
Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Auswirkungen einer Proteinkinase CK2-Inhibition auf Prostatazellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2006

vorgelegt von

Andrea Hessenauer

geboren am 6. Februar 1978 in Homburg/Saar

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Auswirkungen einer Proteinkinase CK2-Inhibition auf Prostatazellen	1
1.2 Effects of inhibition of protein kinase CK2 on prostate cells	3
2. Einleitung	5
2.1 Die Proteinkinase CK2	6
2.2 Bedeutung der CK2 für das Prostatakarzinom	9
2.3 Einführung in die Apoptose	10
2.4 Inhibitoren der Proteinkinase CK2.....	12
2.5 Fragestellung der Arbeit.....	13
3. Materialien und Chemikalien	15
3.1 Materialien und Geräte.....	15
3.2 Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	16
3.3 Verwendete Oligonucleotide und Plasmide.....	21
3.3.1 CK2 antisense Oligonucleotide	21
3.3.2 siRNAs	21
3.3.3 Vektoren.....	21
3.4 Verwendete Antikörper.....	23
4. Methoden	26
4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden	26
4.1.1 Zelllinien.....	26
4.1.2 Kultivierung der Zellen	27
4.1.3 Passagieren der Zellen	28
4.1.4 Einfrieren von Zellen	28
4.1.5 Tauen von Zellen	29
4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen.....	29
4.1.7 Emodin- und TBB-Behandlung.....	29
4.1.8 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer	30
4.1.9 Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen	30
4.1.10 Transfektion von Zellen.....	31

4.1.11	Transfektion von siRNAs.....	32
4.1.12	Ernten der Zellen.....	33
4.1.13	Immunfluoreszenzuntersuchungen	33
4.2	Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	35
4.2.1	Herstellung von Zellextrakten.....	35
4.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	36
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
4.2.4	Westernblot.....	38
4.2.5	Immunfärbung der Proteine.....	38
4.3	Apoptosenachweise	39
4.3.1	Durchflußcytometrie	39
4.3.2	Cytochrom c Freisetzung	40
4.3.3	Spaltung der Procaspase 3.....	41
4.3.4	TUNEL(terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)-Assay.....	41
4.3.5	Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP)	42
4.4	Nukleinsäuretechniken.....	43
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i>	43
4.4.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	43
4.4.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	44
4.4.4	<i>in-vitro</i> -Translation	44
4.4.5	mRNA-Isolation	45
4.4.6	Fällung der mRNA.....	46
4.4.7	Reverse Transkription	46
4.4.8	Micro-Array Analyse.....	47
4.5	sonstige Methoden.....	48
4.5.1	CK2-Kinaseaktivitätstest	48
4.5.2	Galactosidase-Assay	49
4.5.3	Luciferase-Assay.....	50
5.	Ergebnisse.....	51
5.1	Inhibition der CK2 in Prostatazellen	51
5.1.1	Charakterisierung des CK2-Status in den Prostatazellen BPH-1, P1-289 und P1-373.....	51
5.1.2	Emodin inhibiert konzentrationsabhängig die CK2 in Prostatazellen ..	54

5.1.3	Zeitabhängige Inhibition der CK2 durch TBB und Emodin	56
5.1.4	CK2-Inhibition beeinflusst die Lebensfähigkeit der Prostatazellen	59
5.1.5	Die Reduktion der Lebensfähigkeit nach Behandlung mit Emodin beruht nicht auf einem Zellzyklusarrest	61
5.2	CK2-Inhibition induziert Apoptose in Prostatakarzinomzellen, nicht aber in den Zellen einer benignen Prostatahyperplasie	64
5.2.1	Freisetzung von Cytochrom c in das Cytoplasma apoptotischer Zellen	64
5.2.2	Aktivierung der Caspase 3	67
5.2.3	DNA-Fragmentierung nach CK2-Inhibition	69
5.2.4	Behandlung von MRC-5-Zellen mit CK2-Inhibitoren	70
5.3	Inhibition der CK2 mit Hilfe von Antisense-Oligonucleotiden.....	71
5.3.1	Testen der Antisense-Oligonucleotide im <i>in-vitro</i> -Translationsansatz.	72
5.3.2	Transfektion von PC-3-Zellen mit CK2-Antisense-Oligonucleotiden ...	73
5.4	Inhibition der CK2 in Prostatakarzinomzellen mittels RNA-Interferenz.....	74
5.4.1	Test der pSilencer CK2 α - und CK2 β -Konstrukte.....	74
5.4.2	CK2 α/α' siRNA vermindert CK2 α/α' -Expression und -Aktivität	75
5.5	Untersuchung der p53-Beteiligung an der nach CK2-Inhibition ausgelösten Apoptose	77
5.5.1	p53-Anstieg nach CK2-Inhibition.....	77
5.5.2	Herstellung einer stabilen Zelllinie mit induzierbarem p53	78
5.5.3	Charakterisierung des p53 einer p53-positiven PC-3-Zelllinie	80
5.5.4	Die stabil mit p53 transfizierte Zelllinie PC-3pCMVp53	81
5.5.5	Vergleich der Zelllinien HCT116 p53wt und HCT116 p53-/-	82
5.5.6	Inhibition der Transaktivierungsfähigkeit des p53 mit Pifithrin- α	83
5.6	Untersuchung weiterer Signalwege, die an der Apoptose-induktion nach CK2-Inhibition beteiligt sein könnten	86
5.6.1	NF κ B-bcl-2-Weg	87
5.6.2	Micro-Array Analyse	88
6.	Diskussion	92
7.	Literaturverzeichnis	110
8.	Publikationen	122
	Danksagung	123

Lebenslauf.....	124
Eidesstattliche Versicherung	125

Abkürzungsverzeichnis

A_{λ}	Absorption bei der Wellenlänge λ
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ci	Curie
CK2	Proteinkinase CK2
cpm	Counts per minute
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
deion.	deionisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fetal calf serum
G ₁ -Phase	erste Gap-Phase des Zellzyklus
G ₂ -Phase	zweite Gap-Phase des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
kDa	Kilodalton
μ	micro
MeOH	Methanol

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-Phase	Mitose-Phase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear factor κ B
N-Terminus	Amino-Terminus
p53	Wachstumssuppressorprotein p53
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SDS	Sodiumdodecylsulfate
siRNA	short interfering RNA
S-Phase	Synthesephase
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TC	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TUNEL	Terminale Transferase mediated dUTP nick end labeling
wt	Wildtyp
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1. Zusammenfassung

1.1 Auswirkungen einer Proteinkinase CK2-Inhibition auf Prostatazellen

Die Proteinkinase CK2 ist eine ubiquitär vorkommende Serin/Threoninkinase, die an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt ist, insbesondere an der Zellproliferation und, wie sich in jüngster Zeit zunehmend herausstellt, an der Apoptose. Vor allem vom Prostatakarzinom ist bekannt, dass sie eine Rolle bei der Vermittlung androgener Signale spielt und dass ihre Expression und Aktivität gegenüber normalen Zellen erhöht ist, eine Tatsache, die auf die meisten Tumore zutrifft. Zurzeit werden hormonsensitive Prostataumore mit einer Hormonentzugstherapie behandelt, die zu einer Regression des Tumors durch Apoptose führt. Ein Nachteil dieser Therapie ist der Aufbau eines Selektionsdruckes gegenüber hormonunabhängig wachsenden Zellen, die zu einem erneuten Wachstum eines hormonunabhängigen Tumors führen, der, sofern er nicht erfolgreich operativ entfernt wird, zum Tod führen kann. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Inhibition der proliferationsfördernden CK2 eine Möglichkeit bietet, das Wachstum von Prostataumoren einzuschränken. Diese Untersuchungen wurden an den etablierten Zelllinien BPH-1, LNCaP und PC-3 mit den Inhibitoren Emodin und TBB durchgeführt. Versuche, die CK2 mit Antisense-Oligonucleotiden oder durch RNA-Interferenz noch spezifischer zu hemmen, schlugen fehl. Das Wachstumsverhalten der Zellen nach einer CK2-Inhibition wurde mit Hilfe des MTT-Assay untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Emodin zu einem Wachstumsrückgang in den Karzinomzelllinien führt, nicht jedoch in der Zelllinie BPH-1. Dieser Wachstumsrückgang wird durch die Induktion der Apoptose in LNCaP- und PC-3-Zellen verursacht, wie durch die Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase und durch die Abnahme der Procaspase 3 belegt werden konnte. Das Vorhandensein von Cytochrom c im Cytoplasma von LNCaP- und PC-3-Zellen nach einer Behandlung mit Emodin, spricht für die Beteiligung des mitochondrialen Weges der Apoptoseinduktion. Für BPH-1-Zellen dagegen konnte keine Freisetzung von Cytochrom c festgestellt werden. Für eine Behandlung mit TBB konnten mit LNCaP-

und BPH-1-Zellen entsprechende Beobachtungen gemacht werden, während PC-3-Zellen zwar eine Cytochrom c Freisetzung, aber keinen Wachstumsrückgang zeigten. An der Regulation der Cytochrom c Freisetzung ist unter anderem das anti-apoptotische Protein bcl-2 beteiligt, dessen Gehalt nach CK2-Inhibition abnimmt. Um weitere Proteine zu identifizieren, die an der Induktion der Apoptose beteiligt sein könnten, wurde eine Micro-Array-Analyse TBB-behandelter LNCaP-Zellen durchgeführt. Dabei wurde eine Abnahme des mRNA-Gehaltes des IAP-Proteins Survivin deutlich. Für die Abnahme des Proteingehaltes an bcl-2 und Survivin könnte eine Stabilisierung von p53 verantwortlich sein, die in LNCaP-Zellen nach einer Emodinbehandlung beobachtet werden konnte. Eine Abnahme des IAP-Proteins Survivin ist aber auch in den p53-negativen PC-3-Zellen zu beobachten, so dass p53-abhängige und -unabhängige Wege an der Apoptoseinduktion nach CK2-Hemmung eine Rolle spielen dürften. Auffällig ist, dass die Zellen der benignen Prostatahyperplasie weniger empfindlich auf die Inhibition der CK2 reagieren als die Tumorzellen. Da die vermehrte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Proteins bcl-2 einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung eines Tumors darstellt, wurde die Expression von bcl-2 in den Tumorzellen und in den Zellen der benignen Hyperplasie verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinie BPH-1 keine vermehrte Expression von bcl-2 gegenüber LNCaP- oder PC-3-Zellen aufweist. Die Unempfindlichkeit der BPH-1-Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion wird demnach nicht durch eine erhöhte bcl-2-Expression verursacht. Zusammenfassend kann eine Inhibition der CK2 sowohl in den Tumorzelllinien als auch in den Zellen der benignen Prostatahyperplasie erreicht werden. Eine Induktion der Apoptose findet aber nur in den Tumorzelllinien statt. Diese wird über den mitochondrialen Weg vermittelt, wobei p53-abhängige und -unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Vor allem die geringere Empfindlichkeit der BPH-1-Zellen lässt die CK2 als ein interessantes Zielmolekül zur Tumorthherapie erscheinen. Insbesondere bietet sich auch für die Behandlung des Prostatakarzinoms die Möglichkeit, auf eine Hormonentzugstherapie und damit auf die Selektion der aggressiveren hormoninsensitiven Tumore zu verzichten.

In der nachfolgenden Abbildung 0 sind noch einmal zusammenfassend die erhaltenen Ergebnisse für LNCaP- und BPH-1-Zellen gegenübergestellt. Dabei wurde versucht, eine mögliche Verbindung zwischen den beobachteten Ereignissen

herzustellen. Der Übersichtlichkeit wegen wurden durchgezogene Pfeile verwendet, was nicht bedeuten muss, dass eine direkte Verbindung zwischen den Proteinen besteht, sondern dass durchaus weitere Zwischenschritte beteiligt sein könnten. Die in BPH-1-Zellen nicht näher untersuchten Sachverhalte sind unscharf dargestellt.

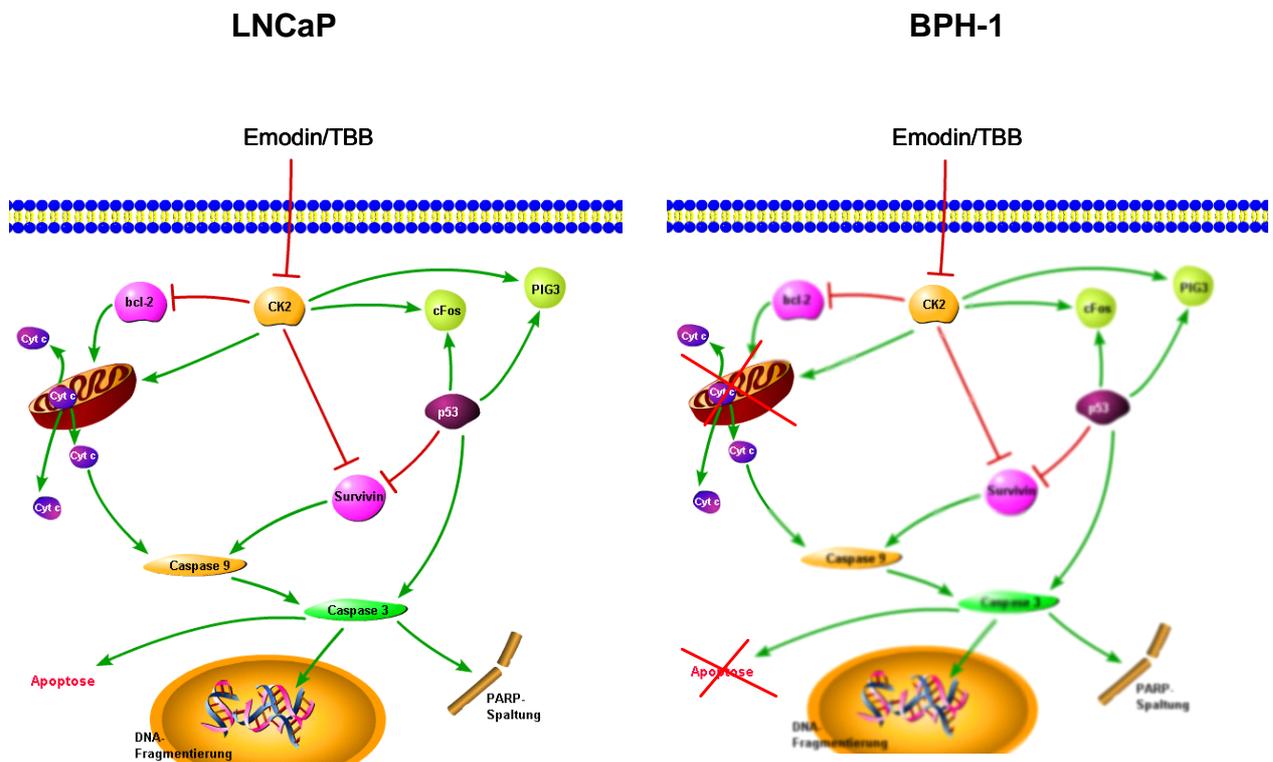


Abbildung 0: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Ergebnisse für LNCaP- und BPH-1-Zellen: Erläuterungen im Text.

1.2 Effects of inhibition of protein kinase CK2 on prostate cells

Protein kinase CK2 is a ubiquitous serine/threonine kinase involved in a plethora of cellular processes like cell proliferation and apoptosis. CK2 plays a pivotal role in the androgenic signaling in the prostate. Similar to many other tumors both its expression and its activity are elevated in prostate cancer. Hormone sensitive prostate cancer can be treated by androgen deprivation, which leads to a regression of the tumor by apoptosis. The main disadvantage of this therapy is the selection of hormone independent growing cells leading to a hormone insensitive tumor, which can lead to death. The subject of this work is the investigation of a reduction of tumor growth by

inhibition of protein kinase CK2. Therefore, the established cell lines BPH-1, LNCaP and PC-3 were treated with the CK2 inhibitors emodin and TBB. Emodin reduced tumor cell growth of LNCaP and PC-3 cells, leaving BPH-1 cells unaffected, as shown by MTT-Assay. Analysing the pathways leading to apoptosis I found that inhibition of CK2 resulted in the activation of the mitochondrial pathway of apoptosis induction with subsequent decrease of procaspase 3 and cleavage of poly-ADP-ribosepolymerase. The involvement of mitochondria in induction of apoptosis in LNCaP and PC-3 cells was shown by the release of cytochrome c into the cytoplasm. In contrast, cytochrome c could not be detected in the cytoplasm of BPH-1 cells. The same results were obtained with the inhibitor TBB for LNCaP and BPH-1 cells, whereas PC-3 showed no decrease in cell growth, but a release of cytochrome c in the cytoplasm upon TBB treatment. A micro array analysis of TBB treated LNCaP cells was performed to identify proteins involved in apoptosis induction. This experiment revealed a decrease in survivin mRNA. Furthermore, a stabilization of the tumor suppressor protein p53 could be detected in LNCaP cells after emodin treatment, which may lead to the observed decrease of survivin and bcl-2 protein level. The IAP survivin is also decreased in p53 negative PC-3 cells, which means that both p53 dependent and independent pathways may be involved in the induction of apoptosis after CK2 inhibition. Interestingly, the BPH-1 cells established from a benign prostate hyperplasia seem to be less sensitive for apoptosis induction after CK2 inhibition than the tumor cells. Overexpression of the anti-apoptotic protein bcl-2 is an important step during tumor development, especially in prostate cancer. In comparison to the tumor cell lines BPH-1 cells did not show an increase of bcl-2 expression. This suggests that a bcl-2 overexpression is not the reason for the incapability of BPH-1 to induce apoptosis after CK2 inhibition. In summary, a decrease of CK2 activity is achieved in both prostate cancer cells and cells of a benign hyperplasia. But induction of apoptosis is only detected in tumor cells. Apoptosis is induced via the mitochondrial pathway, involving p53 dependent and independent pathways. Because of the incapability of non-cancer cells to induce apoptosis upon CK2 inhibition, CK2 seems to be an appropriate target for cancer therapy. CK2 inhibition would provide the possibility to treat tumor cells without or with reduced effects on normal cells. Additionally, the main disadvantage, the selection of androgen independent growing cells in prostate cancer therapy could be avoided. The main results for LNCaP and BPH-1 cells are summarized in figure 0.

2. Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich 400000 Menschen neu an den verschiedensten Tumorarten. Damit liegt es nicht nur im Interesse des Einzelnen, die Prozesse, die an der Tumorigenese beteiligt sind, zu verstehen und zu erforschen, sondern auch von Medizinern, Biologen und allen, die sich mit den sog. Lebenswissenschaften auseinandersetzen. Den Aufbau von Geweben aus Zellen und deren Teilung erkannten Schwann und Schleiden bereits Mitte des 19. Jahrhunderts, womit sie die Grundlagen für die später von Virchow formulierte Zelltheorie legten (Darnell et al., 1993). Das Wachstum von Zellen und ihre Teilung ist ein völlig normaler, hochkomplizierter Prozess. Die Regulation des Zellwachstums und der -teilung ist ein äußerst fein und komplex regulierter Prozess, der, wenn er aus den Fugen gerät, zur Krebsentstehung führen kann. Die Entstehung eines Tumors ist häufig durch eine Fehlregulation des Zellwachstums bedingt. Sowohl unkontrollierte Proliferation als auch nicht ausreichende Apoptose („induzierter Zellselbstmord“) können dazu beitragen. Die Ursachen dafür liegen unter anderem in einer Vielzahl von Proteinen begründet, die an der Kontrolle des Zellwachstums und des Zellzyklus beteiligt sind. Im Wesentlichen können zwei Gruppen unterschieden werden: Wachstumssuppressor-Gene und Proto-Onkogene, die in ihrer normalen Form am korrekten Ablauf des Zellzyklus beteiligt sind. Proto-Onkogene fördern das Zellwachstum, während es durch Wachstumssuppressor-Gene gebremst wird. Zu den Proto-Onkogenen werden z.B. Gene für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie andere an Signaltransduktionskaskaden beteiligte Proteine oder Transkriptionsfaktoren gezählt, deren fehlerhaftes Verhalten in einem übermäßigen Wachstum der Zelle resultieren kann. Andererseits kann aber auch ein Defekt in der Übermittlung wachstumshemmender Signale vorliegen. Häufig übernehmen Proteinkinasen Schlüsselrollen in solchen Signalkaskaden. Bei vielen Arten von Krebszellen ist diese Übermittlungskaskade für inhibitorische Signale unterbrochen; wichtige Glieder - Wachstumssuppressorproteine - sind inaktiv oder fehlen ganz, so dass eine solche Zelle die wachstumshemmenden Signale "ignoriert" (Weinberg, 1996). In der Zelle existiert aber noch ein weiterer Kontrollmechanismus, der das Wachstum einschränken kann: die Apoptose oder der sog. „programmierte Zelltod“ (Weinberg, 1996). Dieses Programm wird ausgelöst, wenn irreparable Schäden in den Kontrollinstanzen der Zelle vorliegen. Eine Umgehung dieses

"Selbstmordprogrammes" resultiert möglicherweise in einem Ungleichgewicht zugunsten entarteter Zellen, was die Entstehung eines Tumors begünstigt. Solche Signalkaskaden werden häufig durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung der beteiligten Proteine reguliert. Diese Aufgaben werden von Phosphatasen und Kinasen, wie zum Beispiel der Proteinkinase CK2, wahrgenommen.

2.1 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2, 1954 von Burnett und Kennedy als Caseinkinase II entdeckt, ist eine ubiquitär vorkommende Serin/Threoninkinase, die hoch konserviert ist. Sie ist an einer Vielzahl zellulärer Prozessen beteiligt und phosphoryliert bevorzugt Serin- und Threoninreste, umgeben von sauren Aminosäuren, wozu sie sowohl ATP als auch GTP verwenden kann. Wichtig dabei ist, dass in Position $n+3$ eine saure Aminosäure vorhanden ist, was für 90% aller durch CK2 phosphorylierten Proteine gilt. Die Proteinkinase CK2 kommt sowohl als tetrameres Holoenzym mit je 2 katalytischen α -Untereinheiten (α , α' oder α'') und 2 regulatorischen β -Untereinheiten vor. Daneben findet man auch eigenständige Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten sind in ihrer Aminosäuresequenz über die ersten 330 Aminosäuren zu 90% identisch während die C-terminalen Aminosäuren für jede Form einzigartig sind. Der C-Terminus der α' -Untereinheit ist um 41 Aminosäuren kürzer als der C-Terminus der α -Untereinheit. Während die α -Untereinheiten die enzymatische Aktivität enthalten, übernimmt die β -Untereinheit regulatorische Aufgaben, wie die Steigerung der Aktivität und Stabilität, sowie die Vermittlung der Substratspezifität. Die katalytischen Untereinheiten der CK2 zeigen eine für Proteinkinasen typische bilobe Struktur (Abb. 1 C) mit einer N-terminalen Region, reich an β -Faltblättern, und einer C-terminalen Region, reich an α -Helices, zwischen denen das aktive Zentrum eingeschlossen ist (Niefind et al., 2001). Ein N-terminales Segment tritt in Wechselwirkung mit dem „activation loop“ der Kinase und bewirkt so eine Stabilisierung der aktiven Form. Es konnte gezeigt werden, dass durch Deletion des N-terminalen Segmentes die CK2 ihre Aktivität verliert (Sarno et al., 2002) und dass dieses N-terminale Segment damit eine Schlüsselrolle für die konstitutive Aktivität der CK2 spielt. Dieser Sachverhalt ist in den Abbildungen 1 A und B dargestellt: das N-

terminale Segment hält durch seine Interaktion mit dem „activation loop“ das aktive Zentrum geöffnet, während es bei einer Deletion des N-terminalen Segments (Abb. 1 B) zu einem Verschließen des aktiven Zentrums kommt indem der „activation loop“ darüber klappt.

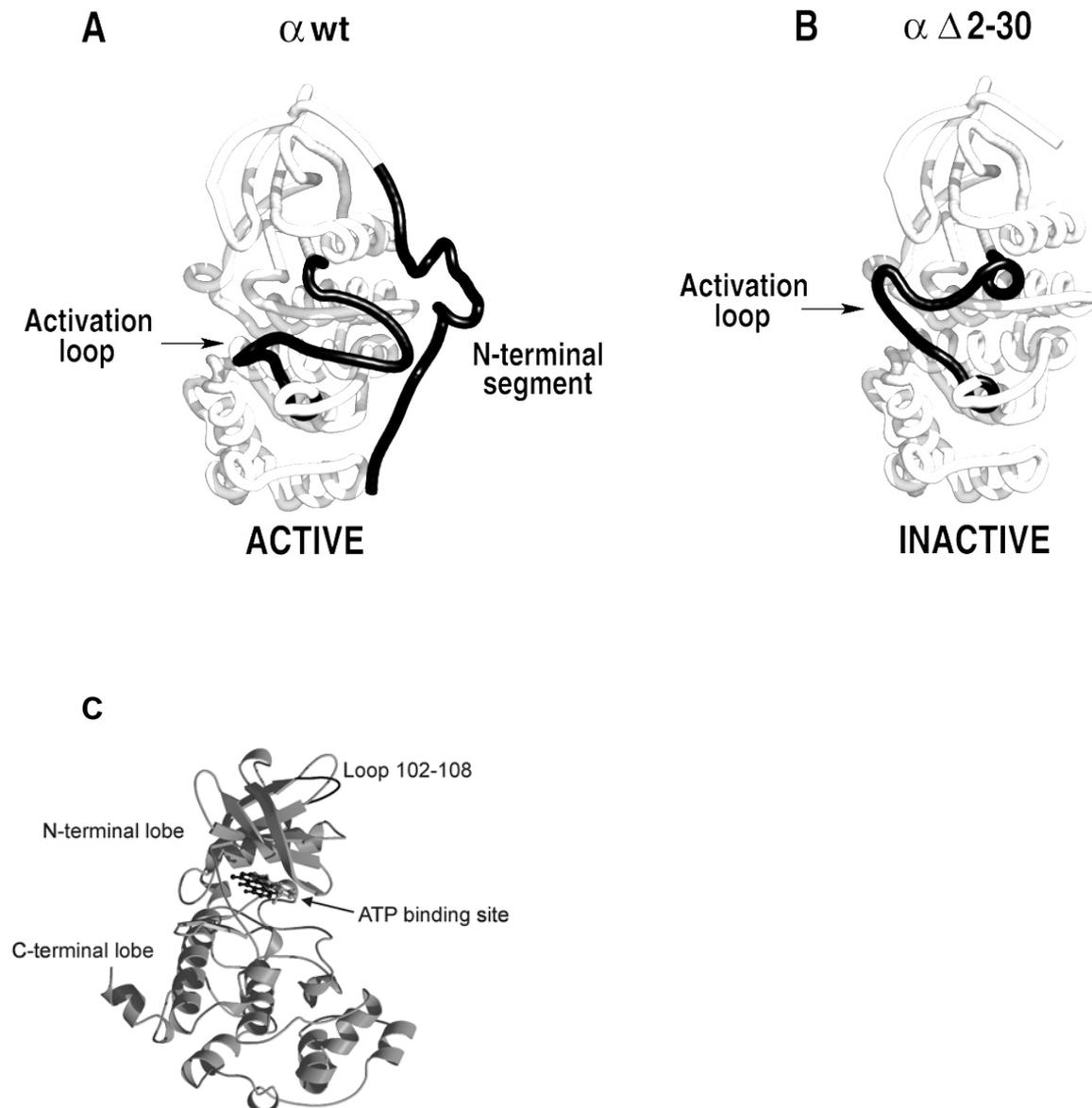


Abbildung 1: **A** und **B** Die konstitutive Aktivität der Proteinkinase CK2 wird durch das Offenhalten des aktiven Zentrums durch die Interaktion des N-terminalen Segmentes mit dem „activation loop“ bewirkt (Sarno et al., 2002). **C** Darstellung der Struktur der CK2 α -Untereinheit (De Moliner et al., 2002).

Über die Regulation der CK2 ist recht wenig bekannt. Sie wird als konstitutiv aktiv beschrieben und ist von keinem der bekannten „second messenger“ abhängig.

Allerdings ist von manchen Interaktionspartnern bekannt, dass sie Einfluss auf die Kinaseaktivität nehmen können. So ist zum Beispiel das Wachstumssuppressorprotein p53 durch Bindung an die β -Untereinheit in der Lage, die Aktivität der Kinase zu inhibieren (Schuster et al., 2001). Im Gegensatz zu den vergleichsweise wenigen bekannten Interaktionspartnern umfasst die ständig wachsende Liste der CK2-Substrate nun weit über 300 Proteine aus den verschiedensten Bereichen wie z.B. Transkription, Translation, Zellzyklusregulation, Apoptose u.v.m. Ein Einblick in einige Aktionsbereiche der CK2 ist in der folgenden Graphik gegeben (Ahmed et al., 2002).

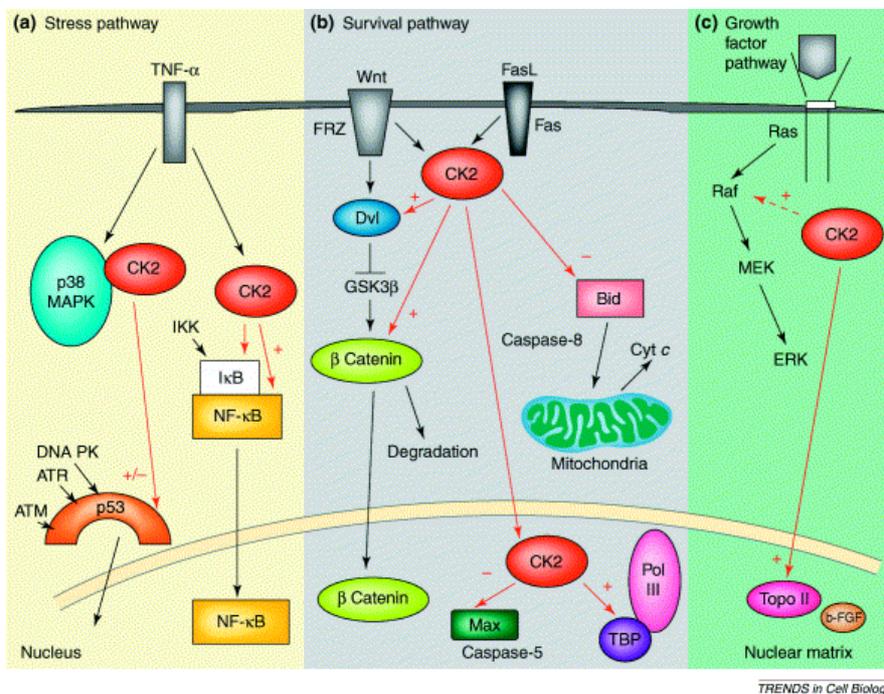


Abbildung 2: Beteiligung der CK2 an verschiedenen Signalwegen (Ahmed et al., 2002).

Eine Analyse von Phosphoproteinen in *S. cerevisiae* lässt vermuten, dass durch die CK2 mehr Phosphorylierungen bewerkstelligt werden als durch jede andere Kinase. Die CK2 ist damit für mehr als 25% des eukaryotischen Phosphoproteoms verantwortlich (Meggio und Pinna, 2003). Eine zentrale, wenn auch noch nicht im Detail verstandene, Rolle kommt der CK2 in der Proliferationsregulation zu. Dies zeigt sich unter anderem daran, dass die beiden α -Untereinheiten der Proteinkinase für das Überleben von *Saccharomyces cerevisiae* absolut notwendig sind: ein

„Knock-out“ beider Untereinheiten ist letal (Glover, 1998). Ebenso stellte sich ein „Knock-out“ der β -Untereinheit in Mäusen als letal heraus (Buchou et al., 2003). Eine Zerstörung der CK2 α' , ebenfalls in Mäusen, führt zu Fehlbildungen der Spermien und damit zu Unfruchtbarkeit der männlichen Tiere, während die Weibchen unauffällig bleiben (Xu et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass die beiden katalytischen Untereinheiten, trotz ihrer hohen Identität spezifische Aufgaben erfüllen, die durch die jeweils andere Untereinheit nicht kompensiert werden können. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Kinase in stark proliferierenden Geweben eine starke Expression und eine hohe Aktivität aufweist (Tawfic et al., 2001; Prowald et al., 1984). Dies trifft nicht nur auf embryonale Gewebe sondern auch auf Tumore zu, bei denen die Zellproliferation ebenso wie die gezielte Apoptose von Zellen eine entscheidende Rolle spielt. So findet man z.B. während der Maus-Embryogenese hohe CK2-Aktivitäten in Neuroepithelien (Guerra und Issinger 1999). Auch eine Phosphorylierung des Homöobox-Proteins Antennapedia deutet auf eine Beteiligung der Proteinkinase CK2 an der Embryogenese hin (Guerra und Issinger, 1999). Für eine Beteiligung an der Tumorentstehung sprechen Versuche mit transgenen Mäusen, die eine erhöhte Dosis an α -Untereinheit erhalten hatten: diese Tiere hatten ein erhöhtes Risiko an Lymphomen zu erkranken (Channavajhala und Seldin, 2002). Dieses Risiko stieg zusätzlich, wenn eine veränderte Expression der Proteine c-myc oder p53 vorlag (Tawfic et al., 2001; Landesman-Bollag et al., 1998; Channavajhala und Seldin, 2002). In folgenden Tumoren sind unter anderem erhöhte CK2-Aktivitäten zu finden: im Prostatakarzinom, bei Tumoren der Niere und des Dickdarms, aber auch bei Leukämien und Lymphomen. Die Aktivitätserhöhung der CK2 im Prostatakarzinom beträgt ungefähr das 3 - 5fache verglichen mit den normalen Zellen (Tawfic et al., 2001).

2.2 Bedeutung der CK2 für das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebsform des älteren Mannes und kann in eine androgenabhängige und eine androgenunabhängige Form unterschieden werden. Dies bedeutet für die Behandlung des Prostatakarzinoms, dass die hormonabhängigen Formen durch Androgenentzug, der zu einer Regression des Tumors führt, behandelbar sind. Im Gegensatz dazu ist bei den unabhängigen

Formen nur noch eine Entfernung der Prostata möglich. Allerdings bringt es die Therapie durch Androgenentzug unweigerlich mit sich, dass ein Selektionsdruck zugunsten hormonunabhängig wachsender Zellen aufgebaut wird, wodurch ein androgen-sensitiver Tumor letzten Endes in einen hormoninsensitiven Tumor übergeht. Dieser Vorgang kann allerdings auch spontan auftreten und ist noch weitgehend unverstanden. Die Erhöhung der Proteinkinase CK2-Aktivität und -Expression im Prostatakarzinom kann mit dem Malignitätsgrad (Gleason grading) des Tumors korreliert werden (Ahmed et al., 2001). Diese Hochregulation der CK2 scheint nicht auf mRNA-Ebene sondern auf Proteinebene stattzufinden (Ahmed et al., 2001). Die CK2 scheint in der Prostata entscheidend an der Vermittlung von Wachstumssignalen beteiligt zu sein. So konnte z.B. am Modell der Ratte gezeigt werden, dass durch Androgenentzug, der zur Apoptose und damit zu Regression der Prostata führt, eine Translokation der CK2 vom Zellkern in das Cytoplasma bewirkt wird. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Prostatakarzinomzellen LNCaP und PC-3 in Antwort auf Androgene bzw. Wachstumsfaktoren erhalten. Jedoch konnte nur in den androgenabhängigen LNCaP-Zellen eine Translokation der CK2 vom Cytoplasma in den Kern und damit eine Stimulation des Wachstums nach Verabreichung von 5α -Dihydrotestosteron bzw. von Wachstumsfaktoren beobachtet werden, während die androgenunabhängigen PC-3-Zellen diese Reaktion nur auf die Gabe von Wachstumsfaktoren zeigten (Guo et al., 1999). Die Reaktion der CK2 auf androgene Stimuli ist besonders im Hinblick auf die noch wenig verstandene Umwandlung eines hormonsensitiven Tumors in eine hormoninsensitive Form interessant. Neuere Ergebnisse zeigen, dass durch Inhibition der CK2 mit dem pflanzlichen Sekundärstoff Emodin eine Verminderung der Aktivität des Androgenrezeptors bewirkt werden kann. Dadurch konnte das Wachstum von Prostatakrebszellen vermindert werden, was im Mausmodell bestätigt wurde (Cha et al., 2005).

