

**Glucocorticoid-induziertes Wachstum von Tumorzellen:
Systematische Quantifizierung,
Signalmechanismen
und Inhibition**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Universität Hohenheim
und
Helmholtz Zentrum München -
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

vorgelegt von
Sibylle Gündisch

aus Hermannstadt
2010

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. Breer
1. berichtende Person:	PD Dr. med. Irmela Jeremias
2. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. L. Graeve
3. Prüfer:	PD Dr. rer. nat. A. Lorentz

Eingereicht am: 30.03.2010

Mündliche Prüfung am: 16.06.2010

Die vorliegende Arbeit wurde am 28.05.2010 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Tumorthherapie	1
1.2	Glucocorticoide	2
1.3	Klinischer Einsatz von Glucocorticoiden.....	3
1.3.1	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	4
1.3.2	Hämatopoetische Tumoren	5
1.3.3	Solide Tumoren.....	7
1.4	Signaltransduktion von Glucocorticoiden	8
1.4.1	Glucocorticoidrezeptor	8
1.4.2	Potentielle Signalmechanismen	9
1.4.3	Einfluss von Glucocorticoiden auf Apoptosesignalwege	11
1.4.4	Einfluss von Glucocorticoiden auf Proliferationssignalwege	13
1.5	Induktion von Tumorzellproliferation durch weitere Zytostatika	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Laborgeräte.....	20
2.1.4	Kommerzielle Reagenziensätze.....	22
2.1.5	Pufferlösungen	22
2.1.6	Stimulantien und Inhibitoren.....	23
2.1.7	Antikörper für Immundetektion	23
2.1.8	Enzyme	24
2.1.9	Primer und Hybridisierungssonden	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Zellbiologie	25
2.2.1.1	Zellkultur adhärenter Zellen	25
2.2.1.2	Zellkultur primärer Leukämiezellen	26
2.2.1.3	Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie	27

2.2.1.4	Bestimmung des Tumorzellwachstums mittels repetitiver Mikroskopie.....	28
2.2.1.5	Bestimmung des Tumorzellwachstums mittels Impedanz- analyse.....	29
2.2.1.6	Bestimmung der DNA-Syntheserate mittels BrdU-Inkorporation..	30
2.2.1.7	Bestimmung der Metabolisierungsrate mittels Wst-1-Umsatz.....	30
2.2.1.8	Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie.....	31
2.2.2	Tierversuch mittels Maus-Xenograft-Modell.....	32
2.2.3	Molekularbiologie.....	33
2.2.3.1	Quantitative Bestimmung von RNA und DNA	33
2.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.3.3	Spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ...	33
2.2.3.4	Spaltung der DNA mittels Restriktionsverdau	35
2.2.3.5	Ligation	36
2.2.3.6	Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA in kompetente E.coli DH5 α	37
2.2.3.7	Colony-PCR.....	37
2.2.3.8	Präparation der Plasmid-DNA.....	38
2.2.3.9	Sequenzierung.....	39
2.2.3.10	RNA-Isolation.....	39
2.2.3.11	Reverse Transkription.....	39
2.2.3.12	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR).....	40
2.2.3.13	Transiente Transfektion mittels Lipofektion.....	41
2.2.3.14	Stabile Transfektion mittels lentiviralem Vektorsystem	42
2.2.3.15	Proteo-Tuning System	44
2.2.4	Proteinbiochemie	45
2.2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	45
2.2.4.2	Protein SDS-PAGE	45
2.2.4.3	Semi-Dry Western Blot.....	46
2.2.4.4	Immundetektion	46
2.2.5	Statistik	47

3	ERGEBNISSE.....	48
3.1	Wirkung von Glucocorticoiden auf Zellen solider Tumoren	48
3.1.1	Glucocorticoid-induzierte Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion....	48
3.1.2	Glucocorticoid-induzierte Proliferation in vitro	51
3.1.2.1	Erhöhung des Wachstums ermittelt anhand repetitiver Mikroskopie.....	51
3.1.2.2	Erhöhung des Wachstums ermittelt anhand elektrischer Impedanz	57
3.1.2.3	Erhöhung der absoluten Zellzahl	58
3.1.2.4	Erhöhung der DNA-Syntheserate und der metabolischen Aktivität	59
3.1.3	Glucocorticoid-induzierte Proliferation in vivo im Tierversuch	60
3.2	Wirkung von Glucocorticoiden auf primäre Leukämiezellen	62
3.3	Signalmechanismen der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren.....	68
3.3.1	Der Glucocorticoidrezeptor.....	68
3.3.1.1	Rezeptor-Expression und Proliferation	68
3.3.1.2	Aktivierung des Rezeptors	71
3.3.1.3	Funktionelle Bedeutung des Rezeptors für die Proliferation	73
3.3.2	Die Proteinkinasen B/Akt und p38-MAPK	79
3.3.2.1	Aktivierung der Kinasen	80
3.3.2.2	Funktionelle Bedeutung der Kinasen für die Proliferation	81
3.3.3	Suche nach sezernierten Wachstumsfaktoren	84
3.4	Inhibition der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren.....	87
3.4.1	Inhibition der Proliferation durch Induktion von Apoptose	87
3.4.1.1	Vincristin-induzierte Apoptose <i>in vitro</i>	87
3.4.1.2	Vincristin-induzierte Apoptose <i>in vivo</i> im Tierversuch.....	89
3.4.2	Inhibition der Proliferation durch Sensitivierung gegenüber Apoptose	90
3.4.2.1	Stabile, induzierbare Expression von Caspase-3 in MCF-7 Zellen	90
3.4.2.2	Sensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Apoptose durch Expression von Caspase-3	96

4	DISKUSSION.....	101
4.1	Wirkung von Glucocorticoiden auf Zellen solider Tumoren	101
4.2	Wirkung von Glucocorticoiden auf primäre Leukämiezellen	103
4.3	Signalmechanismen der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren.....	104
4.3.1	Der Glucocorticoidrezeptor.....	105
4.3.2	Die Proteinkinase B/Akt und p38-MAPK	107
4.4	Inhibition der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren.....	109
4.5	Bedeutung für die Tumorthherapie.....	110
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
6	SUMMARY.....	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	116
8	ANHANG	124
8.1	Abkürzungsverzeichnis	124
8.2	Abbildungsverzeichnis	126
8.3	Tabellenverzeichnis	128
8.4	Danksagung.....	129
8.5	Lebenslauf	130
8.6	Eidesstattliche Erklärung	131

1 EINLEITUNG

Krebs ist eine jener Erkrankungen, die weltweit zu den meisten Todesfällen führen. Laut WHO (World Health Organization) sind im Jahr 2007 schätzungsweise etwa 7,9 Millionen Menschen (13%) an einer Krebserkrankung gestorben. Statistiker gehen davon aus, dass diese Zahl kontinuierlich ansteigen wird und im Jahr 2030 möglicherweise an die 11,5 Millionen Menschen an Krebs sterben werden (www.who.int). Nach jüngsten Forschungserkenntnissen ist unumstritten, dass eine Krebszelle aus einer Vielzahl unterschiedlicher genetischer Veränderungen und epigenetischer Modifikationen hervorgeht (Chin und Gray, 2008). Je besser man die zugrunde liegenden Ursachen sowie die Molekularbiologie der Krebszellen versteht, umso größer wird die Wahrscheinlichkeit, neue und effiziente Ansätze in der Tumorthherapie zu finden.

1.1 Tumorthherapie

Die Tumorthherapie basiert im Wesentlichen auf drei Pfeilern. Die Chirurgie und die Resektion des Tumors bleiben weiterhin die wirksamsten Strategien, solange sich ein solider Tumor noch nicht weit ausgebreitet hat. Daneben stellen die Radiotherapie und die Chemotherapie weitere Maßnahmen zur Beseitigung der Tumorzellen dar. Die Chemotherapie basiert auf dem Einsatz von Zytostatika, die den Tumorzelltod zumeist über den programmierten Zelltod, die Apoptose, herbeiführen. Dabei scheint die Schädigung der DNA eine wichtige Rolle zu spielen, die nachgeordnet zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalproteine, wie zum Beispiel p53 und dem intrinsischen Apoptose-Signalweg, kommt. Jedoch sind bis heute die genauen, zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege, die letztendlich den Zelltod induzieren, unklar.

Der Begriff Zytostatika impliziert eine Gruppe chemisch unterschiedlicher Substanzen, die natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können und welche die zellschädigende Wirkung gemeinsam haben. Dabei wird jedoch unspezifisch das Zellwachstum aller sich schnell teilender Körperzellen beeinträchtigt, wodurch es während einer Therapie zu erheblichen Nebenwirkungen kommen kann. Zum Beispiel sind betroffene gesunde Zellen mit einer hohen Mitoserate Haarfollikel- und Darmzellen, deren Angriff zu den bekannten Nebenwirkungen wie Haarausfall und Störungen des Magen-Darm-Traktes führt. Darüber hinaus verursachen viele Zytostatika, wie beispielsweise Cisplatin, in unterschiedlichem Ausmaß

Nebenwirkungen wie Übelkeit (Nausea) und Erbrechen (Emesis), die laut Studien Patienten während einer Chemotherapie am meisten belasten (Coates et al., 1983). Das Ziel einer antiemetischen Therapie ist also nicht nur, den Patienten vor Dehydratation und Elektrolytstörungen zu bewahren, sondern darüber hinaus auch die Verbesserung seiner Lebensqualität. Die Linderung der zum Teil erheblichen Nebenwirkungen von Zytostatika wird durch adjuvante Therapie erreicht, die unter anderem auch Glucocorticoide umfasst.

1.2 Glucocorticoide

Glucocorticoide (GC), auch als Glucosteroide bezeichnet, sind Steroidhormone und werden, neben Mineralocorticoiden und Sexualhormonen, in der Nebennierenrinde in der Zona fasciculata synthetisiert. GC spielen eine wichtige Rolle als Regulator des Intermediärstoffwechsels und als Modulator des Immunsystems, wobei die Vielfalt der Wirkung dieser Hormone durch die ubiquitäre Präsenz von Glucocorticoidrezeptoren (GR) erklärt werden kann. Ihren Namen verdanken die GC ihrem Einfluss auf den Kohlenhydrathaushalt, indem sie zum Beispiel, synergistisch mit Glucagon und den Katecholaminen, die Gluconeogenese und Glykogenbildung fördern und somit zu einem Blutglucoseanstieg führen. Darüber hinaus beeinflussen sie aber auch den Protein- und Fettstoffwechsel und haben allgemein einen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung.

Synthetische GC sind chemisch veränderte Abkömmlinge des endogenen Cortisolmoleküls, bei denen die unerwünschten mineralocorticoiden Nebenwirkungen vermindert und die erwünschten glucocorticoiden Wirkungen verstärkt sind. Darüber hinaus unterscheiden sie sich in ihrer Affinität zum Transportprotein Transcortin bzw. zum GR und weisen im Vergleich zu Cortisol eine höhere Halbwertszeit auf.

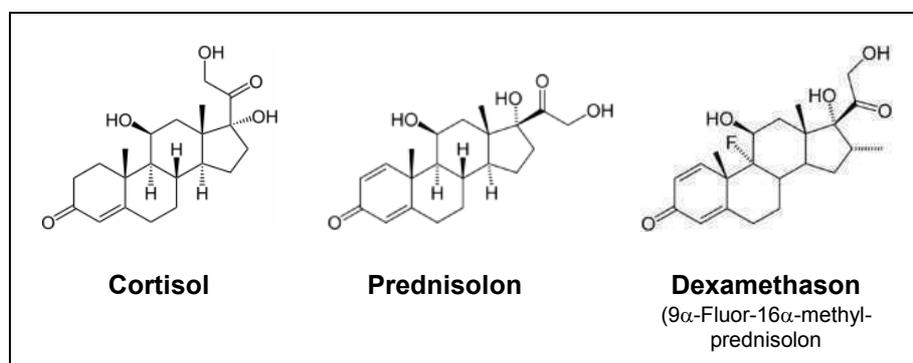


Abb.1.1 Strukturformel von Cortisol und zwei synthetischen Glucocorticoiden

(modifiziert nach www.wikipedia.de)

In Abb.1.1 ist zu sehen, dass Cortisol, auch Hydrocortison genannt, sowie Prednisolon und Dexamethason das typische Grundgerüst von Cholesterin aufweisen, bestehend aus 3 Cyclohexanringen und einem Cyclopentanring. Bei Prednisolon handelt es sich um ein dehydriertes, nicht halogeniertes Cortisolmolekül, wohingegen Dexamethason ein fluoriertes GC ist. Die Differenzen in der sterischen Konformation und die Art der Substituenten bedingen die unterschiedliche Potenz der GC sowie deren Plasmahalbwertszeit.

Name	Glucocorticoid-Potenz	Plasmahalbwertszeit [h]
Cortisol	1	1 - 2
Prednisolon	4 - 5	2 - 3
Dexamethason	25 - 30	4 - 5

Tab.1.1 Unterschiedliche Glucocorticoid-Potenz und Plasmahalbwertszeit

Die GC-Potenz bezieht sich auf Cortisol mit dem Wert 1 (modifiziert nach Czock et al, 2005)

Die Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht über die unterschiedliche Potenz und Plasmahalbwertszeit der GC, im Vergleich zum endogenen Cortisol.

1.3 Klinischer Einsatz von Glucocorticoiden

Weithin bekannt, werden GC aufgrund ihrer immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Wirkung bei der Therapie von Asthma, Rheumatoider Arthritis oder auch bei Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Leiden eingesetzt. So hemmen GC zum Beispiel die Produktion von Prostaglandinen, Cyclooxygenase und Stickstoffmonoxid-Synthase. Darüber hinaus führt die Gabe von GC zu einem Abfall der zirkulierenden Lymphocyten, Monocyten und Eosinophilen, der durch eine Umverteilung dieser Zellen aus der Zirkulation in andere Kompartimente oder durch Apoptose zustande kommt. Diese Tatsache erklärt unter anderem auch die Wirkungsweise von GC in der Chemotherapie hämatopoetischer Tumoren (s. 1.3.2). Durch ihre vielfältige Wirkung und das daraus resultierende breite Anwendungsspektrum, gehören GC zu den wichtigsten und am häufigsten angewandten Medikamenten.

Im Kontext der vorliegenden Arbeit wird im folgenden Abschnitt, neben den pharmakologischen Eigenschaften ausschließlich auf den Einsatz von GC im Zuge der Chemotherapie eingegangen.

1.3.1 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes hängt im Wesentlichen von 5 Parametern ab, namentlich Freisetzung, Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung. Auf das pharmakokinetische Verhalten einer Substanz haben nicht nur ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel Löslichkeit oder Diffusionsgeschwindigkeit Einfluss, sondern auch biologische Kenngrößen des jeweiligen Organismus, wie zum Beispiel Alter, Geschlecht oder der allgemeine Gesundheitszustand. Die Pharmakodynamik eines Wirkstoffes beinhaltet die mathematische Beschreibung für die quantitative Beziehung zwischen der Konzentration des Wirkstoffes und den induzierten Effekten im Organismus. Wie bereits unter Kapitel 1.2 erwähnt, hängt die Wirkung unter anderem von der sterischen Konformation und der Art der Substituenten ab und das Wirkprofil wird durch Art und Ort der Wirkung im Organismus bestimmt. Die klinische Wirksamkeit hängt sowohl von den pharmakokinetischen als auch pharmakodynamischen Charakteristika eines Wirkstoffes ab.

Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt dachte man, dass GC qualitativ nicht zu unterscheiden sind, da sie über denselben Rezeptor (s. 1.4.1) agieren (Liddle, 1961). Jedoch ist heutzutage unverkennbar, dass GC sich beispielsweise in ihrer GC-Potenz und auch Plasmahalbwertszeit deutlich unterscheiden. Allerdings finden sich in den Literaturangaben voneinander abweichende Angaben, sowohl zur Plasmahalbwertszeit von GC sowie zu deren Maximalkonzentration im Plasma (Plasmapeakkonzentration, PPC), was am Beispiel von Dexamethason erläutert werden soll. Charles et al haben zum Beispiel bei Säuglingen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht eine Plasmahalbwertszeit von Dexamethason um 9 ± 3 h beobachtet (Charles et al., 1993). Nach neueren Erkenntnissen hat man sich aber auf die in Tab.1.1 angegebenen Werte von 4 - 5 h festgelegt (Czock et al., 2005). Die Angaben zur PPC von Dexamethason weichen noch stärker voneinander ab. In der Veröffentlichung von Czock et al finden sich auch hierzu Angaben, beispielsweise geben sie einen PPC von maximal $3,4 \times 10^{-8}$ M an, normalisiert auf die intravenöse (i.v.) Gabe von 1 mg Dexamethason. Hochgerechnet auf eine während der Tumortherapie durchaus übliche Gabe von 20 - 40 mg Dexamethason i.v. (Empfehlungen aus „Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2002/2003; J. Preiß, W. Dornoff, F.- G. Hagmann, A. Schmieder) ergibt dies eine PPC von etwa $0,7 - 1,3 \times 10^{-6}$ M. Tsuei et al kommen in ihren Studien an gesunden

Erwachsenen auf etwa denselben Wert von $1,5 \times 10^{-6}$ M, allerdings bereits nach Gabe von nur 8 mg Dexamethason i.v. (Tsuei et al., 1979). Dies würde hochgerechnet auf einen Bolus von 40 mg Dexamethason i.v. bereits einer Konzentration von etwa 8×10^{-6} M entsprechen. Brady et al haben in ihrer Studie die Effektivität von Dexamethason als Antiemetikum bei einer Gabe von 40 - 200 mg i.v. getestet und konnten dabei eine PPC von bis zu $1,3 \times 10^{-5}$ M messen (Brady et al., 1987). In allen erwähnten Studien wurden die PPCs direkt nach Injektion bzw. spätestens nach 1 h erreicht und sanken danach ab. Die Komplexität der Ermittlung von Plasmahalbwertszeit und PPC erschwert den Einsatz adäquater Konzentrationen in einem *in vitro*-Zellkulturmodell. Die Literaturangaben dienen als Maßstab für die PPC, wobei nie höhere Konzentrationen eingesetzt wurden, als sie bei Patienten gemessen wurden.

1.3.2 Hämatopoetische Tumoren

Wie bereits einleitend erwähnt, führt die Gabe von GC zu einem Abfall der zirkulierenden Lymphocyten, Monocyten und Eosinophilen. Deutlich sensitiver als die benignen sind die malignen Blutzellen, insbesondere jene der akuten Leukämien und Lymphome. Demzufolge stellen GC durch ihre Fähigkeit, in diesen Zellen Apoptose zu induzieren, heutzutage einen Eckpfeiler der Chemotherapie hämatopoetischer Erkrankungen, wie Leukämien, Lymphome und Myelome, dar. Die zugrunde liegenden Signalmechanismen der Apoptoseinduktion durch GC in hämatopoetischen Zellen wurden bereits ausgiebig erforscht.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die GC-induzierte Apoptose GR-abhängig verläuft (s. 1.4.1) und Vorgänge, wie zum Beispiel die Transrepression bzw. Transaktivierung, unerlässlich sind (Helmberg et al., 1995; Ramdas und Harmon, 1998). Generell lässt sich der Mechanismus in drei Phasen unterteilen. In der Initiationsphase kommt es zur Aktivierung des GR und zur GR-vermittelten Regulation spezifischer Zielgene. Daraufhin folgt die Entscheidungsphase, in der über Tod und Überleben der Zelle geurteilt wird, was von einer fein regulierten Balance zwischen den unterschiedlichen Signalmolekülen abhängig ist. Die Ausführungsphase umfasst zum Beispiel die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen und führt gegebenenfalls zur Apoptose (Frankfurt und Rosen, 2004).

Für die Apoptoseinduktion können letztendlich viele verschiedene Signalmoleküle verantwortlich sein. Zum Beispiel kann es unter anderem zu einer

Hochregulation der Expression des pro-apoptotischen Proteins Bim kommen (Wang et al., 2003) oder zur Herunterregulation der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL (Broome et al., 2002). Darüber hinaus konnte anhand von Knockout-Experimenten gezeigt werden, dass Caspase-9 und Apaf-1 essentiell für die GC-induzierte Apoptose sind (Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998).

Jedoch gibt es auch im Fall hämatopoetischer Tumoren das Problem der Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose. Zwaan et al. haben zum Beispiel in *in vitro* Untersuchungen an primären Leukämiezellen von Kindern herausgefunden, dass nur etwa 50% der untersuchten Proben sensitiv auf GC-induzierte Apoptose reagierten. Im genaueren Vergleich von ALL-(akute lymphoblastische Leukämie) und AML-(akute myeloische Leukämie) Proben konnte gezeigt werden, dass insbesondere die AML-Proben GC-resistent waren und nur etwa 15% der untersuchten leukämischen Primärzellen sensitiv auf GC-induzierte Apoptose reagierten (Zwaan et al., 2000).

Die für GC-Resistenz zugrunde liegenden Signalmechanismen sind weithin unklar. Es wird vermutet, dass Resistenzprobleme auftreten, wenn zum Beispiel nur wenig GR exprimiert wird, GR-Mutationen vorliegen, es vermehrt zur Expression von inaktiven Spleißvarianten (GR β) oder zu einer abnormen Phosphorylierung des GR kommt (Tissing et al., 2003). Des Weiteren kann es parallel zur Aktivierung von Überlebenssignalwegen kommen, die GC-induzierte Apoptose antagonisieren (Sionov, 2006). Zum Beispiel erklärt sich die hohe Resistenz von AML Zellen dadurch, dass in den meisten Fällen konstitutiv aktive MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) oder PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) vorliegen (Platanias, 2003; Grandage, 2005). Nuutinen et al haben Akt-Inhibitoren erfolgreich eingesetzt, um Lymphomzellen gegenüber GC-induzierter Apoptose zu resensitivieren (N uutinen et al., 2006). In Eosinophilen wurde gezeigt, dass GC in Abhängigkeit der Interleukin-5-Konzentration in der Lage sein können, sowohl Apoptose als auch das Gegenteil, eine höhere Überlebensrate, zu induzieren (Bloom et al., 2004).

Frankfurt und Rosen postulieren in ihrem Artikel, dass es unwahrscheinlich ist, dass ein einziger Mechanismus für die vielseitigen GC-Effekte verantwortlich ist (Frankfurt und Rosen, 2004). Denkbar ist, dass für die zytotoxische Wirkung andere Signalwege benötigt werden als für die antiinflammatorische oder immunsuppressive Wirkung von GC. Darüber hinaus belegen die erwähnten Daten das sowohl pro- als auch anti-apoptotische Potential von GC, das es weiter zu untersuchen gilt.

1.3.3 Solide Tumoren

Eine der schwerwiegendsten und die Lebensqualität der Krebspatienten am meisten einschränkenden Nebenwirkungen der Chemo- und Radiotherapie ist das Auftreten von Übelkeit (Nausea) und Erbrechen (Emesis). Die für das Erbrechen verantwortlichen unterschiedlichen Rezeptortypen und Neurotransmitter wurden sowohl in der Chemorezeptor-Triggerzone im Nucleus tractus solitarii, als auch im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Berger und Clark-Snow, 1997; Drechsler und Bauer, 1995). Als verantwortliche Neurotransmitter scheint Serotonin (5-Hydroxytryptamin), Dopamin und Substanz P (Neurokinin) die größte Bedeutung zuzukommen (Mitchelson, 1992; Sanger, 2004).

Die Therapie basiert in erster Linie auf der Kombination verschiedener Antiemetika und wird in den meisten Fällen prophylaktisch durchgeführt. Dabei sind die wichtigsten Substanzklassen die 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptorantagonisten (Navari, 2009), gefolgt von den GC (Grunberg, 2007) und Neurokinin-1-Rezeptorantagonisten (Diemunsch et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptorantagonisten mit Dexamethason, selbst bei hochemetogenen Zytostatika, in 70 - 90% der Fälle Übelkeit und Erbrechen verhindern kann (Roila et al., 1996). Im Jahr 2004 wurden die so genannten „Leitlinien für die antiemetische Prophylaxe und Therapie“ von der MASCC (Multinational Association of Supportive Care in Cancer, www.massc.org) festgelegt, an denen sich die aktuellen Therapiemaßnahmen im Wesentlichen orientieren.

Eine weitere schwere Nebenwirkung mancher Chemotherapien ist das Auftreten von Hirnödemen, die aufgrund vermehrter Flüssigkeitseinlagerung im Hirngewebe entstehen. Um dauerhafte Schäden zu verhindern, muss schnellstmöglich für Abschwellung gesorgt werden, was zum Beispiel durch Behandlung mit hoch dosiertem Dexamethason erzielt wird (Kaal und Vecht, 2004).

Zusammenfassend haben die Erkenntnisse der vergangenen Jahrzehnte zu einem breit gefächerten Einsatz von GC als Adjuvantien in der Chemotherapie solider Tumoren geführt, obwohl die zugrunde liegenden Wirkmechanismen, die zur Linderung der Nebenwirkungen führen, bis dato unbekannt sind.

1.4 Signaltransduktion von Glucocorticoiden

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, kann die Vielfalt der Wirkung von GC durch die ubiquitäre Präsenz von Glucocorticoidrezeptoren (GR) erklärt werden. Darüber hinaus sind in den vergangenen Jahren jedoch noch weitere potentielle Signalmechanismen der GC aufgedeckt worden, die in diesem Kapitel erläutert werden. Des Weiteren wird im Kontext maligner sowie benigner Zellen auf den Einfluss von GC auf Apoptose- sowie Proliferationssignalwege eingegangen.

1.4.1 Glucocorticoidrezeptor

Der GR ist ein Steroidhormonrezeptor und gehört zu der Gruppe der regulierbaren Transkriptionsfaktoren. Er wurde 1985 erstmals kloniert (Hollenberg et al., 1985) und wird auch als NR3C1 (nuclear receptor superfamily 3, group C, member 1) bezeichnet. Der GR kommt vorwiegend in 2 Isoformen vor, dem GR α (777 Aminosäuren) und dem etwas kleineren GR β (742 Aminosäuren). Die beiden unterscheiden sich am C-Terminus und entstehen durch alternatives Spleißen. Dabei repräsentiert der GR α den klassischen, hormonabhängigen Rezeptor, während GR β keinen Liganden bindet und dominant negative Effekte auf die transkriptionelle Aktivität des GR α ausübt (Bamberger et al., 1995). Erst kürzlich wurde jedoch bekannt, dass auch der GR β intrinsische transkriptionelle Aktivität aufweist, die unabhängig vom GR α abläuft (Kino et al., 2009).

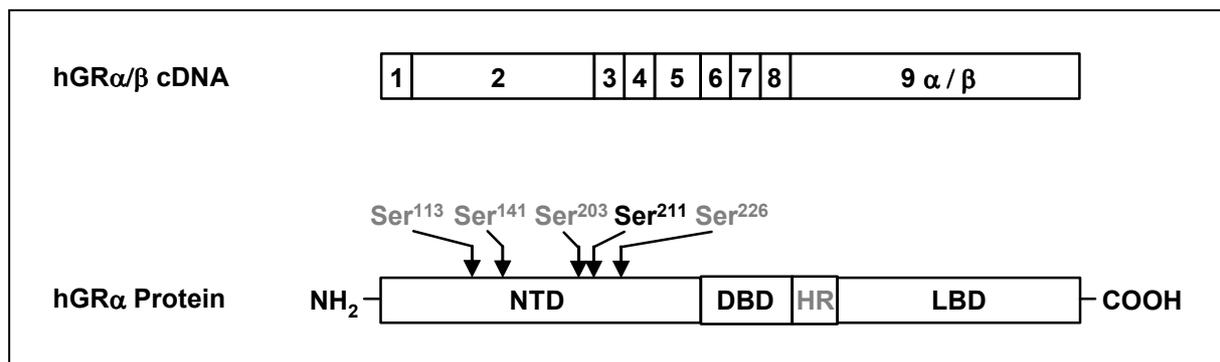


Abb.1.2 Aufbau des Glucocorticoidrezeptors

Durch alternatives Spleißen des humanen GR (hGR) Gens entstehen die zwei Isoformen GR α und GR β . Der GR kann durch posttranslationale Modifikationen an mehreren Serinresten phosphoryliert werden (5 Hauptphosphorylierungsstellen wurden abgebildet). cDNA, complementary DNA; NTD, N-terminale Domäne; DBD, DNA-Bindungsdomäne; HR, hinge region; LBD, Liganden-Bindungsdomäne (modifiziert nach (Moutsatsou und Papavassiliou, 2008)).

Die N-terminale Domäne umfasst die Transaktivierungs- bzw. Transrepressionsbereiche, gefolgt von einer relativ kurzen DNA-Bindungsdomäne, mit charakteristischer Zinkfingerstruktur. C-terminal befindet sich die Liganden-Bindungsdomäne, die zusätzlich noch die Dimerisierungssignale enthält. Im Zuge posttranslationaler Modifikationen wird der GR phosphoryliert, sumoyliert und nach Ubiquitinylierung proteosomal abgebaut (Zhou und Cidlowski, 2005). In der N-terminalen Domäne wurden konstitutiv phosphorylierte Aminosäuren sowie Liganden-induzierte Phosphorylierungen nachgewiesen. Bei genaueren Analysen der funktionellen Relevanz zeigte sich, dass die Phosphorylierung am Serin-Rest an Position 211 mit Lokalisierung des GR im Zellkern und hoher transkriptioneller Aktivität des GR korreliert (Chen et al., 2008). Als GR-phosphorylierende Kinasen mit jeweils spezifischen potentiellen Phosphorylierungsstellen werden CDK5 (Zellzyklus-abhängige Kinase 5), p38-MAPK (p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase), GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) postuliert (Nicolaidis et al., 2010).

1.4.2 Potentielle Signalmechanismen

Bei Abwesenheit eines Liganden liegt der GR hauptsächlich im Cytosol, als Teil eines heterooligomeren Komplexes vor, der Hitzeschockprotein 90, 70, 50, Immunophilin und weitere Proteine umfasst (Pratt, 1993). Diese sorgen für die Stabilisierung des Komplexes, blockieren die DNA-Bindungsdomäne und verbergen die beiden Signalpeptide für die Kernlokalisierung. Erst die Bindung des Liganden führt zu Konformationsänderungen und leitet die Dissoziation der Hitzeschockproteine ein. Nach aktivem Transport des GR in den Zellkern kommt es zur Homodimerisierung und Bindung an sogenannte GRE's (glucocorticoid responsive elements) (Zhou und Cidlowski, 2005), wobei man in dem Fall von direkten transkriptionellen Signalmechanismen spricht (s. Abb. 1.2). Neben den soeben genannten Mechanismen kommt es alternativ auch zu indirekten transkriptionellen Signalmechanismen, die auf einer Interaktion zwischen Rezeptordimer und verschiedenen Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1 (Jonat et al., 1990), NF κ B (Scheinman et al., 1995) oder STATs (Rogatsky und Ivashkiv, 2006), beruhen. Darüber hinaus sind in den vergangenen Jahren noch weitere schnelle, nicht-transkriptionelle Wirkungen von GC bekannt geworden, die zum Teil über membranständige GR oder unspezifisch, GR-unabhängig verlaufen zu scheinen (Buttgereit et al., 2004).

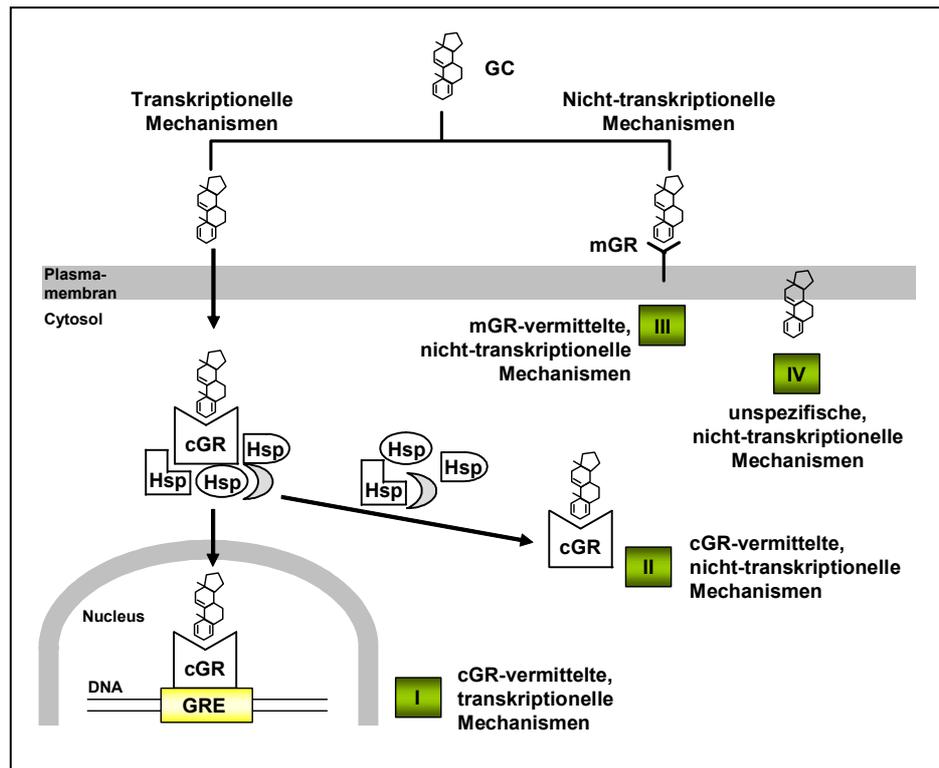


Abb.1.3 Potentielle Signalmechanismen der Glucocorticoide

GC, Glucocorticoid; GR, Glucocorticoidrezeptor; cGR, cytosolischer GR; mGR, Membran-gebundener GR; Hsp, Hitzeschockprotein; GRE, glucocorticoid responsive element (modifiziert nach (Buttgereit et al., 2004)).

Aus der Abb.1.3 ist ersichtlich, dass mittlerweile vier verschiedene potentielle Signalmechanismen für GC postuliert werden. Als lipophile Substanzen können GC leicht durch die Plasmamembran ins Cytosol diffundieren, wo sie an ubiquitär exprimierte GR (cGR) binden. Daraufhin folgen entweder, wie bereits einleitend erwähnt, klassische cGR-vermittelte, transkriptionelle Mechanismen (I) oder es kommt zur Induktion cGR-vermittelter, nicht-transkriptioneller Effekte (II). Darüber hinaus existieren weitere nicht-transkriptionelle Mechanismen, die über Interaktionen der GC mit der Plasmamembran, entweder über Membran-gebundene GR (III) oder über unspezifische Mechanismen (IV) vermittelt werden (Buttgereit et al, 2004). Die transkriptionellen Effekte gelten als die klassischen und wichtigsten, erklären jedoch nicht alle GC-induzierten Reaktionen. Hingegen liefern die nicht-transkriptionellen Effekte Erklärungen für beispielsweise sehr schnelle GC-Effekte. Die Induktion der potentiellen Signalmechanismen der GC hängt unter anderem von deren Dosierung ab und ist somit von unterschiedlicher klinischer Relevanz.

1.4.3 Einfluss von Glucocorticoiden auf Apoptosesignalwege

Der Einsatz von GC als Adjuvantien in der Chemotherapie solider Tumoren wird in den vergangenen Jahren zunehmend kritisch betrachtet, da in vielen Untersuchungen das Problem der GC-induzierten Apoptoseresistenz festgestellt wurde. Dies umfasst viele verschiedene Tumorzelllinien und konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde GC-induzierte Apoptoseresistenz gegenüber Cisplatin und Radiotherapie für Cervix- und Lungenkarzinomzellen (Herr et al., 2009) sowie gegenüber TRAIL für Schilddrüsenkarzinomzellen (Petrella et al., 2006) gezeigt. In einer breiter angelegten Studie wurden 10 primäre Lungenkarzinomzelllinien *in vitro* untersucht und in 100% der Fälle GC-induzierte Resistenz gegenüber Cisplatin und Gemcitabine detektiert (Gassler et al., 2005). Zhang et al testeten eine Vielzahl verschiedener Tumorzelllinien, zum Beispiel vom Mammakarzinom, Cervixkarzinom, Melanom oder Neuroblastom, und stellten bei einer Mehrzahl der untersuchten Zelllinien ebenfalls GC-induzierte Apoptoseresistenz gegenüber Cisplatin und 5-Fluorouracil fest (Zhang et al., 2006). Des Weiteren wurde in einem Mammakarzinom-Xenograft-Modell GC-vermittelte Resistenz gegenüber Paclitaxel-induzierter Apoptose gezeigt (Pang et al., 2006).

Diese Daten belegen, dass es sich bei dem Phänomen der GC-induzierten Apoptoseresistenz in Zellen solider Tumoren um ein breit gestreutes Problem handelt und es konnten bereits eine Vielzahl zugrunde liegender, fehlregulierter Signalwege ermittelt werden. Prinzipiell geht man derzeit davon aus, dass für die anti-apoptotischen Effekte von GC auf Zellen solider Tumoren kein Defekt des GR, zum Beispiel eine Mutation, verantwortlich ist. Hingegen sprechen einige Erkenntnisse dafür, dass es GR-abhängig über direkte und indirekte transkriptionelle Mechanismen zur Hochregulation anti-apoptotischer bzw. Herunterregulation pro-apoptotischer Signalmoleküle kommen kann. Ein Beispiel hierfür ist der Einfluss von GR auf Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF κ B. Es konnte gezeigt werden, dass es am Promoter des CD95-Liganden (Fas-L) zu einer kompetitiven Bindung entweder von NF κ B oder dem GR kommt und die GR-Bindung zu einer Herunterregulation der Expression des CD95-Liganden führt (Novac et al., 2006). Einige weitere Veröffentlichungen zeigen ebenfalls, dass es zu Interaktionen des GR mit NF κ B kommt, welche die Funktion von NF κ B inhibieren (Evans-Storms und Cidlowski, 2000; McKay und Cidlowski, 1998). Demzufolge ist es denkbar, dass die vom Zelltyp abhängige Kombination aus transkriptionellen Effekten und der

Expression weiterer Transkriptionsfaktoren mitverantwortlich dafür ist, dass GC in manchen Zelltypen zu einer positiven und in anderen zu einer negativen Regulation desselben Gens führen.

Als weiterer Grund für die GC-induzierte Apoptoseresistenz wird der positive Einfluss von GC auf die Zellkommunikation betrachtet, die etwa durch vermehrte Bildung von Tight junctions induziert wird (Woo et al., 1996). Dieser intensive Zell-Zell-Kontakt scheint allgemein eine wichtige Rolle für den Schutz vor Apoptose zu spielen (Sasson et al., 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass zum Beispiel die Anlagerung von Epithelzellen an extrazelluläre Matrix zu einer Aktivierung von Überlebenssignalen, wie zum Beispiel PI3K/Akt-Signalweg, führt (Khwaja et al., 1997). Demzufolge wird vermutet, dass es indirekt, durch GC-induzierte Verbesserung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege kommen kann. Dies kann wiederum im weiteren Verlauf zur Phosphorylierung pro-apoptotischer Moleküle führen, was beispielsweise für Akt und Caspase-9 gezeigt wurde. Das pro-apoptotische Protein Caspase-9 wird durch die Phosphorylierung inhibiert und belegt folglich die anti-apoptotische Funktion von Akt (Cardone et al., 1998).

Einen Überblick über die bis dato aufgedeckten, potentiell zugrunde liegenden Signalmechanismen der GC-induzierten Apoptoseresistenz, liefert der Artikel von Herr et al (Herr et al., 2009) und Tab.1.2 zeigt einen Ausschnitt daraus.

Name	Involvierte Faktoren
Herunterregulation pro-apoptotischer Moleküle	Apoptose-induzierende Liganden, wie CD95-L, TRAIL Adaptermoleküle, wie FADD, Bid Caspasen, wie Caspase-8, -9, -3
Hochregulation anti-apoptotischer Moleküle	cFLIP, Bcl-2 und Mitglieder aus der Familie der IAP's (inhibitor of apoptosis)
Gewebeentwicklung	Bildung von Zell-Zell-Kontakten , einschließlich Expression von E-cadherin ; gefolgt von PI3K / Akt Aktivität
PI3K / Akt	aktiviert durch den GR und Zell-Zell-Kontakte, führt zu Inaktivierung pro-apoptotischer Moleküle wie z.B. Caspasen , blockt GSK3 -Aktivität, inhibiert FOXO Transkriptionsfaktoren
Wnt / GSK3	Wnt -Signalweg aktiviert durch GC, führt zu Phosphorepression von GSK3 , verstärkt Zell-Kontakte

Tab.1.2 Potentiell involvierte Signalwege und -moleküle

Ausschnitt verschiedener Signalwege und -moleküle, die an der GC-induzierten Apoptoseresistenz potentiell beteiligt sein können (modifiziert nach (Herr et al., 2009))

1.4.4 Einfluss von Glucocorticoiden auf Proliferationssignalwege

In den vergangenen Jahren wurde viel zur GC-induzierten Apoptose in hämatopoetischen Zellen und auch zur GC-induzierten Apoptoseresistenz in Zellen solider Tumoren geforscht. Hingegen existieren bis dato nur vereinzelte Publikationen, die sich mit dem Phänomen der GC-induzierten Proliferation auseinandersetzen und diese wurden meist anhand benigner Zellen durchgeführt. Ein pro-proliferativer Effekt von GC konnte zum Beispiel für Keratozyten (Bourcier et al., 1999), Epithelzellen der Hornhaut (Bourcier et al., 2000), Epithelzellen der Linse (Petersen et al., 2008), Fibroblasten (Li et al., 1998) und auch für erythroide Vorläuferzellen (Ganguli et al., 2002) gezeigt werden. Die Effekte verliefen zum Teil in Abhängigkeit der Konzentration, das heißt in niedrigeren GC-Konzentrationen traten gehäuft die pro-proliferativen Effekte auf. Hingegen wurden in höheren GC-Konzentrationen teils sogar anti-proliferative Effekte detektiert. Generell wird dabei ein Einfluss der Expressionsrate des GR vermutet.

Im Bereich von Tumorzellen sind die Untersuchungen zu GC-induzierter Proliferation noch rarer gesät. Bereits 1980 wurde ein pro-proliferativer Effekt von GC auf Astrozytomzellen beobachtet (Freshney et al., 1980). Für Gliomazellen konnte der Effekt in Abhängigkeit der Zelllinien und des GR nachgewiesen werden (Langeveld et al., 1992; Zibera et al., 1992). Des Weiteren haben Guo und Antakly einen pro-proliferativen Effekt von GC auf Kaposi's Sarkomzellen detektiert und darüber hinaus gezeigt, dass die GC-Stimulation zusätzlich noch zu einer erhöhten Expression des GR geführt hat (Guo and Antakly, 1995). Die unerwünschten, pro-proliferativen Effekte von GC auf die Tumorentwicklung *in vivo* wurden bereits in den fünfziger Jahren erstmals postuliert. In einem Mausmodell für Adenokarzinome wurde im Zuge der GC-Behandlung ein erhöhtes Risiko zur Metastasenbildung detektiert (Agosin et al., 1952). In den folgenden Jahren wurden diese Ergebnisse in klinischen Studien mit Patienten mit Mammakarzinom (Iversen and Hjort, 1958), Lungenkarzinom (Wolf et al., 1960) und Nierenkarzinom (Rasmuson et al., 2001) bestätigt. In einer groß angelegten Untersuchung verglichen Sorensen et al die Daten von knapp 60.000 Patienten, denen GC verschrieben wurden. Dabei stellten sie, mit steigender Anzahl der Verordnungen, ein erhöhtes Risiko für Hautkrebs und Non-Hodgkin-Lymphome fest (Sorensen et al., 2004).

In unserer Arbeitsgruppe legten die Arbeiten meiner Vorgängerin, der ehemaligen Doktorandin Eva Böckler, ebenfalls nahe, dass GC in der Lage sind, als

bisher unbekannte Wirkung die Proliferation von Tumorzellen zu induzieren. Zusammenfassend dienten diese Erkenntnisse als Ausgangspunkt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Den pro-proliferativen Eigenschaften von GC entgegengesetzt, wurden auf malignen Zellen in Einzelfällen auch gegenteilige, anti-proliferative Effekte festgestellt, beispielsweise für Ovarialkarzinomzellen (Chen et al., 2006) und Fibrosarkomzellen (Braunschweiger et al., 1982). Des Weiteren konnten Münstedt et al in einer retrospektiven klinischen Studie an Patienten mit Ovarialkarzinom zeigen, dass GC keinen negativen Effekt auf die Effizienz der Tumorthherapie haben (Münstedt et al., 2004). Anhand dieser Beispiele soll die kontroverse Datenlage zum Einfluss von GC auf das Proliferationsverhalten benigner und maligner Zellen verdeutlicht werden.

