-tumorösen gesunden Gewebes entstammen, erneut mit 50 μ M Sulindac Sulfid und DMSO (äquivalente Konzentration) für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die MDA-7/IL24-, GADD45 α - und GADD45 γ -Expression mittels RT-PCRs untersucht (Abbildung 20, Abbildung 21, Tabelle 4).

Bei den Prostatakarzinom-Zellen CW19, sowie DU145 fanden sich eine 15-, beziehungsweise 124-fach gesteigerte MDA-7/IL24-Expression als Folge der Behandlung mit Sulindac Sulfid. Desweiteren führte dies in diesen beiden Prostatakarzinomzelllinien zu einer gesteigerten Synthese von GADD45 α und GADD45 γ um das 3-, sowie 2-fache in CW19 und um das 20- und 8-fache in DU145.

In den Brustkrebszellen MDA 453, sowie SKBR3 fanden sich eine 11-, beziehungsweise 19-fach gesteigerte MDA-7/IL24-Expression als Behandlungsfolge mit Sulindac Sulfid. Zusätzlich führte die Behandlung mit Sulindac Sulfid in den beiden Brustkrebszelllinien zu einer gesteigerten Synthese von GADD45 α und GADD45 γ um das 6- und 6-fache in MDA 453 und um das 7- und 4-fache in SKBR3.

Bei den Magenkarzinom-Zellen AGS, sowie KATO kam es zu einer 24-, beziehungsweise 21-fach gesteigerte MDA-7/IL24-Expression durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid. Ausserdem führte die Sulindac Sulfid Behandlung in den beiden Magenkarzinomzelllinien zu einer gesteigerten Synthese von GADD45 α und GADD45 γ um das 3-, sowie 5-fache in AGS und um das 28- und 8-fache in KATO.

Bei den Nierenkarzinom-Zellen, A498 und UOK, fanden sich eine 18-, beziehungsweise 22-fach gesteigerte MDA-7/IL24-Expression nach 24stündiger Sulindac Sulfid Gabe. Desweiteren führte dies in den beiden Nierenkarzinomzelllinien zu einer gesteigerten

Synthese von GADD45 α und GADD45 γ um das 8-, sowie 2-fache in A498 und um das 9- und 2-fache in UOK.

Die Zellen bei denen keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate gefunden werden konnte (MS-1, F12, A704, SNU16, CW22, MDA231), zeigten auch keine signifikante Steigerung ihrer MDA-7/IL24-, GADD45 α - oder GADD45 γ -Expression.

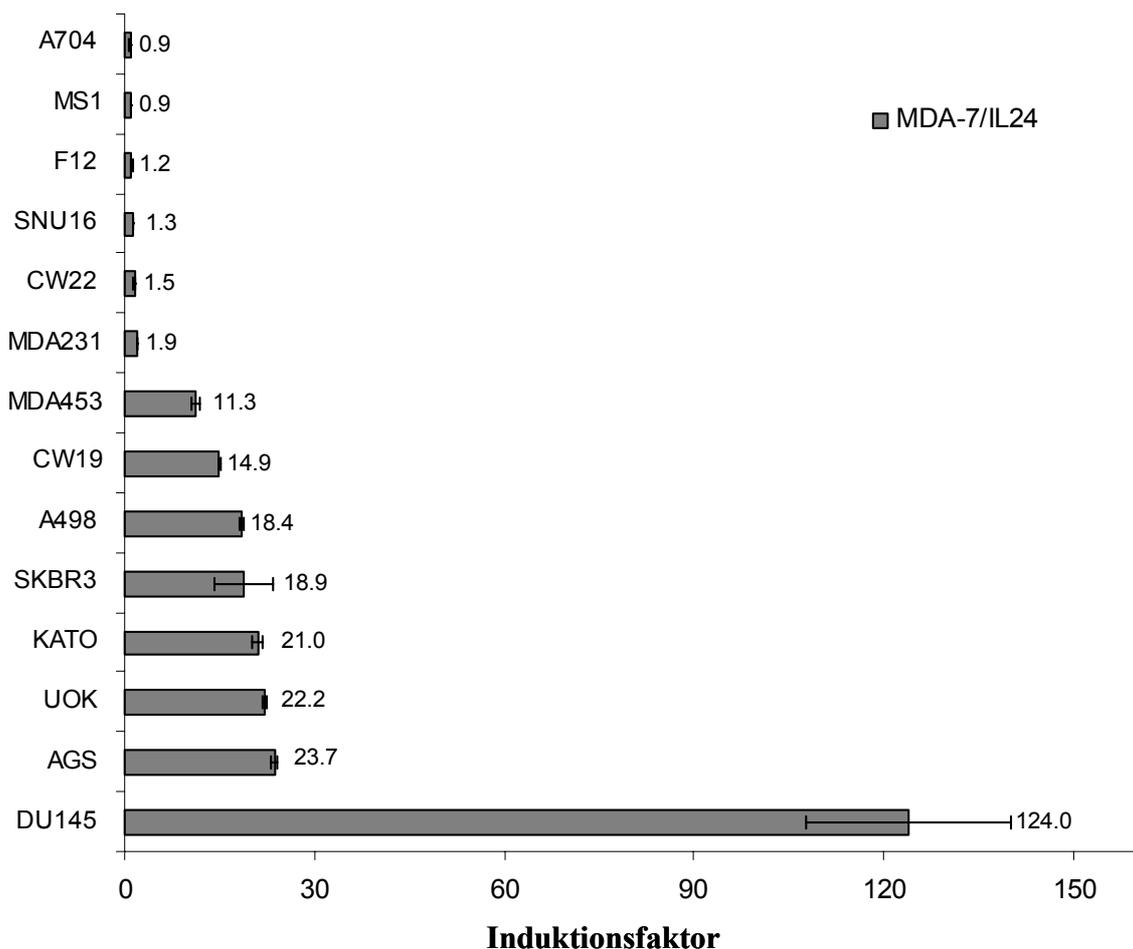


Abbildung 20. RT-PCRs von MDA-7/IL24 nach Sulindac Sulfid Behandlung in verschiedenen Karzinomzelllinien.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist der Faktor der Transkriptionssteigerung (Induktionsfaktor) von MDA-7/IL24 durch die Sulindac Sulfid Behandlung verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

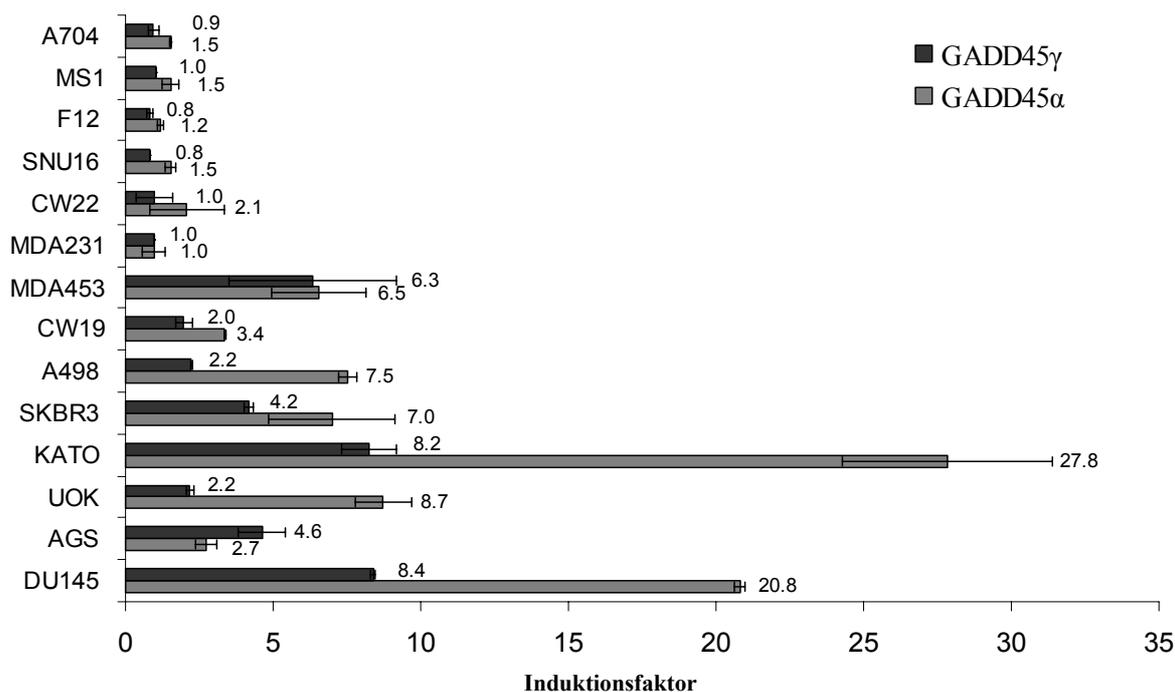


Abbildung 21. RT-PCRs von GADD45α und GADD45γ in verschiedenen Karzinomzelllinien nach Sulindac Sulfid Behandlung.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid oder DMSO behandelt. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) der jeweiligen Gene durch die Sulindac Sulfid Behandlung verglichen mit den DMSO-Kontrollen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [± Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

Tabelle 3.

Zelllinie	Apoptose	MDA-7/IL24	GADD45α	GADD45γ
DU145	13,5	124,0	20,8	8,4
MDA453	7,3	11,6	6,6	6,3
UOK	7,0	22,2	8,7	2,2
AGS	6,9	23,7	2,7	4,6
KATO	5,8	21,0	27,8	8,2
CW19	5,8	14,9	3,4	2,0
SKBR3	5,3	18,9	7,0	4,2
A498	3,6	18,4	7,5	2,2
MDA231	2,0	1,9	1,0	1,0
SNU16	1,7	1,3	1,5	0,8
CW22	1,4	1,5	2,1	1,0
A704	0,9	0,9	1,5	0,9
F12	0,8	1,2	1,2	0,8
MS-1	0,4	0,9	1,5	1,0

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid behandelt. Apoptose, MDA-7/IL24, GADD45α und GADD45γ geben die Induktionsfaktoren der Apoptose, sowie der einzelnen Gene verglichen mit den DMSO-Kontrollen wieder. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.7 Weitere nicht-steroidale Antiphlogistika induzieren Apoptose via MDA-7/IL24 Expression in Prostatakarzinom-Zellen

Nachdem der molekularen Wirkungsmechanismus von Sulindac Sulfid in Prostatakarzinom-Zellen weitgehend demonstriert wurde und gezeigt werden konnte, dass Sulindac Sulfid bei unterschiedlichsten Karzinomzelllinien Apoptose induziert, ging es nun darum herauszufinden, ob auch andere nicht-steroidale Antiphlogistika eine ähnliche Wirkung auf Prostatakarzinom-Zellen entfalten können.