2.3 Einführung in die Apoptose

Der Begriff „apoptosis“ stammt ursprünglich aus dem Griechischen und bezeichnet das Herabfallen der Blätter im Herbst. In der Biologie versteht man darunter eine besondere Form des programmierten Zelltodes (PCD - programmed cell death), den

sog. „Induzierten Zellselbstmord“. Damit ist gemeint, dass eine Zelle in der Lage ist, auf bestimmte Stimuli, wie DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren, Stress etc., ihren Tod herbeizuführen. Dabei wird die Apoptose durch bestimmte Merkmale, wie sie von Kerr und Mitarbeitern (1972) zuerst beschrieben wurden, von anderen Formen des Zelltodes abgegrenzt. Diesem Vorgang liegt ein Netzwerk aus Signalkaskaden zugrunde. Es können zwei Wege der Apoptoseinduktion unterschieden werden: ein rezeptorvermittelter Weg („extrinsischer Weg“) und ein mitochondrialer Weg („intrinsischer Weg“). Eine schematische Übersicht über diese beiden Wege ist in Abbildung 3 gegeben.

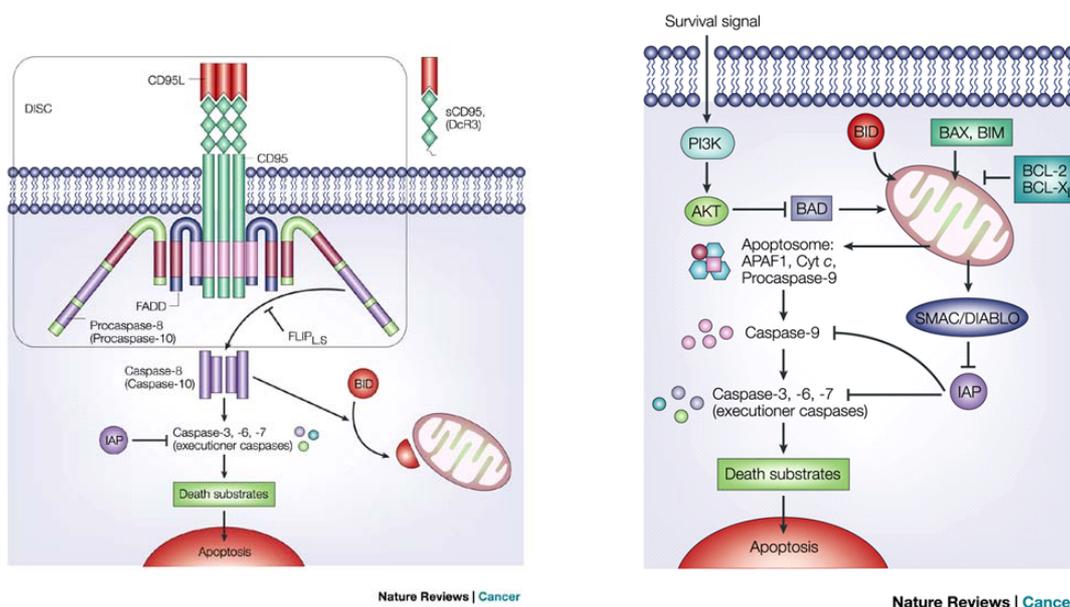


Abbildung 3: Die zwei verschiedenen Wege der Apoptoseinduktion: Auf der linken Seite ist der extrinsische Weg dargestellt, während auf der rechten Seite der intrinsische Weg veranschaulicht wird (Igney und Kramer, 2002).

Beiden Wegen ist die Aktivierung von Proteasen, sog. Caspasen gemeinsam, durch deren proteolytische Aktivität gegenüber zellulären Substraten letztlich die biochemischen und morphologischen Veränderungen verursacht werden, die charakteristisch für die Apoptose sind. Es handelt sich dabei um **Cystein-Aspartat-Proteasen**, die man in Initiations- und Exekutionscaspasen unterscheidet. Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch „Todesrezeptoren“ (death receptors) und deren entsprechende Liganden induziert. Sie gehören zur Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Superfamilie und sind durch den Besitz einer intrazellulären „Todesdomäne“ (death domain) gekennzeichnet. Diese rekrutiert, nach Aktivierung durch einen

Liganden, ein intrazelluläres Adapterprotein, FADD (Fas-associated death domain protein), welches seinerseits inaktive Caspase-Proformen zu diesem DISC (death-inducing signaling complex) rekrutiert. Dabei handelt es sich zumeist um die Zymogene der Caspasen 8 oder 10, die als Initiatorcaspasen wirken, und durch diesen Komplex gespalten und damit aktiviert werden. Der intrinsische Weg wird über die Mitochondrien vermittelt, die durch pro-apoptotische Stimuli in die Lage versetzt werden, Cytochrom c und andere apoptosefördernde Faktoren, in das Cytoplasma der Zelle freizusetzen. Dieser Vorgang wird unter anderem durch die verschiedensten Mitglieder der bcl-2-Familie reguliert, ist aber im Detail noch nicht völlig geklärt. Im Cytosol bildet Cytochrom c einen Komplex (das Apoptosom) mit APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Procaspase 9, in dem es zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9 kommt. Die Initiatorcaspasen spalten nun die Proformen der Exekutionscaspasen (Caspase 3, 6 und 7), die durch gegenseitige Spaltung und Aktivierung einen Amplifikationsmechanismus, die Caspasekaskade, in Gang setzen. Sie sind ebenfalls für die Spaltung zellulärer Substrate verantwortlich wodurch es zu den charakteristischen Merkmalen der Apoptose kommt. So führt zum Beispiel die Spaltung von ICAD (inhibitor of the DNase CAD) zur Freisetzung einer Endonuclease, die für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist. Die Spaltung von Proteinen des Cytoskeletts, wie unter anderem z.B. Aktin, führt zu morphologisch auffälligen Merkmalen wie dem „Blebbing“.

2.4 Inhibitoren der Proteinkinase CK2

Um mehr über die Aufgaben eines Enzyms zu erfahren, ist die Inhibition seiner Aktivität ein attraktives Mittel. Für die Proteinkinase CK2 gilt dies umso mehr, da sie einen entscheidenden Beitrag zur Proliferationsregulation zu leisten scheint, wodurch ihre Dysregulation zur Tumorentstehung beitragen kann. Daher könnte die Inhibition der CK2 und damit des Zellwachstums eine Grundlage zur Tumorbehandlung bieten. Faktoren die eine Inhibition der Proteinkinase CK2 bewirken könnten, lassen sich in 4 Gruppen einteilen (Guerra et al., 1999):

- Typ 1: Analoge des Phospho-Akzeptors, d.h. des Substrats,
- Typ 2: Analoge des Phosphodonors,

- Typ 3: Komponenten, die die Interaktion zwischen „activation loop“ und dem N-terminalen Segment stören und
- Typ 4: Komponenten, die die Assoziation mit der β -Untereinheit verhindern.

Zurzeit sind jedoch nur Inhibitoren aus den Gruppen 1 und 2 bekannt (Guerra et al., 1999), die im Folgenden näher beschrieben werden. Als Pseudosubstrate (Typ 1) wirken vor allem saure Moleküle wie Heparin, sowie synthetische Substrate wie z.B. Polyglutamat bzw. Polymere aus Glutaminsäure und Tyrosin. Diese Moleküle besitzen jedoch den Nachteil, dass sie für Versuche in Zellen nur bedingt geeignet sind, da sie nur schlecht in die Zellen gelangen und schnell abgebaut werden. Zu den Inhibitoren des Typs 2 gehören Moleküle die mit ATP / GTP kompetitieren. Diese können wiederum in verschiedene Kategorien untergliedert werden (Battistutta et al., 2000). 5,6-Dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)-benzimidazol (DRB) bildet den Ursprung der Gruppe der halogenierten Benzimidazole und hemmt die CK2 je nach ihrer Herkunft mit K_i -Werten zwischen 20 und 30 μ M (Guerra et al., 1999; Zandomeni und Weinmann, 1984). DRB hemmt die Caseinkinase 1 (CK1), eine der CK2 verwandten Kinase, in gleichem Maße wie die Proteinkinase CK2 (Meggio et al., 1990). Durch weitere Derivatisierung des DRB erhielt man schließlich 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) das, wie in einem Test mit 33 weiteren Kinasen gezeigt wurde (Sarno et al., 2001), spezifisch die CK2 hemmt. Darüber hinaus wirkt TBB fünfmal effektiver als DRB (Szyszka et al., 1995). Eine weitere Gruppe bilden die pflanzlichen Sekundärstoffe der Anthrachinone, zu denen das aus dem chinesischen Medizinalrhabarber (*Rheum palmatum*) stammende Emodin gehört. Dieses Anthrachinonderivat wird zwar als Tyrosinkinaseinhibitor beschrieben (Jayasuriya et al., 1992), hemmt aber die Proteinkinase CK2 wesentlich spezifischer (Yim et al., 1999). Zu einer dritten Gruppe werden Isochinolinderivate zusammengefasst, die allerdings eine wesentlich geringere Spezifität als die beiden zuvor genannten aufweisen und darüber hinaus die Proteinkinase CK1 effizienter inhibieren (Battistutta et al., 2000).

2.5 Fragestellung der Arbeit

Die Proteinkinase CK2 ist in der Lage, in die oben aufgeführten Signalwege der Apoptose an verschiedenen Stellen einzugreifen. Dabei wirken die meisten bis heute

bekanntes Phosphorylierungen durch die CK2 der Apoptose entgegen, d.h. sie können das Wachstum, auch von Tumoren, begünstigen. Gerade für die Entstehung des Prostatakarzinoms wird angenommen, dass nicht nur eine Fehlregulation der Proliferationsprozesse vorliegt, sondern auch eine Störung in der Regulation apoptotischer Signalwege (Denmade und Issacs, 1996). Dies wirft die Frage auf, ob das Tumorstadium durch eine Inhibition der CK2 gestoppt werden könnte. Mit einer Hemmung der CK2 würden nicht nur proliferationsfördernde Signale gemindert, sondern auch apoptosefördernde Signale verstärkt. Für die Behandlung von Prostata Tumoren ist dies ein besonders interessanter Aspekt, da hier bereits eine Beteiligung der CK2 an der Signalvermittlung durch Androgene gezeigt wurde. Üblicherweise werden die androgensensitiven Formen des Prostatakarzinoms durch Hormonentzug therapiert wodurch es zu einer Regression des Tumors durch das Absterben (Apoptose) der Zellen kommt. Der entscheidende Nachteil dieser Behandlungsform ist aber, dass dadurch ein Selektionsdruck zugunsten hormonunabhängig wachsender Zellen aufgebaut wird, wodurch es zu erneutem Wachstum eines hormoninsensitiven Tumors kommt. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Inhibition der CK2 eine Möglichkeit bietet das Wachstum von Prostatakarzinomzellen zu beeinflussen und über welche Wege die potentielle Reduktion des Wachstums vermittelt wird. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist es wichtig, zu klären, ob ausschließlich maligne entartete Zellen der Prostata diese Reaktion aufweisen oder ob auch nicht-entartete Zellen davon betroffen sind. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich die Zelllinie BPH-1, die aus einer benignen Prostatahyperplasie stammt, analysiert. Schließlich wäre die Aufklärung der beteiligten Signalwege nötig, um möglicherweise therapeutische Angriffspunkte in den untergeordneten Komponenten zu finden, die zusätzlich oder um eine noch höhere Spezifität zu erreichen genutzt werden könnten oder auch um eventuelle unerwünschte Nebeneffekte zu verhindern.

3. Materialien und Chemikalien

3.1 Materialien und Geräte

15 ml / 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Kulturschalen 94 mm / 60 mm	Greiner, Nürtingen
24-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer: FACScan	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer Mighty Small™ SE250	Serva (Hoefer)
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop: Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma, München
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Meter: pH537	WTW, Weilheim
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
Röntgenfilme AGFA Cronex5	Agfa-Gaevert, Mortsel, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	Agfa-Gaevert, Mortsel, Belgien
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Transonic 460 Elma,	Singen/Htw
Umkehrmikroskop: Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena
UV-Vis-Spektralphotometer Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg

3.2 Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Acrylamid-Stammlösung: rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Emodin	Sigma, München
APS	Pharmacia Biotech, Freiburg
BM-Cyclin	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	PAA laboratories GmbH, Pasching
Complete™, Proteaseinhibitor cocktail	Roche, Mannheim
DAPI	Roche, Mannheim
Digitonin	Sigma, München
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
EDTA	Sigma, München
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
EGTA	Calbiochem® Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
FCS	GIBCO BRL, life technologies
Formalin, 37%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Insulin (für die Zellkultur)	Sigma, München
Lumi-light-Detektionslösung	Roche, Mannheim
Mannitol	Sigma, München
MTT	Sigma, München
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumselenit (für die Zellkultur)	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Polyvinylalkohol MW 72 000	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Prestained SDS-Molekulargewichtsstandard	Fermentas GmbH, St.Leon- Rot

Propidiumjodid	Sigma, München
Proteinassay-Kit	BioRad, München
RNaseA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
siRNA	Qiagen GmbH, Hilden
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TBB	Calbiochem® Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
TEMED	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Testosteron (für die Zellkultur)	Sigma, München
Transferrin (für die Zellkultur)	Sigma, München
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
TritonX-100	Fluka, Neu-Ulm
In situ cell death detection kit, fluorescein	Roche, Mannheim
Tween20	Fluka, Neu-Ulm
X-treme Gene siRNA Transfection Reagent	Roche, Mannheim

Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)

30% (w/v) Acrylamid

0.8% (w/v) Bisacrylamid

DAPI-Stammlösung

5 µg/ml in PBS

DEPC-Wasser

1% DEPC in destilliertem Wasser, autoklaviert

Digitonin-Lösung

20 mg/ml Stammlösung

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8.8

0.2 M Glycin

0.5% (w/v) SDS

Fixierlösung für Immunfluoreszenz / TUNEL-Assay

3.7% Formalin in PBS

Gellösungen

Pufferlösung B

375 mM Tris-HCl, pH 8.8

Pufferlösung C

125 mM Tris-HCl, pH 6.8

Kinasepuffer für CK2-Kinaseassay

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

Mounting Medium

5% (v/v) Polyvinylalkohol MW 72 000

10% Glycerin (v/v)

in PBS

MTT-Lösung

5 mg/ml in PBS

PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)

1% BSA

0.2% TritonX-100 in PBS, pH 7.4

Permeabilisierungslösung (TUNEL-Assay)

0.1% Natriumcitrat in PBS

0.1% TritonX-100

Propidiumjodidlösung

400 µg Propidiumjodid / ml H₂O_{deion.}

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

150 mM NaCl

0.5% Natriumdesoxycholat

1% TritonX-100

0.1% SDS

SDS-Probenpuffer

4% (w/v) SDS

200 mM DTT

120 mM Tris-HCl, pH 6.8

10 mM β-Mercaptoethanol

20% (v/v) Glycerin

0.02% Bromphenolblau

Solubilisierungslösung (MTT-Assay)

10% SDS

0.01 M HCl

20x SSC

3 M NaCl

0.3 M Tri-Natriumcitrat, pH 7.0

Sucrosepuffer (Cytochrom c Freisetzung)

210 mM D-Mannitol
70 mM Sucrose
10 mM HEPES, pH 8.0
0.2 mM EGTA
5 mM Succinat
0.15% BSA

Transferpuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8.3
150 mM Glycin

Trypsin/EDTA-Lösung

0.25% (w/v) Trypsin
0.1% (w/v) EDTA

Waschpuffer (Westernblot)

0.1% (v/v) Tween20
1% bzw. 5% (w/v) Trockenmilch in PBS, pH 7.4

Waschlösung 1 (Hybridisierung)

2x SSC
1% SDS

Waschlösung 2 (Hybridisierung)

0.1x SSC
0.5% SDS

3.3 Verwendete Oligonucleotide und Plasmide

3.3.1 CK2 antisense Oligonucleotide

Die verwendeten CK2-antisense-Oligonucleotide wurden von Prof. Dr. Seliger (Ulm) hergestellt. Diese wurden mit invertierten Enden versehen, um den Abbau der Oligonucleotide in den Zellen zu vermindern. Die Sequenzen lauten wie folgt:

Antisense CK2 α : 3'-G-5'-5'-TCCCGACATGTCAGACAG-3'-3'-G-5'

Antisense CK2 α' : 3'-C-5'-5'-GGCCGGGCATGGCGGGC-3'-3'-G-5' und

Antisense CK2 β : 3'-G-5'-5'-AGCTGCTCATCTTCACGT-3'-3'-C-5'.

3.3.2 siRNAs

Die folgende siRNA (Lim et al., 2004) gegen die α/α' -Untereinheit der CK2 wurden von der Firma Qiagen synthetisiert:

5'-r(CCAGCUGGUAGUCAUCUUG)d(TT)-3'

Da es im Laufe der Experimente den Anschein hatte, dass die oben genannte siRNA nur die Expression der α -Untereinheit der CK2 beeinflusst, wurde eine weitere siRNA synthetisiert, die nur gegen die α' -Untereinheit der CK2 wirken sollte. Diese Sequenz lautet wie folgt:

5'-r(CCUUCGUGGUGGAACAAAU)-d(TT)-3'

3.3.3 Vektoren

ptetoff: Dieses Plasmid stellt die erste Komponente eines sog. Tetoff-Systems dar. In diesem System ist man durch Tetracyclingaben in der Lage, die Expression eines zuvor transfizierten Gens in eukaryontischen Zellen „abzuschalten“ bzw. durch Tetracyclinentzug „anzuschalten“. Dieses Regulatorplasmid kodiert für den „tetracycline-responsive transcriptional activator“ (tTA), einem Fusionsprotein bestehend aus einem Tet-Repressor und der VP16-Aktivierungsdomäne aus dem *Herpes simplex* Virus. Dieses Fusionsprotein wird konstitutiv exprimiert, da es unter

der Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Das Antwort-Plasmid enthält das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des entsprechenden „tet responsive element“ (TRE) (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995).

pBlp53: Hierbei handelt es sich um das oben erwähnte Antwort-Plasmid im Tetoff-System, das für das humane Wachstumssuppressorprotein p53 kodiert.

pTKhyg (BD Biosciences) ist ein Plasmid, das für eine Hygromycinresistenz kodiert und als Selektionsmarker für stabile Transfektionen von Säugerzellen nach einer Kotransfektion z.B. mit pBlp53 verwendet werden kann.

pUHG16-3 ist ein Reporterplasmid für das Tetoff-System. Das bedeutet nach Tetracyclinentzug wird die Expression der β -Galactosidase induziert (Gossen und Bujard, 1992).

pUHC13-3 stellt ein Luciferasereporterkonstrukt dar, das durch Tetracyclinentzug induziert werden kann (Gossen und Bujard, 1992).

pcDNACK2 α , -CK2 α' und -CK2 β sind Vektoren, die für die entsprechenden Untereinheiten der Proteinkinase CK2 kodieren. Da sie einen T7-RNA-Polymerasepromotor enthalten, sind sie für eine *in-vitro*-Translation der Proteine geeignet.

pSilencerTMhygro: Dieses Plasmid stellt einen siRNA-Expressionsvektor mit Hygromycinresistenz dar, der bei der Firma Ambion (Austin, Texas) erhältlich ist. Unter der Kontrolle eines U6-Promotors wird eine hairpin-siRNA exprimiert, durch die RNA-Interferenz induziert wird. Dieses Hairpin-Konstrukt muss zuvor als Oligonucleotid mit einer Loopsequenz in den Vektor inkloniert werden. Die Klonierungsarbeiten dazu wurden vorwiegend von Herrn Dipl.-Chem. S. Lehnert ausgeführt. Das im Rahmen dieser Arbeit getestete Konstrukt enthält eine Targetsequenz für die CK2 α von Nucleotid 1000 bis Nucleotid 1019. Die Sequenz gegen die CK2 β beginnt mit Nucleotid 570 und endet bei Nucleotid 589. Die Sequenzen der über eine BamH1 bzw. HindI Schnittstelle eingefügten Oligonucleotide ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Richtigkeit der inklonierten Sequenzen wurde vor Verwendung der Konstrukte durch eine Sequenzanalyse bestätigt.

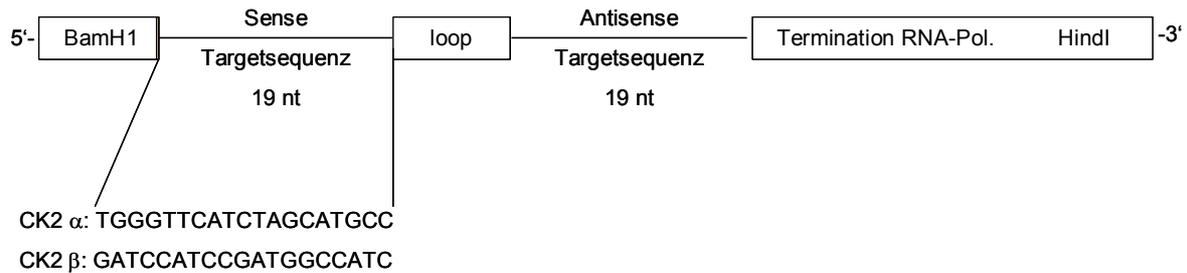


Abbildung 4: Schematische Darstellung der in pSilencerTMhygro einklonierten Sequenzen.

3.4 Verwendete Antikörper

Actin-Antikörper

Actin wird mit dem polyklonalen Antikörper I-19 (Santa Cruz) aus der Ziege nachgewiesen.

bcl-2-Antikörper

Zum Nachweis von humanem bcl-2 wird der monoklonale Mausantikörper Ab-1, Klon 100 von der Firma Oncogene verwendet. Die Mäuse wurden mit einem Peptid, das den Aminosäuren 41 – 54 entspricht, immunisiert.

Cytochrom c-Antikörper

Cytochrom c wird nach seiner Freisetzung ins Cytoplasma mit dem monoklonalen Antikörper 7H8 aus der Maus (Santa Cruz) nachgewiesen.

GAPDH-Antikörper

Zur Detektion der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase wird der polyklonale Kaninchenantikörper FL-335 der Firma Santa Cruz benutzt.

NF κ B-Antikörper

Die p65-Untereinheit des NF κ B wird mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenantikörpers C-20 (Santa Cruz) nachgewiesen.

p21-Antikörper

Zur Darstellung von p21^{WAF1} wird der in der Arbeitsgruppe hergestellte, monoklonale Maus-Antikörper SK1 eingesetzt. Zur Immunisierung der Tiere wurde das gesamte Protein verwendet. Der Antikörper erkennt die Aminosäuren 66 – 80.

p53-Antikörper

DO-1 ist ein monoklonaler Mausantikörper, der von der Firma Santa Cruz bezogen wurde. DO-1 erkennt ein Epitop im N-Terminus des Proteins (Aminosäuren 21 – 25) (Vojtesek et al., 1992; Stephen et al., 1995). Das Epitop von **PAb240** liegt im mittleren Teil des p53 Proteins (Gannon et al., 1990). Dieser Antikörper soll spezifisch eine mutante Form des Wachstumssuppressorproteines erkennen. **PAb421** dagegen erkennt C-terminal die Aminosäuren 372 – 380 (Harlow et al., 1981). Außerdem wird ein polyklonales Kaninchenserum gegen p53 verwendet, bei dessen Herstellung zur Immunisierung des Tieres ein in der Arbeitsgruppe über His-Tag gereinigtes p53-Protein eingesetzt wurde.

PARP-Antikörper

Es handelt sich hier um den monoklonalen Maus-Antikörper C-2-10 von Oncogene Research Products. Der Antikörper erkennt das gesamte Enzym (115 kDa) und das während der Apoptose auftretende Fragment von 85-90 kDa. Das erkannte Epitop befindet sich C-terminal in der DNA-Binde-Domäne der Poly-ADP-Ribosepolymerase (Produktkatalog Oncogene).

Peptidseren gegen CK2:

Es werden gegen die Untereinheiten der CK2 gerichtete, spezifische, polyklonale Kaninchenserum verwendet. Serum #26 erkennt die α -Untereinheit der CK2, Serum #30 die α' -Untereinheit und Serum #269 die β -Untereinheit. Alle Seren erkennen C-terminale Bereiche der verschiedenen Untereinheiten: Das α -Serum erkennt die Aminosäuren 360 - 371 auf der Polypeptidkette der α -Untereinheit der CK2, während von dem Serum gegen die α' -Untereinheit die Aminosäuren 330 - 349 auf der Polypeptidkette der α' -Untereinheit der

CK2 erkannt werden. Die Antikörper gegen die β -Untereinheit sind gegen die Aminosäuren 206 - 215 gerichtet (Faust et al., 1999).

Procaspase 3-Antikörper

Zur Detektion der Procaspase 3 wird der monoklonale Kaninchenantikörper 8G10 der Firma Cell Signal verwendet.

Survivin-Antikörper

Die Detektion von Survivin wird mit dem monoklonalen Mausantikörper D-8 von Santa Cruz durchgeführt.

α -Tubulin-Antikörper

Zum Nachweis von α -Tubulin wird der monoklonale Antikörper DM 1A (Sigma) aus der Maus verwendet.

Sekundärantikörper

Für die Westernblot-Analysen wird ein Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Myeloperoxidase Antikörper bzw. ein Ziege-anti-Maus-Ig-Myeloperoxidase Antikörper, beide von Dianova (Hamburg) verwendet. Die Konjugate besitzen eine Konzentration von 0.8 mg/ml. Mit der eingesetzten Verdünnung von 1 μ l : 30000 μ l ergibt sich eine Endkonzentration von 0.026 ng/ μ l.

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen kommen das Rhodamin-Konjugat Alexa Fluor™594 Ziege-anti-Kaninchen(oder Maus)-IgG-Konjugat oder das Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Konjugat Alexa Fluor™488 Ziege-anti-Kaninchen(oder Maus)-IgG-Konjugat von Molecular Probes zur Verwendung. Die Antikörper besitzen eine Konzentration von 2 mg/ml dabei wird das Rhodamin-Konjugat 1:1000 und das FITC-Konjugat 1: 500 verdünnt.

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.1.1 Zelllinien

BPH-1:

Die Zelllinie BPH-1 (DSMZ-Nummer: ACC 143) wurde aus einer benignen Prostatahyperplasie gewonnen und mit dem großen T-Antigen des SV40 immortalisiert (Hayward et al., 1995).

Cos-1:

Bei dieser Zelllinie (ATCC-Nummer: CRL 1650) handelt es sich ebenfalls um SV40-immortalisierte Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze.

CHO-AA 8 Tetoff:

Bei diesen Zellen handelt es sich um „Chinese hamster ovary“-Zellen, die mit einem Luciferasereporterkonstrukt stabil transfiziert wurden. Dazu wurde ein Tetoff-System verwendet, d.h. die Expression der Luciferase wird durch Tetracyclin unterdrückt (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Die Zelllinie kann bei BD Biosciences Clontech erworben werden und wurde hier als Positivkontrolle zum Nachweis von Luciferaseaktivität verwendet.

HEK 293:

Zur Herstellung dieser Zelllinie (ATCC-Nummer: CRL1573) wurden humane Embryofibroblasten aus der Niere mit dem Adenovirus 5 immortalisiert.

Hela S3:

Hela-Zellen stammen aus einem Cervix-Adenokarzinom und weisen eine epitheliale Morphologie auf (ATCC-Nummer: CCL-2.2).

PC-3:

Die Zelllinie PC-3 (ATCC-Nummer: CRL-1435) wurde 1976 aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms gewonnen. Es handelte sich dabei um eine androgeninsensitive Form des Prostatakarzinoms (Kaighn et al., 1979). Die verwendeten PC-3-Zellen exprimieren kein p53 Protein (Carroll et al., 1993; van Bokhoven et al., 2003).

PC-3p53:

Hierbei handelt es sich um die oben genannte Zelllinie, jedoch konnte hier eindeutig von Benninghoff und Mitarbeitern (1999) die Expression von p53 nachgewiesen werden.

PC-3 pCMVp53 und PC-3 pCMV:

Diese Zelllinie wurde von Ouyang und Mitarbeitern (2001) hergestellt, indem PC-3-Zellen mit einem pCMV-Vektor, der für ein p53-Wildtyp-Protein kodiert bzw. mit einem Leervektor transfiziert wurden. Da es sich um eine stabil transfizierte Zelllinie handelt, wurde sie unter Zusatz eines Selektionsantibiotikums, G 418, gehalten.

LNCaP:

Die LNCaP-Linie (ATCC-Nummer: CRL-1740) stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms. Diese Karzinomzellen sind im Gegensatz zu PC-3-Zellen hormonsensitiv (Horoszewicz et al., 1983) und repräsentieren damit ein weniger malignes Stadium des Prostatakarzinoms als die PC-3-Zellen.

MRC-5:

MRC-5-Zellen (ATCC-Nummer CCI-171) sind humane Lungenfibroblasten mit einem unauffälligen diploiden Chromosomensatz.

P1-289 und P1-373:

Diese Prostatakrebszellen sind primären Ursprungs, da man sie aus radikalen Prostataektomien hat auswachsen lassen. Sie wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. G. Unteregger (Homburg) zur Verfügung gestellt.

HCT 116 p53 wt und HCT 116 p53 -/-:

HCT 116 sind epitheliale Zellen, die aus einem Colonkarzinom stammen. Sie wurden in der Arbeitsgruppe von B. Vogelstein in verschiedenen Varianten hergestellt (Bunz et al., 1998).

4.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen werden in 94-mm-Kulturschalen der Firma Greiner im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre kultiviert. Für alle Prostata-Zelllinien wird RPMI 1640 (Invitrogen) mit 10% FCS ohne den sonst üblichen Indikator Phenolrot verwendet. Phenolrot könnte aufgrund seines Phenolringes

androgenähnliche Wirkung auf die Prostatakarzinomzellen ausüben, was vermieden werden sollte. Das Medium der BPH-1-Zellen enthält folgende Zusätze: 20% fötales Kälberserum (FCS), 20 ng/ml Testosteron, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit und 5 µg/ml Insulin. Die aus den Prostataektomien erhaltenen Primärzellen werden in MEM/Hams F-12 (PromoCell, Heidelberg) unter Zusatz von 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml Cholera toxin, 10 µg/ml Hydrocortison und 10 µg/ml Insulin gehalten. Die MRC-5-Zellen werden in DMEM (Invitrogen) mit 10% FCS kultiviert, während die HCT 116-Zellen in Mc Coy's 5A-Medium (PromoCell, Heidelberg) ebenfalls mit 10% FCS gehalten werden.

4.1.3 Passagieren der Zellen

Das Medium über den Zellen wird abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) abgelöst. Dazu wird das Trypsin kurz nach der Zugabe wieder abgesaugt und die Kulturschale für einige Minuten in den Brutschrank zurückgestellt. In der Zwischenzeit werden in neue Schalen 5 ml des entsprechenden Mediums vorgelegt, in das je 1 ml der Zellsuspension, nach Aufnahme der abtrypsinisierten Zellen in einer entsprechenden Menge Medium, ausgesät wird.

4.1.4 Einfrieren von Zellen

Säugerzellen lassen sich in flüssigem Stickstoff eingefroren über längere Zeit lagern. Zum Einfrieren werden die Zellen, wie oben beschrieben, vom Boden der Kulturschale mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und für 7 min bei 4°C und 250xg zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 0.5 ml eiskaltem Zellkulturmedium mit 40% FCS resuspendiert. Danach werden unter ständigem Schütteln 0.5 ml Medium mit 20% DMSO tropfenweise zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und für 2 Stunden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff inkubiert. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

4.1.5 Tauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgt möglichst rasch, indem man die Zellsuspension in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, dann sofort in ein steriles Röhrchen überführt und sie danach durch langsame tropfenweise Zugabe des 10-fachen Volumens an Zellkulturmedium verdünnt. Die Zellen werden 5 min bei 250xg und 4°C abzentrifugiert, das Sediment in frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen

Bakterielle Kontaminationen werden, nach vorangegangenem Mediumwechsel, durch die Zugabe von 10 µl Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium beseitigt. Bei schweren Kontaminationen durch Bakterien werden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert, in 5 ml serumfreiem Medium in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 7 min bei 4°C und 250xg abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen auf eine neue Schale, unter Antibiotikazugabe, ausgesät. Hefe- und Pilzkontaminationen werden mit 10 µl Amphotericin B (250 µg/ml; Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium behandelt. Die Beseitigung von Mycoplasmen erfolgt mit dem Antibiotikum BM-Cyclin der Firma Roche nach den Angaben des Herstellers.

4.1.7 Emodin- und TBB-Behandlung

Das Flavonoid Emodin (Sigma) bzw. 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) (Calbiochem) werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Form einer 10 mM Stocklösung steril gelöst; ausgehend davon werden die Zellen mit Emodin bzw. TBB in verschiedenen Endkonzentrationen behandelt, indem die Lösung in das Medium pipettiert wird. Die Zellen werden wenigstens einen Tag vor der Behandlung ausgesät, um ihnen ein Absetzen und Anwachsen zu ermöglichen. Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO in gleicher Weise behandelt werden.

4.1.8 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Die Zellen werden, wie zuvor beschrieben, abtrypsiniert und in Medium aufgenommen. Von der Zellsuspension werden 20 µl abgenommen und mit der gleichen Menge Trypanblau zur Anfärbung der toten Zellen gemischt. Die beiden Kammern der Neubauer Zählkammer werden mit je 6 µl der Zellsuspension gefüllt und die 4 äußeren Großquadrate des Rasters ausgezählt. Anschließend wird die Abweichung der Summen aus beiden Kammern bestimmt; beträgt diese weniger als 15%, wird der Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat errechnet und durch Multiplikation mit 2 die Verdünnung durch Trypanblau berücksichtigt. Durch Multiplikation mit 10^4 ergibt sich die Anzahl lebender Zellen pro ml, da jedes Großquadrat ein Volumen von 0.1 µl besitzt.