Die zugrunde liegenden Signalmechanismen der pro-proliferativen Effekte sind bis dato unklar, allerdings existieren Hinweise auf Beteiligung verschiedener Signalwege und -moleküle. Beispielsweise deuten manche sehr schnelle GC-induzierte Effekte daraufhin, dass es sich dabei um die bereits im Abschnitt 1.4.2 erwähnten, nicht-transkriptionellen Mechanismen handelt. Hafezi-Moghadam und Kollegen haben sich mit diesen schnellen GC-Effekten in Endothelzellen auseinandergesetzt, um den kardiovaskulären Schutz von GC aufzudecken. Sie konnten zeigen, dass die Bindung von GC an den GR zu einer Aktivierung der PI3K und Akt geführt hat. Dies wiederum führte zu einer Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und durch NO-Freisetzung zur Vasodilatation. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unklar, aber es scheint, dass es zu einer Assoziation des GR mit der regulatorischen Untereinheit p85 α der PI3K kommt, wie es bereits für den Östrogenrezeptor gezeigt wurde (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg und Liao, 2003). Cato et al haben sich ebenfalls mit den schnellen Effekten der GC auseinandergesetzt und den Einfluss einer Vielzahl verschiedener Signalwege postuliert. Zum Beispiel reicht die Bandbreite über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), Adenylcyclase, Proteinkinase C bis zum Guaninnucleotid-bindenden Protein (Cato et al., 2002). In Rattenherzzellen bzw. isolierten Kardiomyozyten konnte eine direkte Phosphorylierung und damit Aktivierung sowohl von p38-MAPK als auch Akt durch Dex nachgewiesen werden (Kewalramani et al., 2008). Im Zusammenhang mit p38-MAPK, die im Allgemeinen als Stress-induzierte Kinase bekannt ist, werden zunehmend pro-proliferative Eigenschaften diskutiert.

Fernades et al zeigten zum Beispiel den Einfluss von p38-MAPK auf die Proliferation glatter Muskelzellen der Luftwege (Fernandes et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass B-Lymphozyten p38-MAPK benötigen für die CD40-induzierte Genexpression und Proliferation (Craxton et al., 1998).

Die funktionelle Rolle von Akt als Regulator von Überleben und Proliferation sowohl in benignen Zellen als auch bei vielen zugrunde liegenden malignen Erkrankungen scheint unumstritten zu sein (Song et al., 2005). Darüber hinaus wird p38-MAPK und deren Einfluss auf die Proliferation immer intensiver diskutiert und erforscht (Cuenda und Rousseau, 2007; Yong et al., 2009). Den vorliegenden Daten zufolge ist ein Zusammenhang zwischen GC-induzierter Proliferation und den Proteinkinasen Akt sowie p38-MAPK denkbar.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass GC sowohl anti-apoptotische als auch pro-proliferative Effekte auf Tumorzellen ausüben können. Es scheint, dass Zellen hämatopoetischen Ursprungs großteils sensitiv auf GC-induzierte Apoptose reagieren, wohingegen Zellen epithelialen Ursprungs vermehrt durch anti-apoptotische, pro-proliferative Effekte vor Apoptose geschützt werden. Bislang sind die molekularen Abläufe nicht im Einzelnen geklärt, die in dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Leben und Tod entscheiden.

1.5 Induktion von Tumorzellproliferation durch weitere Zytostatika

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert ist, das Ziel der Zytostatika-basierten Chemotherapie die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen, wobei viele Details der intrazellulären Signalwege bis heute unklar sind. Darüber hinaus konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass nicht nur die Resistenz gegenüber Zytostatika während der Tumorthherapie ein Problem darstellt, sondern manche Zytostatika unter bestimmten Bedingungen sogar das Tumorzellwachstum fördern.

Anhand des physiologischen Liganden TRAIL (Tumor Necrosis Factor (TNF) Related Apoptosis Inducing Ligand), einem Mitglied der TNF-Familie, konnte dieses Phänomen in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. TRAIL, das in vielen Tumorzellen Apoptose induziert, war in nur 50% der untersuchten primären Leukämiezellen von Kindern in der Lage, Apoptose zu induzieren. Dagegen wurde in den gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose resistenten Tumorzellen das Gegenteil beobachtet, nämlich NF κ B-abhängige TRAIL-induzierte Proliferation (Ehrhardt et al., 2003). In einer weiteren Studie konnte bestätigt werden, dass TRAIL-induzierte

Proliferation ein häufiges Phänomen in Tumorzellen ist. Die Daten lassen vermuten, dass es sich in den Zellen um Defekte auf Ebene des DISC (Death Inducing Signaling Complex), also der Apoptoseinduktion handelt (Baader et al., 2005). Durch Hochregulation von Caspase-8 konnten die resistenten Zellen wieder gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose resensitiviert und dadurch die TRAIL-induzierte Proliferation verhindert werden (Ehrhardt et al., 2008).

In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde daraufhin untersucht, ob diese paradoxe Funktion auf Tumorzellen ein einzigartiges Charakteristikum von TRAIL darstellt oder auch bei anderen Apoptose-induzierenden Substanzen zu finden ist. Dabei stellte sich unerwarteter Weise heraus, dass auch Zytostatika, die seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt werden, in bestimmten Tumorzellen Proliferation auslösen können. Dieses Phänomen beschränkt sich nicht auf einzelne Wirkstoffklassen, sondern umfasst viele verschiedene Gruppen und findet sich ebenso auf Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs wieder. Beispielsweise war das Zytostatikum Epirubicin, das zu der Gruppe der Alkylantien gehört, in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in der Lage, in hohen Konzentrationen Apoptose, allerdings in niedrigen Konzentrationen das Gegenteil, nämlich Proliferation zu induzieren. Durch diese Erkenntnisse könnte das paradoxe Phänomen der Zytostatika-induzierten Proliferation ein klinisch relevantes, neues Problem darstellen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Glucocorticoide (GC) werden in der Tumorthherapie vielfältig eingesetzt, zum einen als Zytostatika zur Behandlung hämatopoetischer Tumoren und zum anderen als Adjuvantien zur Reduktion von Nebenwirkungen in der Behandlung solider Tumoren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe legten nahe, dass GC in der Lage sind, als bisher unbekannte Wirkung die Proliferation von Tumorzellen zu induzieren. Diese Daten dienten als Ausgangspunkt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Das Ziel dieser Dissertation war die systematische Quantifizierung des GC-induzierten Wachstums von Tumorzellen. Zunächst sollte die Häufigkeit der proliferativen Effekte von GC auf Zelllinien solider Tumoren ermittelt werden. Hierzu sollte ein Spektrum verschiedener Methoden zur Ermittlung der Proliferationsrate eingesetzt werden. Um ein auf Zelllinien beschränktes Artefakt ausschließen zu können, sollten primäre Tumorzellen von Patienten untersucht werden, wofür primäre leukämische Zellen herangezogen wurden. Über *in vitro* Untersuchungen hinausgehend, sollte GC-induziertes Wachstum von Tumorzellen in einem Tiermodell gezeigt werden. In ersten Studien zu Signalmechanismen sollte die Rolle des Glucocorticoidrezeptors für die GC-induzierte Proliferation in Zellen solider Tumoren aufgezeigt werden. Des Weiteren sollte die potentielle Aktivierung proliferativer intrazellulärer Signalwege wie Akt und p38-MAPK und deren Bedeutung für GC-induziertes Wachstum von Tumorzellen ermittelt werden. Zuletzt sollte untersucht werden, wie GC-induzierte Proliferation durch gezielte molekulare Modulation von intrazellulären Signalwegen, aber auch durch klinisch einsetzbare Substanzen inhibiert werden kann.

Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag dazu leisten, die Applikation von GC während der Tumorthherapie mittelfristig effektiver und sicherer zu machen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Acrylamidlösung, 30%	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Aminosäurelösung, nicht-essentielle	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin trihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Tryptone	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Yeast-Extract (Hefeextrakt)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	BioRad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM, Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch, 70% (v/v)	Klinikum Großhadern, München
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Lysepuffer	BD Bioscience, Heidelberg
Ficoll-Histopaque-1077	GE Healthcare, München
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gel-Transfer-Puffer	Klinikum Großhadern, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
ITS (Insulin-Transferin-Selen)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt
2-Propanol, technisch, mind. 98%	Klinikum Großhadern, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe

Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin / Streptomycinlösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
Polybren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Protein Standards	BioRad, München
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe
Proteinase Inhibitor-Cocktail Set I	Merck, Darmstadt
Restore Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Karlsruhe
RPMI, Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Super Signal West Femto (ECL)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
TransIT-293	Mirus, Madison, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20, Sigma-Aldrich Ultra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 und 2 ml-Reaktionsgefäße	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Amicon Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Combitips (1, 2.5, 5, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Gel-Blotting-Papier (Whatman)	GE Healthcare, München
Immobilon-P Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten (24, 12, 6 Vertiefungen)	BD Bioscience, Heidelberg
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, teilweise mit Filter	VWR, Darmstadt
Polypropylen-Röhrchen, Rundboden	BD Bioscience, Heidelberg
QIAShredder	Qiagen, Hilden
Skalpelle	Brand, Wertheim
Steriflip (Filter, 0,45 µM)	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter, Rotilabo (0,22 µM)	Carl Roth, Karlsruhe
TruCOUNT Tubes	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturflaschen Cellstar (25, 75 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 und 50 ml	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.3 Laborgeräte

Absaugsystem	Schütt-Biotech, Göttingen
Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Analysenwaage, Sartorius 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Blockthermostat BT 1302	HLC Biotech, Bovenden
Brutschrank B6060	Heraeus, Hanau
CCD Video Kamera System, Modell PP TP 115 SD (UV-Lampe)	LTF Labortechnik, Wasserburg
Cellscreen + Inversmikroskop Olympus IX50	Roche Innovatis AG, Bielefeld; Olympus, Hamburg

CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus, Hanau; Nunc, Wiesbaden; Binder, Tuttlingen
DNA/RNA-Cleaner UVC/T-M-AR	Kisker, Steinfurt
Durchflusszytometer (FACScan)	BD Bioscience, Heidelberg
Elisa-Reader EL800	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Entwicklungsmaschine CP-1000	Agfa, Düsseldorf
Epson Perfection V700 Photo	Epson, Meerbusch
Expositionskassette DuPont Cronex	DuPont, Bad Homburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M + Camera controller	Carl Zeiss, Jena Hamamatsu Photonic, Bridgewater
Gelelektrophorese-Apparatur	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Gelelektrophorese-Apparatur Mini-Protean II	BioRad, München
Inversmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Inversmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Minizentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, USA
Multipette Plus, digital	Eppendorf, Hamburg
ph-Meter HI221	HANNA instruments, Kehl
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Präzisionswaage 440-43N	Kern&Sohn, Balingen
Reinstwasseranlage Purelab Plus	ELGA LabWater, Siershahn
Rollermixer SRT9	Stuart, Asbach
Schüttelinkubator Innova 4400	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Spannungsgerät Power Pac 200, 300	BioRad, München
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbänke Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermoschüttler TS-100	Kisker, Steinfurt
Thermocycler Advanced Primus 25	Peqlab, Erlangen
Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417C und 5417R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschallgerät Branson Digital 250-D	Branson, Fürth
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA

Vortex Mixer, GV Lab	Gilson, Limburg-Offheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wippschüttler	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 3K30	Sigma-Aldrich, Osterode
Zentrifuge Rotanta 46R	Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Kommerzielle Reagenziensätze

Cell Proliferation ELISA BrdU	Roche, Mannheim
Cell Proliferation Reagent Wst-1	Roche, Mannheim
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond PC500, Plasmid Maxi	Macherey-Nagel, Düren
Presto Spin D, Plasmid Midi 100L	Molzym, Bremen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ultra Prep, Plasmid Mini	Molzym, Bremen

2.1.5 Pufferlösungen

Name	Zusammensetzung
10 x PBS	NaCl [1,37 M]; KCl [27 mM]; Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O [81 mM]; KH ₂ PO ₄ [18 mM] (pH 7,4)
10 x TBS	Tris [100 mM]; NaCl [1,37 M] (pH 7,6)
1 x TBST-Puffer	1 x TBS [10 x TBS 1:10 mit H ₂ O dd verdünnt]; Tween-20 [0,1 %]
1 x SDS-Lysepuffer	Tris [62,5 mM] (pH 6,8), SDS [2%], Glycerin [10%], Bromphenolblau [0,01%]
Trenngelpuffer	Tris [3 M] (pH 8,9)
Sammelgelpuffer	Tris [0,5 M] (pH 6,7)
5 x SDS-Laufpuffer	Tris [125 mM]; Glycin [1,3 M]; SDS [0,5%]
50 x TAE-Puffer	Tris [2 M]; Eisessig [1 M]; EDTA [50 mM] (pH 8,3)
LB-Medium	NaCl [0,17 M]; Hefeextrakt [0,5 %]; Trypton [1 %]; Pepton [1 %]
LB-Agar	LB-Medium; Agar [2 %]
SOB-Medium	NaCl [10 mM]; KCl [2,5 mM]; Hefeextrakt [0,5 %]; Trypton [2 %]; pH 7; Autoklavierung; anschließend hinzu MgCl ₂ [10 mM]; MgSO ₄ [10 mM]
SOC-Medium	SOB-Medium; Glucose [1 M] (steril filtriert)

Tab.2.1 Eingesetzte Pufferlösungen

2.1.6 Stimulantien und Inhibitoren

Name	Hersteller
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Prednisolon	Sigma-Aldrich
Paclitaxel	Calbiochem / Merck
Epirubicin	Hexal AG
Vincristin	Sigma-Aldrich
Akt-Inhibitor VIII	Calbiochem / Merck
p38-MAPK-Inhibitor	Calbiochem / Merck
SB202190	Calbiochem / Merck
SB203580	Calbiochem / Merck
Shield-1	Cheminpharma LLC

Tab.2.2 Eingesetzte Stimulantien und Inhibitoren

2.1.7 Antikörper für Immundetektion

Primärantikörper wurden in TBST / 5% BSA / 0,1% Natriumazid verdünnt.

Sekundärantikörper wurden in TBST / 5% Milchpulver verdünnt.

Name, Kat.-Nr.	Herkunft/Typ	Verdünnung	Hersteller
anti-phospho-Akt, 9271	K, p	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-Akt, 9272	K, p	1:2000 - 1:5000	Cell Signaling Technology
anti-phospho-GSK-3 α/β , 9331	K, p	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-GSK-3 β , 9332	K, p	1:2000 - 1:5000	Cell Signaling Technology
anti-phospho-p38-MAPK, 9211	K, p	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-p38-MAPK, 9212	K, p	1:2000 - 1:5000	Cell Signaling Technology
anti-phospho-Hsp27, 2401	K, p	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-Hsp27, 2402	M, m	1:2000 - 1:5000	Cell Signaling Technology
anti-phospho-GR, 4161	K, p	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-GR, 611226	M, m	1:2000 - 1:5000	BD Transduction Laboratories
anti-GAPDH, MA1-22670	M, m	1:5000 - 1:10.000	Thermo Fisher Scientific
anti-DD, 631073	M, m	1:1000 - 1:2000	Clontech Laboratories
anti-Caspase-3, 9668	M, m	1:1000 - 1:2000	Cell Signaling Technology
anti-Kaninchen-HRP, 31460, 7074		1:2000 - 1:10.000	Thermo Fisher Scientific, Cell Signaling Technology
anti-Maus-HRP, 31430, 7076		1:2000 - 1:10.000	Thermo Fisher Scientific, Cell Signaling Technology

Tab.2.3 Eingesetzte Antikörper für Immundetektion

Kat.-Nr., Katalognummer; K, Kaninchen; M, Maus; p, polyklonal; m, monoklonal

2.1.8 Enzyme

Name	Verwendung	Quelle
Multiscribe Reverse Transcriptase	Reverse Transkription von RNA	Applied Biosystems
Platinum Pfx-Polymerase	PCR	Invitrogen
FastStart Taq Polymerase	qRT-PCR	Roche
GoTaq	Colony-PCR	Promega
EcoRI	Restriktionsverdau	Fermentas
NotI	Restriktionsverdau	Fermentas
XbaI	Restriktionsverdau	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Ligation	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Dephosphorylierung	Fermentas

Tab.2.4 Eingesetzte Enzyme

2.1.9 Primer und Hybridisierungssonden

Name	Sequenz [5' → 3']	Verwendung
DD_For	GCGT CTAGAG CCACCATGGGAGTGC	PCR
DD_Rev	CGC GAATTC TTCCGGTTTTAGAAGCTCC	PCR
Casp3_For	CCG GAATTC ATGGAGAACACTGAAA ACTCAG	PCR
Casp3_Rev	ATAAGAAT GCGGCCGCG TGATAAAAATAGAGT TCTTTTGTG	PCR
4245_DD_For	GCATCGCAGCTTGGATACACG	Sequenzierung
pCDH_For	CTTGGAGCCTACCTAGACTCAG	Sequenzierung
Casp3_Mid	GGAGGCCGACTTCTTGTATGC	Sequenzierung
hGR_For	GGGTGGAGATCATATAGACAATCAA	qRT-PCR
hGR_Rev	ACATGCAGGGTAGAGTCATTCTC	qRT-PCR
hHPRT1_For	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	qRT-PCR
hHPRT1_Rev	CGAGCAAGACGTT CAGTCCT	qRT-PCR
hGR	Referenzsequenz PubMed: NM_001018077.1 Hybridisierungssonde Nr.62 *	qRT-PCR
hHPRT1	Referenzsequenz PubMed: NM_000194.2 Hybridisierungssonde Nr.73	qRT-PCR

Tab.2.5 Eingesetzte Primer und Hybridisierungssonden

For, forward; Rev, reverse; Mid, middle; Schnittstellen für Restriktionsenzyme fett markiert.

* Sonde Nr.62 detektiert beide Transkriptvarianten GR α und β

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

2.2.1.1 Zellkultur adhärenter Zellen

Alle verwendeten Zelllinien sind immortalisierte, adhären wachsende humane Tumorzellen und wurden entweder von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Alle Tumorzelllinien wurden in RPMI 1640 oder DMEM mit hohem Glucosegehalt, versetzt mit fötalem Kälberserum (FKS, 10%) und Glutamin (2 mM), ohne Antibiotika, bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. LNCaP Zellen wurden zusätzlich mit Natriumpyruvat (1 mM) und Nicht-essentiellen Aminosäuren (1%) supplementiert. Die Arbeiten mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter der gentechnischen Sicherheitsstufe S1 bzw. während der Arbeit mit Lentiviren unter S2 durchgeführt.

Name	Tumorentität	Ursprung
A498	Nierenkarzinom	epithelial
A549	Lungenkarzinom	epithelial
CADO	Ewing-Sarkom	mesenchymal
CALU-6	Lungenkarzinom	epithelial
KELLY	Neuroblastom	neuroectodermal
LNCaP	Prostatakarzinom	epithelial
MCF-7	Mammakarzinom	epithelial
MDA-MB-231	Mammakarzinom	epithelial
RH-30	Rhabdomyosarkom	mesenchymal
SHEP	Neuroblastom	neuroectodermal
HEK293T	embryonale Nierenzellen, für lentivirale Transfektion eingesetzt	

Tab.2.6 Eingesetzte Zelllinien

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort in vorgewärmtes Medium mit Penicillin/Streptomycin (1%) in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Antibiotika-enthaltende Medium entfernt und frisches Medium, ohne Antibiotika, für die weitere Kultivierung zugegeben. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst und je nach Dichte und Art der Zellen 1:3 – 1:10 geteilt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer

Neubauer-Zählkammer in vier Großquadraten gezählt und nach der Formel $c \text{ [Zellen/ml]} = (\text{Anzahl gezählte Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4)$ die Zellzahl ermittelt. Zum Einfrieren wurden die Zellen ebenso abgelöst, nach Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm in FKS aufgenommen und in ein Gefrierrohrchen überführt. Nach Zugabe von Dimethylsulfoxid (10%) wurden die Zellen sofort bei -80°C eingefroren und zur dauerhaften Lagerung nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.2 Zellkultur primärer Leukämiezellen

Primäre Leukämiezellen wurden dank einer Kooperation mit mehreren Kinderkliniken in München gewonnen, mit dem Einverständnis der Eltern gemäß der Erklärung von Helsinki des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen. Nach Erstdiagnose Leukämie oder bei einem Rückfall, wurde den Kindern, vor Beginn der Chemotherapie, peripheres Blut oder Knochenmark abgenommen und direkt in unser Labor überführt. Die immunologische Leukämiediagnostik wurde anhand der Expressionsmenge spezifischer Zell-Antigene in den jeweiligen Kinderkliniken durchgeführt. Als Ausschlusskriterium wurde eine mindeste Blastenzahl von 80% festgelegt. Aus diesen Proben wurden die Leukoblasten mittels Ficoll-Histopaque-1077 isoliert, aufgereinigt und in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Die Konzentration betrug 10^5 Zellen / 100 μl RPMI 1640, welches mit FKS (20%), Glutamin (2 mM), Nariumpyruvat (1 mM), Insulin (6 mg/L), Transferin (3 mg/L), Selen (4 $\mu\text{g/L}$), α -Thioglycerol (50 μM), Penicillin-Streptomycin (1 %) und Gentamycin (1 %) versetzt wurde. Direkt nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit verschiedenen Zytostatika stimuliert, unter anderem Dexamethason (10^{-5} M) und Prednisolon (10^{-4} M), und zwischen 24 - 96 h in Kultur gehalten. Die Apoptoserate der Zellen wurde zu Beginn der Kultivierung (Startapoptose) und daraufhin alle 24 h anhand unstimulierter Kontrollzellen im Durchflusszytometer ermittelt (s. 2.2.1.3). Bei einer spezifischen Apoptoserate von mindestens 25%, wurde die Apoptoserate aller Proben durchflusszytometrisch ermittelt. Die spezifische Apoptoserate der Kontrolle wurde mit Hilfe der Formel $[(\text{Apoptoserate der Kontrollzellen nach } x \text{ h} - \text{Startapoptose der Kontrolle}) / (100 - \text{Startapoptose der Kontrolle})] \times 100$ bestimmt.

2.2.1.3 Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen einer Zelle, die durch einen Laserstrahl angeregt wird. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) korreliert mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter) mit der internen Struktur der Zelle, das heißt der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns. Apoptotische Zellen sind klein und stark granuliert; tote Leukämiezellen können dadurch mit Hilfe der FSC/SSC-Methode von den lebenden Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Apoptoserate von Suspensionszellen wurden diese in Reaktionsgefäße überführt (100 µl), mit 100 – 200 µl PBS verdünnt und mittels der FSC/SSC-Methode im Durchflusszytometer (FACScan, BD Bioscience) gemessen. Zur Bestimmung der Apoptoserate adhärenter Zellen wurde die Nicoletti-Methode herangezogen (Nicoletti et al., 1991). Dabei wird die fragmentierte DNA apoptotischer Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und anschließend nach ihrer Größe im Durchflusszytometer aufgetrennt. Apoptotische Zellen besitzen hypodiploide DNA, die leicht von dem schmalen DNA-Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen mit diploidem und tetraploidem DNA-Gehalt unterschieden werden kann. Hierzu wurde zuerst der Zellüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt, der Zelldebris für 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Währenddessen wurden die adhärenenten Zellen durch Zugabe von 400 µl hypotonem Nicolettipuffer (1xPBS, Natriumcitrat (0,1 %), Triton X-100 (0,1%)) für 20 min bei 4°C lysiert und durch Überführung in das entsprechende Reaktionsgefäß mit dem Zelldebris vereinigt. Nach Zugabe von 20 µl Propidiumiodidlösung (1 mg/ml) wurde die Zellsuspension gemischt und die Apoptoserate im Durchflusszytometer im Kanal FL-2 gemessen, wo die DNA apoptotischer Zellen als subdiploider DNA-Peak (sub G1-Peak) erschien.

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest Pro Software (BD Bioscience) analysiert. Die spezifische Apoptoserate der Proben wurde mit Hilfe der Formel $(((\text{Apoptoserate der stimulierten Zellen} - \text{Apoptoserate der unstimulierten Zellen}) / (100 - \text{Apoptoserate der unstimulierten Zellen})) * 100]$ bestimmt. Die spezifische Überlebensrate errechnete sich aus der Formel $(\text{Spezifische Apoptoserate}) * (-1)$.

2.2.1.4 Bestimmung des Tumorzellwachstums mittels repetitiver Mikroskopie

Das Cellscreen System (Roche Innovatis AG) ist ein Gerät zur nicht-invasiven, automatisierten Bestimmung der Zellzahl und des Wachstumsverhaltens von Zellen. Das System besteht aus einem inversen Autofokus-Phasenkontrast-Lichtmikroskop, das an eine Digitalkamera angeschlossen ist und einem beweglichen Motorkreuztisch, mit dessen Hilfe Mikrotiterplatten präzise angesteuert werden können. Dadurch ermöglicht das Gerät die Aufnahme exakt derselben Zellen bei repetitiven Messungen. Die aufgenommenen Bilder werden im Anschluss automatisiert in eine Datenbank eingespeist und von einer spezifischen Software analysiert. Bei adhären wachsenden Zellen wird somit der Bedeckungsgrad jeder Vertiefung einer Mikrotiterplatte in Prozent über einen beliebigen Zeitraum dokumentiert.

Die adhären Zellen wurden je nach Größe zwischen $5 - 8 \times 10^3$ Zellen / Vertiefung in $100 \mu\text{l}$ 10% FKS-haltigem Medium in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Die Vertiefungen am Rand wurden mit $200 \mu\text{l}$ PBS gefüllt, da diese aufgrund möglicher Evaporationseffekte ausgeschlossen wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt zu je $200 \mu\text{l}$ 0% FKS-haltigem Medium, um die Spontanproliferation der Zellen zu reduzieren und die Zellen zu synchronisieren. Außer bei RH-30 Zellen, bei denen die Experimente in 10% FKS-haltigem Medium durchgeführt wurden. Nach Stimulation der Zellen wurde die erste Cellscreen-Messung (Zeitpunkt 0 h) durchgeführt, die daraufhin alle 24 h wiederholt wurde. Im Allgemeinen wurden die Experimente über 48 h dokumentiert, in einzelnen Fällen auch bis zu 96 h. Pro Vertiefung wurden 4 Bilder mit dem 4x-Objektiv im Modul für adhären Zellen (AC, adherent cell) aufgenommen, wodurch die gesamte Innenfläche jeder Vertiefung abgedeckt wurde. Darüber hinaus wurden alle Ansätze in einer Vierfachbestimmung durchgeführt, um einzelne, nicht auswertbare Bilder bei Bedarf ausschließen zu können. Versuche waren nur dann auswertbar, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Bedeckungsgrad pro Vertiefung zwischen 15 – 40%
- keine Luftblasen oder sonstige Verunreinigungen
- keine Spontanapoptose der Zellen
- keine unscharfen Bilder

Alle Versuche, die diesen Kriterien nicht entsprachen, wurden ausgeschlossen. Die Messwerte der adhären Zellen wurden in Excel importiert, die Vierfachwerte

gemittelt und die Anfangsbedeckung aller Vertiefungen zur Anfangsbedeckung der Kontrollzellen normiert. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde für die Zelllinien CADO, CALU-6, MCF-7, MDA-MB-231, RH-30 und SHEP ein Umrechnungsfaktor ermittelt, indem eine definierte Anzahl Zellen pro Vertiefung ausgesät wurde und direkt nach Adhärenz der Zellen die Bedeckung in Prozent bestimmt wurde. Dadurch konnte im Anschluss die prozentuale Bedeckung mit Zellen pro Vertiefung in Zelldichte mit der Einheit Zellen pro cm^2 ermittelt werden. Die spezifische Differenz wurde mit Hilfe der Formel $[(\text{Zelldichte stimulierter Zellen am Ende} - \text{Zelldichte stimulierter Zellen am Anfang}) / (\text{Zelldichte der Kontrollzellen am Ende} - \text{Zelldichte der Kontrollzellen am Anfang})] * 100$ ermittelt.

Die Bilder der Suspensionszellen in Abb.3.2.2 wurden mit dem 10x-Objektiv im Modul für Suspensionszellen (CL, cloning) aufgenommen. Es wurden hierzu 10^5 Zellen / Vertiefung in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und die Bilder 24 h nach Stimulation aufgenommen.

2.2.1.5 Bestimmung des Tumorzellwachstums mittels Impedanzanalyse

Das xCELLigence System (Roche) ist ebenso wie das Cellscreen ein Gerät zur nicht-invasiven, automatisierten Bestimmung der Zellzahl und des Wachstumsverhaltens der Zellen, wobei die Methode auf Messung der elektrischen Impedanz beruht. Hierfür werden spezielle, mit Golddioden beschichtete Mikrotiterplatten (E-Platten) eingesetzt, die in jeder Vertiefung einen Sensor mit zwei Mikroelektroden besitzen. Die E-Platte wird über den gesamten Zeitraum in einer Messstation im Inkubator gehalten, die jede Veränderung des Zellwachstums über Veränderungen der elektrischen Impedanz misst und in Echtzeit darstellt.

Die Zellen wurden unter denselben Konditionen wie für die Cellscreen Analysen (s. 2.2.1.4) ausgesät, wobei eine E-Platte statt einer gewöhnlichen Mikrotiterplatte verwendet wurde. Nach Stimulation der Zellen wurde die E-Platte in die Messstation in den Inkubator gestellt und über 48 h die elektrische Impedanz gemessen. Mit Hilfe der RTCA Software 1.1 (Roche) wurde der Zellindex ermittelt, der ein dimensionsloser Parameter ist, der die Veränderungen in gemessener elektrischer Impedanz widerspiegelt. Die Messwerte wurden in Excel importiert, die Vierfachwerte gemittelt und der Anfangszellindex aller Vertiefungen zum Anfangszellindex der Kontrollzellen normiert.

2.2.1.6 Bestimmung der DNA-Syntheserate mittels BrdU-Inkorporation

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate der Zellen wurde das Cell Proliferation ELISA BrdU Kit (Roche) herangezogen. Dabei wird 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und von einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper erkannt. Die anschließende Substratreaktion ermöglicht die Messung der Absorption des entstehenden farbigen Reaktionsproduktes im Spektrophotometer. Die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit der DNA-Syntheserate der Zellen.

Die Zellen wurden unter denselben Konditionen wie für die Cellscreen Analysen (s. 2.2.1.4) ausgesät und stimuliert. Der einzige Unterschied war die Reduktion des Stimulationsvolumens auf 90 µl, anstelle der üblichen 200 µl. 24 h nach erfolgter Stimulation wurde zu den Zellen 10 µl einer vorverdünnten BrdU-Lösung (Endkonzentration 10 µM) für 4 h zugegeben. Im weiteren Verlauf wurde exakt nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Messung der Absorptionswerte erfolgte im Spektrophotometer (Elisa-Reader EL800, Bio-Tek Instruments), woraufhin die Daten in Excel importiert und ausgewertet wurden.

2.2.1.7 Bestimmung der Metabolisierungsrate mittels Wst-1-Umsatz

Zur Bestimmung der Metabolisierungsrate der Zellen wurde das Cell Proliferation Reagent Wst-1 Kit (Roche) herangezogen. Dabei wird das Tetrazoliumsalz Wst-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat) durch metabolisch aktive Zellen zu Formazan gespalten. Das farbige Reaktionsprodukt kann anschließend im Spektrophotometer gemessen werden.

Die Zellen wurden unter denselben Konditionen wie für die Cellscreen Analysen (s. 2.2.1.4) ausgesät und stimuliert. Der einzige Unterschied war die Reduktion des Stimulationsvolumens auf 90 µl, anstelle der üblichen 200 µl, um im weiteren Verlauf exakt nach Angaben des Herstellers vorgehen zu können. 24 h nach erfolgter Stimulation wurde zu den Zellen 10 µl Wst-1-Reagenz für 1 - 2 h zugegeben. Die Messung der Absorptionswerte erfolgte im Spektrophotometer (Elisa-Reader EL800, Bio-Tek Instruments), woraufhin die Daten in Excel importiert und ausgewertet wurden. Aufgrund der hohen Intra-Assay-Varianzen dieser Methode wurden jeweils Achtfachbestimmungen durchgeführt und diese anschließend gemittelt.

2.2.1.8 Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wurden TruCOUNT Tubes (BD Biosciences) herangezogen. Dabei handelt es sich um FACS-Röhrchen, die eine kalibrierte Anzahl an fluoreszierenden Mikropartikeln enthalten. Diese Partikel können aufgrund ihrer geringen Größe und starken Fluoreszenz von Zellen unterschieden werden und dienen als Referenzwert zur relativen Quantifizierung der Zellen in der Zellsuspension.

Die Zellen wurden unter denselben Konditionen wie für die Cellscreen Analysen (s. 2.2.1.4) ausgesät und stimuliert. 24 h nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. 50 µl dieser sehr gut durchmischten Zellsuspension wurden in das FACS-Röhrchen überführt, vorsichtig gemischt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 450 µl FACS Lysepuffer (1x) zugegeben und erneut nach Mischen 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben im Durchflusszytometer nach Angaben des Herstellers gemessen und die absolute Zellzahl mit Hilfe der Formel [(Anzahl gemessene zelluläre Ereignisse / Anzahl gemessene Beads) * (Kalibrierte Anzahl Beads pro Lot / Testvolumen)] ermittelt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde zur Darstellung im Diagramm die Zellzahl pro µl ermittelt.

2.2.2 Tierversuch mittels Maus-Xenograft-Modell

In Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg wurde ein Tierversuch in einem Maus-Xenograft-Modell mit der Lungenkarzinomzelllinie CALU-6 durchgeführt. Dieser wurde von der Ethikkommission des Bundeslandes Baden-Württemberg geprüft und genehmigt und wurde in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien des Helmholtz Zentrums München getan. Der Tierversuch wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg von PD Dr. Eberhard Amtmann und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen mittels Kalipermessung dokumentiert.

Es wurden 8-10 Wochen alte Swiss-Nacktmäuse (nu/nu, Charles River) eingesetzt. 5×10^6 CALU-6 Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 200 μ l PBS resuspendiert und anschließend subkutan in die rechte Flanke injiziert. Dexamethason (Dex) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst und mit 0,1 % BSA-Lösung weiter verdünnt zu einer Endkonzentration von 5 μ g/ml. Vincristin (VCR) wurde in einer Konzentration von 0,03 mg/ml in PBS gelöst. Insgesamt wurden 33 Tiere eingesetzt, wobei diese in 3 Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt wurden und einer Kontrollgruppe (Placebo) aus 9 Tieren. Das genaue Behandlungsschema findet sich in Tabelle 2.7 wieder.

Name	Behandlung
Placebo	subkutane Injektion am Tag 0-4, 7-11 und 14-18 mit Placebo
Dex	subkutane Injektion von 200 μ l Dex-Lösung / 20 g Körpergewicht am Tag 0-4, 7-11 und 14-18 (entsprechend 50 μ g Dex / kg / Tag)
VCR	intraperitoneale Injektion von 200 μ l VCR-Lösung / 20 g Körpergewicht an Tag 3, 10 und 17 (entsprechend 0,3 mg VCR / kg / Tag)
VCR+Dex	subkutane Injektion von 200 μ l Dex-Lösung / 20 g Körpergewicht am Tag 0-4, 7-11 und 14-18 (entsprechend 50 μ g Dex / kg / Tag) intraperitoneale Injektion von 200 μ l VCR-Lösung / 20 g Körpergewicht an Tag 3, 10 und 17 (entsprechend 0,3 mg VCR / kg / Tag)

Tab.2.7 Behandlungsschemen der 4 verschiedenen Gruppen des *in vivo*-Experimentes

2.2.3 Molekularbiologie

2.2.3.1 Quantitative Bestimmung von RNA und DNA

Die quantitative Bestimmung der RNA bzw. DNA erfolgte über die spektrometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) am NanoDrop (PepLab). Um Kontaminationen der Proben durch beispielsweise Proteine oder Chemikalien wie Phenol zu kontrollieren, wurde als Referenz die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen (OD_{280}). Das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} ist ein Kriterium für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein Quotient, der deutlich unter 1,8 bei DNA bzw. 2,0 bei RNA liegt, gibt Kontaminationen der Proben an.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Identifizierung und Trennung von DNA-Molekülen, die in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt und durch einen Größenstandard überprüft werden. Der zugefügte, mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid erlaubte eine Visualisierung und photographische Dokumentation der Produkte bei 254 nm in einem UV-Transilluminator.

Die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente bzw. die PCR-Produkte wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend das zu isolierende Produkt mit einem Skalpell in einem UV-Transilluminator ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers. Aufgrund der anschließenden direkten Verwendung der DNA für die Ligation wurde diese in H_2O von den Säulen eluiert und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

2.2.3.3 Spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Die PCR ist ein molekulargenetisches Verfahren, das die exponentielle Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts ermöglicht. Die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen geschieht mit Hilfe zweier genspezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien. Durch die Methode ist es

möglich, kleinste Mengen DNA nachzuweisen oder die Amplikons für weitere gentechnische Zwecke einzusetzen. Das Einfügen von Restriktionsschnittstellen an den Enden des amplifizierten DNA-Fragmentes ermöglicht die Klonierung in Plasmide.

Für die Klonierung des Fusionsproteins des Proteo-Tuning Systems (s. 2.2.3.15), das aus der destabilisierenden Domäne (DD) und Caspase-3 (Casp3) besteht, wurden spezifische Restriktionsschnittstellen sowohl in die DD als auch die Casp3 eingefügt. Für beide PCR-Ansätze wurde das Pipettierschema und „Three-step cycling“-Protokoll der Platinum Pfx-Polymerase (Invitrogen GmbH) angewendet. Es wurden jeweils 100 ng DNA als Template eingesetzt und 2,5 U Pfx-Polymerase, alle anderen Komponenten entsprachen exakt den Angaben des Herstellers. Zur Amplifikation der DD-DNA diente der Vektor 4245 (s. Abb.2.1), der freundlicherweise von Prof. Dr. Hammerschmidt zur Verfügung gestellt wurde. In den N-terminalen Primer DD_For wurde eine XbaI-Schnittstelle und in den C-terminalen Primer DD_Rev eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt (s. Tab.2.5). Zur Amplifikation der Casp3-DNA diente der Vektor pCMV-SPORT-Caspase-3, der über die Firma OpenBiosystems erworben wurde. In den N-terminalen Primer Casp3_For wurde eine EcoRI-Schnittstelle und in den C-terminalen Primer Casp3_Rev eine NotI-Schnittstelle eingefügt sowie das Stop-Codon entfernt (s. Tab.2.5).

PCR-Programm:	1. initiale Denaturierung	94°C	2 min	} 35 Zyklen
	2. Denaturierung	94°C	15 sec	
	3. Annealing	<i>variabel</i>	30 sec	
	4. Elongation	68°C	1 min	
	5. terminale Elongation	68°C	5 min	
	6. Kühlung	4°C		
Annealing:	DD	56°C		
	Caspase-3	50°C		

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.3.2) überprüft, woraufhin die PCR-Produkte entweder direkt für weitere Experimente eingesetzt oder bei -20°C gelagert wurden.

2.2.3.4 Spaltung der DNA mittels Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen, die aus mindestens vier Basen bestehen und eine palindromische Struktur besitzen. Der einzusetzende Reaktionspuffer wurde je nach eingesetztem Enzym, bzw. bei einer Mehrfachrestriktion je nach Kombination mehrerer Enzyme, entsprechend kommerziell erhältlichen Tabellen ermittelt. Dabei wurden die benötigte Enzymmenge und die Inkubationszeit durch die Konzentration des Enzyms und seiner Aktivität bestimmt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Schnittstellen wurde bei der anschließenden Ligation des Inserts mit der Vektor-DNA eine Inversion des DNA-Fragments verhindert. Um eine Religation der Vektoren abzuwenden, wurden die geschnittenen Enden zusätzlich mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) desphosphoryliert. Wenn möglich, wurden alle Enzyme am Ende durch Erhitzen inaktiviert.

Für den Restriktionsverdau wurde das mittels PCR (s. 2.2.3.3) gewonnene Produkt DD und der Vektor pCDH (s. Abb.2.1) mit XbaI und EcoRI inkubiert. Der Puffer wurde in zweifacher Konzentration eingesetzt, um die Star-Aktivität von EcoRI zu inhibieren. Des Weiteren wurde das mittels PCR gewonnene Produkt Casp3 und der Vektor pCDH-DD mit EcoRI und NotI inkubiert. Die genauen Mengenangaben finden sich in den folgenden Pippettierschemen. Sowohl die Inserts als auch die Vektoren wurden im Anschluss über Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt (s. 2.2.3.2).

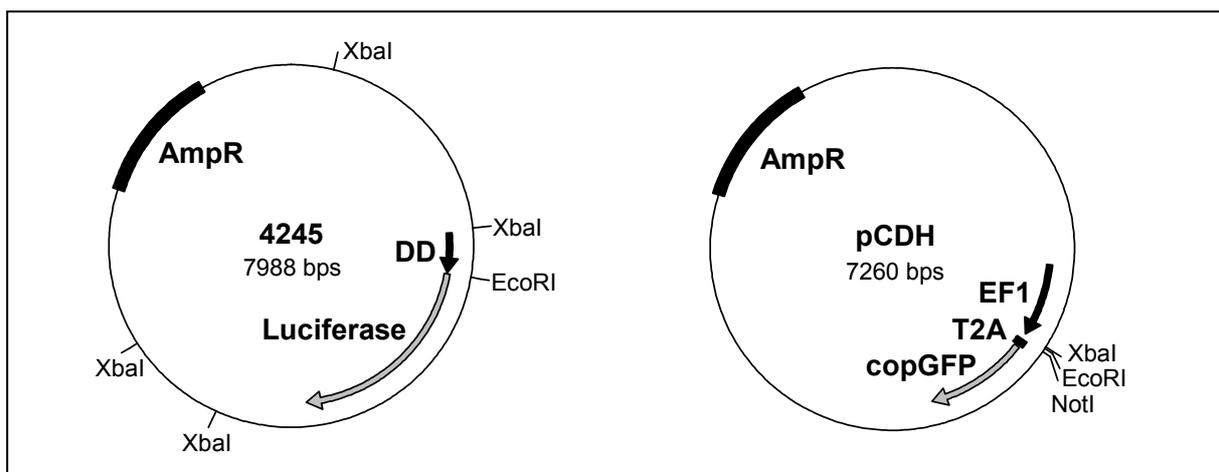


Abb.2.1 Eingesetzte Vektoren

Der Vektor 4245 diente zur Amplifikation der Destabilisierenden Domäne (DD). In den Vektor pCDH des lentiviralen Systems wurde mittels der Restriktionsenzyme XbaI, EcoRI und NotI sowohl die cDNA der DD als auch der Caspase-3 zwischen EF1 und T2A kloniert. *AmpR*, Ampicillin-Resistenzgen; *copGFP*, copepoda green fluorescent protein; *EF1*, elongation factor 1 (Promoter); *T2A*, Signalpeptid zur ribosomalen Spaltung; *bps*, base pairs.

XbaI / EcoRI:

PCR-Produkt bzw. Vektor	10 µl bzw. 1 µg
Puffer Tango [10x]	4 µl (enthält BSA 0,1 mg/ml)
XbaI [20 U/µl]	3,4 µl
EcoRI [10 U/µl]	1,3 µl
H ₂ O (PCR-Grad)	add 20 µl
Inkubation:	37°C / 1 h; 65°C / 20 min

EcoRI / NotI:

PCR-Produkt bzw. Vektor	10 µl bzw. 1 µg
Puffer O [10x]	2 µl (enthält BSA 0,1 mg/ml)
EcoRI [10 U/µl]	1,3 µl
NotI [10 U/µl]	0,7 µl
H ₂ O (PCR-Grad)	add 20 µl
Inkubation:	37°C / 1 h; 80°C / 20 min

SAP:

Vektor	20 µl (ganzer Ansatz aus Restriktionsverdau, 1 µg)
Puffer SAP [10x]	3 µl
SAP [1 U/µl]	5 µl
H ₂ O (PCR-Grad)	2 µl
Inkubation:	37°C / 1 h; 65°C / 10 min

2.2.3.5 Ligation

Durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden können linearisierte DNA-Fragmente miteinander verbunden werden. Die Reaktion wird von der T4 DNA Ligase, unter Hydrolyse von ATP, katalysiert, wobei das einzufügende Insert im Vergleich zum Vektor im Überschuss vorliegen sollte. Die Inkubationszeit und Reaktionstemperatur waren nicht entscheidend, da Ligationen sowohl bei 4°C über Nacht als auch bei 16°C für eine Stunde erfolgreich verliefen.