Es wurden DU145 Prostatakarzinom-Zellen mit 14 verschiedenen nicht-steroidalen Antiphlogistika (Sulindac Sulfid, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398, Flurbiprofen, Sulindac Sulfon, Aspirin, Celecoxib, Acetaminophen, Ibuprofen, Naproxen, Meloxicam, Ebselen) behandelt und es fand sich, dass 7 dieser 14 Medikamente (Sulindac Sulfide, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398, Flurbiprofen, Sulindac Sulfone) in der Tat signifikant die Apoptoserate der DU145 Prostatakarzinom-Zellen steigerten. Interessanterweise ging dies in allen Fällen mit einer Expressionserhöhung von MDA-7/IL24 einher.

Die Ausnahmen bildeten Aspirin und Celecoxib, die trotz einer 17- und 6-fachen Induktion von MDA-7/IL24 nur zu einer geringen bis nicht-signifikanten Steigerung der Apoptoserate in DU145 Prostatakarzinom-Zellen führten.

3.7.1 Apoptoseinduktion in Prostatakarzinom-Zellen durch verschiedene nicht-steroidale Antiphlogistika

DU145 Prostatakarzinom-Zellen wurden mit 50 μ M Sulindac Sulfid, 50 mM Finasterid, 200 mM Diclofenac, 200 mM Flufenaminsäure, 200 mM NS-398, 20 nM Flurbiprofen, 200 mM Sulindac Sulfon, 5 mM Aspirin, 50 mM Celecoxib, 1 mM Acetaminophen, 200 mM Ibuprofen, 200 mM Naproxen, 40 mM Meloxicam, 50 mM Ebselen und DMSO (0.1%) oder Ethanol als Kontrolle behandelt (Abbildung 22). Nach 24 sowie nach 48 Stunden wurde dann bei den behandelten Zellen Apoptose gemessen.

Die Steigerung der Apoptose nach 24 und 48stündiger Behandlung mit Sulindac Sulfid betrug Faktor 7 und 10, mit Finasterid Faktor 7 und 6, mit Diclofenac Faktor 6 und 6, mit Flufenaminsäure Faktor 4 und 7, mit NS-398 Faktor 5 und 5, mit Flurbiprofen Faktor 2 und 3 und mit Sulindac Sulfon Faktor 2 und 4 verglichen mit den DMSO-, sowie Ethanol-Kontrollen. Bei Aspirin, Meloxicam und Ebselen kam es nach 48 Stunden jeweils zu einer

1,9fach gesteigerten Apoptoserate. Bei den anderen verwendeten nicht-steroidalen Antiphlogistika (Celecoxib, Acetaminophen, Ibuprofen, Naproxen) kam es weder nach 24 noch nach 48 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate.

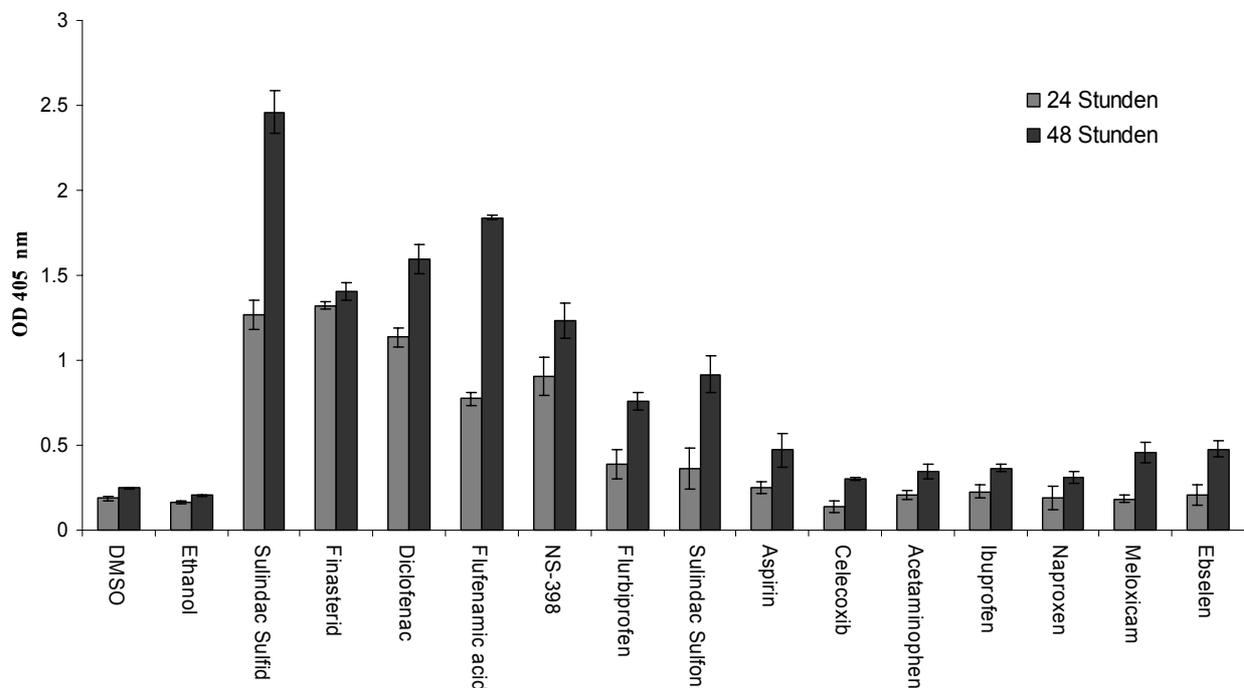


Abbildung 22. Apoptose-ELISA von DU145 Prostatakarzinom-Zellen.

Die Zellen wurden für jeweils 24, sowie 48 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid, 50 mM Finasterid, 200 mM Diclofenac, 200 mM Flufenaminsäure, 200 mM NS-398, 20 nM Flurbiprofen, 200 mM Sulindac Sulfon, 5 mM Aspirin, 50 mM Celecoxib, 1 mM Acetaminophen, 200 mM Ibuprofen, 200 mM Naproxen, 40 mM Meloxicam, 50 mM Ebselen und DMSO (0.1%), sowie Ethanol als Kontrolle behandelt. Mit Hilfe des Cells Death Detection ELISaplus (Roche, Penzberg, D, No. 1774425) Kits konnte dann die Apoptoserate der Zellen bestimmt werden. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.7.2 MDA-7/IL24 Induktion in Prostatakarzinom-Zellen durch verschiedene nicht-steroidale Antiphlogistika

Als nächstes wurde getestet, ob die nicht-steroidalen Antiphlogistika die in Prostatakarzinom-Zellen Apoptose induzieren, auch zu einer erhöhten MDA-7/IL24-Expression führen. Dazu wurden erneut DU145 Prostatakarzinom-Zellen für die Dauer von 48 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid, 50 mM Finasterid, 200 mM Diclofenac, 200 mM Flufenaminsäure, 200 mM NS-398, 20 nM Flurbiprofen, 200 mM Sulindac Sulfon, 5 mM Aspirin, 50 mM Celecoxib, 1 mM Acetaminophen, 200 mM Ibuprofen, 200 mM Naproxen, 40 mM Meloxicam, 50 mM Ebselen und DMSO (0.1%), beziehungsweise Ethanol als Kontrolle behandelt. Nach der RNA-Extraktion der behandelten Zellen wurden RT-PCRs für MDA-7/IL24 durchgeführt

(Abbildung 23, Tabelle 3). Es zeigte sich, dass die nicht-steroidalen Antiphlogistika die zu einer Apoptoseinduktion führten auch die Expression von MDA-7/IL24 erhöhten. Bei Sulindac Sulfid kam es zu einer 110-, bei Finasterid zu einer 71-, bei Diclofenac zu einer 40-, bei Flufenaminsäure zu einer 38-, bei NS-398 zu einer 38-, bei Flurbiprofen zu einer 27-, bei Sulindac Sulfon zu einer 20-fachen Erhöhung der MDA-7/IL24-Expression verglichen mit den DMSO-, beziehungsweise Ethanol-Kontrollen.

Die Behandlung der DU145 Prostatakarzinom-Zellen mit Aspirin und Celecoxib führte zwar zu einer 17-, beziehungsweise zu einer 6-fachen Erhöhung der MDA-7/IL24-Expression, allerdings kam es lediglich bei Aspirin zu einer 1,9-fachen Induktion der Apoptose nach 48stündiger Behandlungsdauer. Die Behandlung der Prostatakarzinom-Zellen mit Celecoxib führte nicht zu einer gesteigerten Apoptoserate. Ebselen und Meloxicam führten ebenfalls nach 48stündiger Behandlungsdauer zu einer 1,9-fach erhöhten Apoptoserate in DU145. Dies ging ebenfalls mit einer nur geringen Steigerung der MDA-7/IL24-Expression in den Ebselen (Faktor 1,7) und Meloxicam (Faktor 2) behandelten Prostatakarzinom-Zellen einher.

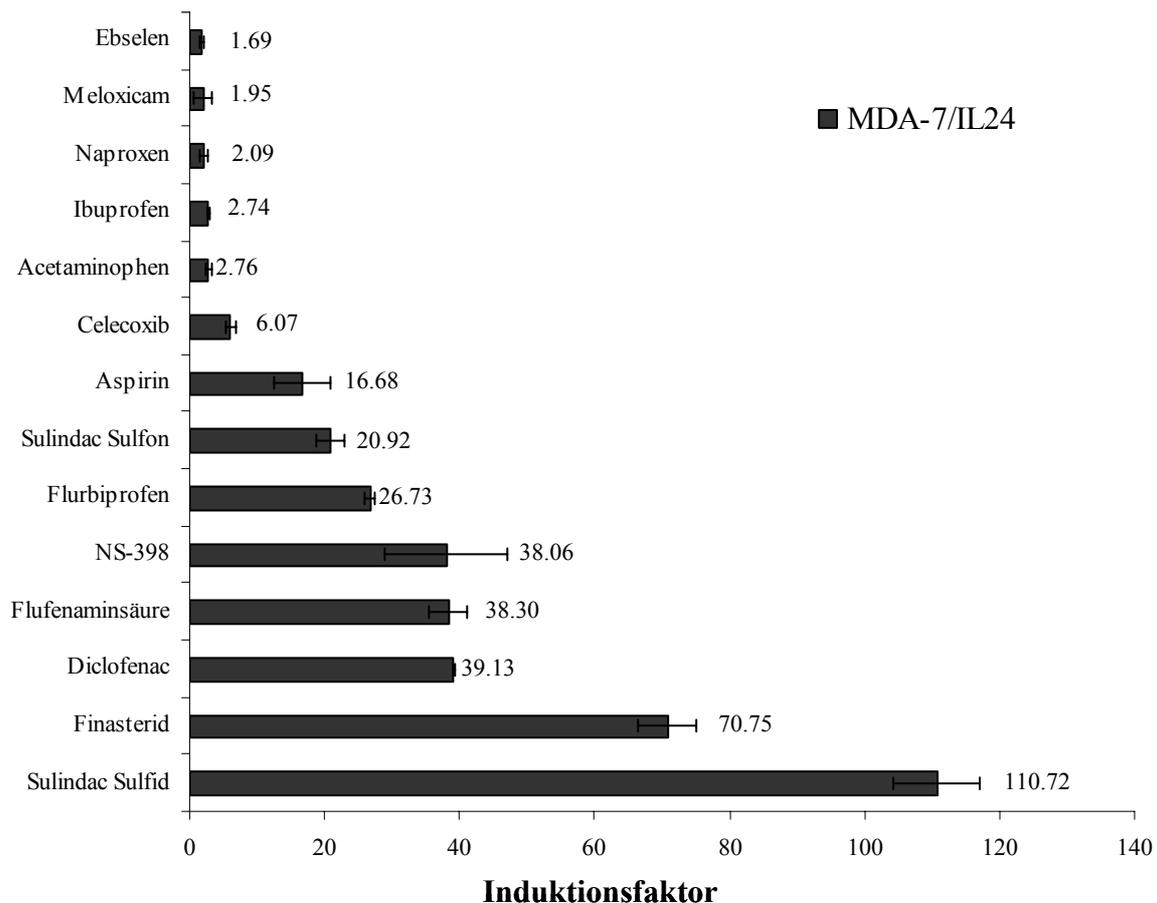


Abbildung 23. MDA-7/IL24 RT-PCRs von behandelten Prostatakarzinom-Zellen.