4.1.9 Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen

Die Messung des Anteils an metabolisch aktiven Zellen erfolgt mit Hilfe des MTT-Assay. Der Test beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen, Tetrazoliumsalze in Formazane umzusetzen. In diesem Fall wird das gelbe MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid; Sigma) durch metabolisch aktive Zellen unter Beteiligung von NADH und NADPH in violette Formazan reduziert. Diese Reaktion ist in folgender Abbildung 5 dargestellt. Sie findet an der Succinat-Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen unabhängig vom Zellzyklus statt und ist damit ein Maß für die Vitalität einer Zellprobe. Die entstehenden Formazankristalle werden durch die Solubilisierungslösung gelöst und die farbige Lösung kann im ELISA-„Reader“ (BioRad) quantitativ ausgewertet werden. Da eine größere Anzahl lebender Zellen einer höheren metabolischen Aktivität entspricht, korreliert dieser Anstieg in der Zellanzahl mit der Anzahl an Formazankristallen und damit mit der gemessenen Absorption.

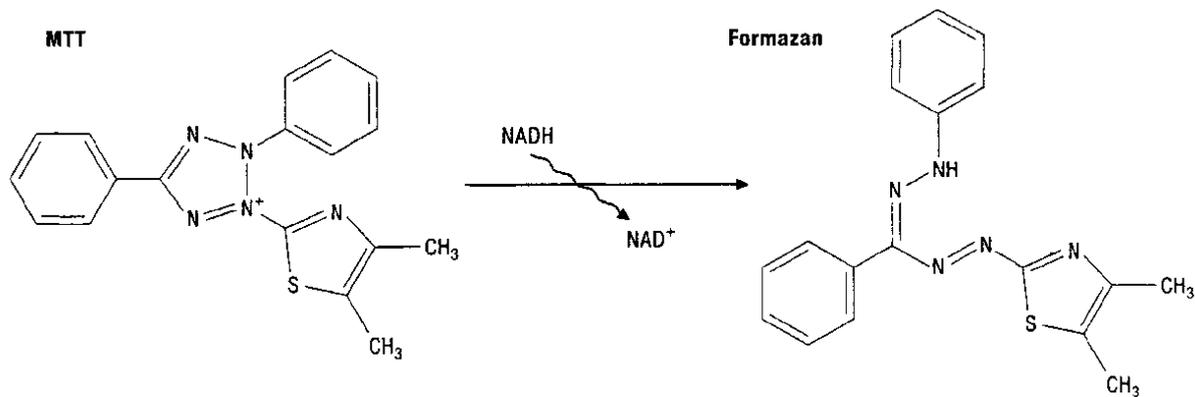


Abbildung 5: Reduktion des gelben MTT in violettes Formazan durch die Succinat-Dehydrogenase (Roche molecular biochemicals: Apoptosis and cell proliferation, 2nd edition).

Die Zellen werden in entsprechender Anzahl ($1-2 \times 10^4$ / 500 μ l) in 500 μ l Medium in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zum nächsten Tag wachsen gelassen. Gegebenenfalls erfolgt dann die Behandlung der Zellen und nach entsprechender Inkubationszeit werden 50 μ l MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C werden 500 μ l der Solubilisierungslösung zugegeben und die Zellen über Nacht bei 37°C lysiert. Am folgenden Tag werden jeweils 3 mal 200 μ l in eine 96-Loch-Platte überführt, um die Extinktion bei 595 nm in einem ELISA-„Reader“ zu bestimmen. Zur Auswertung wird die Extinktion der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle als 100% lebende Zellen gesetzt.

4.1.10 Transfektion von Zellen

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen nennt man Transfektion, dabei unterscheidet man chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden. Hier erfolgt die Transfektion der Zellen mit dem „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Effectene ist ein Lipid, es handelt sich also um eine Lipofektion. Dabei wird die DNA ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden wobei DNA-Liposomen-Komplexe entstehen, die an die Zelloberfläche binden und auf bisher ungeklärte Weise in die Zelle aufgenommen werden (Schimpf, 2002). Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen in entsprechender Anzahl ausgesät und bis zum nächsten Tag unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Zur Transfektion von Zellen einer 6-cm-Schale wird 1 μ g DNA in einem Gesamtvolumen von 150 μ l DNA-Kondensationspuffer EC

aufgenommen, 8 µl Enhancer-Lösung zugegeben und kurz gemischt. Nach einer Inkubation von 2-5 min bei Raumtemperatur werden 25 µl Effectene Transfektionsreagenz zugegeben, gemischt und die Ansätze erneut 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. In dieser Zeit werden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und erhalten frisches Medium. Nach der Inkubation gibt man 1 ml Kulturmedium zu den Transfektionskomplexen, mischt durch auf- und abpipettieren und gibt sie tropfenweise zu den Zellen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe im Zellkulturmedium zu gewährleisten, werden die Schalen kurz geschwenkt und anschließend wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wird 24 h nach der Transfektion das entsprechende Selektionsantibiotikum zu den Zellen gegeben. Die benötigte Konzentration des Selektionsantibiotikums zum Absterben untransfizierter Zellen muss vorher ausgetestet werden. Die transfizierten Zellen werden mehrere Wochen unter diesem Selektionsdruck gehalten, bevor das Antibiotikum entfernt und eine Einzelzellklonierung vorgenommen werden kann. Dazu werden die Zellen so stark verdünnt, dass nur eine Zelle pro Kavität einer 96-Loch-Platte ausgesät wird. Von den Zellen, die sich in einer Kavität vermehren, wird angenommen, dass sie positiv transfiziert sind und nur von einer einzigen Zelle abstammen. Die Aktivität des hier transfizierten p_{tetoff}-Plasmids kann anschließend mit Hilfe eines Reporterassays bestimmt werden.

4.1.11 Transfektion von siRNAs

Das Einbringen von siRNAs in die Zelle wird mit dem „X-treme GENE siRNA transfection reagent“ der Firma Roche vorgenommen. Dazu werden nach den Angaben des Herstellers für jede siRNA 2 verschiedene Reaktionsgefäße vorbereitet: in Gefäß A wird das Transfektionsreagenz in serumfreiem Medium verdünnt, während in Gefäß B die entsprechende siRNA ebenfalls in serumfreiem Medium vorverdünnt wird. Beide Ansätze werden gemischt, möglichst innerhalb von 5 min zusammengegeben, erneut durch auf- und abpipettieren gemischt und für 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Komplexe tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese unter den genannten Bedingungen bis zum gewünschten Erntezeitpunkt weiterinkubiert.

4.1.12 Ernten der Zellen

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen 2 x mit kaltem PBS (pH 7.4) gewaschen. Nach erneuter Zugabe von PBS wird der Zellrasen mit einem Schaber geerntet und die Zellsuspension in ein Röhrchen auf Eis überführt. Nach Wiederholen dieses Vorganges erfolgt für 7 min die Zentrifugation der Zellen bei 4°C und 250xg. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet entweder weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Apoptotische Zellen werden einschließlich des überstehenden Mediums geerntet, wie beschrieben abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen durch Zugabe von PBS und einer weiteren Zentrifugation gewaschen.

4.1.13 Immunfluoreszenzuntersuchungen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Methode zur Untersuchung der Lokalisierung und Verteilung von Biomolekülen in einer einzelnen Zelle. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein spezifischer Sonden für das jeweilige Molekül. Handelt es sich bei diesen Sonden um Antikörper, spricht man von Immunfluoreszenz. Eine direkte Immunfluoreszenz liegt vor, wenn diese Sondenantikörper selbst mit einem Fluorochrom gekoppelt sind, während eine indirekte Immunfluoreszenz dadurch gekennzeichnet ist, dass fluoreszenzmarkierte Sekundärmoleküle eingesetzt werden, bei denen es sich häufig ebenfalls um Antikörper handelt.

Für einen Nachweis intrazellulärer Moleküle ist es erforderlich, dass die Sondenmoleküle an ihren Zielort gelangen können. Daher ist beim Einsatz von Antikörpern eine Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich, um dem Antikörper die Passage über die Plasmamembran zu ermöglichen. Vor der Permeabilisierung werden die Zellen in der Regel fixiert. In der vorliegenden Arbeit wird zur Lokalisation der CK2-Untereinheiten eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Als Primärantikörper dienen dabei die vorhandenen Kaninchen-Peptidseren #26 zur Lokalisierung der α -Untereinheit, #30 zur Lokalisierung der α' -Untereinheit und #269 zur Lokalisierung der β -Untereinheit. Als Sekundärantikörper werden TRITC- oder FITC-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen ALEXA-Fluor Antikörper von Molecular Probes eingesetzt.

Um ein besseres Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, werden die Deckgläschen mit Poly-Lysin beschichtet. Die Beschichtung wird vorwiegend für die Untersuchung der LNCaP-Zellen durchgeführt, da diese, im Gegensatz zu den PC-3-Zellen verstärkt dazu neigen, sich während der Behandlung von der Unterlage abzulösen. Mit der Poly-Lysin-Beschichtung soll daher sichergestellt werden, dass im Anschluss an die Versuchsdurchführung noch genügend Zellen zur Mikroskopie auf dem Deckgläschen vorhanden sind. Die Beschichtung wird unter einer Sterilbank durchgeführt. Eine Poly-L-Lysinlösung der Firma Sigma (0.1% w/v) wird 1:10 in deionisiertem Wasser verdünnt. Es werden je 50 µl der Lösung auf sterile Deckgläschen verteilt und nach 5 min wieder abgesaugt. Die Deckgläschen werden über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag können die Zellen auf die Deckgläschen ausgesät werden.

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wachsen die Zellen in 60 mm-Kulturschalen auf Deckgläschen bis die Kultur zu etwa 80% konfluent ist. Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen 3 x 10 min in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung mit PBS-Formalin (2% oder 3.7%) bei Raumtemperatur für 15 min. Die Formalinlösung sollte unmittelbar vor der Verwendung hergestellt werden. Es schließen sich 3 Waschschrte in PBS an. Die Permeabilisierung der Zellen wird mit TritonX-100 (0.2%) und BSA (1%) in PBS für 5 min auf Eis vorgenommen. Es folgen 3 Waschschrte in PBS-BSA (1%). An dieser Stelle kann der Arbeitsvorgang unterbrochen werden und die Schälchen mit den Deckgläschen können z.B. über Nacht in PBS bei 4°C gelagert werden. Es schließt sich die Inkubation mit dem Primärantikörper an. Dazu wird aus einer 145-mm-Schale, in die ein feuchter Filter und darüber Parafilm gelegt wird, eine feuchte Kammer hergestellt. Darin findet die Inkubation mit dem Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur statt. Die Deckgläschen werden mit der bewachsenen Seite nach oben auf den Parafilm gebracht und mit 50 µl des entsprechenden Antikörpers überschichtet. Der Antikörper wird zuvor in PBS-BSA 1:100 verdünnt. Auf ein Gläschen wird als Negativkontrolle statt des Primärantikörpers PBS-BSA aufgebracht. Danach werden die Deckgläschen wiederum dreimal in PBS gewaschen. Es schließt sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper an, der in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wird. Die Inkubation muss im Dunkeln erfolgen, um ein zu starkes Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Nach den drei anschließenden

Waschschritten in PBS werden die Zellen kurz in A. dest. gewaschen und mit Mounting-Medium eingedeckt. Bei allen Arbeitsschritten sollte darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht austrocknen. Nach etwa einer halben Stunde können die Präparate am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Um die Präparate auch noch nach einigen Tagen betrachten zu können, werden sie mit farblosem Nagellack abgeschlossen und im Dunkeln im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Anfärbung des Zellkerns wird das Fluorochrom DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) verwendet, das spezifisch DNA anfärbt. Dazu werden die Zellen auf den Deckgläschen in gleicher Weise wie oben für 15 min bei 37°C mit 50 µl DAPI in Methanol (2 µg/ml) in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Waschen und Einbetten der Präparate erfolgt wie beim Nachweis der CK2-Untereinheiten.

Bei dem zur Analyse der Präparate verwendeten Mikroskop handelt es sich um das "Axioskop" der Firma Zeiss. Die Anregung des Rhodamin-Konjugates erfolgt bei 554 nm, während DAPI im UV-Bereich mit 340 nm angeregt wird. Die jeweilige Fluoreszenz liegt im roten bzw. blau-violetten Bereich.

4.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

4.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen werden, wie unter Punkt 3.1.12 beschrieben, geerntet und sedimentiert. Alle Schritte werden unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wird anschließend in etwa dem doppelten Volumen RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% TritonX-100, 0.1% SDS) mit zugesetztem Proteaseinhibitor (Complete™ 1:25) resuspendiert und die Zellsuspension 3 mal 1 min im Eisbad sonifiziert. Danach erfolgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Schütteln (ca. alle 10 min). Die Proben werden 30 min bei 4°C und 16000xg abermals zentrifugiert. Mit dem erhaltenen Überstand wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Lagerung der Zellextrakte erfolgt aliquotiert, kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C.

4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes einer Proteinlösung erfolgt meist mit Hilfe von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen und kann mit einem Photometer gemessen werden. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford werden blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden, verwendet. Häufig wird der Vertreter Coomassie-Brilliantblau G250 benutzt, dessen Absorptionsmaximum sich in Anwesenheit von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs durch Komplexbildung mit dem Protein.

Die Bestimmung des Proteingehaltes wird mit dem Proteinassay Kit von BioRad vorgenommen. Dazu wird je 1 μl des Zellextraktes zu 800 μl A. dest. und 200 μl Bradfordreagenz pipettiert und nach 10 min die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert aus A. dest. und Bradfordreagenz gemessen. Der Proteingehalt ergibt sich mit Hilfe einer BSA-Eichkurve in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte erfolgt elektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel. Dieses wird durch Polymerisation von Acrylsäureamid gewonnen. Als Starter der radikalischen Reaktion dient APS, das in Wasser freie Radikale bildet. TEMED wird als Katalysator der Reaktion zugesetzt, weil dieses Amin in wässriger Lösung Radikale stabilisieren kann. Als Quervernetzer der Polyacrylamidketten dient N,N'-Methylenbisacrylamid, wodurch die mechanische Stabilität gewährleistet wird. Die Porengröße des Gels ist vom Anteil an Methylenbisacrylamid abhängig. Hier wird eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Dazu werden zwei Gele unterschiedlicher Dichte übereinander gegossen: ein engporiges Trenngel und ein weitporiges Sammelgel.

Zur Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS auf 95°C erhitzt, dabei werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe von β -Mercaptoethanol aufgespalten. Zu-

sätzlich überdeckt die negative Ladung des SDS die Nettoladungen der Proteine, so dass man ein Proteingemisch erhält, welches ausschließlich aus aufgefalteten, separaten und negativ geladenen Polypeptidketten besteht.

Die Gele werden in einem vertikalen Gießstand hergestellt, in dem 4 bis 5 Gele gleichzeitig gegossen werden können. Zuvor werden die Glasplatten, zwischen die die Gele gegossen werden, die Kämme und Abstandshalter gereinigt und mit Ethanol entfettet. Nach dem Zusammenbauen der Kammer wird diese erst auf ihre Dichtheit überprüft. Danach wird die Trenngellösung hergestellt und die Kammer damit bis etwa zu 3/4 gefüllt. Etwaige Luftblasen werden durch Aufklopfen des Gießstandes entfernt und die Oberfläche der Gellösung mit Isopropanol überschichtet. Um eine gleichmäßige Dicke zu gewährleisten, werden die Kämme ebenfalls eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel hergestellt und nach dem Gießen die Kämme eingesteckt. Die Gele werden voneinander getrennt und können verwendet oder feucht im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für beide Gele wird eine gebrauchsfertige Acrylamid-Stammlösung (Lösung A) mit 30% (w/v) Acrylamid und 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid der Firma Carl Roth GmbH & Co (rotiphorese® Gel 30) verwendet. Für das Trenngel wird die Pufferlösung B, für das Sammelgel die Pufferlösung C zugesetzt. Für die Polymerisation des Trenngels werden 0.1% (w/v) APS und 0.2% (v/v) TEMED eingesetzt, während im Sammelgel 0.05% (w/v) APS und 0.06% (v/v) TEMED benutzt werden. Es werden verschieden prozentige Trenngele, deren Zusammensetzung aus Tabelle 1 A deutlich wird, und 4.3%ige Sammelgele (Zusammensetzung in Tabelle 1 B) verwendet. Ein der gewünschten Proteinmenge entsprechendes Volumen an Zellextrakt wird entnommen und 3 min in Probenpuffer bei 95°C erhitzt. Die Proben können nun in die Geltaschen aufgetragen werden. Die Gesamtzellextrakte werden über die Polyacrylamidgele bei 25 mA in einem Elektrophoresepuffer, bestehend aus 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.2 M Glycin, 0.5% (w/v) SDS, aufgetrennt. Als Größenmarker dient der bereits gefärbte Molekulargewichtsstandard "Prestained Molecular Weight Marker" der Firma Fermentas, da die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Dieser setzt sich aus folgenden Proteinen bekannter Größe zusammen: β -Galactosidase (118 kDa), bovines Serumalbumin (86 kDa), Ovalbumin (47 kDa), Carboanhydrase (36 kDa), β -Lactoglobulin (26 kDa) und Lysozym (20 kDa).

A

Trenngel	7.5%	10%	12.5%	15%	20%
Lösung A [ml]	9	12	15	18	24
Lösung B [ml]	9	9	9	9	9
Wasser [ml]	18	15	12	9	3
APS [μ l]	200	200	200	200	200
TEMED [μ l]	20	20	20	20	20

B

Sammelgel	4.3%
Lösung A [ml]	2.2
Lösung C [ml]	3.8
Wasser [ml]	9
APS [μ l]	100
TEMED [μ l]	40

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Polyacrylamidgele.

4.2.4 Westernblot

Hierunter versteht man den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Membran mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Dabei bleiben die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haften. Der Transfer erfolgt in diesem Falle auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran. Der Proteintransfer wird hier in einem vertikalen Puffertank, an dessen Seitenwänden Elektroden angebracht sind, vorgenommen. Gel und Membran werden "sandwichartig" zwischen Filterpapier, Schwämmen und 2 Gitterplatten eingeklemmt und senkrecht in den Puffertank geschoben. Der Transfer auf die PVDF-Membran (Roche, Mannheim) wird über Nacht bei 120 mA vorgenommen.

4.2.5 Immunfärbung der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgt indirekt immunologisch: als Primärantikörper dienen die für die Untereinheiten der CK2 spezifischen Peptidseren bzw. andere entsprechende Antikörper. Als Sekundärantikörper wird ein Peroxidase-Konjugat verwendet. Als Substrat wird die Peroxidase "Lumi-Light" der Firma Roche angeboten, mit deren Hilfe ein chemilumineszenter Nachweis der geblotteten Proteine möglich ist.

Die Detektion der Proteine geschieht, falls nicht anders ausgeführt, folgendermaßen: Nach Beendigung des Blots wird die Membran für 1 h in einer Blockierlösung aus

PBS mit 0.1% Tween20 und 5% Trockenmilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h in PBS mit 0.1% Tween20 und 1% Trockenmilchpulver. Nach dreimaligem Waschen (10 min) mit PBS / 0.1% Tween20 / 1% Trockenmilchpulver folgt in gleicher Weise die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die Primärantikörper werden in der Regel in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, während der Sekundärantikörper gegen Kaninchen 1:30000 und die Sekundärantikörper gegen Maus bzw. Ziege 1:10000 verdünnt werden. Es schließt sich ein dreimaliger Waschschrift mit Waschpuffer aus 0.1% (v/v) Tween20 in PBS, pH 7.4 an. Danach wird die Detektion mit dem "Lumi-Light Westernblot Substrat" von Roche durchgeführt. Bei Bedarf werden die Membranen zur Nachinkubation kurz in Methanol geschwenkt, getrocknet und zwischen zwei Filterpapieren eingeschweißt bei 4°C aufbewahrt. Bei erneuter Verwendung wird die Membran zuvor in Methanol geschwenkt und dann nach oben beschriebenem Vorgang behandelt.

4.3 Apoptosenachweise

4.3.1 Durchflußcytometrie

Das Durchflußzytometer stellt ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen (Genzlinger, 1998), hier wurde Propidiumjodid eingesetzt. So kann man durch Färbung der DNA den DNA-Gehalt einer Zellpopulation messen und den verschiedenen Zellzyklusphasen zuordnen, bzw. apoptotische Zellpopulationen darstellen, da deren DNA-Gehalt geringer als der einer G₁-Population ist.

Zur FACS-Analyse werden die Zellkulturen, wie bereits beschrieben, mit CK2-Inhibitoren behandelt, nach entsprechender Inkubationsdauer abtrypsiniert und mit PBS (pH 7.4) einschließlich des überstehenden Mediums in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen werden für 7 min bei 250xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200 µl PBS resuspendiert und die Zellen durch Zugabe

von 2 ml eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert. Die Fixierung erfolgt für 30 min auf Eis. An dieser Stelle kann der Arbeitsvorgang unterbrochen werden und die Zellen über mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden. Nach der Fixierung werden die Zellen wiederum bei 250xg für 7 min abzentrifugiert und das Pellet in 800 µl PBS resuspendiert. Es werden 100 µl RNase A (1 mg/ml; Roth) und 100 µl Propidiumjodid (400 µg/ml; Sigma) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Propidiumjodid ist ein interkalierender Farbstoff, der sowohl DNA als auch doppelsträngige RNA anfärbt, daher muss durch den Verdau mit RNaseA gewährleistet werden, dass doppelsträngige RNA, die das Ergebnis verfälschen würde, abgebaut wird. Propidiumjodid wird durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und fluoresziert bei 630 nm. Die Messung dieser Fluoreszenz liefert die DNA-Gehalt-Verteilung innerhalb der Zellpopulation. Es werden 20000 Zellen mit einer Rate von 100 - 200 Zellen pro Sekunde gezählt. Mit Hilfe eines Computerprogramms, der zugehörigen Auswertesoftware zum FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson), wurden die einzelnen Zellzyklusanteile errechnet und in einem Histogramm dargestellt.

4.3.2 Cytochrom c Freisetzung

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma der Zelle gilt als ein relativ frühes Ereignis bei der Induktion der Apoptose. Da dieses Protein unter normalen Bedingungen nur in der Mitochondrienmembran zu finden ist, dient sein Auftreten im Cytoplasma als Indikator für das Einleiten des programmierten Zelltodes. Um Cytochrom c im Cytoplasma nachzuweisen, ist es erforderlich, die Zellmembran derart zu permeabilisieren, dass die Mitochondrienmembran unbeschädigt bleibt, da das dort vorhandene Cytochrom c bei einer Freisetzung das Ergebnis verfälschen würde. Daher muss für jede Zelllinie die geeignete Konzentration des hier verwendeten Detergenz, Digitonin, vorher unter nicht-apoptotischen Bedingungen ausgetestet werden. Für den Vorversuch, wie auch beim späteren Cytochrom c Nachweis unter Apoptoseinduktion, wird wie folgt vorgegangen: Festsitzende Zellen werden einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml kaltem Sucrosepuffer (210 mM D-Mannitol, 70 mM Sucrose, 10 mM HEPES pH8.8, 0.2 mM EGTA, 5 mM Succinat, 0.15% BSA) abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Schwimmende Zellen werden im Medium abgeschabt und ebenfalls in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden bei 200xg, 5 min und

4°C sedimentiert. Bereits abgelöste Zellen werden mit Sucrosepuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 50 µl Sucrosepuffer resuspendiert, die im Vorversuch ermittelte Menge Digitonin zugegeben und kurz geschüttelt. Danach erfolgt eine kurze Inkubation von 1-2 min auf Eis. Durch Abzentrifugieren bei 16000xg für 2 min und bei 4°C erhält man einen cytosolischen Überstand, der unter apoptotischen Bedingungen Cytochrom c haltig ist. Das Pellet wird erneut in 50 µl PBS mit 1% TritonX-100 resuspendiert und für 5-10 min auf Eis inkubiert, dadurch wird mitochondriales Cytochrom c freigesetzt. Dieser Extrakt kann, nach erneutem Abzentrifugieren für 2 min bei 16000xg, als Positivkontrolle im anschließenden Westernblot verwendet werden, bei dem der Nachweis des Cytochrom c mit einem spezifischen Antikörper in 75 µg Zellextrakt erfolgt.

4.3.3 Spaltung der Procaspase 3

Als Caspasen bezeichnet man Cystein-Aspartat-Proteasen die für die Ausführung des apoptotischen Programms verantwortlich sind. In der Regel liegen sie in nicht-apoptotischen Zellen als inaktive Zymogene vor. Die aktiven Proteasen gehen aus einer Spaltung ihrer Proformen hervor. Daher kann eine Spaltung oder Abnahme des Proenzym, in diesem Falle der Procaspase 3, auf das Vorhandensein der aktiven Form hindeuten. In diesem Falle wird eine Abnahme der Procaspase 3 im Westernblot als Hinweis auf die Aktivität der reifen Caspase 3 gewertet. Der dazu verwendete monoklonale Kaninchenantikörper 8G10 wird abweichend vom üblichen Westernblotprotokoll über Nacht in einer Verdünnung von 1:1000 in Waschpuffer (PBS pH 7.4, 0.1% TritonX-100) mit 5% Magermilchpulver inkubiert. Ebenso wird der Sekundärantikörper in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver in einer Verdünnung von 1:3000 für 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt.

4.3.4 TUNEL(terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)-Assay

Bei der Apoptose auftretende DNA-Strangbrüche können durch Markieren der so entstandenen freien 3'-OH Enden mit modifizierten Nucleotiden detektiert werden. Die Markierung der freien DNA-Enden mit dUTP-Fluorescein erfolgt hier durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase. Während dieser Arbeit wurde dazu der von der Firma Roche angebotene „in situ cell death detection kit, fluorescein“

verwendet. Die Zellen werden, wie schon für die Immunfluoreszenz beschrieben, auf Deckgläschen kultiviert, mit dem apoptoseauslösenden Agens behandelt und nach der gewünschten Inkubationszeit mit PBS gewaschen und in 3.7% Formalin in PBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgt eine Permeabilisierung der Zellen in 0.1% Natriumcitrat mit 0.1% TritonX-100 in PBS für 2 min auf Eis. Nach den Angaben des Herstellers wird ein "TUNEL-Reaktionsmix" hergestellt, indem die Enzymlösung 1:10 mit der Markierungslösung verdünnt wird. Wie schon für die Immunfluoreszenz beschrieben, werden auf jedes Deckgläschen 50 µl dieses Reaktionsmix pipettiert und die Gläschen in einer feuchten Kammer für 60 min bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrollen dienen je ein apoptotischer Ansatz, der nur mit Markierungslösung (ohne Enzym) inkubiert wird bzw. ein nicht-apoptotischer Ansatz, der mit dem vollständigen Reaktionsmix inkubiert wird. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Deckgläschen wie unter 3.1.13 eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop verglichen.

4.3.5 Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP)

Im Rahmen des apoptotischen Programms kommt es zur Spaltung der PARP durch die Caspase 3. Die entstehenden Spaltfragmente von ca. 89 und 24 kDa dienen als Marker für die Aktivität der Caspase 3 und damit für den programmierten Zelltod. Die Caspase 3 gehört zu den so genannten Exekutionscaspasen, das bedeutet, dass Zellen mit aktiver Caspase 3, d.h. mit nachweisbarer PARP-Spaltung, in jedem Fall sterben. Die Spaltprodukte können, wie oben beschrieben, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließendem Westernblot, mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Der Anti-PARP Antikörper C-2-10 der Firma Oncogene wird hierzu 1:100 in Waschpuffer mit 1% Magermilchpulver verdünnt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Alle weiteren Schritte werden wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

4.4 Nukleinsäuretechniken

4.4.1 Transformation von *E. coli*

Die Vermehrung der verwendeten Plasmide wird in *E. coli* vorgenommen. Das Einbringen von DNA wird Transformation genannt und kann auf verschiedene Arten erfolgen. Hier wird eine Hitzeschock-Transformation durchgeführt. Dazu werden 300 µl einer Bakteriensuspension mit 1 µg Plasmid vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 90 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und sofort wieder auf 4°C abgekühlt. Zu diesem Ansatz werden 800 µl LB-Medium hinzugegeben. Der Transformationsansatz wird für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Die pelletierten Zellen werden in diesem Mediumrest resuspendiert, auf eine Selektionsplatte ausgebracht und mit einem Drigalsky-Spatel verteilt. Die Selektionsplatten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag können die Kolonien weiterverarbeitet oder gelagert werden.

4.4.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Gewinnung der in den Bakterien propagierten Plasmid-DNA erfolgt mit dem Nucleobond® AX Kit von Machery Nagel, der auf einer alkalischen Lyse der Zellen beruht. Dabei kommt es, neben der Lyse der Bakterienzellen, zu einer Denaturierung der DNA. Schließlich wird durch Neutralisation die Plasmid-DNA renaturiert, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt, ausfällt und zusammen mit den Zelltrümmern abzentrifugiert werden kann. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wird durch Fällung mit Isopropanol gewonnen.

Von einer Selektionsplatte wird ein Klon in 250 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden die Bakterien abzentrifugiert (4°C, 20 min, 5000xg) in 4 ml Lösung S1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase) resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wird mit 4 ml Lösung S2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt, vorsichtig durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 4 ml

Lösung S3 (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) zugegeben, die Suspension vorsichtig durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird filtriert, um genomische DNA und Zelltrümmer abzutrennen. Der klare plasmidhaltige Überstand wird auf eine mit Puffer N2 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0.15% TritonX-100, pH 6.3 mit H_3PO_4 eingestellt) equilibrierte NUCLEOBOND[®]-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer N3 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, pH 6.3 mit H_3PO_4 eingestellt) wird die Plasmid-DNA mit Puffer N5 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8.5 mit H_3PO_4 eingestellt) in ein Corexrohrchen eluiert. Durch Zugabe von 0.7 – 0.8 Vol Isopropanol wird die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation ($> 15000xg$, 30 min, 20°C) abgetrennt. Die gefällte DNA kann dann mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, an der Luft getrocknet und in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen werden.

4.4.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Basen der DNA und der RNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Diese Eigenschaft lässt sich ausnutzen, um die Konzentration der Nukleinsäuren in wässriger Lösung zu bestimmen. Im Spektralphotometer wird die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, kann man aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA bzw. RNA bestimmen. Er sollte für DNA 1.8 ergeben und für RNA größer als 1.9 sein. Die Konzentration ergibt sich aus der Beziehung $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ DNA bzw. $30 \mu\text{g/ml}$ RNA. Der Quotient A_{260}/A_{230} wird bestimmt, um Verunreinigungen mit organischen Substanzen zu überprüfen. Dieses Verhältnis sollte größer als 1.7 sein. Die Verunreinigung der isolierten RNA mit organischen Substanzen kann zu einer Inhibition der nachfolgenden reversen Transkription führen.

4.4.4 *in-vitro*-Translation

Die *in-vitro*-Translation bietet die Möglichkeit, Proteine in einem zellfreien System herzustellen. Man geht dabei von einer template DNA aus, die üblicherweise aus einer cDNA besteht, die in einen Vektor mit SP6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase-Promotor eingefügt wurde. Zunächst entsteht daraus durch *in-vitro*-Transkription die entsprechende mRNA und anschließend durch *in-vitro*-Translation das gewünschte Protein. Die am weitesten verbreiteten eukaryotischen Translationssysteme sind

diejenigen, die auf Weizenkeimextrakt oder auf Reticulocytenlysat basieren. In dieser Arbeit wurde die *in-vitro*-Translation mit dem „TNT® coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega (USA, Madison) durchgeführt, das bereits alle Komponenten enthält. Um später das *in-vitro*-translatierte Protein durch Autoradiographie nachweisen zu können, wird die Reaktion in Gegenwart von ³⁵S-Methionin durchgeführt. Ein Ansatz für eine *in-vitro*-Translation setzt sich wie folgt zusammen:

TNT® Rabbit reticulocyte Lysate	25 µl
TNT® Reaction Buffer	2 µl
TNT® T7-RNA-Polymerase	1 µl
Aminosäuremix ohne Methionin	1 µl
³⁵ S-Methionin	2 µl (10 µCi/µl)
RNasin® Ribonucleaseinhibitor (40 u/µl)	1 µl
DNA template (0.5 µg/µl)	2 µl und
nucleasefreies Wasser	16 µl

Da die *in-vitro*-translatierten Proteine nicht weiter verwendet werden, sondern nur ihre Synthese im Ansatz kontrolliert wird, wird pro *in-vitro*-Translation nur ¼ des oben beschriebenen Ansatzes verwendet. Dieser wird anschließend für 90 min bei 30°C inkubiert und danach in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Es schließt sich eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an, wobei darauf geachtet wird, dass die Lauffront nicht das Gel verlässt. Nach erfolgter Elektrophorese wird die Lauffront entfernt, das Gel für 30 min in einer Fixierlösung aus 10% Essigsäure, 30% Methanol und 60% Wasser geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und erneut für 30 min in Salizylsäure (0.5 M) unter Schütteln inkubiert. Das Gel wird getrocknet und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt.

4.4.5 mRNA-Isolation

Zur Isolation von mRNA werden verschiedene Kits angeboten, welche die Eigenschaft der mRNA, über ihren Poly-A-Schwanz an Oligo-dT-Cellulose zu binden, ausnützen. In der vorliegenden Arbeit wurde der „QuickPrep micro mRNA Purification Kit“ der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Zellen werden durch einen Puffer mit hohem Gehalt an Guanidinium-Thiocyanat, als RNase-Inhibitor, lysiert und

anschließend mit Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) dreifach verdünnt. Nach Abtrennen des Zelldebris durch Zentrifugieren wird das Lysat auf Oligo-dT-Cellulose (25 mg/ml) gegeben und gemischt, wobei die Bindung der mRNA an die Oligo-dT-Cellulose stattfindet. Die Cellulose wird durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgen 5 Waschschrte mit einem Hochsalzpuffer bestehend aus 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA und 0.5 M NaCl. Nach weiteren 5 Waschschrten mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) wird schließlich die polyadenylierte mRNA mit 2 x 200 µl Elutionspuffer in ein RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Anschließend wird eine Bestimmung der mRNA-Konzentration durchgeführt. Falls die RNA nicht direkt weiterverwendet wird, kann sie aliquotiert bei -80°C gelagert werden.

4.4.6 Fällung der mRNA

Der mRNA-Gehalt des Eluates wird, wie unter 3.4.3 beschrieben, bestimmt. Da für die folgenden Experimente eine Konzentrierung des Eluates nötig war, wurde die RNA wie folgt gefällt und anschließend in einem kleineren Volumen wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 1/40 Volumen Glycogenlösung (5-10 mg/ml in DEPC-Wasser) und 1/10 Volumen Kaliumacetat (2.5 M, pH 5.0) wird die RNA mit 95% Ethanol (vorgekühlt bei -20°C) für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die ausgefallene mRNA wird bei 4°C und 16000xg für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das mRNA-Pellet in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser resuspendiert. Anschließend wird erneut eine Bestimmung des RNA-Gehaltes durchgeführt.