Zur Gewinnung des Konstruktes pCDH-DD bzw. pCDH-DD-Casp3 wurden die geschnittenen und aufgereinigten Produkte pCDH und DD bzw. im Anschluss pCDH-DD und Casp3 ligiert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend direkt in kompetente E.coli DH5α Bakterien transformiert (s. 2.2.3.6).

Vektor	2 µl
Insert (PCR-Produkt)	2 µl - 4 µl
Puffer T4 DNA Ligase [10x]	2 µl (Puffer enthält ATP)
T4 DNA Ligase [5 U/µl]	1 µl
H ₂ O (PCR-Grad)	add 20 µl
Inkubation:	4°C / über Nacht; 16°C, 1 - 3 h

2.2.3.6 Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA in kompetente E.coli DH5 α

Die rekombinante DNA wurde mit Hilfe eines Hitzeschocks in kompetente prokaryontische Empfängerzellen eingeschleust. Dazu wurden E.coli DH5 α Bakterien mit 10 μ l des Ligationsproduktes 10-30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C unterzogen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 Minuten auf Eis wurde zu dem Ansatz 400 μ l SOC-Medium gegeben und 1 Stunde bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und ein Teil des Überstands verworfen. Das Pellet wurde in einem Restvolumen von etwa 100 μ l resuspendiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agar-Platte ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden einzelne Kolonien in LB-Medium überführt und mit Hilfe der Colony-PCR (s. 2.2.3.7) analysiert. Klone, die in der Colony-PCR positiv waren, wurden amplifiziert.

2.2.3.7 Colony-PCR

Die Colony-PCR wurde eingesetzt, um nach erfolgter Transformation diejenigen Kolonien zu identifizieren, welche die eingesetzte DNA aufgenommen haben. Sie ist eine schnelle Methode zur Identifikation erfolgreich transformierter Bakterienklone, da man die PCR direkt mit Zellen durchführen kann und eine getrennte DNA-Isolation nicht durchgeführt werden muss. Es wurden direkt von der Agarplatte Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in den entsprechenden PCR-Reaktionsansatz getaucht. Mit jeweils derselben Pipettenspitze, das heißt mit derselben Kolonie, wurde anschließend 1 ml ampicillinhaltiges LB-Medium in einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen angeimpft, um die Klone für die DNA-Präparation zu amplifizieren. Für die PCR wurde das Pipettierschema und Cycling-Protokoll der GoTaq-Polymerase (Promega) angewendet. Die Primer wurden in der Konzentration 0,3 μ M eingesetzt, alle anderen Komponenten entsprachen exakt den Angaben des Herstellers.

Um zu überprüfen, ob unter den Kolonien des Ansatzes pCDH-DD ein positiver Klon für die DD ist, wurde eine Colony-PCR mit verschiedenen Klonen durchgeführt. Als Primer dienten der Vektor-spezifische pCDH_For und der Insert-spezifische DD_Rev (s. Tab.2.5). Um zu überprüfen, ob unter den Kolonien des

Ansatzes pCDH-DD-Casp3 ein positiver Klon für DD-Casp3 ist, wurde ebenfalls eine Colony-PCR mit verschiedenen Klonen durchgeführt. Als Primer dienten der Vektor-spezifische pCDH_For und der Insert-spezifische Casp3_Rev (s. Tab.2.5). Da das Amplikon in diesem Fall über 1 kb lang war, wurde an dieser Stelle vom Protokoll abgewichen und die Zeit für die Elongation von 1 Minute auf 2 Minuten erhöht.

<u>PCR-Programm:</u>	1. initiale Denaturierung	95°C	2 min	} 35 Zyklen
	2. Denaturierung	95°C	30 sec	
	3. Annealing	60°C	1 min	
	4. Elongation	72°C	<i>variabel</i>	
	5. terminale Elongation	72°C	5 min	
	6. Kühlung	4°C		
<u>Elongation:</u>	DD		1 min	
	DD_Casp3		2 min	

Das Ergebnis der Colony-PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.3.2) überprüft und positive Klone zur Weiterverarbeitung eingesetzt.

2.2.3.8 Präparation der Plasmid-DNA

Die Minipräparation wurde angewendet, um Bakterien in einem geringen Mediumvolumen zu kultivieren und anschließend die Plasmid-DNA zu isolieren, die meist für Sequenzierungen eingesetzt wurde. Um Plasmid-DNA in größerem Maßstab zu isolieren, wurden Midi- und Maxipräparationen durchgeführt. Die Methode beruht bei allen Ansätzen auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, worauf bei niedriger Salzkonzentration und bei optimalem pH-Wert die Bindung der Plasmid-DNA an die Säule erfolgt. RNA, Proteine und weitere Verunreinigungen wurden durch mehrere Waschschriffe entfernt.

Die Minipräparation erfolgte aus 3-6 ml Bakteriensuspension mit Hilfe des Ultra Prep Plasmid Mini Kits (Molzym) oder QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen). Die Midipräparation erfolgte aus 50 ml Bakteriensuspension mit Hilfe des Presto Spin D Plasmid Midi Kits (Molzym). Die Maxipräparation erfolgte aus 200 ml Bakteriensuspension mit Hilfe des Nucleobond PC500 Plasmid Maxi Kits (Macherey-Nagel), bei dem die Plasmid-DNA unter hoher Salzkonzentration eluiert und durch Isopropanol-Präzipitation konzentriert wird. In diesem Fall wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet je nach Größe in 100-500 µl H₂O resuspendiert. Alle Präparationen

erfolgten exakt nach Angaben der Hersteller. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (s. 2.2.3.1) wurden die Eluate bei -20°C gelagert.

2.2.3.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen, wurde die aus einer Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) mit entsprechenden Primern (s. Tab.2.5) sequenziert.

2.2.3.10 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus 1×10^5 - 1×10^6 Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Angewandt wurde das Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology“. Zur Homogenisierung der Zellen wurde die Zellsuspension durch QIAshredder-Säulen (Qiagen) bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Die RNA wurde in 30 - 50 µl autoklaviertem Wasser eluiert, die Konzentration mit dem NanoDrop ermittelt (s. 2.2.3.1) und das Eluat anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3.11 Reverse Transkription

Für die quantitative RT-PCR wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) je nach Versuchsansatz 0,5 - 1 µg RNA mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Für die reverse Transkription wurde das Pipettierschema sowie das Cycling-Protokoll „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit without RNase Inhibitor“ (Applied Biosystems) exakt nach Angaben des Herstellers angewendet. Pro Experiment wurde für jeden Ansatz dieselbe Menge Gesamt-RNA eingesetzt, um unter Voraussetzung gleich bleibender Effizienz der reversen Transkription in cDNA, anschließend eine Quantifizierung bestimmter Gene durchzuführen (s. 2.3.3.12). Die cDNA lag in einem Reaktionsvolumen von 20 µl vor und wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.12 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. In dem kommerziellen System der Firma Roche wird hierfür, außer dem sequenzspezifischen Primerpaar, eine spezielle fluorogene Hybridisierungssonde (Oligonukleotid) zur Probe gegeben, welche sich zwischen dem Primerpaar am Template anlagert. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff markiert. Wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch die räumliche Nähe zum Quencherfarbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Während der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der FastStart Taq Polymerase hydrolysiert. Dadurch entfernt sich der Reporterfarbstoff räumlich vom Quencherfarbstoff und die Reporteremission kann detektiert werden. Die Hydrolyse der Sonde ist nur dann möglich, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes nimmt das Signal des Farbstoffs zu, wobei diese Zunahme direkt proportional zum Zuwachs des PCR-Amplifikats ist.

Die eingesetzten Sonden wurden aus dem Universal Probe Library Set, Maus (Roche) ausgewählt, das größtenteils auch für humane Proben geeignet ist, da über 90% der murinen Gene homolog zu den humanen sind. Sowohl die Ermittlung der spezifischen Sonden als auch der Primer erfolgte mit Hilfe der Probe Finder Software 2.44 (Roche) für das Zielgen GR und das Referenzgen HPRT1. Die Primer wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) synthetisiert und über HPLC (high performance liquid chromatography) aufgereinigt. Als PCR-Maschine diente der Light Cycler 480 (LC480, Roche), der in Kombination mit dem hierfür empfohlenen Master Mix LC480 Probes Master (FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und $MgCl_2$) eingesetzt wurde. Die Experimente wurden in LC480 Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt, die mit einer speziellen LC480 Folie zugeklebt wurden. Zur einfachen, relativen Quantifizierung des zu untersuchenden Gens versus Referenzgen wurde die LC480 software 1.5.0 und die $\Delta\Delta C_T$ -Methode herangezogen. Für alle qRT-PCR-Ansätze wurde das Pipettierschema und Cycling-Protokoll des LC480 Probes Masters (Roche) exakt nach Angaben des Herstellers angewendet, wobei die Annealing-Temperatur $60^\circ C$ betrug und 45 Zyklen durchgeführt wurden.

2.2.3.13 Transiente Transfektion mittels Lipofektion

Der Vorgang der Einschleusung rekombinanter DNA oder siRNA (small interfering RNA) in eukaryotische Empfängerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids bzw. der siRNA in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion, s. 2.2.3.14). Die sequenzspezifische, posttranskriptionale Stilllegung von Genen wurde in der vorliegenden Arbeit durch RNA Interferenz (RNAi) induziert. Dabei wurde doppelsträngige RNA (dsRNA) mittels Lipofektion transient in Wirtszellen transfiziert.

Zur Herunterregulation des Glucocorticoidreceptors (GR) wurde eine sequenzspezifische, vorvalidierte siRNA eingesetzt (ID #s6187, Applied Biosystems). 5 nmol wurden in 50 µl Nuclease-freiem H₂O zu einer Stock-Konzentration von 100 µM gelöst. Die adhärenenten Zellen wurden je nach Größe zwischen 5 – 8 x 10³ Zellen / Vertiefung in 100 µl 10% FKS-haltigem Medium in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und über Nacht adhärenenten gelassen. Es wurden die gleichen Konditionen wie für die Cellscreen-Versuche eingesetzt, um im Anschluss an die RNA-Interferenz das Tumorzellwachstum mittels repetitiver Mikroskopie untersuchen zu können. Das heißt, die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion nur zu etwa 30% konfluent, was der empfohlenen Untergrenze des Herstellers zur Transfektion entsprach. Die siRNA wurde in einer Endkonzentration von 10, 25 und 50 nM eingesetzt, um die Effizienz der Herunterregulation unter verschiedenen Konditionen auszutesten und eine maximale Effizienz zu erzielen. Hierzu wurde pro Vertiefung die entsprechende Menge an siRNA, ebenso wie 0,5 µl Lipofectamine jeweils mit 25 µl Opti-MEM in einem Reaktionsgefäß verdünnt und nach 5 min beide Ansätze vorsichtig miteinander gemischt. Während weiterer 20 min Inkubationszeit wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch je 50 µl 0% FKS-haltigem Medium ersetzt. Nach Ablauf der 20 min wurden jeweils 50 µl der Liposomen-siRNA-Komplexe pro Vertiefung vorsichtig auf die Zellen pipettiert und 6 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit fusionierten die Liposomen-siRNA-Komplexe mit der Zellmembran, wodurch RNA-Interferenz ermöglicht wurde. Im Fall der RH-30 Zellen wurde nach 24 h unter denselben Konditionen repetitiv transfiziert. Die Transfektionseffizienz der GR-spezifischen siRNA wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten mittels qRT-PCR (s. 2.2.3.12) und Western Blot Analysen (s. 2.2.4) überprüft.

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde AllStars Negative siRNA (Qiagen) eingesetzt, die an keine bekannte humane Sequenz bindet. Durch eine Fluoreszenzmarkierung dieser Kontroll-siRNA mit AlexaFluor488 war es möglich, den prozentualen Anteil an transfizierten Zellen direkt nach erfolgter Transfektion im Durchflusszytometer im Kanal FL-1 zu ermitteln. Für die Transfektion der Kontroll-siRNA wurde ebenso wie für die GR-spezifische siRNA vorgegangen, wobei eine Endkonzentration von 5 nM eingesetzt wurde.

2.2.3.14 Stabile Transfektion mittels lentiviralem Vektorsystem

Zur dauerhaften Expression eines Gens wurde die stabile Transfektion mit Hilfe von Lentiviren gewählt. Diese sind Einzelstrang-RNA-Viren und gehören zur Familie der Retroviren. Aufgrund ihrer Eigenschaft auch ruhende, sich nicht in Teilung befindliche, eukaryotische Zellen zu infizieren, ist die Transfektionseffizienz mit diesem System sehr hoch. Darüber hinaus ermöglicht das System einen dauerhaften, stabilen Einbau des gewünschten Gens in das Genom. Es wurde ein lentivirales System der dritten Generation herangezogen, das aus insgesamt vier Plasmiden besteht. Aufgrund der Aufteilung, der für die Produktion der Viruspartikel benötigten Proteine, auf drei verschiedene Verpackungsplasmide sowie einem HIV-basierten Transfervektor für das Zielgen mit selbst-inaktivierenden Eigenschaften, war eine hohe biologische Sicherheit gewährleistet.

Zur Virusproduktion wurden HEK293T-Zellen herangezogen, die in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät wurden. 250 μ l 0% FKS-haltiges DMEM-Medium wurden mit 12,7 μ l TransIT-293 Transfektionsreagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden die Verpackungsplasmide 1 μ g pRSV-Rev (392), 2 μ g pMDLgag/polRRE (393) und 0,5 μ g pMD2.G (VSV-G) mit 1 μ g des Transfervektors pCDH-DD-Casp3 in 25 μ l 0% FKS-haltiges DMEM-Medium gemischt. Der TransIT- und der DNA-Ansatz wurden vorsichtig miteinander gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der HEK293T Zellen abgenommen und durch 3 ml frisches 10% FKS-haltiges DMEM-Medium ersetzt. Nach Ablauf der 30 min wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen verteilt und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf der Zellkulturplatte verteilt. Nach 72 h Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und der Zell-Debris durch

Zentrifugation für 10 min bei 2000 rpm entfernt. Daraufhin wurde der Überstand durch einen Steriflip (0,45 µm) filtriert und mittels Ultrafiltration mit Amicon Ultra-15 für 30 min bei 3400 rpm aufkonzentriert. Ein Teil des Konzentrats, mit einem Endvolumen von 150 µl, wurde direkt zur lentiviralen Transfektion eingesetzt und der Rest zur Lagerung zu je 10 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren.

Zur Bestimmung des Virus-Titers wurden erneut HEK293T Zellen herangezogen, die mittels Polybren mit verschiedenen Konzentrationen des Virus-Überstandes transduziert wurden. 24 h nach Infektion wurden die Virus-Verdünnungen mitsamt dem Überstand entfernt und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der Transfervektor pCDH (s. Abb.2.1) codiert neben dem gewünschten Zielgen auch für copGFP (copepoda green fluorescent protein), das die Bestimmung der Transfektionseffizienz zum Einen durch Fluoreszenzmikroskopie und zum Anderen durch Durchflusszytometrie im Kanal FL-1 ermöglicht. Nach weiteren 48 h konnte demzufolge der Anteil der GFP-positiven HEK293T Zellen in den jeweiligen Verdünnungen bestimmt und dadurch der Virus-Titer berechnet werden. Mit Hilfe der Formel [Titer = (Prozentsatz GFP-positive Zellen x Zellzahl bei Infektion) / Volumen Virus-Aliquot in ml] wurde der Titer mit der Einheit [Titer-Unit (TU) / ml] ermittelt. Hohe Virus-Titer liegen in einem Bereich von 10^8 – 10^9 TU/ml.

Die Ausbeute für den Transfervektor pCDH-DD-Casp3 lag nur bei ungefähr $7,5 \times 10^6$ TU/ml, wohingegen für den Leervektor ein sehr hoher Virus-Titer von etwa $1,5 \times 10^9$ TU/ml. Der Virus-Überstand des Leervektors wurde von meiner Kollegin Dr. Nadia Terziyska in einem vorangegangenen Versuch produziert und von mir für die Transfektion der MCF-7-Zellen verwendet. Von dem Kontrollvektor wurde nur 1 µl Virus-Überstand für die Infektion eingesetzt, dies entspricht etwa $1,5 \times 10^6$ TU. Von dem Vektor pCDH-DD-Casp3 wurde ein sehr hohes Volumen von 40 µl des Virus-Überstandes herangezogen, was etwa einer Menge von 3×10^5 TU entspricht. Der unterschiedlichen Menge eingesetzten Virus entsprechend, war der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen 48 h später auch sehr unterschiedlich. Für den pCDH waren etwa 90% der Zellen hoch positiv, das heißt unter dem Fluoreszenzmikroskop war eine sehr helle grüne Fluoreszenz zu sehen. Für den pCDH-DD-Casp3 waren nur ca. 30% der Zellen fluoreszierend, die im Vergleich zum Leervektor auch weniger hell leuchteten.

Um einen höheren Prozentsatz an GFP-positiven und damit Caspase-3-exprimierenden Zellen zu erzielen, wurden die Zellen durch Dr. Joachim Ellwart (IMI,

Helmholtz Zentrum München) am Durchflusszytometer (MoFlo, Cytomation) sortiert. Jedoch betrug der Anteil an GFP-positiven Zellen 4 Wochen nach der Zellsortierung nur etwa 50%. Möglicherweise schalten die Zellen das Gen nach einigen Wochen ab (gene silencing) oder die Zellsortierung war nicht effizient genug. Jedoch wurde aufgrund ausreichend hoher Effizienz für die folgenden Experimente von einer weiteren Zellsortierung abgesehen.

2.2.3.15 Proteo-Tuning System

Die bisherigen Methoden zur Regulation eines Proteins basieren vorwiegend einerseits auf Ebene der Transkription (Genexpression) oder andererseits auf Ebene der Translation (RNA-Interferenz). Die Technologie des Proteo-Tuning Systems basiert darauf, dass die Menge an vorliegendem Protein über den proteosomalen Abbau reguliert wird. Hierfür wird das Protein N-terminal an eine so genannte destabilisierende Domäne (DD) fusioniert, die das exprimierte Fusionsprotein unverzüglich zum proteosomalen Abbau führt. Erst durch Zugabe eines Liganden (Shield-1), der an die DD bindet, wird der Abbau inhibiert (Banaszynski et al., 2006; Chu et al., 2008).

Zu diesem Zweck wurde zunächst die cDNA der DD und im Anschluss daran die cDNA der Caspase-3 in den lentiviralen Transfervektor pCDH kloniert und in kompetente E.coli transformiert. Die DNA wurde nach Sequenzierung mittels lentiviraler Transfektion in MCF-7 Zellen geschleust und die GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer sortiert (s. 2.2.3.1-14). Es wurden somit zwei stabile Zelllinien produziert, zum einen die Kontrollzellen mit dem Leervektor MCF-7-pCDH und zum anderen die das Zielgen DD-Caspase-3 enthaltenden MCF-7-pCDH-DD-Casp3.

Zur Untersuchung der Funktionalität des Proteo-Tuning Systems wurden zunächst beide Zelllinien eingesetzt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät und nach Stimulation mit Shield-1 die Konzentrations- und Zeit-abhängige Expression von Caspase-3 mittels Western Blot Analysen überprüft (s. 2.2.4). Zur Untersuchung der funktionellen Rolle der Caspase-3 Expression wurden MCF-7-pCDH-DD-Casp3 Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät. Nach Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Shield-1 bzw. der Ethanol-Kontrolle (1‰) und Epirubicin in verschiedenen Konzentrationen, wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch ermittelt (s. 2.2.1.3).

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Das Zelllysat dient der Analyse von Proteinen, zum Beispiel um die Menge an phosphoryliertem Protein zu detektieren oder die Transfektionseffizienz zu überprüfen.

Hierzu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und zur Proteingewinnung mit 1xSDS-Lysepuffer (s. Tab.2.1) behandelt, dem jeweils frisch 1xProteinase Inhibitor-Cocktail (Merck) und Natriumorthovanadat (5 mM) als Phosphataseinhibitor zugegeben wurde. Dies wurde entweder durch Abschaben der Zellen von der Zellkulturplatte mit einem Zellschaber direkt in Lysepuffer durchgeführt oder die Zellen wurden trypsinisiert, für 5 min bei 2000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und im Anschluss daran in 1xSDS-Lysepuffer aufgenommen. Die Proben wurden während des gesamten Prozesses auf Eis gelagert. Um die hohe Viskosität der Zelllysate herabzusetzen, die durch den ebenso lysierten Zellkern und der daraus resultierenden DNA im Lysat entstanden ist, wurden die Proben mit Ultraschall behandelt. Hierzu wurde die Amplitude des Ultraschallgerätes auf 10% eingestellt und die DNA durch 0,1 sec dauernde Impulse geschert. Der Prozess wurde je nach Probenvolumen 7-15 Mal wiederholt, bis das Lysat vollständig verflüssigt war. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, 5 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und entweder direkt mittels SDS-PAGE (2.2.4.2) analysiert oder bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Protein SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. SDS ist ein anionisches Detergenz, das an die Proteine bindet und somit die Eigenladung der Proteine überdeckt, die daraufhin aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Es wurde pro Experiment jeweils dieselbe Menge an Lysat pro Spur aufgetragen, ebenso wie ein Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein Standard), der zur Identifizierung der Proteine diente. Es wurden 12% PA-Trenngele und 5% PA-Sammelgele, mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zum Schutz der Proteine, insbesondere der phosphorylierten Proteine, in 1xSDS-Laufpuffer auf Eis.

Die angelegte Stromstärke betrug am Anfang im Sammelgel 30 mA für 15 min, anschließend im Trenngel 50 mA für weitere 1,5 - 2 h.

Zusammensetzung eines 5% PA-Trenngels (Vol = 1 ml): 170 µl 30% Acrylamid, 680 µl H₂O dd, 130 µl Trenngelpuffer, 10 µl 20% SDS, 10 µl 10% APS, 1 µl TEMED.

Zusammensetzung eines 12% PA-Sammelgels (Vol = 5 ml): 1 ml 30% Acrylamid, 2,6 ml H₂O dd, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 50 µl 20% SDS, 50 µl 10% APS, 4 µl TEMED.

2.2.4.3 Semi-Dry Western Blot

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Gele 15 min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend durch elektrophoretischen Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Transfermembran übertragen. Der Transfer erfolgte nach dem „Sandwich-Prinzip“, bei dem zuerst 3 in Gel-Transferpuffer getränkte Whatman Filterpapiere, anschließend die PVDF-Membran und das SDS-Gel, gefolgt von 3 weiteren in Gel-Transferpuffer getränkten Whatman Filterpapieren aufeinander geschichtet und in einer Blotzelle eingeklemmt wurden. Die erforderliche Stromstärke für den Transfer betrug je nach Anzahl der Gele zwischen 80 - 360 mA (80 mA pro Gel) und die Dauer betrug zwischen 1,5 - 2 Stunden.

2.2.4.4 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden diese mit Hilfe der Immundetektion visualisiert. Dabei bindet ein antigenspezifischer primärer Antikörper an Epitope des zu untersuchenden Proteins auf der Membran, woraufhin ein sekundärer, Spezies-spezifischer Antikörper in der Lage ist, an den primären zu binden. Die sekundären Antikörper sind an eine Peroxidase gekoppelt (HRP-konjugiert), die im weiteren Verlauf eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, wodurch die spezifische Detektion der Proteine ermöglicht wird. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen direkt nach dem Transfer 1 h in 5 % Milchpulver in TBST geschwenkt, anschließend 3 x 10 min mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen erneut 3 x 10 min mit TBST gewaschen, bevor sie mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des ECL Entwicklungsreagenz, dessen Substrat

Luminol durch die Peroxidase oxidativ gespalten wird. Das oxidierte Produkt emittiert Licht, das eine Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms bewirkt. Durch unterschiedlich lange Expositionszeiten wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die eingesetzten Antikörper sowie deren Verdünnungen, finden sich in Tabelle 2.3 wieder. Bei ausreichendem Größenunterschied der zu detektierenden Proteine wurde dieselbe Membran nach Detektion des ersten Proteins für ca. 15 min in TBST / Natriumazid (0,1%) gewaschen und erneut über Nacht bei 4°C mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert. War der Größenunterschied jedoch nicht groß genug, wurde die Membran gestrippt, das heißt alle Antikörper und die Blockiersubstanzen wurden entfernt. Dies erfolgte im Restore Western Blot stripping buffer für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut mit 5 % Milchpulver in TBST blockiert und nach dreimaligem Waschen mit TBST mit dem nächsten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Für eine Quantifizierung der Proteinmenge wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software (Raytest, Straubenhardt) quantifiziert.

2.2.5 Statistik

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz einer Datengruppe wurden univariate Varianzanalysen durchgeführt (analysis of variance, ANOVA; SigmaStat, Jandel Scientific). Wenn möglich, wurde bei 2 Stichproben der gepaarte t test nach Student angewendet, außer beim Tierversuch, wo der t test für unabhängige Stichproben durchgeführt wurde. Alle Tests waren zweiseitig und statistische Signifikanz lag bei $p < 0,05$. Im Fall der Korrelationsanalyse wurde statistische Signifikanz mittels der Pearson-Produkt Momentkorrelation ermittelt.

3 ERGEBNISSE

Vorarbeiten unserer Gruppe legten nahe, dass Glucocorticoide (GC) in der Lage sind, die Proliferation von Tumorzellen zu induzieren. Darauf aufbauend, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals systematisch quantifiziert, wie häufig GC Überleben und Proliferation von etablierten Zelllinien solider Tumoren und primären Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie induzieren. Des Weiteren wurden zugrunde liegende Signalmechanismen der GC-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren identifiziert und diese biochemisch bzw. molekular inhibiert.

3.1 Wirkung von Glucocorticoiden auf Zellen solider Tumoren

Zunächst wurde mit Zellen solider Tumoren gearbeitet, bei denen GC nicht als Zytostatika eingesetzt werden, sondern als Adjuvantien, um Nebenwirkungen wie beispielsweise Übelkeit, Erbrechen und Ödembildung zu reduzieren (Grunberg, 2007; Kaal und Vecht, 2004).

3.1.1 Glucocorticoid-induzierte Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion

Der Einsatz von GC in der Chemotherapie solider Tumoren wird in den vergangenen Jahren zunehmend kritisch diskutiert, da anhand einer Vielzahl unterschiedlicher Studien belegt wurde, dass GC Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion auslösen können (Herr et al., 2009). Das Problem umfasst viele verschiedene Tumorzelllinien und konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass GC Resistenz gegenüber Paclitaxel-induzierter Apoptose sowohl in Mamma- als auch Ovariakarzinomzellen auslösen können (Pang et al., 2006; Sui et al., 2006).

In Anlehnung an die einleitend erwähnten Publikationen wurde zunächst der Phänotyp der GC-induzierten Apoptoseresistenz in den beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 untersucht. Hierzu wurden die Zellen 1 h mit Dexamethason (Dex) vorinkubiert und anschließend weitere 48 - 96 h mit Paclitaxel stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde mit Hilfe repetitiver Mikroskopie analysiert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid-Färbung ermittelt.

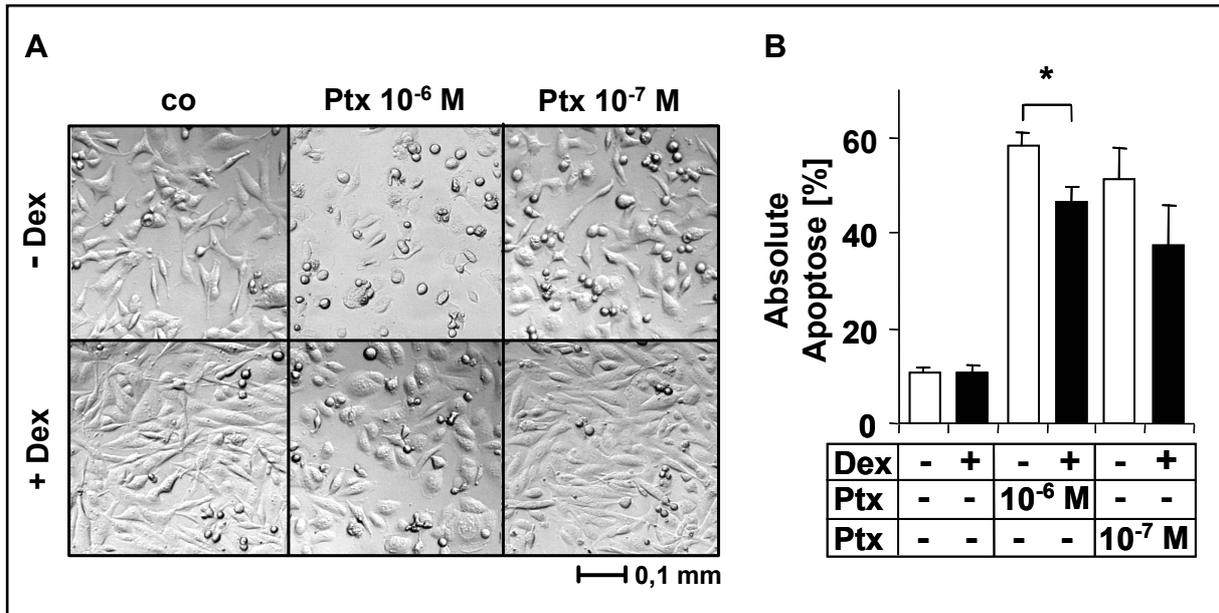


Abb.3.1.1 Dexamethason-induzierte Apoptoseresistenz in MDA-MB-231 Zellen

MDA-MB-231 Zellen wurden 1 h mit Dex (10^{-5} M; + Dex) bzw. PBS (- Dex) vorinkubiert und anschließend mit Paclitaxel (Ptx) in abgebildeten Konzentrationen stimuliert. **A** Mittels der repetitiven Mikroskopie wurde das Tumorzellwachstum unter den verschiedenen Stimuli dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen nach 48 h. **B** Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Apoptoserate durch Messung der Propidiumiodid-markierten, fragmentierten DNA nach 96 h gemessen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, deren Mittelwert mit dem mittleren Fehler in der Grafik zu sehen ist. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,01$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.1.1 zeigt, dass Dex in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 in der Lage ist, Apoptoseresistenz gegenüber Paclitaxel zu induzieren. Die Bilder der repetitiven Mikroskopie (A) belegen, dass die Paclitaxel-behandelten Zellen zum Großteil apoptotisch waren, was an den abgekugelten Zellen zu erkennen ist. Dagegen waren die mit Dex vorinkubierten Paclitaxel-behandelten Zellen deutlich vitaler, es lagen weniger apoptotische, abgekugelte, sondern mehrheitlich proliferierende Zellen vor. Dies Ergebnis wurde auch durch die Apoptoserate (B) der Paclitaxel-behandelten Zellen bestätigt, die durch Vorinkubation mit Dex statistisch signifikant niedriger war, als ohne Dex. Über die Tatsache der GC-induzierten Apoptoseresistenz hinaus, wurde bereits an dieser Stelle anhand der Bilder der Lichtmikroskopie festgestellt, dass die Dex-stimulierten Tumorzellen (A, unten links), im Vergleich zu den Kontrollzellen (A, oben links), beschleunigtes Wachstum aufweisen.

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, wurde der Phänotyp der GC-induzierten Apoptoseresistenz ferner in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls 1 h mit Dex vorinkubiert und anschließend weitere 48 - 96 h mit Paclitaxel stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde mit Hilfe repetitiver Mikroskopie analysiert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid-Färbung ermittelt.

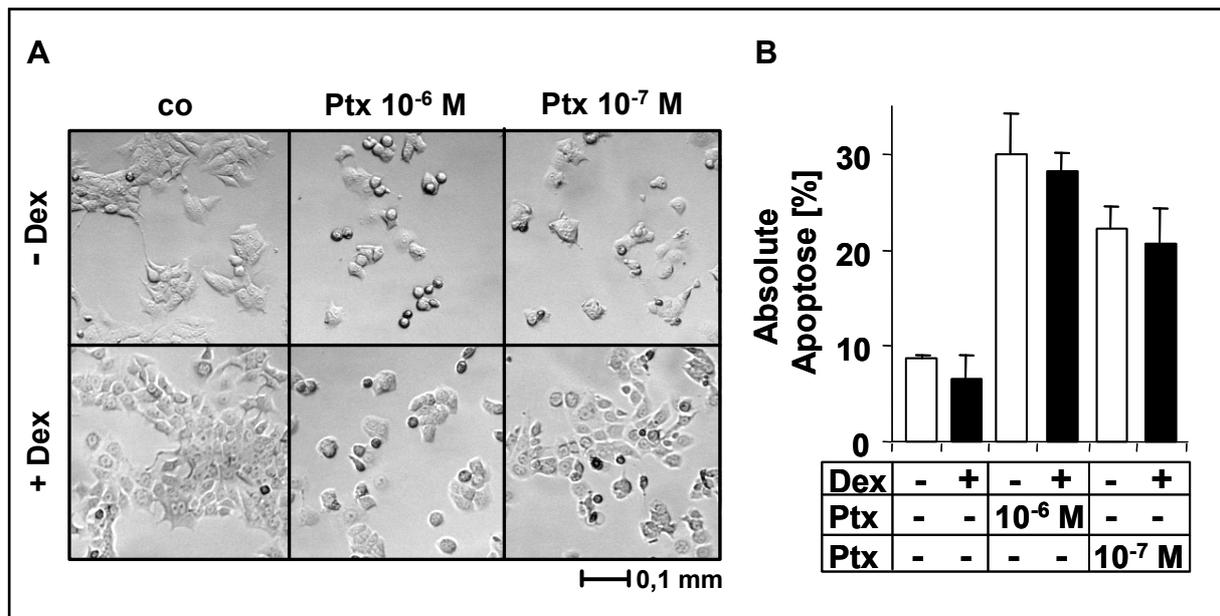


Abb.3.1.2 Dexamethason-induzierte Apoptoseresistenz in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden 1 h mit Dex (10⁻⁵ M; + Dex) bzw. PBS (- Dex) vorinkubiert und anschließend mit Paclitaxel (Ptx) in abgebildeten Konzentrationen stimuliert. **A** Mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie wurde das Tumorzellwachstum unter den verschiedenen Stimuli dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen nach 48 h. **B** Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Apoptoserate durch Messung der Propidiumiodid-markierten, fragmentierten DNA nach 96 h gemessen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, deren Mittelwert mit dem mittleren Fehler in der Grafik zu sehen ist.

Die Abb.3.1.2 zeigt, dass in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Dex-induzierte Apoptoseresistenz nicht so deutlich gezeigt werden konnte, wie in MDA-MB-231 Zellen. Die Bilder der repetitiven Mikroskopie (A) belegen den Unterschied deutlicher als die gemessene Apoptoserate (B). Die Paclitaxel-behandelten Zellen waren zum Teil apoptotisch bzw. wiesen keine Proliferation mehr auf. Dagegen waren die mit Dex vorinkubierten Paclitaxel-behandelten Zellen deutlich vitaler, es lagen weniger apoptotische, abgekugelte, sondern mehrheitlich proliferierende Zellen vor. Die durchflusszytometrisch ermittelte Apoptoserate der Paclitaxel-behandelten Zellen lag selbst nach 96 h durchschnittlich nur bei etwa 30%. Im Vergleich hierzu wurde die Apoptoserate durch Vorinkubation mit Dex schwach reduziert. Jedoch wurde ebenso

wie für MDA-MB-231 Zellen auch für MCF-7 Zellen eine erhöhte Dex-induzierte Proliferation detektiert. Anhand der Bilder der Lichtmikroskopie erkennt man, dass die Dex-stimulierten Zellen (A, unten links) im Vergleich zu den Kontrollzellen (A, oben links) beschleunigtes Wachstum aufweisen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch GC ausgelöste Resistenz gegenüber Paclitaxel-induzierter Apoptose in beiden Tumorzelllinien belegt werden konnte. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie ein pro-proliferativer Effekt von Dex festgestellt. Demzufolge deuten die Daten darauf hin, dass GC nicht nur Apoptoseresistenz induzieren, sondern des Weiteren in der Lage sind, das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen zu fördern.

3.1.2 Glucocorticoid-induzierte Proliferation *in vitro*

Mit den pro-proliferativen Effekte von GC beschäftigen sich bis dato nur wenige Studien. Aus diesem Grund wurde systematisch quantifiziert, wie viele Zelllinien solider Tumoren *in vitro* den Phänotyp der GC-induzierten Proliferation aufweisen.

3.1.2.1 Erhöhung des Wachstums ermittelt anhand repetitiver Mikroskopie

Zur systematischen Quantifizierung der pro-proliferativen Effekte von GC wurden 10 Tumorzelllinien herangezogen und mit Dex in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Um ausschließen zu können, dass der Phänotyp auf einen Tumortyp beschränkt ist, wurden gezielt Zelllinien verschiedenen Ursprungs und unterschiedlicher Tumorentität gewählt. In der Tab.3.1 findet sich eine Übersicht über alle untersuchten Tumorzelllinien sowie deren Entität und Ursprung. Das Tumorzellwachstum wurde mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie über 48 h ermittelt, wobei nur jene Versuche auswertbar waren, die den definierten Kriterien entsprachen (s. 2.2.1.4). War dies der Fall, wurde die prozentuale spezifische Differenz des Wachstums der Dex-stimulierten Zellen versus den Kontrollzellen ermittelt. Ein pro-proliferativer Effekt von Dex auf das Tumorzellwachstum wurde definiert, wenn die spezifische Differenz mindestens 120% im Vergleich zu den Kontrollzellen betrug, die als 100% festgelegt wurden. Mindestens 3 von 5 Experimenten mussten exakt diese Bedingungen erfüllen, bevor eine Zelllinie der Gruppe „GC-induziertes Tumorzellwachstum“ zugeordnet wurde (s. Tab.3.1). In den folgenden Abbildungen sind alle Tumorzelllinien, die dieser Gruppe zugeteilt werden konnten, dargestellt.

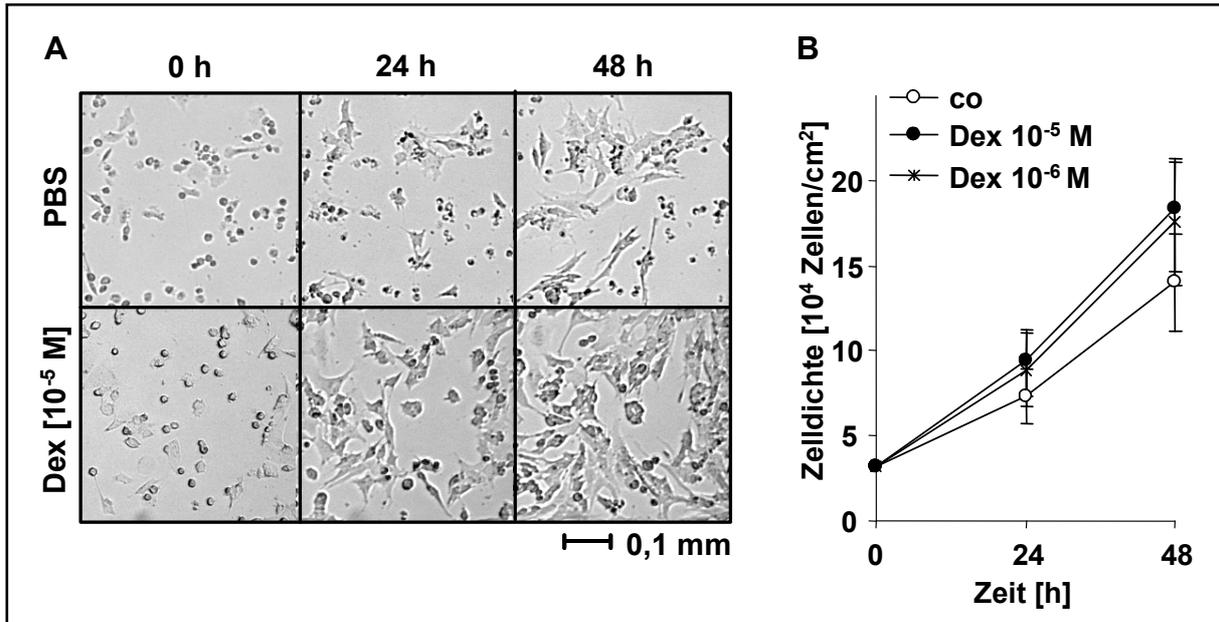


Abb.3.1.3 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CADO Zellen

CADO Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Daten wurden freundlicherweise aus der medizinischen Doktorarbeit von N. Kohistani zur Verfügung gestellt, die in unserer Arbeitsgruppe angefertigt wurde.