Die DU145 Zellen wurden für 48 Stunden mit 50 μ M Sulindac Sulfid, 50 mM Finasterid, 200 mM Diclofenac, 200 mM Flufenaminsäure, 200 mM NS-398, 20 nM Flurbiprofen, 200 mM Sulindac Sulfon, 5 mM Aspirin, 50 mM Celecoxib, 1 mM Acetaminophen, 200 mM Ibuprofen, 200 mM Naproxen, 40 mM Meloxicam, 50 mM Ebselen und DMSO (0.1%), sowie Ethanol als Kontrolle behandelt. Nach RNA-Isolation führten wir RT-PCRs für MDA-7/IL24 durch. Dargestellt ist der Faktor der erhöhten Transkription (Induktionsfaktor) von MDA-7/IL24 durch die Behandlung mit den jeweiligen nicht-steroidalen Antiphlogistika verglichen mit den Kontrollen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte [\pm Standardabweichung] aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

Tabelle 4.

Gegenüberstellung der Apoptoseinduktion und MDA-7/IL24-Expression bei DU145 Prostatakarzinom-Zellen die mit verschiedenen nicht-steroidalen Antiphlogistika behandelt wurden.

Medikament	Apoptose	MDA-7/IL24
Sulindac Sulfid	10,0	110,7
Finasterid	5,7	70,8
Diclofenac	6,5	39,1
Flufenaminsäure	7,5	38,3
NS-398	5,0	38,1
Flurbiprofen	3,1	26,7
Sulindac Sulfon	3,7	20,9
Aspirin	1,9	16,7
Celecoxib	1,2	6,1
Acetaminophen	1,4	2,8
Ibuprofen	1,5	2,7
Naproxen	1,3	2,1
Meloxicam	1,9	2,0
Ebselen	1,9	1,7

Die DU145 Zellen wurden für 48 Stunden mit 50 µM Sulindac Sulfid, 50 mM Finasterid, 200 mM Diclofenac, 200 mM Flufenaminsäure, 200 mM NS-398, 20 nM Flurbiprofen, 200 mM Sulindac Sulfon, 5 mM Aspirin, 50 mM Celecoxib, 1 mM Acetaminophen, 200 mM Ibuprofen, 200 mM Naproxen, 40 mM Meloxicam, 50 mM Ebselen und DMSO oder Ethanol (0.1%) als Kontrolle behandelt. Apoptose und MDA-7/IL24 geben die Induktionsfaktoren der Apoptose und der MDA-7/IL24-Expression verglichen mit den DMSO-, beziehungsweise Ethanol-Kontrollen wieder. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nicht-steroidale Antiphlogistika vermitteln ihre hemmende Wirkung auf Karzinomzelllinien verschiedenster Entitäten über eine gesteigerte MDA-7/IL24-, sowie GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese. Dabei ist MDA-7/IL24 ein Schlüsselgen, welches, beispielsweise, durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid in Prostatakarzinom-Zellen induziert und deutlich vermehrt transkribiert wird. Es kommt durch die erhöhte MDA-7/IL24-Transkription zu einer ebenfalls gesteigerten Synthese der beiden GADD45-Proteine, GADD45 α und GADD45 γ . Dies führt in den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen zu einer Steigerung der Apoptoserate und zu einem Zellzyklus-Arrest in der G2-Phase. Wird eines dieser drei Gene mit Hilfe der siRNA-Technik in den behandelten Zellen ausgeschaltet, kommt es zu deutlich verringerter Apoptose und einer nur geringen Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass MDA-7/IL24 den beiden GADD45-Proteinen übergeordnet ist und deren Expression induzieren kann. Wird MDA-7/IL24 in den Zellen überexprimiert, kommt es zu einer gesteigerten GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese. Wird die MDA-7/IL24-Transkription mittels siRNA blockiert, so unterbleibt dieser Effekt auch nach Sulindac Sulfid Gabe.

Wie anhand der Prostatakarzinom-Zellen und Sulindac Sulfid exemplarisch gezeigt wurde, folgt auf die Erhöhung der MDA-7/IL24-, sowie GADD45 α - und GADD45 γ -Expression eine direkt von den beiden GADD45-Proteinen abhängige Aktivierung der JNK, was zu Apoptose führt sowie eine Deaktivierung der G2-Checkpoint Kinase, CDK1/Cyclin-B, was den Arrest der Zellen in der G2-Phase nach sich zieht. Durch die Behandlung mit Sulindac Sulfid wurden weitere Proteine in ihrer Translation gehemmt (Cdc25C, Cyclin B1, Cyclin B2) oder induziert (p21), welche ebenfalls die Progression der Zelle von der G2-Phase in die Mitose steuern können.

Insgesamt führte Sulindac Sulfid bei 15 Krebszelllinien unterschiedlicher Entitäten zu Apoptose. Bei allen 8 dieser 15 Zelllinien die wir exemplarisch auf ihre MDA-7/IL24-, GADD45 α - und GADD45 γ -Expressionsniveaus hin untersuchten waren selbige erhöht. Zellen die keine Steigerung der Apoptose zeigten, zeigten auch keine signifikante Expressionsänderung für MDA-7/IL24, GADD45 α oder GADD45 γ . Interessanterweise waren 7 der 14 getesteten nicht-steroidalen Antiphlogistika bei Prostatakarzinom-Zellen in der Lage Apoptose zu induzieren. Auch bei diesen Zellen war die Expression von MDA-7/IL24 deutlich erhöht.

4. DISKUSSION

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Die Zahl klinischer Studien, die nicht-steroidale Antiphlogistika zur Prävention und Therapie maligner Neoplasien erproben, nimmt stetig zu. Es zeigte sich jedoch bei Langzeitanwendung selektiver COX-2-Inhibitoren, zum Beispiel Rofecoxib, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Singh, 2001). Aktuelle Studien zeigen dieses erhöhte Risiko auch für zahlreiche ältere, nicht-selektive, nicht-steroidale Antiphlogistika wie Indomethazin oder Diclofenac (Singh, 2005). Das Auftreten dieser bisher unbekanntenen Nebenwirkungen ist ein Rückschlag im Bemühen, neue, gut verträgliche Anti-Krebs-Therapeutika aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika zu finden. Als Konsequenz wurden bereits zahlreiche Studien gestoppt, die selektive COX-2-Inhibitoren als Langzeitmedikation zur Prävention von Krebserkrankung einsetzten oder dies planten. Hierdurch wurde noch einmal deutlich, wie wichtig genaue Kenntnisse der Nebenwirkungsprofile und der molekularen Mechanismen nicht-steroidaler Antiphlogistika sind, bevor diese Substanzen zur Anwendung am Patienten kommen. Solche Kenntnisse werden dazu führen, dass Substanzen gezielter ausgewählt, eingesetzt und weiterentwickelt werden. Nicht-steroidale Antiphlogistika per se sind eine heterogene Gruppe chemisch unterschiedlicher Substanzen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass sie anti-inflammatorische, anti-pyretische und analgetische Effekte vermitteln. Sie unterscheiden sich zusätzlich, neben ihrer Struktur, noch in ihrer Affinität zu den einzelnen Iso-Enzymen der Cyclooxygenase (COX). In der vorliegenden Arbeit wurden drei selektive COX-2-Inhibitoren (Celecoxib, Meloxicam, NS-398), sieben nicht-selektive COX-Hemmer (Sulindac Sulfid, Aspirin, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Acetaminophen, Flurbiprofen) und vier Präparate die ihre Effekte unabhängig von einer Beeinflussung der COX vermitteln (Sulindac Sulfon, Ebselen, Flufenaminsäure, Finasterid) untersucht. Eine weitere Gemeinsamkeit zahlreicher Substanzen aus der Gruppe nicht-steroidaler Antiphlogistika ist ihre Fähigkeit, unter in vitro-Bedingungen die Vermehrung von Karzinomzellen zu hemmen (Basler and Piazza, 2004; Narayanan et al., 2004; Riedl et al., 2004; Sabichi and Lippman, 2004).

Diese Arbeit berichtet von einem neuen, COX-unabhängigen Signalweg der über MDA-7/IL24 von insgesamt sieben strukturell gänzlich unterschiedlichen nicht-steroidalen Antiphlogistika bei 15 Karzinomzelllinien verschiedenster Entitäten aktiviert wird. Dies geschieht selektiv bei neoplastischen Zellen, denn die Behandlung aller gesunder

Kontrollzelllinien, die getestet wurden blieb ohne jeglichen Effekt. Ferner wird demonstriert, dass die Aktivierung dieses Signalweges in Karzinomzelllinien zu Apoptose und einem Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase führt. Dabei induzieren nicht-steroidale Antiphlogistika die Transkription von MDA-7/IL24, was eine gesteigerte GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese zur Folge hat. Die beiden GADD45-Proteine vermitteln dann, Apoptose über eine Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) und einen G2-Zellzyklus-Arrest über eine Deaktivierung der G2/M-Checkpoint-Kinase, CDK1/Cyclin-B (Abbildung 1).