4.4.7 Reverse Transkription

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben von mRNA in eine sog. cDNA. Die cDNA-Synthese erfolgt hier im Rahmen einer Micro-Array-Analyse mit den Bestandteilen des „TrueLabeling-AMP™ Linear RNA Amplification Kit“ der Firma SuperArray, die zum Teil nicht näher spezifiziert werden. In einem ersten Annealingschritt werden 20 – 100 ng der mRNA mit 1 µl „TrueLabeling Primer“ in einem Gesamtansatz von 10 µl zusammengegeben und für 10 min bei 70°C

inkubiert. Anschließend werden 10 µl eines cDNA-Synthese Mastermix hinzugegeben, der pro Ansatz aus

- 4 µl RNase-freiem Wasser
- 4 µl 5x cDNA-Synthesepuffer
- 1 µl RNase-Inhibitor und
- 1 µl „cDNA-Synthese Enzymmix“

besteht. Nach einer Inkubation von 40 min bei 42°C kann die entstandene cDNA bei -20°C gelagert werden. Wird die cDNA nicht im Rahmen der Micro-Array-Experimente benötigt, wird die reverse Transkription mit der reversen Transkriptase „SuperScript™“ der Firma Invitrogen durchgeführt. Zuerst werden in einem Gesamtansatz von 12 µl 1 µl Oligo(dT)-Primer mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 - 500 ng der mRNA zusammengegeben, für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Nun werden pro Ansatz

- 4 µl 5x Erst-Strang-Synthesepuffer
- 2 µl 0.1 M DTT und
- 1 µl RNaseOUT™ als RNase-Inhibitor

hinzugefügt und für 2 min bei 42°C inkubiert bevor 1 µl (200 units) der reversen Transkriptase SuperScript™ zugegeben werden. Die Reaktion findet für 50 min bei 42°C statt bevor das Enzym für 15 min bei 72°C inaktiviert wird.

4.4.8 Micro-Array Analyse

Hierbei handelt es sich um Membranen, auf welche die DNA Sequenzen verschiedener Proteine aufgebracht sind und die zu Expressionsanalysen verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der Micro-Array „Human Signal Pathway Finder“ der Firma Superarray verwendet. Um die Expression verschiedener an Signalkaskaden beteiligter Proteine darzustellen, wird, wie beschrieben, die mRNA der Zellen isoliert und in cDNA zurückübersetzt. Anschließend wird eine markierte cRNA-Sonde hergestellt, die mit der DNA auf der Membran hybridisiert und danach sichtbar gemacht wird. Die Herstellung dieser Sonde erfolgt ebenfalls mit Hilfe des bereits erwähnten Kits. Dazu wird die cDNA für 5 min auf 37°C erwärmt und anschließend folgender „Amplificationmastermix“ pro Ansatz zugegeben:

- 16 µl 2.5x RNA "amplification buffer"
- 2 µl Biotin-16-UTP (Roche, Mannheim) und
- 2 µl „amplification enzyme mix“.

Diese Reaktion wird über Nacht bei 37°C inkubiert und die biotinmarkierte cRNA am nächsten Tag mit dem „SuperArray ArrayGrade cRNA Cleanup Kit“ aufgereinigt. Eine Gehaltsbestimmung und Qualitätskontrolle der cRNA erfolgt photometrisch. Dazu wird die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Die cRNA-Präparation wird nur dann weiterverwendet wenn der Quotient aus den Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm zwischen 1.8 und 2.0 liegt ($1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$) und wenn das Verhältnis aus den Absorptionen bei 260 nm und 230 nm über 1.7 liegt ($A_{260}/A_{230} > 1.7$). Nach einer Vorhybridisierung der Micro-Arrays mit Hybridisierungslösung für 1-2 Stunden bei 60°C in einem Hybridisierungssofen werden 4-20 µg der biotinmarkierten cRNA in 0.75 ml Hybridisierungslösung verdünnt und über Nacht ebenfalls bei 60°C in einem Hybridisierungssofen mit den Arraymembranen hybridisiert. Die Detektion der Sonde erfolgt am nächsten Tag mit einem Streptavidin/alkalische Phosphatase-Konjugat. Zuvor wird die Hybridisierungslösung verworfen und die Membranen für 15 min bei 60°C im Hybridisierungssofen mit Waschlösung 1 (2x SSC, 1% SDS, vorgewärmt auf 60°C) gewaschen. Es folgt ein weiterer Waschschrift unter den gleichen Bedingungen mit Waschlösung 2 (0.1x SSC, 0.5% SDS, vorgewärmt auf 60°C). Die Waschlösung wird verworfen und die Membranen auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Zur Detektion erfolgt ein 40 minütiges Blocken unter Schütteln, gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation mit Streptavidin/alkalische Phosphatase. Die Membranen werden danach 4-mal für 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem CDP-Star Chemolumineszenz Substrat 5 min inkubiert. Die Chemolumineszenz wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

4.5 sonstige Methoden

4.5.1 CK2-Kinaseaktivitätstest

Die enzymatische Aktivität der Proteinkinase CK2 wird über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$) in ein synthetisches Substratpeptid

gemessen. Als Substrat dient ein Peptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD, dessen Serin durch CK2 phosphoryliert werden kann (Marshak und Carroll, 1991). Die Menge des eingebauten Phosphats wird über die Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt.

Dem Gesamtzellextrakt wird ein Aliquot entnommen, das 30 µg Gesamtprotein entspricht, und mit Kinasepuffer auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Als Negativkontrolle dient nur der Extraktionspuffer des Zellextraktes und als Positivkontrolle gereinigtes, in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehendes, CK2-Enzym. Durch die Zugabe von 30 µl CK2-Reaktionsmix zu jeder Probe werden alle für die Umsetzung notwendigen Komponenten bereitgestellt. Darin betragen die jeweiligen Endkonzentrationen im 50 µl Testansatz: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µM ATP, 0.19 mM synthetisches Substratpeptid. Zuletzt werden 10 - 20 µCi [³²P]-γ-ATP pro ml dem CK2-Mix zupipettiert. Nach Zugabe des CK2-Reaktionsmix werden die Proben für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Proben wieder auf Eis zurückgestellt und je 40 µl auf ein Whatman P81 Filterpapier pipettiert, welches das Peptidsubstrat bindet. Noch vor dem Eintrocknen werden die Filter in 85 mM Phosphorsäure gegeben und darin dreimal für 5 min gewaschen. Anschließend wird einmal mit Ethanol gewaschen und die Filter zum Trocknen ausgelegt. Durch die Waschschrte wird nicht in das Peptid eingebautes Phosphat entfernt. Die trockenen Filter werden in Szintillationsgefäße überführt und in einem Szintillationszähler ausgewertet.

4.5.2 Galactosidase-Assay

Die Messung der β-Galactosidaseaktivität dient hier zur Identifikation positiv mit dem Vektor „ptetoff“ transfizierter Zellen. Dazu wird eine transiente Transfektion mit pUHG16-3 der zuvor mit „ptetoff“ transfizierten Zellen durchgeführt. Da es sich um ein sog. Tetoff-System handelt, sollte nach Tetracyclinentzug aus dem Zellkulturmedium die Induktion der β-Galactosidase stattfinden, deren Aktivität mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays nachgewiesen wird. Dazu wird aus Stocklösungen ein Färbereagenz mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 1 mg/ml X-Gal, 4 mM K₃Fe(CN)₆, 4 mM K₄Fe(CN)₆·3 H₂O, 2 mM MgCl₂ in PBS, pH 7.4. Zur eigentlichen Färbung der Zellen wird das Kulturmedium abgesaugt und die

Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgt eine Fixierung der Zellen mit 2% Formalin und 0.2% Glutaraldehyd in PBS, pH 7.3, für 10 min bei Raumtemperatur. Die Zellen werden erneut zweimal mit PBS gewaschen und danach mit der Färbelösung inkubiert. Nach etwa 24 h werden die Zellen auf eine Blaufärbung, die die Aktivität der β -Galactosidase nachweist, kontrolliert. Da dieser Nachweis mit der Gesamtheit aller Zellen durchgeführt wurde, schließt sich nun eine Einzelzellklonierung an. Die erhaltenen Klone werden erneut auf ihre Induzierbarkeit durch Tetracyclinentzug mit dem im Folgenden beschriebenen Luciferasetest überprüft.

4.5.3 Luciferase-Assay

Die Zellen werden transient mit dem Vektor pUHC13-3 transfiziert, der für das Reportergen Luciferase kodiert. Die Induktion der Luciferaseaktivität nach Tetracyclinentzug wird mit dem Luciferase Assay System der Firma Promega bestimmt. Zum Nachweis der Luciferaseaktivität wird das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgt auf der Zellkulturplatte durch Zugabe von 200 μ l Lysepuffer (25 mM Tris, pH 7.8 mit H_3PO_4 eingestellt, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glycerol, 1% TritonX-100) pro Kavität einer 6-Loch-Platte für 15 min bei Raumtemperatur, danach werden die Zellen abgeschabt. Das Zellysat wird in Reaktionsgefäße überführt und kurz bei 13000xg abzentrifugiert. Der Überstand wird bis zur Messung der Luciferaseaktivität auf Eis oder bei $-20^\circ C$ gelagert. Zur Aktivitätsmessung werden 50 μ l Luciferase-Assay-Reagenz in ein Probenröhrchen vorgelegt, 10 μ l Zellysat zugegeben, gemischt und die entstehende Lumineszenz in einem Luminometer gemessen. Es werden jeweils Doppelwerte bestimmt; als Positivkontrolle dient eine stabil mit induzierbarer Luciferase transfizierte CHO-Zelllinie.

5. Ergebnisse

5.1 Inhibition der CK2 in Prostatazellen

Die CK2 spielt eine große Rolle in der Vermittlung von wachstumsstimulierenden Signalen, insbesondere beim Prostatakarzinom (PCA). Deshalb könnte eine Hemmung der CK2-Aktivität eine Möglichkeit zur Verminderung des Tumorwachstums bieten. Da die Inhibition der CK2 in Zellen durchgeführt werden sollte, die verschiedene Stadien eines Prostatakarzinoms repräsentieren, wurde zunächst eine Charakterisierung des CK2-Status in verschiedenen Prostatakarzinomzellen, die sich bezüglich ihres Malignitätsgrades und der Androgenabhängigkeit unterscheiden, vorgenommen. Während für die hormonsensitive Zelllinie LNCaP und die hormoninsensitive Zelllinie PC-3 die Expression der CK2 schon früher gezeigt wurde (Guo et al., 1999), werden hier die Expression und die Lokalisation der CK2 in den Zellen der benignen Prostatahyperplasie (BPH-1), sowie in den Primärzellen P1-289 und P1-373 analysiert.

5.1.1 Charakterisierung des CK2-Status in den Prostatazellen BPH-1, P1-289 und P1-373

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den etablierten Zelllinien LNCaP und PC-3 die Zelllinie BPH-1, gewonnen aus einer benignen Prostatahyperplasie, sowie die aus Prostataektomien stammenden Primärzellen P1-289 und P1-373 verwendet. Zur Bestimmung des CK2-Status dieser Zellen wurden die Untereinheiten der CK2 im Westernblot und mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Um die Expression der CK2-Untereinheiten mit Hilfe eines Westernblots zu untersuchen, wurden 30 µg eines Gesamtzellextraktes mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran überführt. Die Detektion der einzelnen Untereinheiten wurde mit für die α - bzw. α' -Untereinheit der CK2 spezifischen Kaninchenseren vorgenommen, während die β -Untereinheit mit dem monoklonalen Mausantikörper 6D5 sichtbar gemacht wurde (Abb. 6 A). Darüber hinaus konnte die CK2 auch mit Hilfe einer indirekten

Immunfluoreszenz in allen drei Zelllinien gezeigt werden. Um die CK2-Untereinheiten mit den entsprechenden Seren in der Einzelzelle zu zeigen, wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, fixiert, permeabilisiert und mit den spezifischen Seren als Primärantikörper inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit einem Fluorochrom (FITC oder TRITC) gekoppelten Sekundärantikörper, der die Lokalisierung des Proteins mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes erlaubt. Neben der Expression der CK2 konnte hier gezeigt werden, dass alle Untereinheiten im Kern und im Cytoplasma vorliegen, mit einem stark ausgeprägten Fluoreszenzsignal im Nukleus, was für eine überwiegende Lokalisation der Kinase im Zellkern spricht (Abb. 6 B).

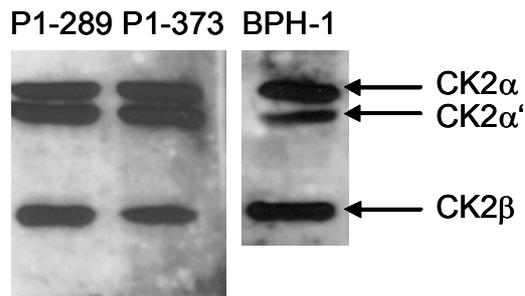
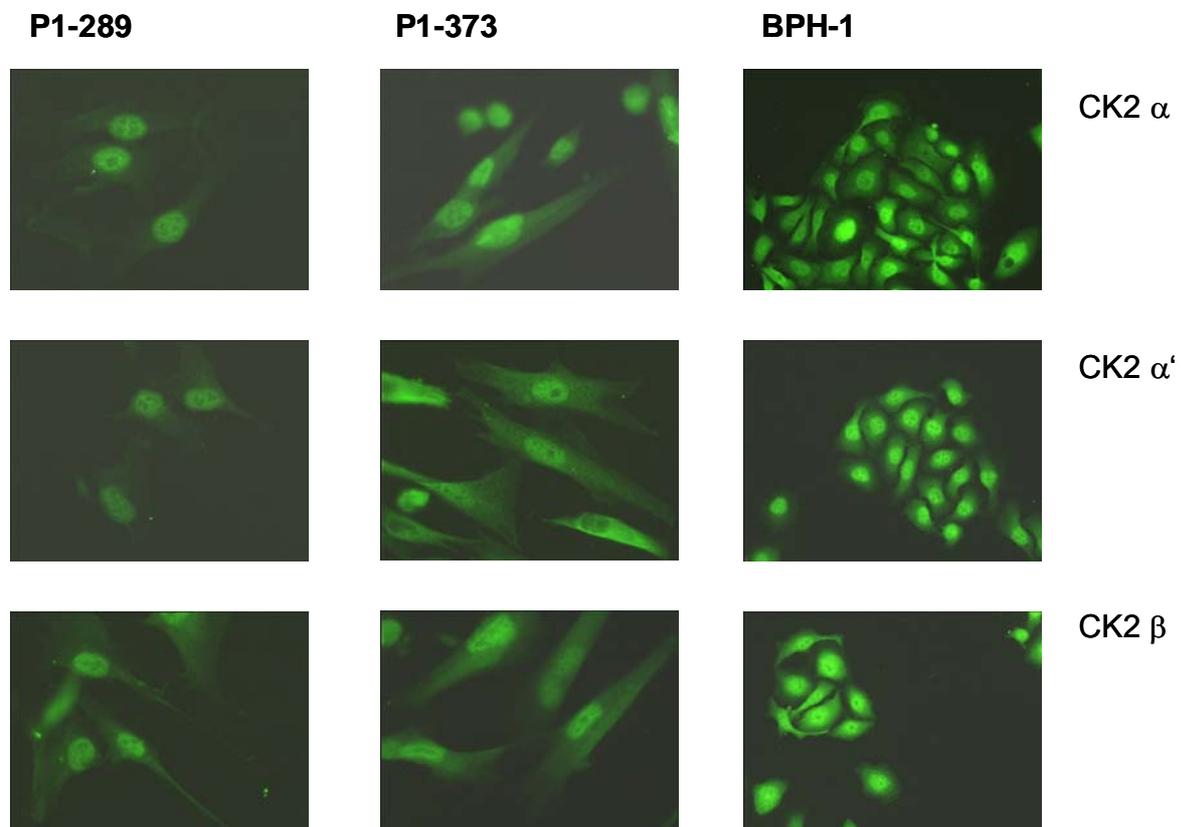
A**B**

Abbildung 6: Nachweis der CK2-Untereinheiten in P1-289-, P1-373- und BPH-1-Zellen: A Nachweis der CK2-Untereinheiten im Westernblot: Dazu wurden 30 μ g eines Zellextraktes über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die CK2-Untereinheiten mit den entsprechenden spezifischen Kaninchenseren detektiert. **B** Nachweis der CK2-Untereinheiten in der Immunfluoreszenz: Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und permeabilisiert, sowie die CK2-Untereinheiten mit den spezifischen Kaninchenseren als Primärantikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht; Vergrößerung: 200x.

5.1.2 Emodin inhibiert konzentrationsabhängig die CK2 in Prostatazellen

Emodin (Abb. 7) ist ein pflanzlicher Sekundärstoff aus dem chinesischen Medizinalrhabarber (*Rheum palmatum*), der als spezifischer Inhibitor der Kinaseaktivität der CK2 beschrieben wurde (Yim et al., 1999). Emodin ist ein Anthrachinonderivat und wirkt als Nucleotidanalogen, das mit ATP bzw. GTP um deren Bindestelle konkurriert.



Abbildung 7: Struktur des CK2-Inhibitors Emodin.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob Emodin auch in Prostatazellen zur Hemmung der CK2 in der Lage ist, und ob die Inhibition eine Abhängigkeit von der verwendeten Emodinkonzentration zeigt. Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von Emodin, in verschiedenen Endkonzentrationen, in das Zellkulturmedium behandelt, nach 24 Stunden geerntet und die Aktivität der CK2 sowie deren Expression bestimmt. Die Aktivität der CK2 wurde im Gesamtzellextrakt über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in ein spezifisches Substratpeptid gemessen. Parallel dazu wurde die Expression der CK2 mittels Westernblot kontrolliert. Aus den in Abbildung 8 gezeigten Diagrammen wird ersichtlich, dass Emodin in allen Zelllinien konzentrationsabhängig die enzymatische Aktivität der CK2 inhibiert.

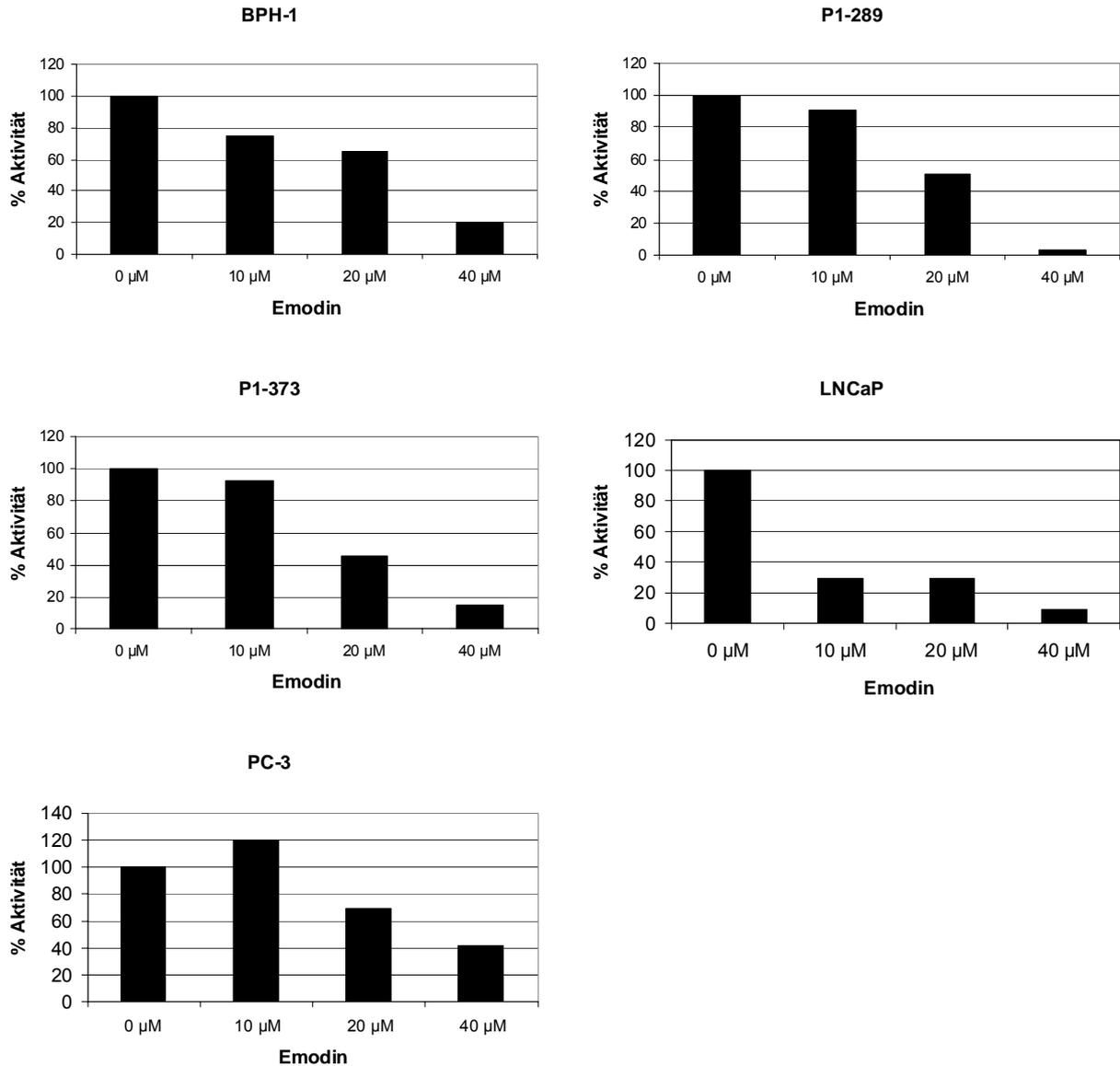


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Inhibition der CK2 durch Emodin: Die Zellen wurden durch Zugabe einer 10 mM-Stammlösung Emodin in das Zellkulturmedium mit den angegebenen Endkonzentrationen behandelt, nach 24 h geerntet und ein Gesamtzellextrakt hergestellt, in dem über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in ein Substratpeptid die Aktivität der CK2 bestimmt wurde. Die Aktivität der mit Lösungsmittel behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Ungeachtet dessen ob es sich um primäre Zellen oder etablierte Zelllinien handelt, findet eine deutliche Reduktion der CK2-Aktivität statt. Von einer weiteren Untersuchung der primären Zellen P1-289 und P1-373 wurde an dieser Stelle abgesehen, da zu wenig über den zellulären Hintergrund dieser Zellen bekannt war, um später beteiligte Signalwege untersuchen zu können. In den etablierten Zelllinien findet die Inhibition der CK2 bei annähernd gleich bleibendem Proteingehalt statt, wie

aus den in Abbildung 9 gezeigten Westernblots hervorgeht. Um die im weiteren Verlauf der Arbeit zu beobachtenden Effekte spezifischer auf die Inhibition der CK2 zurückführen zu können, wurde ein weiterer CK2-Inhibitor, TBB, verwendet.

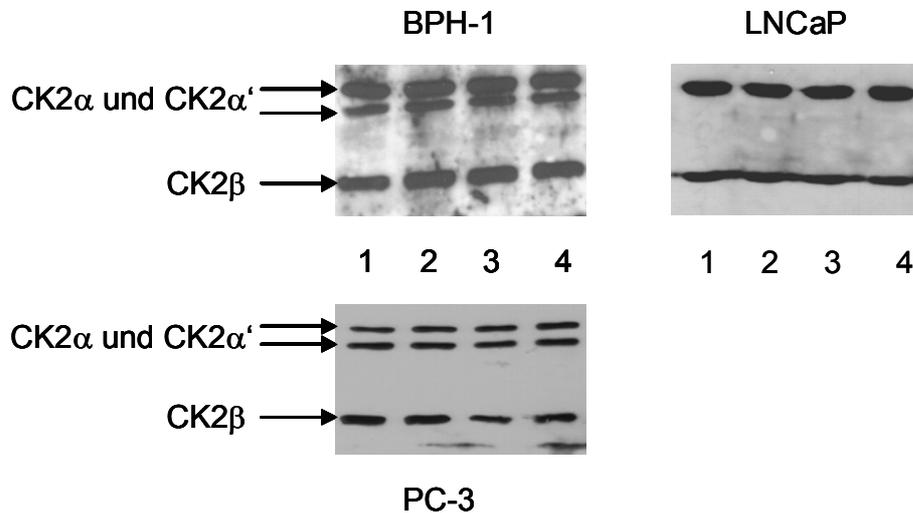
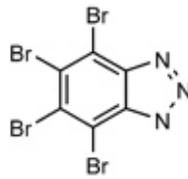


Abbildung 9: Keine veränderte Expression der CK2 nach Inhibition durch Emodin: Die Zellen wurden durch Zugabe einer 10 mM-Stammlösung Emodin in das Zellkulturmedium mit den angegebenen Endkonzentrationen behandelt, nach 24 h geerntet und ein Gesamtzellextrakt hergestellt, der mittels Polyacrylamidgelelektrophorese über ein 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel auf die Expression der CK2-Untereinheiten hin untersucht wurde. Der Nachweis der CK2-Untereinheiten erfolgte mit den dafür spezifischen Kaninchenseren in Prostatazellen nach 24 stündiger Emodinbehandlung: Spuren 1: 0 µM Emodin; Spuren 2: 10 µM Emodin; Spuren 3: 20 µM Emodin; Spuren 4: 40 µM Emodin.

5.1.3 Zeitabhängige Inhibition der CK2 durch TBB und Emodin

4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB, Abb. 10) ist ein synthetischer Inhibitor der CK2, der durch Derivatisierung des schon länger benutzten, aber weniger spezifischen 5,6-Dichloro-1-(β-D-ribofuranosyl)benzimidazol (DRB) entstand. TBB entfaltet seine Wirkung ebenfalls durch Competition mit dem Phosphatgruppendonator, passt sich aber wesentlich exakter in die dafür vorgesehene Bindetasche ein, wodurch die Spezifität der Hemmung erhöht wird (Battistutta et al., 2000).



Tetrabromo-2-azabenzimidazole

Abbildung 10: Struktur des CK2-Inhibitors TBB.

Im Folgenden wurden die Zellen sowohl mit Emodin als auch mit TBB in verschiedenen Konzentrationen und über verschiedene Zeiträume behandelt. Zur Behandlung der Zellen mit Emodin wurden Konzentrationen von 13 μM und 30 μM gewählt, da sich in den vorangegangenen Versuchen herausgestellt hatte, dass Emodinkonzentrationen von 10 μM – 20 μM in den meisten Zelllinien nur eine geringe Inhibition der CK2 bewirken, während mit einer Konzentration von 20 μM – 40 μM eine wesentlich bessere Hemmung der CK2 erreicht wird. Die Behandlung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 48 h um herauszufinden, ob eine verlängerte Inkubationszeit zu einer verbesserten Inhibition der CK2 führt. Nach ähnlichen Vorversuchen wurden die Konzentrationen 25 μM und 50 μM für die Behandlung der Zellen mit TBB gewählt. Es zeigt sich mit TBB, ebenso wie mit Emodin, eine konzentrationsabhängige Hemmung der CK2, die aber durch eine längere Inkubationsdauer nicht wesentlich gesteigert werden kann (Abb. 11). Es wird aber auch hier eine deutliche Abnahme der CK2-Aktivität in allen Zelllinien sichtbar. Unter einer Behandlung mit 13 μM Emodin wird in PC-3- und BPH-1-Zellen ein Rückgang der CK2-Aktivität auf etwa 40% der Aktivität der Kontrollzellen deutlich, während mit 30 μM Emodin nur noch etwa 20-30% Restaktivität gemessen werden können. In LNCaP-Zellen wirkt sich die Inhibition etwas drastischer aus: hier werden bereits mit 13 μM Emodin nur noch etwa 20% Restaktivität gemessen, die durch die höhere Konzentration nur noch unwesentlich geringer wird. Durch eine TBB-Behandlung mit einer Konzentration von 25 μM erreicht man in LNCaP-Zellen etwa 30% CK2-Restaktivität, die durch Gabe von 50 μM TBB auf etwa 20% sinkt. PC-3-Zellen dagegen zeigen nur eine Aktivitätsverminderung um etwa die Hälfte mit einer Konzentration von 25 μM TBB, die mit 50 μM TBB auf etwa 40% CK2-Restaktivität sinkt. BPH-1-Zellen zeigen sich dagegen noch unempfindlicher: nach einem Tag

sinkt hier die Aktivität unter 25 μM TBB auf etwa 80% und mit 50 μM auf 70%, während sich die Auswirkungen mit 50 μM TBB und einer CK2-Restaktivität von 50% nach einer 48 stündigen Inkubation deutlicher zeigen. Eine verlängerte Inkubationsdauer unter 25 μM TBB zeigt keinen Effekt.

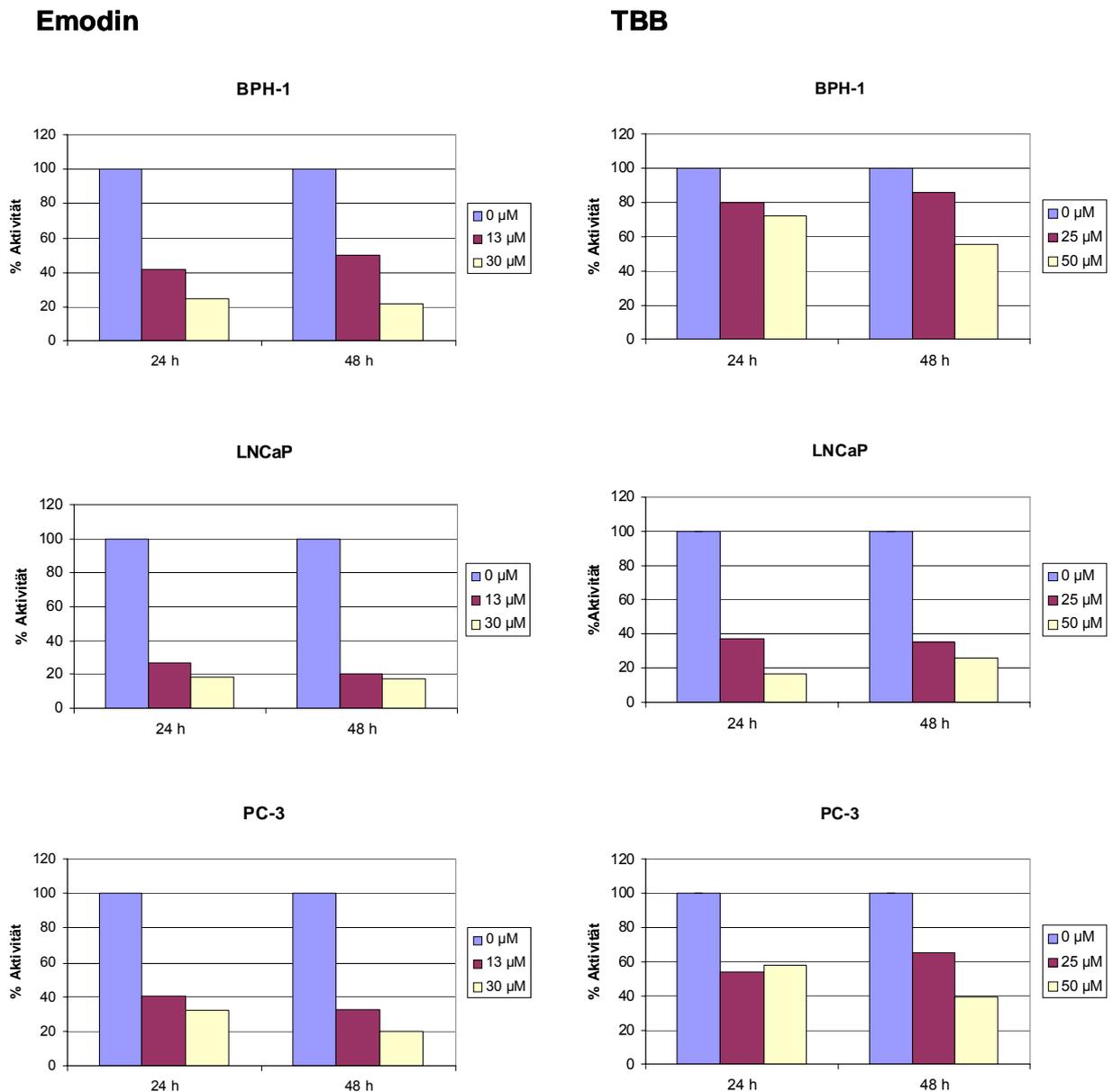


Abbildung 11: Behandlung verschiedener Prostata-Zelllinien mit den CK2-Inhibitoren Emodin und TBB: Die Zellen wurden durch Zugabe der Inhibitoren in den angegebenen Endkonzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der CK2 im Zellextrakt über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in ein synthetisches Substratpeptid bestimmt. Die Aktivität der CK2 in den mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen wurde 100% gesetzt.

5.1.4 CK2-Inhibition beeinflusst die Lebensfähigkeit der Prostatazellen

Die CK2 scheint eine große Rolle für das Zellwachstum zu spielen, so ist sie z.B. in schnell proliferierenden Geweben stark erhöht, oder kann in Prostata Tumoren in ihrer Aktivität und Expression mit dem Malignitätsgrad korrelieren (Ahmed et al., 2001). Daher stellt sich die Frage, welche Folgen die nachgewiesene Inhibition der CK2 für das Wachstum dieser Zellen hat. Aus diesem Grund wurde zunächst die Lebensfähigkeit der Zellen nach einer CK2 Inhibition mit Hilfe des MTT-Assays überprüft. Dazu wurden die Zellen auf einer 24-Loch Platte ausgesät, mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt und durch Zugabe des gelben 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), das an den Mitochondrien zu violetter Formazan umgesetzt wird, die Viabilität der Zellen analysiert. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit MTT inkubiert, anschließend lysiert und so das entstandene Formazan solubilisiert. Die Absorption der entstandenen Lösung wurde photometrisch vermessen, wobei sich deren Absorption proportional zur Anzahl der Zellen verhält. Aus den unten gezeigten Diagrammen (Abb. 12) wird ersichtlich, dass die CK2-Inhibition durch Emodin das Wachstum der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 drastisch beeinflusst. Nach einer dreitägigen Inkubation mit dem Inhibitor sind im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nur noch 50 – 60% der Zellen vorhanden. Bei der Zelllinie BPH-1 hingegen, lässt sich keine Beeinflussung des Wachstums feststellen, da auch nach 3 Tagen ebenso viele Zellen in den Inhibitionsansätzen wie in den Kontrollansätzen vorhanden sind. Das bedeutet, dass hier die Zellen sogar noch zum Wachstum fähig sind. Die gleichen Auswirkungen wie mit Emodin auf LNCaP-Zellen zeigen sich mit dem zweiten Inhibitor (TBB). Nach einer dreitägigen Behandlung mit 50 μ M TBB ist nur noch etwa die Hälfte der LNCaP-Zellen, verglichen mit den DMSO-behandelten Zellen, vorhanden. Ein anderes Bild liefern jedoch die PC-3-Zellen: hier sind nach 3 Tagen noch ebenso viele lebensfähige Zellen im Ansatz mit 50 μ M TBB wie im Ansatz mit 0 μ M TBB vorhanden. Das Gleiche gilt für die Zellen der benignen Prostatahyperplasie, deren Verhalten unter TBB damit dem unter Emodinbehandlung entspricht.