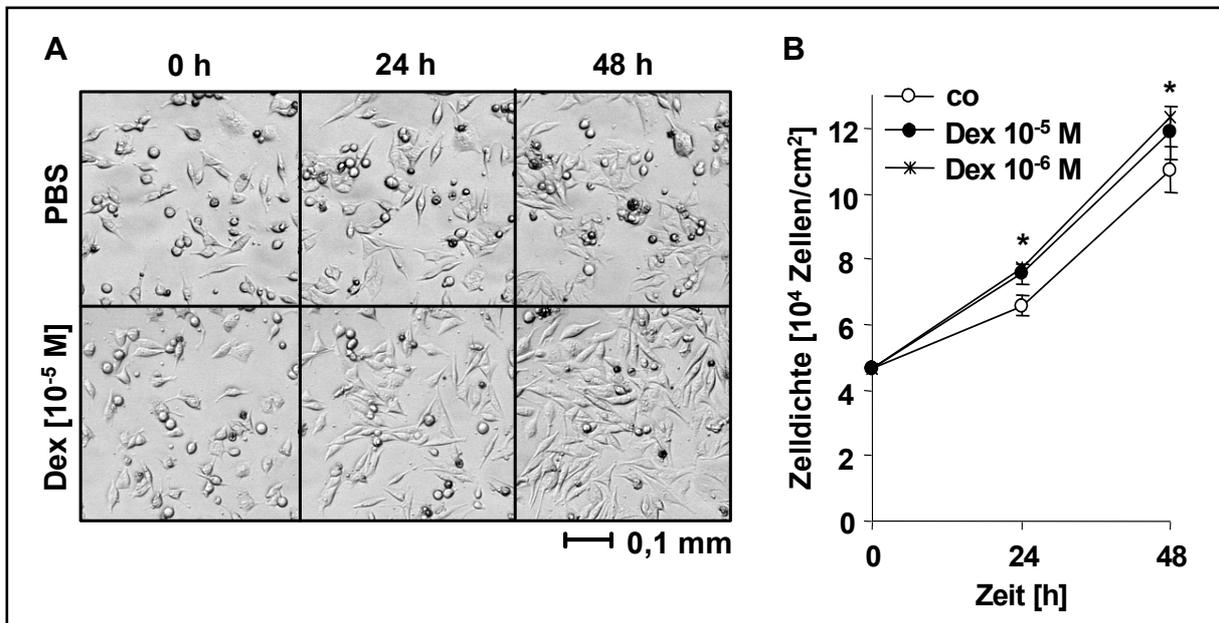


Abb.3.1.4 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CALU-6 Zellen

CALU-6 Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

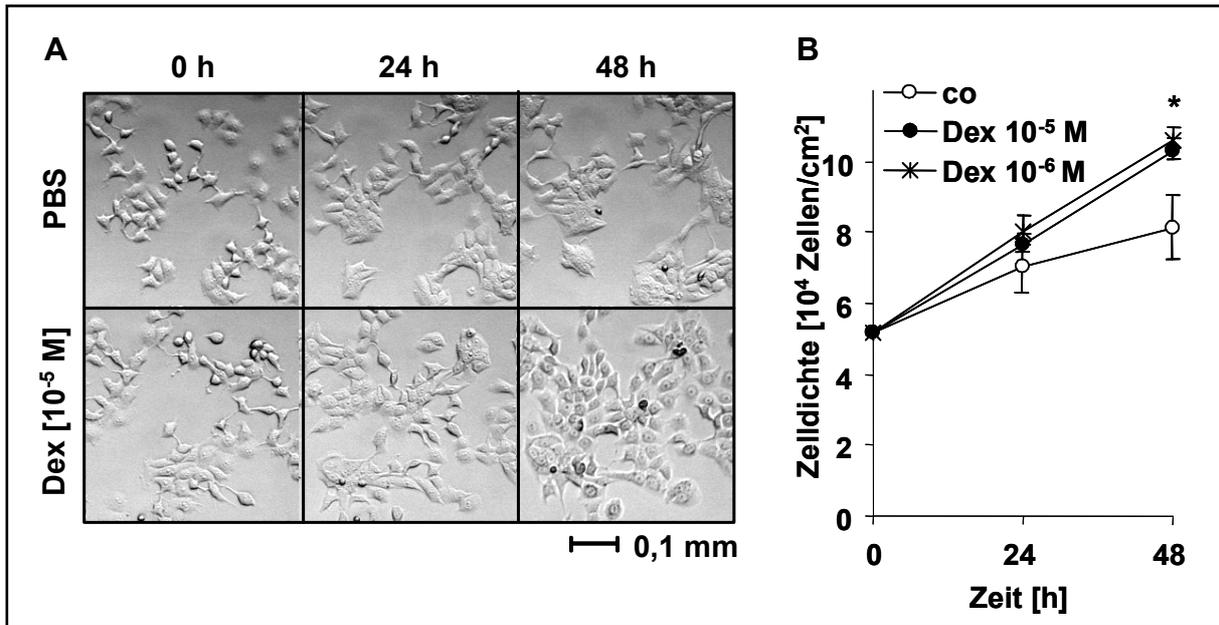


Abb.3.1.5 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

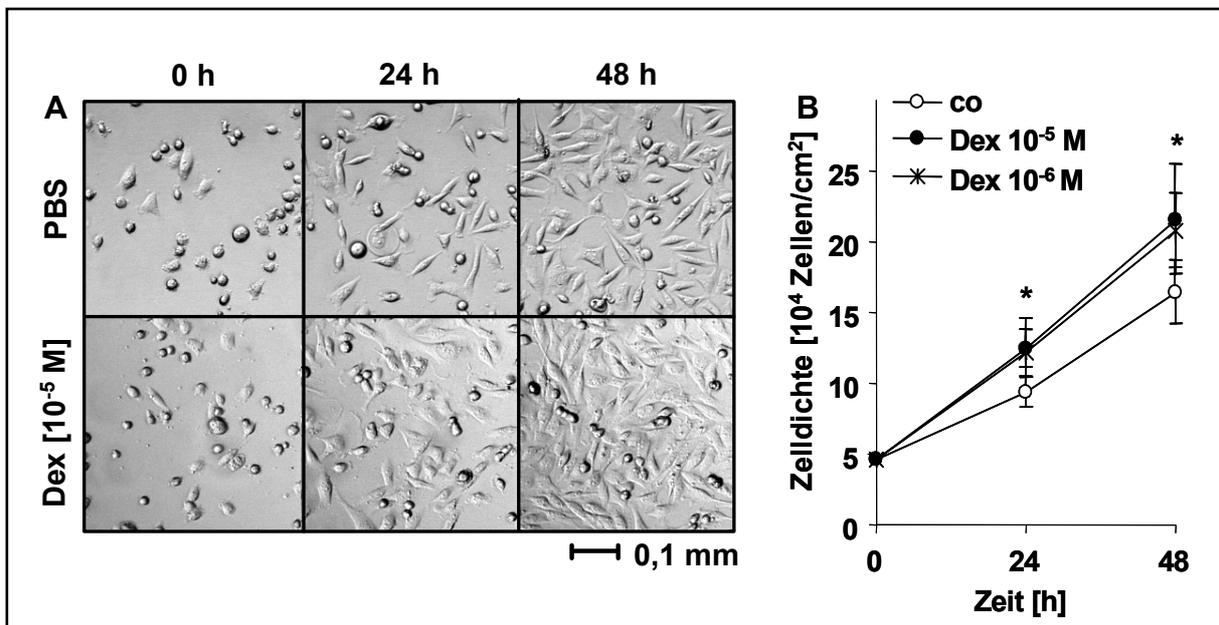


Abb.3.1.6 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von MDA-MB-231 Zellen

MDA-MB-231 Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

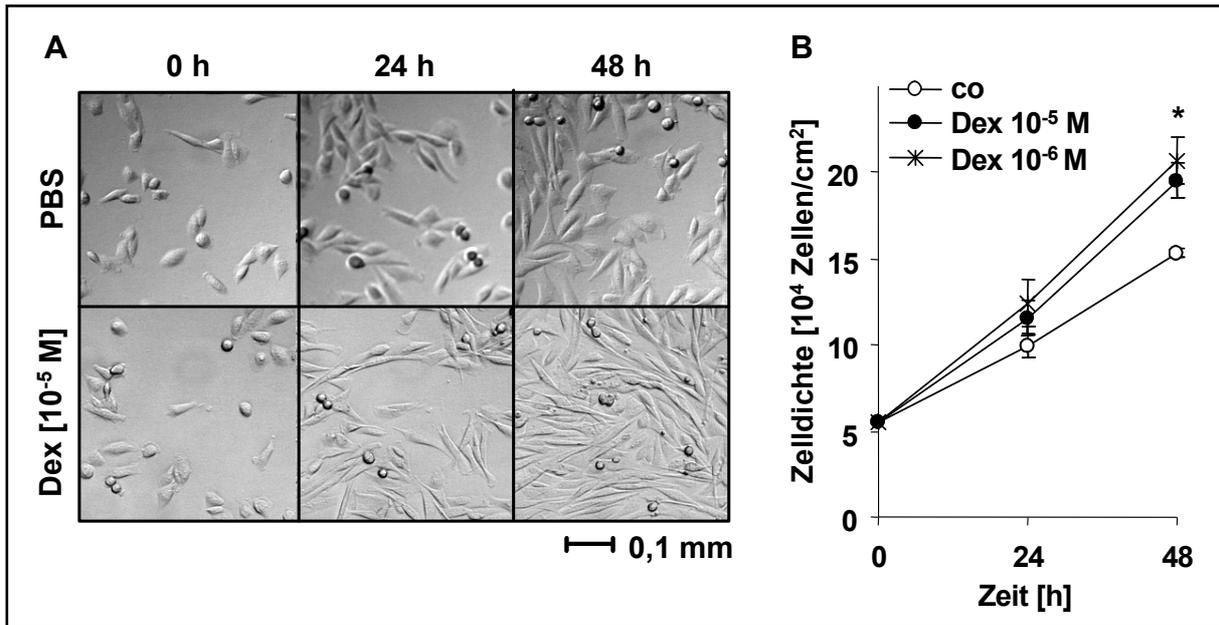


Abb.3.1.7 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von RH-30 Zellen

RH-30 Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

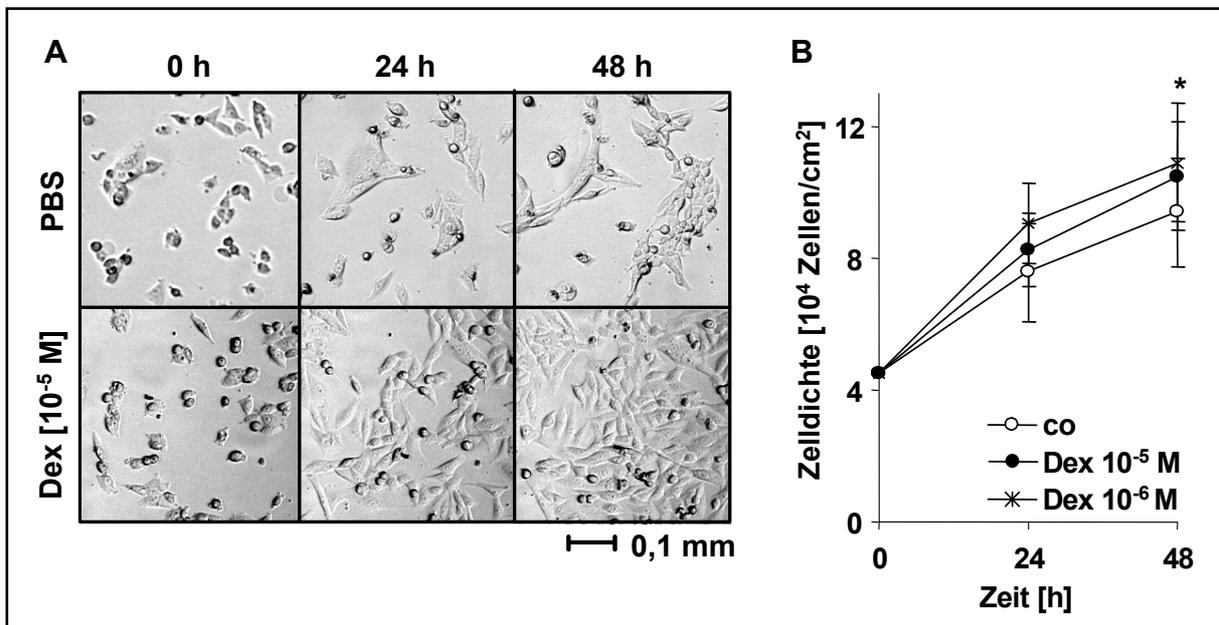


Abb.3.1.8 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von SHEP Zellen

SHEP Zellen wurden mit Dex in verschiedenen Konzentrationen (10^{-5} , 10^{-6} M) bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. **A** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, die zum Zeitpunkt 0 h, das heißt direkt nach der Stimulation, 24 h und 48 h gemacht wurden. **B** In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Daten aus Abb.3.1.3 – 3.1.8 zeigen deutlich den pro-proliferativen Effekt von Dex auf 6 von 10 untersuchten Tumorzelllinien. Auf den repräsentativen Bildern der repetitiven Mikroskopie (jeweils A) ist zu erkennen, dass die Anfangsbedeckung der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur geringfügig voneinander abweichen. Das heißt, dass ungefähr dieselbe Fläche zum Zeitpunkt 0 h mit Zellen bedeckt war und somit gleiche Startkonditionen gegeben waren. Bereits nach 24 h, aber noch eindrücklicher nach 48 h, ist die Fläche, die mit Zellen bedeckt war, in den Dex-stimulierten Ansätzen deutlich größer. Zum Beispiel in Abb.3.1.7, den RH-30 Zellen, ist der Unterschied nach 48 h besonders groß. Hier bedecken die Dex-stimulierten Zellen die gesamte Fläche, wohingegen in der Kontrolle nur etwa die Hälfte der Fläche bedeckt ist, unter denselben Startkonditionen. Die Wachstumskurven (jeweils B), in denen der Mittelwert der Zelldichte dargestellt ist, fassen die durchgeführten Experimente zusammen und belegen, dass es sich bei der Dex-induzierten Proliferation um einen statistisch signifikanten Phänotyp handelt.

Die Tabelle 3.1 liefert eine Übersicht der Ergebnisse, inklusive Tumorentität und Ursprung aller untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	Tumorentität	Ursprung
GC-induziertes Tumorzellwachstum		
CADO	Ewing-Sarkom	mesenchymal
CALU-6	Lungenkarzinom	epithelial
MCF-7	Mammakarzinom	epithelial
MDA-MB-231	Mammakarzinom	epithelial
RH30	Rhabdomyosarkom	mesenchymal
SHEP	Neuroblastom	neuroectodermal
Kein GC-induziertes Tumorzellwachstum		
A498	Nierenkarzinom	epithelial
A549	Lungenkarzinom	epithelial
KELLY	Neuroblastom	neuroectodermal
LNCaP	Prostatakarzinom	epithelial

Tab.3.1 Übersicht aller untersuchten Tumorzelllinien

Bei 10 Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs wurde der Einfluss von Dex auf das Tumorzellwachstum untersucht. Die Daten wurden mittels repetitiver Mikroskopie erhoben und je nach Phänotyp wurden die Zelllinien der Gruppe „GC-induziertes Tumorzellwachstum“ oder „Kein GC-induziertes Tumorzellwachstum“ untergeordnet. Die Originaldaten der Gruppe „GC-induziertes Tumorzellwachstum“ finden sich in Abb.3.1.3 – 3.1.8.

Interessanterweise waren nicht nur Tumorzelllinien einer Entität oder eines gemeinsamen Ursprungs betroffen, sondern sowohl epithelialen (MDA-MB-231, MCF-7, CALU-6), mesenchymalen (RH-30, CADO) als auch neuroectodermalen Ursprungs (SHEP). Die durchschnittliche spezifische Differenz des Tumorzellwachstums lag im Vergleich zu den Kontrollzellen bei etwa 140%.

Um den pro-proliferativen Effekt auch in niedrigeren GC-Konzentrationen nachzuweisen, wurden CALU-6 Zellen mit Dex in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie ermittelt.

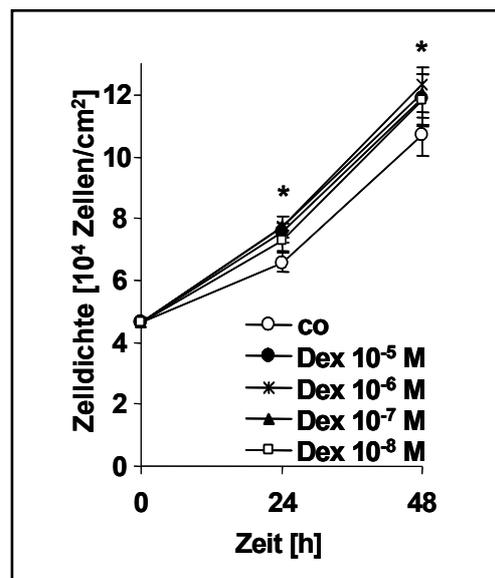


Abb.3.1.9 Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CALU-6 Zellen

CALU-6 Zellen wurden mit abgebildeten Konzentrationen Dex bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie bestimmt. In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.1.9 (A) zeigt, dass Dex auch in Konzentrationen bis in den mittleren nanomolaren Bereich noch in der Lage ist, Tumorzellwachstum zu induzieren. Diese niedrigen Konzentrationen sind ebenso von hoher klinischer Relevanz, da die Konzentration von GC aufgrund einer Plasmahalbwertszeit von durchschnittlich 3 - 5 h während der Therapie auch in den nanomolaren Bereich absinken.

Diesen Abschnitt zusammenfassend kann man sagen, dass in 6 von 10 untersuchten Tumorzelllinien GC-induziertes Tumorzellwachstum mittels repetitiver Mikroskopie nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren scheint sich der Phänotyp nicht auf eine Tumorentität oder einen gemeinsamen Ursprung zu beschränken und innerhalb eines weiten Konzentrationsspektrums aufzutreten.

3.1.2.2 Erhöhung des Wachstums ermittelt anhand elektrischer Impedanz

Die Bilder der repetitiven Mikroskopie weisen bereits darauf hin, dass es sich bei dem GC-induzierten Tumorzellwachstum nicht nur um eine Zunahme der Zellgröße, sondern tatsächlich der Zellzahl handelt. Zur Validierung dieser Hypothese anhand weiterer Methoden wurde das xCELLigence herangezogen. Dies ermöglicht die Bestimmung des Zellwachstums über Veränderungen in der elektrischen Impedanz. Die Untersuchungen wurden anhand der beiden Tumorzelllinien MDA-MB-231 und RH-30 durchgeführt. Allerdings konnten die Versuche nur zweimal durchgeführt werden, da das Gerät nur einige Wochen während einer Testphase zur Verfügung stand.

Die Zellen wurden in speziellen, mit Golddioden beschichteten Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und mit Dex über 48 h stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde während der gesamten Dauer des Experiments anhand Veränderungen der elektrischen Impedanz dokumentiert.

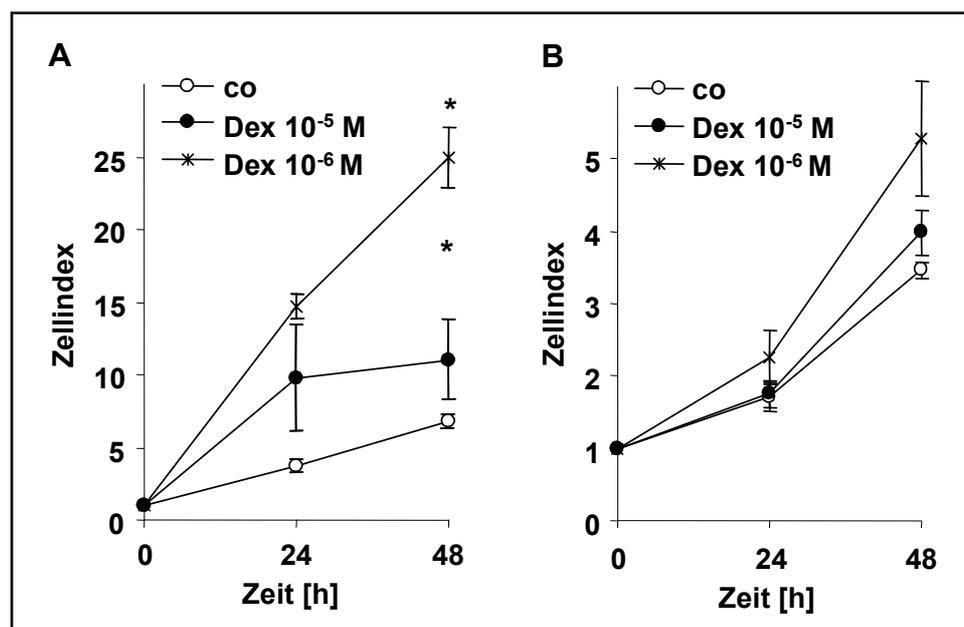


Abb.3.1.10 Ermittlung des Tumorzellwachstums anhand elektrischer Impedanz

MDA-MB-231 (A) und RH-30 (B) Zellen wurden mit Dex in abgebildeten Konzentrationen bzw. PBS (co) über 48 h stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der elektrischen Impedanzanalyse bestimmt. In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus je zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,01$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Aus der Abb.3.1.10 ist ersichtlich, dass Dex in beiden untersuchten Zelllinien beschleunigtes Tumorzellwachstum induziert hat. Dies ist anhand des schnelleren Anstiegs des Zellindex im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erkennen. Der Zellindex

ist eine fiktive Einheit und gibt die elektrische Impedanz wider. Der vor allem bei den MDA-MB-231 Zellen gemessene, sehr deutliche Unterschied von PBS- zu Dex-stimulierten Zellen beruht unter anderem darauf, dass die Messmethode noch sensitivere Ergebnisse liefert als jene der repetitiven Mikroskopie.

Die Ergebnisse der Impedanzanalyse zur Ermittlung des Tumorzellwachstums bestätigten somit den pro-proliferativen Effekt von GC auf Tumorzellen, der bereits anhand repetitiver Mikroskopie belegt wurde.

3.1.2.3 Erhöhung der absoluten Zellzahl

Zur Ermittlung des pro-proliferativen Effektes von GC auf Tumorzellen anhand der Zellzahl wurden so genannte TruCount Tubes herangezogen. Dabei handelt es sich um vorgefertigte Röhrchen für die Durchflusszytometrie, die eine definierte Anzahl an fluoreszierenden Kügelchen (beads) enthalten und somit eine exakte Quantifizierung der Zellzahl mit Hilfe des Durchflusszytometers erlauben. Diese äußerst sensitive Methode reduziert Fehlmessungen auf ein Minimum, die zum Beispiel durch Ungenauigkeiten bei der Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Zählkammer auftreten können.

Nach Stimulation der Zellen mit Dex über 24 h, wurde die absolute Zellzahl mit Hilfe von TruCount Tubes ermittelt.

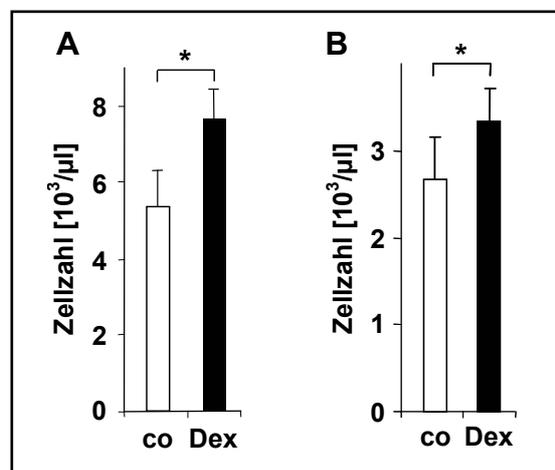


Abb.3.1.11 Dexamethason-induzierte Zellzahlerhöhung

CALU-6 (A) und MCF-7 Zellen (B) wurden 24 h mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS (co) stimuliert. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe von TruCount Tubes im Durchflusszytometer bestimmt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus je fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.1.11 zeigt, dass die Stimulation mit Dex über 24 h in beiden untersuchten Zelllinien zu einer Erhöhung der Zellzahl geführt hat. Die durchschnittliche Differenz

der Zellzahl lag im Vergleich zu den Kontrollzellen bei etwa 130%. Dies stimmt mit den mittels repetitiver Mikroskopie ermittelten Differenzen beim Tumorzellwachstum von etwa 140% überein.

Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei dem mittels repetitiver Mikroskopie und Impedanzanalyse gemessenen GC-induzierten Tumorzellwachstum um eine Erhöhung der Zellzahl und nicht nur der Zellgröße handelt.

3.1.2.4 Erhöhung der DNA-Syntheserate und der metabolischen Aktivität

Neben der Bestimmung des Tumorzellwachstums anhand der bisher vorgestellten Methoden, wurden weitere klassische Nachweise durchgeführt. Dabei wurde der proliferative Effekt von GC anhand der DNA-Syntheserate mittels Einbau von BrdU in die DNA und des Weiteren die enzymatische Aktivität mittels Umsatz von Wst-1 untersucht. Die Experimente wurden mit CALU-6 Zellen durchgeführt, da aufgrund einer Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum die Möglichkeit der Durchführung eines Tierversuchs mit CALU-6 Zellen bestand, was eine mehrfache Validierung der Ergebnisse *in vitro* voraussetzt.

Nach Stimulation der Zellen mit Dex über 24 h, wurde sowohl die DNA-Syntheserate als auch die enzymatische Aktivität ermittelt.

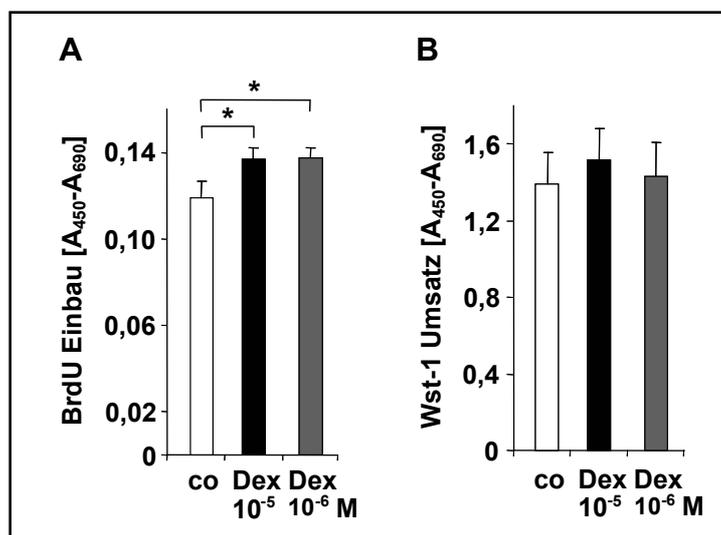


Abb.3.1.12 Dexamethason-induzierte Proliferation von CALU-6 Zellen

CALU-6 Zellen wurden 24 h mit Dex (10⁻⁵, 10⁻⁶ M) bzw. PBS (co) stimuliert. **A** Die DNA-Syntheserate wurde über den Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA und anschließende antikörpervermittelte Substratreaktion im Spektrophotometer bestimmt. **B** Die Metabolisierungsrate wurde über den Umsatz von Wst-1 und Messung des entstandenen Produktes im Spektrophotometer bestimmt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus je fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * p < 0,01 und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.1.12 zeigt, dass die Stimulation mit Dex zu einem erhöhten Einbau von BrdU in die DNA sowie gesteigertem Umsatz von Wst-1 geführt hat. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die DNA-Syntheserate der Zellen als auch die enzymatische Aktivität durch Dex-Stimulation erhöht wurde. Die durchschnittliche Differenz lag in beiden Versuchsansätzen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei etwa 115 - 120% und war somit leicht unterhalb der mittels sensitiveren Methoden erhobenen Unterschiede von 130 - 140%, bestätigt dennoch ebenso den pro-proliferativen Effekt von GC auf Tumorzellen.

Den Abschnitt 3.1.2 zusammenfassend kann man sagen, dass GC in 6 von 10 untersuchten Tumorzelllinien beschleunigtes Tumorzellwachstum induziert haben. Der Phänotyp ließ sich dabei nicht auf eine Tumorentität oder einen gemeinsamen Ursprung beschränken und wurde innerhalb eines weiten Konzentrationsspektrums detektiert. Die Erhöhung des Tumorzellwachstums konnte sowohl mittels repetitiver Mikroskopie als auch Impedanzanalyse nachgewiesen werden. Darüber hinaus bestätigte die Ermittlung der absoluten Zellzahl, der DNA-Syntheserate und der enzymatischen Aktivität den pro-proliferativen Effekt von GC.

Diese Daten belegen, dass es sich bei dem Phänotyp der GC-induzierten Proliferation von Tumorzellen *in vitro* um ein breit gefächertes Problem handelt. In der vorgefundenen Häufigkeit stellen die unerwünschten pro-proliferativen Effekte von GC eine neue und unerwartete Nebenwirkung dar.

3.1.3 Glucocorticoid-induzierte Proliferation *in vivo* im Tierversuch

Um GC-induziertes Tumorzellwachstum auch *in vivo* belegen zu können, wurde nach mehrfacher Validierung der Ergebnisse für CALU-6 Zellen *in vitro*, ein Tierversuch geplant. Dank einer Kooperation am Deutschen Krebsforschungszentrum, bestand die Möglichkeit, in einem heterotopen Maus-Tumor-Xenograft Modell mit CALU-6 Zellen ein Stimulationsexperiment mit GC durchzuführen.

Hierzu wurden 8-10 Wochen alten Swiss-Nacktmäusen (nu/nu, Charles River) CALU-6 Zellen (5×10^6 pro Tier) subkutan in die rechte Flanke injiziert. 8 Tiere wurden über subkutane Injektion am Tag 0-4, 7-11 und 14-18 mit Dex (50 µg/kg/Tag) und weitere 9 Tiere mit Placebo behandelt. Das Tumorwachstum wurde regelmäßig an bestimmten Tagen mittels Kalipermessung dokumentiert. Der Tierversuch und die Messungen wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum von PD Dr. Eberhard Amtmann und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

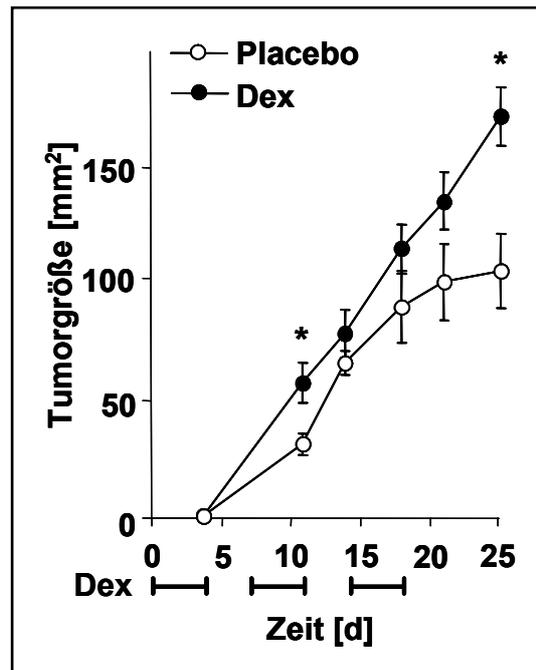


Abb.3.1.13 Dexamethason-induziertes Tumorwachstum *in vivo* im Tierversuch

CALU-6 Zellen (5×10^6 Zellen/Tier) wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 200 μ l PBS resuspendiert und subkutan in die rechte Flanke von 8-10 Wochen alten Swiss-Nacktmäusen (nu/nu) injiziert. Dex wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst und wurde mit 0,1 % BSA weiter verdünnt zu einer Endkonzentration von 5 μ g/ml. An Tag 0-4, 7-11 und 14-18 wurden 8 Tiere mit 200 μ l / 20 g Körpergewicht Dex (entsprechend 50 μ g Dex/ kg / Tag) bzw. 9 Tiere mit Placebo, über subkutane Injektion, behandelt. Die Tumorgröße wurde an dargestellten Tagen mit einem Kaliper gemessen und ist in der Abbildung als Mittelwert mit dem mittleren Fehler dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen t-test ermittelt.

Das Ergebnis aus Abb.3.1.13 bestätigt die *in vitro* erhobenen Befunde, dass Dex in der Lage ist beschleunigtes Tumorzellwachstum zu induzieren. Die injizierten Tumorzellen entwickelten sich in beiden Gruppen zu Tumoren, allerdings wuchsen jene aus der Dex-behandelten Gruppe nach nur 25 Tagen schneller zu einer Größe bis zu über 150 mm^2 heran. Hingegen wiesen jene aus der Placebo-behandelten Gruppe nur eine Größe von etwa 100 mm^2 auf. Demzufolge entsprach die durchschnittliche Differenz ca. 150% und lag damit sogar über den *in vitro* erhobenen Unterschieden.

Das Kapitel 3.1 zusammenfassend, kann man sagen, dass GC nicht nur in der Lage waren Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion auszulösen, sondern darüber hinaus einen pro-proliferativen Effekt auf Tumorzellen aufwiesen. Die GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen *in vitro* beschränkte sich weder auf eine Tumorentität noch einen gemeinsamen Ursprung und wurde mittels verschiedener Methoden nachgewiesen. Darüber hinaus konnte der pro-proliferative Effekt von GC *in vivo* in einem Maus-Tumor-Xenograft-Modell bestätigt werden, was die klinische Relevanz dieses breit gefächerten Problems unterstreicht.

3.2 Wirkung von Glucocorticoiden auf primäre Leukämiezellen

Im Fall maligner, hämatopoetischer Erkrankungen, wie Leukämien, werden GC als Zytostatika eingesetzt und nicht als Adjuvantien wie bei soliden Tumoren. Die in diesen Zellen zugrunde liegenden Signalmechanismen der GC-induzierten Apoptose sowie jene der Resistenz gegenüber GC-induzierter Apoptose, wurden bereits ausgiebig erforscht (Frankfurt und Rosen, 2004; Tissing et al., 2003). Jedoch wurde bis dato noch nicht untersucht, ob beispielsweise unter den resistenten Leukämiezellen ebenfalls unerwünschte pro-proliferative Effekte von GC auftreten können. Demzufolge wurde die Wirkung von GC auf primären, hämatopoetischen Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie untersucht. Dies umfasst einerseits eine Ausweitung der Untersuchungen zu GC-induzierten Phänotypen auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs und zum Anderen auf primäre Zellen, wodurch Zelllinienartefakte ausgeschlossen werden können. Die Gewinnung primärer Leukämiezellen ist im Vergleich zu Primärzellen solider Tumoren einfacher und liefert schneller eine reine Zellpopulation.

Mehrere Kooperationen mit Kinderkliniken in München ermöglichten das Arbeiten mit primären Leukämiezellen. Die Entnahme der Proben erfolgte bei Patienten direkt nach Diagnose einer akuten Leukämie, das heißt vor Beginn therapeutischer Maßnahmen. Die immunologische Leukämiediagnostik wurde anhand der Expressionsmenge spezifischer Zell-Antigene in den jeweiligen Kinderkliniken durchgeführt. Es wurde entweder über Punktion Knochenmark oder über Blutabnahme peripheres Blut zur Verfügung gestellt. Zur Isolation der leukämischen Blasten wurden die Proben Ficoll-isoliert, wodurch eine starke Anreicherung der Tumorzellen auf über 90% und dadurch eine sehr reine Zellpopulation erzielt wurde. Zur Kultivierung dieser primären Leukämiezellen war eine Supplementierung des Zellkulturmediums mit verschiedenen Zusätzen notwendig, da Primärzellen *in vitro* eine sehr hohe spontane Apoptoserate aufweisen (s. 2.2.1.2). Direkt nach Isolation der Blasten und Aufnahme in speziellem Zellkulturmedium, wurden die Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät und mit GC stimuliert. Für die Experimente mit primären Leukämiezellen wurden zwei GC eingesetzt, Dex und Prednisolon (Pred), um die Daten gegenseitig zu validieren. Die spontane Apoptoserate der Primärzellen zu Beginn (Startapoptose) der *in vitro* Kultivierung wurde durchflusszytometrisch bestimmt sowie anschließend alle 24 h anhand unstimulierter Kontrollzellen. Sobald die spezifische Apoptoserate (s. 2.2.1.2)

bei mindestens 25% lag, wurden alle Proben in Eppendorfgefäße überführt und die Apoptoserate durchflusszytometrisch ermittelt. In seltenen Fällen lag die spezifische Apoptose der Kontrollzellen auch nach 96 h noch nicht bei 25%, wobei zur Vergleichbarkeit der Daten spätestens nach 96 h alle Proben gemessen wurden. In die folgenden Daten fließen Ergebnisse von Proben ein, die vor und während meiner Zeit als Doktorandin im Zeitraum zwischen 2002 und 2009 erhoben wurden.

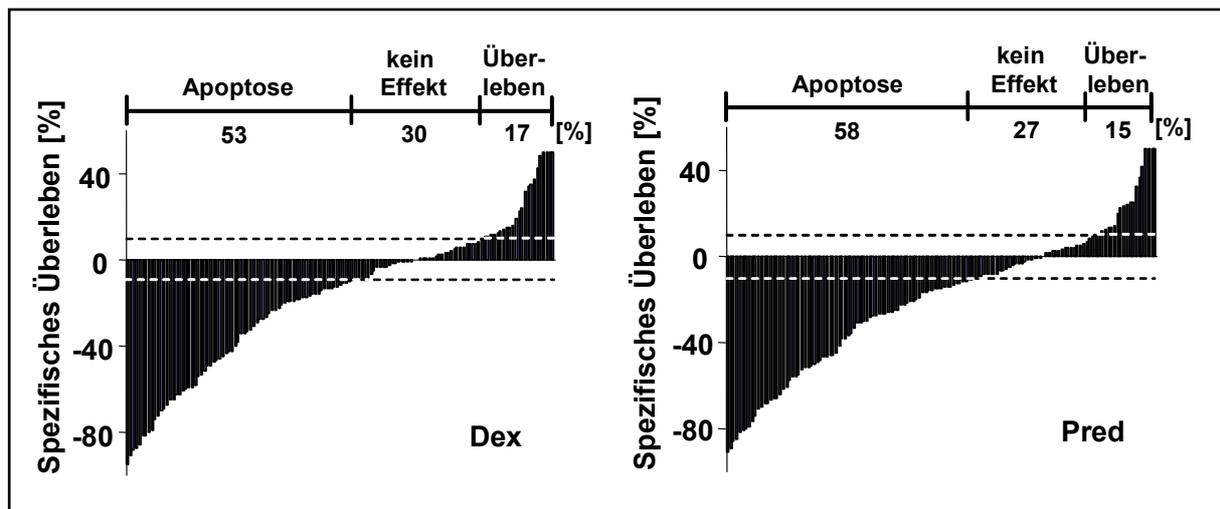


Abb.3.2.1 GC-induzierter Phänotyp primärer Leukämiezellen

139 verschiedene primäre Leukämiezellen wurden mit Dex 10^{-5} M (links) bzw. Pred 10^{-4} M (rechts) stimuliert und nach Erreichen einer spezifischen Apoptoserate von 25% bzw. spätestens nach 96 h die Apoptoserate im forward/side-scatter im Durchflusszytometer bestimmt. Die Eingliederung in die Gruppe „Apoptose“ bzw. „Überleben“ erfolgte per Definition, wenn das GC mehr als 10% spezifische Apoptose bzw. Überleben (gestrichelte Linien) induziert hat; anderenfalls wurden die Proben der Gruppe „kein Effekt“ zugeordnet. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen kalkuliert: $((\text{Apoptoserate GC-stimuliert} - \text{Apoptoserate unstimuliert}) / (100 - \text{Apoptoserate unstimuliert})) \times 100$. Das spezifische Überleben wurde folgendermaßen kalkuliert: $(\text{Spezifische Apoptose}) \times (-1)$. Aufsteigend dargestellt ist das spezifische GC-induzierte Überleben der Tumorzellen.

In Abb.3.2.1 ist das spezifische Überleben (s. 2.2.1.2) der primären Leukämiezellen dargestellt, das durch Dex bzw. Pred induziert wurde. Nur 53% der Dex- und 58% der Pred-behandelten Proben reagierten sensitiv auf GC-induzierte Apoptose, die an dem negativen spezifischen Überleben zu erkennen ist. Der Rest der GC-behandelten Proben, das heißt mehr als 40%, wies den Phänotyp der GC-Resistenz auf. Diese Ergebnisse korrelieren zu bereits publizierten Daten von Zwaan et al., die ebenfalls zeigen, dass in nur etwa 50% der untersuchten primären Leukämiezellen GC-induzierte Apoptose nachgewiesen werden konnte (Zwaan et al., 2000). Das wesentliche Ergebnis aus Abb.3.2.1 ist jedoch die Tatsache, dass in 17% der Dex- und 15% der Pred-behandelten Zellen eine reduzierte Apoptoserate festgestellt

werden konnte. Das heißt, dass die GC in diesem Fall nicht nur keine Apoptose induzierten, sondern das Gegenteil bewirkten und die Überlebensrate der primären Leukämiezellen sogar noch gesteigert haben. Diese Teilmenge an Proben wurde genauer analysiert und ein besonders hervorstechendes Beispiel ist in Abb.3.2.2 dargestellt. Die Probe, die aus peripherem Blut bestand, war von einem 4 ½ Jahre alten Mädchen, bei dem eine c-ALL (common acute lymphoblastic leukemia) diagnostiziert wurde und enthielt 40.000 Leukozyten pro μl . Die Ficoll-isolierten Blasten wurden, wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, *in vitro* mit Dex bzw. Pred stimuliert. Nach 48 h war eine spezifische Apoptoserate von über 25% erreicht, woraufhin die Proben durchflusszytometrisch analysiert wurden. Nach 24 h wurden bereits lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Stimulationsansätze gemacht und die enzymatische Aktivität durch den Verbrauch an ATP ermittelt.

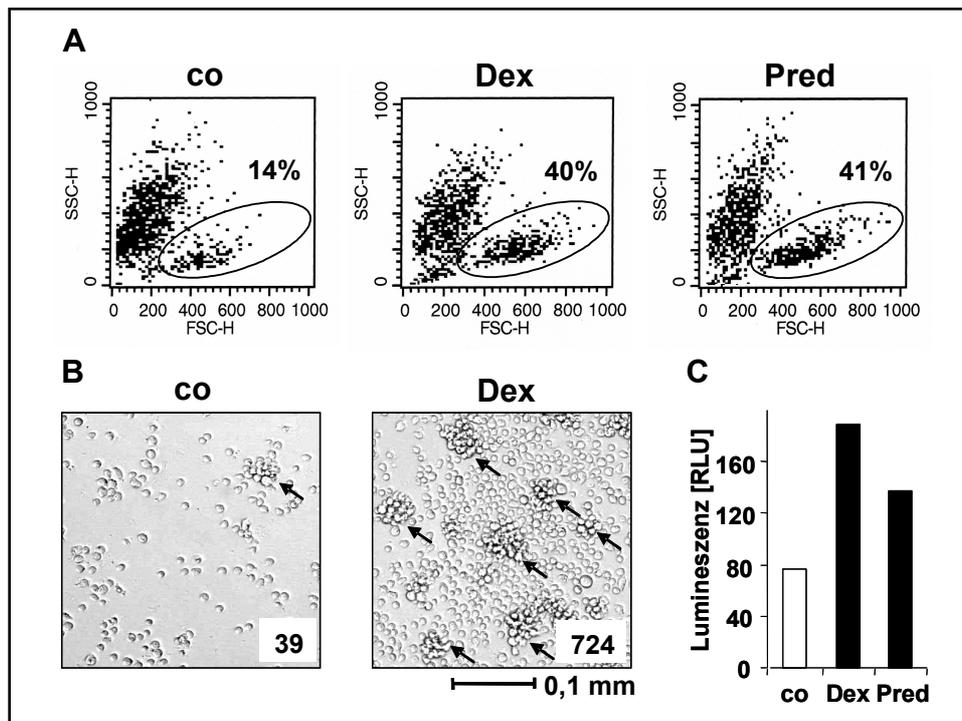


Abb.3.2.2 Glucocorticoid-induzierte Proliferation primärer Leukämiezellen

A, Originaldaten der Probe 114, die mittels Durchflusszytometrie 48 h nach Stimulation erhoben wurden (FSC, Forward-Scatter; SSC, Sideward-Scatter). Zu sehen sind die Kontrollzellen (links) und die mit Dex (10^{-5} M, mittig) bzw. Pred (10^{-4} M, rechts) stimulierten Zellen. Markiert und abgebildet ist der Prozentsatz der lebenden Zellen. **B**, Lichtmikroskopische Aufnahmen der primären Leukämiezellen 24 h nach Stimulation mit Dex bzw. Kontrollzellen. Die Pfeile markieren Kolonien und die Zahl unten rechts entspricht der Gesamtmenge an Kolonien einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte in dem jeweiligen Ansatz, die durch einen unabhängigen Mitarbeiter ermittelt wurde. **C**, ATP-Verbrauch der Kontrollzellen bzw. GC-stimulierten Zellen nach 24 h. Dargestellt ist die Lumineszenz mit der Einheit RLU (relative Lumineszenzeinheit).

In Abb.3.2.2 sind die Originaldaten, die mittels Durchflusszytometrie (A) erhoben wurden und in Abb.3.2.1 zusammengefasst sind, dargestellt. Es ist zu sehen, dass in dieser Probe der Prozentsatz noch lebender Zellen nach 48 h mit 40% für Dex und 41% für Pred im Vergleich zur Kontrolle mit nur 14% deutlich höher lag. Darüber hinaus belegen die lichtmikroskopischen Aufnahmen (B), dass die Probe ungewöhnlicherweise spontane Proliferation und Koloniebildung zeigte. Die Ermittlung der enzymatischen Aktivität der Zellen über den Verbrauch an ATP, bestätigt die Ergebnisse und zeigt eine erhöhte Aktivität in den GC-stimulierten Ansätzen.

Diese Daten belegen, dass durchschnittlich in etwa 15% der GC-stimulierten Proben im Vergleich zu den Kontrollzellen eine niedrigere Apoptoserate festgestellt wurde und darüber hinaus in einer Probe dieser Subpopulation erhöhtes GC-induziertes Tumorzellwachstum detektiert werden konnte.

Die beiden Grafiken in Abb.3.2.1 zeigen die Ergebnisse zweier verschiedener GC und belegen, dass beide GC in diesen Proben den gleichen Effekt auslösen. Um dies noch genauer zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse auf allen Proben des jeweiligen GC durchgeführt.

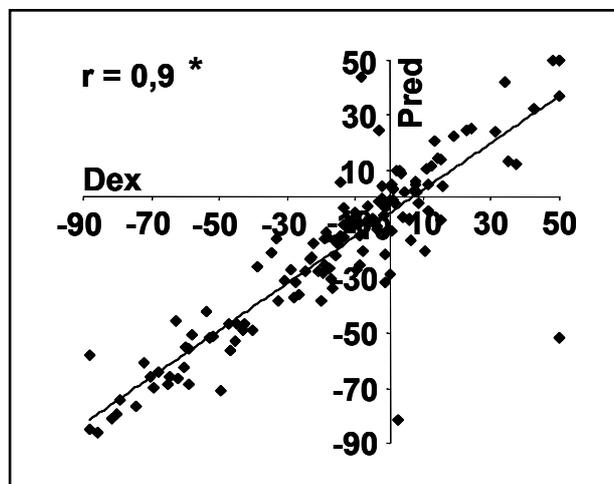


Abb.3.2.3 Korrelationsanalyse der Daten beider Glucocorticoide

Die erhobenen Daten des spezifischen Überlebens der primären Leukämiezellen für Dex (x-Achse) wurden mit den Daten für Pred (y-Achse) korreliert. r = Korrelationskoeffizient; $r > 0,9$ = positive Korrelation. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,001$ und wurde mit dem Pearson Produkt-Momentkorrelation bestimmt.