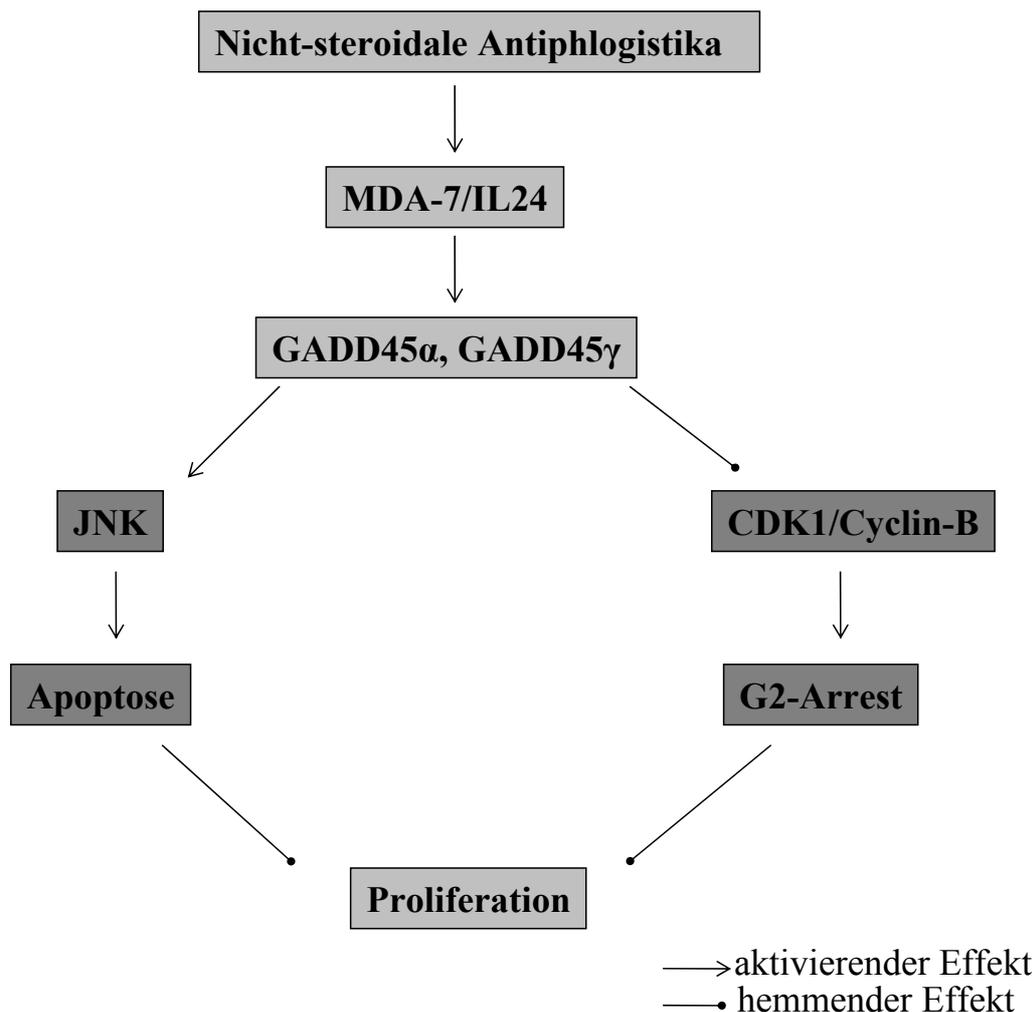


Abbildung 1. Schematische Darstellung der durch nicht-steroidale Antiphlogistika aktivierten Signalkaskade in Karzinomzelllinien.

Nicht-steroidale Antiphlogistika induzieren eine gesteigerte MDA-7/IL24-Transkription, was wiederum zu einer gesteigerten GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese führt. Die beiden GADD45-Proteine induzieren dann, Apoptose über eine Aktivierung der JNK und einen G2-Arrest über eine Deaktivierung der G2/M-Checkpoint Kinase, CDK1/Cyclin-B.

Die proliferationshemmenden Eigenschaften nicht-steroidaler Antiphlogistika werden auf eine Blockierung der COX-2 zurückgeführt (Basler and Piazza, 2004; Bishop-Bailey et al., 2002; Lin and Nelson, 2003; Mann and DuBois, 2004; Peek, 2004; Riedl et al., 2004; Sabichi and Lippman, 2004). Möglicherweise sind jedoch Signalwege unabhängig der Cyclooxygenasen entscheidend für die anti-proliferativen Effekte nicht-steroidaler Antiphlogistika auf Karziom-Zellen (Zha et al., 2004). Die Daten dieser Arbeit weisen ebenfalls daraufhin, dass die durch eine Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika bedingte Steigerung der Apoptoserate in Karzinom-Zellen nicht die Folge einer Hemmung der COX-1 oder COX-2 ist. Zum Beispiel die Finasterid vermittelte Apoptoseinduktion bei Prostatakarzinom-Zellen. Finasterid ist ein selektiver 5- α -Reduktase-Hemmer, der die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron blockiert. Finasterid hat keinen Einfluss auf die COX-1 oder COX-2, aber führt dennoch bei DU145 Prostatakarzinom-Zellen zu einer Induktion der Apoptose um Faktor sechs, verbunden mit einer Expressionsteigerung von MDA-7/IL24 um Faktor 70. Diese Apoptoseinduktion kann auch nicht mit der anti-Androgenen Wirkung Finasterids erklärt werden, da DU145-Zellen weder einen Androgen-Rezeptor exprimieren, noch Androgen-sensitiv sind. Auch der unselektiven Kationen-Kanal-Blocker Flufenaminsäure, sowie die nicht-selektiven COX-Hemmer Sulindac Sulfid, Diclofenac, Flurbiprofen und der selektive COX-2-Hemmer NS-398 führen über eine gesteigerte MDA-7/IL24-Expression zu Apoptose. Hingegen sind die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Meloxicam weit weniger effektiv in der Behandlung der Prostatakarzinom-Zellen. Hier kam es lediglich zu einer Apoptoseinduktion um Faktor 1,2 und 1,9. Vielmehr sind die nicht-steroidalen Antiphlogistika vermittelten Effekte auf Karzinom-Zellen das Resultat einer gesteigerten MDA-7/IL24-Expression mit der Folge einer vermehrten Transkription und Translation von GADD45 α und GADD45 γ . Diese gesteigerte GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese ist dann über eine JNK-Aktivierung für Apoptose und über eine Hemmung der CDK-1/Cyclin-B Kinase für den G2-Zellzyklus-Arrest verantwortlich. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen für die In-vitro Modelle orientierten sich an den Plasmakonzentrationen die im menschlichen Plasma bei einer Dauertherapie erreichbar sind.

Einer der Schlüssel für die gemeinsamen anti-proliferativen Effekte der nicht-steroidalen Antiphlogistika auf unterschiedliche Karzinom-Zellen scheint eher in der Aktivierung von MDA-7/IL24 zu liegen, als in den bisher den jeweiligen Substanzen zugeschriebenen Wirkungspfaden. MDA-7/IL24 ist ein Mitglied der Interleukin 10 (IL10) Zytokin-Familie. Es vermittelt seine biologischen Effekte mittels zweier heterodimerer Rezeptoren, IL-20R1/IL20R2 und IL-22R1/IL-20R2 (Sarkar et al., 2002a). Leukozyten, allen voran Monozyten und T-

Helfer-Zellen, sind die Hauptsynthese-Orte von MDA-7/IL24. Die Transkription von MDA-7/IL24 wird von den beiden Transkriptionsfaktor-Familien AP-1 und c/EBP reguliert (Madireddi et al., 2000). Interessanterweise zeigen die Gen-Expressionsprofil-Daten dieser Arbeit in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen ebenfalls eine Sulindac Sulfid bedingte Transkriptionserhöhung für c/EBP β und c/EBP γ . Je nach intrazellulärer Konzentration kommen MDA-7/IL24 zwei gänzlich unterschiedliche Aufgaben in der Zelle zu. In physiologischen Konzentrationen, bei normaler Stoffwechsellage, fungiert MDA-7/IL24 als Zytokin (Sarkar et al., 2002a). Es induziert beispielsweise in mononukleären Zellen peripheren Blutes (PBMC) die Synthese von IL6, TNF α und IFN γ . In der Tat fand sich eine gesteigerte IL6-Transkription in den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen. Die Beobachtung, dass MDA-7/IL24 sowohl von Leukozyten produziert werden kann, als auch seinerseits Leukozyten zur Synthese andere Zytokine anregt, führte schließlich zu dessen Einordnung als Interleukin. Wird MDA-7/IL24 allerdings weit über sein physiologisches Niveau überexprimiert, beispielsweise mit Hilfe eines Adenovirus-Vektors, entfaltet es anti-proliferative-Effekte auf Karzinom-Zellen, ohne dabei Zellen gesunden Gewebes zu schädigen (Su et al., 2003). Mehrere In-vitro- und tierexperimentelle Studien konnten seitdem die selektiven pro-apoptischen Eigenschaften von MDA-7/IL24 in Karzinom-Zellen belegen (Lebedeva et al., 2003; Sarkar et al., 2002a; Su et al., 2003). MDA-7/IL24 ist, basierend auf diesen In-vitro Ergebnissen, derzeit als Gentherapeutikum (INGN 24L, Introgen, USA) bei verschiedenen Karzinom-Entitäten in der klinischen Phase-1 und Phase-2 Erprobung. Allerdings birgt die Überexpression von MDA-7/IL24 mittels replikationsinkompetenter Adenoviren zahlreiche Probleme. Die Viren müssen in ausreichender Menge die Karzinom-Zellen erreichen und den Gentransfer fehlerfrei abschließen. Ausserdem erschweren immunologische Reaktionen des Körpers den Einsatz der Viren. Auch in dieser Arbeit zeigte die gesteigerte MDA-7/IL24-Expression mittels Adenovirus-Vektoren geringere pro-apoptische Effekte als die MDA-7/IL24-Transkriptionssteigerung durch eine Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika. So fand sich bei einer Sulindac Sulfid vermittelten MDA-7/IL24-Transkriptionserhöhung bereits nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden in DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen eine Steigerung der Apoptoserate um Faktor 12 und 24. Bei einer Adenovirus vermittelten MDA-7/IL24-Transkriptionserhöhung kam es erst nach 48 Stunden zu einer signifikanten Apoptoseinduktion um Faktor drei in DU145 und Faktor vier in PC-3. Auch nach 96stündiger Inkubationsdauer der mit den MDA-7/IL24 exprimierenden Adenovirus infizierten Zellen belief sich die Apoptoseinduktion in den DU145 und PC-3 Prostatakarzinom-Zellen lediglich