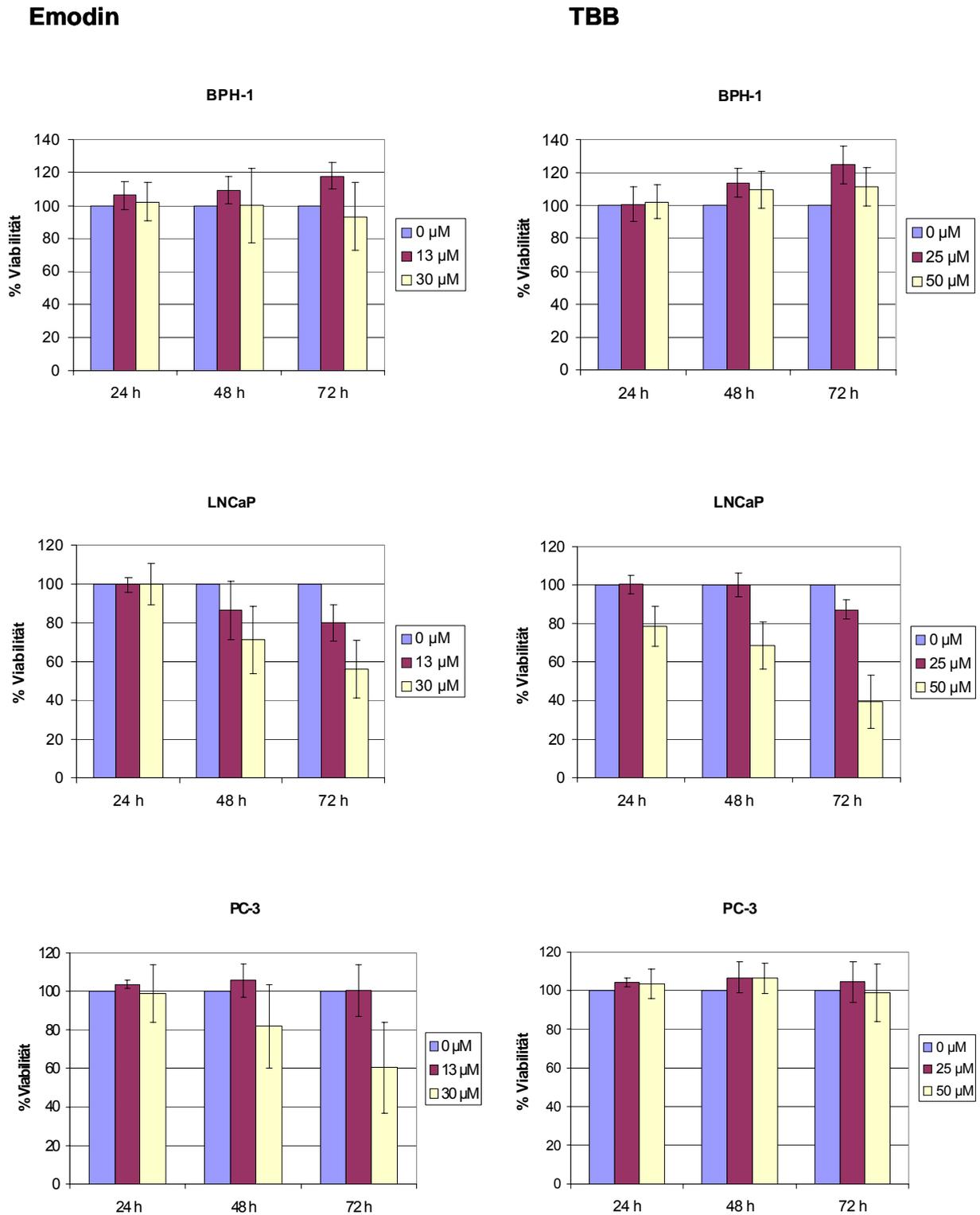
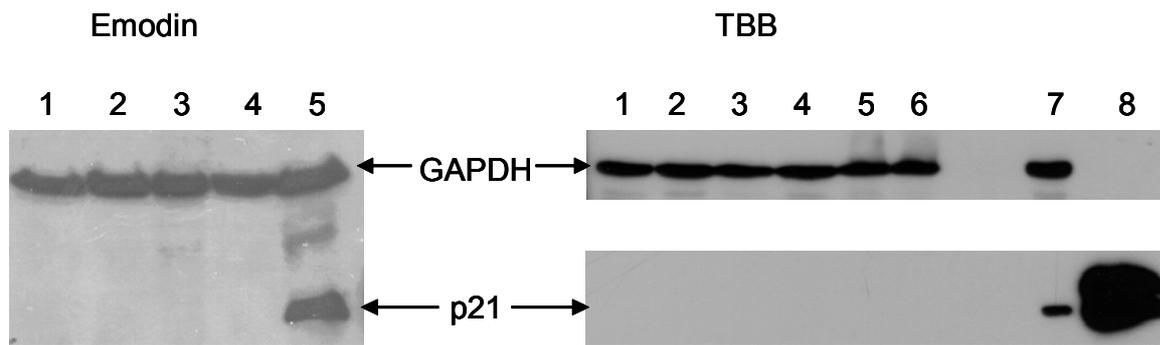


Abbildung 12: Behandlung von Prostatazellen mit den CK2-Inhibitoren Emodin und TBB mit anschließender Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen. Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert und ihre Lebensfähigkeit durch einen MTT-Assay nach 1, 2 und 3 Tagen Inkubationsdauer mit den jeweiligen Inhibitoren bestimmt. Die Absorption der mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen wurde 100% gesetzt.

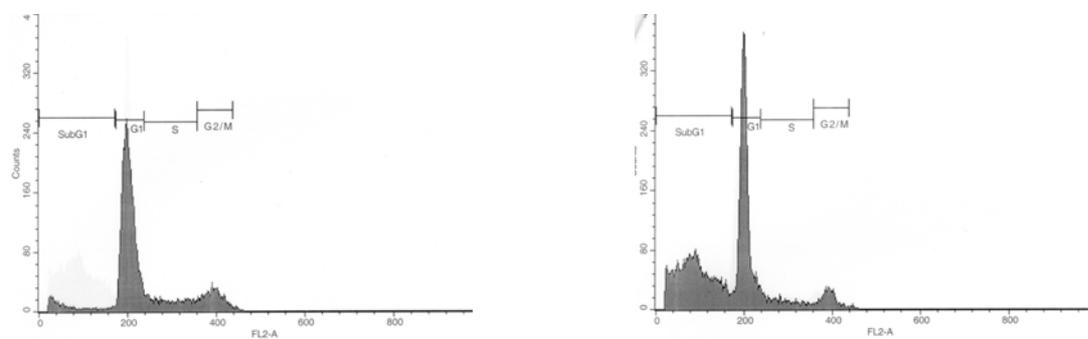
5.1.5 Die Reduktion der Lebensfähigkeit nach Behandlung mit Emodin beruht nicht auf einem Zellzyklusarrest

Da mit Hilfe des MTT-Assays nur mitochondriale Aktivität nachgewiesen wird, die mit der Anzahl an Zellen steigt oder fällt, lässt sich keine Aussage darüber treffen, durch welchen Mechanismus die beobachtete Reduktion in der Zellanzahl zustande kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass die behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen im Zellzyklus arretieren, während die mit Lösungsmittel behandelten Zellen weiterhin proliferieren. Da dies in p53-positiven Zellen, wie der LNCaP-Zelllinie, durch die Induktion des cdk-Inhibitors p21^{WAF1} geschehen könnte, wurde dessen Expression im Westernblot überprüft. Es zeigte sich (Abb. 13 A), dass weder eine Behandlung der Zellen mit Emodin noch eine Behandlung mit TBB für mehrere Tage zu einer Induktion von p21^{WAF1} führen. Als Positivkontrolle wurden rekombinantes p21^{WAF1}-Protein bzw. LNCaP-Zellen verwendet, die zuvor mit Doxorubicin behandelt wurden, was zu einer Induktion von p21^{WAF1} führt (Martinez et al., 2002). Eine Alternative zum Zellzyklusarrest stellt die Apoptose dar, wodurch Zellen, unter bestimmten Bedingungen, in die Lage versetzt werden, sich selbst zu zerstören. Die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) bietet die Möglichkeit sowohl einen Zellzyklusarrest, als auch Apoptose nachzuweisen. Dazu wird die zelluläre DNA mit Propidiumjodid angefärbt, deren Menge anhand der abgegebenen Fluoreszenz bestimmt und in einem sog. Histogramm dargestellt. Dabei repräsentieren Zellen mit einfachem DNA-Gehalt die G₁-Phase des Zellzyklus, Zellen mit einem DNA-Gehalt zwischen der einfachen und der doppelten Menge die S-Phase sowie Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt die G₂/M-Phase. Apoptotische Zellen verursachen durch ihre fragmentierte DNA, einem Charakteristikum der späten Apoptose, ein Signal unterhalb des G₁-Peaks, einen sog. SubG₁-Peak. Aus Abb. 12 B wird ersichtlich, dass nach Emodinbehandlung von LNCaP-Zellen deutlich mehr fragmentierte DNA auftritt als in unbehandelten Zellen, einhergehend mit einer Abnahme der Zellen in den Zellzyklusphasen G₁ und G₂/M. Dabei ist keine Zunahme der Zellanzahl in einer der drei Zellzyklusphasen zu beobachten, dies gilt auch für eine längere Inkubationsdauer von 72 h (Abb. 12 C). Damit liefert auch die FACS-Analyse keine Hinweise auf einen Zellzyklusarrest. Allerdings spricht das Auftreten einer SubG₁-Population, die das Vorhandensein von fragmentierter DNA zeigt, für das Absterben von Zellen durch eine Behandlung mit Emodin.

A



B



C

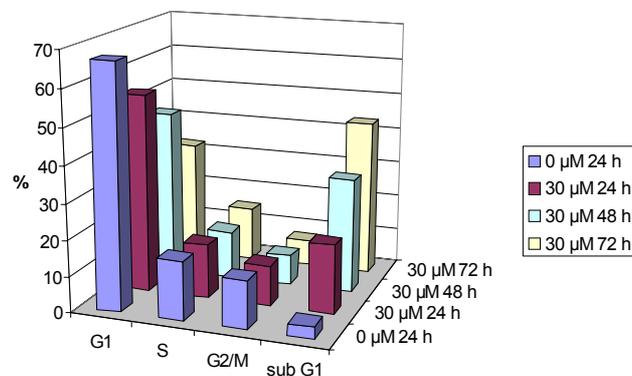


Abbildung 13: Eine CK2-Inhibition in LNCaP-Zellen durch Emodin bewirkt keinen Zellzyklusarrest: **A** Die Expression von p21^{WAF1} wurde im Westernblot mit dem spezifischen Antikörper SK1 untersucht, während die gleichmäßige Beladung der Spuren mit einem Antikörper gegen GAPDH gezeigt wird; Westernblot nach Emodinbehandlung (links): Spur 1: 0 μM Emodin, 24 h; Spur 2: 30 μM Emodin, 24 h; Spur 3: 0 μM Emodin, 48 h; Spur 4: 30 μM Emodin, 48 h; Spur 5: Positivkontrolle 1 μg/μl Doxorubicin, 24 h; Westernblot nach TBB-Behandlung (rechts): Spur 1: 0 μM TBB, 24 h; Spur 2: 25 μM TBB, 24 h; Spur 3: 50 μM TBB, 24 h; Spur 4: 0 μM TBB, 48 h; Spur 5: 25 μM TBB, 48 h; Spur 6: 50 μM TBB, 48 h; Spur 7: Positivkontrolle 1 μg/μl Doxorubicin, 24 h; Spur 8: rekombinantes p21^{WAF1}-Protein. **B** FACS-Analyse un behandelter (links) und mit 30 μM Emodin behandelte (rechts) LNCaP-Zellen nach 48 h. Die Färbung der DNA erfolgte mit Propidiumjodid. **C** Verteilung der Zellzyklusphasen emodinbehandelter Zellen über 24 h, 48 h und 72 h.

Da in PC-3-Zellen ein Wachstumsrückgang nach Emodinbehandlung im MTT-Assay beobachtet werden konnte, wurden diese Zellen ebenfalls einer FACS-Analyse nach Emodinbehandlung unterzogen. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, zeigen die Zellen nach einer Emodinbehandlung von 3 Tagen mit 30 μM Emodin keine auffälligen Veränderungen des Zellzyklusprofils, bis auf einen leichten Anstieg der Zellen in der G₁-Phase von etwa 40% auf 50%.

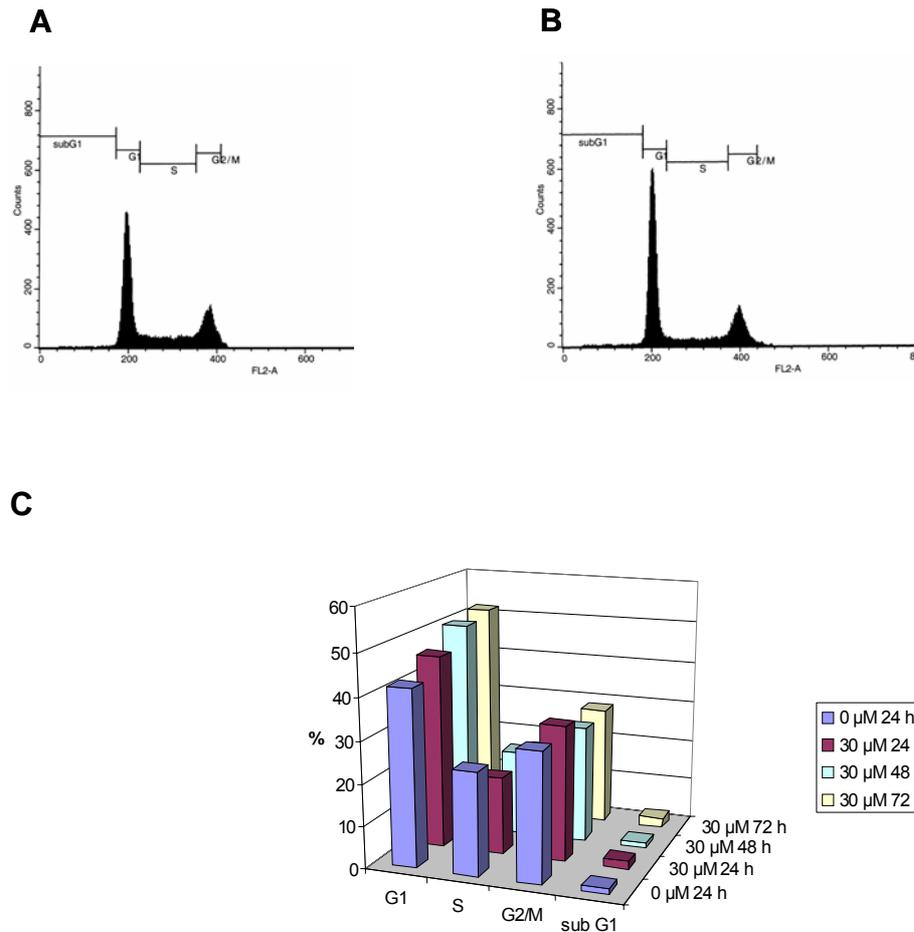


Abbildung 14: Eine CK2-Inhibition in PC-3-Zellen durch Emodin bewirkt keinen Zellzyklusarrest: FACS-Analyse unbehandelter (A) und mit 30 μM Emodin behandelter (B) PC-3-Zellen nach 72 h. Die Färbung der DNA erfolgte mit Propidiumjodid. C Verteilung der Zellzyklusphasen emodinbehandelter PC-3-Zellen über 24 h, 48 h und 72 h.

5.2 CK2-Inhibition induziert Apoptose in Prostatakarzinomzellen, nicht aber in den Zellen einer benignen Prostatahyperplasie

Der in der FACS-Analyse von LNCaP-Zellen beobachtete SubG₁-Peak kann durch das Entstehen von DNA-Fragmenten während der Apoptose verursacht sein. Fragmentierte DNA ist kein alleiniges Merkmal von apoptotischen Zellen, sondern kann auch unter anderen Bedingungen, wie z.B. nekrotischen Vorgängen, beobachtet werden. Deshalb galt es als nächstes die Frage zu klären, ob der beobachtete Rückgang in der Lebensfähigkeit der Prostatazellen tatsächlich auf Apoptose zurückzuführen ist.

5.2.1 Freisetzung von Cytochrom c in das Cytoplasma apoptotischer Zellen

Die wohl bekannteste Aufgabe des Cytochrom c besteht in der Beteiligung am Elektronentransport der Atmungskette, woraus sich seine Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran ergibt. Unter normalen zellulären Bedingungen ist kein Cytochrom c im Cytoplasma einer Zelle zu finden, unter apoptotischen Bedingungen jedoch findet eine Freisetzung dieses Proteins in das Plasma statt, wo es zusammen mit APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) und Procaspase 9 ATP-abhängig deren autoproteolytische Aktivierung verursacht. Aus diesem Grund kann das Vorhandensein von Cytochrom c im Cytoplasma einer Zelle als Marker für eine frühe Apoptose dienen. Um dieses Protein gezielt nur im Plasma der Zelle nachzuweisen, muss man aber in der Lage sein, die Proteine der Zelle so zu extrahieren, dass die Mitochondrien unbeschädigt bleiben, da das dort verbleibende Cytochrom c das Ergebnis verfälschen würde. Die Extraktion des Cytoplasmas erfolgt in einem Puffer aus 210 mM D-Mannitol, 70 mM Sucrose, 10 mM HEPES, pH 8.0, 0.2 mM EGTA, 5 mM Succinat und 0.15% BSA unter Zugabe von Digitonin zur Permeabilisierung der Zellmembran. Die Konzentration an Digitonin muss jedoch zuvor für jede Zelllinie ausgetestet werden, um diejenige Konzentration zu finden, bei der zwar die Zellmembran permeabilisiert wird, die Mitochondrienmembran aber intakt bleibt. Die geeignete Digitoninkonzentration wird durch Austesten verschiedener Digitoninmengen ermittelt. Dazu werden die Zellen in Sucrosepuffer geerntet, abzentrifugiert und das Pellet in Sucrosepuffer wieder aufgenommen. Danach erfolgt die Zugabe verschiedener Mengen an Digitonin. Nach einer 1-2 minütigen Inkubation auf Eis werden die cytosolischen Überstände abzentrifugiert und der Gehalt an Cytochrom c

mittels Westernblot bestimmt. Aus den in Abbildung 15 gezeigten Vorversuchen ergeben sich für die einzelnen Zelllinien folgende Digitoninkonzentrationen: LNCaP: 100 µg/50 µl, PC-3: 75 µg/50 µl, BPH-1: 75 µg/50 µl.

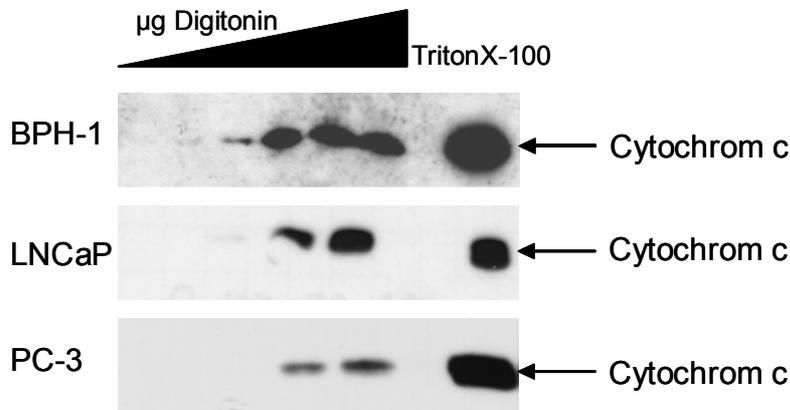


Abbildung 15: Vorversuch zur Cytochrom c Freisetzung: Die Zellen wurden durch Abschaben in Sucrosepuffer geerntet und anschließend steigende Mengen an Digitonin zugegeben. Die erhaltenen Überstände wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese über ein 15%iges Gel und anschließendem Westernblot auf das Vorhandensein von Cytochrom c in diesen cytoplasmatischen Extrakten analysiert. Konzentrationsreihe für die BPH-1-Zellen: 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg und 350 µg Digitonin pro 50 µl Sucrosepuffer; Konzentrationsreihe für die LNCaP-Zellen: 0 µg, 100 µg, 150 µg und 200 µg Digitonin pro 50 µl Sucrosepuffer; Konzentrationsreihe für die PC-3-Zellen: 0 µg, 50 µg, 100 µg, und 200 µg Digitonin pro 50 µl Sucrosepuffer.

Anschließend wird untersucht, ob eine CK2-Inhibition eine Freisetzung von Cytochrom c in das Cytoplasma der Zellen bewirkt. Dazu werden die Zellen mit den CK2-Inhibitoren über verschiedene Zeiträume behandelt und danach, wie beschrieben, geerntet und extrahiert. In LNCaP-Zellen ist bereits nach 24 h Inkubationsdauer sowohl mit Emodin als auch mit TBB eine Freisetzung von Cytochrom c zu beobachten (Abb. 16). Ebenso ist für PC-3-Zellen aus Abb. 16 das Vorhandensein von Cytochrom c im Cytoplasma bereits nach eintägiger Inhibition der CK2 zu erkennen, sowohl nach Zugabe von Emodin als auch nach Zugabe von TBB. Dagegen kann in den Zellen der benignen Prostatahyperplasie, BPH-1, weder nach 24 h noch nach 48 h Behandlung mit den Inhibitoren Cytochrom c im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 16).

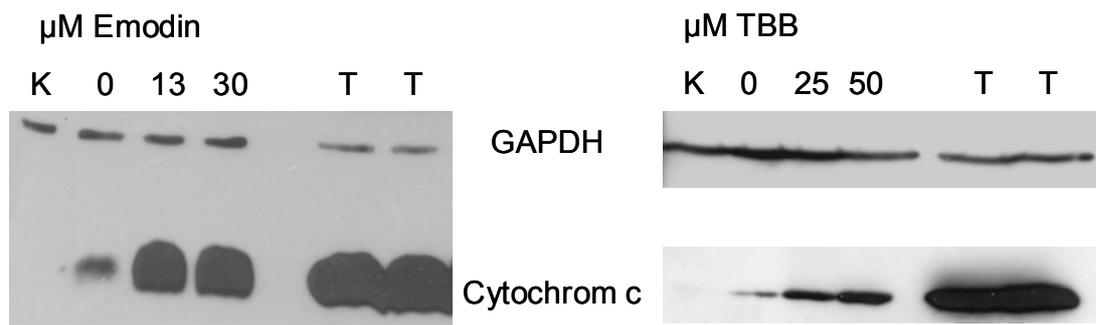
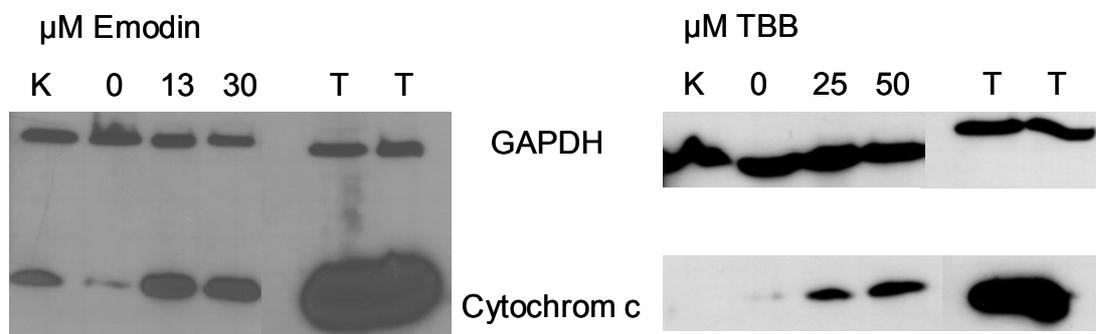
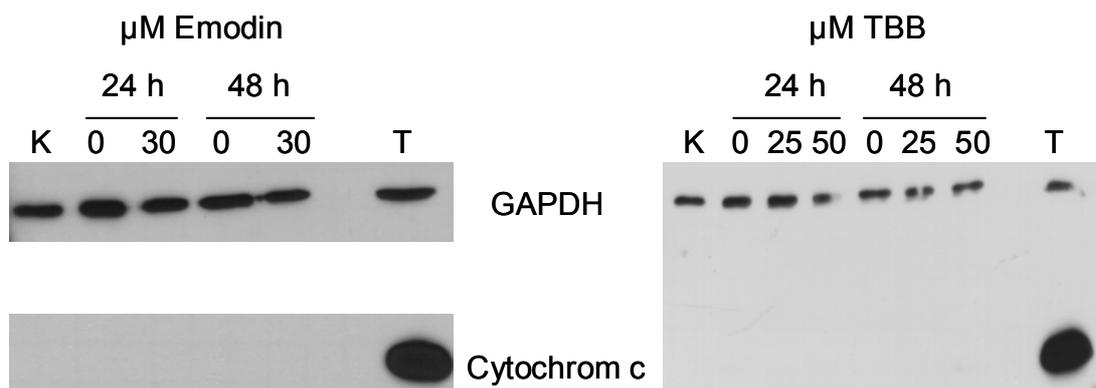
LNCaP**PC-3****BPH-1**

Abbildung 16: Cytochrom c Freisetzung nach CK2-Inhibition: Die Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit den Inhibitoren behandelt und cytoplasmatische Extrakte, wie beschrieben, hergestellt. Die zurückbleibenden Pellets wurden mit PBS/1% TritonX-100 nachextrahiert. Die Lysate wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese über ein 15%iges Gel aufgetrennt. Mit dem monoklonalen Antikörper 7H8 wurde Cytochrom c nachgewiesen, während zur Kontrolle der Beladung GAPDH mit dem Antikörper FL-335 sichtbar gemacht wurde. Als Positivkontrolle wurden in den mit T gekennzeichneten Spuren die Tritonextrakte aufgetragen. In den mit K bezeichneten Spuren wurden Extrakte ohne Digitoninbehandlung aufgetrennt.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Induktion der Apoptose in den Karzinomzellen, im Gegensatz zu den normalen Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraumes von zwei Tagen hin. Durch die Aktivierung der Caspase 9 sollte es zu Auslösung der Caspasekaskade gekommen sein, im Laufe derer es zur Aktivierung von Exekutionscaspasen kommt, die für das Entstehen der charakteristischen morphologischen Merkmale der Apoptose durch Proteolyse ihrer Substrate verantwortlich sind. Zur Gruppe dieser Exekutionscaspasen zählt die Caspase 3, deren Aktivierung im nächsten Schritt untersucht werden sollte.

5.2.2 Aktivierung der Caspase 3

Caspasen liegen in der Regel als inaktive Proformen in der Zelle vor, zu deren Spaltung und damit Aktivierung es durch übergeordnete Caspasen oder andere Proteasen nach einem apoptotischen Stimulus kommt. Damit ist eine Abnahme im Gehalt der Proform der Caspase 3 ein Zeichen für deren proteolytische Spaltung und damit deren Aktivierung. Die Procaspase 3 wurde im Folgenden mit einem spezifischen Antikörper in Extrakten von CK2-inhibierten und nicht-inhibierten Zellen nachgewiesen. In LNCaP-Zellen ist, wie aus Abbildung 17 A ersichtlich, bereits nach 24 h, ebenso wie nach 48 h, Inkubation mit Emodin eine deutliche Abnahme der Procaspase 3 zu erkennen. In PC-3-Zellen dagegen wird eine Abnahme der Proform erst nach 48 h Emodinbehandlung deutlich, die nach 72 h noch stärker ausgeprägt ist (Abb. 17 B). Die Abnahme der Procaspase 3 spricht für eine Aktivierung der Caspase 3 nach der Inhibition der CK2 mit Emodin. Dass die Caspase 3 auch aktiv ist, zeigen die Westernblots in Abb. 17 C und D. Die Poly-ADP-Ribosepolymerase ist ein Substrat der Exekutionscaspasen 3 und 7, die das Protein mit einer Gesamtgröße von ca. 116 kDa in zwei Fragmente von 89 kDa und 27 kDa spalten. Daher kann das Auftreten des 89 kDa-Spaltproduktes als ein Hinweis auf die Aktivität dieser Exekutionscaspasen dienen. Aus Abb. 17 C geht hervor, dass dieses Spaltprodukt in LNCaP-Zellen bereits nach einer Inkubation mit 20 μ M Emodin über 24 h detektierbar ist. In PC-3-Zellen wird dieses Spaltprodukt, ebenso wie die Abnahme der Procaspase 3 (Abb. 17 B und D), erst nach einer zweitägigen Inkubation mit 13 μ M bzw. 30 μ M Emodin gefunden.

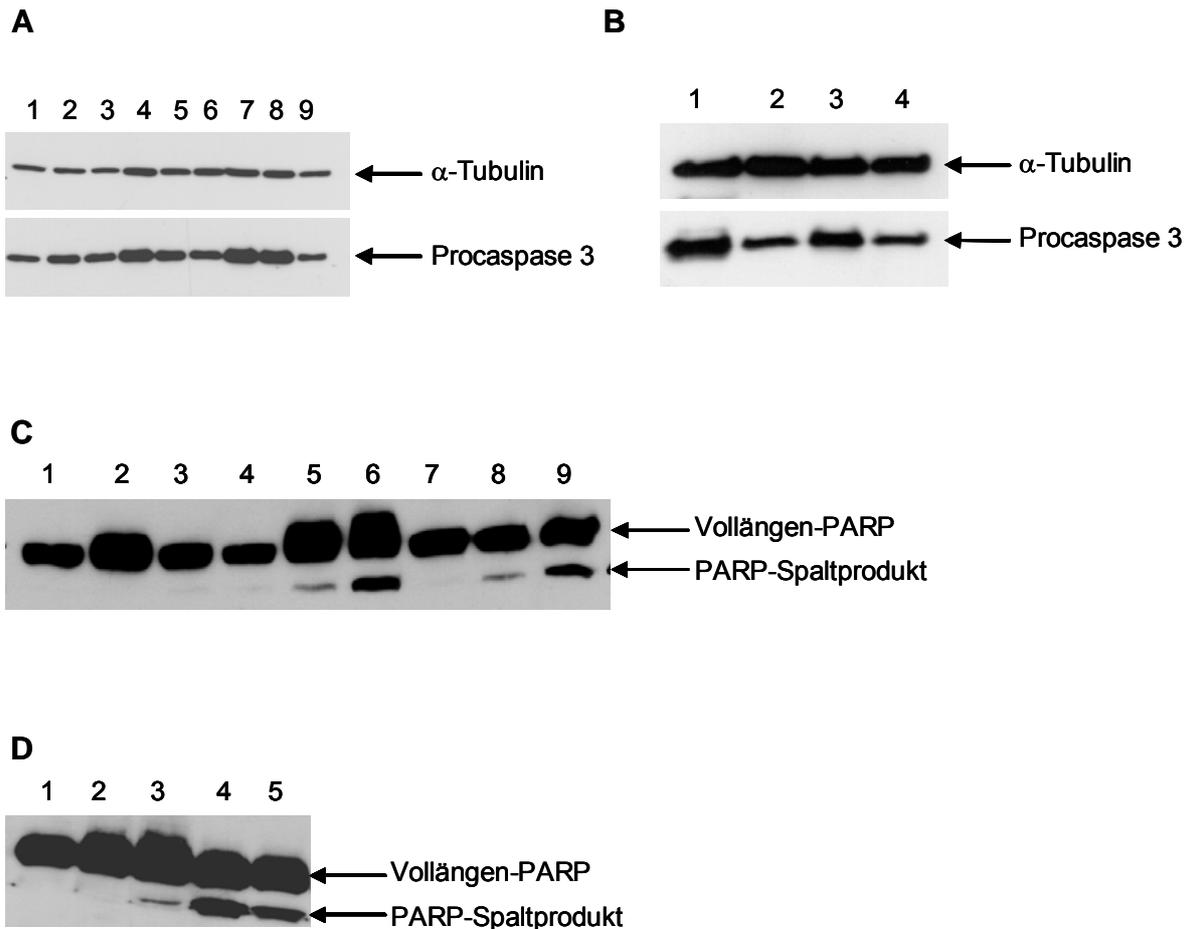


Abbildung 17: A und B Abnahme der Procaspase 3 nach Emodinbehandlung: Prostatakarzinomzellen wurden mit Emodin behandelt, geerntet, extrahiert und 50 µg der Gesamtzellextrakte über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Zur Detektion der Proform der Caspase 3 erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper 8G10 (cell signaling) über Nacht in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver. Um die gleichmäßige Beladung der Taschen zu zeigen, wurde α-Tubulin mit dem Antikörper DM 1A von Sigma nachgewiesen. **A** PC-3-Zellen: Spur 1: 0 µM Emodin, 24 h; Spur 2: 13 µM Emodin 24 h; Spur 3: 30 µM Emodin, 24 h; Spur 4: 0 µM Emodin, 48 h; Spur 5: 13 µM Emodin 48 h; Spur 6: 30 µM Emodin, 48 h; Spur 7: 0 µM Emodin, 72 h; Spur 8: 13 µM Emodin 72 h; Spur 9: 30 µM Emodin, 72 h; **B** LNCaP-Zellen: Spur 1: 0 µM Emodin, 24 h; Spur 2: 30 µM Emodin 24 h; Spur 3: 0 µM Emodin, 48 h; Spur 4: 30 µM Emodin 48 h.

C und D Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase nach Emodinbehandlung: Prostatakarzinomzellen wurden mit Emodin behandelt, geerntet, extrahiert und 150 µg der Gesamtzellextrakte über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Zur Detektion der Poly-ADP-Ribosepolymerase diente der monoklonale Mausantikörper C-2-10 der Firma Oncogene. **C** PC-3-Zellen nach dreitägiger Emodinbehandlung: Spur 1: 0 µM Emodin, 24 h; Spur 2: 13 µM Emodin 24 h; Spur 3: 30 µM Emodin, 24 h; Spur 4: 0 µM Emodin, 48 h; Spur 5: 13 µM Emodin 48 h; Spur 6: 30 µM Emodin, 48 h; Spur 7: 0 µM Emodin, 72 h; Spur 8: 13 µM Emodin 72 h; Spur 9: 30 µM Emodin, 72 h; **D** LNCaP-Zellen nach 24 h Emodinbehandlung: Spur 1: 0 µM Emodin; Spur 2: 10 µM Emodin; Spur 3: 20 µM Emodin; Spur 4: 40 µM Emodin; Spur 5: 80 µM Emodin.