Die Korrelationsanalyse der erhobenen Daten für Dex und Pred, die in Abb.3.2.3 zu sehen ist, zeigt eine deutlich positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9 und einer sehr hohen statistischen Signifikanz. Dieses Ergebnis

unterstreicht, dass beide GC in den primären Zellen den gleichen Effekt induziert haben.

Um noch detailliertere Informationen aus den erhobenen Daten zu ziehen, wurden diese der jeweiligen Subform der Leukämie zugeordnet. Diese umfassen die akute myeloische Leukämie (AML) und die akute lymphatische Leukämie (ALL), mit deren weiteren Subformen c-ALL (common-ALL), prä-B-ALL (B-lymphozytäre Differenzierung) und T-ALL (T-lymphozytäre Differenzierung). Mit Hilfe einer Kastengrafik (Box-Whisker-Plot) sind die Daten in Abb.3.2.4 dargestellt, wobei jeweils der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte abgebildet wurden.

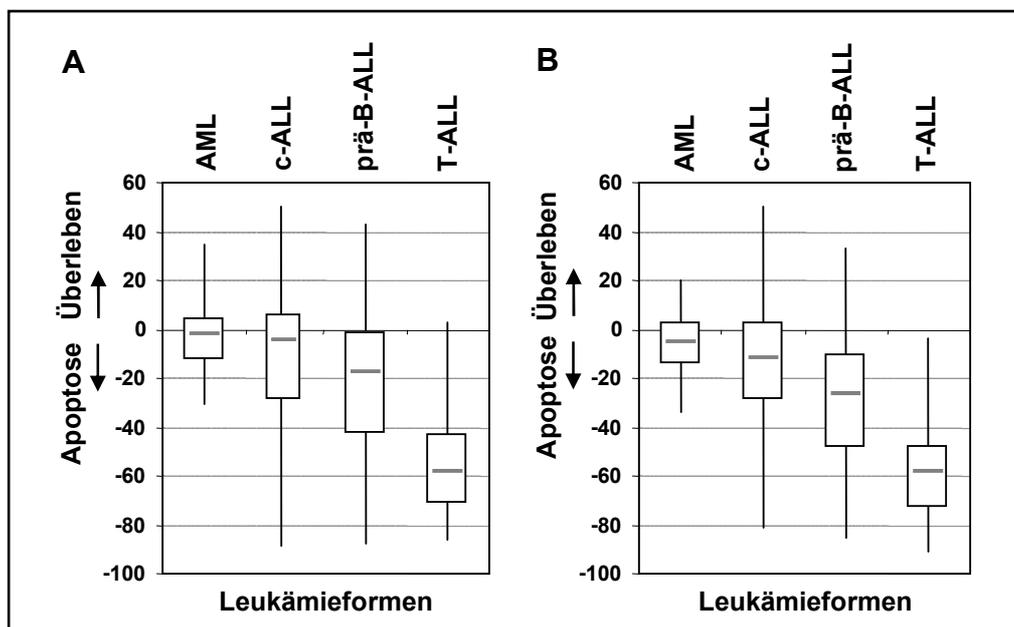


Abb.3.2.4 Kastengrafikanalyse der Phänotypen in verschiedenen Leukämiesubformen

Die Dex (links) bzw. Pred (rechts)-induzierten Phänotypen wurden den verschiedenen Subformen der Leukämie untergeordnet. Dargestellt ist eine Kastengrafik, wo jeweils der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte des spezifischen Überlebens (positiver y-Achsenabschnitt) bzw. der spezifischen Apoptose (negativer y-Achsenabschnitt) für jede Leukämieform zu sehen sind. AML, akute myeloische Leukämie; ALL, akute lymphatische Leukämie; c-ALL, prä-B-ALL, Reifungsgrad der ALL-Zellen; T-ALL, ALL mit T-lymphozytärer Differenzierung.

Aus Abb.3.2.4 geht hervor, dass besonders die AML-Proben resistent gegenüber GC-induzierter Apoptose sind, das an dem Median zu erkennen ist, der bei etwa 0% liegt. Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls zu den von Zwaan et al. publizierten Daten, die zeigen, dass besonders AML Proben, im Vergleich zu ALL, sehr resistent gegenüber GC-induzierter Apoptose sind und nur ca. 15% der untersuchten leukämischen Primärzellen sensitiv auf GC-induzierte Apoptose reagieren (Zwaan et al., 2000). Im Gegensatz zu den AML-Proben, zeigten die T-ALL-Proben die höchste

Sensitivität gegenüber GC-induzierter Apoptose, das an einem Median der spezifischen Apoptose von etwa -60% zu erkennen ist. Dies ist von besonderer klinischer Relevanz, da die Prognose der T-ALL-Patienten relativ schlecht ist und den Daten aus Abb.3.2.4 zufolge der Einsatz von GC in der Tumorthherapie positiv zu sein scheint. Der Median der c-ALL- und prä-B-ALL-Proben zeigt, dass die c-ALL-Proben durchschnittlich resistenter gegenüber GC-induzierter Apoptose waren als die prä-B-ALL-Proben. Das paradoxe Phänomen des GC-induzierten Überlebens der primären Leukämiezellen scheint besonders häufig bei den c-ALL-, aber auch bei den prä-B-ALL-Proben aufzutreten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass GC auch in Tumorzellen hämatopoetischen Ursprungs in etwa 15% der untersuchten Proben in der Lage waren, die Apoptoserate zu reduzieren. Darüber hinaus konnte innerhalb dieser gegenüber GC-induzierter Apoptose resistenten Subpopulation, in einer Probe GC-induzierte Proliferation detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass sich das Problem der anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekte von GC nicht nur auf Zellen solider Tumoren beschränkt, sondern ebenso auf hämatopoetischen Tumorzellen auftreten kann, allerdings in einer niedrigeren Frequenz. Darüber hinaus belegen die Daten, dass das Problem sowohl in etablierten Zelllinien als auch in primären Zellen nachgewiesen werden konnte. Sowohl die *in vitro* und *in vivo* Daten der etablierten Zelllinien solider Tumoren als auch die Daten der primären Leukämiezellen belegen den potentiell anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekt von GC. Die systematische Quantifizierung hat erstmals gezeigt, dass es sich bei der GC-induzierten Proliferation von Tumorzellen um eine sehr häufig auftretende Nebenwirkung handelt. Dies führt zu der Erkenntnis, dass es sich bei diesen GC-induzierten unerwünschten Effekten um ein neues, breit gefächertes Problem handelt.

3.3 Signalmechanismen der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren

In den ersten beiden Teilen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem paradoxen Phänomen der GC-induzierten Proliferation in etablierten Zelllinien solider Tumoren und primären hämatopoetischen Tumorzellen um ein häufiges Problem handelt. Im Folgenden wurden in Zellen solider Tumoren zugrunde liegende Signalmechanismen untersucht, um potentielle Wege zu finden, die GC-induzierte Proliferation zu inhibieren.

3.3.1 Der Glucocorticoidrezeptor

Allgemein werden für die GC-vermittelten Effekte verschiedene potentielle Signalmechanismen postuliert, die sowohl zugrunde liegende GR-abhängige, transkriptionelle als auch GR-unabhängige, unspezifische Wege umfassen (s. Abb.1.3). Demzufolge wurde zunächst die funktionelle Rolle des Glucocorticoidrezeptors (GR) in der GC-induzierten Proliferation untersucht.

3.3.1.1 Rezeptor-Expression und Proliferation

Die einleitenden Untersuchungen konzentrierten sich auf die Expressionsmenge des GR, die zunächst in allen eingesetzten Tumorzelllinien (s. Tab.3.1) ermittelt wurde. Damit sollte zum einen geklärt werden, ob es sich bei dem Phänotyp der Dex-induzierten Proliferation um spezifische, GR-vermittelte oder unspezifische, GR-unabhängige Effekte handelt. Zum anderen sollte analysiert werden, ob eine Korrelation zwischen der Expressionsmenge des GR und dem Einfluss von Dex auf das Tumorzellwachstum besteht.

Unter den in Abschnitt 3.1.2 untersuchten Tumorzelllinien befand sich auch die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP, die bekanntermaßen keinen GR exprimiert (Nishimura et al., 2001). Um dies zu bestätigen, wurde die Expression des GR mittels Western Blot Analysen und anschließender Immundetektion analysiert. Der Einfluss von Dex auf das Tumorzellwachstum wurde mittels repetitiver Mikroskopie über 96 h ermittelt.

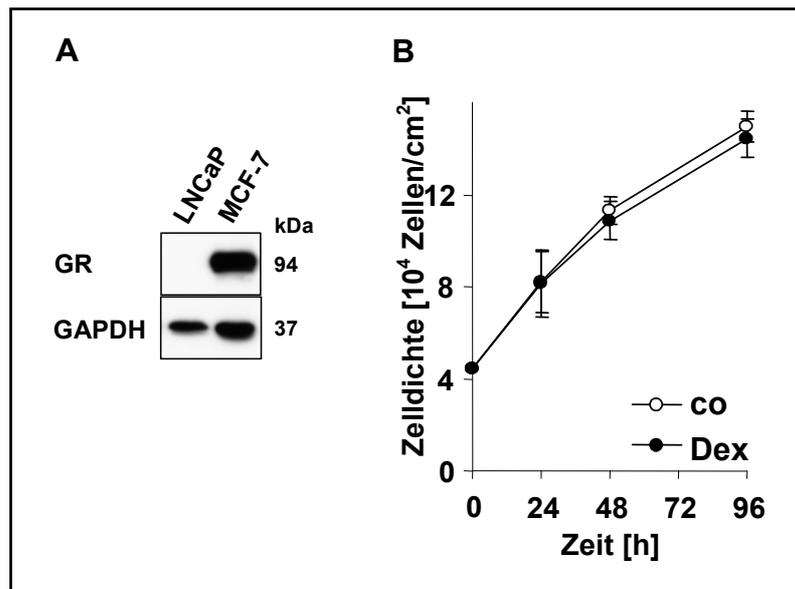


Abb.3.3.1 Einfluss von Dexamethason auf Tumorzellwachstum GR-negativer LNCaP Zellen

A Die Proteine aus dem Lysat von GR-negativen LNCaP und GR-positiven MCF-7 Zellen (Positivkontrolle) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. **B** LNCaP Zellen wurden mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS (co) stimuliert und das Tumorzellwachstum mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie über 96 h dokumentiert. In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Abb.3.3.1 zeigt, dass LNCaP Zellen erwartungsgemäß keinen GR exprimieren (A) und dass Dex auch über den langen Zeitraum von 96 h keinen Einfluss auf das Tumorzellwachstum hatte (B). Die Zelldichte der Dex-stimulierten Zellen ist im Vergleich zu den Kontrollzellen nahezu unverändert.

Das Ergebnis belegt, dass im Fall der LNCaP Zellen kein GR-unabhängiger, unspezifischer GC-induzierter Effekt auf das Proliferationsverhalten vorliegt. Dies lässt vermuten, dass dem GR eine tragende Rolle beim GC-induzierten Tumorzellwachstum zukommt und es sich nicht um unspezifische, GC-vermittelte Effekte handelt.

Im Folgenden wurde die Expressionsmenge aller weiteren untersuchten Zelllinien mittels Western Blot Analysen und anschließender Immundetektion analysiert.

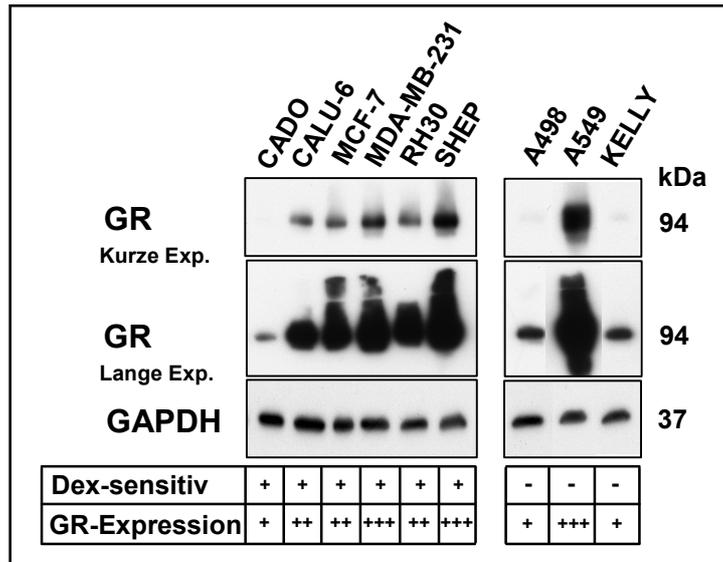


Abb.3.3.2 Unterschiedliche Expression des GR in den untersuchten Zelllinien

Alle untersuchten Zelllinien wurden einer Lyse unterzogen (10^6 Zellen) und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. Es ist sowohl ein Film mit kurzer (Kurze Exp.), als auch einer mit längerer (Lange Exp.) Expositionszeit abgebildet, um auch eine schwache Expression des GR nachweisen zu können. Die gegenüber Dex-induzierter Proliferation sensitiven Zellen (+) sind im linken Abschnitt dargestellt, die insensitiven (-) im rechten Abschnitt. Die Expression des GR wurde visuell quantifiziert (+ = wenig GR, ++ = viel GR, +++ = sehr viel GR).

Aus Abb.3.3.2 ist ersichtlich, dass die Expressionsmenge des GR in den untersuchten Tumorzelllinien sehr unterschiedlich ist, wobei hier nicht zwischen den Isoformen $GR\alpha$ und $GR\beta$ unterschieden wurde. Die Zelllinien CADO, A498 und KELLY zeigen die geringste Expression des GR, die erst nach längerer Expositionszeit des Röntgenfilms detektierbar ist. Hingegen weisen die Zelllinien MDA-MB-231, SHEP und A549 die deutlichste Expression des GR auf. Allerdings scheint keine Korrelation zwischen GR-Expression und Sensitivität gegenüber Dex-induzierter Proliferation zu bestehen. Beispielsweise exprimiert die Zelllinie A549 sehr viel GR, zeigte jedoch in der repetitiven Mikroskopie keine Dex-induzierte Proliferation.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Menge an exprimiertem GR keinen direkten Einfluss auf den GC-induzierten Phänotyp hat und demzufolge keine Rückschlüsse von der Expressionsmenge des GR auf den GC-induzierten Phänotyp möglich sind.

3.3.1.2 Aktivierung des Rezeptors

Die Ergebnisse der vorigen Abschnitte lassen vermuten, dass dem GR eine tragende Rolle beim GC-induzierten Tumorzellwachstum zukommt und es sich nicht um unspezifische, GR-unabhängige Effekte handelt. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurde der Aktivierungszustand des Rezeptors nach Stimulation mit Dex anhand der Phosphorylierung am Serinrest 211 (Ser211) analysiert.

Hierzu wurden MCF-7 Zellen zum einen für unterschiedlich lange Dauer und zum anderen in verschiedenen Konzentrationen mit Dex stimuliert. Die spezifische Phosphorylierung des GR an Ser211 wurde mittels Western Blot Analysen und anschließender Immundetektion analysiert.

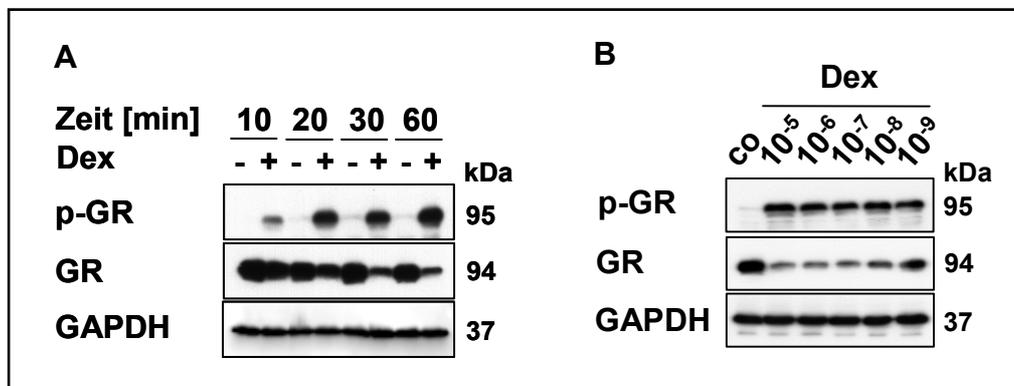


Abb.3.3.3 Dexamethason-induzierte Aktivierung des GR

A MCF-7 Zellen wurden mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS stimuliert und nach abgebildeten Zeitpunkten lysiert. **B** MCF-7 Zellen wurden 4 h mit verschiedenen Konzentrationen Dex (10^{-5} - 10^{-9} M) stimuliert und anschließend lysiert. **A,B** Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Wie in Abb.3.3.3 (A) zu sehen ist, liegt der GR bereits wenige Minuten nach Stimulation mit Dex phosphoryliert vor. Die spezifische Phosphorylierung des GR an Ser211 ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert und stellt demzufolge einen Marker für transkriptionelle Aktivität dar (Chen et al., 2008). Die Menge an unphosphoryliertem GR nimmt parallel zur zunehmenden Phosphorylierung ab. Der hierfür verwendete Antikörper bindet genau an das Epitop am GR, wo sich der Ser211-Rest befindet. Daher kann dieser Antikörper nach Phosphorylierung an Ser211 nicht mehr an das Epitop binden und zeigt somit die Menge an noch unphosphoryliertem GR an. Darüber hinaus wird der GR ubiquitinyliert und daraufhin proteosomal abgebaut (Zhou und Cidlowski, 2005), was auch zu einer Abnahme der Gesamtproteinmenge führen kann. In Abb.3.3.3 (B) ist zu erkennen, dass der GR selbst in nanomolaren Dex-Konzentrationen noch deutlich phosphoryliert und somit aktiviert wird.

Diese Daten belegen, dass der GR bereits wenige Minuten nach GC-Stimulation aktiviert vorliegt. Die spezifische Phosphorylierung an Ser211, die als Marker für transkriptionelle Aktivität des Rezeptors gilt, lässt vermuten, dass es sich um spezifische GR-abhängige, transkriptionelle Effekte handelt.

Im nächsten Schritt wurde anhand einer Kinetik untersucht, ob die Aktivierung des GR nach einmaliger Stimulation mit Dex über 24 h andauert. Hierzu wurden ebenfalls MCF-7 Zellen und darüber hinaus auch RH-30, MDA-MB-231 und CALU-6 Zellen über 24 h mit Dex stimuliert und nach unterschiedlich langen Zeitabschnitten lysiert. Die spezifische Phosphorylierung des GR an Ser211 wurde mittels Western Blot Analysen und anschließender Immundetektion analysiert.

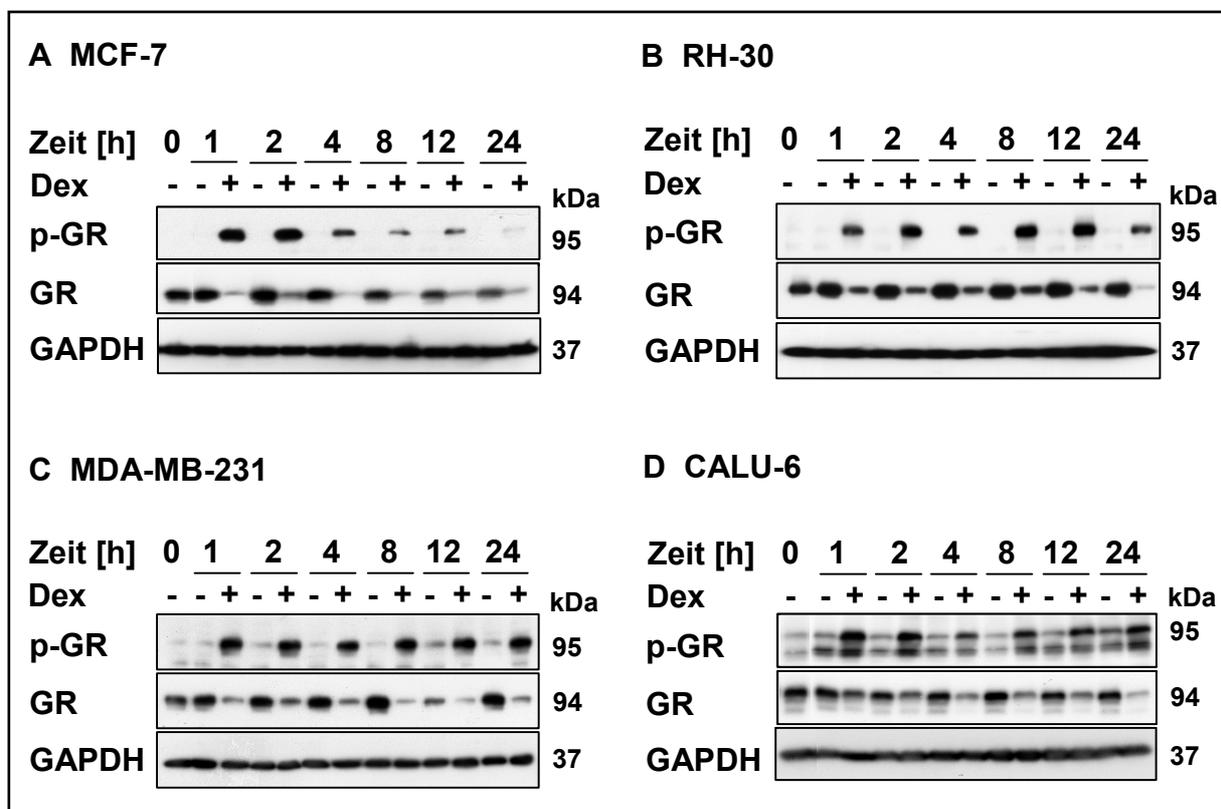


Abb.3.3.4 Dexamethason-induzierte Aktivierung des GR

A MCF-7, **B** RH-30, **C** MDA-MB-231 und **D** CALU-6 Zellen wurden mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS stimuliert und nach abgebildeten Zeitpunkten lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Die Abb.3.3.4 bestätigt eine Aktivierung des GR in allen 4 untersuchten Zelllinien. Der GR zeigt bereits 1 h nach Stimulation mit Dex Phosphorylierung an Ser211, die auch bis zu 24 h lang stabil detektierbar bleibt. Hingegen nimmt die Menge an unphosphoryliertem GR analog dazu ab.

Diese Daten belegen, dass der GR in allen 4 untersuchten Zelllinien nach Stimulation mit Dex phosphoryliert und somit aktiviert vorliegt. Die Phosphorylierung erfolgt bereits nach wenigen Minuten, ist über einen Mindestzeitraum von 24 h stabil und selbst durch nanomolare GC-Konzentrationen noch induzierbar. Die spezifische Phosphorylierung des GR an Ser211, die vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist, lässt transkriptionelle Aktivität vermuten.

3.3.1.3 Funktionelle Bedeutung des Rezeptors für die Proliferation

Nachdem die Dex-induzierte Aktivierung des GR nachgewiesen werden konnte, wurde im weiteren Verlauf die funktionelle Bedeutung des GR für die Dex-induzierte Proliferation untersucht. Dies erfolgte durch Herunterregulation der GR-Expression mittels RNA-Interferenz, mit anschließender Dex-Stimulation und Analyse des Tumorzellwachstums anhand repetitiver Mikroskopie.

Für die Untersuchungen wurden zwei repräsentativen Zelllinien, die epitheliale Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und die mesenchymale Rhabdomyosarkomzelllinie RH-30 eingesetzt. Beide Zelllinien haben einen sehr stabilen Phänotyp der Dex-induzierten Proliferation aufgewiesen und entstammen einer unterschiedlichen Tumorentität. Die siRNA (small interfering RNA) wurde mittels Lipofektion in die Zellen eingeschleust und zur Kontrolle bzw. Optimierung der Transfektionseffizienz wurde eine siRNA eingesetzt, die an keine bekannte humane Sequenz bindet. Durch eine Fluoreszenzmarkierung der Kontroll-siRNA mit AlexaFluor488 (AF488) war es möglich, den prozentualen Anteil an transfizierten Zellen bereits 4 h nach Transfektion im Durchflusszytometer zu ermitteln. Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen, um überstehende, nicht in die Zellen eingeschleuste, siRNA-Moleküle zu entfernen, welche die Ergebnisse der Transfektionseffizienz verfälscht hätten.

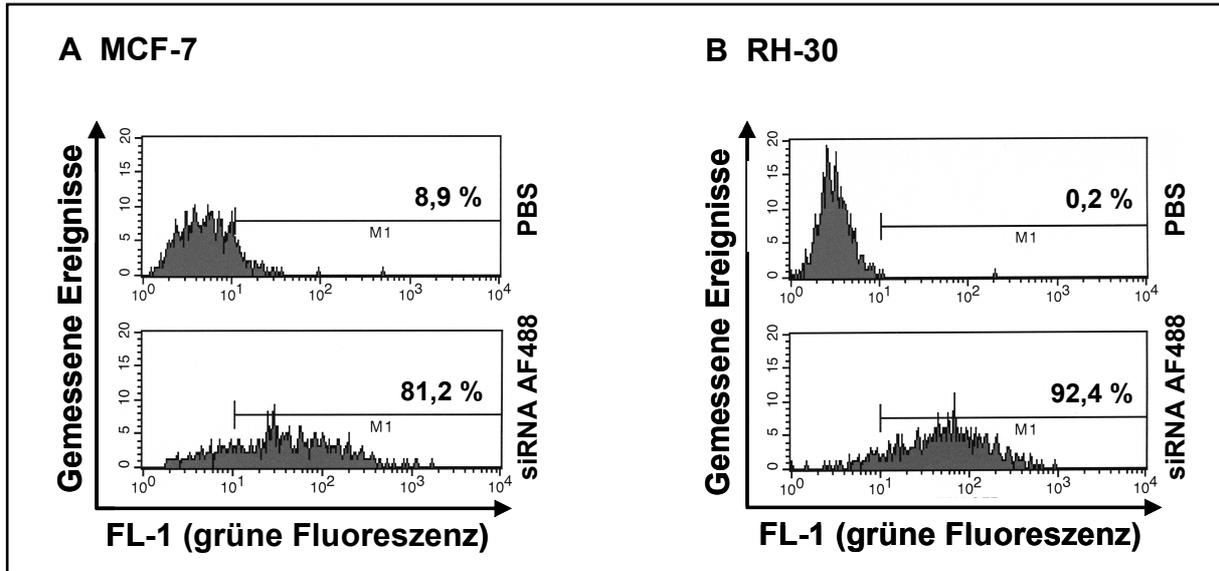


Abb.3.3.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Kontroll-siRNA AF488

A MCF-7 bzw. **B** RH-30 Zellen wurden transient mit einer unspezifischen Fluoreszenzmarkierten (Alexa Fluor 488) Kontroll-siRNA (siRNA AF 488) in einer Endkonzentration von 5 nM bzw. PBS mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Nach 4 h wurden die Zellen pelletiert, 2 Mal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Die Transfektionseffizienz wurde durchflusszytometrisch durch Messung der grünen Fluoreszenz im Kanal FL-1 bestimmt und ist in den Diagrammen prozentual abgebildet.

Die Abb.3.3.5 zeigt, dass die Transfektionseffizienz beider Zelllinien im Vergleich zu den PBS-transfizierten Kontrollzellen bei 80-90 % lag, die für weitere Experimente als ausreichend hoch betrachtet wurde. Eine hohe Transfektionseffizienz ist nötig, da untransfizierte Zellen die Auswertbarkeit stören.

Nach erfolgreicher transienter Transfektion der Kontroll-siRNA mittels Lipofektion wurden die beiden Zelllinien daraufhin mit einer GR-spezifischen siRNA transfiziert. Die Effizienz der Herunterregulation der GR-Expression wurde auf Ebene der RNA mit Hilfe von quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) und auf Ebene der Proteine mit Hilfe von Western Blot Analysen und Immundetektion überprüft. Für die qRT-PCR wurde der Light Cycler 480 (LC480, Roche) eingesetzt, der sehr hohe Sensitivität aufweist und besonders für den Einsatz von fluorogenen Hybridisierungssonden geeignet ist. Es wurden fluorogene Hybridisierungssonden aus der Universal Probe Library (UPL, Roche) verwendet. Zur Validierung der Qualität der qRT-PCR im LC480 und zur Ermittlung der optimalen cDNA-Verdünnung für präzise Messungen, wurde zunächst nur aus MCF-7 Zellen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mit 4 cDNA-Verdünnungen, jeweils in Triplikaten, eine qRT-PCR mit Gen-spezifischen DNA-Sonden durchgeführt. Die fluorogenen Hybridisierungssonden lieferten während der Amplifikation des

entsprechenden Genabschnittes ein Emissionssignal, das im LC480 quantitativ detektiert wurde.

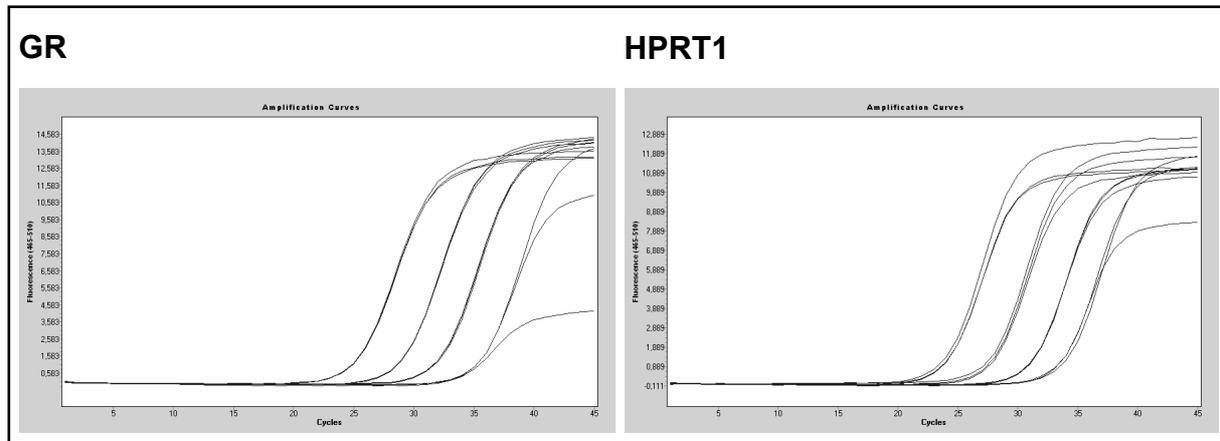


Abb.3.3.6 Etablierung der qRT-PCR mittels UPL-System im LC480

Aus 10^6 MCF-7 Zellen wurde die RNA isoliert und aus 1 μ g RNA cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt als Template eingesetzt. Des Weiteren wurden sequenzspezifische Primerpaare und fluorogene Hybridisierungssonden aus der UPL zugegeben. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt, die in den Diagrammen, die mit der LC480 Software erstellt wurden, als Einzelkurven dargestellt sind.

In Abb.3.3.6 sind die einzelnen Kurven der jeweiligen Triplikate aller 4 cDNA-Verdünnungen dargestellt. Es wurden zwei verschiedene Hybridisierungssonden zusammen mit den spezifischen Primern eingesetzt. Eine spezifisch für das zu untersuchende Zielgen GR (links) und eine weitere spezifisch für das Referenzgen HPRT1 (rechts). Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass die C_p -Werte der einzelnen Triplikate eine sehr hohe Reproduzierbarkeit zeigen und dass ab einer Verdünnung von 1:10.000 die Messungen ungenau werden. Die Negativkontrolle, die anstelle von cDNA H_2O enthielt, lieferte erwartungsgemäß kein Signal.

Die Daten belegen, dass der LC480 sehr hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufweist. Infolgedessen wurden alle weiteren Experimente unter denselben Konditionen durchgeführt und eine cDNA-Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

Nach Ermittlung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenz-markierter Kontroll-siRNA und Validierung der qRT-PCR, wurden zunächst MCF-7 Zellen mit GR-spezifischer siRNA mittels Lipofektion transfiziert. Dabei wurden dieselben optimierten Konditionen aus den Vorversuchen angewendet, das heißt in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen. Anschließend wurden jeweils 8 Vertiefungen vereinigt, was ungefähr einer Zellzahl von 10^5 Zellen zum Versuchsende entsprach

und daraufhin genug Material für die Isolation der RNA zur Verfügung stand. Die Effizienz der Herunterregulation der GR-Expression wurde auf Ebene der Proteine mit Hilfe von Western Blot Analysen und Immundetektion und auf Ebene der RNA mit Hilfe von qRT-PCR überprüft.

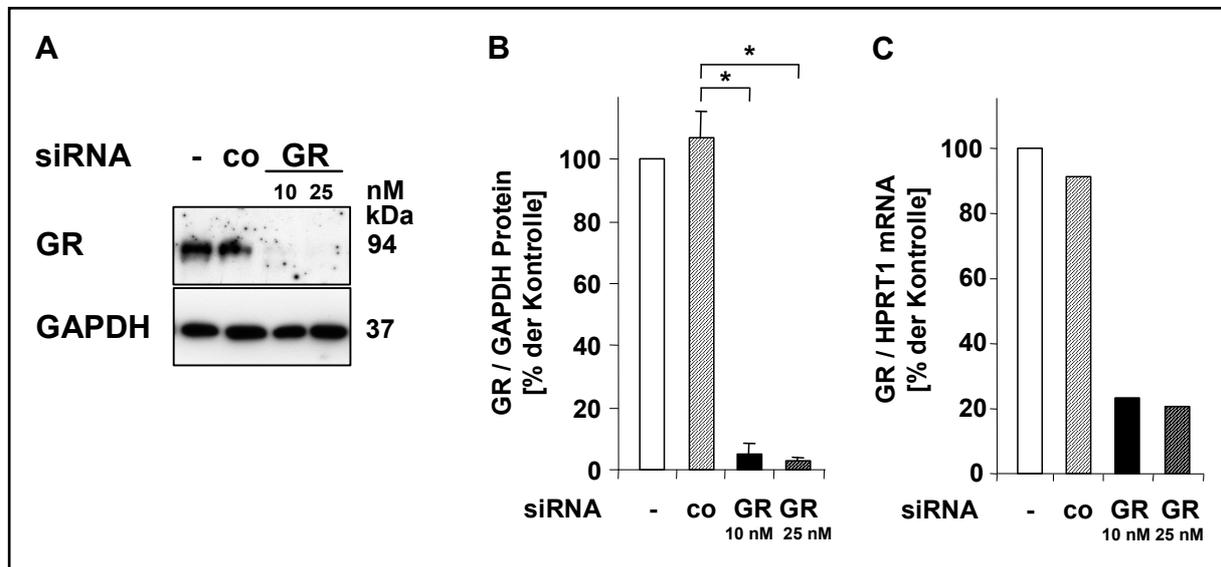


Abb.3.3.7 Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden 4 h transient mit einer sequenzspezifischen siRNA gegen den GR in 2 verschiedenen Konzentrationen (10, 25 nM) bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA (co, 5 nM) mit Lipofectamine 2000 transfiziert. (-) bedeutet parentale Zellen. **A** Nach 24 h wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert und lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. **B** In drei unabhängigen Experimenten wurde die Proteinexpression quantifiziert und versus GAPDH normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem mittleren Fehler der normalisierten Menge an Protein, prozentual zur Proteinmenge parentaler MCF-7 Zellen, die als 100 % gesetzt wurde. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt. **C** Nach 12 h wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert. Daraus wurde die RNA isoliert und je 0,5 μ g RNA zu cDNA synthetisiert, die 1:10 verdünnt als Template eingesetzt wurde. Nach erfolgter PCR im LC480 mit sequenzspezifischen Primerpaaren und fluorogenen Hybridisierungssonden wurde eine einfache relative Quantifizierung durchgeführt. Als Referenzgen wurde HPRT1 herangezogen. Dargestellt ist die normalisierte Menge an mRNA, prozentual zu parentalen MCF-7 Zellen, die als 100 % gesetzt wurde.

Nach erfolgter Optimierung der Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz durch GR-spezifische siRNA wurde in MCF-7 Zellen eine Effizienz von 80-90 % erreicht, was in Abb.3.3.7 sowohl aus dem repräsentativen Western Blot (A) als auch aus der Quantifizierung der Proteinexpression (B) und der mRNA-Menge (C) hervorgeht. Diese Konditionen wurden als ausreichend für die Untersuchung der funktionellen Rolle des GR mittels repetitiver Mikroskopie betrachtet und für weitere Versuche mit MCF-7 Zellen angewendet.

Zunächst wurden jedoch auch RH-30 Zellen zur Herunterregulation des GR mittels GR-spezifischer siRNA unter denselben Konditionen transfiziert. Obwohl im Fall der RH-30 Zellen direkt unter den optimierten Konditionen, das heißt in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit anschließender Vereinigung von 8 Vertiefungen, durchgeführt wurde, lag die Transfektionseffizienz bei nur etwa 40%. Da trotz Erhöhung der siRNA-Konzentration die Effizienz nicht gesteigert werden konnte, wurden RH-30 Zellen 24 h nach der ersten Transfektion repetitiv transfiziert. Die Effizienz der Herunterregulation der GR-Expression wurde ebenso auf Ebene der Proteine mit Hilfe von Western Blot Analysen und Immundetektion und auf Ebene der RNA mit Hilfe von qRT-PCR überprüft.

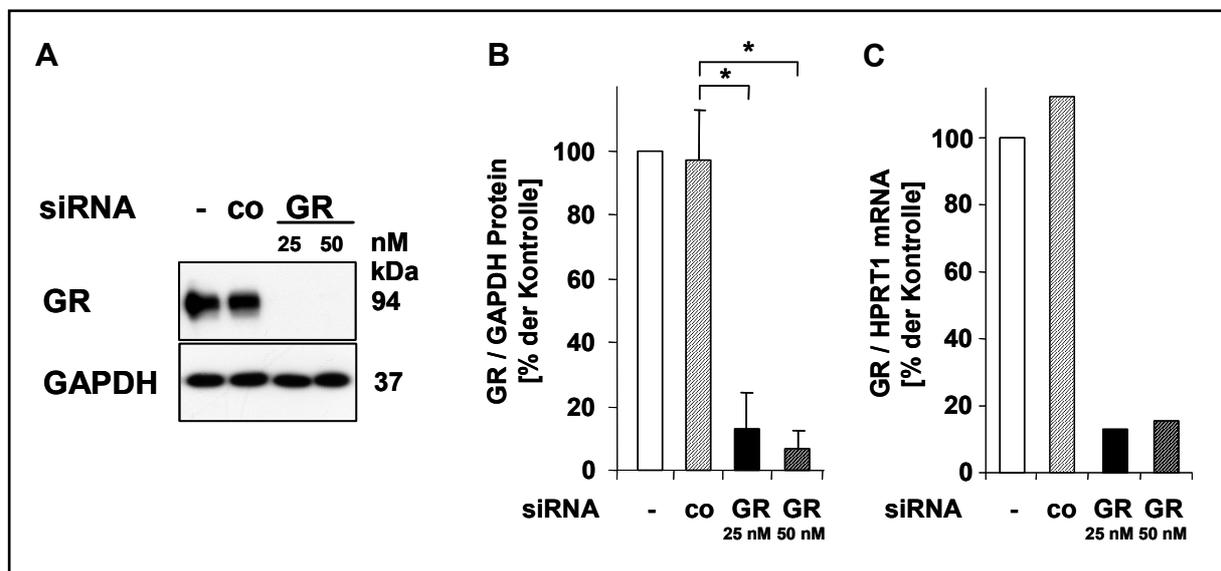


Abb.3.3.8 Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz in RH-30 Zellen

RH-30 Zellen wurden 4 h transient mit einer sequenzspezifischen siRNA gegen den GR in 2 verschiedenen Konzentrationen (25, 50 nM) bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA (co, 5 nM) mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Nach 24 h wurde repetitiv 4 h transient mit siRNA gegen den GR transfiziert. **A** Nach weiteren 24 h wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert und lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. **B** In drei unabhängigen Experimenten wurde die Proteinexpression quantifiziert und versus GAPDH normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem mittleren Fehler der normalisierten Menge an Protein, prozentual zur Proteinmenge in untransfizierten RH-30 Zellen, die als 100 % gesetzt wurde. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt. **C** Nach weiteren 12 h wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert. Daraus wurde die RNA isoliert und je 0,5 µg RNA zu cDNA synthetisiert, die 1:10 verdünnt als Template eingesetzt wurde. Nach erfolgter PCR im LC480 mit sequenzspezifischen Primerpaaren und fluorogenen Hybridisierungssonden wurde eine einfache relative Quantifizierung durchgeführt. Als Referenzgen wurde HPRT1 herangezogen. Dargestellt ist die normalisierte Menge an mRNA, prozentual zu untransfizierten RH-30 Zellen, die als 100 % gesetzt wurde.

Aus Abb.3.3.8 geht hervor, dass die Herunterregulation des GR in RH-30 Zellen, nach repetitiver transienter Transfektion, bei über 90% lag. Dies belegen sowohl der repräsentative Western Blot (A) als auch die Quantifizierung der Proteinexpression (B) und der mRNA-Menge (C) Diese Konditionen wurden als ausreichend für die Untersuchung der funktionellen Rolle des GR mittels repetitiver Mikroskopie betrachtet und für weitere Versuche mit RH-30 Zellen angewendet.

Nach dieser erfolgten Optimierung des Transfektionsprotokolls für beide Zelllinien, war es nun möglich, unter Bedingungen mit hoher Effizienz der Herunterregulation des GR, funktionelle Analysen durchzuführen.

Hierfür wurden MCF-7 und RH-30 Zellen, unter den jeweils optimierten Konditionen, transient mit GR-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Dex stimuliert und das Tumorzellwachstum mittels repetitiver Mikroskopie über 48 h dokumentiert.