auf Faktor sechs, sowie Faktor sieben. Dies lässt den Schluss zu, dass MDA-7/IL24 durch eine Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika schneller und in wirksameren Konzentrationen in den Karzinom-Zellen zur Verfügung gestellt wird. Diese Arbeit, die eine spezifische Erhöhung der endogenen MDA-7/IL24-Expression durch die Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika zeigt, eröffnet somit einen gänzlich neuen Ansatzpunkt zur Induktion von MDA-7/IL24 in Karzinom-Zellen. Nicht-steroidale Antiphlogistika sind einer adenoviralen-Therapie auch in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften überlegen, beispielsweise wenn es um die systemische Verfügbarkeit der Wirkstoffe und damit der Verlässlichkeit der MDA-7/IL24-Expression in den Ziel-Zellen geht. Die Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika bietet die Möglichkeit, systemisch die Expression von MDA-7/IL24 in Karzinom-Zellen zu steigern. Welchen Einfluss eine gesteigerte MDA-7/IL24-Expression haben kann, zeigte eine jüngst publizierte Studie, die eine verbesserte Prognose und einen höheren Anteil apoptotischer Tumor-Zellen bei bronchialen Adenokarzinompatienten mit erhöhter endogener MDA-7/IL24-Expression zeigte (Ishikawa et al., 2005). In dieser Studie führte Sulindac Sulfid in verschiedenen Prostata-, Nieren-, Magen-, und Brustdrüsenkarzinom-Zellen zu einer gesteigerten MDA-7/IL24-Expression zwischen Faktor 18 und 124, was immer auch eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen zur Folge hatte. Ferner führten Sulindac Sulfid, Sulindac Sulfon, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, Flurbiprofen und NS-398 in Prostatakarzinom-Zellen zu einer Steigerung der MDA-7/IL24-Expression zwischen Faktor 20 und 110, was auch eine deutliche Steigerung der Apoptoserate nach sich zog. Allerdings führten auch Aspirin und Celecoxib zu einer Erhöhung der MDA-7/IL24-Transkription um Faktor 17, beziehungsweise um Faktor sechs. Eine Steigerung der Apoptoserate ließ sich jedoch bei Aspirin nur um Faktor 1,9 und bei Celecoxib um Faktor 1,2 feststellen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass eine sehr hohe Konzentration von MDA-7/IL24 in den Zellen erreicht werden muss, eine Induktion mindestens um Faktor 18-20, damit MDA-7/IL24 seine hemmenden Effekte auf Karzinom-Zellen entfalten kann. Es kann hier zwar keine absolut lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Grad der MDA-7/IL24-Expression und dem Ausmaß der Apoptoseinduktion festgestellt werden, aber ein hoher Grad der MDA-7/IL24-Expressionssteigerung (ab Faktor 30) korrelierte mit einem hohen Grad der Apoptoseinduktion (Faktor 5-10). Hingegen führten niedrige Steigerungsraten der MDA-7/IL24-Expression (Faktor 18-30) auch zu geringeren Steigerungsraten der Apoptose (Faktor 2-5) und eine Erhöhung der MDA-7/IL24-Expression kleiner Faktor 18 hatte keine signifikante Apoptoseinduktion zur Folge.

Es gibt eine Reihe von Signalkaskaden die in Karzinom-Zellen Apoptose induzieren. Beispielsweise führt eine Hemmung von NF- κ B in denselben Prostatakarzinom-Zellen die in dieser Arbeit verwendet wurden ebenfalls zu Apoptose, allerdings ohne die Transkription von MDA-7/IL24 zu verändern (Zerbini et al., 2004). Wird NF- κ B in diesen Zellen mittels I κ B α gehemmt, kommt es zu einer Steigerung der GADD45 α - und GADD45 γ -Expression. Diese Expressionsteigerung führt dann zu Apoptose. Auch nach einer Behandlung der Zellen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika kam es zu einer MDA-7/IL24-bedingten Induktion der beiden GADD45-Gene, GADD45 α und GADD45 γ . Unabhängig davon ob die Expression von GADD45 α und GADD45 γ nun durch eine NF- κ B-Hemmung oder durch eine MDA-7/IL24-Induktion vermittelt wurde, beide Male war dies der essentielle Schritt für die folgende Apoptoseinduktion. Diese Beobachtung repräsentiert die Schlüsselrolle der GADD45-Genfamilie für das Überleben maligner Zellen. Es ist denkbar, dass noch weitere proapoptotische Signalkaskaden in bösartigen Zellen GADD45 als gemeinsame Endstrecke aufweisen.

In zahlreichen Gen-Expressionsprofil-Arbeiten die sich mit Apoptose und dem Überleben von Karzinom-Zellen beschäftigten, waren die GADD45-Gene in ihrer Expression verändert, ohne dass dies bisher weiter beachtet oder untersucht wurde (Zerbini and Libermann, 2005). Zudem ist mittlerweile bekannt, dass in zahlreichen Tumoren Mutationen für die GADD45-Gene vorliegen, oder selbige vermindert exprimiert werden. In resezierten ductalen Pankreaskarzinomen ist GADD45 α häufig mutiert und zusammen mit Mutationen des p53-Gens ein wichtiger Prognose-Parameter dieser Patienten (Yamasawa et al., 2002). In Epiphysen Tumoren findet sich bei 67% der Patienten keine Expression des GADD45 γ -Gens, in fast allen Fällen aufgrund einer Methylierung der Promotersequenz. Demethylierung selbiger führt zur Re-Expression von GADD45 γ (Bahar et al., 2004). Eine übermäßige Methylierung der Promotersequenz für GADD45 α findet sich auch bei einer Vielzahl von Mamma-Karzinomen mit folglich verminderter GADD45 α -Expression verglichen mit gesundem Brustdrüsenepithel (Sun et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die alleinige Überexpression von MDA-7/IL24 mit einem Adenovirus-Vektor in Prostatakarzinom-Zellen bereits ausreicht, um die Transkription von GADD45 α und GADD45 γ zu erhöhen und die Apoptoserate der Prostatakarzinom-Zellen zu steigern. Ferner war es Prostatakarzinom-Zellen mit ausgeschalteter MDA-7/IL24-Transkription nicht möglich, trotz Behandlung mit Sulindac Sulfid, eine Expressionssteigerung der beiden GADD45-Gene zu bewirken und auch die Apoptoseinduktion war deutlich reduziert, wenn auch nicht vollständig aufgehoben. Der

genaue Pfad über den GADD45 α und GADD45 γ Apoptose auslösen, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Die Daten dieser Arbeit und die von Zerbini et al. (Zerbini et al., 2004) liefern Hinweise dahingehend, dass die GADD45 α und GADD45 γ vermittelte Apoptoseinduktion über direkte Interaktion der beiden GADD45-Gene mit MEKK4/MTK1 (Zerbini et al., 2004) und konsekutiver Aktivierung der JNK mit anschließender Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun abläuft. Von dieser JNK-Aktivierung und der konsekutiven c-Jun Phosphorylierung ist bekannt, dass hierdurch Apoptose induziert wird (Li et al., 2004). Es fand sich eine Sulindac Sulfid abhängige JNK-Aktivierung in apoptotischen Prostatakarzinom-Zellen, bei gleichzeitig gesteigerter GADD45 α - und GADD45 γ -Expression in diesen Zellen. Daher kann vermutet werden, dass die Apoptose in Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen durch JNK vermittelt wird. Durch Zugabe eines JNK-Inhibitors ließ sich die Sulindac Sulfid bedingte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen um 56% in DU145 und um 40% in PC-3 reduzieren, was die Vermutung unterstützt. Diese inkomplette Aufhebung der Apoptose könnte sich durch eine unzureichende Spezifität des Inhibitors erklären. Es konnte hier aber gezeigt werden, dass es bei Prostatakarzinom-Zellen, die mit Sulindac Sulfid behandelt wurden und nicht in der Lage waren GADD45 α und GADD45 γ zu exprimieren, zu einer deutlich reduzierten Aktivierung der JNK und zu keiner signifikanten Induktion der Apoptose kam. Dies ist ein Hinweis dahingehend, dass die pro-apoptotische Wirkung der GADD45 α - und GADD45 γ -Gene über eine JNK-Aktivierung vermittelt wird.

Es gelang mit dieser Arbeit ebenfalls, große Teile der für den G2/M-Zellzyklus-Arrest verantwortlichen Signalkaskade zu entschlüsseln. Der Sulindac Sulfid vermittelte Arrest der Prostatakarzinom-Zellen in der G2-Phase wird ebenfalls durch die MDA-7/IL24-Induktion mit konsekutiver Erhöhung der GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese vermittelt. Die beiden GADD45-Gene, GADD45 α und GADD45 γ hemmen dabei die G2/M-Checkpoint Kinase, CDK1/Cyclin-B, und sorgen so für den Arrest der Zellen in der G2-Phase. Ob die Behandlung der Zellen mit Sulindac Sulfid zuerst zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase führt und dann Apoptose ausgelöst wird, oder ob beide Effekte parallel in der Zelle stattfinden bleibt zu klären.

Die Schlüsselfunktion der G2/M-Checkpoint Kinase, CDK1/Cyclin-B, bei der Kontrolle der Zellprogression von der G2-Phase in die Mitose ist an zahlreichen Modellen gezeigt (Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999a). Der G2/M-Checkpoint wird vor allem bei Chromosomenschäden über komplexe Regulationsmechanismen aktiviert. Diese Aktivierung des G2/M-Checkpoints ist gleichbedeutend mit einer Hemmung der CDK1/Cyclin-B Kinase

und bedingt einen Stop des Teilungszyklus in der G2-Phase. Dies gibt den Zellen Zeit für Reparaturvorgänge oder den Eintritt in die Apoptose (Vermeulen et al., 2003). Es fand sich bei Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen die in der G2-Phase akkumulierten eine deutlich verminderte Aktivität der CDK1/Cyclin-B Kinase. Die beiden GADD45-Gene, GADD45 α und GADD45 γ sind Schlüsselgene bei der Auslösung des G2-Arrestes nach UV-Strahlung oder Behandlung mit Alkylanzien (Zhan et al., 1999a). Es ist bekannt, dass GADD45 α über eine eigene Bindungsstelle direkt mit CDK1 interagieren und diese hemmen kann (Jin et al., 2000). Diese Interaktion ist spezifisch für die CDK1-Kinase, denn GADD45 α hat keinen direkten Einfluss auf die G1/S-Checkpoint-Kinase, CDK2/Cyclin-E. GADD45 α entfaltet seine hemmende Wirkung auf den CDK1/Cyclin-B Kinase Komplex durch eine Abspaltung des zugehörigen Cyclin-Bs, dessen Bindung unabdingbar für die Aktivität der G2/M-Checkpoint-Kinase ist (Hermeking et al., 1997; Taylor and Stark, 2001). Yang et al. berichteten, dass ausschließlich GADD45 α in der Lage sei den CDK1/Cyclin-B Komplex zu sprengen und dadurch einen Arrest der Zellen in der G2-Phase auszulösen (Yang et al., 2000). Vaiparandie et al. demonstrierten, dass nur GADD45 α und GADD45 β dazu in der Lage seien (Kovalsky et al., 2001; Vairapandi et al., 2002). Allerdings testeten beide Autoren nicht direkt die Aktivität der CDK1-Kinase in Abhängigkeit der GADD45-Expression, so dass die beobachteten Zellzyklus-Veränderungen auch auf andere Einflussfaktoren in den In-vitro Modellen zurückzuführen sein könnten. Dies könnte den Widerspruch erklären in dem die Daten zu diesen beiden Arbeiten stehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Prostatakarzinom-Zellen nach Sulindac Sulfid Gabe, sowohl GADD45 α als auch GADD45 γ in der Lage sind, die Aktivität der CDK1-Kinase zu hemmen und so einen Stop des Zellzyklus in der G2-Phase herbeizuführen. Wurde die MDA-7/IL24-Expression und damit auch die Fähigkeit der Zellen die GADD45 α und GADD45 γ -Synthese zu steigern in den Prostatakarzinom-Zellen ausgeschaltet und diese dann mit Sulindac Sulfid behandelt, war der Eintritt der Zellen in die Mitose, trotz Sulindac Sulfid Behandlung, annähernd auf dem Kontroll-Niveau möglich. Es kam also nur zu einer geringen Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Ferner fand sich bei Prostatakarzinom-Zellen, die nicht in der Lage waren GADD45 α oder GADD45 γ zu synthetisieren, trotz Sulindac Sulfid Behandlung keine verringerte Aktivität der CDK1/Cyclin-B Kinase. Belege dafür, dass die MDA-7/IL24 bedingte Steigerung der GADD45 α - und GADD45 γ -Expression neben der Apoptose auch den Sulindac Sulfid vermittelten G2-Arrest der Zellen steuert. Dabei scheinen sowohl GADD45 α , als auch GADD45 γ direkt mit der CDK1/Cyclin-B Kinase zu interagieren und diese zu blockieren. Ähnlich wie bei der JNK vermittelten Apoptose ist es ausreichend die