5.2.3 DNA-Fragmentierung nach CK2-Inhibition

Im Endstadium der Apoptose kommt es zur Spaltung von DNA durch Nucleasen. Die dabei entstehenden DNA-Strangbrüche sind mit Hilfe der TUNEL-Technik nachweisbar (Terminal transferase mediated dUTP nick end labeling). Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, 48 h mit den Inhibitoren behandelt und anschließend mit terminaler Transferase und Fluorescein-markiertem dUTP inkubiert. Die in Abbildung 18 C auftretenden grünen Punkte zeigen DNA-Strangbrüche nach Emodinbehandlung in LNCaP-Zellen an. In Abbildung 18 D sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt, an denen ebenfalls morphologisch deutlich wird, dass die Zellen schwer beeinträchtigt sind. Das gleiche Bild liefert die Behandlung von LNCaP-Zellen mit TBB (Abb. 18 G und H), auch hier sind deutlich DNA-Strangbrüche erkennbar.

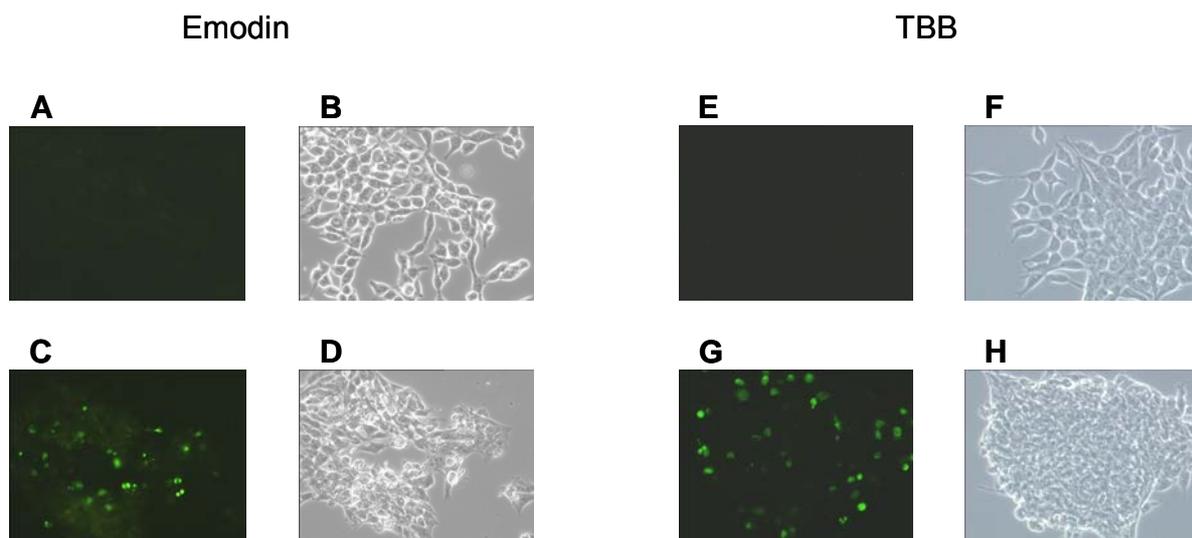


Abbildung 18: TUNEL-Assay mit LNCaP-Zellen nach zweitägiger CK2-Inhibition. A, B, E und F Kontrollzellen; C und D Zellen nach 48 h Emodinbehandlung (30 µM), G und H Zellen nach 48 h TBB-Behandlung (50 µM); Vergrößerung 200x.

In PC-3-Zellen dagegen konnte, übereinstimmend mit der FACS-Analyse, keine DNA-Fragmentierung nach einer 3-tägigen Inkubation mit 30 µM Emodin festgestellt werden. Allerdings konnten bei einer Betrachtung der Zellen im Phasenkontrast sowohl bei PC-3-Zellen als auch bei LNCaP-Zellen nach einer Behandlung mit 30 µM Emodin morphologische Veränderungen, z.B. das Blebbing, beobachtet werden, die

für das Eintreten apoptotischer Vorgänge sprechen. Zellen mit „Blebbs“ sind in der folgenden Abbildung 19 durch ein Sternchen gekennzeichnet.

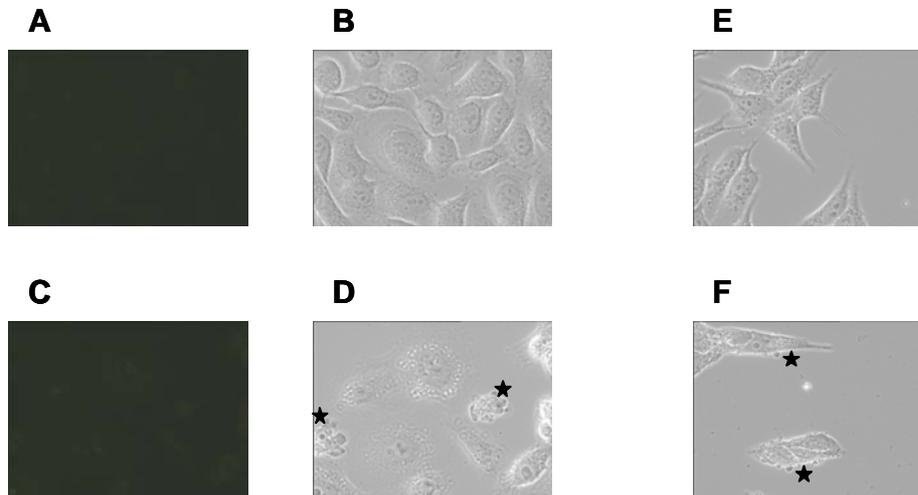


Abbildung 19: TUNEL-Assay mit PC-3-Zellen: PC-3-Zellen wurden über 72 h mit 30 μM Emodin behandelt und anschließend ein TUNEL-Assay durchgeführt. **A** und **B** 0 μM Emodin; **C** und **D** 30 μM Emodin; **E** und **F** Phasenkontrastaufnahmen von LNCaP-Zellen nach einer Behandlung mit 0 μM bzw. 30 μM Emodin. 400x.

5.2.4 Behandlung von MRC-5-Zellen mit CK2-Inhibitoren

Aus den oben gezeigten Experimenten geht hervor, dass die Prostatakrebszelllinien PC-3 und LNCaP nach einer 3-tägigen Behandlung mit Emodin und LNCaP-Zellen auch nach einer Behandlung mit TBB die Apoptose einleiten. Dies gilt aber nicht für die Zelllinie BPH-1, die aus einer benignen Prostatahyperplasie, also nicht aus einem Tumor, stammt. BPH-1-Zellen zeigten weder einen Wachstumsrückgang im MTT-Assay, noch eine Freisetzung von Cytochrom c nach einer Behandlung mit den CK2-Inhibitoren über 2 Tage. Da diese Reaktion im Hinblick auf therapeutische Ansätze äußerst interessant ist, stellt sich die Frage, ob diese Reaktion lediglich auf BPH-1-Zellen beschränkt ist oder ob sie auch bei anderen Nicht-Tumor-Zellen auftritt. Deshalb wurde im Folgenden die humane Lungenfibroblasten-Zelllinie MRC-5 mit den CK2-Inhibitoren behandelt. MRC-5-Zellen wurden durch Zugabe von 30 μM Emodin oder mit 50 μM TBB für 24 bzw. 48 Stunden in das Kulturmedium der Zellen behandelt. Anschließend wurde, wie beschrieben, eine Extraktion zum Nachweis von

Cytochrom c im Cytoplasma durchgeführt. Die dazu erforderliche Digitoninmenge von 100 µg/50 µl wurde zuvor in einem Vorversuch (Abb. 20 A) ermittelt. Ebenso wie bei den Zellen der benignen Prostatahyperplasie ist in MRC-5-Zellen nach einer Emodin- bzw. TBB-Behandlung von 24 h oder 48 h keine Freisetzung von Cytochrom c in das Cytoplasma der Zellen zu erkennen (Abb. 20 B).

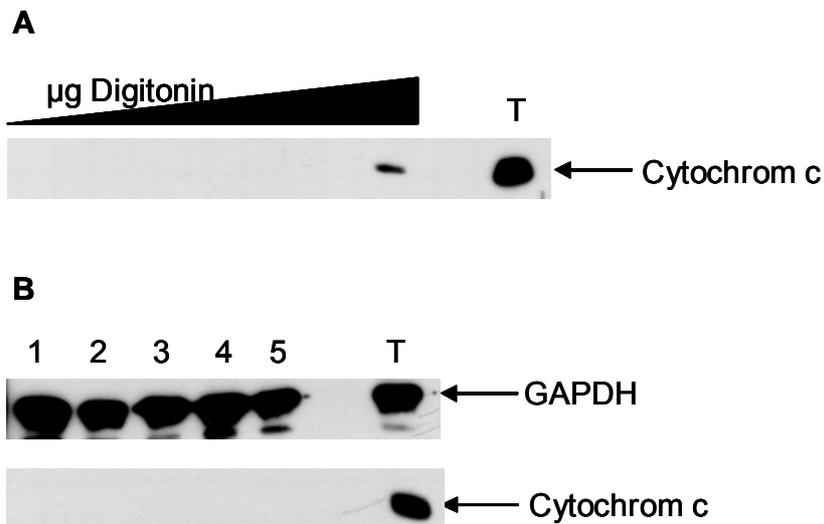


Abbildung 20: Cytochrom c Freisetzung nach Emodin- bzw. TBB-Behandlung von MRC-5-Zellen: **A** Austesten der geeigneten Digitoninkonzentration: MRC-5-Zellen wurden, wie für die Prostatakarzinomzellen bereits beschrieben, geerntet, mit verschiedenen Konzentrationen Digitonin inkubiert und anschließend durch Zentrifugation der cytosolische Überstand gewonnen. Das Pellet wurde mit PBS/TritonX-100 nachextrahiert, 75 µg dieser Extrakte wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anhand eines Westernblots auf das Vorhandensein von Cytochrom c im Cytoplasma überprüft. **B** Cytochrom c Freisetzung nach Emodin- bzw. TBB-Behandlung: Es wurden, wie beschrieben, cytosolische Extrakte behandelter und unbehandelter Zellen hergestellt und die dabei entstandenen Pellets mit PBS/TritonX-100 nachextrahiert. Der Nachweis von Cytochrom c erfolgte, wie für Abb. 16 beschrieben, mittels Westernblot und Immunodetektion mit dem monoklonalen Antikörper 7H8 (Santa Cruz). Zum Sichtbarmachen der Banden wurde das „Lumilight“-System von Roche verwendet. Spur 1: 0 µM Emodin/TBB; Spur 2: 30 µM Emodin, 24 h; Spur 3: 50 µM TBB, 24 h; Spur 4: 30 µM Emodin, 48 h; Spur 5: 50 µM TBB, 48 h; Spur T: Kontrolle nach Extraktion mit PBS/ 1% TritonX-100.

5.3 Inhibition der CK2 mit Hilfe von Antisense-Oligonucleotiden

Eine Möglichkeit der Inhibition der CK2-Aktivität besteht neben dem Einsatz von Nucleotidanaloga auch darin, von Anfang an die Expression der Kinase zu verhindern. Unter diesen Bedingungen kann allerdings nicht ausgeschlossen

werden, dass manche Effekte durch das Unvermögen mit Bindungspartnern zu interagieren zu Stande kommen. Da es sich bei den CK2-Inhibitoren Emodin und TBB um sehr spezifische CK2-inhibitoren handelt, aber immerhin doch um Nucleotidanaloga, deren Wirkung auf andere Kinasen nicht völlig ausgeschlossen werden kann, bestand der Bedarf, die Spezifität der CK2-Inhibition weiter zu erhöhen. Es ist bekannt, dass Oligonucleotide, deren Sequenz komplementär zu der eines proteinkodierenden Genes ist, in der Lage sind, die Expression dieses Proteins zu verhindern. Deshalb wurde im Folgenden versucht die Expression der CK2 mit Antisense-Oligonucleotiden zu beeinflussen.

5.3.1 Testen der Antisense-Oligonucleotide im *in-vitro*-Translationsansatz

Es standen Oligonucleotide gegen die drei Untereinheiten der CK2 zur Verfügung, wobei als Kontrolle von Prof. Seliger (Ulm) zu jedem Antisense-Oligonucleotid auch das entsprechende Sense-Konstrukt hergestellt wurde. Zuerst sollten die Antisense-Oligonucleotide auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Sollte dies der Fall sein, müssten die Konstrukte in der Lage sein, die Translation der entsprechenden Untereinheit im Reticulocytenlysats (*in-vitro*-Translation, IVT) zu verhindern. Dazu wurden die für die entsprechenden Untereinheiten der CK2 kodierenden Plasmide pcDNACK2 α , pcDNACK2 α' und pcDNACK2 β *in vitro* unter Zugabe verschiedener Mengen der jeweiligen Antisense-DNA translatiert. In Abbildung 21 sind die Autoradiographien für die α - und die α' -Untereinheit sowie für die β -Untereinheit der CK2 gezeigt. Weder mit 0.05 μ g noch mit 0.3 μ g oder 1 μ g Antisense-DNA konnte eine zufrieden stellende Reduktion der Translation der CK2-Untereinheiten erreicht werden. Auch mit größeren Mengen an Antisense-Oligonucleotiden, bis zu 4 μ g, stellte sich der gewünschte Effekt nicht ein.

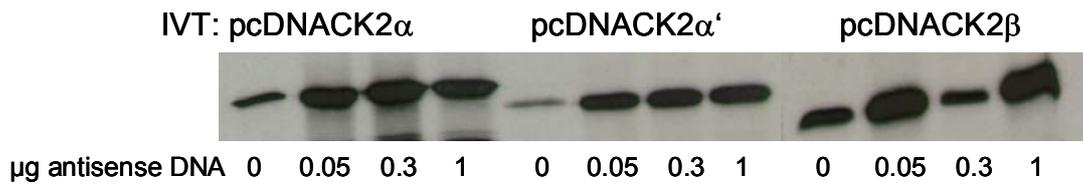


Abbildung 21: Test der Antisense-Oligonucleotide im *in-vitro*-Translationsansatz: Die Untereinheiten der CK2 wurden in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* unter Zugabe verschiedener Mengen der jeweiligen Antisense-Oligonucleotide translatiert. Die *in-vitro*-Translatate wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und zur Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt.

Leider konnten mit diesem Ansatz keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Da es sich bei diesem Versuch um ein *in-vitro*-System handelte, das nicht unbedingt mit den *in-vivo*-Verhältnissen übereinstimmen muss, wurden die Zellen trotzdem mit den Antisense-Oligonucleotiden transfiziert.

5.3.2 Transfektion von PC-3-Zellen mit CK2-Antisense-Oligonucleotiden

PC-3-Zellen wurden mit dem „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen mit den Antisense-Oligonucleotiden transfiziert, zusätzlich wurde ein positiver Kontrollansatz mitgeführt, in dem ein Konstrukt transfiziert wurde, das für die Phosphatase *cdc25C* kodiert, sowie ein negativer Kontrollansatz, der keine DNA enthielt. Aus Abbildung 22 wird deutlich, dass sich die Zellen transfizieren ließen, da in Spur 5 eine Überexpression von *cdc25C* zu erkennen ist. Allerdings scheint weder das Antisense-Konstrukt gegen die α -Untereinheit der CK2 (Abb. 22, Spur 4), noch das Antisense-Konstrukt gegen die β -Untereinheit (Abb. 22, Spur 2) eine Wirkung auf den Gehalt an zelleigener CK2 auszuüben. Damit decken sich diese *in-vivo*-Daten mit den oben gezeigten *in-vitro*-Daten, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

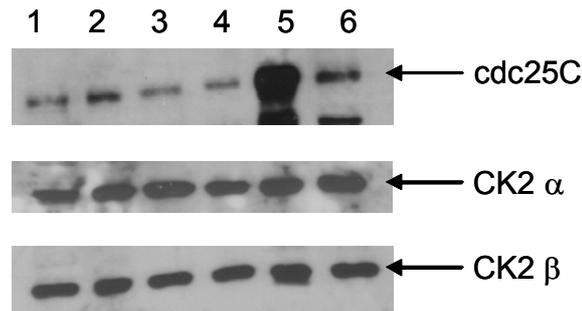


Abbildung 22: Transfektion von PC-3-Zellen mit CK2-Antisense-Oligonucleotiden: Nach der Transfektion wurden Zellextrakte hergestellt, über ein 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der CK2-Untereinheiten erfolgte im Westernblot mit den entsprechenden Seren, die Detektion der Transfektionskontrolle cdc25C mit dem Antikörper C-20. Spur 1: PC-3 Zellextrakt, untransfiziert; Spur 2: Transfektion von AntisenseCK2 β ; Spur 3: Transfektion von AntisenseCK2 α' ; Spur 4: Transfektion von AntisenseCK2 α ; Spur 5: Transfektionskontrolle pcDNAcdc25C; Spur 6: Transfektions-Negativkontrolle: Transfektionsreagenz ohne DNA.

5.4 Inhibition der CK2 in Prostatakarzinomzellen mittels RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist eine relativ junge Methode, um die Expression eines Proteins zu beeinflussen. Es handelt sich dabei um einen evolutionär alten Prozess, der als Abwehrmechanismus diente und sowohl in *C. elegans*, *D. melanogaster* sowie in Pflanzen und Säugerzellen nachgewiesen werden konnte.

5.4.1 Test der pSilencer CK2 α - und CK2 β -Konstrukte

Die Klonierungsarbeiten zu diesen Konstrukten wurden vor allem von Herrn Dipl.-Chem. S. Lehnert durchgeführt, während ihre Funktionsfähigkeit in der vorliegenden Arbeit getestet wurde. Da sich die epithelialen Prostatakarzinomzellen vergleichsweise schlecht transfizieren lassen, wurden die Konstrukte zunächst an HeLa bzw. HEK 293 Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen mit dem „Effectene Transfection Reagent“ der Firma Qiagen mit den „pSilencer“ Vektoren transfiziert, geerntet und die Expression der CK2-Untereinheiten im Westernblot überprüft. Dabei wurden die Zellen mit unterschiedlichen Verhältnissen von DNA zu Transfektionsreagenz transfiziert und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. In der folgenden Abbildung 23 ist exemplarisch ein Westernblot mit „pSilencer“ CK2 α -

transfizierten HEK 293 gezeigt, aus dem ersichtlich wird, dass weder unterschiedliche Verhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz noch eine Steigerung der Inkubationsdauer zu einem Rückgang der CK2 α -Expression führten.

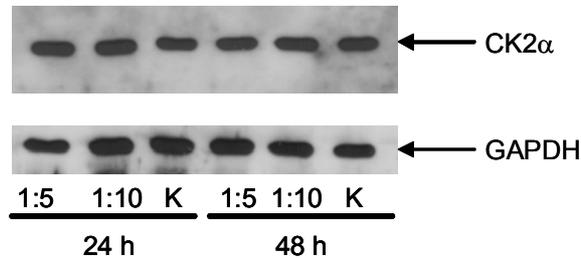


Abbildung 23: Test der pSilencer-Konstrukte: HEK 293 Zellen wurden mit „pSilencer“ CK2 α transfiziert, nach 24 h bzw. 48 h geerntet und extrahiert. 30 μ g der Gesamtzellextrakte wurden einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese über ein 12.5%iges Gel mit anschließendem Westernblot unterworfen und die α -Untereinheit der CK2 mit dem spezifischen Serum #26 detektiert, während der Nachweis von GAPDH mit FL-335 (Santa Cruz) als Ladekontrolle diente.

5.4.2 CK2 α / α' siRNA vermindert CK2 α / α' -Expression und -Aktivität

Nachdem die Transfektion von Zellen mit den siRNA-Expressionsvektoren (siRNA – short interfering RNA) wenig erfolgreich war, wurde nun mit siRNAs eine Beeinflussung des CK2-Proteingehaltes versucht. Dazu wurden je eine siRNA für die CK2 α und die CK2 α' bei der Firma Qiagen in Auftrag gegeben. Die siRNAs wurden mit dem „Xtreme Gene siRNA-Transfektion Reagent“ der Firma Roche in LNCaP-Zellen eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden nach 3 Tagen geerntet, Proteinextrakte hergestellt und zunächst der Gehalt an den einzelnen katalytischen CK2-Untereinheiten mittels Westernblot überprüft. Wie aus Abbildung 24 A und B hervorgeht, konnte mit den siRNAs eine Reduktion der katalytischen CK2-Untereinheiten erreicht werden, wobei diese nie unter die Detektionsgrenze fiel. Um die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren zu überprüfen, wurde α -Tubulin nachgewiesen. Aus Abbildung 24 B wird ersichtlich, dass keine der beiden siRNAs die Expression der jeweiligen anderen Untereinheit beeinflusst. Anschließend wurde mit Hilfe eines Kinaseaktivitätstests untersucht, inwieweit sich diese Reduktion im Proteingehalt auf die Aktivität der Kinase auswirkt. Auch hier wurde eine Verminderung der CK2-Aktivität festgestellt (Abb. 24 C), die aber nicht mit der

Reduktion der CK2-Aktivität nach Behandlung mit den Inhibitoren Emodin und TBB vergleichbar war. Mit Hilfe der CK2 α -siRNA wurde eine Reduktion der Aktivität im Mittel um 20% gemessen. Dieser Mittelwert wurde aus fünf verschiedenen Experimenten berechnet, wobei die geringste gemessene Aktivität bei 63% im Vergleich zu den mit nonsense-siRNA transfizierten Zellen lag. Durch Transfektion der CK2 α' siRNA wurde, in drei Experimenten, eine durchschnittliche Reduktion der CK2-Aktivität um 25% erreicht, ebenso mit einer Doppeltransfektion der siRNAs gegen die CK2 α und die CK2 α' .

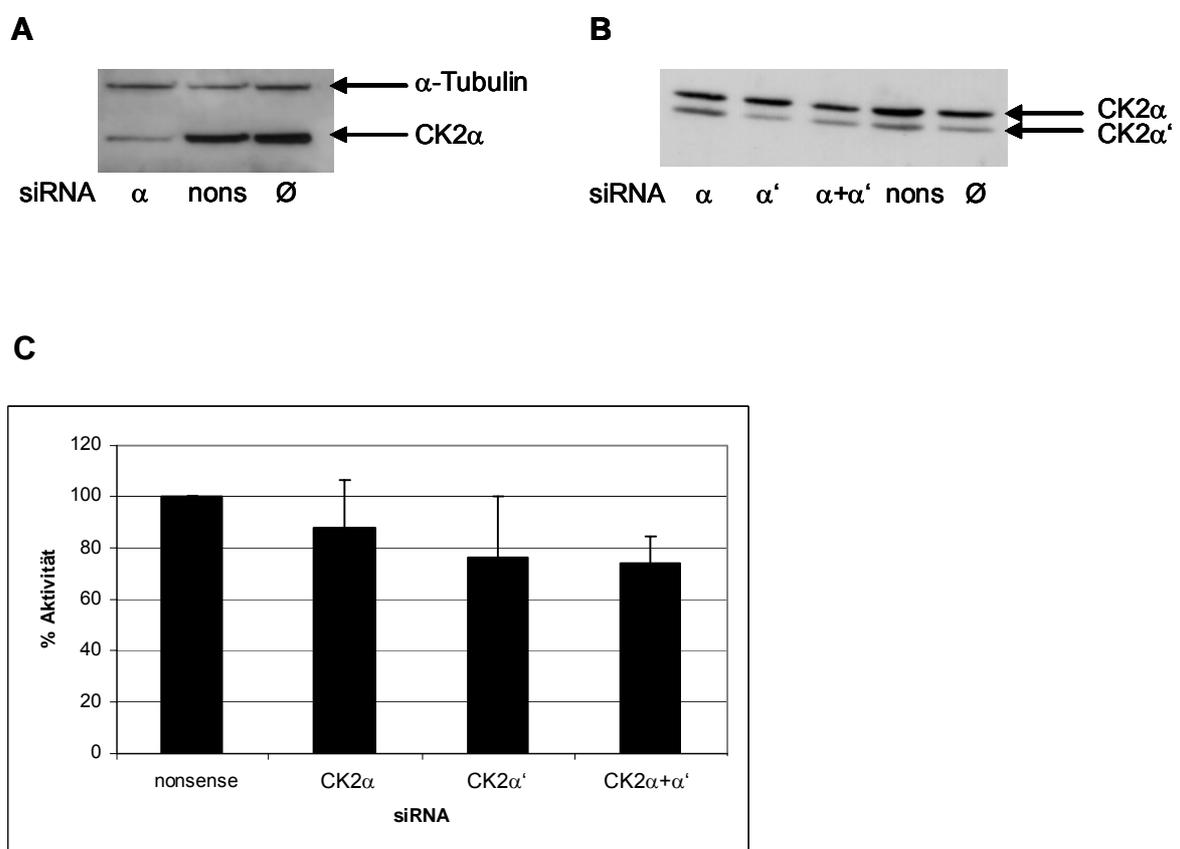


Abbildung 24: Transfektion von LNCaP-Zellen mit siRNAs gegen die CK2 α - bzw. α' -Untereinheit und mit „nonsense“-siRNAs: Die siRNAs wurden mit dem „Xtreme Gene Transfection Reagent“ der Firma Roche in die Zellen eingebracht. Diese wurden nach drei Tagen geerntet und ein Proteinextrakt hergestellt. **A** und **B**: Für die Westernblotanalyse wurden 30 μ g des Zellextraktes über ein 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Die Detektion der CK2-Untereinheiten erfolgte mit den dafür spezifischen Seren (#26 für die α -Untereinheit und #30 für die α' -Untereinheit). Es wurde außerdem eine nonsense-siRNA (nons) transfiziert und eine Negativkontrolle (\emptyset) ohne siRNA mitgeführt. Die Banden wurden mit dem LumiLight System der Firma Roche sichtbar gemacht. **C**: Die Aktivität der CK2 wurde im Zellextrakt über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in ein synthetisches Substratpeptid bestimmt. Die Aktivität der CK2 in den mit nonsense siRNA transfizierten Zellen wurde 100% gesetzt.

Bei der täglichen mikroskopischen Kontrolle der Zellen konnten keine morphologischen Auffälligkeiten festgestellt werden. Ebenso zeigte sich im MTT-Assay keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Zellen nach Transfektion dieser siRNAs nicht die Apoptose einleiten.

5.5 Untersuchung der p53-Beteiligung an der nach CK2-Inhibition ausgelösten Apoptose

Das Wachstumssuppressorprotein p53 ist unter anderem als Transkriptionsfaktor ein wichtiger Vermittler von apoptoseinduzierenden Signalen, indem es die Expression einer Reihe von pro-apoptotisch wirkenden Proteinen aktiviert, sowie die Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen reprimiert. Zusätzlich ist p53 in der Lage, Apoptose über transaktivierungsunabhängige Wege zu stimulieren. Daher war es von Interesse die Beteiligung von p53 auf die CK2-Inhibition in LNCaP-Zellen zu untersuchen.

5.5.1 p53-Anstieg nach CK2-Inhibition

LNCaP-Zellen exprimieren Wildtyp-p53, dessen Gehalt nach Emodinbehandlung im Westernblot untersucht wurde (Abb. 25). Nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit 30 μ M Emodin ist eine deutliche Stabilisierung des Wachstumssuppressorproteins zu erkennen. Der Nachweis von Actin zeigt, dass in allen Spuren die gleiche Menge an Proteinextrakt aufgetragen wurde.

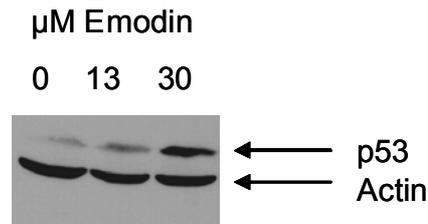


Abbildung 25: p53 Gehalt nach CK2-Inhibition: 150 µg eines Gesamtzellextraktes aus mit 30 µM Emodin behandelten LNCaP-Zellen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese über ein 12.5%iges Gel aufgetrennt und anschließend ein Westernblot durchgeführt. Die Detektion von p53 erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Santa Cruz), während Actin zur Ladekontrolle mit dem monoklonalen Antikörper I-19 (Santa Cruz) nachgewiesen wurde.

5.5.2 Herstellung einer stabilen Zelllinie mit induzierbarem p53

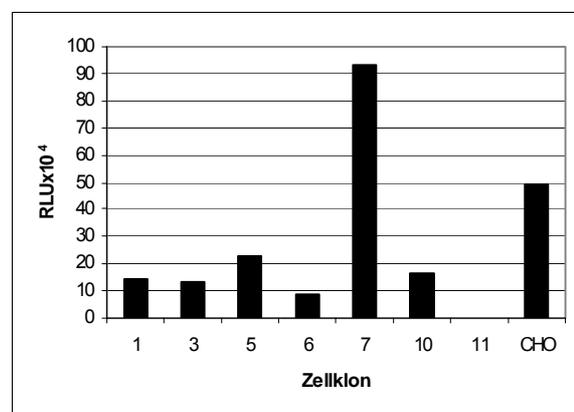
Zum besseren Verständnis des p53-Einflusses sollte eine p53-positive und eine p53-negative Situation auf sonst gleichem zellulärem Hintergrund geschaffen werden. Dafür wurde die p53-negative Zelllinie PC-3 (Carroll et al, 1993; van Bokhoven et al., 2003) ausgewählt, die durch Transfektion eines Tetoff-Systems mit einem durch Tetracyclinentzug induzierbaren p53 versehen werden sollte. Zunächst wurde das Regulatorplasmid mit dem tet-Repressor mit dem „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen nach Hersteller-Angaben transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit G418 einem Selektionsdruck ausgesetzt, unter dem nur die positiv-transfizierten Zellen weiter proliferieren. Etwa drei Wochen später wurde die Gesamtheit der Zellen auf die Aktivität des Regulatorplasmids hin getestet. Dazu wurde eine transiente Transfektion mit pUHG16-3, der für β -Galactosidase kodiert, durchgeführt und anschließend ein Reporterassay auf β -Galactosidaseaktivität vorgenommen. Durch ihre Blaufärbung konnten Zellen, die eine Galactosidaseaktivität auswiesen, identifiziert und ausgezählt werden. Aus Abbildung 26 A wird ersichtlich, dass die Anzahl der β -Galaktosidaseaktivität aufweisenden Zellen, die keinem G418-Selektionsdruck ausgesetzt waren, sich vor und nach Tetracyclinentzug nicht unterscheidet. Die Anzahl der Zellen dagegen, die auf das Regulatorplasmid hin selektioniert wurden und eine Galactosidaseaktivität zeigen, ist nach Tetracyclinentzug etwa um das Vierfache erhöht. Um im späteren Verlauf eine einheitliche Zelllinie zu erhalten, wurde nun eine Einzelzellklonierung durchgeführt, d.h. es wurde eine Zelle pro Kavität auf eine 96-Loch-Platte ausgesät und das Heranwachsen der Klone täglich kontrolliert. Nach weiteren vier Wochen waren die

Klone 1, 3, 5, 6, 7, 10 und 11 soweit herangewachsen, dass sie erneut auf die Aktivität des Regulatorplasmides hin getestet werden konnten. Dies geschah wiederum durch transiente Transfektion, allerdings mit einem für Luciferase kodierenden Reporterkonstrukt (pUHC13-3) mit anschließendem Reporterassay auf Luciferaseaktivität. Aus dem Diagramm in Abbildung 26 B lässt sich ablesen, dass die Klone 5, 7 und 10 die höchste Luciferaseaktivität aufweisen. Eine stabil mit Luciferase transfizierte CHO AA8Tetoff-Zelllinie wurde als Positivkontrolle verwendet. Diese drei Klone wurden nun mit dem wtp53 tragenden Vektor pBlp53 und mit dem Vektor pTKhyg, der eine Hygromycinresistenz zur Selektion trägt, cotransfiziert und mit Hygromycin einem Selektionsdruck ausgesetzt. Aus einer erneuten Einzelzellklonierung entstanden die Klone 7.1, 7.5 und 10.1, die nun nach Tetracyclinentzug, wie in Abbildung 26 C für den Klon 7.1 gezeigt, auf die Expression von p53 getestet wurden. Dabei konnte weder nach einem Tag noch nach zwei oder drei Tagen Tetracyclinentzug die Expression von p53 nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Herstellung einer stabilen PC-3-Zelllinie mit induzierbarem p53 fehlgeschlagen ist.

A

	mit G418	ohne G418
ohne TC	4	9
mit TC	1	8,5

B



C

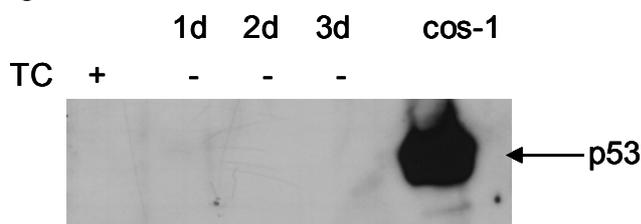


Abbildung 26: Herstellung einer stabil mit p53 transfizierten PC-3-Zelllinie.
A Galactosidasereporterassay nach der Transfektion von pTetoff nach Tetracyclin-(TC)-Entzug.
B Luciferaseassay nach erfolgter Einzelzellklonierung von mit pTetoff transfizierten Zellen
C Überprüfung der p53 Expression nach TC-Entzug: Die Zellen wurden nach 1 Tag, 2 Tagen oder 3 Tagen TC-Entzug geerntet, extrahiert und die Extrakte über ein 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran überführt. Die Detektion von p53 erfolgte mit dem Antikörper DO-1. Als Positivkontrolle zur p53-Detektion diente ein Lysat aus cos-1-Zellen.

5.5.3 Charakterisierung des p53 einer p53-positiven PC-3-Zelllinie

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des p53 Einflusses auf die durch CK2-Inhibition ausgelöste Apoptose bot sich durch die Tatsache, dass eine p53 positive PC-3-Zelllinie in unserem Labor vorhanden war. Eine Emodinbehandlung dieser Zellen zeigte jedoch keinen wesentlichen Rückgang in der Lebensfähigkeit der Zellen (Abb. 27 A), was im Hinblick auf die Reaktion der p53-positiven LNCaP-Zellen eine unerwartete Reaktion war. Da über dieses in PC-3-Zellen enthaltene p53 jedoch nur wenig bekannt war, sollte zunächst eine Charakterisierung dieses p53 stattfinden, um herauszufinden ob es sich tatsächlich um eine Wildtypform des Proteins handelt. Nach Benninghoff et al. (1999) kann dieses p53 mit den Antikörpern PAb240, PAb1620, PAb421 und PAb1801 nachgewiesen werden. Diese Aussage konnte, wie aus den Westernblots in Abbildung 27 B ersichtlich, bestätigt werden, bis auf die Tatsache, dass mit PAb1620 ebenfalls eine Detektion möglich sein sollte. Der Antikörper PAb1801 wurde nicht erneut untersucht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Antikörper DO-1 und ein polyklonales Serum gegen p53 das Protein in PC-3-Zellen mit einer Größe von etwa 53 kDa erkennen. Als Positivkontrolle wurde ein Gesamtzellextrakt aus cos-1-Zellen verwendet, ebenfalls wurde für die bisher verwendeten PC-3-Zellen bestätigt, dass keine p53 Expression vorliegt. Um zu überprüfen, ob dieses Protein in der Lage ist, Aufgaben des Wildtyp-p53 wahrzunehmen, wurden die Zellen einer UV-Bestrahlung ausgesetzt, nach der üblicherweise eine Stabilisierung des p53 auftritt. Dies war jedoch, wie man aus Abbildung 27 C erkennen kann, nicht der Fall. Durch eine Bestrahlung mit 150 J/m^2 konnte weder 2, 4, 6 oder 16 Stunden nach der Bestrahlung eine Stabilisierung des Proteins festgestellt werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem von PC-3-Zellen exprimierten p53 nicht um ein funktionelles Wildtypprotein handelt. Da in diesem Falle nicht sicher angenommen werden konnte, dass es sich bei diesem in PC-3-Zellen exprimierten p53 um eine funktionelles Protein handelt, wurden diese Zellen als ungeeignet zur Untersuchung des p53 Einflusses betrachtet und nicht weiter verwendet.