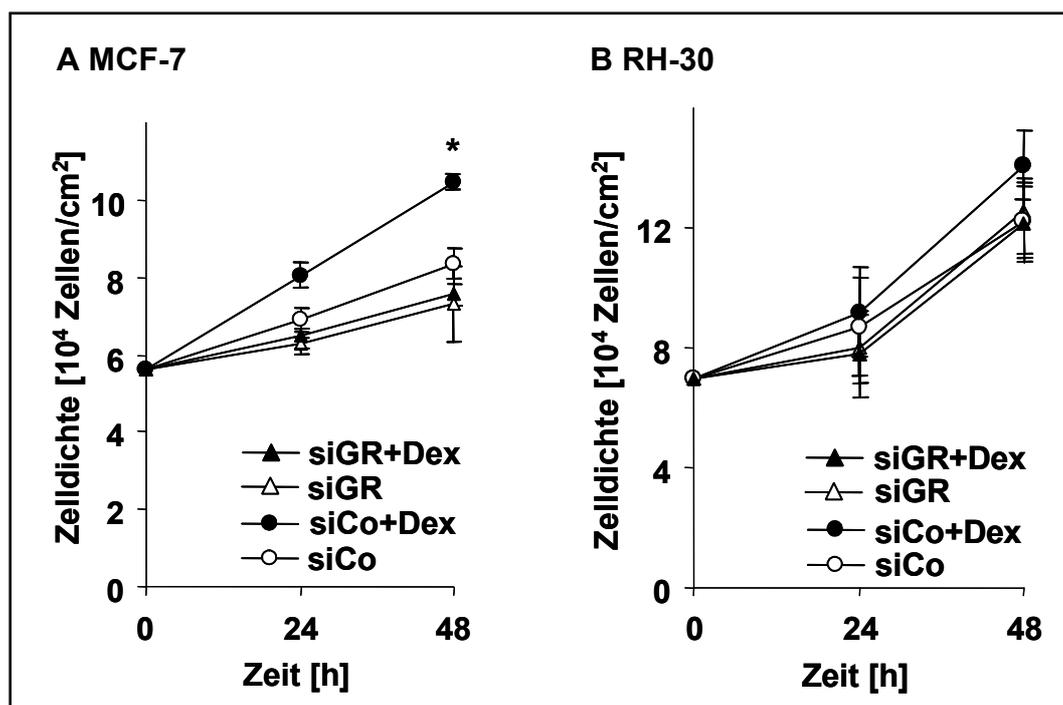


Abb.3.3.9 Inhibition der Dex-induzierten Proliferation mittels GR-spezifischer siRNA

MCF-7 Zellen (A) und RH-30 Zellen (B) wurden 4 h transient mit einer sequenzspezifischen siRNA gegen den GR in der Konzentrationen 25 nM (siGR) bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siCo, 5 nM) mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Nach 24 h wurden RH-30 Zellen repetitiv 4 h transient mit siRNA gegen den GR transfiziert. Danach wurden die Zellen mit Dex (10^{-5} M) stimuliert und das Tumorzellwachstum mittels repetitiver Mikroskopie über 48 h dokumentiert. In den Diagrammen sind jeweils die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.3.9 zeigt die funktionellen Daten, die mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie erhoben wurden. Daraus ist ersichtlich, dass die Herunterregulation des GR, sowohl in MCF-7 (A) als auch RH-30 Zellen (B), das Dex-induzierte Tumorzellwachstum inhibiert. Dex ist nicht mehr in der Lage, in den mit GR-spezifischer siRNA behandelten Zellen beschleunigtes Tumorzellwachstum zu induzieren. Dagegen ist in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen der Phänotyp der Dex-induzierten Proliferation in beiden Zelllinien weiterhin deutlich zu sehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten aus Kapitel 3.3.1 darauf hindeuten, dass dem GR eine tragende Rolle in der Dex-induzierten Proliferation zukommt und es sich nicht um unspezifische, GR-unabhängige Effekte handelt. Die spezifische Phosphorylierung des GR an Ser211 erfolgte bereits nach wenigen Minuten und war über einen Zeitraum von mindestens 24 h stabil detektierbar. Die Phosphorylierung an Ser211, die als Marker für Kernlokalisierung dient, lässt transkriptionelle Aktivität vermuten. Selbst nanomolare Dex-Konzentrationen führten noch zu einer Aktivierung des GR. Darüber hinaus zeigten die funktionellen Daten, die mittels repetitiver Mikroskopie erhoben wurden, dass die Herunterregulation des GR zu einer Inhibition des Dex-induzierten Tumorzellwachstums führte. Dies belegt die funktionelle Rolle des GR für die Dex-induzierte Proliferation in Zellen solider Tumoren.

3.3.2 Die Proteinkinasen B/Akt und p38-MAPK

Nachdem gezeigt werden konnte, dass dem GR eine funktionelle Bedeutung bei der GC-induzierten Proliferation von Zellen solider Tumoren zukommt, stellte sich darüber hinaus die Frage, welche weiteren Signalwege für den paradoxen Effekt verantwortlich sind. Dabei wurde der Schwerpunkt auf Signalwege gelegt, die überwiegend für die Induktion von Überleben und Proliferation bekannt sind. Aufgrund vereinzelter Publikationen, die GC-induzierte Aktivierung von Proteinkinase B/Akt (Akt) in Endothelzellen (Hafezi-Moghadam et al., 2002) bzw. Aktivierung von p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) in Kardiomyozyten (Kewalramani et al., 2008) gezeigt haben, wurde der Fokus auf diese beiden Proteinkinasen gelegt. Folglich wurde untersucht, ob es im Zuge der GC-Stimulation zu einer Aktivierung der beiden Kinasen kommt und welche funktionelle Rolle ihnen in der GC-induzierten Proliferation von Zellen solider Tumoren zukommt.

3.3.2.1 Aktivierung der Kinasen

Die Proteinkinasen Akt und p38-MAPK werden durch Phosphorylierung aktiviert und führen im weiteren Verlauf der Signalkaskade zur Phosphorylierung ihrer jeweiligen Zielmoleküle. Für Akt wurde als klassisches Zielprotein die Glykogen-Synthase-Kinase-3 α/β (GSK-3 α/β) herangezogen und für p38-MAPK das Hitzeschockprotein 27 (Hsp27).

Als repräsentative Zelllinie wurden erneut MCF-7 Zellen herangezogen, die im Rahmen einer Kinetik über 24 h mit Dex stimuliert und nach unterschiedlich langen Zeitabschnitten lysiert wurden. Der Aktivierungszustand der beiden Signalwege wurde mittels Western Blot Analysen und anschließender Immundetektion mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern untersucht.

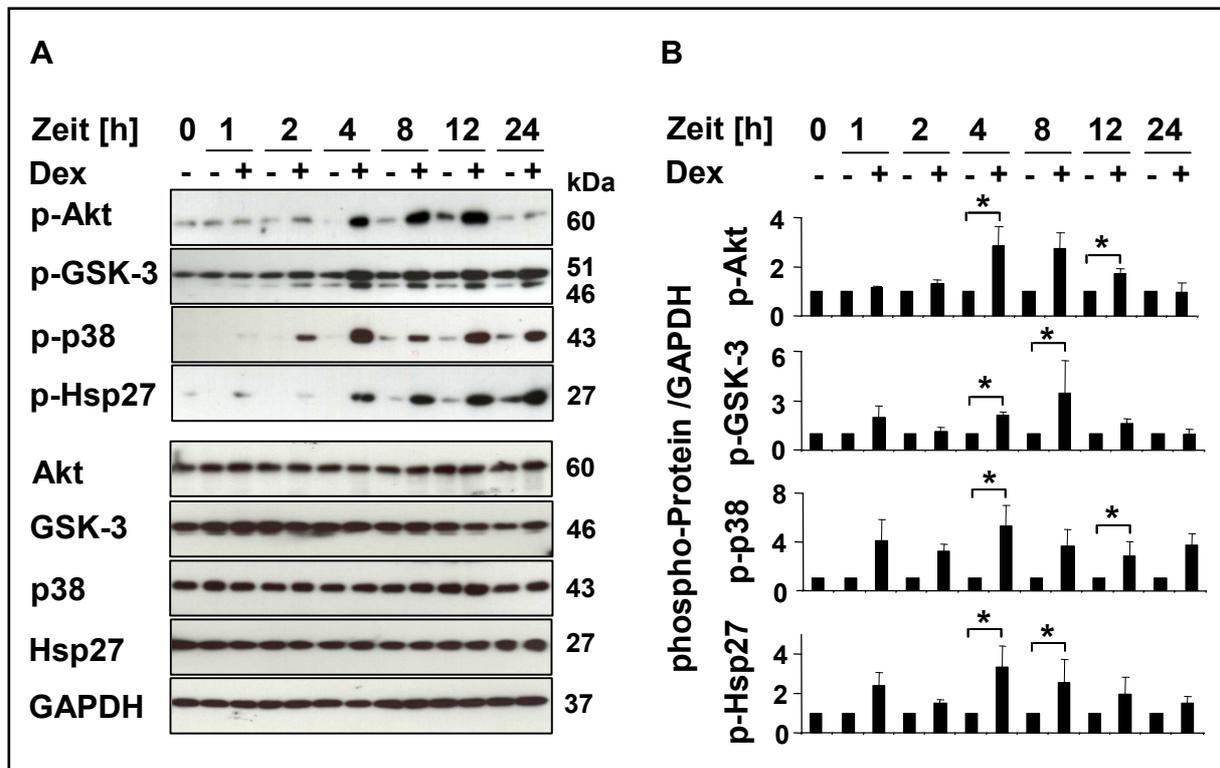


Abb.3.3.10 Dexamethason-induzierte Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS stimuliert und nach abgebildeten Zeitpunkten lysiert. **A** Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. **B** In drei unabhängigen Experimenten wurde die Menge an phosphoryliertem Protein quantifiziert und vs. GAPDH normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit mittlerem Fehler der normierten phospho-Protein Menge relativ zur Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes, die als 1 gesetzt wurde. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die repräsentativen Western Blots in Abb.3.3.10 (A) zeigen, dass sowohl die Proteinkinasen Akt und p38-MAPK als auch die jeweiligen Zielproteine GSK-3 α/β und Hsp27, nach Stimulation mit Dex phosphoryliert vorliegen. Nach 2 bzw. noch deutlicher nach 4 h ist eine Phosphorylierung aller 4 untersuchten Proteine detektierbar, die auch über einen Zeitraum von 12 bis 24 h stabil bleibt. Das heißt die Phosphorylierungsmuster aller 4 Proteine, die durch Dex induziert werden, sind vergleichbar. Die Gesamtmenge an Protein, die mit einem Antikörper detektiert wurde, der sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes Protein detektiert, veränderte sich in dem untersuchten Zeitraum bei allen Proteinen nicht. Diese Kinetik wurde dreimal in unabhängigen Experimenten reproduziert, mit Hilfe der AIDA Software quantifiziert und vs. GAPDH normiert. In der Grafik in Abb.3.3.10 (B) ist die Quantifizierung dargestellt und man kann daraus ablesen, dass durchschnittlich nach 4 bzw. 8 h die Menge an phosphoryliertem Protein und somit die Aktivierung der Signalwege um Akt und p38-MAPK maximal war.

Die Daten belegen, dass es nach Stimulation mit Dex zu einer Aktivierung beider Kinasen und deren Signalwege kommt. Dies konnte mittels Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die etwas verzögerte, im Durchschnitt erst nach etwa 4 h auftretende Phosphorylierung, lässt vermuten, dass es sich bei der Aktivierung der beiden Signalwege um einen indirekten Weg handelt.

3.3.2.2 Funktionelle Bedeutung der Kinasen für die Proliferation

Im vorhergehenden Abschnitt konnte die Dex-induzierte Phosphorylierung der beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK und die Aktivierung deren Signalwege gezeigt werden. Um die funktionelle Bedeutung der Kinasen, die bekanntlich für Überleben und Proliferation verantwortlich sein können, für die Dex-induzierte Proliferation zu untersuchen, wurden die beiden Signalwege in MCF-7 Zellen biochemisch inhibiert.

Für die Proteinkinase Akt wurde der spezifische Akt-Inhibitor VIII verwendet, der an die Pleckstrin-homology-(PH) Domäne von Akt bindet, wodurch die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt gehemmt wird. MCF-7 Zellen wurden 1 h mit dem Inhibitor vorinkubiert und anschließend weitere 48 h mit Dex stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde mittels repetitiver Mikroskopie analysiert und die Funktionalität des Inhibitors mittels Western Blot Analyse und anschließender Immundetektion überprüft.

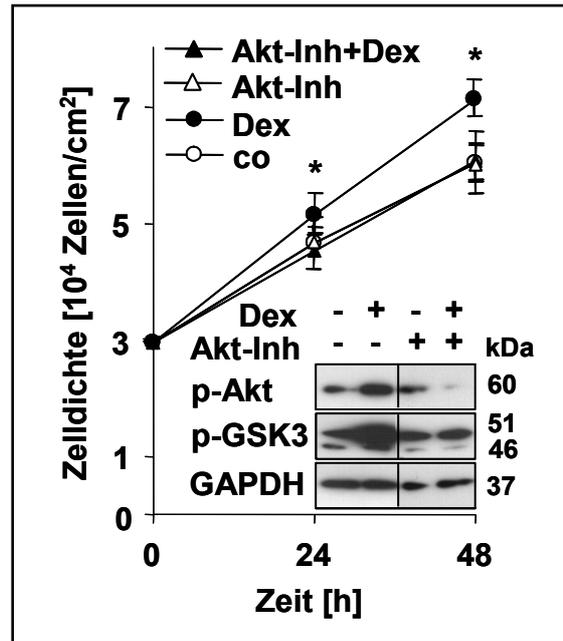


Abb.3.3.11 Inhibition der Dexamethason-induzierten Proliferaton durch Akt-Inhibitor

MCF-7 Zellen wurden 1 h mit Akt-Inhibitor VIII (5×10^{-8} M, Akt-Inh) vorinkubiert und anschließend mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde 48 h mittels repetitiver Mikroskopie bestimmt und ist in dem Diagramm als Mittelwert mit dem mittleren Fehler aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist $* p < 0,01$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt. Zur Untersuchung des Signalweges auf Proteinebene wurden die Zellen ebenfalls 1 h mit Akt-Inhibitor VIII (5×10^{-8} M) vorinkubiert und anschließend mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS für weitere 4 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle. Die Trennlinien in den Bildern markieren das Zusammenfügen zweier nicht nebeneinander liegenden Abschnitte einer Membran.

Der repräsentative Western Blot in Abb.3.3.11 zeigt, dass sowohl die Dex-induzierte Phosphorylierung von Akt als auch von GSK-3 α/β durch den Akt-Inhibitor verhindert werden konnte, was ein Beleg für die Funktionalität des Inhibitors ist. Des Weiteren belegen die funktionellen Daten, die mittels repetitiver Mikroskopie erhoben wurden, dass der Akt-Inhibitor in einer Konzentration eingesetzt wurde, welche die Spontanproliferation der Kontrollzellen nicht beeinträchtigt. Entscheidend ist jedoch, dass der Akt-Inhibitor in der Lage ist, die Dex-induzierte Proliferation zu verhindern. Die Zellen, die mit dem Akt-Inhibitor vorinkubiert und anschließend mit Dex stimuliert wurden, zeigen kein Dex-induziertes beschleunigtes Tumorzellwachstum mehr im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese weisen dagegen weiterhin deutlich den typischen Phänotyp des Dex-induzierten Tumorzellwachstums auf.

Für die Proteinkinase p38-MAPK wurden die spezifischen Inhibitoren SB202190, SB203580 und p38-MAPK-Inhibitor eingesetzt.

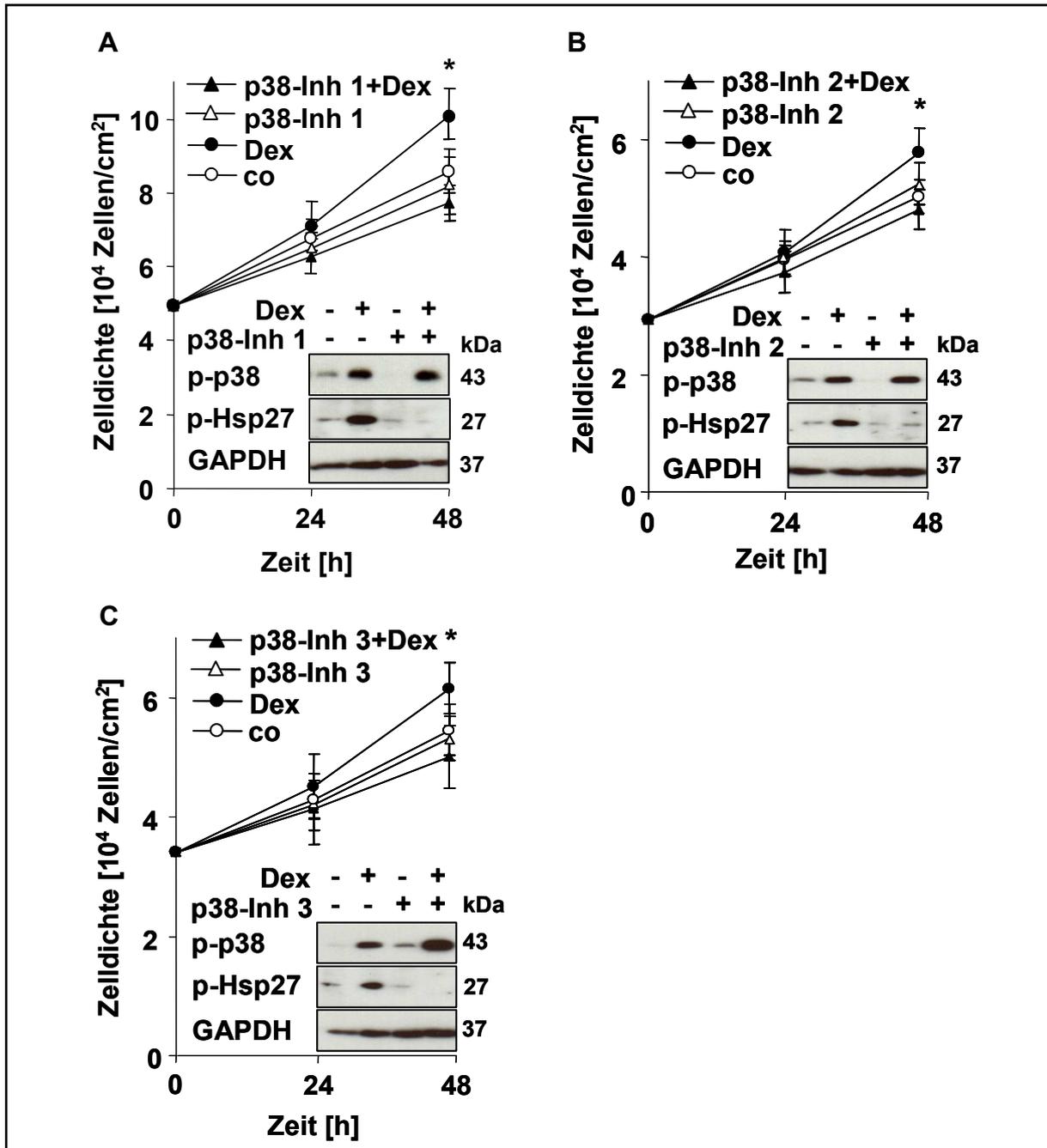


Abb.3.3.12 Inhibition der Dexamethason-induzierten Proliferaton durch p38-MAPK-Inhibitoren

MCF-7 Zellen wurden 1 h mit verschiedenen p38-MAPK-Inhibitoren vorinkubiert, **A** SB202190 (10^{-5} M, p38-Inh 1), **B** SB203580 (10^{-5} M, p38-Inh 2) bzw. **C** p38-MAPK-Inhibitor (10^{-5} M, p38-Inh 3), und anschließend mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde 48 h mittels repetitiver Mikroskopie ermittelt und ist in dem Diagramm als Mittelwert mit dem mittleren Fehler aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt. Zur Untersuchung des Signalweges auf Proteinebene wurden die Zellen ebenfalls 1 h mit dem jeweiligen p38-MAPK-Inhibitor vorinkubiert und anschließend mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS für weitere 4 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Auch für diese Untersuchungen wurden MCF-7 Zellen 1 h mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert und anschließend weitere 48 h mit Dex stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde mittels repetitiver Mikroskopie analysiert und die Funktionalität der Inhibitoren mittels Western Blot Analyse und anschließender Immundetektion überprüft. Im Fall von p38-MAPK wurden drei Inhibitoren eingesetzt, um die Ergebnisse gegenseitig zu validieren. Alle drei Inhibitoren binden kompetitiv in die ATP-Tasche der Kinase, woraufhin zwar die Phosphorylierung von p38-MAPK noch möglich ist, allerdings eine Phosphorylierung des Zielmoleküls Hsp27, nicht mehr. Genau diese Eigenschaft belegen die repräsentativen Western Blot Analysen in Abb.3.3.12 und zeigen somit die Funktionalität der 3 Inhibitoren. Des Weiteren belegen die funktionellen Daten, die mittels repetitiver Mikroskopie erhoben wurden, dass die p38-MAPK-Inhibitoren ebenfalls in solchen Konzentrationen eingesetzt wurden, welche die Spontanproliferation der Kontrollzellen nicht beeinträchtigen. Entscheidend ist jedoch auch hier, dass die p38-MAPK-Inhibitoren in der Lage sind, die Dex-induzierte Proliferation zu verhindern. Die Zellen, die mit den p38-MAPK-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit Dex stimuliert wurden, zeigen kein Dex-induziertes beschleunigtes Tumorzellwachstum mehr im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese weisen dagegen weiterhin deutlich den typischen Phänotyp des Dex-induzierten Tumorzellwachstums auf.

Die Daten aus Abschnitt 3.3.2 zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl der Signalweg der Proteinkinase Akt als auch der p38-MAPK in MCF-7 Zellen durch Dex aktiviert wurde. Die etwas verzögerte, im Durchschnitt erst nach etwa 4 h auftretende Phosphorylierung, lässt vermuten, dass es sich bei der Aktivierung der beiden Signalwege um einen indirekten Weg handelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die biochemische Inhibition von Akt bzw. p38-MAPK die GC-induzierte Proliferation hemmt.

3.3.3 Suche nach sezernierten Wachstumsfaktoren

Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, ließ die etwas verzögert auftretende Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK die Vermutung aufkommen, dass es sich bei der Aktivierung der beiden Kinasen möglicherweise um einen sekundären Effekt und keinen direkten Effekt von Dex handelt. Im Vergleich zum GR, der bereits nach wenigen Minuten aktiviert vorlag, wurden die Kinasen und deren Zielmoleküle erst nach etwa 4 h aktiviert. Daraus folgernd wäre es möglich, dass beispielsweise die

Aktivierung des GR zur Regulation der Transkription bestimmter Gene führt, was wiederum über einen sekundären Weg zur Aktivierung von Akt und p38-MAPK führt. Zum Beispiel über die Sekretion von Wachstumsfaktoren, die wiederum über auto- oder parakrine Stimulation zu einer Aktivierung von Signalwegen führen können.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen 8 h mit Dex stimuliert. Dieser Zeitraum ist ausreichend lang für die Aufnahme der gesamten Dex-Menge und gegebenenfalls, nach GR-induzierter transkriptioneller Aktivierung, Sekretion der Wachstumsfaktoren. Dieser konditionierte Überstand wurde anschließend abgenommen und frische MCF-7 Zellen 5 min damit stimuliert. Die Aktivierung der Signalwege wurde nach Lyse der Zellen mittels Western Blot Analyse und Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern untersucht.

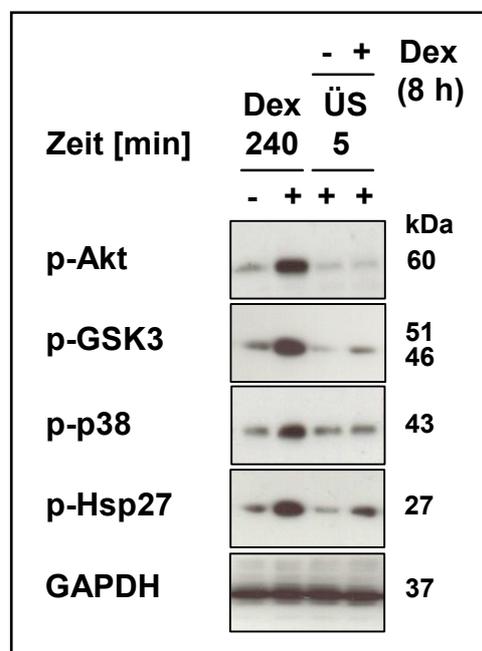


Abb.3.3.13 Stimulation mit konditioniertem Überstand von Dex-behandelten Zellen

Als Positivkontrolle wurden MCF-7 Zellen 240 min mit PBS (-, 1.Spur) bzw. Dex (10^{-5} M) (+, 2.Spur) stimuliert, bevor sie einer Lyse unterzogen wurden. Für die Stimulation mit konditioniertem Überstand (ÜS) wurden MCF-7 Zellen 8 h mit PBS (-) bzw. Dex (10^{-5} M, +) stimuliert. Anschließend wurde der konditionierte Überstand (- Dex, 3.Spur, + Dex, 4.Spur) abgenommen und frische MCF-7 Zellen 5 min damit stimuliert, bevor sie einer Zellyse unterzogen wurden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Aus Abb.3.3.13 ist ersichtlich, dass durch Stimulation mit konditioniertem Überstand keine Aktivierung von Akt oder p38-MAPK herbeigeführt werden konnte. Die Positivkontrolle, das heißt 4 h direkte Stimulation mit Dex und anschließende Lyse, zeigt, dass erwartungsgemäß unter diesen Bedingungen eine deutliche

Phosphorylierung der Proteine vorliegt. Der Versuch der Stimulation mit konditioniertem Überstand wurde mehrfach wiederholt, unter verschiedenen Konditionen. Zum Beispiel wurde die Stimulationsdauer mit Dex variiert oder die anschließende Stimulationsdauer mit konditioniertem Überstand erhöht. Leider zeigten die Experimente keinen klaren Hinweis auf das Vorhandensein sezernierter Wachstumsfaktoren bei der GC-induzierten Proliferation, woraufhin die Versuchsreihe beendet wurde.

Das Kapitel 3.3 zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten darauf hindeuten, dass dem GR eine tragende Rolle in der GC-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren zukommt und es sich nicht um unspezifische, GR-unabhängige Effekte handelt. Die Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz führte zu einer Inhibition des GC-induzierten Tumorzellwachstums. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK nach GC-Stimulation aktiviert vorlagen und die biochemische Inhibition das GC-induzierte Tumorzellwachstum gehemmt hat. Die im Vergleich zum GR verzögert eintretende Phosphorylierung der Kinasen deutet auf einen indirekten Weg hin, was jedoch nicht endgültig belegt werden konnte.

3.4 Inhibition der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren

In den vorhergehenden Abschnitten konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die molekulare Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz als auch die biochemische Inhibition der beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK zur Hemmung der GC-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren führten. Weitere Möglichkeiten, den Tumorzelltod herbeizuführen und somit die GC-induzierte Proliferation zu verhindern, sind zum einen durch einen starken Apoptoseinduktor gegeben oder zum anderen durch Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Apoptose mittels Expression eines pro-apoptotischen Proteins.

3.4.1 Inhibition der Proliferation durch Induktion von Apoptose

Eine Möglichkeit den Zelltod herbeizuführen, ist durch Behandlung der Tumorzellen mit einem potenten Apoptoseinduktor. Demzufolge wurde untersucht, ob das Zytostatikum Vincristin zu jenen Stimulantien gehört, die aufgrund ihrer Fähigkeit Apoptose zu induzieren in der Lage sind, die GC-induzierte Resistenz sowie Proliferation zu inhibieren.

3.4.1.1 Vincristin-induzierte Apoptose *in vitro*

Vincristin gehört zu der Substanzklasse der Vincaalkaloide, die als potente Apoptoseinduktoren gelten. Aufgrund ihrer Bindung an Tubulin wird die Ausbildung von Mikrotubuli inhibiert, weswegen sie auch allgemein als Mitosehemmer bezeichnet werden.

Um zu untersuchen, ob GC selbst in Kombination mit Vincaalkaloiden noch in der Lage sind, GC-induzierte Resistenz und Proliferation zu induzieren, wurden CALU-6 Zellen 1 h mit Dex vorinkubiert und anschließend mit Vincristin für weitere 48 h stimuliert. Das Tumorzellwachstum wurde mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie analysiert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid-Färbung der fragmentierten DNA bestimmt.

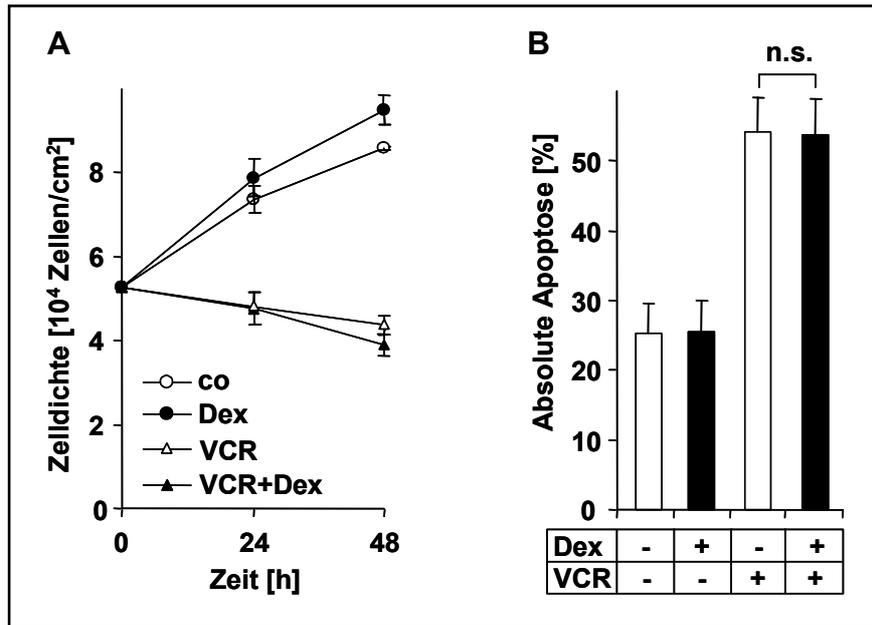


Abb.3.4.1 Apoptoseinduktion durch Vincristin in CALU-6 Zellen

CALU-6 Zellen wurden 1 h mit Dex (10^{-5} M) bzw. PBS vorinkubiert und anschließend mit Vincristin ($3,5 \times 10^{-7}$ M, VCR) weitere 48 h stimuliert. **A** Mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie wurde das Tumorzellwachstum bestimmt. In dem Diagramm sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. **B** Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Apoptoserate durch Messung der Propidiumiodid-markierten, fragmentierten DNA nach 48 h gemessen. Es wurden 6 unabhängige Experimente durchgeführt, deren Mittelwert mit dem mittleren Fehler in der Grafik zu sehen ist. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt. (n.s., nicht signifikant).

In Abb.3.4.1 ist sowohl in der repetitiven Mikroskopie (A) als auch in den Daten der Durchflusszytometrie (B) zu sehen, dass Dex in Kombination mit Vincristin nicht in der Lage ist, Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose zu induzieren. Sowohl das Tumorzellwachstum als auch die Apoptoserate sind in beiden VCR-Stimulationsansätzen gleich bleibend, unabhängig von der Vorinkubation mit Dex. Wie bereits in Kapitel 3.1 gezeigt, ist Dex auch in diesem Experiment in der Lage, das Tumorzellwachstum zu beschleunigen, was anhand der Daten der repetitiven Mikroskopie zu sehen ist (A). Hingegen scheint die simultane Stimulation mit VCR dies zu inhibieren.

Die Daten deuten darauf hin, dass Vincristin ein starker Apoptoseinduktor ist, der in der Lage ist, die GC-induzierte Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose sowie die GC-induzierte Proliferation zu inhibieren.

3.4.1.2 Vincristin-induzierte Apoptose *in vivo* im Tierversuch

Um diesen Phänotyp auch *in vivo* belegen zu können, wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum ein Stimulationsexperiment in einem heterotopen Maus-Tumor-Xenograft Modell mit CALU-6 Zellen durchgeführt. Das Experiment wurde gleichzeitig mit dem in Kapitel 3.1/Abb.3.1.13 dargestellten Tierversuch durchgeführt.

Wie bereits in dem Abschnitt beschrieben, wurden 8-10 Wochen alten Swiss-Nacktmäusen (nu/nu, Charles River) CALU-6 Zellen (5×10^6 pro Tier) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die drei unterschiedlichen Gruppen wurden entweder mit Placebo, mit Dex alleine, mit Vincristin alleine oder in Kombination mit Dex und VCR behandelt. Das Tumorwachstum wurde regelmäßig an bestimmten Tagen mittels Kalipermessung dokumentiert. Der Tierversuch und die Messungen wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum von PD Dr. Eberhard Amtmann und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

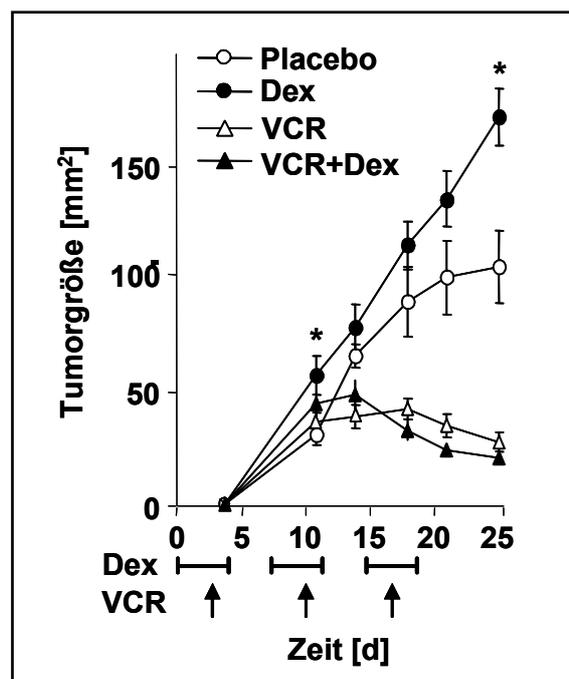


Abb.3.4.2 Inhibition des Tumorwachstums durch Vincristin *in vivo*

CALU-6 Zellen (5×10^6 Zellen/Tier) wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 200 μ l PBS resuspendiert und subkutan in die rechte Flanke von 8-10 Wochen alten Swiss-Nacktmäusen (nu/nu) injiziert. Dex wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst und wurde mit 0,1 % BSA weiter verdünnt zu einer Endkonzentration von 5 μ g/ml. VCR wurde in einer Konzentration von 0,03 mg/ml in PBS gelöst. 9 Tiere wurden an Tag 0-4, 7-11 und 14-18, über subkutane Injektion, mit Placebo bzw. 8 Tiere mit 200 μ l / 20 g Körpergewicht Dex (entsprechend 50 μ g Dex/kg/Tag) behandelt (Dex). 8 Tiere wurden an Tag 3, 10 und 17, über intraperitoneale Injektion, mit 200 μ l / 20 g Körpergewicht VCR (entsprechend 0,3 mg/kg/Tag) behandelt (VCR). Weitere 8 Tiere wurden an Tag 0-4, 7-11 und 14-18 mit obiger Dex-Dosis und zusätzlich an Tag 3, 10 und 17 mit obiger VCR-Dosis behandelt (VCR+Dex). Die Tumorgöße wurde an dargestellten Tagen mit einem Kaliper gemessen und ist in der Abbildung als Mittelwert mit dem mittleren Fehler dargestellt.

Das Ergebnis aus Abb.3.4.2 bestätigt die *in vitro* erhobenen Befunde, dass Dex in Kombination mit Vincristin nicht in der Lage ist, das Tumorwachstum zu beschleunigen und Apoptoseresistenz zu induzieren. Vincristin scheint ein potentes Zytostatikum zu sein, da die Tumoren in dem Mausmodell deutlich kleiner sind als jene der Placebo-behandelten Kontrollgruppe. Nach 25 Tagen weisen die Vincristin-behandelten Tumoren eine Größe von nur etwa 25 mm² auf, wohingegen jene der Kontrollgruppe bei über 100 mm² liegen. Die mit Dex vorbehandelten und anschließend mit Vincristin behandelten Tumoren weisen dieselbe Größe auf, wie die ausschließlich mit Vincristin behandelten, was dafür spricht, dass Dex nicht in der Lage ist, Apoptoseresistenz zu induzieren. Wobei Dex alleine in diesem Versuchansatz durchaus in der Lage war, das Tumorwachstum zu beschleunigen.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes lassen vermuten, dass im Fall von Vincaalkaloiden das paradoxe Phänomen der GC-induzierten Apoptoseresistenz und GC-induzierten Proliferation nicht auftritt. Der Einsatz von Vincaalkaloiden bietet somit eine Möglichkeit, die GC-induzierte Proliferation zu inhibieren und deutet darauf hin, dass GC dann keine Proliferation in Zellen solider Tumoren auslösen, solange ein weiteres Medikament effektiv Apoptose induziert.

3.4.2 Inhibition der Proliferation durch Sensitivierung gegenüber Apoptose

Eine weitere Möglichkeit, Tumorzellen gegenüber Apoptose zu sensitivieren, ist die Hochregulation pro-apoptotischer Moleküle, wie Caspasen. Beispielsweise konnten resistente Zellen durch Hochregulation von Caspase-8 wieder gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose resensitiviert und die TRAIL-induzierte Proliferation verhindert werden (Ehrhardt et al., 2008). MCF-7 Zellen weisen per se hohe Zytostatika-Resistenz auf, da aufgrund einer Deletion im Caspase-3 Gen dies pro-apoptotische Protein nicht exprimiert wird (Jänicke, 2009). Demzufolge wurde untersucht, ob die Expression von Caspase-3 in MCF-7 Zellen zur Sensitivierung gegenüber Apoptose führt und dadurch die GC-induzierte Proliferation verhindert werden kann.

3.4.2.1 Stabile, induzierbare Expression von Caspase-3 in MCF-7 Zellen

Die Expression pro-apoptotischer Moleküle, wie Caspase-3, kann unter Umständen problematisch werden, da in den exprimierenden Zellen, aufgrund der pro-

apoptotischen Eigenschaften des Proteins, Apoptose induziert werden kann. Aus diesem Grund wurde eine neue Technologie der Proteinexpression eingesetzt, bei der man von *Proteo-Tuning* spricht. Dabei wird die bestehende Proteinmenge über den proteosomalen Abbau reguliert und nicht auf Ebene der Transkription oder Translation. Hierfür wird das Protein N-terminal an eine so genannte destabilisierende Domäne (DD) fusioniert, die das exprimierte Fusionsprotein unverzüglich zum proteosomalen Abbau führt. Erst durch Zugabe eines Liganden (Shield-1), der an die DD bindet, wird der Abbau inhibiert (Banaszynski et al., 2006; Chu et al., 2008). Zur stabilen Transfektion wurde ein lentivirales Vektorsystem herangezogen, das hohe Effizienzen und schnelle Selektion stabiler Klone ermöglichte. Der Transfektor pCDH war so aufgebaut, dass die cDNA der Caspase-3 N-terminal an die DD in die Multiklonierstelle des Vektors kloniert werden konnte, woraufhin das Signalpeptid T2A und copGFP (*copepoda green fluorescent protein*) folgten. Das Signalpeptid T2A führt während der Translation an der Stelle zur Spaltung der Peptidkette, so dass das Fusionsprotein DD-Caspase-3 und copGFP getrennt voneinander vorliegen. Die grüne Fluoreszenz von copGFP ermöglichte eine Bestimmung der Transfektionseffizienz und die Sortierung der GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer

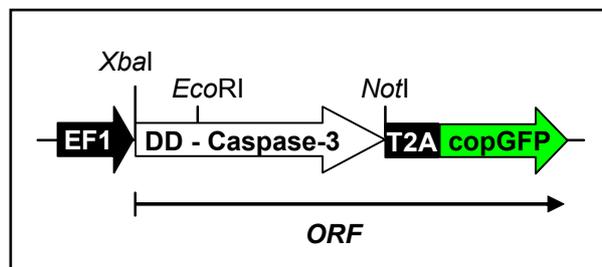


Abb.3.4.3 Schema des lentiviralen Transfektors mit DD-Caspase-3

Zuerst wurde die cDNA der destabilisierenden Domäne (DD) mittels der Restriktionsenzyme XbaI und EcoRI hinter den Promoter EF1 in die Multiklonierstelle des Vektors pCDH kloniert. Anschließend wurde die cDNA der Caspase-3, ohne Stop-Codon, mittels der Restriktionsenzyme EcoRI und NotI hinter die DD kloniert. Das Signalpeptid T2A führt während der Translation zur Spaltung des Fusionsproteins DD-Caspase-3 von copGFP. ORF, open reading frame.

Die Abb.3.4.3 liefert ein Schema, wie der Transfektor des lentiviralen Systems aufgebaut war. Die Virusproduktion wurde in HEK293T-Zellen durchgeführt, ebenso wie die Bestimmung des Virus-Titers. Anschließend wurden MCF-7 Zellen mit dem Virusüberstand des Ansatzes mit dem Leervektor pCDH als Kontrolle bzw. pCDH-DD-Caspase-3 transfiziert. Nach einer Woche wurden die GFP-positiven Zellen mit

Hilfe von Dr. Joachim Ellwart vom Zellsortierservice im Helmholtz Zentrum München am MoFlo (MoFlo, Cytomation) sortiert. Die grüne Fluoreszenz der Zellen diente auch der Ansicht unter einem Fluoreszenzmikroskop im Kanal FITC und wurde mittels einer integrierten Kamera dokumentiert.

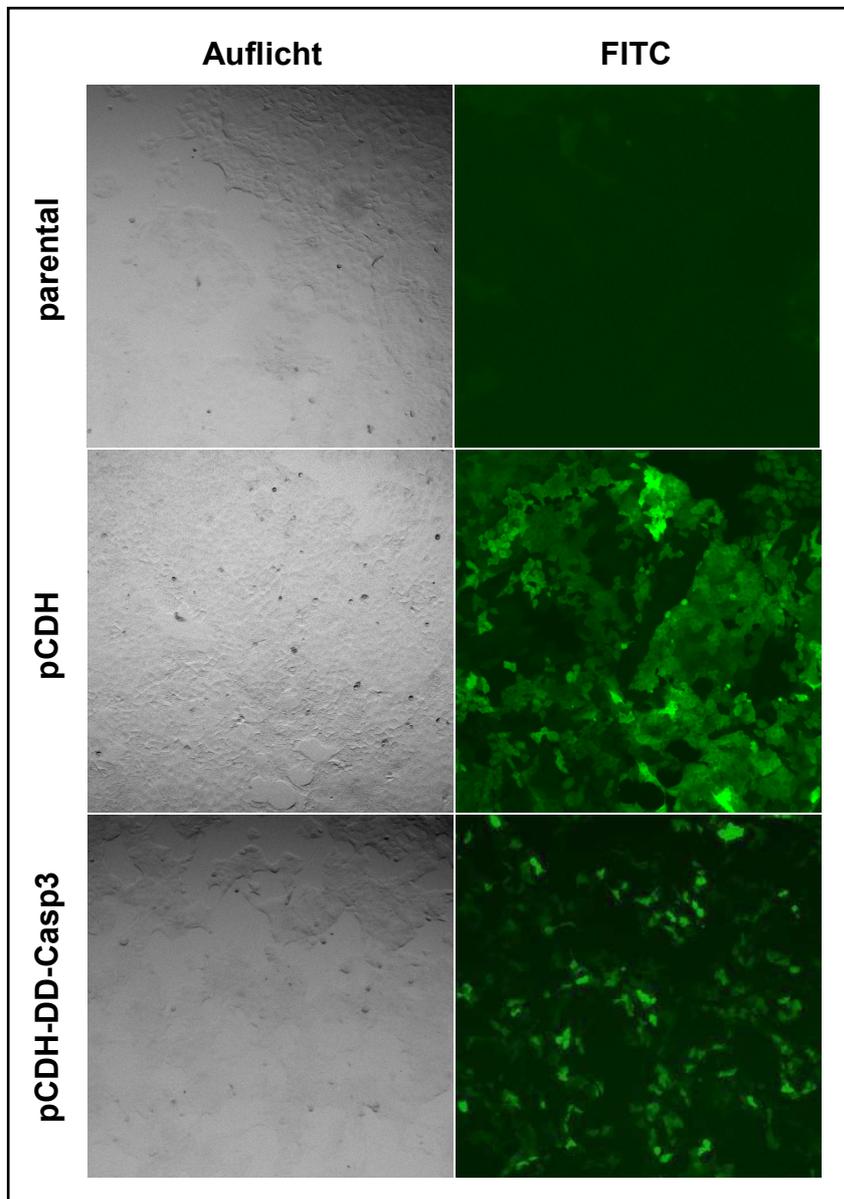


Abb.3.4.4 Detektion der grünen Fluoreszenz stabil transfizierter GFP-positiver MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden mittels Virusüberstand und Polybren infiziert. Als Kontrolle wurden MCF-7 Zellen nur mit Polybren, ohne Virus behandelt (parental). Für den Transfervektor pCDH wurden $1,5 \times 10^6$ TU für die Infektion eingesetzt, für pCDH-DD-Casp3 3×10^5 TU/ml. Die Bilder wurden 4 Wochen nach Zellsortierung im Durchflusszytometer, am Fluoreszenzmikroskop, mit dem 5xObjektiv aufgenommen. Links sind die Auflichtbilder zu sehen und rechts die Aufnahmen durch den FITC-Kanal, in dem die grüne Fluoreszenz sichtbar wird.

In Abbildung 3.4.4 ist deutlich der Unterschied in der Fluoreszenzintensität der beiden verwendeten Transfervektoren zu sehen. Die Kontrolle MCF-7 parental zeigt erwartungsgemäß keine Fluoreszenzsignale, wohingegen für den Leervektor pCDH über 90% hoch positive Zellen zu sehen sind. Für den Vektor pCDH-DD-Casp3 sieht man, dass nur etwa 50% der Zellen GFP-positiv sind und die Fluoreszenzintensität nicht so hoch ist, das heißt die Zellen nicht so hell grün leuchten. Diese Ergebnisse stimmen mit jenen des Durchflusszytometers überein. Vor der Zellsortierung lag der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen für pCDH-DD-Casp3 bei nur etwa 30%, allerdings konnte das auch nach der Zellsortierung auf nur knapp über 50% erhöht werden, wobei dieser Wert erst ca. 4 Wochen nach der Sortierung bestimmt wurde. Möglicherweise schalten die Zellen das Gen nach einigen Wochen ab (gene silencing) oder die Zellsortierung war nicht effizient genug. Dennoch wurden diese Zellen für weitere Versuche eingesetzt, ohne sie ein zweites Mal zu sortieren.