Transkription von GADD45 α oder GADD45 γ zu hemmen um die Sulindac Sulfid vermittelten Effekte auszuschalten. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die beiden GADD45-Gene α und γ einen Proteinkomplex bilden, der nur gebildet und als Transkriptionsfaktor aktiv sein kann, wenn sowohl GADD45 α als auch GADD45 γ ausreichend exprimiert werden. Dieses Phänomen der Proteinkomplex-Bildung wurde bereits für einzelne GADD45 α -Proteine gezeigt (Kovalsky et al., 2001). Da es in den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen trotz Ausschaltung der MDA-7/IL24-Expression und damit einem Ausbleiben der direkten Hemmung der CDK-1/Cyclin-B Kinase immer noch zu einer geringen Akkumulation der Zellen in der G2-Phase, Steigerung von 6,9 auf 9,4%, kam, liegt vermutlich an der Sulindac Sulfid bedingten Transkriptionsänderung für Cdc25C und p21, die den G2/M-Checkpoint ebenfalls steuern können. Cdc25C aktiviert die CDK1-Kinase durch Dephosphorylierung der inhibitorischen Domänen Thr-14 und Tyr-15 und ermöglicht so die Progression der Zelle von der G2-Phase in die Mitose. Es fand sich sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene eine verminderte Cdc25C-Expression in den Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen. Für p21 wurde gezeigt dass dieser Inhibitor der CDKs den CDK1-Cyclin-B Komplex ebenfalls zerstören und so die Zellprogression in die Mitose verhindern kann (Vermeulen et al., 2003). Für p21 fanden wir in unseren Sulindac Sulfid behandelten Prostatakarzinom-Zellen sowohl eine gesteigerte Transkription als auch eine vermehrte Translation.

4.2 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit verbessert das Verständnis der Signalwege, die bei einer Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika aktiviert werden. Die Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven für innovative Therapiekonzepte zur Behandlung bösartiger Erkrankungen. Die Fähigkeit nicht-steroidaler Antiphlogistika Apoptose bei Karzinom-Zellen verschiedener Entitäten auszulösen, scheint auf eine Erhöhung der MDA-7/IL24-Expression und eine dadurch gesteigerte GADD45 α - und GADD45 γ -Synthese zurückzuführen zu sein. Diese GADD45 α - und GADD45 γ -Synthesesteigerung führt zu einer Aktivierung der JNK mit konsekutiver Apoptose und zu einer Hemmung der CDK-1/Cyclin-B Kinase mit der Folge eines Zellzyklus-Arrestes in der G2-Phase. Die Steigerung der MDA-7/IL24-Expression hat also entscheidenden Einfluss auf das Überleben von Karzinom-Zellen. Je höher das Maß der MDA-7/IL24-Expression, desto höher die Induktion der Apoptose. Die durch nicht-steroidale Antiphlogistika vermittelte MDA-7/IL24-Transkriptionssteigerung ist der Adenovirus-Vektor-vermittelten MDA-7/IL24 Transkriptionserhöhung in ihrer Potenz überlegen. Zudem konnten verdeutlicht werden, dass den beiden GADD45-Genen, GADD45 α und GADD45 γ , eine zentrale Funktion im Überlebenszyklus von Tumorzellen zukommt, indem sie Apoptose durch eine Aktivierung der JNK und einen G2-Zellzyklus-Arrest durch eine Hemmung der CDK1/Cyclin-B Kinase auslösen. Sowohl Apoptose, als auch Zellzyklus-Veränderungen unterliegen somit der Kontrolle der beiden GADD45-Gene. Beide GADD45-Gene werden durch die Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika via MDA-7/IL24 induziert.

In Zukunft sollte daher bei Karzinom-Zellen nach dem Grad der nativen MDA-7/IL24-, GADD45 α - und GADD45 γ -Expression gefahndet werden. Dies wird helfen zu ermitteln, ob dem über MDA-7/IL24, GADD45 α und GADD45 γ vermittelten Signalweg tatsächlich eine Schlüsselfunktion bei der Proliferations-Hemmung von Krebszellen zukommt. Diese Arbeit eröffnet völlig neue Perspektiven für das bestehende Konzept, die Proliferation von Karzinom-Zellen über eine gesteigerte MDA-7/IL24-Expression zu hemmen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Studien zeigen, dass nicht-steroidale Antiphlogistika erfolgreich zur Prävention und Behandlung maligner Neoplasien eingesetzt werden können. Allerdings fehlt weiterhin ein tieferes Verständnis der Wirkmechanismen. Im folgenden wird gezeigt, dass die nicht-steroidalen Antiphlogistika Sulindac-Sulfid, Exisulind, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398 und Flurbiprofen die Expression des Zytokins melanoma differentiation-associated gene 7/ Interleukin 24 (MDA-7/IL24) in Karzinomzellen steigern. Diese Expressionssteigerung war in vitro einer Adenovirus-vermittelten MDA-7/IL24-Expressionssteigerung überlegen. MDA-7/IL24 ist ein potenter Induktor für Apoptose und Zellzyklus-Arrest. Interessanterweise findet sich diese gesteigerte MDA-7/IL24-Expression als Folge einer Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika nur in Karzinomzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies für verschiedene Prostata-, Magen-, Nieren-, und Mammakarzinomzellen demonstriert werden. Bei nicht-neoplastischen Zellen fand sich weder eine MDA-7/IL24-Aktivierung noch eine Proliferationshemmung. MDA-7/IL24 vermittelt seine anti-proliferativen Effekte also exklusiv in Karzinomzellen. Bei anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika wie Aspirin, Celecoxib, Acetaminophen, Ibuprofen, Naproxen, Meloxicam und Ebselen war der Einfluß auf die MDA-7/IL24-Transkription nicht ausreichend, um Apoptose oder Zellzyklus-Arrest auszulösen. Es zeigte sich ferner, dass die MDA-7/IL24-Aktivierung zu einer Expressionssteigerung der beiden growth arrest- and DNA damage-inducible genes 45 (GADD45) α und γ führt. Diese GADD45-Expressionssteigerung ist verantwortlich für die MDA-7/IL24 vermittelte Apoptoseinduktion via Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) sowie für den Zellzyklus-Arrest via Hemmung der G2/M-Checkpoint-Kinase, cyclin-dependent kinase 1/ Cyclin B (CDK1/Cyclin-B). Tumorzellen, bei denen mittels siRNA die Fähigkeit der GADD45 α - und γ -Expression ausgeschaltet war, zeigten trotz Inkubation mit nicht-steroidalen Antiphlogistika weder eine gesteigerte Apoptoseinduktion noch eine signifikante Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Diese Zellen zeigten auch keine Aktivierung der JNK und keine Hemmung der G2/M-Checkpoint-Kinase. Diese Arbeit zeigt, dass MDA-7/IL24, GADD45 α und γ kritische Mediatoren der Apoptose und der Zellzyklusregulation bei neoplastischen Zellen sind. Ferner werden die nicht-steroidalen Antiphlogistika Sulindac-Sulfid, Exisulind, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398 und Flurbiprofen in vitro als hoch-effektive Substanzen zur MDA-7/IL24-Expressionssteigerung in malignen Zellen etabliert.

6. ABSTRACT

Numerous studies demonstrate that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are effective in chemoprevention or treatment of cancer. Nevertheless, the understanding of the mechanisms involved remains poorly understood. But, it gains more and more important to unmask the genes and proteins involved in NSAID action, since several NSAIDs exposed severe side-effects after long-term treatment. Here, we report that high level induction of the cytokine MDA-7/IL-24 by several NSAIDs is an essential step for apoptosis induction and G2/M growth arrest in cancer. Interestingly, the MDA-7/IL-24 induction by NSAIDs occurs only in cancer cells, leaving non-neoplastic cells unaffected by NSAID treatment. MDA-7/IL24 seems to exhibit its anti-proliferative effects exclusively in cancer cells. NSAIDs which were not able to increase MDA-7/IL24 induction were not able to induce apoptosis or growth-arrest in those cancer cells. We also demonstrate that MDA-7/IL24 dependent up regulation of GADD45 α and GADD45 γ genes is sufficient for cancer cell apoptosis. Since inhibition of GADD45 α and GADD45 γ by small interfering RNA almost abrogates apoptosis and growth arrest induction by the NSAID Sulindac sulfide by blocking JNK activation and restoring CDK1 kinase activity. Our results establish MDA-7/IL-24 and GADD45 α and GADD45 γ as critical mediators of cancer cell survival in response to NSAID treatment.

7. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Norbert Gattermann danke ich für das Thema und die Führung durch diese Dissertation

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Manuel Aivado, ohne dessen Förderung, Rat und ständige Hilfsbereitschaft wäre ich nicht der Wissenschaftler, der ich heute bin. Es ist mir auch eine besondere Ehre ihn als Freund gewonnen zu haben.

Sehr zu Dank bin ich auch Herrn Dr. Luiz F. Zerbini verpflichtet, der mich sehr viel gelehrt hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haas danke ich dafür, dass er mich so freundschaftlich in sein Institut aufgenommen hat. Er hat als Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie ein höchst inspirierendes wissenschaftliches Umfeld geschaffen.

Herrn Prof. Dr. Towia A. Libermann, PhD möchte ich für die Möglichkeit danken in einem äußerst stimulierenden Umfeld wissenschaftlich Arbeiten zu dürfen.