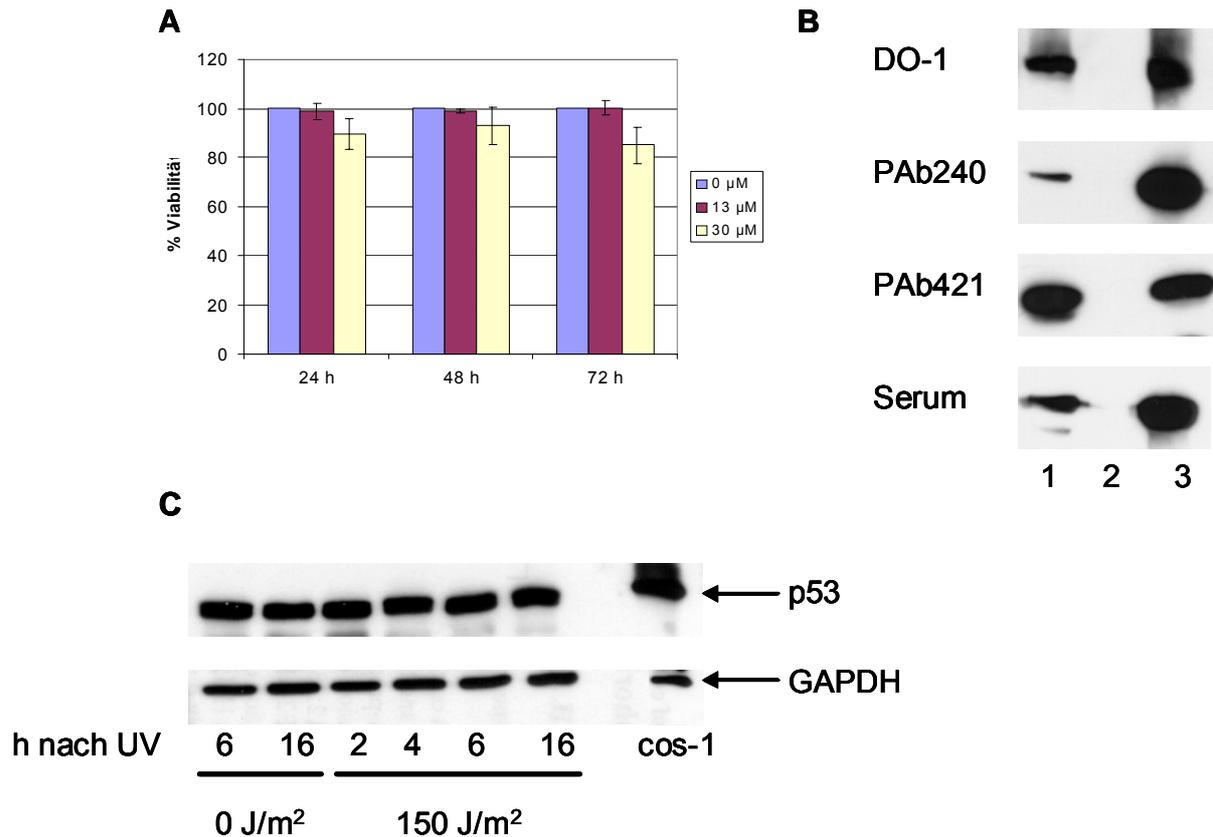


Abbildung 27: p53-positive PC-3-Zellen: A Auswirkung einer Emodinbehandlung auf PC-3p53: Die Zellen wurden auf 24-Loch-Platten ausgesät und mit Emodin in steigenden Mengen behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels MTT-Assay nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht. Die Absorption der DMSO-behandelten Zellen wurde als 100% Viabilität gesetzt. **B Nachweis des p53:** PC-3p53 Zellen wurden extrahiert, 100 µg Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran überführt. p53 wurde mit unterschiedlichen Antikörpern in dieser Zelllinie nachgewiesen, als Positivkontrolle diente ein Lysat aus cos-1 Zellen; Spur 1: PC-3p53; Spur 2: PC-3; Spur 2: cos-1; **C UV-Bestrahlung von PC-3p53:** PC-3p53 wurden mit 150 J/m² bestrahlt und nach unterschiedlichen Zeiten geerntet. Es wurden Proteinextrakte hergestellt, die mittels Gelelektrophorese und Westernblot auf ihren p53 Gehalt hin untersucht wurden. Der Nachweis von p53 erfolgte mit dem Antikörper DO-1. Als Positivkontrolle diente ein Lysat aus cos-1-Zellen in der letzten Spur. Um die gleichmäßige Beladung der Taschen zu kontrollieren wurde GAPDH mit dem Antikörper FL-335 nachgewiesen.

5.5.4 Die stabil mit p53 transfizierte Zelllinie PC-3pCMVp53

Nach einer Literaturrecherche bot sich eine weitere Möglichkeit, PC-3-Zellen mit und ohne p53 in Form der stabilen Zelllinie PC-3pCMVp53 zu untersuchen. Diese Zelllinie wurde von Ouyang und Mitarbeitern beschrieben und hergestellt (Ouyang et al., 2001) und mir auf Anfrage zur Verfügung gestellt. Eine Überprüfung der p53 Expression konnte jedoch die von Ouyang und Mitarbeitern (2001) gezeigten Daten

nicht bestätigen. Im Gesamtzellextrakt dieser Zellen konnte kein Protein der Größe 53 kDa nachgewiesen werden, sondern nur ein Protein von etwa 36 kDa (Abb. 28). Als Positivkontrolle diente auch hier ein Gesamtzellextrakt aus cos-1-Zellen und es wurde ein Gemisch der Antikörper PAb421 und DO-1 verwendet. Da diese beiden Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen, DO-1 die Aminosäuren 21 - 25 im N-Terminus und PAb421 die Aminosäuren 372 – 380 im C-Terminus, stellte sich die Frage, ob aus dem zuvor verwendeten Gemisch nur einer der beiden Antikörper das Protein erkannt hat. In der Tat zeigte sich, dass nur DO-1 ein Signal liefert (Abb. 28), während PAb421 nur das in cos-1- Zellen enthaltene p53 erkennt (Abb. 28, Spur 3). Eine Nachinkubation der zuvor mit PAb421 inkubierten Membran mit DO-1 lieferte das gleiche Bild wie in Abbildung 28. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhaltene Zelllinie PC-3pCMVp53 möglicherweise nur noch eine C-terminal verkürzte Form des Wachstumssuppressorproteins exprimiert und damit nicht für die geplanten Untersuchungen geeignet ist.

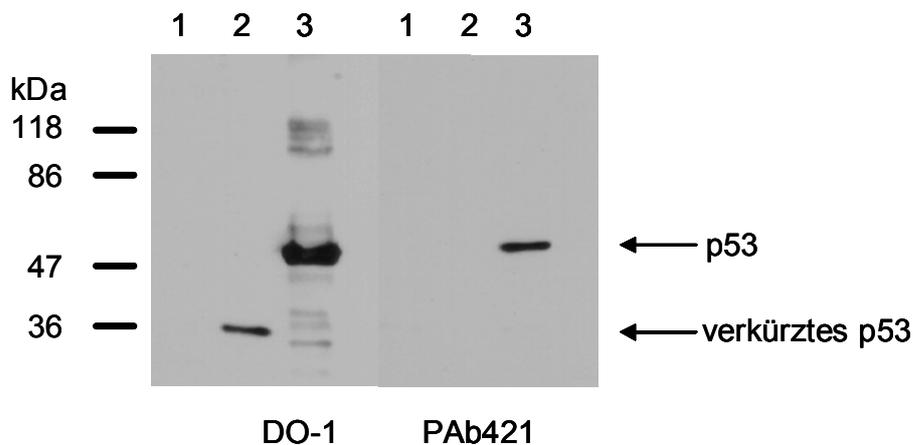


Abbildung 28: Nachweis von p53 in PC-3pCMVp53: 150 µg Gesamtzellextrakt wurden über ein 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt. Der Nachweis von p53 erfolgte mit den spezifischen, monoklonalen Antikörpern DO-1 und PAb421 aus der Maus. Als Positivkontrolle wurde ein Gesamtzellextrakt aus cos-1-Zellen verwendet. Spur 1: PC-3pCMV; Spur 2: PC-3pCMVp53; Spur 3: cos-1.

5.5.5 Vergleich der Zelllinien HCT116 p53wt und HCT116 p53^{-/-}

Ein weiterer Versuch, die Rolle des p53 in Emodin- bzw. TBB-induzierter Apoptose zu untersuchen, wurde mit den Zelllinien HCT116 p53wt und HCT116 p53^{-/-} (Bunz et

al., 1998) unternommen, die mir von Prof. K. Römer zu Verfügung gestellt wurden. Allerdings birgt dieses System den Nachteil, dass es sich bei diesen Zellen zwar um eine p53-positive und eine p53-negative Situation auf gleichem zellulärem Hintergrund handelt, allerdings im Modell des Colonkarzinoms. In den Diagrammen der Abbildung 29 sind die Ergebnisse einer Emodinbehandlung beider Zelllinien dargestellt. Daraus wird deutlich, dass die Zellen unabhängig vom p53-Status nicht mit einem Rückgang des Zellwachstums und damit höchstwahrscheinlich nicht mit einer Apoptoseinduktion reagieren. Das bedeutet, auch in diesem Zellsystem kann die Apoptoseinduktion nach CK2-Hemmung abhängig von p53-Status nicht untersucht werden.

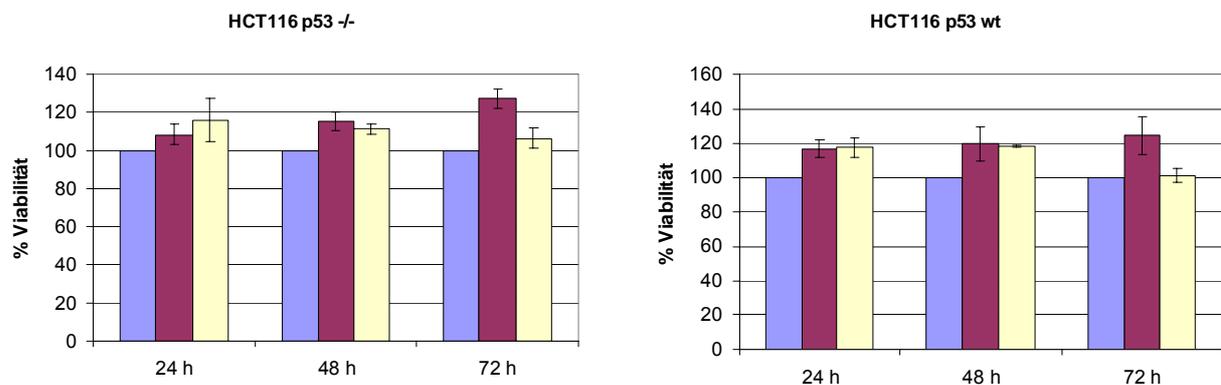


Abbildung 29: Emodinbehandlung von HCT116-Zellen: HCT116 p53wt und HCT116 p53^{-/-} wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und über 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Emodin behandelt. Danach wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt. Die Absorption, die in den Kontrollansätzen gemessen wurde, entspricht 100% Viabilität.

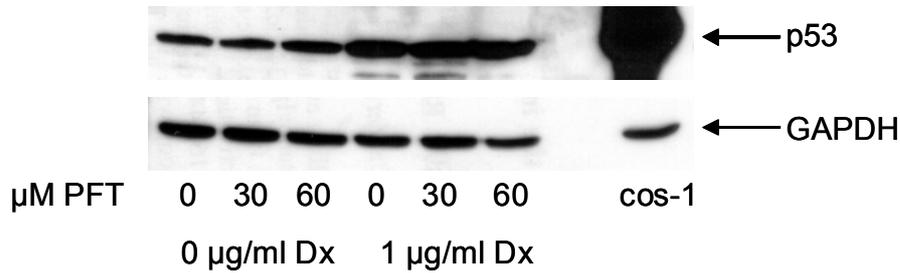
5.5.6 Inhibition der Transaktivierungsfähigkeit des p53 mit Pifithrin- α

Wie bereits erwähnt, ist p53 über transaktivierungsabhängige und -unabhängige Wege in der Lage, Apoptose zu induzieren. Um zwischen transaktivierungsabhängigen und -unabhängigen Aufgaben des p53 nach einer CK2-Inhibition zu unterscheiden, sollten LNCaP-Zellen mit Pifithrin- α (PFT), einem Inhibitor der Transaktivierungsfähigkeit des p53 (Komarov et al., 1999) vorbehandelt, und dann erneut auf Apoptoseinduktion nach Emodin- bzw. TBB-Behandlung untersucht

werden. Zuerst musste jedoch eine geeignete PFT-Konzentration zur Transaktivierungsinhibition gefunden werden.

Ein von p53 transaktiviertes Protein ist der cdk-Inhibitor p21^{WAF1}, der z.B. in LNCaP-Zellen nach einer Behandlung mit Doxorubicin (Dx) durch p53 aktiviert wird (Martinez et al., 2002). Dieses System wurde ausgewählt, um die PFT-Konzentration zur Inhibition der Transaktivierungsfähigkeit des p53 zu optimieren: LNCaP-Zellen wurden 6 h mit PFT bzw. dessen Lösungsmittel vorinkubiert und anschließend für weitere 24 h mit Doxorubicin behandelt. Aus dem Westernblot in Abbildung 30 A wird ersichtlich, dass es nach Doxorubicinbehandlung zu einer Stabilisierung des p53 kommt, die mit einer Induktion der Expression von p21^{WAF1} (Abb. 30 B) einhergeht, während ohne Doxorubicinbehandlung eine gleich bleibende Menge an p53 detektiert wird und keine p21 Induktion nachgewiesen werden kann. Führt man die Doxorubicinbehandlung nach einer Vorinkubation mit PFT durch, so nimmt die Expression von p21^{WAF1} (Abb. 30 B) abhängig von der verwendeten PFT-Konzentration wieder ab. Dieser Effekt war nach einer 6-stündigen Vorinkubation mit 60 µM PFT am deutlichsten, weshalb diese Konzentration in den folgenden Experimenten zu weiterer Verwendung kam.

A



B

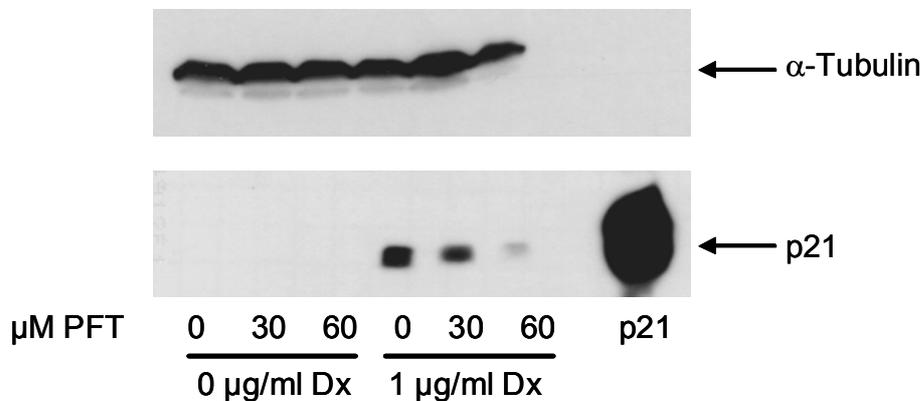


Abbildung 30: Austesten der geeigneten PFT-Konzentration zur Inhibition der p53-Transaktivierungsfähigkeit: LNCaP-Zellen wurden 6 h mit den gezeigten PFT-Konzentrationen vorinkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml Doxorubicin (Dx) für 24 h. Danach wurden die Zellen geerntet, extrahiert und die Proteine über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. **A** Detektion von p53 mit dem Antikörper DO-1 in mit Doxorubicin behandelten LNCaP-Zellen mit und ohne PFT-Vorbehandlung. Als p53-Positivkontrolle wurde in der letzten Spur ein Lysat aus cos-1-Zellen aufgetragen; **B** Detektion von p21^{WAF1} in Doxorubicin behandelten LNCaP-Zellen mit PFT-Vorbehandlung, in der letzten Spur wurde als Positivkontrolle rekombinantes p21^{WAF1}-Protein aufgetragen. Um eine gleichmäßige Beladung der Taschen zu zeigen wurde α -Tubulin mit dem Antikörper DM 1A (Sigma) nachgewiesen.

Zunächst wurde überprüft, ob PFT in der Lage ist, den im MTT-Assay beobachteten Wachstumsrückgang nach CK2-Inhibition zu verhindern. Dazu wurden LNCaP-Zellen wie beschrieben auf 24-Loch-Platten ausgesät. Nach einer 6-stündigen Vorinkubation mit 0 µM bzw. 60 µM PFT erfolgte die Zugabe von 30 µM Emodin, 50 µM TBB oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Die Zellen wurden damit 24 bzw. 48 h inkubiert und anschließend ein MTT-Assay durchgeführt. Aus dem Diagramm in Abbildung 31 wird ersichtlich, dass die Anzahl der LNCaP-Zellen, wie zuvor schon

beobachtet, durch Behandlung mit Emodin bzw. TBB stark reduziert wird. Würde dieser Effekt ausschließlich über p53-Transaktivierungsaktivität vermittelt, sollte man erwarten, in den mit PFT-vorbehandelten Zellen diesen Wachstumsrückgang nicht beobachten zu können. Jedoch zeigt sich in Abb. 31, dass das Gegenteil der Fall ist: Durch eine Vorbehandlung mit PFT scheint sich der wachstumshemmende Effekt von Emodin bzw. TBB auf die Zellen noch zu verstärken.

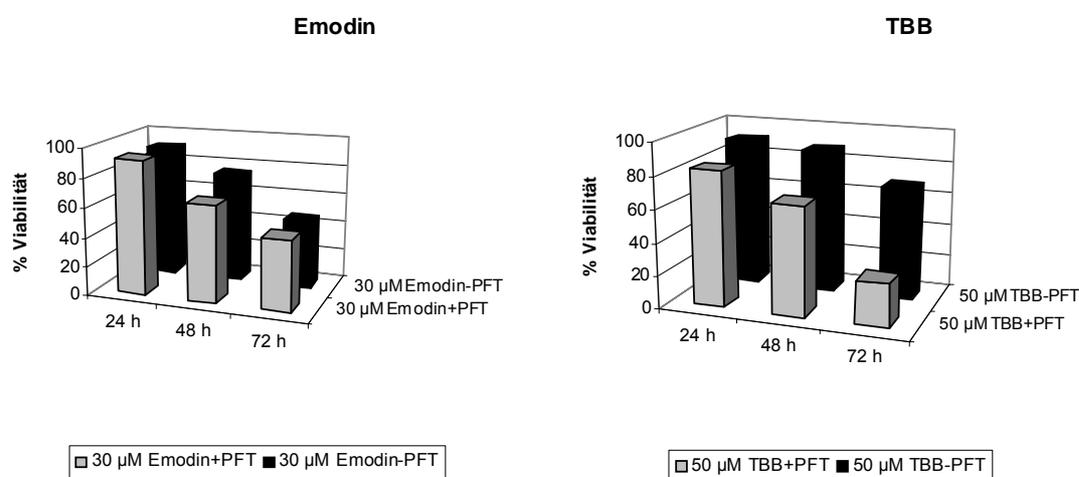


Abbildung 31: Emodin- bzw. TBB-Behandlung von LNCaP-Zellen mit PFT-Vorinkubation: Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät, 6 h mit PFT vorbehandelt und anschließend 24 h, 48 h und 72 h mit den CK2-Inhibitoren inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe eines MTT-Assay bestimmt, dabei wurde die Absorption der mit Lösungsmittel behandelten Zellen mit 100% Viabilität gleichgesetzt.

5.6 Untersuchung weiterer Signalwege, die an der Apoptose-induktion nach CK2-Inhibition beteiligt sein könnten

Von Prostatakarzinomen ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B (nuclear factor κ B) konstitutiv aktiv sein kann. Er soll unter anderem der Apoptose entgegenwirken, indem er die Expression des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 aktiviert. Dass eine Überexpression von bcl-2 bei der Entstehung eines Prostatakarzinoms im frühen Stadium vorliegen kann, ist ebenfalls bekannt.

5.6.1 NF κ B-bcl-2-Weg

Prostatakarzinomzellen exprimieren in unterschiedlichem Maße NF κ B und bcl-2 (Abb. 32). Zum Nachweis von bcl-2 wurden 200 μ g eines Gesamtzellextraktes über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, ein Westernblot durchgeführt und das Protein mit dem Antikörper Ab-1 (Oncogene) nachgewiesen. Eine Ladekontrolle mit Tubulin oder Actin wurde nicht durchgeführt, da die untersuchten Extrakte aus verschiedenen Zelllinien stammen, die sich auch in der Menge ihrer Cytoskelettproteine unterscheiden können. Im Vergleich zu den Prostata-Zelllinien ist die Expression von bcl-2 in den Zellen der benignen Prostatahyperplasie am geringsten (Abb. 32 A, Spur 4). In LNCaP-Zellen (Abb. 32 A, Spur 3) ist die bcl-2-Expression am stärksten. Die bcl-2-Expression in PC-3-Zellen liegt dagegen zwischen der von LNCaP- und BPH-1-Zellen. Als Kontrolle diente in der ersten Spur ein Lysat aus cos-1-Zellen.

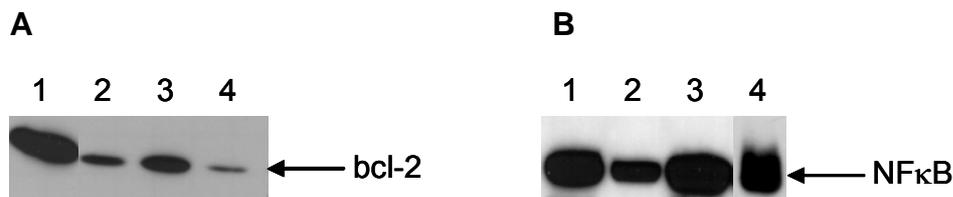


Abbildung 32: Expression von bcl-2 und NF κ B in Prostata-Zellen: **A** Expression von bcl-2: 200 μ g eines Gesamtzellextraktes wurden mittels SDS-Gelelektrophorese über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Detektion von bcl-2 erfolgte mit dem Antikörper Ab-1, Klon 100 (Oncogene), dabei erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht; Spur 1: cos-1 (Positivkontrolle); Spur 2: PC-3; Spur 3: LNCaP; Spur 4: BPH-1. **B** Expression von NF κ B in PCA-Zellen: Spur 1: LNCaP; Spur 2: PC-3; Spur 3: BPH-1; Spur 4: cos-1.

Die Expression des NF κ B geht aus Abb. 32 B hervor; es zeigt sich, dass LNCaP-Zellen, die im Vergleich zu den anderen Prostata-Zelllinien viel NF κ B exprimieren, (Abb. 32 B Spur 1) auch einen hohen bcl-2-Gehalt (Abb. 32 A, Spur 3) aufweisen. Andererseits zeigt sich in BPH-1-Zellen eine vergleichbare NF κ B-Expression (Abb. 32 B, Spur 3), allerdings liegt der Gehalt an bcl-2 (Abb. 32 A, Spur 4) im Vergleich mit den beiden anderen Zelllinien am niedrigsten. Das Expressionsniveau in PC-3-Zellen von bcl-2 (Abb. 32 A, Spur 2) und NF κ B (Abb. 32 B, Spur 2) liegt in beiden Fällen etwa zwischen dem von LNCaP- und BPH-1-Zellen. Eine gesteigerte

Expression des anti-apoptotisch wirkenden bcl-2 scheint also in BPH-1-Zellen nicht für deren Überlebensfähigkeit nach einer CK2-Inhibition verantwortlich zu sein. Wie schon zuvor gezeigt, bewirkt die Inhibition der CK2 die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. An der Regulation dieses Vorganges sind die Mitglieder der bcl-2-Familie wesentlich beteiligt, woraus sich die Frage ergibt, in welcher Art und Weise auch hier die bcl-2-Familienmitglieder eine Rolle spielen. Zunächst wurde der Gehalt des anti-apoptotisch agierenden bcl-2 in mit Emodin bzw. TBB behandelten Zellen untersucht. Aus den in Abbildung 33 gezeigten Westernblots ist eine Abnahme des bcl-2-Gehaltes in LNCaP-Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration erkennbar.

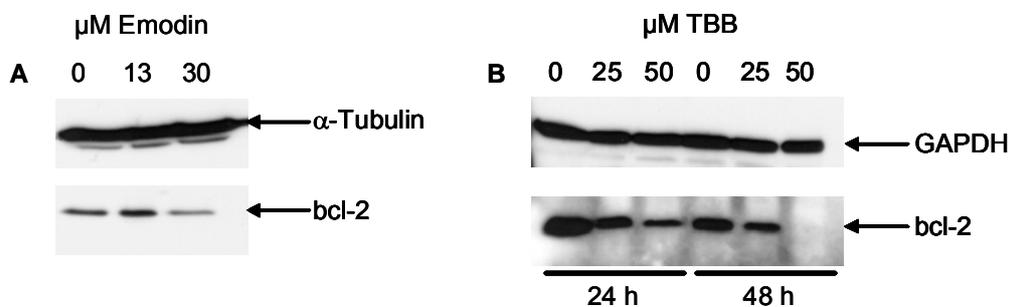


Abbildung 33: bcl-2-Gehalt in Emodin- und TBB-behandelten LNCaP-Zellen: LNCaP-Zellen wurden über 24 h bzw. 48 h mit den CK2-Inhibitoren Emodin (A) und TBB (B) behandelt, geerntet und anschließend ein Proteinextrakt hergestellt. 200 μ g des Proteinextraktes wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und bcl-2 mit dem Antikörper Ab-1, Klon 100 (Oncogene) detektiert. Als Ladekontrolle wurden α -Tubulin (Antikörper DM 1A, Sigma) oder GAPDH (Antikörper FL-335, Santa Cruz) nachgewiesen.

5.6.2 Micro-Array Analyse

Um weitere Anhaltspunkte zu bekommen, über welche Signalwege die nach CK2-Inhibition ausgelöste Apoptose verläuft, wurde mit TBB-behandelten LNCaP-Zellen eine Micro-Array Analyse durchgeführt. Dazu wurde der von der Firma SuperArray angebotene Array „Human Signal Pathwayfinder“ verwendet, der aus auf einer Membran immobilisierten cDNA-Abschnitten aus unterschiedlichsten an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen besteht. LNCaP-Zellen wurden über 17 Stunden mit 0 μ M und 50 μ M TBB behandelt, anschließend geerntet und die mRNA isoliert. Diese wurde einer photometrischen Qualitätskontrolle unterzogen: Bei einem Quotienten $A_{260}/A_{280} > 1.9$ wurde die mRNA weiter zur cDNA-Synthese verwendet,

aus der direkt eine mit Biotin markierte cRNA-Sonde hergestellt wurde. Diese cRNA-Präparation wurde erneut im Photometer kontrolliert und nur dann weiterverwendet wenn der Quotient aus den Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm zwischen 1.6 und 2.0 ($1.8 < A_{260}/A_{280} < 2.0$) lag und das Verhältnis aus den Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 230 nm größer als 1.7 ($A_{260}/A_{230} > 1.7$) war. Diese Sonde wurde nun über Nacht auf oben genannter Membran hybridisiert und am folgenden Tag mit Hilfe von Streptavidin/alkalischer Phosphatase detektiert. In Abbildung 34 sind die mit cRNA aus unbehandelten und TBB-behandelten LNCaP-Zellen hybridisierten Membranen gezeigt. Die in zwei Versuchen einheitlich aufgetretenen deutlichen Veränderungen im RNA-Gehalt nach CK2-Inhibition werden durch Kreise hervorgehoben. Es zeigte sich eine Abnahme der mRNA des IAP (inhibitor of apoptosis)-Proteins Survivin (roter Kreis 1), sowie eine Zunahme der mRNA des Transkriptionsfaktors cFos (blauer Kreis 2) und der mRNA des „p53 induzierbaren Gens“ PIG3 (blauer Kreis 3).

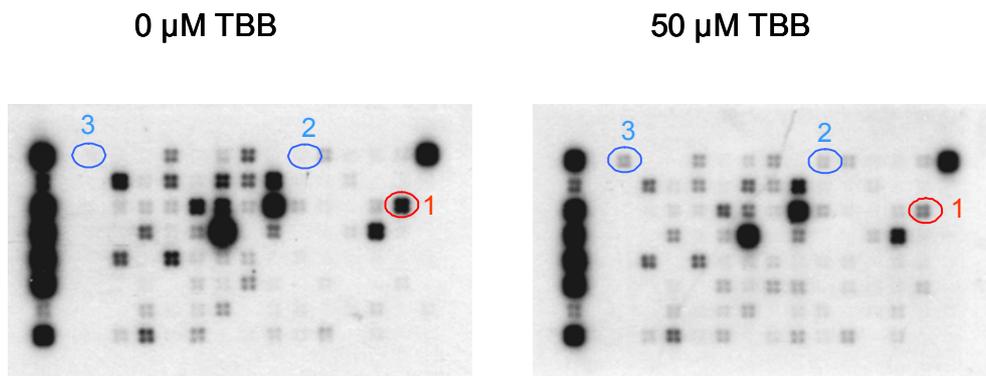


Abbildung 34: Micro-Array-Analyse TBB-behandelter LNCaP-Zellen: LNCaP-Zellen wurden für 17 h mit TBB behandelt, geerntet und anschließend die mRNA isoliert. Über eine cDNA-Synthese als Zwischenschritt wurde eine mit Biotin markierte RNA-Sonde hergestellt, die mit der Microarray-Membran „Human signal pathway finder“ der Firma SuperArray hybridisiert wurde. Die Detektion der Sonde erfolgte mittels Chemolumineszenz mit einem Streptavidin/alkalische Phosphatase Konjugat.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die im mRNA-Gehalt gefundenen Veränderungen durch eine TBB-Behandlung der Zellen auf Proteinebene widerspiegeln und ob diese auch unter Emodinbehandlung zu finden sind. Dazu wurden LNCaP-Zellen über 24 h mit Emodin bzw. TBB behandelt, die Proteine extrahiert und im Anschluss eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Westernblot durchgeführt. Aus dem in Abbildung 35 A gezeigten Westernblot geht hervor, dass in LNCaP-Zellen nach einer CK2-

Inhibition eine Reduktion des Gehaltes an Survivin bereits mit 13 μM Emodin bzw. 25 μM TBB auftritt. Die Expression von Survivin liegt nach einer 24-stündigen Behandlung mit 30 μM Emodin bzw. 50 μM TBB bereits unterhalb der Detektionsgrenze. In den wtp53 exprimierenden LNCaP-Zellen könnte diese Abnahme der Survivinexpression auf der Repression von Survivin durch p53 beruhen. Damit stellt sich die Frage, ob die Abnahme von Survivin auch in PC-3-Zellen beobachtet werden kann, die kein p53 exprimieren. Aus Abbildung 35 B geht hervor, dass auch in dieser Zelllinie eine Reduktion des Survivingehaltes stattfindet, so dass das IAP-Protein nach 48 h Inkubation mit 50 μM TBB nicht mehr detektiert werden kann, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung.

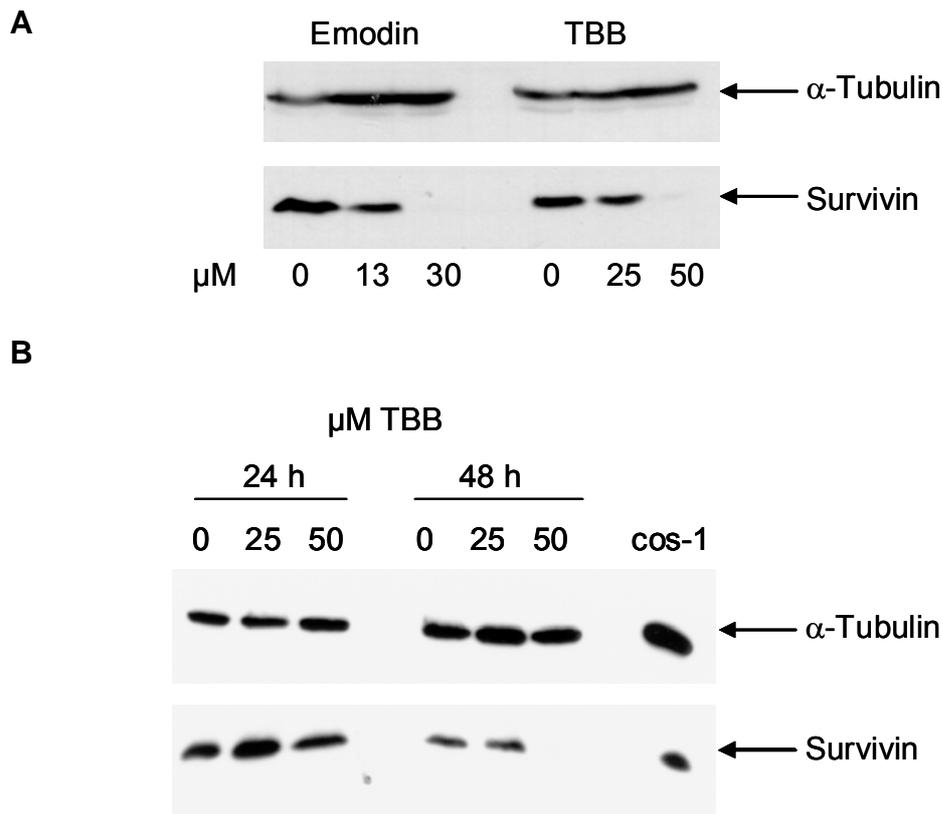


Abbildung 35: Survivingehalt nach CK2-Inhibition: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h mit den entsprechenden CK2-Inhibitoren behandelt, geerntet und 200 μg eines Gesamtzell-extraktes über ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran und die Detektion des Survivin mit dem monoklonalen Antikörper D-8 (Santa Cruz). α -Tubulin wurde nachgewiesen, um eine gleichmäßige Beladung der Taschen zu zeigen. **A** LNCaP-Zellen, **B** PC-3-Zellen.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit nur eine der im Micro-Array gefundenen Veränderungen auf mRNA-Ebene auch auf der Proteinebene nachvollzogen werden. Dadurch bleiben weitere Moleküle, die an der Apoptoseinduktion nach CK2-Hemmung beteiligt sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6. Diskussion

Die Proteinkinase CK2 ist ein Enzym, das für das Überleben von Zellen absolut notwendig ist. Dies konnte durch Knock-out-Studien in *S. cerevisiae* (Glover, 1998) und mit Mäusen belegt werden (Buchou et al., 2003; Xu et al., 1999). Bislang ist nur ein Knock-out der α' - bzw. der β -Untereinheit in Mäusen gelungen. Männliche Mäuse, denen die α' -Untereinheit fehlt, waren aufgrund fehlgebildeter Spermien und einer erhöhten Apoptoserate in den Testes unfruchtbar, während sich bei weiblichen Mäusen ohne α' -Untereinheit kein Phänotyp zeigte. Ein Fehlen der regulatorischen Untereinheit wirkt sich embryonal letal aus. Diese Experimente untermauern zusätzlich die Wichtigkeit der CK2. Sie fördert die Zellproliferation und ist damit auch in die Entstehung von Tumoren involviert. Um die Rolle der CK2 bei der Tumorentwicklung besser verstehen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellen aus verschiedenen Tumorstadien bezüglich ihrer Reaktionen auf eine Hemmung der CK2 verglichen. Da darüber hinaus bekannt ist, dass die CK2 im Prostatakarzinom an der Vermittlung wachstumsfördernder Signale beteiligt ist (Tawfic und Ahmed, 1994; Guo et al., 1999; Ahmed 1994; Ahmed 1999), wurde das Prostatakarzinom als Modellsystem ausgewählt. Es besteht hier eine medizinische Notwendigkeit nach neuen Behandlungsmöglichkeiten zu suchen, da die heute übliche Therapie durch Hormonentzug häufig die Entstehung aggressiverer, hormoninsensitiver Tumoren begünstigt. Zu Beginn der Arbeit wurde eine Analyse der CK2 in primären Prostatakarzinomzellen (P1-289 und P1-373) und in Zellen, die einer benignen Prostatahyperplasie entstammen (BPH-1), durchgeführt. Die Expression der drei CK2-Untereinheiten konnte für alle drei Zelllinien sowohl im Westernblot, als auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten außerdem, dass die CK2 in der Zelle überwiegend im Zellkern und nur wenig im Cytoplasma lokalisiert ist. Dieses „Verteilungsmuster“ wurde schon bereits von Faust et al. (1999) und Krek et al. (1992) beschrieben und trifft auch auf die etablierten Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 zu.