Um zu überprüfen, ob das induzierbare System funktionsfähig ist und das Fusionsprotein DD-Caspase-3 nur unter Zugabe von Shield-1 vorliegt, wurde Shield-1 in einer Dosis-Wirkungskurve zu den transfizierten Zellen titriert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot Analyse und Immundetektion die Menge des Fusionsproteins überprüft.

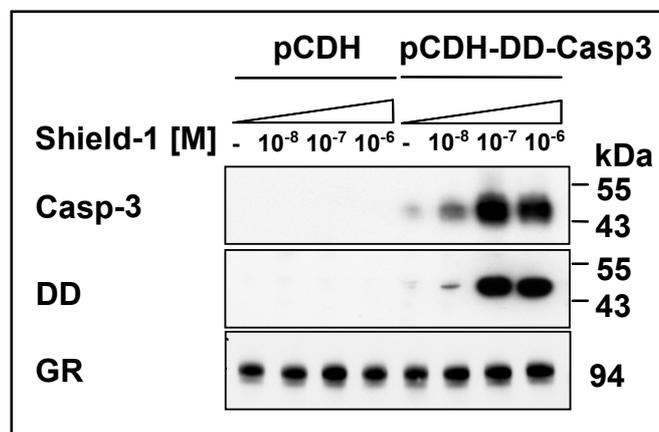


Abb.3.4.5 Shield-1-abhängige Expression des Fusionsproteins DD-Caspase-3

MCF-7 pCDH und MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen wurden 24 h mit den abgebildeten Konzentrationen Shield-1 stimuliert. Die Kontrolle (-) wurde mit Ethanol in der maximal vorliegenden Lösungsmittelkonzentration von 1 %o stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GR dient als Ladungskontrolle. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Die Abb.3.4.5 zeigt deutlich, dass das induzierbare System funktionsfähig ist. Das Fusionsprotein DD-Caspase-3 wird in MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen Shield-1-abhängig exprimiert, wohingegen die Kontrollzellen MCF-7 pCDH erwartungsgemäß keine Proteinexpression zeigen. Je höher die eingesetzte Konzentration an Shield-1 ist, desto mehr Protein wird exprimiert. Die Größe des Fusionsproteins beläuft sich auf etwa 46 kDa, da Caspase-3 eine Größe von ca. 34 kDa und die DD ca. 12 kDa hat. Mit zwei unterschiedlichen Antikörpern, einer, der spezifisch Caspase-3 erkennt und ein weiterer, der spezifisch die DD erkennt, wurde die Größe des Fusionsproteins validiert. Beide Western Blots deuten an, dass eine minimale Hintergrundexpression des Proteins auch ohne Shield-1 existiert. Das würde bedeuten, dass das System leicht durchlässig ist und eine geringe konstitutive Proteinexpression vorhanden ist bzw. der proteosomale Abbau nicht vollständig ist.

Da alle vorhergehenden Stimulationsexperimente unter Hungerbedingungen, das heißt mit 0% FKS, durchgeführt wurden, musste überprüft werden, ob die Expression des Fusionsproteins auch unter diesen Bedingungen in gleichem Maße gegeben ist, wie unter Normalbedingungen mit 10% FKS. Hierzu wurde 12 h nach Aussäen der MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen ein Mediumwechsel vollzogen, wobei ein Ansatz weiterhin in 10%, der andere Ansatz allerdings unter FKS-Entzug kultiviert wurde. Daraufhin erfolgte Stimulation mit Shield-1 in verschiedenen Konzentrationen für 24 h. Anschließend wurde nach Lyse der Zellen mittels Western Blot Analyse und Immundetektion die Menge des vorliegenden Fusionsproteins überprüft.

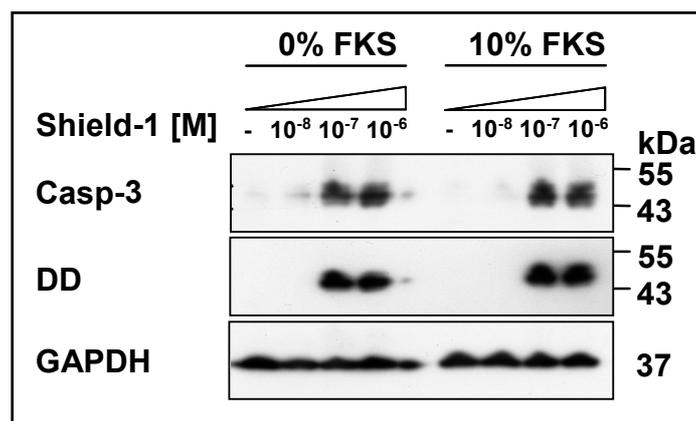


Abb.3.4.6 Shield-1-abhängige Expression von DD-Casp3 in 0 und 10% FKS

MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen wurden entweder mit 0 oder 10% FKS kultiviert und 24 h mit den abgebildeten Konzentrationen Shield-1 stimuliert. Die Kontrolle (-) wurde mit Ethanol in der maximal vorliegenden Lösungsmittelkonzentration von 1 ‰ stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Die Abb.3.4.6 zeigt, dass kein Unterschied in der Proteinexpression besteht, ob die Zellen in 0% FKS unter Hunger- oder in 10% FKS unter Normalbedingungen kultiviert wurden. Das Fusionsprotein wurde auch in 0% FKS Shield-1-abhängig in gleichem Maße exprimiert, was eine Durchführung der folgenden Experimente, wie gewöhnlich unter Hungerkonditionen, ermöglichte.

Um letztendlich noch die Geschwindigkeit und Stabilität der Shield-1-abhängigen Inhibition des proteosomalen Abbaus zu überprüfen, wurden MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen einmalig mit 10^{-6} M Shield-1 stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Mittels Western Blot Analyse und Immundetektion wurde anschließend die vorliegende Menge des Fusionsproteins überprüft.

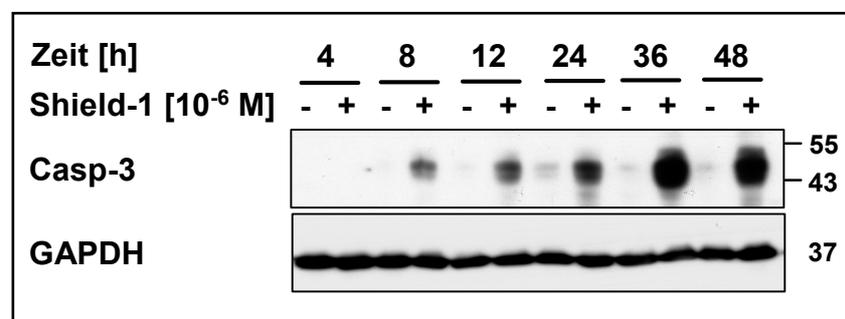


Abb.3.4.7 Shield-1-abhängige Expression von DD-Casp3 über 48 h stabil

MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen wurden mit 10^{-6} M Shield-1 stimuliert und nach abgebildeten Zeitpunkten lysiert. Die Kontrollzellen (-) wurden mit Ethanol in der maximal vorliegenden Lösungsmittelkonzentration von 1 %o stimuliert und jeweils parallel zum Shield-1-stimulierten Ansatz lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach Western Blot auf der PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und mit ECL-Reagenz detektiert. GAPDH dient als Ladungskontrolle.

Die Abb.3.4.7 belegt, dass nach 4 h noch kein Protein detektierbar ist, allerdings nach 8 h der proteosomale Abbau inhibiert und Protein nachweisbar ist und nach etwa 24 bzw. 36 h das Maximum erreicht zu haben scheint. Auch nach 48 h kann noch sehr viel Protein nachgewiesen werden, das heißt, das Shield-1 eine lange Halbwertszeit hat und der Abbau des Fusionsprotein mindestens 48 h ohne repetitive Gabe von Shield-1 stabil inhibiert wird. Für längere Inkubationszeiträume wäre die Untersuchung der Proteinmenge in einer längeren Kinetik erforderlich, was für meine Experimente jedoch nicht notwendig war.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Regulation der vorliegenden Proteinmenge durch die DD und den Liganden Shield-1 sehr gut funktioniert hat. Das System des Proteo-Tunings scheint nur minimal durchlässig zu sein und daher ist die geringe konstitutive Expression vernachlässigbar. Dder Abbau des Fusionsproteins

wird auch unter Hungerkonditionen mit 0% FKS inhibiert und eine Konzentration von 10^{-7} bzw. 10^{-6} M Shield-1 scheint optimal zu sein, um das Fusionsprotein Ligandenabhängig zu exprimieren. Die Proteinexpression ist bereits nach 8 h zu detektieren, wobei sich eine Inkubationszeit von mindestens 24 h als optimal erwiesen hat, um eine maximale Proteinexpression zu erzielen. Eine repetitive Gabe von Shield-1 nach 24 h ist nicht erforderlich, da die Proteinmenge selbst 48 h nach Gabe von Shield-1 stabil ist.

3.4.2.2 Sensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Apoptose durch Expression von Caspase-3

Nach erfolgreicher Etablierung des Proteo-Tuning-Systems sollte nun untersucht werden, ob es möglich ist, durch Expression von Caspase-3 MCF-7 Zellen gegenüber Apoptose zu resensitivieren und damit den resistenten Phänotyp zu überwinden. Hierzu konnten leider keine GC eingesetzt werden, da diese im Fall von Zellen solider Tumoren selbst in hohen Konzentrationen nicht in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. In Arbeiten der ehemaligen Doktorandin Eva Böckler konnte allerdings anhand des Zytostatikums Epirubicin ein ähnlicher Phänotyp wie für die GC gezeigt werden. Das Anthracyclin Epirubicin führte in MCF-7 Zellen nur zu einer schwachen Apoptoseinduktion und zeigte darüber hinaus in niedrigen Konzentrationen das paradoxe Phänomen des Epirubicin-induzierten Tumorzellwachstums. Aufgrund dessen wurde nun untersucht, ob MCF-7 Zellen durch die Expression von Caspase-3 anstelle von GC gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose resensitiviert werden können. Darüber hinaus wurde ermittelt, ob eine Apoptoseinduktion auch mit niedrigen Konzentrationen an Epirubicin erzielt und somit die Epirubicin-induzierte Proliferation verhindert werden kann.

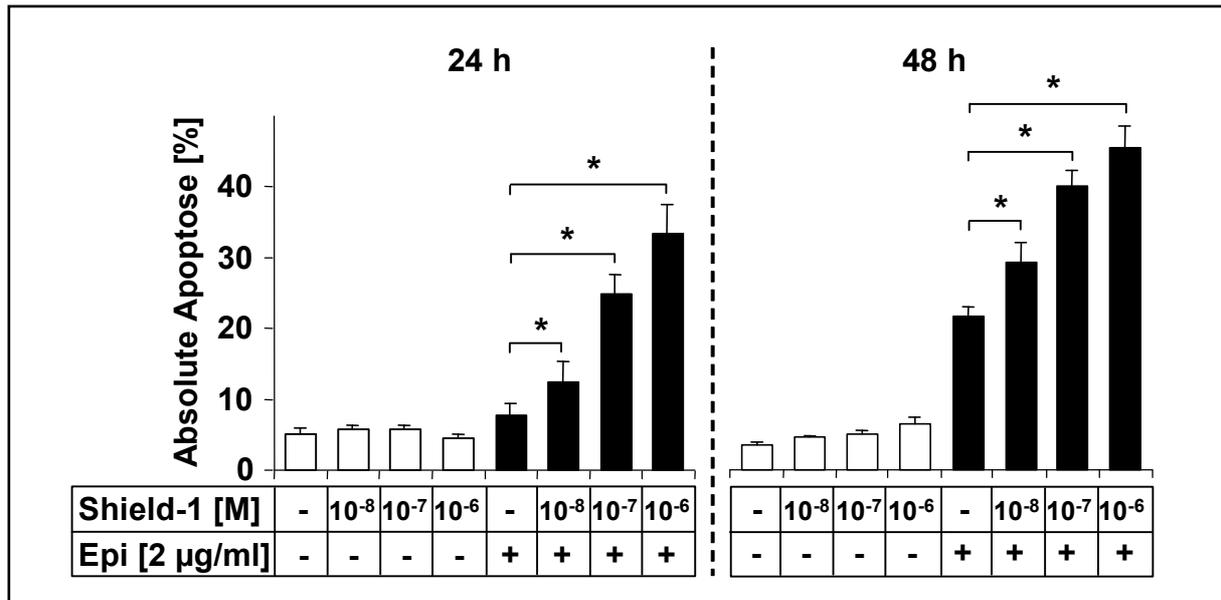


Abb.3.4.8 Resensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose durch Shield-1-abhängige Expression von Caspase-3

MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen wurden mit den abgebildeten Konzentrationen Shield-1 24 h in 0% FKS-haltigem Medium vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 h (links) bzw. 48 h (rechts) mit 2 µg/ml Epirubicin (Epi) stimuliert. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurde die Apoptoserate nach Nicoletti und Propidiumiodid-Markierung im Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bestimmt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der absoluten Apoptoserate mit dem mittleren Fehler aus je fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * p < 0,05 und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Die Abb.3.4.8 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte Apoptoserate von MCF-7 pCDH-DD-Casp3-Zellen, die mit steigenden Konzentrationen Shield-1 für 24 h vorinkubiert und anschließend für weitere 24 bzw. 48 h mit Epirubicin stimuliert wurden. Daraus ist ersichtlich, dass Shield-1 alleine, und demzufolge die Expression von Caspase-3, keine toxischen Eigenschaften aufweist, da die Apoptoserate selbst nach 48 h nur minimal um etwa 3% erhöht ist. Die Expressionsrate des proapoptotischen Proteins liegt somit in einem optimalen nicht zu hohen Bereich, wo durch das Protein selber noch keine Apoptose induziert wird. Des Weiteren kann man in dem Diagramm sehen, dass Epirubicin alleine keine (24 h) oder nur geringe (48 h) Apoptose induziert. Darüber hinaus ist aus der Abbildung ersichtlich, dass es durch Expression einer funktionellen Caspase-3 gelungen ist, die resistenten MCF-7 Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose zu resensitivieren. Mit zunehmender Konzentration an Shield-1 steigt die Apoptoserate unter dem Einfluss von Epirubicin. Nach 24 h zeigt Epirubicin alleine einen minimalen Anstieg der Apoptoserate von 5 auf 8%, wohingegen die Apoptoserate unter 10⁻⁶ M Shield-1, das

heißt unter Caspase-3-Expression, bereits 34% aufweist. Nach 48 h ist Epirubicin alleine schwach in der Lage Apoptose zu induzieren, allerdings bleibt die Rate sehr niedrig bei nur 21%, wohingegen auch hier, unter Caspase-3 Expression, die Apoptoserate auf 45% ansteigt. Die Resensitivierung verlief demzufolge erfolgreich und die Apoptoserate konnte durch Epirubicin nach 24 h in den Caspase-3-exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, mehr als vervierfacht werden.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob es möglich ist, die Schwelle zur Apoptoseinduktion so zu verschieben, dass auch in niedrigeren Epirubicin-Konzentrationen Apoptose induziert und somit die Proliferation verhindert werden kann.

Hierzu wurden MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen mit 10^{-6} M Shield-1 für 24 h vorinkubiert und anschließend für weitere 48 h mit Epirubicin in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Im Anschluss wurde die Apoptoserate durch Messung der Propidiumiodid-markierten, fragmentierten DNA im Durchflusszytometer bestimmt.

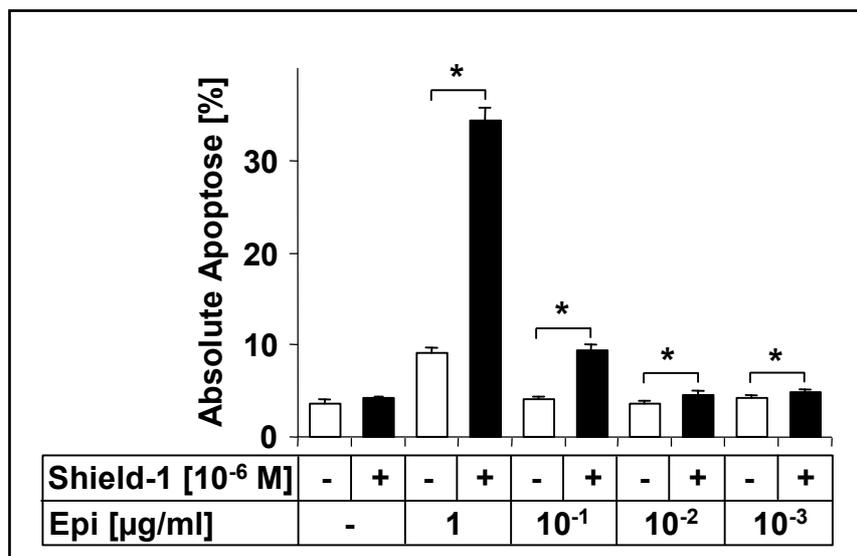


Abb.3.4.9 Resensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose durch Shield-1-abhängige Expression von Caspase-3

MCF-7 pCDH-DD-Casp3 Zellen wurden mit 10^{-6} M Shield-1 12 h in 0% FKS-haltigem Medium vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den abgebildeten Konzentrationen Epirubicin (Epi) für weitere 48 h stimuliert. Danach wurde die Apoptoserate nach Nicoletti und Propidiumiodid-Markierung im Durchflusszytometer im Kanal FL-1 bestimmt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der absoluten Apoptoserate mit dem mittleren Fehler aus je 6 unabhängigen Experimenten dargestellt. Statistische Signifikanz ist * $p < 0,05$ und wurde mit dem zweiseitigen, gepaarten t-test ermittelt.

Aus Abb.3.4.9 ist ersichtlich, dass es möglich war, die Schwelle zugunsten der Apoptoseinduktion auch in niedrigen Epirubicin-Konzentrationen zu verschieben. Selbst in Konzentrationen wie 10^{-1} µg/ml, in denen Epi alleine nicht mehr in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, führt die Shield-1-abhängige Expression von Caspase-3 zu einer Verdopplung der Apoptoserate. In niedrigeren Konzentrationen ist der Unterschied kaum noch zu sehen, zeigte allerdings im zweiseitigen, gepaarten t-test immer noch statistische Signifikanz, was auf einen zwar geringen, aber doch sehr stabilen Unterschied hindeutet. Es ist daher anzunehmen, dass Epirubicin in der niedrigsten Konzentration von 10^{-3} µg/ml, in der meine Vorgängerin Epi-induzierte Proliferation nachweisen konnte, nun keine Proliferation mehr induzieren kann und das Gleichgewicht durch die Expression von Caspase-3 auf Seiten der Apoptose verschoben wurde.

Diese Daten zeigen, dass es mit Hilfe des Proteo-Tuning Systems gelungen ist, ein pro-apoptotisches Protein wie Caspase-3 zu exprimieren, ohne die Zellen in die Apoptose zu führen. Die Expression des DD-Caspase-3 konnte Konzentrations- und Zeit-abhängig induziert werden. Des Weiteren zeigten die funktionellen Daten, die mittels Stimulation mit dem Zytostatika Epirubicin und Durchflusszytometrie erhoben wurden, dass es gelungen ist, durch Expression von Caspase-3 die sonst sehr resistenten MCF-7 Zellen gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose zu resensitivieren. Die Daten deuten an, dass Epirubicin selbst in niedrigen Konzentrationen in der Lage ist Apoptose zu induzieren und lassen demzufolge vermuten, dass dadurch die Epirubicin-induzierte Proliferation zu Epirubicin-induzierter Apoptose konvertiert werden konnte.

Das Kapitel 3.4 zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl der Einsatz eines starken Apoptoseinduktors als auch die Expression eines pro-apoptotischen Moleküls zu einer Sensitivierung der Tumorzelle gegenüber Apoptose geführt hat. Die Daten belegen, dass aufgrund der Verschiebung der Schwelle in Richtung Apoptose durch VCR die GC-induzierte Proliferation inhibiert wurde. Des Weiteren deuten die Ergebnisse an, dass aufgrund dieser Sensitivierung gegenüber Apoptose ebenso Epirubicin-induzierte Proliferation gehemmt wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass GC nicht nur anti-apoptotische, sondern darüber hinaus außerdem pro-proliferative Effekte auf Tumorzellen ausüben können. Es konnte anhand der systematischen Quantifizierung erstmals gezeigt werden, dass die GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen ein

sehr häufiges Problem darstellt und somit eine neue Nebenwirkung von GC ist. Die GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen *in vitro* beschränkte sich weder auf eine Tumorentität noch einen gemeinsamen Ursprung und konnte *in vivo* in einem Maus-Tumor-Xenograft-Modell bestätigt werden. Die Untersuchungen im Hinblick auf zugrunde liegende Signalmechanismen haben gezeigt, dass dem GR eine tragende Rolle in der GC-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren zukommt und es sich nicht um unspezifische, GR-unabhängige Effekte handelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK nach GC-Stimulation aktiviert vorlagen und die biochemische Inhibition das GC-induzierte Tumorzellwachstum gehemmt hat. Über die Erkenntnisse in etablierten Zelllinien solider Tumoren hinaus konnten die anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekte von GC ebenso in primären, hämatopoetischen Tumorzellen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse zusammenfassend belegen, dass es sich bei den anti-apoptotischen und darüber hinaus auch pro-proliferativen Effekten von GC um ein breit gefächertes Problem handelt und demzufolge der standardisierte Einsatz von GC während der Chemotherapie überdacht werden muss.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Glucocorticoid(GC)-induzierter Proliferation von Tumorzellen als neuer, in unserer Arbeitsgruppe erstmals systematisch untersuchter Nebenwirkung von GC während der Tumorthapie. Diese wurde sowohl in Zelllinien solider Tumoren als auch in primären hämatopoetischen Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie quantifiziert. Des Weiteren wurden zugrunde liegende Signalmechanismen der GC-induzierten Proliferation charakterisiert und biochemisch bzw. molekular inhibiert. Darüber hinaus wurden Möglichkeiten identifiziert, GC-induzierte Proliferation medikamentös oder molekular zu verhindern.

4.1 Wirkung von Glucocorticoiden auf Zellen solider Tumoren

Das erste Ziel der Arbeit war, die Häufigkeit des pro-proliferativen Effekts von GC auf etablierte Zelllinien solider Tumoren zu quantifizieren. Die Schwierigkeit dieser Experimente lag darin, ein stabiles und reproduzierbares Spontanwachstum der Zellen zu ermöglichen. Hierzu wurden zu Beginn der Untersuchungen verschiedene Stimulationsbedingungen ausgetestet. Dabei stellte sich heraus, dass der GC-induzierte pro-proliferative Effekt am deutlichsten zu detektieren war, wenn die Spontanproliferation der Zellen am niedrigsten war. Aus diesem Grund wurden die Experimente daraufhin ohne fötales Kälberserum (FKS) durchgeführt, was zu einer Reduktion der Spontanproliferation und Synchronisation der Zellen führte. Der Einsatz von FKS wird ohnehin kontrovers diskutiert, da es sich um einen natürlichen Zusatz handelt, dessen genaue Zusammensetzung bisher unbekannt ist und der nachweislich einen Einfluss auf bestimmte Signalwege ausüben kann. Darüber hinaus unterliegt die Zusammensetzung innerhalb der Chargen und Anbieter deutlichen Schwankungen, was sich auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirken kann (Mannello und Tonti, 2007). Hinzu kommt, dass FKS mitunter GC enthalten kann, was die Untersuchungen gestört hätte.

Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Erhöhung des Tumorzellwachstums der GC-stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen betrug *in vitro* durchschnittlich etwa 140%, wenn das Kontrollwachstum zu 100% gesetzt wurde. Dieser Wert erscheint im ersten Moment, trotz statistischer Signifikanz, nicht gravierend. Bedenkt man jedoch, dass Tumoren stets kontinuierlich wachsen und teilweise sogar exponentiell, scheint eine Beschleunigung des Wachstums um den

Faktor 1,4 erheblich. Dies belegen auch eindeutig die *in vivo* Daten aus dem Xenograft-Maus-Modell mit der Lungenkarzinomzelllinie CALU-6. Der Tierversuch wurde zur Validierung der *in vitro* erhobenen Befunde durchgeführt und zeigte, dass das Tumorwachstum durch Dex erheblich beschleunigt wurde. Die Differenz der Tumorgröße der GC-stimulierten Tiere gegenüber den Placebo-behandelten Tieren betrug durchschnittlich 160%. Somit scheint der Unterschied *in vivo* sogar noch bedeutender zu sein als *in vitro*, was die hohe Relevanz der pro-proliferativen Effekte von GC auf Zellen solider Tumoren unterstreicht.

Die systematische Quantifizierung ergab, dass 6 von 10 untersuchten Zelllinien, die sowohl von der Tumorentität als auch vom Ursprung her unterschiedlich waren, GC-induziertes beschleunigtes Wachstum aufwiesen. Diese Daten zeigen, dass GC-induzierte Proliferation eine überaus häufige Wirkung von GC auf Zellen solider Tumoren *in vitro* ist, welche weiterer Abklärung bedarf. Ein Zelllinienartefakt kann hierbei ausgeschlossen werden, da die unerwünschten pro-proliferativen Effekte der GC nicht nur *in vitro*, sondern *auch in vivo* anhand des Tierversuchs gezeigt werden konnten.

Zur Ermittlung der GC-induzierten Effekte wurden verschiedene Methoden, wie beispielsweise die repetitive Mikroskopie sowie die Bestimmung der DNA-Syntheserate herangezogen. Im Zuge der Experimente stellten sich die repetitive Mikroskopie und die Impedanzanalyse als die sensitivsten Methoden heraus. Eine hohe Sensitivität der Messverfahren war vor allem durch die zunächst geringen Effekte - Beschleunigung des Wachstums um den Faktor 1,4, siehe oben - notwendig. Dagegen wies insbesondere die Bestimmung der enzymatischen Aktivität mittels Wst-1-Umsatz, aufgrund hoher Intra- und Interassay-Varianzen, die geringste Sensitivität auf. Diese Erkenntnis könnte eine Ursache dafür sein, dass das Phänomen der GC-induzierten Proliferation bisher in manchen Untersuchungen übersehen wurde. Viele *in vitro* Studien zum Proliferationsverhalten von Zellen werden mit dem MTT-Test durchgeführt, der wie der Wst-1-Test auf dem Umsatz eines Tetrazoliumsalzes basiert und ebenso den soeben erwähnten technischen Schwierigkeiten unterliegt. Daher ist es für zukünftige Untersuchungen ratsam, moderne und besonders sensitive Methoden wie die repetitive Mikroskopie einzusetzen, die auch eine Ermittlung von nur geringen Unterschieden ermöglichen.

Die eingesetzten GC-Konzentrationen orientierten sich an den nach intravenöser Injektion von GC im Plasma von Patienten gemessenen maximalen

Konzentrationen (Brady et al., 1987; Tsuei et al., 1979). Auch in niedrigeren Konzentrationen, selbst im nanomolaren Bereich, konnte in unserer Studie der proliferative Effekt von GC *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse sind potentiell von hoher klinischer Relevanz, da aufgrund einer Plasmahalbwertszeit von etwa 2 - 5 h (in Abhängigkeit des applizierten GC (Czock et al., 2005)), GC in relevanten Konzentrationen über einen längeren Zeitraum im Patienten vorliegen können und dort eventuell das Tumorwachstum kontinuierlich stimulieren.

4.2 Wirkung von Glucocorticoiden auf primäre Leukämiezellen

In hämatopoetischen Tumorzellen, bei denen GC als Zytostatika zur Apoptose-induktion verabreicht werden, induzieren GC häufig und effektiv Apoptose; es kann jedoch das Problem der GC-Resistenz auftreten (Zwaan et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von GC auf hämatopoetische Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie untersucht. Erwartungsgemäß reagierten nur etwa 50% der 139 untersuchten Proben mit GC-induzierter Apoptose, während die andere Hälfte der Proben Apoptoseresistenz zeigte. Primäre Leukämiezellen sterben normalerweise schnell *in vitro* ab und zeigen keine Spontanproliferation, was die Untersuchungen von GC-induzierter Proliferation auf wenige Proben beschränkte. Deswegen wurde aushilfsweise auf den Einfluss von GC auf die Spontanapoptose ausgewichen. Hier reduzierten GC in etwa 15% der Proben signifikant die Spontanapoptose und ermöglichten ein längeres Überleben der Tumorzellen. In einer Probe, die Spontanproliferation *in vitro* zeigte, konnte sogar GC-induzierte Proliferation nachgewiesen werden. Dies mag die Häufigkeit von GC-induzierter Proliferation in primären Leukämiezellen unterschätzen. Die Auswertung der Experimente mit Hilfe der repetitiven Mikroskopie ist im Fall von Suspensionszellen mit Schwierigkeiten verbunden. Beispielsweise müssen die Zellen für die repetitive Mikroskopie in Methylcellulose ausgesät werden, um einerseits die Bewegungsfreiheit der Zellen bzw. andererseits ihre Agglutination einzuschränken, woraufhin jedoch eine durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen nicht mehr möglich ist. Da es sich um primäre Proben aus Kindern handelte, war die Menge an Zellmaterial in den meisten Fällen beschränkt, wodurch häufig nur die durchflusszytometrische Ermittlung der Apoptoserate möglich war, die jedoch ungeeignet ist für die Bestimmung von Proliferation. Diese technischen

Schwierigkeiten haben möglicherweise dazu geführt, dass die Zahl der Proben, in denen pro-proliferative Effekte hätten detektiert werden können, unterschätzt wurde.

Die detailliertere Analyse der GC-induzierten Effekte auf unterschiedliche Subformen der Leukämie lässt vermuten, dass insbesondere die AML-Proben sehr resistent gegenüber GC-induzierter Apoptose waren und nur etwa 15% der untersuchten Proben sensitiv mit Apoptose reagierten. Dies macht den Einsatz von GC bei einer AML, besonders im Hinblick auf die potentiell pro-proliferativen Effekte fragwürdig. Wobei ein anti-apoptotischer und möglicherweise sogar pro-poliferativer Effekt vor allem bei c-ALL- und Prä-B-ALL-Proben detektiert wurde. Über diese Erkenntnisse hinaus kam bei der Analyse interessanterweise heraus, dass insbesondere T-ALL Patienten von der Therapie mit GC profitieren könnten. Der prozentuale Anteil der T-ALL-Proben an allen untersuchten Proben betrug etwa 15%. Diese Zahl stimmt mit den Literaturangaben überein, die besagen, dass nur etwa 15% aller Kinder mit ALLs eine T-ALL erleiden, diese Patienten jedoch eine besonders schlechte Prognose haben im Vergleich zu anderen Leukämien (Goldberg et al., 2003). Um noch detailliertere Aussagen treffen zu können, müsste man die Anzahl der untersuchten T-ALL Proben erhöhen und den GC-induzierten Effekt systematisch *in vitro* sowie *in vivo* überprüfen.

Generell zeigen unsere Daten, dass auch im Fall hämatopoetischer Zellen zu dem Problem der GC-Resistenz zusätzlich noch die möglichen anti-apoptotischen bzw. pro-proliferativen GC-induzierten Effekte hinzukommen. Die Daten belegen, dass die GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen ein neues, unerwartet häufiges Problem darstellt, das nicht auf Zellen solider Tumoren beschränkt ist, sondern ebenso im Fall hämatopoetischer Tumorzellen auftritt, allerdings wohl in einer niedrigeren Frequenz.

4.3 Signalmechanismen der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem paradoxen Phänomen der GC-induzierten Proliferation von Tumorzellen um ein häufiges Problem handelt, galt es in einem nächsten Schritt, zugrunde liegende Signalmechanismen in Zellen solider Tumoren zu untersuchen, um im Anschluss potentielle Wege zu finden, die GC-induzierte Proliferation zu inhibieren.

4.3.1 Der Glucocorticoidrezeptor

In den Untersuchungen im Hinblick auf zugrunde liegende Signalmechanismen in Zellen solider Tumoren konnte gezeigt werden, dass die pro-proliferativen Effekte der GC über einen GR-abhängigen, höchstwahrscheinlich transkriptionellen Mechanismus induziert werden. Dies konnte durch Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz und anschließender repetitiver Mikroskopie sowie Western Blot Analysen gezeigt werden.

Die Abhängigkeit vom GR, die anhand der Knockdown-Studien gezeigt werden konnte, bestätigen auch die Ergebnisse der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP. In der vorliegenden Arbeit konnte in diesen Zellen weder eine nachweisbare Menge an GR auf Proteinebene detektiert werden, noch reagierten sie auf GC-Stimulation mit beschleunigtem Tumorzellwachstum. Demzufolge scheinen die pro-proliferativen Effekte der GC in Abhängigkeit vom GR aufzutreten. In der Literatur werden die LNCaP Zellen im Hinblick auf die Expression des GR kontrovers diskutiert. Beispielsweise konnten Nishimura et al weder detektierbare Mengen an Protein, noch RNA nachweisen (Nishimura et al., 2001). Eine aktuellere Studie zeigt allerdings eine sehr geringe Expression des GR in LNCaP Zellen (Dovio et al., 2009). Da jedoch in dieser Arbeit keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurden die LNCaP Zellen sozusagen als Negativkontrolle betrachtet und bestätigten die Abhängigkeit des pro-proliferativen Effektes vom GR. In weiteren Untersuchungen zeigte sich allerdings, dass die Expressionsmenge des GR nicht direkt mit GC-induzierter Proliferation korreliert. Beispielsweise wurde in der Lungenkarzinomzelllinie A549 eine hohe Expression des GR detektiert, dennoch zeigten diese Zellen kein beschleunigtes Tumorzellwachstum nach Stimulation mit GC. Den Hinweis auf einen GR-abhängigen sowie transkriptionellen Mechanismus lieferte der Nachweis der spezifischen Phosphorylierung des GR am Serinrest 211 mittels Western Blot Analysen. Diese spezifische Phosphorylierung konnte für vier verschiedene Zelllinien, die GC-induzierte Proliferation aufwiesen, gezeigt werden. Die Phosphorylierung des GR am Serinrest 211 ist ein Marker für die Lokalisation im Zellkern und transkriptionelle Aktivität (Chen et al., 2008). Sowohl die Knockdown-Studien als auch die Analyse der spezifischen Phosphorylierung des GR lassen folgern, dass die pro-proliferativen Effekte der GC nicht über unspezifische, sondern GR-abhängige, transkriptionelle Mechanismen induziert werden.

Eine denkbare Erklärung, warum manche Zelllinien, trotz ähnlicher Expressionsmenge des GR, GC-induziertes beschleunigtes Tumorzellwachstum zeigten und andere nicht, ist möglicherweise die Existenz verschiedener Isoformen oder Mutationen des GR. Beispielsweise wird GR β als Antagonist des klassischen, hormonabhängigen Rezeptors GR α diskutiert, indem er negative Effekte auf die transkriptionelle Aktivität des GR α ausübt (Bamberger et al., 1995). GR β ist nicht in der Lage, GC zu binden, fängt also nicht den Agonisten ab, sondern ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert und kann dort seine potentiell antagonistische Wirkung ausüben (Oakley et al., 1996). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper detektiert theoretisch beide Isoformen, da GR β nur um einige Aminosäuren kürzer als GR α ist und beide das zu erkennende Epitop gemein haben. Durch den Größenunterschied von etwa 10 kDa, hätte man diesen parallel zum GR α detektieren können, wenn er exprimiert worden wäre. Allerdings war dies nicht möglich, was als potentielle Ursache die per se sehr geringe Menge an GR β im Vergleich zu GR α haben könnte (Lewis-Tuffin und Cidlowski, 2006). Welche Rolle dem GR β zukommt und wie entscheidend das Verhältnis der vorliegenden Menge an GR α und GR β zu den jeweiligen Phänotypen beiträgt, gilt es durch weitere Studien näher zu untersuchen. Zusätzlich zu den bereits genannten Isoformen wurden in den vergangenen Jahren noch weitere Varianten des GR bekannt, zum Beispiel GR γ , die durch alternatives Spleißen, Polyadenylierung oder translationale Initiierung entstehen (Schmidt et al., 2004). Jedoch ist zu deren Funktion noch wenig bekannt und demzufolge wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht darauf eingegangen. Wie bereits angedeutet, könnten auch Mutationen im GR zu den unterschiedlichen Effekten geführt haben. Heck et al konnten mittels einer Dimerisierungs-defizienten Mutante des GR (GR^{dim}) nachweisen, dass trotz fehlender Dimerisierung des Rezeptors und fehlender Bindung an die GREs (glucocorticoid response elements), die Modulation der Genexpression durch Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren erhalten blieb (Heck et al., 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die GR^{dim} Mutanten, im Gegensatz zu GR^{-/-}-Mäusen, überlebensfähig sind, was die Relevanz der über die DNA-Bindungsaktivitäten des GR hinausgehenden Fähigkeiten belegt (Reichardt et al., 1998). Aufgrund der vielfältigen potentiellen Signalmechanismen der GC (s. Abb.1.3) ist anzunehmen, dass verschiedene Faktoren bei der Induktion von pro-proliferativen Effekten eine wichtige Rolle spielen.

4.3.2 Die Proteinkinase B/Akt und p38-MAPK

In den Untersuchungen im Hinblick auf zugrunde liegende Signalmechanismen in Zellen solider Tumoren konnte mittels Western Blot Analysen gezeigt werden, dass die Signalwege der beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK nach GC-Stimulation aktiviert vorlagen. Die biochemische Inhibition der beiden Kinasen, die mittels Western Blot Analysen überprüft wurde, führte zur Hemmung des GC-induzierten Tumorzellwachstum, was mittels repetitiver Mikroskopie gezeigt werden konnte.

Bisherige Veröffentlichungen setzen sich nur mit der funktionellen Rolle von Akt im Kontext der GC-vermittelten Resistenz gegenüber Apoptose auseinander, nicht jedoch der GC-induzierten Proliferation. Für die Induktion der Resistenzmechanismen wird für die Proteinkinase Akt eine wichtige Funktion postuliert (s. Tab.1.2). Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurde erst kürzlich ein weiteres Molekül entdeckt, dass unter anderem durch GC reguliert wird und im Zusammenhang mit Akt agiert. Dabei handelt es sich um das Protein GILZ (Glucocorticoid-induzierter Leucin-Zipper), ein intrazelluläres Protein, das in den meisten Geweben exprimiert wird und als wichtiger Mediator der GC-induzierten Wirkmechanismen gilt (Ayroldi und Riccardi, 2009). In Ovarialkarzinomzellen wurde GILZ als einer der zentralen Regulatoren der Tumorzellproliferation identifiziert. Das Protein war in allen untersuchten malignen Proben überexprimiert, was zur Aktivierung von Akt und beschleunigter Tumorzellproliferation führte (Redjimi et al., 2009). Allerdings wurde in jener Studie nicht näher untersucht, ob die Stimulation mit GC zu einer zusätzlichen Aktivierung von Akt führt. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zur Proteinkinase Akt und GC-induzierter Proliferation gehen somit einher mit den bisher postulierten Mechanismen und lassen vermuten, dass der Proteinkinase Akt eine tragende Rolle in der Induktion sowohl anti-apoptotischer als auch pro-proliferativer Effekte zukommt.

Wie bereits erwähnt, wurde die Proteinkinase p38-MAPK neben Akt als weiteres, in die GC-induzierte Proliferation involviertes Signalmolekül identifiziert. Die biochemische Inhibition der Kinase erfolgte mit 3 verschiedenen Pyridinylimidazol-basierten Inhibitoren. Diese blockieren spezifisch die α - und β -Isoform der Kinase, die im Vergleich zur γ - und δ -Isoform stärker und ubiquitär exprimiert wird und deren Funktion besser analysiert wurde (Bradham und McClay, 2006). Im Gegensatz zu Akt ist p38-MAPK im Allgemeinen als durch Stress induzierte Kinase bekannt, ihr wird jedoch in den vergangenen Jahren zunehmend eine tragende Rolle in der

Induktion von Überleben und Proliferation zugesprochen (Fernandes et al., 2004) und sie kann durch GC aktiviert werden (Kewalramani et al., 2008). Das Gegenteil der pro-proliferativen Effekte von p38-MAPK wurde für Lymphoidzellen gezeigt. Dabei wurde p38-MAPK als Schlüsselmolekül der GC-induzierten Apoptose identifiziert. Die Stimulation mit GC führte zu Apoptoseinduktion über die Aktivierung von p38-MAPK, die wiederum in einer Art Rückkopplungsmechanismus zu einer verstärkten Phosphorylierung des GR am Serinrest 211 führte (Miller et al., 2005). Diese Beispiele verdeutlichen, wie kontrovers die Datenlage beim Zusammenspiel von GC, p38-MAPK und dem induzierten Phänotyp ist. Es ist anzunehmen, dass p38-MAPK, ähnlich wie NF κ B, sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege aktivieren kann und dieser Phänotyp vom Zelltyp abhängig ist.

Im Gegensatz zur Aktivierung des GR, die bereits nach wenigen Minuten erfolgte, war die Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK im Durchschnitt erst nach etwa 2 - 4 h detektierbar. Die im Vergleich zum GR verzögerte Aktivierung der beiden Kinasen ließ die Vermutung aufkommen, dass es sich um einen indirekten Signalweg handelt. Infolgedessen wurde untersucht, ob es nach Stimulation mit GC zur Sekretion eines Wachstumsfaktors kam, der wiederum durch auto- oder parakrine Stimulation der Zellen zur Aktivierung von Akt bzw. p38-MAPK führte. Diese Vermutung ließ sich jedoch nicht eindeutig belegen, da die Stimulation mit konditioniertem Medium keinen klaren Hinweis auf das Vorhandensein sezernierter Wachstumsfaktoren lieferte. Ob die Ursache in technischen Schwierigkeiten lag oder ein anderer indirekter Signalweg zugrunde liegt, konnte somit nicht geklärt werden.

Wie es letztendlich zur Aktivierung der beiden Proteinkinasen nach GC-Stimulation kommt, ob beispielsweise über GR-abhängige transkriptionelle Signalmechanismen, gilt es noch eingehender zu untersuchen. Interessanterweise waren jedoch sowohl der Akt-Inhibitor per se als auch die p38-MAPK-Inhibitoren jeweils alleine in der Lage, die GC-induzierte Proliferation zu verhindern. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Kinasen in einem Signalkomplex zusammen vorliegen, sonst hätte man bei zwei völlig unabhängigen Signalwegen sowohl Akt als auch p38-MAPK gleichzeitig inhibieren müssen, um die GC-induzierte Proliferation zu verhindern. In Neutrophilen wurde von Rane et al ein Signalkomplex bestehend aus Akt, p38-MAPK, MK-2 (MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase-2) und Hsp27 dokumentiert. Dabei kam es p38-MAPK-induziert unter anderem zur Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch MK-2 (Rane et al., 2001). Weitere

Untersuchungen zu den Kinasen sind nötig, um deren Zusammenspiel zu verifizieren. Allerdings erst nach molekularer Herunterregulation, da diese eine höhere Spezifität als die biochemische Inhibition aufweist. Generell ist es denkbar, dass Kinasen eine wichtige Rolle spielen, da durch sie sowohl die anti-apoptotischen Effekte induziert werden könnten, zum Beispiel über Phosphorylierung von Bad oder Caspasen (Kurokawa und Kornbluth, 2009) als auch die pro-proliferativen durch ihre Fähigkeit, Überleben und Proliferation zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf pro-proliferative Signalwege gelegt. Wie bereits für die GC-induzierte Resistenz gegenüber Apoptose gezeigt, können eine Vielzahl unterschiedlicher Signalmoleküle dereguliert und involviert sein (Herr et al., 2009). Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, dass die pro-proliferativen Effekte der GC in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedlich vermittelt werden und nicht nur ein einzelner Signalweg, das heißt ein genereller Mechanismus, dafür verantwortlich ist.