PD. Dr. Ulrich Germing führe seine unkomplizierte Erreichbarkeit und ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Corinna Strupp die als erste meinen wissenschaftlichen Hunger erkannte und in die richtige Bahn lenkte.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1991). Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 6, 165-167.
- Altinoz, M. A., and Korkmaz, R. (2004). NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma* 51, 239-247.
- Arellano, M., and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 559-573.
- Bahar, A., Bicknell, J. E., Simpson, D. J., Clayton, R. N., and Farrell, W. E. (2004). Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene* 23, 936-944.
- Baron, J. A., Cole, B. F., Sandler, R. S., Haile, R. W., Ahnen, D., Bresalier, R., McKeown-Eyssen, G., Summers, R. W., Rothstein, R., Burke, C. A., *et al.* (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348, 891-899.
- Basler, J. W., and Piazza, G. A. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective inhibitors for prostate cancer chemoprevention. *J Urol* 171, S59-62; discussion S62-53.
- Beadling, C., Johnson, K. W., and Smith, K. A. (1993). Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2719-2723.
- Berridge, M. V., and Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482.
- Bishop-Bailey, D., Calatayud, S., Warner, T. D., Hla, T., and Mitchell, J. A. (2002). Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21, 93-101.
- Bortner, C. D., Hughes, F. M., Jr., and Cidlowski, J. A. (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32436-32442.
- Carrier, F., Georgel, P. T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H. U., Antinore, M. J., Gariboldi, M., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Pommier, Y., and Fornace, A. J., Jr. (1999). Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19, 1673-1685.
- Coogan, P. F., Clapp, R. W., Newcomb, P. A., Mittendorf, R., Bogdan, G., Baron, J. A., and Longnecker, M. P. (1996). Variation in female breast cancer risk by occupation. *Am J Ind Med* 30, 430-437.

- Dang, C. T., Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K., Dickler, M. N., Moasser, M. M., Seidman, A. D., D'Andrea, G. M., Theodoulou, M., Panageas, K. S., Norton, L., and Hudis, C. A. (2004). Phase II study of celecoxib and trastuzumab in metastatic breast cancer patients who have progressed after prior trastuzumab-based treatments. *Clin Cancer Res* 10, 4062-4067.
- Drago, J. R., and Murray, C. (1984). Control of metastases in the Nb rat prostatic adenocarcinoma model. *J Androl* 5, 265-268.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Fesus, L., Davies, P. J., and Piacentini, M. (1991). Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 56, 170-177.
- Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.
- Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P., and Adams, C. L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364, 555-556.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-773.
- Fornace, A. J., Jr., Zmudzka, B., Hollander, M. C., and Wilson, S. H. (1989). Induction of beta-polymerase mRNA by DNA-damaging agents in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 9, 851-853.
- Freeman, W. M., Robertson, D. J., and Vrana, K. E. (2000). Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29, 1042-1046, 1048-1055.
- Giardiello, F. M., Yang, V. W., Hylind, L. M., Krush, A. J., Petersen, G. M., Trimbath, J. D., Piantadosi, S., Garrett, E., Geiman, D. E., Hubbard, W., *et al.* (2002). Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 346, 1054-1059.
- Golub, T. R. (2001a). Genome-wide views of cancer. *N Engl J Med* 344, 601-602.
- Golub, T. R. (2001b). Genomic approaches to the pathogenesis of hematologic malignancy. *Curr Opin Hematol* 8, 252-261.
- Goluboff, E. T., Prager, D., Rukstalis, D., Giantonio, B., Madorsky, M., Barken, I., Weinstein, I. B., Partin, A. W., and Olsson, C. A. (2001). Safety and efficacy of exisulind for treatment of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 166, 882-886.
- Gomez-Angelats, M., Bortner, C. D., and Cidlowski, J. A. (2000). Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 33-42.
- Gupta, S., Adhami, V. M., Subbarayan, M., MacLennan, G. T., Lewin, J. S., Hafeli, U. O., Fu, P., and Mukhtar, H. (2004). Suppression of prostate carcinogenesis by dietary

supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res* 64, 3334-3343.

Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.

Hengst, L., Gopfert, U., Lashuel, H. A., and Reed, S. I. (1998). Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes Dev* 12, 3882-3888.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.

Hinchliffe, J. R., Garcia-Porrero, J. A., and Gumpel-Pinot, M. (1981). The role of the zone of polarizing activity in controlling the differentiation of the apical mesenchyme of the chick wing-bud: histochemical techniques in the analysis of a developmental problem. *Histochem J* 13, 643-658.

Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D., *et al.* (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 23, 176-184.

Huang, E. Y., Madireddi, M. T., Gopalkrishnan, R. V., Leszczyniecka, M., Su, Z., Lebedeva, I. V., Kang, D., Jiang, H., Lin, J. J., Alexandre, D., *et al.* (2001). Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene* 20, 7051-7063.

Hughes, F. M., Jr., Bortner, C. D., Purdy, G. D., and Cidlowski, J. A. (1997). Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 30567-30576.

Hurle, J. M., Ros, M. A., and Hinchliffe, J. R. (1988). Spatial and temporal changes in the pattern of glycosylation of the developing chick limb tissue components as revealed by fluorescent conjugated lectin probes. *Cell Differ* 24, 149-158.

Ishikawa, S., Nakagawa, T., Miyahara, R., Kawano, Y., Takenaka, K., Yanagihara, K., Otake, Y., Katakura, H., Wada, H., and Tanaka, F. (2005). Expression of MDA-7/IL-24 and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 1198-1202.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.

Jiang, H., Lin, J. J., Su, Z. Z., Goldstein, N. I., and Fisher, P. B. (1995). Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 11, 2477-2486.

Jiang, H., Su, Z. Z., Lin, J. J., Goldstein, N. I., Young, C. S., and Fisher, P. B. (1996). The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9160-9165.

- Jin, S., Antinore, M. J., Lung, F. D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A. B., Blanck, P., Roller, P. P., Fornace, A. J., Jr., and Zhan, Q. (2000). The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 275, 16602-16608.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.
- Kotenko, S. V. (2002). The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 223-240.
- Kovalsky, O., Lung, F. D., Roller, P. P., and Fornace, A. J., Jr. (2001). Oligomerization of human Gadd45a protein. *J Biol Chem* 276, 39330-39339.
- Lebedeva, I. V., Su, Z. Z., Sarkar, D., and Fisher, P. B. (2003). Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 13, 169-178.
- Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J. T., Reed, J. C., Griffin, D. E., and Hardwick, J. M. (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361, 739-742.
- Lew, D. J., and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 8, 795-804.
- Li, L., Feng, Z., and Porter, A. G. (2004). JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 279, 4058-4065.
- Lin, D. W., and Nelson, P. S. (2003). The role of cyclooxygenase-2 inhibition for the prevention and treatment of prostate carcinoma. *Clin Prostate Cancer* 2, 119-126.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21, 20-24.
- Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Lee, R., Holland, J. F., and Levine, A. C. (2000). Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol* 164, 820-825.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675-1680.
- Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J., and Cotman, C. W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7951-7955.

- Luk, G. D. (1996). Prevention of gastrointestinal cancer--the potential role of NSAIDs in colorectal cancer. *Schweiz Med Wochenschr* *126*, 801-812.
- Madireddi, M. T., Dent, P., and Fisher, P. B. (2000). AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation. *J Cell Physiol* *185*, 36-46.
- Mann, J. R., and DuBois, R. N. (2004). Cyclooxygenase-2 and gastrointestinal cancer. *Cancer J* *10*, 145-152.
- Masferrer, J. (2001). Approach to angiogenesis inhibition based on cyclooxygenase-2. *Cancer J 7 Suppl 3*, S144-150.
- McGall, G., Labadie, J., Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T., and Hinsberg, W. (1996). Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13555-13560.
- Mhashilkar, A., Chada, S., Roth, J. A., and Ramesh, R. (2001a). Gene therapy. Therapeutic approaches and implications. *Biotechnol Adv* *19*, 279-297.
- Mhashilkar, A. M., Schrock, R. D., Hindi, M., Liao, J., Sieger, K., Kourouma, F., Zou-Yang, X. H., Onishi, E., Takh, O., Vedvick, T. S., *et al.* (2001b). Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med* *7*, 271-282.
- Milella, M., Gelibter, A., Di Cosimo, S., Bria, E., Ruggeri, E. M., Carlini, P., Malaguti, P., Pellicciotta, M., Terzoli, E., and Cognetti, F. (2004). Pilot study of celecoxib and infusional 5-fluorouracil as second-line treatment for advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* *101*, 133-138.
- Molina, M. A., Sitja-Arnau, M., Lemoine, M. G., Frazier, M. L., and Sinicrope, F. A. (1999). Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* *59*, 4356-4362.
- Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Pittman, B., and Reddy, B. S. (2004). Regression of mouse prostatic intraepithelial neoplasia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Clin Cancer Res* *10*, 7727-7737.
- Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I. S., Tanaka, T., and Hirose, M. (2004). Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets* *4*, 373-384.
- Oppenheim, A., Katzir, Y., Fibach, E., Goldfarb, A., and Rachmilewitz, E. (1985). Hypomethylation of DNA derived from purified human erythroid cells correlates with gene activity of the beta-globin cluster. *Blood* *66*, 1202-1207.
- Paulovich, A. G., and Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* *82*, 841-847.
- Peek, R. M., Jr. (2004). Prevention of colorectal cancer through the use of COX-2 selective inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* *54 Suppl 1*, S50-56.

- Phillips, R. K., Wallace, M. H., Lynch, P. M., Hawk, E., Gordon, G. B., Saunders, B. P., Wakabayashi, N., Shen, Y., Zimmerman, S., Godio, L., *et al.* (2002). A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut* *50*, 857-860.
- Pruthi, R. S., Derksen, J. E., and Moore, D. (2004). A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *BJU Int* *93*, 275-278.
- Rao, M., Yang, W., Seifalian, A. M., and Winslet, M. C. (2004). Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* *19*, 1-11.
- Reardon, D. A., Quinn, J. A., Vredenburg, J., Rich, J. N., Gururangan, S., Badruddoja, M., Herndon, J. E., 2nd, Dowell, J. M., Friedman, A. H., and Friedman, H. S. (2005). Phase II trial of irinotecan plus celecoxib in adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* *103*, 329-338.
- Riedl, K., Krysan, K., Pold, M., Dalwadi, H., Heuze-Vourc'h, N., Dohadwala, M., Liu, M., Cui, X., Figlin, R., Mao, J. T., *et al.* (2004). Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Drug Resist Updat* *7*, 169-184.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., *et al.* (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* *33*, 401-406.
- Sabichi, A. L., and Lippman, S. M. (2004). COX-2 inhibitors and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genitourinary cancer. *Semin Oncol* *31*, 36-44.
- Saito, Y., Miyahara, R., Gopalan, B., Litvak, A., Inoue, S., Shanker, M., Branch, C. D., Mhashilkar, A. M., Roth, J. A., Chada, S., and Ramesh, R. (2005). Selective induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells through adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated -7 (mda-7)/interleukin-24 (IL-24) gene. *Cancer Gene Ther* *12*, 238-247.
- Saji, S., Hirose, M., and Toi, M. (2004). Novel sensitizing agents: potential contribution of COX-2 inhibitor for endocrine therapy of breast cancer. *Breast Cancer* *11*, 129-133.
- Sandler, R. S., Halabi, S., Baron, J. A., Budinger, S., Paskett, E., Keresztes, R., Petrelli, N., Pipas, J. M., Karp, D. D., Loprinzi, C. L., *et al.* (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* *348*, 883-890.
- Sarkar, D., Su, Z. Z., Lebedeva, I. V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R. V., Dent, P., and Fisher, P. B. (2002a). mda-7 (IL-24): signaling and functional roles. *Biotechniques Suppl*, 30-39.
- Sarkar, D., Su, Z. Z., Lebedeva, I. V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R. V., Valerie, K., Dent, P., and Fisher, P. B. (2002b). mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10054-10059.

- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Schadt, E. E., Li, C., Su, C., and Wong, W. H. (2000). Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data. *J Cell Biochem* 80, 192-202.
- Schuler, G. D. (1997). Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res* 7, 541-550.
- Schuler, G. D., Boguski, M. S., Stewart, E. A., Stein, L. D., Gyapay, G., Rice, K., White, R. E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., *et al.* (1996). A gene map of the human genome. *Science* 274, 540-546.
- Sheer, D., and Squire, J. (1996). Clinical applications of genetic rearrangements in cancer. *Semin Cancer Biol* 7, 25-32.
- Sheikh, M. S., Hollander, M. C., and Fornace, A. J., Jr. (2000). Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59, 43-45.
- Singh, G. (2001). Cardiovascular events and COX-2 inhibitors. *Jama* 286, 2810-2811; author reply 2811-2812.
- Sinicrope, F. A., Half, E., Morris, J. S., Lynch, P. M., Morrow, J. D., Levin, B., Hawk, E. T., Cohen, D. S., Ayers, G. D., and Stephens, L. C. (2004). Cell proliferation and apoptotic indices predict adenoma regression in a placebo-controlled trial of celecoxib in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 920-927.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79, 329-339.
- Su, Z. Z., Lebedeva, I. V., Sarkar, D., Gopalkrishnan, R. V., Sauane, M., Sigmon, C., Yacoub, A., Valerie, K., Dent, P., and Fisher, P. B. (2003). Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner. *Oncogene* 22, 1164-1180.
- Sun, L., Gong, R., Wan, B., Huang, X., Wu, C., Zhang, X., Zhao, S., and Yu, L. (2003). GADD45gamma, down-regulated in 65% hepatocellular carcinoma (HCC) from 23 chinese patients, inhibits cell growth and induces cell cycle G2/M arrest for hepatoma Hep-G2 cell lines. *Mol Biol Rep* 30, 249-253.
- Taketo, M. M. (1998a). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 90, 1529-1536.
- Taketo, M. M. (1998b). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 90, 1609-1620.

- Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Terai, C., Kornbluth, R. S., Pauza, C. D., Richman, D. D., and Carson, D. A. (1991). Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 87, 1710-1715.
- Thun, M. J., Henley, S. J., and Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94, 252-266.
- Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M., and Verma, I. M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1844-1848.
- Tuettenberg, J., Grobholz, R., Korn, T., Wenz, F., Erber, R., and Vajkoczy, P. (2005). Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 31-40.
- Umar, A., Viner, J. L., Anderson, W. F., and Hawk, E. T. (2003). Development of COX inhibitors in cancer prevention and therapy. *Am J Clin Oncol* 26, S48-57.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192, 327-338.
- Vaux, D. L. (1993). Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 786-789.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149.
- Wang, H. M., and Zhang, G. Y. (2005). Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis in vivo. *World J Gastroenterol* 11, 340-343.
- Wang, M., Tan, Z., Zhang, R., Kotenko, S. V., and Liang, P. (2002). Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J Biol Chem* 277, 7341-7347.
- Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr., and Harris, C. C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706-3711.
- Wechter, W. J., Kantoci, D., Murray, E. D., Jr., Quiggle, D. D., Leipold, D. D., Gibson, K. M., and McCracken, J. D. (1997). R-flurbiprofen chemoprevention and treatment of intestinal adenomas in the APC(Min)/+ mouse model: implications for prophylaxis and treatment of colon cancer. *Cancer Res* 57, 4316-4324.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 15, 1359-1367.

Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.

Yamasawa, K., Nio, Y., Dong, M., Yamaguchi, K., and Itakura, M. (2002). Clinicopathological significance of abnormalities in Gadd45 expression and its relationship to p53 in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 8, 2563-2569.

Yang, Q., Manicone, A., Coursen, J. D., Linke, S. P., Nagashima, M., Forgues, M., and Wang, X. W. (2000). Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *J Biol Chem* 275, 36892-36898.

Zerbini, L. F., and Libermann, T. A. (2005). Life and death in cancer. GADD45 alpha and gamma are critical regulators of NF-kappaB mediated escape from programmed cell death. *Cell Cycle* 4, 18-20.

Zerbini, L. F., Wang, Y., Cho, J. Y., and Libermann, T. A. (2003). Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res* 63, 2206-2215.

Zerbini, L. F., Wang, Y., Czibere, A., Correa, R. G., Cho, J. Y., Ijiri, K., Wei, W., Joseph, M., Gu, X., Grall, F., *et al.* (2004). NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13618-13623.

Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., and De Marzo, A. M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 215, 1-20.

Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr. (1999a). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-2900.

Zhan, Q., Kontny, U., Iglesias, M., Alamo, I., Jr., Yu, K., Hollander, M. C., Woodworth, C. D., and Fornace, A. J., Jr. (1999b). Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. *Oncogene* 18, 297-304.

Zhang, W., Bae, I., Krishnaraju, K., Azam, N., Fan, W., Smith, K., Hoffman, B., and Libermann, D. A. (1999). CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene* 18, 4899-4907.

9. CURRICULUM VITAE

Name: Akos Gabor Czibere
Geburtsdatum: 04.08.1977
Geburtsort: Budapest, Ungarn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch- katholisch

1977 - 1981 Budapest, Ungarn

1981 Immigration nach Deutschland

1984 - 1988 Ricarda-Huch-Grundschule, Düsseldorf

1988 - 1997 Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium, Düsseldorf

1997 Abitur

1997 - 1998 Zivildienst in der Unfallchirurgischen Abteilung des Florence-Nightingale-Krankenhauses, Düsseldorf

1998 -2005 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2000 Physikum

2001 Famulatur in der Abteilung für Unfallchirurgie am Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf

2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2001 - 2005 Experimentelle Arbeiten zur Therapie von Karzinomen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika bei Prof. Dr. Norbert Gattermann an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie; Direktor: Prof. Dr. Rainer Haas

2001 - 2002 Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Assistenz im Präparierkurs.

2002 Famulatur an der Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf im Labor für Molekulare Hämatologie der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

2002 Famulatur an der Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

- 2002 Famulatur an der Charité, Virchow Klinikum Berlin
Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
- 2002 - 2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Pathologie an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 2003 Hausärztliches Praktikum in Klausen, Süd-Tirol.
- 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Genomics Center des Beth
Israel Deaconess Medical Center (Direktor: Prof. Towia
Libermann, PhD), Harvard Institutes of Medicine, Boston,
USA
- 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2004 Beginn des Praktischen Jahres an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
- 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2005 Abschluss des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf. Gesamtnote: gut
- 2005 Seit 01.07.2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für
Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Weitere Aktivitäten

- 1996 - 1997 Mitarbeit in der Schülervertretung des Annette-von-Droste-Hülshoff
Gymnasiums
- 2000 - 2003 Organisation von Tutorien für Medizinstudenten der Heinrich-Heine-
Universität im ersten Jahr.
- 2001 - 2003 Mitglied der Unterrichtskommission für den ersten klinischen Studienabschnitt
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sprachen

Deutsch
Englisch
Ungarisch

Akos Gabor Czibere

06. Dezember 2005

ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Studien zeigen, dass nicht-steroidale Antiphlogistika erfolgreich zur Prävention und Behandlung maligner Neoplasien eingesetzt werden können. Allerdings fehlt weiterhin ein tieferes Verständnis der Wirkmechanismen. Im folgenden wird gezeigt, dass die nicht-steroidalen Antiphlogistika Sulindac-Sulfid, Exisulind, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398 und Flurbiprofen die Expression des Zytokins melanoma differentiation-associated gene 7/ Interleukin 24 (MDA-7/IL24) in Karzinomzellen steigern. Diese Expressionssteigerung war in vitro einer Adenovirus-vermittelten MDA-7/IL24-Expressionssteigerung überlegen. MDA-7/IL24 ist ein potenter Induktor für Apoptose und Zellzyklus-Arrest. Interessanterweise findet sich diese gesteigerte MDA-7/IL24-Expression als Folge einer Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika nur in Karzinomzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies für verschiedene Prostata-, Magen-, Nieren-, und Mammakarzinomzellen demonstriert werden. Bei nicht-neoplastischen Zellen fand sich weder eine MDA-7/IL24-Aktivierung noch eine Proliferationshemmung. MDA-7/IL24 vermittelt seine anti-proliferativen Effekte also exklusiv in Karzinomzellen. Bei anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika wie Aspirin, Celecoxib, Acetaminophen, Ibuprofen, Naproxen, Meloxicam und Ebselen war der Einfluß auf die MDA-7/IL24-Transkription nicht ausreichend, um Apoptose oder Zellzyklus-Arrest auszulösen. Es zeigte sich ferner, dass die MDA-7/IL24-Aktivierung zu einer Expressionssteigerung der beiden growth arrest- and DNA damage-inducible genes 45 (GADD45) α und γ führt. Diese GADD45-Expressionssteigerung ist verantwortlich für die MDA-7/IL24 vermittelte Apoptoseinduktion via Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) sowie für den Zellzyklus-Arrest via Hemmung der G2/M-Checkpoint-Kinase, cyclin-dependent kinase 1/ Cyclin B (CDK1/Cyclin-B). Tumorzellen, bei denen mittels siRNA die Fähigkeit der GADD45 α - und γ -Expression ausgeschaltet war, zeigten trotz Inkubation mit nicht-steroidalen Antiphlogistika weder eine gesteigerte Apoptoseinduktion noch eine signifikante Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Diese Zellen zeigten auch keine Aktivierung der JNK und keine Hemmung der G2/M-Checkpoint-Kinase. Diese Arbeit zeigt, dass MDA-7/IL24, GADD45 α und γ kritische Mediatoren der Apoptose und der Zellzyklusregulation bei neoplastischen Zellen sind. Ferner werden die nicht-steroidalen Antiphlogistika Sulindac-Sulfid, Exisulind, Finasterid, Diclofenac, Flufenaminsäure, NS-398 und Flurbiprofen in vitro als hoch-effektive Substanzen zur MDA-7/IL24-Expressionssteigerung in malignen Zellen etabliert.