4.4 Inhibition der Glucocorticoid-induzierten Proliferation in Zellen solider Tumoren

Einer der wichtigsten Aspekte der GC-induzierten, anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekte ist zweifelsohne, wie man diese hemmen kann. Die eine Möglichkeit ist, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt ausführlich erläutert, die zugrunde liegenden Signalwege zu analysieren und Wege der Inhibition zu finden. Weitere Möglichkeiten, den Tumorzelltod herbeizuführen und somit die GC- bzw. die Zytostatika-induzierte Proliferation zu verhindern, sind zum einen durch einen starken Apoptoseinduktor gegeben und zum anderen durch Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit konnte das für Vincristin (VCR) gezeigt werden, das zu der Gruppe der Vincaalkaloide gehört. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Daten haben belegt, dass VCR in der Lage war, Apoptose zu induzieren und die Vorinkubation mit Dex nicht zu dem sonst typischen Bild der GC-induzierten Apoptoseresistenz führte. Des Weiteren konnten auch die pro-proliferativen Effekte der GC durch Stimulation mit VCR gehemmt werden. Vincristin ist somit ein Beispiel für ein Zytostatikum, das in der Lage ist, die anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekte von GC zu inhibieren. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass GC so lange keine Proliferation in Zellen solider Tumoren auslösen, wie ein weiteres

Medikament effektiv Apoptose induziert. In den klinischen Kontext translatiert, legen diese Daten nahe, dass GC so lange ohne Bedenken eingesetzt werden können, wie ein parallel appliziertes Zytostatikum effektiv Apoptose induziert. Demzufolge wäre es ratsam, weitere Kombinationen *in vitro* und *in vivo* zu analysieren, um ein überschaubares Bild zu bekommen, welche Zytostatika in Kombination mit GC sicher eingesetzt werden können und bei welchen besser auf Alternativen zurückgegriffen werden sollte.

Wie bereits erwähnt, wurde als weitere Möglichkeit, den Tumorzelltod herbeizuführen und somit die GC- bzw. die Zytostatika-induzierte Proliferation zu verhindern, die Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Apoptose untersucht. Dies wurde durch die Expression des pro-apoptotischen Moleküls Caspase-3 in der Caspase-3-defizienten Mammakarzinomzelllinie MCF-7 erzielt. Hierdurch gelang es, die Zellen gegenüber Induktion von Apoptose zu sensitivieren. Die Zellen, die neben Caspase-3 auch copGFP exprimierten, wurden mittels ihrer grünen Fluoreszenz vor der Durchführung der Stimulationsexperimente sortiert. Allerdings betrug der Prozentsatz GFP-positiver und Caspase-3-exprimierender Zellen nach 4 Wochen nur etwa 50%, was durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Um die Sensitivierung der Zellen gegenüber Apoptose durch Expression von Caspase-3 noch deutlicher zeigen zu können, hätten die GFP-positiven Zellen ein zweites Mal sortiert werden müssen. Dadurch hätte man den Prozentsatz Caspase-3-exprimierender Zellen erhöhen können und somit den störenden Einfluss untransfizierter Zellen verhindert. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Expression eines pro-apoptotischen Proteins wie Caspase-3 die Tumorzellen gegenüber Apoptose sensitiviert.

Durch die gezielte molekulare Modulation von intrazellulären Signalwegen, aber auch durch klinisch einsetzbare Substanzen wie VCR, konnten folglich die anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekte inhibiert werden.

4.5 Bedeutung für die Tumortherapie

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestärken den Appell vieler anerkannter Wissenschaftler, den breit gefächerten Einsatz von GC in der Tumortherapie zu überdenken. Nicht nur die bereits bekannten anti-apoptotischen Effekte von GC, sondern darüber hinaus auch die in dieser Arbeit erstmals systematisch untersuchten pro-proliferativen Effekte von GC können zu einer geringeren Effizienz der Tumortherapie führen. Die Datenlage lässt vermuten, dass es durch einen

kooperativen Effekt beider Phänotypen zu einem Anstieg vitaler Tumorzellen und somit im Patienten zu einem beschleunigten Tumorwachstum kommen kann.

Von hoher klinischer Bedeutung ist jedoch erneut die Differenzierung zwischen hämatopoetischen und soliden Tumoren. Bei Ersteren konnte in der vorliegenden Arbeit und ebenso durch weitere publizierte Studien belegt werden, dass GC zumindest in etwa 50% der untersuchten primären Leukämiezellen von Kindern in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Dies entspricht einer hohen Effizienz der Tumorthherapie im klinischen Alltag. Noch dazu, wenn man bedenkt, wie viele verschiedene Mutationen einer Tumorentität zugrunde liegen können, weswegen ein Medikament häufig nur einem Bruchteil der Patienten helfen kann. Jedoch wird der Einsatz von GC dann kritisch, wenn GC-Resistenz auftritt, das heißt, es zu keiner Apoptoseinduktion kommt. Dann kann es unter Umständen durch GC zur Induktion der unerwünschten anti-apoptischen und pro-proliferativen Effekte in Leukämiezellen kommen, wie in dieser Arbeit belegt wurde. Grundsätzlich sollte man deswegen in der Klinik bedenken, dass durch diese paradoxen Effekte von GC in der Behandlung von Leukämiezellen ein Grad an Komplexität hinzukommt. Die Therapie kann nicht in das einfache Schema eingepasst werden, dass GC entweder in der Lage sind, Apoptose zu induzieren und dadurch das Tumorwachstum zu inhibieren oder keinen Effekt haben. Aufgrund der neuen Erkenntnisse sollte man als weitere Möglichkeit den paradoxen Phänotyp des GC-induzierten Überlebens und möglicherweise sogar der GC-induzierten Proliferation hämatopoetischer Tumorzellen bedenken. Im Fall hämatopoetischer Tumoren wäre möglicherweise die Suche nach adäquaten Parametern bzw. Biomarkern eine Option, anhand derer prognostische Aussagen zur Effizienz der Tumorthherapie mit GC und demzufolge eine individualisierte Therapie möglich wären. Oder die gezielte Kombination von GC mit weiteren Medikamenten. Beispielsweise konnten Bonapace et al zeigen, dass multiresistente ALL Zellen durch Kostimulation mit einem Antagonisten der Proteine der Bcl-2 Familie gegenüber GC-induzierter Apoptose resensitiviert werden konnten (Bonapace et al., 2010).

Im Fall solider Tumoren, wo GC als Adjuvantien eingesetzt werden, um schwere Nebenwirkungen wie Hirnödeme oder Erbrechen zu lindern, sind die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit von noch größerer klinischer Bedeutung. Die Daten belegen, dass GC nicht nur zur Induktion von Resistenz gegenüber Apoptose führen können, sondern dass sie zusätzlich noch das Tumorzellwachstum

beschleunigen können. Demzufolge könnte die adjuvante Behandlung mit GC im Patienten zwar zu einer Linderung der Nebenwirkungen, jedoch ebenso zu einer geringeren Effizienz der Tumorthherapie führen. Da GC in der Regel bereits prophylaktisch vor Beginn einer Chemo- oder Strahlentherapie oder auch in Chemotherapiepausen verabreicht werden, kann es insbesondere in dieser Phase zur Induktion der pro-proliferativen Effekte kommen. Da sich die GC-induzierte Proliferation zumindest in den *in vitro* Daten nicht auf eine Tumorentität oder einen gemeinsamen Ursprung zurückführen ließ, ist anzunehmen, dass es sich dabei um ein breit gefächertes, paradoxes Phänomen handelt. Diese Tatsache könnte zu einem neuen Problem im klinischen Alltag führen. Einerseits will man dem Patienten helfen und durch die Linderung der teilweise schweren Nebenwirkungen die Lebensqualität erhöhen, andererseits will man aber auch eine hohe Effizienz in der Tumorthherapie erzielen.

Einen Ausweg bietet die Suche nach Alternativen, die anstelle der GC appliziert werden können und weniger negative Eigenschaften aufweisen. Neben den GC gehören die 5-Hydroxytryptamin-3-Rezeptorantagonisten (Navari, 2009) und die Neurokinin-1-Rezeptorantagonisten (Diemunsch et al., 2009) zu den wichtigsten Substanzklassen, um Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen zu reduzieren. Man muss jedoch bedenken, dass der kombinierte Einsatz dieser Substanzen mit GC zu einer noch deutlicheren Reduktion der Nebenwirkungen, vor allem auch der Ödembildung, führt. Weitere klinische Studien sind notwendig, um zu definieren, wann im Hinblick auf die möglichen anti-apoptischen und pro-proliferativen Effekte der GC deren Nutzen die möglichen unerwünschten Wirkungen überwiegt. Eine weitere denkbare Option wäre der simultane Einsatz von Inhibitoren gegen Akt oder p38-MAPK, die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in der Lage waren, die GC-induzierte Proliferation zu verhindern. Das Potential solcher Inhibitoren wird derzeit in klinischen Studien untersucht und müsste zusätzlich im Kontext der adjuvanten Therapie mit GC analysiert werden.

Zusammenfassend unterstreichen die Daten dieser Arbeit, dass GC nicht nur die erwünschten Effekte wie Apoptoseinduktion in der Behandlung hämatopoetischer Tumoren bzw. Reduktion der Nebenwirkungen in der Therapie solider Tumoren haben, sondern ebenso unerwünschte Phänotypen wie Resistenz oder Proliferation induzieren können (s. Abb.4.1).

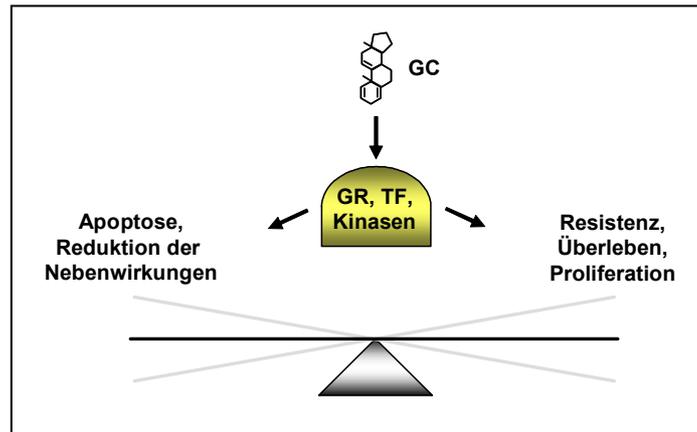


Abb.4.1 Überblick der potentiellen GC-Effekte

GC, Glucocorticoid; GR, Glucocorticoidrezeptor; TF, Transkriptionsfaktoren

Jedes Jahr unterzieht sich eine Vielzahl von Menschen einer Tumorthherapie und die meisten von ihnen werden begleitend mit GC behandelt. Generell sollte in Anbetracht der potentiell antagonistischen Effekte von GC auf die Effizienz der Tumorthherapie der breit gefächerte Einsatz von GC kritisch überdacht werden und eine sorgfältige Abwägung von Nutzen und Risiko erfolgen. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen den Bedarf an weiteren präklinischen sowie klinischen Studien nahe, die sich mit den anti-apoptotischen und pro-proliferativen Effekten von GC während der Tumorthherapie auseinandersetzen und letztendlich einen effektiveren und sichereren Einsatz von GC in der Tumorthherapie ermöglichen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Glucocorticoide (GC) wie Dexamethason (Dex) werden in der Tumorthherapie häufig eingesetzt, zum einen als Zytostatika zur Behandlung hämatopoetischer Tumoren und zum anderen als Adjuvantien zur Reduktion von Nebenwirkungen in der Behandlung solider Tumoren. In den vergangenen Jahren wurde jedoch gezeigt, dass GC die Wirkung von Zytostatika auf Zellen solider Tumoren abschwächen können. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe legten nahe, dass GC in der Lage sind, als bisher unbekannte Wirkung die Proliferation von Tumorzellen zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen erstmals systematisch untersucht. Das beschleunigte Tumorzellwachstum wurde mittels repetitiver Mikroskopie, Impedanzanalyse, Bestimmung der DNA-Syntheserate, der enzymatischen Aktivität sowie der absoluten Zellzahl validiert. Eine Quantifizierung ergab, dass 6 von 10 Zelllinien verschiedenster solider Tumoren mit Proliferation auf GC reagierten. Ein präklinischer Tierversuch mit einer Lungenkarzinomzelllinie zeigte pro-proliferative Effekte der GC *in vivo*. Des Weiteren wurden 139 primäre Proben von Kindern mit akuter Leukämie *in vitro* getestet und bei 15% der Proben ein Überlebensvorteil der Tumorzellen durch GC gemessen; eine Probe zeigte GC-induzierte Proliferation. Knockdown-Studien in Zellen solider Tumoren belegten eine wichtige Rolle des Glucocorticoidrezeptors für die GC-induzierte Proliferation, welche des Weiteren durch die beiden Proteinkinasen Akt und p38-MAPK vermittelt wurde. GC-induzierte Proliferation konnte durch Induktion von Apoptose verhindert werden, die einerseits durch klinisch einsetzbare Substanzen wie beispielsweise Vincristin herbeigeführt wurde, andererseits durch lentivirale Transfektion und induzierbare Expression des pro-apoptotischen Moleküls Caspase-3.

Zusammenfassend charakterisiert die vorliegende Arbeit GC-induzierte Proliferation von Tumorzellen als häufige und weitverbreitete, neue, Tumorzellgerichtete Nebenwirkung von GC. Die Daten sprechen für einen zurückhaltenden Einsatz von GC während der Tumorthherapie sowie für die Durchführung weiterführender präklinischer und klinischer Studien, die einen effektiveren und sichereren Einsatz von GC während der Tumorthherapie ermöglichen.

6 SUMMARY

Glucocorticoids (GCs) like Dexamethasone (Dex) are widely used in cancer patients as cytotoxic drugs in hematopoietic tumors or as adjuvants in solid tumors reducing therapy-related adverse effects. Nevertheless, GCs are accused to reduce anti-cancer treatment efficiency in solid tumors. Preliminary data of our group suggested that GCs might exert a yet unknown adverse effect by inducing tumor cell proliferation.

The present work provides the first systematic study of pro-proliferative effects of GCs on tumor cells. Enhanced tumor cell growth was validated by repetitive microscopy, impedance analysis, DNA synthesis rate, enzymatic activity as well as absolute cell number. Upon quantification, 6 out of 10 cell lines from solid tumors of different origins showed Dex-induced proliferation. *In vivo*, Dex significantly promoted tumor cell growth in a preclinical mouse model of lung carcinoma. When the effect of GCs was tested on 139 fresh primary, patient-derived acute childhood leukemia cells *in vitro*, 15% of samples showed increased tumor cell survival by GCs and one sample showed GC-induced proliferation. Knockdown studies in cells of solid tumors showed that GC-induced proliferation was mediated by the glucocorticoid receptor and further downstream by the protein kinases Akt and p38-MAPK. GC-induced proliferation was inhibited by induction of apoptosis either by clinically used drugs such as Vincristine, or by lentiviral transduction and inducible expression of the pro-apoptotic molecule Caspase-3.

Taken together, the present work identified GC-induced proliferation of tumor cells as a frequent, broad-spread, new, tumor cell directed side effect of GCs. Of direct translational relevance, our data argue towards a restricted use of GCs during anti-cancer therapy and strengthen the need for preclinical and clinical studies allowing a more effective and safer application of GCs during anti-cancer therapy.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agosin, M., R. Christen, O. Badinez, G. Gasic, A. Neghme, O. Pizarro, and A. Jarpa, 1952, "Cortisone-induced metastases of adenocarcinoma in mice," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 128-131.
- Ayroldi, E. and C. Riccardi, 2009, "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action," *FASEB J.* **23**, 3649-3658.
- Baader, E., A. Toloczko, U. Fuchs, I. Schmid, C. Beltinger, H. Ehrhardt, K. M. Debatin, and I. Jeremias, 2005, "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects," *Cancer Res.* **65**, 7888-7895.
- Bamberger, C. M., A. M. Bamberger, C. M. de, and G. P. Chrousos, 1995, "Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans," *J. Clin. Invest* **95**, 2435-2441.
- Banaszynski, L. A., L. C. Chen, L. A. Maynard-Smith, A. G. Ooi, and T. J. Wandless, 2006, "A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules," *Cell* **126**, 995-1004.
- Berger A.M., R.A. Clark-Snow, 1997, "Adverse effects of treatment: nausea and vomiting", In *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, DeVita V., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds) **5**, 2705– 2712.
- Bloom, J. W., J. Chako, I.C. Lohman, M. Halone, F.D. Martinez, R.L. Miesfeld, 2004, "Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids," *Apoptosis* **9**, 97-104.
- Bonapace, L., B. C. Bornhauser, M. Schmitz, G. Cario, U. Ziegler, F. K. Niggli, B. W. Schafer, M. Schrappe, M. Stanulla, and J. P. Bourquin, 2010, "Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance," *J. Clin. Invest.*
- Bourcier, T., V. Borderie, P. Forgez, A. Lombet, W. Rostene, and L. Laroche, 1999, "In vitro effects of dexamethasone on human corneal keratocytes," *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1061-1070.
- Bourcier, T., P. Forgez, V. Borderie, S. Scheer, W. Rostene, and L. Laroche, 2000, "Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone," *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 4133-4141.
- Bradham, C. and D. R. McClay, 2006, "p38 MAPK in development and cancer," *Cell Cycle* **5**, 824-828.
- Brady, M. E., G. P. Sartiano, S. L. Rosenblum, N. E. Zaglama, and C. T. Bauguess, 1987, "The pharmacokinetics of single high doses of dexamethasone in cancer patients," *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **32**, 593-596.
- Braunschweiger, P. G., H. L. Ting, and L. M. Schiffer, 1982, "Receptor-dependent antiproliferative effects of corticosteroids in radiation-induced fibrosarcomas and implications for sequential therapy," *Cancer Res.* **42**, 1686-1691.

- Broome, H. E., A. L. Yu, M. Diccianni, B. M. Camitta, B. P. Monia, and N. M. Dean, 2002, "Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes T-cell acute lymphoblastic leukemia cells to chemotherapeutic drugs," *Leuk. Res.* **26**, 311-316.
- Buttgereit, F., R. H. Straub, M. Wehling, and G. R. Burmester, 2004, "Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action," *Arthritis Rheum.* **50**, 3408-3417.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed, 1998, "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation," *Science* **282**, 1318-1321.
- Cato, A. C., A. Nestl, and S. Mink, 2002, "Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways," *Sci. STKE.* **2002**, re9.
- Charles, B., P. Schild, P. Steer, D. Cartwright, and T. Donovan, 1993, "Pharmacokinetics of dexamethasone following single-dose intravenous administration to extremely low birth weight infants," *Dev. Pharmacol. Ther.* **20**, 205-210.
- Chen, W., T. Dang, R. D. Blind, Z. Wang, C. N. Cavaotto, A. B. Hittelman, I. Rogatsky, S. K. Logan, and M. J. Garabedian, 2008, "Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression," *Mol. Endocrinol.* **22**, 1754-1766.
- Chen, Y. X., Z. B. Li, F. Diao, Y. Wang, and J. Lu, 2006, "[Mechanism of inhibiting proliferation of human ovarian cancer cells of the line HO-8910 by dexamethasone: the role of RhoB signaling pathway]," *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* **86**, 1400-1404.
- Chin, L. and J. W. Gray, 2008, "Translating insights from the cancer genome into clinical practice," *Nature* **452**, 553-563.
- Chu, B. W., L. A. Banaszynski, L. C. Chen, and T. J. Wandless, 2008, "Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains," *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5941-5944.
- Coates, A., C. F. Dillenbeck, D. R. McNeil, S. B. Kaye, K. Sims, R. M. Fox, R. L. Woods, G. W. Milton, J. Solomon, and M. H. Tattersall, 1983, "On the receiving end--II. Linear analogue self-assessment (LASA) in evaluation of aspects of the quality of life of cancer patients receiving therapy," *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19**, 1633-1637.
- Craxton, A., G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs, and E. A. Clark, 1998, "p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes," *J. Immunol.* **161**, 3225-3236.
- Cuenda, A. and S. Rousseau, 2007, "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases," *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1358-1375.
- Czock, D., F. Keller, F. M. Rasche, and U. Haussler, 2005, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids," *Clin. Pharmacokinet.* **44**, 61-98.

- Diemunsch, P., G. P. Joshi, and J. F. Brichant, 2009, "Neurokinin-1 receptor antagonists in the prevention of postoperative nausea and vomiting," *Br. J. Anaesth.* **103**, 7-13.
- Dovio, A., M. L. Sartori, F. S. De, S. Mussino, P. Perotti, L. Saba, G. Abbadessa, S. Racca, and A. Angeli, 2009, "Differential expression of determinants of glucocorticoid sensitivity in androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer cell lines," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **116**, 29-36.
- Drechsler S. und R. Bauer, 1995, "5-HT₃-Rezeptorantagonisten", *Arzneimitteltherapie* **8**, 224–235.
- Ehrhardt, H., S. Fulda, I. Schmid, J. Hiscott, K. M. Debatin, and I. Jeremias, 2003, "TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB," *Oncogene* **22**,3842-3852.
- Ehrhardt, H., S. Hacker, S. Wittmann, M. Maurer, A. Borkhardt, A. Toloczko, K. M. Debatin, S. Fulda, and I. Jeremias, 2008, "Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells," *Oncogene* **27**, 783-793.
- Evans-Storms, R. B. and J. A. Cidlowski, 2000, "Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB," *Endocrinology* **141**, 1854-1862.
- Fernandes, D. J., C. E. Ravenhall, T. Harris, T. Tran, R. Vlahos, and A. G. Stewart, 2004, "Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific," *Br. J. Pharmacol.* **142**, 1182-1190.
- Frankfurt, O. and S. T. Rosen, 2004, "Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies:updates,"*Curr. Opin. Oncol.* **16**,553-63.
- Freshney, R. I., A. Sherry, M. Hassanzadah, M. Freshney, P. Crilly, and D. Morgan, 1980, "Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids," *Br. J. Cancer* **41**, 857-866.
- Ganguli, G., J. Back, S. Sengupta, and B. Wasylyk, 2002, "The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors," *EMBO Rep.* **3**, 569-574.
- Gassler, N., C. Zhang, T. Wenger, P. A. Schnabel, H. Dienemann, K. M. Debatin, J. Mattern, and I. Herr, 2005, "Dexamethasone-induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated ex vivo," *Br. J. Cancer* **92**, 1084-1088.
- Goldberg, J. M., L. B. Silverman, D. E. Levy, V. K. Dalton, R. D. Gelber, L. Lehmann, H. J. Cohen, S. E. Sallan, and B. L. Asselin, 2003, "Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience," *J. Clin. Oncol.* **21**, 3616-3622.
- Grandage, V. L., R. Gale, D. Linch, A. Khwaja, 2005, "PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NFkB, MAPK and p53 pathways," *Leukemia* **19**, 586-94.

- Grunberg, S. M., 2007, "Antiemetic activity of corticosteroids in patients receiving cancer chemotherapy: dosing, efficacy, and tolerability analysis," *Ann. Oncol.* **18**, 233-240.
- Guo, W. X. and T. Antakly, 1995, "AIDS-related Kaposi's sarcoma: evidence for direct stimulatory effect of glucocorticoid on cell proliferation," *Am. J. Pathol.* **146**, 727-734.
- Hafezi-Moghadam, A. *et al.*, 2002, "Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase," *Nat. Med.* **8**, 473-479.
- Hakem, R. *et al.*, 1998, "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo," *Cell* **94**, 339-352.
- Heck, S., M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich, and A. C. Cato, 1994, "A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1," *EMBO J.* **13**, 4087-4095.
- Helmberg, A., N. Auphan, C. Caelles, and M. Karin, 1995, "Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor," *EMBO J.* **14**, 452-460.
- Herr, I., M. W. Buchler, and J. Mattern, 2009, "Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors," *Results Probl. Cell Differ.* **49**, 191-218.
- Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. B. Thompson, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans, 1985, "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA," *Nature* **318**, 635-641.
- Iversen, H. G. and G. H. Hjort, 1958, "The influence of corticoid steroids on the frequency of spleen metastases in patients with breast cancer," *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **44**, 205-212.
- Janicke, R. U., 2009, "MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3," *Breast Cancer Res. Treat.* **117**, 219-221.
- Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta, and P. Herrlich, 1990, "Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone," *Cell* **62**, 1189-1204.
- Kaal, E. C. and C. J. Vecht, 2004, "The management of brain edema in brain tumors," *Curr. Opin. Oncol.* **16**, 593-600.
- Kewalramani, G., P. Puthanveetil, M. S. Kim, F. Wang, V. Lee, N. Hau, E. Beheshti, N. Ng, A. Abrahani, and B. Rodrigues, 2008, "Acute dexamethasone-induced increase in cardiac lipoprotein lipase requires activation of both Akt and stress kinases," *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **295**, E137-E147.

- Khawaja, A., P. Rodriguez-Viciano, S. Wennstrom, P. H. Warne, and J. Downward, 1997, "Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway," *EMBO J.* **16**, 2783-2793.
- Kino, T., I. Manoli, S. Kelkar, Y. Wang, Y. A. Su, and G. P. Chrousos, 2009, "Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 671-675.
- Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, R.A. Flavell, 1998, "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9," *Cell* **94**, 325-37.
- Kurokawa, M. and S. Kornbluth, 2009, "Caspases and kinases in a death grip," *Cell* **138**, 838-854.
- Langeveld, C. H., M. P. van Waas, J. C. Stoof, W. Sutanto, E. R. de Kloet, J. G. Wolbers, and J. J. Heimans, 1992, "Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone," *J. Neurosci. Res.* **31**, 524-531.
- Lewis-Tuffin, L. J. and J. A. Cidlowski, 2006, "The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1069**, 1-9.
- Li, S., M. Mawal-Dewan, V. J. Cristofalo, and C. Sell, 1998, "Enhanced proliferation of human fibroblasts, in the presence of dexamethasone, is accompanied by changes in p21Waf1/Cip1/Sdi1 and the insulin-like growth factor type 1 receptor," *J. Cell Physiol* **177**, 396-401.
- Liddle, G. W., 1961, "Clinical pharmacology of the anti-inflammatory steroids," *Clin. Pharmacol. Ther.* **2**, 615-635.
- Limbourg, F. P. and J. K. Liao, 2003, "Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor," *J. Mol. Med.* **81**, 168-174.
- Mannello, F. and G. A. Tonti, 2007, "Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!," *Stem Cells* **25**, 1603-1609.
- McKay, L. I. and J. A. Cidlowski, 1998, "Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism," *Mol. Endocrinol.* **12**, 45-56.
- Miller, A. L., M. S. Webb, A. J. Copik, Y. Wang, B. H. Johnson, R. Kumar, and E. B. Thompson, 2005, "p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211," *Mol. Endocrinol.* **19**, 1569-1583.

- Mitchelson, F., 1992, "Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part I)," *Drugs* **43**, 295-315.
- Moutsatsou, P. and A. G. Papavassiliou, 2008, "The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer," *J. Cell Mol. Med.* **12**, 145-163.
- Münstedt, K., D. Borces, M. K. Bohlmann, M. Zygmunt, and G. R. von, 2004, "Glucocorticoid administration in antiemetic therapy: is it safe?," *Cancer* **101**, 1696-1702.
- Navari, R. M., 2009, "Antiemetic control: toward a new standard of care for emetogenic chemotherapy," *Expert. Opin. Pharmacother.* **10**, 629-644.
- Nicolaides, N. C., Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos, and E. Charmandari, 2010, "The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function," *Steroids* **75**, 1-12.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi, 1991, "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *J. Immunol. Methods* **139**, 271-279.
- Nishimura, K. *et al.*, 2001, "Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer," *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1739-1746.
- Novac, N., D. Baus, A. Dostert, and T. Heinzel, 2006, "Competition between glucocorticoid receptor and NFkappaB for control of the human FasL promoter," *FASEB J.* **20**, 1074-1081.
- Nuutinen, U., V. Postila, M. Matto, J. Eeva, A. Ropponen, M. Eray, P. Riikonen, J. Pelkonen, 2006, "Inhibition of PI3-kinase-Akt pathway enhances dexamethasone-induced apoptosis in a human follicular lymphoma cell line," *Exp. Cell Res.* **312**, 322-30.
- Oakley, R. H., M. Sar, and J. A. Cidlowski, 1996, "The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function," *J. Biol. Chem.* **271**, 9550-9559.
- Pang, D., M. Kocherginsky, T. Krausz, S. Y. Kim, and S. D. Conzen, 2006, "Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis," *Cancer Biol. Ther.* **5**, 933-940.
- Petersen, A., T. Carlsson, J. O. Karlsson, S. Jonhede, and M. Zetterberg, 2008, "Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture," *Mol. Vis.* **14**, 1344-1352.
- Petrella, A., S. F. Ercolino, M. Festa, A. Gentilella, A. Tosco, S. D. Conzen, and L. Parente, 2006, "Dexamethasone inhibits TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells via Bcl-xL induction," *Eur. J. Cancer* **42**, 3287-3293.
- Platanias, L. C., 2003, "Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies," *Blood* **101**, 4667-79.

- Pratt, W. B., 1993, "The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor," *J. Biol. Chem.* **268**, 21455-58.
- Ramdas, J. and J. M. Harmon, 1998, "Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells," *Endocrinology* **139**, 3813-3821.
- Rane, M. J., P. Y. Coxon, D. W. Powell, R. Webster, J. B. Klein, W. Pierce, P. Ping, and K. R. McLeish, 2001, "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils," *J. Biol. Chem.* **276**, 3517-3523.
- Rasmuson, T., B. Ljungberg, K. Grankvist, J. Jacobsen, and T. Olsson, 2001, "Increased serum cortisol levels are associated with high tumour grade in patients with renal cell carcinoma," *Acta Oncol.* **40**, 83-87.
- Redjimi, N., F. Gaudin, C. Touboul, D. Emilie, M. Pallardy, A. Biola-Vidamment, H. Fernandez, S. Prevot, K. Balabanian, and V. Machelon, 2009, "Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer," *Mol. Cancer* **8**, 83.
- Reichardt, H. M. *et al.*, 1998, "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival," *Cell* **93**, 531-541.
- Rogatsky, I. and L. B. Ivashkiv, 2006, "Glucocorticoid modulation of cytokine signaling," *Tissue Antigens* **68**, 1-12.
- Roila, F., M. Tonato, E. Ballatori, and F. A. Del, 1996, "Comparative studies of various antiemetic regimens," *Support. Care Cancer* **4**, 270-280.
- Sanger, G. J., 2004, "Neurokinin NK1 and NK3 receptors as targets for drugs to treat gastrointestinal motility disorders and pain," *Br. J. Pharmacol.* **141**, 1303-1312.
- Sasson, R., V. Shinder, A. Dantes, A. Land, and A. Amsterdam, 2003, "Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1047-1056.
- Scheinman, R. I., A. Gualberto, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski, and A. S. Baldwin, Jr., 1995, "Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors," *Mol. Cell Biol.* **15**, 943-953.
- Schmidt, S., J. Rainer, C. Ploner, E. Presul, S. Riml, and R. Kofler, 2004, "Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance," *Cell Death. Differ.* **11 Suppl 1**, S45-S55.
- Sionov, R. V., 2006, "Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria," *Cell Cycle* **5**, 1017-26.
- Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, 2005, "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival," *J. Cell Mol. Med.* **9**, 59-71.

- Sorensen, H. T., L. Mellekjær, G. L. Nielsen, J. A. Baron, J. H. Olsen, and M. R. Karagas, 2004, "Skin cancers and non-hodgkin lymphoma among users of systemic glucocorticoids: a population-based cohort study," *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 709-711.
- Sui, M., F. Chen, Z. Chen, and W. Fan, 2006, "Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors," *Int. J. Cancer* **119**, 712-717.
- Tissing et al., W. J., J.P. Meijerink, M.L. den Boer, R. Pieters 2003, "Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia," *Leukemia* **17**, 17-25.
- Tsuei, S. E., R. G. Moore, J. J. Ashley, and W. G. McBride, 1979, "Disposition of synthetic glucocorticoids. I. Pharmacokinetics of dexamethasone in healthy adults," *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **7**, 249-264.
- Wang, Z., M. H. Malone, H. He, K. S. McColl, and C. W. Distelhorst, 2003, "Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.* **278**, 23861-23867.
- Wolf, J., P. Spear, R. Yesner, and M. E. Patno, 1960, "Nitrogen mustard and the steroid hormones in the treatment of inoperable bronchogenic carcinoma," *Am. J. Med.* **29**, 1008-1016.
- Woo, P. L., H. H. Cha, K. L. Singer, and G. L. Firestone, 1996, "Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor-beta in mouse mammary epithelial cells," *J. Biol. Chem.* **271**, 404-412.
- Yong, H. Y., M. S. Koh, and A. Moon, 2009, "The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer," *Expert. Opin. Investig. Drugs* **18**, 1893-1905.
- Zhang, C. *et al.*, 2006, "Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma," *Int. J. Oncol.* **29**, 1295-1301.
- Zhou, J. and J. A. Cidlowski, 2005, "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses," *Steroids* **70**, 407-417.
- Zibera, C., N. Gibelli, G. Butti, P. Pedrazzoli, M. Carbone, L. Magrassi, and C. G. Robustelli della, 1992, "Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors," *Anticancer Res.* **12**, 1571-1574.
- Zwaan C. M., G.J. Kaspers, R. Pieters, N.L. Ramakers-Van Woerden, M.L. den Boer, R. Wunsche, M.M. Rottier, K. Hahlen, E.R. van Wering, G.E. Janka-Schaub, U. Creutzig, A.J. Veerman, 2000, "Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia," *Blood* **96**, 2879-86.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	ALL mit B-lymphozytärer Differenzierung
bps	Base pairs
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
c-ALL	Common ALL
cDNA	Complementary DNA
cGR	Cytosolischer GR
d	Tag
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DD	Destabilisierende Domäne
Dex	Dexamethason
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	Doppelsträngige RNA
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
Epi	Epirubicin
EtBR	Ethidiumbromid
FKS	Fötale Kälberserum
for	Forward
FSC	Forward scatter
g	Gramm
G	Guanin
GC	Glucocorticoid
GFP	Green fluorescent protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid responsive element
GSK-3 α/β	Glykogensynthasekinase-3 α/β
h	Hora, Stunde
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	Horse radish peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LC	Light Cycler

M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mGR	Membran-gebundener GR
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
NFκB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK	Neurokinin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NR3C1	Nuclear receptor superfamily 3, group C, member 1
NTD	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
p38-MAPK	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPC	Plasma peak concentration
Pred	Prednisolon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Real Time-PCR
rev	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Runden pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
siRNA	Small interfering RNA
SOB	Super Optimal Broth
SSC	Sideward scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-ALL	ALL mit T-lymphozytärer Differenzierung
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit
V	Volt
VCR	Vincristin
Wst	Water soluble tetrazolium

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Strukturformel von Cortisol und zwei synthetischen Glucocorticoiden.....	2
Abb.1.2	Aufbau des Glucocorticoidrezeptors.....	8
Abb.1.3	Potentielle Signalmechanismen der Glucocorticoide.....	10
Abb.2.1	Eingesetzte Vektoren.....	35
Abb.3.1.1	Dexamethason-induzierte Apoptoseresistenz in MDA-MB-231 Zellen.....	49
Abb.3.1.2	Dexamethason-induzierte Apoptoseresistenz in MCF-7 Zellen.....	50
Abb.3.1.3	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CADO Zellen.....	52
Abb.3.1.4	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CALU-6 Zellen.....	52
Abb.3.1.5	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von MCF-7 Zellen.....	53
Abb.3.1.6	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von MDA-MB-231 Zellen....	53
Abb.3.1.7	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von RH-30 Zellen.....	54
Abb.3.1.8	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von SHEP Zellen.....	54
Abb.3.1.9	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum von CALU-6 Zellen.....	56
Abb.3.1.10	Ermittlung des Tumorzellwachstums anhand elektrischer Impedanz.....	57
Abb.3.1.11	Dexamethason-induzierte Zellzahlerhöhung.....	58
Abb.3.1.12	Dexamethason-induzierte Proliferation von CALU-6 Zellen.....	59
Abb.3.1.13	Dexamethason-induziertes Tumorzellwachstum <i>in vivo</i> im Tierversuch.....	61
Abb.3.2.1	GC-induzierter Phänotyp primärer Leukämiezellen.....	63
Abb.3.2.2	Glucocorticoid-induzierte Proliferation primärer Leukämiezellen.....	64
Abb.3.2.3	Korrelationsanalyse der Daten beider Glucocorticoide.....	65
Abb.3.2.4	Kastengrafikanalyse der Phänotypen in verschiedenen Leukämiesubformen.....	66
Abb.3.3.1	Einfluss von Dexamethason auf Tumorzellwachstum GR-negativer LNCaP Zellen.....	69
Abb.3.3.2	Unterschiedliche Expression des GR in den untersuchten Zelllinien.....	70

Abb.3.3.3	Dexamethason-induzierte Aktivierung des GR.....	71
Abb.3.3.4	Dexamethason-induzierte Aktivierung des GR.....	72
Abb.3.3.5	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Kontroll-siRNA AF488.....	74
Abb.3.3.6	Etablierung der qRT-PCR mittels UPL-System im LC480.....	75
Abb.3.3.7	Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz in MCF-7 Zellen.....	76
Abb.3.3.8	Herunterregulation des GR mittels RNA-Interferenz in RH-30 Zellen.....	77
Abb.3.3.9	Inhibition der Dex-induzierten Proliferation mittels GR-spezifischer siRNA....	78
Abb.3.3.10	Dexamethason-induzierte Phosphorylierung von Akt und p38-MAPK in MCF-7 Zellen.....	80
Abb.3.3.11	Inhibition der Dexamethason-induzierten Proliferaton durch Akt-Inhibitor.....	82
Abb.3.3.12	Inhibition der Dexamethason-induzierten Proliferaton durch p38-MAPK- Inhibitoren.....	83
Abb.3.3.13	Stimulation mit konditioniertem Überstand von Dex-behandelten Zellen.....	85
Abb.3.4.1	Apoptoseinduktion durch Vincristin in CALU-6 Zellen.....	88
Abb.3.4.2	Inhibition des Tumorwachstums durch Vincristin <i>in vivo</i>	89
Abb.3.4.3	Schema des lentiviralen Transfervektors mit DD-Caspase-3.....	91
Abb.3.4.4	Detektion der grünen Fluoreszenz stabil transfizierter GFP-positiver MCF-7 Zellen.....	92
Abb.3.4.5	Shield-1-abhängige Expression des Fusionsproteins DD-Caspase-3.....	93
Abb.3.4.6	Shield-1-abhängige Expression von DD-Casp3 in 0 und 10% FKS.....	94
Abb.3.4.7	Shield-1-abhängige Expression von DD-Casp3 über 48 h stabil.....	95
Abb.3.4.8	Resensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose durch Shield-1-abhängige Expression von Caspase-3.....	97
Abb.3.4.9	Resensitivierung von MCF-7 Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose durch Shield-1-abhängige Expression von Caspase-3.....	98
Abb.4.1	Überblick der potentiellen GC-Effekte.....	113

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1.1	Unterschiedliche Glucocorticoid-Potenz und Plasmahalbwertszeit.....	2
Tab.1.2	Potentiell involvierte Signalwege und -moleküle.....	12
Tab.2.1	Eingesetzte Pufferlösungen.....	22
Tab.2.2	Eingesetzte Stimulantien und Inhibitoren.....	23
Tab.2.3	Eingesetzte Antikörper für Immundetektion.....	23
Tab.2.4	Eingesetzte Enzyme.....	24
Tab.2.5	Eingesetzte Primer und Hybridisierungssonden.....	24
Tab.2.6	Eingesetzte Zelllinien.....	25
Tab.2.7	Behandlungsschemen der 4 verschiedenen Gruppen des <i>in vivo</i> - Experimentes.....	32
Tab.3.1	Übersicht aller untersuchten Tumorzelllinien.....	55

8.4 Danksagung

Frau PD Dr. Irmela Jeremias danke ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe des interessanten Themas. Sie hat mich in den vergangenen Jahren stets unterstützt und hat sich immer Zeit für Fragen aller Art genommen. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen sowie darüber hinaus gehende Unterhaltungen haben mich in meiner Arbeit und auch persönlich enorm vorangebracht.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve, möchte ich ebenso von ganzem Herzen danken, weil er meinen Werdegang sehr geprägt hat. Durch ihn und seine damaligen Mitarbeiter, insbesondere Dr. Deborah Buk, habe ich die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten entdeckt.

Herrn PD Dr. Axel Lorentz danke ich vielmals, dass er sich bereit erklärt hat, als dritter Prüfer diese Arbeit zu begutachten.

Unserem Abteilungsleiter Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und allen Mitarbeitern des Helmholtz Zentrums München möchte ich für die Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen danken. Herrn PD Dr. Eberhard Amtmann des Deutschen Krebsforschungszentrums und seinen Mitarbeitern, danke ich für die Durchführung des Tierversuchs.

Ein großer Dank geht an meine Kollegen Dr. Catarina Alves, Ulrike Borgmeier, Dr. Harald Ehrhardt, Volker Groß, Michaela Grunert, Dr. Amparo Hausherr-Bohn, Ines Höfig, Liliana Mura, Katja Schneider, Dr. Nadia Terziyska, die zu der freundschaftlichen und harmonischen Atmosphäre im Labor beigetragen haben. Die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung hat selbst frustrierende Laborphasen erleichtert und es mir ermöglicht, meine Arbeit mit viel Freude durchzuführen. Vielen Dank auch an alle Medizindoktoranden, insbesondere Najla Kohistani, für das Interesse an unserer Arbeit. Meiner Vorgängerin Eva Böckler danke ich recht herzlich für die vorhergehenden Arbeiten, auf denen diese Arbeit aufbaut. Ebenfalls ein Dankeschön an alle Mitglieder des Labors, die vor meinem Eintritt ins Labor am Projekt der primären Leukämiezellen mitgearbeitet haben.

Meinen Freunden und meinem Freund Hans danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung. Sie alle haben mir stets zugehört, mich aufgeheitert sowie darin bestärkt, diesen Weg zu gehen.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mir stets den Rücken frei gehalten und mir diese Ausbildung ermöglicht haben. Ich weiß, dass meine Familie allzeit für mich da ist und ich mich immer auf sie verlassen kann.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sibylle Gündisch

geboren am 01.11.1980 in Hermannstadt / Rumänien

deutsch

Ausbildungsweg:

- 01/2007 - dato **Promotion**
Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Abteilung Genvektoren, Nachwuchsgruppe Apoptose PD Dr. med. Irmela Jeremias, München
Titel: Glucocorticoid-induziertes Wachstum von Tumorzellen: Systematische Quantifizierung, Signalmechanismen und Inhibition
- 01/2006 - 12/2006 **Diplomarbeit**
Universität Hohenheim, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve, Stuttgart
Titel: „Die funktionelle Bedeutung des GPI-Ankers am CNTF-Rezeptor“
- 10/2001 - 12/2006 **Studium der Ernährungswissenschaften**
Schwerpunkt: Biochemie; Universität Hohenheim, Stuttgart
- 10/2000 - 07/2001 **Studium der Chemie**
Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 09/1991 - 07/2000 **Gymnasium**
Ernst-Sigle-Gymnasium, Kornwestheim

Publikationsliste:

- 01/2010 “Dexamethasone - a tumor growth promoting drug”
Sibylle Gündisch, Eva Baader, Uta Behrends, Eberhard Amtmann, Harald Ehrhardt, Irmela Jeremias
Veröffentlichung eingereicht beim “British Journal of Cancer”; in Revision
- 05/2008 EMBO Kongress - Zelluläre Signaltransduktion und molekulare Medizin; Dubrovnik, Kroatien
Posterpräsentation, Titel: „Dexamethasone-induced activation of p38-MAPK and Akt“
- 11/2006 10. wissenschaftlicher Kongress der Gesellschaft für Signaltransduktion; Weimar
Vortrag und Posterpräsentation, Titel: „Who directs apical sorting of the CNTF-R in polar cells: its GPI-anchor or N-glycans?“

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

**Glucocorticoid-induziertes Wachstum von Tumorzellen:
Systematische Quantifizierung, Signalmechanismen und Inhibition**

entspricht den Anforderungen zur Erlangung des Doktorgrades rerum naturalis in der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim. Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet.

München, den 29.03.2010

Ort, Datum

Unterschrift