Da die CK2 eine wichtige Rolle für das Wachstum von Prostatatumoren und bei der androgenen Signalvermittlung spielt (Tawfic und Ahmed, 1994; Guo et al., 1999; Ahmed 1994; Ahmed 1999), wurde untersucht, ob mit einer Inhibition der CK2

Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen genommen werden kann. Durch die Zugabe des CK2-spezifischen Inhibitors Emodin (Yim et al., 1998) kann unabhängig vom Malignitätsgrad eine Hemmung der CK2 in Prostatazellen erreicht werden. Dies wird ebenfalls für den CK2-Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB; Sarno et al., 2001; Zien et al., 2003) gezeigt. Eine Verlängerung der Behandlungsdauer über 24 h hinaus zeigt weder mit Emodin noch mit TBB einen weiteren Einfluss auf die Aktivität der CK2. Allerdings muss bemerkt werden, dass die Inhibition der CK2 mit Emodin in den Prostatazellen in etwa das gleiche Ausmaß besitzt, während eine TBB-Behandlung von LNCaP-Zellen die Aktivität der CK2 wesentlich effizienter reduziert als in BPH-1- oder PC-3-Zellen. Diese Tatsache könnte durch eine unterschiedliche Aufnahmefähigkeit der Zellen für das TBB begründet werden, da ein Unterschied in der Wirkungsweise in den verschiedenen Zelllinien unwahrscheinlich ist. Aus Röntgenstrukturanalysen der CK2 α aus Mais ist die Wirkungsweise der beiden Inhibitoren bekannt. Emodin und TBB kompetieren mit dem Cosubstrat und liegen ungefähr in der gleichen Ebene wie der Purinring von ATP oder GTP. Die Bindung von Emodin bewirkt bedeutende strukturelle Änderungen im N-terminalen Teil des CK2-Moleküls (Abb. 36), wobei ein Rückgratsegment aus Arg47, Gly48 und Lys49 zum aktiven Zentrum hin, nach unten, verschoben wird. Diese Bewegung fängt gewissermaßen das Emodin ein, wodurch es tiefer in der aktiven Tasche eingebettet ist als das natürliche Cosubstrat. Diese Bewegung wird durch die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg47 und Histidin 160 bewirkt. Normalerweise wird dies durch den Triphosphat-Schwanz des ATP verhindert, der den Imidazolring des Histidins in einer anderen Position hält (Battistutta et al., 2000).

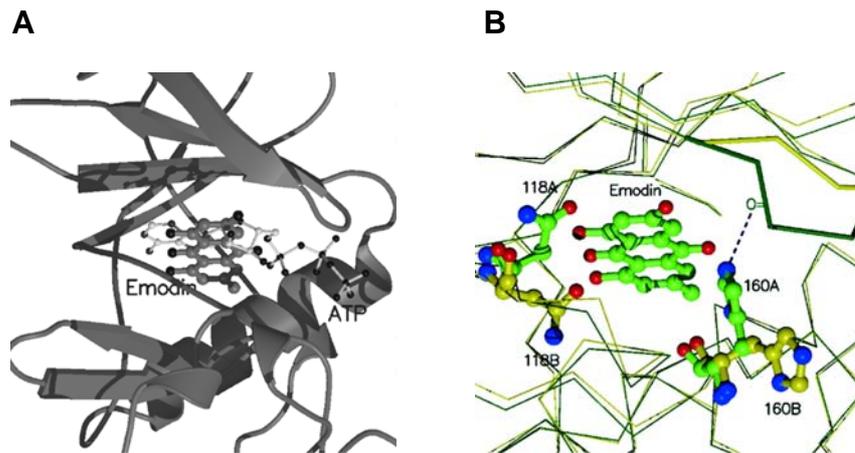


Abbildung 36: A Emodin im aktiven Zentrum der CK2: Es wird die Orientierung von Emodin (dunkelgrau) im Vergleich zu ATP (hellgrau) im aktiven Zentrum der CK2 gezeigt. **B Veränderungen im aktiven Zentrum der CK2 im Komplex mit Emodin:** Im CK2-Emodinkomplex (Model A) sind die C-Atome der Seitenreste Asn118 und His160 in grün gezeigt und für den Komplex mit ATP (Model B) in gelb. Die Position dieser beiden Reste verhindert die Freisetzung des Emodin aus der Tasche. Die Verschiebung der Reste Arg47, Gly48 und Lys49 wird ebenfalls gezeigt: für das Model A (Emodin) mit einer dicken grünen und für das Model B (ATP) mit einer dicken gelben Linie. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen His160 und Arg47 wird durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot dargestellt (Battistutta et al., 2000).

Mit TBB nimmt der Ring des Histidins 160 zwar die gleiche Orientierung ein, ist aber zu weit entfernt, um mit Arg47 eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden. Vielmehr führt die Größe der Bromatome dazu, dass dieses Rückgratsegment nach oben verschoben wird. Diese sind wohl auch für die Spezifität des TBB verantwortlich, da sie das Molekül dem aktiven Zentrum so gut anpassen, dass seine Freisetzung erschwert wird (Battistutta et al., 2001). Weiterhin scheinen große Seitenreste im aktiven Zentrum der CK2 für die Spezifität der Inhibitoren verantwortlich zu sein, wie z.B. Val66, Ile174 und Met163 (Pagano et al., 2004). Diese sind einzigartig für die CK2 und in anderen Kinasen durch Aminosäuren mit weniger sperrigen Seitenresten ersetzt. Es scheint, dass TBB in anderen Kinasen nicht wirken kann, weil deren hydrophobe Tasche zu groß ist, so dass sich TBB frei hinein- und hinausbewegen kann, während es sich in die hydrophobe Bindetasche der CK2 perfekt einpasst (Pinna, 2003). Die Bedeutung von Val66 in diesem Zusammenhang wurde durch die Herstellung von mutierten CK2-Molekülen bestätigt, in denen Val66 durch Alanin ersetzt wurde. Diese waren wesentlich weniger sensitiv für eine Hemmung mit TBB oder Emodin (Sarno et al., 2001). TBB wurde an 33 weiteren Kinasen getestet, von denen nur 3 durch TBB gehemmt wurden (Sarno et al., 2001). TBB wird daher noch spezifischer als Emodin eingeschätzt, das unter

anderem auch als Tyrosinkinaseinhibitor beschrieben wurde (Jayasuriya et al., 1992). TBB inhibiert die gereinigte CK2 zwar sehr spezifisch mit einem IC₅₀-Wert von 1 μ M, allerdings ist die benötigte Konzentration von 17 μ M, um 50% einer Jurkat-Zellpopulation in die Apoptose zu treiben, relativ hoch. Diese Tatsache erweist sich besonders problematisch im Hinblick auf die von Pagano und Mitarbeitern (2004) erwähnte, leider aber nicht im Ergebnissteil der Publikation gezeigte, Depolarisation isolierter Mitochondrien nach einer Behandlung mit 1 μ M TBB. Sollte dies tatsächlich auch in der Zelle der Fall sein, wäre TBB zur Untersuchung einer durch CK2-Inhibition ausgelösten Apoptose ungeeignet, da TBB selbst durch Veränderung des Mitochondrienpotentials die Apoptose auslösen könnte. Eine noch höhere Spezifität könnte durch den Einsatz von Antisense-Oligonucleotiden oder durch RNA-Interferenz erreicht werden, da diese nicht wie die ATP-Kompetitoren das aktive Zentrum der Kinase beeinflussen, sondern die Expression des gesamten Proteins unterbinden. Darin liegt aber auf der anderen Seite der entscheidende Nachteil dieser Methoden begründet: dadurch, dass das gesamte Protein nicht mehr gebildet wird, können auch Interaktionen mit möglichen Bindepartnern nicht mehr stattfinden, so dass die Auswirkungen von fehlenden Interaktionen und nicht mehr stattfindenden Phosphorylierungen nicht von einander getrennt werden können. Deshalb ist lediglich ein Vergleich der mit beiden Inhibitionsstrategien (Inhibition mit Nucleotidanaloga bzw. Knock-down des gesamten Proteins) erhaltenen Ergebnisse sinnvoll oder der Einsatz einer kinaseinaktiven Mutante. Ein Ansatz der vorliegenden Arbeit bestand darin die Expression der CK2 durch Antisense-Oligonucleotide zu senken oder ganz zu verhindern. Leider zeigten die verwendeten Oligonucleotide nicht die gewünschte Wirkung, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Die Gründe für eine ausbleibende Wirkung der Antisense-Oligonucleotide könnten in einer mangelhaften Transfektionseffizienz oder in einer verfrühten Degradation der Antisense-Oligonucleotide zu finden sein. In der Arbeitsgruppe um Ahmed werden erfolgreich Antisense-Strategien angewendet, die zu einer Reduktion der CK2-Expression führen. Allerdings unterscheiden sich diese Oligonucleotide in ihrer Sequenz von den hier verwendeten und werden mit Hilfe eines anderen Transfektionsreagenzes in die Zellen eingebracht. Durch diese Strategie waren Slaton und Mitarbeiter (2004) in der Lage, die Induktion von Apoptose in Prostatazellen nach Herunterregulation der CK2 nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden Antisense-Oligonucleotide mit invertierten Enden verwendet. Die

Funktionsfähigkeit solcher Oligonucleotide wurde von Ortigao und Mitarbeitern (1992) gezeigt. Sie besitzen den Vorteil einer höheren Stabilität durch die invertierten Enden (Seliger et al., 1991; Ortigao et al., 1992). Alternativ zu den Antisense-Oligonucleotiden wurde eine Beeinflussung der CK2-Expression durch RNA-Interferenz versucht. Dazu wurde von Herrn Dipl.-Chem. S. Lehnert ein Fragment in einen Expressionsvektor (pSilencer) einkloniert, das zur Expression einer short-hairpin-RNA (shRNA) führt, die den RNA-Interferenz-Mechanismus gegen die entsprechende CK2-Untereinheit in Gang setzen sollte. Da dieser Vektor nicht die erwarteten Resultate erbrachte, wurden in einem zweiten Versuch siRNAs eingesetzt. Von den beiden verwendeten siRNAs wurde die gegen die α -Untereinheit der CK2 gerichtete siRNA bereits von Lim und Mitarbeitern (2004) beschrieben und bereits eine Reduktion des Proteingehaltes gezeigt. Insgesamt zeigten sich die Transfektionen mit siRNAs als weniger effektiv im Vergleich zu den Inhibitoren. Obwohl im Vorfeld verschiedene Transfektionsreagenzien und unterschiedliche Bedingungen ausgetestet wurden, könnte dies in einer mangelhaften Transfektionseffizienz begründet liegen. Hinzu kommt, dass Lim und Mitarbeiter ihre Studien mit Hela-Zellen durchführten, so dass die Unterschiede in der Effizienz der gewählten siRNA durch den Wechsel des Zellsystems zustande kommen könnten. Abgesehen davon fand in dieser Arbeit keine Analyse der CK2-Aktivität statt. Auf die Tatsache dass der Wechsel des Zellsystems mit einer funktionierenden siRNA problematisch sein kann, weisen auch Huppi und Mitarbeiter (2005) hin. Darüber hinaus beschreiben Seeber und Mitarbeiter (2005) ebenfalls eine nur geringe Reduktion der CK2-Aktivität und -Expression nach Transfektion von siRNAs, was, ihrer Meinung nach, aus der überaus hohen Stabilität der Kinase resultieren könnte. Es erscheint daher auf jeden Fall ratsam, die Wirksamkeit der siRNAs nicht nur auf Proteinebene zu untersuchen, sondern auch auf RNA-Ebene. Daraus würde ersichtlich werden, ob die siRNAs tatsächlich nur schlecht die CK2-Expression beeinflussen, oder ob es aufgrund der hohen Stabilität der Kinase nur einen längeren Zeitraum braucht, bis sich die Änderungen auf RNA-Ebene im Proteingehalt widerspiegeln. Andererseits wurden schon RNA-Interferenz-Studien, die die Proteinkinase CK2 zum Ziel hatten, veröffentlicht wobei der gewählte Betrachtungszeitraum von 24 – 72 h mit dem Zeitraum, der in dieser Arbeit betrachtet wurde gleichzusetzen ist. Bedauerlicherweise wurden aber in diesen Arbeiten selten CK2-Proteingehalt und CK2-Aktivität zusammen betrachtet. Lim und Mitarbeiter

(2004) untersuchten beispielsweise die Stabilität der Mikrotubuli nach einer Hemmung der CK2. Ein „Knock-down“ der CK2 mit Hilfe von siRNAs führte zu einer Destabilisierung des Tubulingerüsts der Zelle, das daraufhin durch Zugabe von Colchizin, in normalerweise nicht wirksamen Konzentrationen, zerstört werden konnte. Durch die Verwendung kinaseinaktiver CK2-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung der Mikrotubuli allein durch die Interaktion mit der CK2 erfolgt. Yamane und Kinsella (2005) konnten mit Hilfe von siRNAs gegen die CK2 eine gesteigerte Apoptoseinduktion nach Behandlung der Zellen mit 6-Thioguanin bzw. nach ionisierender Strahlung zeigen. Dabei ist interessant, dass bereits in den Kontrollansätzen mit CK2-siRNA, aber ohne 6-Thioguanin bzw. Bestrahlung ein Anstieg apoptotischer Zellen auftrat. Es konnte also bereits sowohl mit Antisense-Oligonucleotiden als auch mit Hilfe von siRNAs gegen die CK2 eine Apoptoseinduktion beobachtet werden (Unger et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass die CK2 eine wesentliche Aufgabe zum Schutz der Zelle vor dem programmierten Zelltod erfüllt. Diese Vermutung wird durch die von Guo und Mitarbeitern (2001) und Yu und Mitarbeitern (2001) erhaltenen Ergebnisse unterstützt. Diese zeigten, dass mit CK2 transfizierte PC-3-, LNCaP- bzw. ALVA41-Zellen resistent gegen eine Apoptoseinduktion mit Etoposid oder Diethylstilbestrol werden. Diese Wirkung konnte allerdings nur mit einer Überexpression des Holoenzym oder der katalytischen Untereinheiten erreicht werden, nicht durch Überexpression der β -Untereinheit. Wie die CK2 im Einzelnen diese Schutzfunktion ausübt, ist noch weitgehend ungeklärt. Aus der wachsenden Liste ihrer Substrate sind mittlerweile einige bekannt, die durch die CK2-Phosphorylierung vor einer Spaltung durch Caspasen geschützt werden, wie z. B. Bid (Deshager et al., 2001), Max (Krippner-Heidenreich et al., 2001), PTEN (Torres et al., 2003; Miller et al., 2002), Presenilin (Loetscher et al., 1997; Walter et al., 1998), und HS-1 (Ruzzene et al., 2002). Vergleicht man die Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch CK2 und für die Spaltung durch Caspasen, kommt man unweigerlich zu der Vermutung, dass sich dahinter ein genereller Mechanismus zu Regulation der Caspaseaktivität verbergen könnte (Litchfield, 2003; Pinna, 2002).

In einem MTT-Assay wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine deutliche Beeinflussung des Wachstums von LNCaP- und PC-3-Zellen, nicht aber von BPH-1-Zellen, durch eine CK2-Inhibition mit Emodin stattfindet, obwohl eine vergleichbare

Hemmung der CK2 vorliegt. Unter TBB-Behandlung dagegen zeigen nur LNCaP-Zellen einen deutlichen Rückgang im Zellwachstum. Dieses Wachstumsverhalten unter TBB-Behandlung scheint sich in den Aktivitätstests unter TBB-Behandlung widerzuspiegeln: in BPH-1- und PC-3-Zellen wird durch TBB die Aktivität der Kinase weniger drastisch reduziert als in LNCaP-Zellen. Die Zelllinie mit der geringsten Restaktivität wird also auch im Wachstum beeinflusst. Möglicherweise gibt es eine „CK2-Mindestaktivität“, die vorliegen muss, um das Wachstum der Karzinomzellen zu gewährleisten. In diesem Falle würde man sie bei etwa 20-30% Restaktivität ansiedeln, da PC-3-Zellen unter diesen Bedingungen nach einer Emodinbehandlung ebenfalls einen Wachstumsrückgang zeigen. Diese „Aktivitätsgrenze“ könnte durchaus für die Karzinomzellen und die Zellen aus der benignen Prostatahyperplasie, BPH-1, unterschiedlich sein, was das Weiterwachsen dieser Zellen unter Emodin- bzw. TBB-Behandlung erklären würde. Diese Tatsache wird durch die Vermutung von Slaton und Mitarbeitern (2004) unterstützt, dass BPH-1-Zellen, ebenso wie Prec(prostate epithelial cells)-Zellen eine Reduktion der CK2-Aktivität besser tolerieren als die Prostatakarzinomzellen. Eine ähnliche Vermutung lassen die Ergebnisse von Izeradjene und Mitarbeitern (2005) zu, die zeigten, dass der CK2-Inhibitor DRB zwar Krebszellen für eine TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induzierte Apoptose sensitiver macht, nicht jedoch „normale“ Zellen. Eine solche Grenze würde auch erklären, warum die Inhibition der CK2 mit den Antisense-Oligonucleotiden bzw. durch RNA-Interferenz keine offensichtlichen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen hatten. Vermutlich ist die verbleibende CK2-Restaktivität für das Überleben der Zellen ausreichend.

Sowohl von Emodin (Kuo et al., 1997) als auch von TBB ist bekannt, dass sie die Lebensfähigkeit von Zellen beeinflussen. So beschrieben z.B. Ruzzene und Mitarbeiter (2002) die Induktion von Apoptose in Jurkat-Zellen nach einer Behandlung mit TBB, allerdings ohne eine weitere Betrachtung der dorthin führenden Signalwege. Für Emodin wurde die Induktion von Apoptose in Gebärmutterhalskrebszellen über eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 gezeigt (Srinivas et al., 2003). Ebenfalls konnte in Hepatoma-Zelllinien die Aktivierung dieser beiden Caspasen nach vorangegangener Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt werden (Jing et al., 2002). Shieh und Mitarbeiter (2004) wiesen in Hepatoma-Zelllinien einen p53-Anstieg,

sowie eine Induktion von p21 und einen Arrest der Zellen in der G₂/M-Phase nach Emodinbehandlung nach. Eine Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom c in Lungenkarzinomzelllinien, sowie eine Beteiligung der pro-apoptotischen Bcl2-Familien Proteine Bax und Bak wurde von Lee (2001) gezeigt. Der hier zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen verwendete MTT-Assay lässt keine Rückschlüsse zu, über welchen Mechanismus es zu einer Reduktion der Zellzahl in den mit Inhibitoren behandelten Ansätzen kommt. In vielen Fällen wird ein Wachstumsarrest über die Induktion des cdk-Inhibitors p21^{WAF1} vermittelt, dessen Expression aber weder nach Emodin- noch nach TBB-Behandlung in LNCaP-Zellen nachgewiesen werden kann. Eine Zellzyklusanalyse emodinbehandelter LNCaP-Zellen zeigt deutlich das Vorhandensein einer Zellpopulation mit hypodiploidem DNA-Gehalt. Dies lässt auf ein Absterben der Zellen durch Apoptose schließen, bei der durch Fragmentierung der DNA Zellen mit einem DNA-Gehalt unter 2n entstehen. Das Auftreten fragmentierter DNA in LNCaP-Zellen nach CK2-Inhibition kann durch einen TUNEL-Assay, sowohl für Emodin als auch für TBB, bestätigt werden. Der Nachweis von fragmentierter DNA, z.B. über eine FACS-Analyse, liefert nur einen Hinweis auf eine mögliche Apoptose. Die Spaltung der DNA in 180 – 200 bp große Fragmente ist ein spätes Ereignis im apoptotischen Programm und wird hauptsächlich von CAD (Caspase activated DNase) oder der Endonuclease G bewerkstelligt. Eine alternative Methode zum Nachweis dieser DNA-Fragmente ist der sog. TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling), der auf der Markierung der entstehenden freien 3'-OH-Enden mit Fluorescein-dUTP beruht. Die Detektion dieser freien Enden von DNA-Einzelsträngen ist insofern problematisch, als dass sie nicht spezifisch bei der Apoptose auftreten. Strangbrüche können beispielsweise auch in nekrotischen Zellen oder während der Mitose auftreten (Willingham, 1999; Huppertz et al., 1999). Abgesehen davon ist es ebenso möglich, dass Zellen das apoptotische Programm durchlaufen, ohne dass eine DNA-Fragmentierung auftritt, was letzten Endes das Absterben der Zelle nicht beeinflusst (Samejima und Earnshaw, 2005). Schulze-Osthoff und Mitarbeiter (1994) konnten beispielsweise zeigen, dass weder der Zellkern noch eine DNA-Fragmentierung zum Ablauf einer Fas-induzierten Apoptose in einer Fibrosarcomzelllinie nötig ist. Dies bedeutet, dass nur mit einem alleinigen Nachweis fragmentierter DNA nicht notwendigerweise der Nachweis einer Apoptose gelungen ist. Demnach ist es möglich, dass PC-3-Zellen nach Emodinbehandlung die Apoptose einleiten, ohne

dass diese durch fragmentierte DNA in der FACS-Analyse oder im TUNEL-Assay nachweisbar sein muss. Um eine Apoptose sicher nachzuweisen, sollten mindestens drei Ereignisse im apoptotischen Programm betrachtet werden. Die Fragmentierung der DNA ist ein spätes Ereignis der Exekutionsphase, wobei die Aktivierung der CAD durch Caspase 3 erfolgt. Der Nachweis der Caspase 3-Aktivität wird häufig als ein weiteres Kriterium zum Apoptosenachweis herangezogen. Dazu kann ein direkter Aktivitätsnachweis mit einem synthetischen Substrat durchgeführt werden oder es wird die Spaltung zelleigener Substrate im Westernblot nachgewiesen, wie z. B. die Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP). Beim Nachweis der PARP-Spaltung ist zu beachten, dass nur das auftretende Fragment von etwa 89 kDa durch die Caspaseaktivität entsteht und damit nur dieses Fragment als Nachweis für eine Apoptose gewertet werden darf. Shah und Mitarbeiter (1996) beschrieben weitere Spaltprodukte der PARP, die nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht werden können. Häufig wird auch eine Abnahme im Gehalt der inaktiven Caspase-Proform als Hinweis auf eine Caspaseaktivität gewertet, wobei bedacht werden muss, dass alleine die Tatsache, dass eine potentiell aktive Form gebildet wird, nicht bedeutet, dass die Protease auch aktiv ist. Zum Nachweis eines Ereignisses der Initiationsphase der Apoptose kann die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien herangezogen werden. Nach seiner Freisetzung führt Cytochrom c zusammen mit APAF-1 und ATP zur Aktivierung der Procaspase 9, die ihrerseits in der Lage ist, Caspase 3 zu aktivieren. Da dieses Ereignis noch in der Initiationsphase der Apoptose stattfindet, liegt es durchaus im Rahmen des Möglichen, dass ein Abbruch des Apoptoseprogrammes stattfindet. Damit ist auch die Freisetzung von Cytochrom c nicht als alleiniges Kriterium zum Apoptosenachweis geeignet. Zudem herrscht Unklarheit darüber, wie groß die Menge an freigesetztem Cytochrom c sein muss, damit es zu einer Caspase 9-Aktivierung kommt (Willingham, 1999). Darüber hinaus wurden Fälle beschrieben, für die eine Cytochrom c Freisetzung zur Induktion der Apoptose nicht notwendig zu sein scheint (Kiechle und Zhang, 2002). Für die Zelllinie „Chinese hamster ovary K1“ wurde eine Induktion der Apoptose durch Behandlung mit Phosphatidylserin gezeigt, die aber nicht mit einer Veränderung des mitochondrialen Potentials oder einer Cytochrom c Freisetzung einhergeht (Miyato et al., 2001). Die Einleitung der Apoptose ist auf Ebene der Cytochrom c Freisetzung noch vielfältig inhibierbar, beispielsweise durch das Oncoprotein Prothymosin α (Nicholson und Thornberry, 2003; Jiang et al., 2003). Die genaue Wirkungsweise von

Prothymosin α ist noch unbekannt, allerdings wird vermutet, dass sich sein oncogenes Potential auf die Fähigkeit gründet, die Apoptosombildung zu verhindern (Hajra und Liu, 2004). Aus der Familie der Hitzeschockproteine (HSPs) sind ebenfalls Vertreter bekannt, die in der Lage sind, die Bildung des Apoptosoms zu hemmen. Hsp70 bindet an die CARD (caspase recruitment domain)-Domäne von APAF-1, wodurch die Rekrutierung der Procaspase 9 und damit die Apoptosombildung unterbleibt. Hsp27 verhindert die Bildung des Apoptosoms, indem es an Cytochrom c bindet, während Hsp90 an APAF-1 bindet und dessen Oligomerisierung im Vorfeld der Apoptosombildung inhibiert (Hajra und Liu, 2004; Garrido et al., 2001). Alle diese Szenarien zur Hemmung der Apoptosombildung wären denkbare Erklärungen dafür, warum PC-3-Zellen nach TBB-Behandlung zwar Cytochrom c freisetzen, aber nicht absterben. Im Hinblick auf eine Apoptoseinduktion nach Hemmung der CK2 müsste dann aber die Spezifität des Emodin in Frage gestellt werden, da die Einleitung der Apoptose in PC-3-Zellen nach Emodinbehandlung auf zusätzliche Effekte des Emodin zurückgeführt werden müsste.

Bei der Vermittlung von apoptoseinduzierenden Signalen spielt auch das Wachstumssuppressorprotein p53 eine wichtige Rolle. Dies geschieht einerseits über die Transaktivierung von apoptosefördernden Proteinen, wie z. B. Bax, Puma oder Caspase 3, sowie über transaktivierungsunabhängige Wege, die im Folgenden noch näher betrachtet werden. Da in der vorliegenden Arbeit mit der Zelllinie LNCaP eine p53 exprimierende Zelllinie und mit den PC-3-Zellen eine p53-negative Zelllinie betrachtet wurde, in beiden Zelllinien aber nach CK2-Inhibition eine Apoptoseinduktion gezeigt werden konnte, könnte man auf den ersten Blick annehmen, dass p53 in diesem Prozess keine Rolle spielt. Allerdings konnte in LNCaP-Zellen nach CK2-Inhibition ein Anstieg im p53-Proteingehalt festgestellt werden und es wurde über eine Micro-Array-Analyse die Induktion bzw. Repression von p53 responsiven Genen gezeigt. Um die Aufgaben des p53 besser und auf gleichem zellulärem Hintergrund untersuchen zu können, sollte die Zelllinie PC-3 stabil mit einem durch Tetracyclin induzierbaren p53 transfiziert werden. Ein funktionsfähiges p53 in eine p53-negative Zelllinie einzuführen, stellt sich insofern schwierig dar, als dass der Verlust des Wachstumssuppressorproteins in vielen Fällen einen wesentlichen Schritt in der Tumorigenese darstellt. Es ist davon auszugehen, dass in den meisten Fällen das eingebrachte p53 seiner Aufgabe

nachkommt und die Tumorzelle in die Apoptose treibt. Deshalb wurde hier die Herstellung einer induzierbaren Zelllinie mit dem sog. Tetoff-System versucht, in der p53 nur nach Tetracyclinentzug exprimiert werden sollte. Ist die Unterdrückung der p53-Expression aber nicht vollständig, kann dies ausreichen, um in den Zellen die Apoptose zu induzieren. Nichts desto trotz ist die Herstellung p53-positiver Tumorzelllinien, wie sie z.B. Ouyang und Mitarbeiter (2001) oder Bunz und Mitarbeiter (1998) (HCT116p53wt und HCT116p53^{-/-}) beschreiben, nicht unmöglich. Darüber hinaus sind auch Tumorzelllinien mit einem funktionellen p53 Protein bekannt, wie z. B. die in der vorliegenden Arbeit verwendete LNCaP-Zelllinie. Anhand der von Ouyang und Mitarbeitern (2001) erhaltenen Zelllinie wird aber ein weiteres Problem deutlich: selbst wenn ein funktionelles p53 erfolgreich in eine Krebszelle eingeführt wurde, ist diese in der Lage, den Kontrollmechanismus zu umgehen. Dies könnte hier z.B. durch eine Deletion, nach der nur noch eine verkürzte für die Tumorzelle „unschädliche“ Form exprimiert wird, erklärt werden. Auch für eine p53-exprimierende PC-3-Zelllinie konnte nicht bestätigt werden, dass es sich bei diesem p53 um ein funktionelles Wildtypprotein handelt. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen zur Stabilisierung nach UV-Behandlung, sowie durch die Tatsache unterstützt, dass der Antikörper PAb1620, der die Wildtypform des p53 erkennt, in diesen PC-3-Zellen kein Signal liefert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den von Benninghoff und Mitarbeitern (1999) gezeigten Daten, der p53 mit PAb1620 nachweisen konnte. Dieses Phänomen könnte durch den Verlust der p53-Expression während der fortlaufenden Kultur der Zellen erklärt werden, da dies einen Selektionsvorteil für die Zellen darstellt. Da alle Versuche p53-positive Zellen mit p53-negativen PC-3-Zellen zu vergleichen, nicht zum Erfolg führten, wurde lediglich die Rolle des p53 als Transkriptionsfaktor nach einer durch CK2-Inhibition induzierten Apoptose untersucht. Dies geschah mit einem Inhibitor der Transaktivierungsfähigkeit des p53, Pifithrin α (PFT), in LNCaP-Zellen. Wäre die in LNCaP-Zellen beobachtete Apoptose nach CK2-Inhibition allein durch die Transaktivierungsfähigkeit des p53 verursacht, sollte nach deren Hemmung mit PFT kein Wachstumsrückgang mehr zu beobachten sein. Erstaunlicherweise zeigte sich aber sowohl bei mit Emodin als auch bei mit TBB behandelten Zellen eine Verstärkung des Wachstumsrückganges nach einer Vorbehandlung mit PFT. Da die im vorliegenden Experiment verwendete PFT-Konzentration zu einer Inhibition der p21-Induktion nach Doxorubicinbehandlung führte, kann davon ausgegangen

werden, dass diese auch zusammen mit den CK2-Inhibitoren wirksam ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transaktivierungsfunktion des p53 zumindest nicht ausschließlich an der Apoptoseinduktion nach CK2-Inhibition beteiligt ist, und dass wahrscheinlich noch andere, transaktivierungsunabhängige oder völlig p53-unabhängige, Wege existieren, die für die Induktion des programmierten Zelltods verantwortlich sind. Dies steht im Einklang mit den für die Zelllinie PC-3 gemachten Beobachtungen, die ohne p53-Expression in der Lage ist, die Apoptose einzuleiten. Eine transkriptions-unabhängige Wirkungsweise des p53 beschreiben Mihara und Mitarbeiter (2003), demnach lokalisiert p53 an den Mitochondrien, wo es einen Komplex mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-XL (Petros et al., 2004) bildet und so die Freisetzung von Cytochrom c fördert. Chipuk und Mitarbeiter (2003) berichten von einer Bax-abhängigen Apoptose in Zellen, die mit den Transkriptionshemmern Cycloheximid oder Actinomycin D behandelt wurden, sowie in entkernten Zellen. Dabei scheint p53 in der Lage zu sein, Bax direkt zu aktivieren (Chipuk et al., 2004). Dass es neben p53-transaktivierungsunabhängiger Apoptose auch völlig p53-unabhängige Formen geben muss, legen zahlreiche Berichte über Apoptose in p53-defizienten Zellen nahe. Die Rolle von PFT als generellem Inhibitor der p53-Transaktivierung sollte ebenfalls überdacht werden. In JB6-Zellen konnte durch alleinige Behandlung mit PFT eine Apoptoseinduktion gezeigt werden, die durch eine UV-Bestrahlung oder Behandlung mit Doxorubicin verstärkt wurde (Kaji et al., 2003). Demnach können synergistische Effekte zwischen PFT und einer CK2-Inhibition bezüglich der Einleitung der Apoptose nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die Wirkungsweise des PFT abhängig vom Zellsystem, so dass eine grundsätzliche Verwendung als Inhibitor der p53 Transaktivierungsfunktion, vor allem im Zusammenhang mit Apoptoseinduktion, überdacht werden sollte. Diese Meinung vertreten ebenfalls Walton und Mitarbeiter (2005), die zeigen konnten, dass PFT α unter Zellkulturbedingungen nicht stabil ist und zu PFT β kondensiert. Für keinen dieser beiden Stoffe konnten sie eine gesteigerte Überlebensrate für A2780- oder HCT116-Zellen nach Etoposid-, Cisplatin-, Paclitaxel- oder Doxorubicinbehandlung nachweisen. Die Expression von p53 transaktivierten Genen blieb ebenfalls unbeeinflusst. Da diese Beobachtungen jedoch im Gegensatz zu solchen stehen, in denen durchaus ein cytoprotektiver Effekt des PFT beobachtet werden konnte, schließen Walton und Mitarbeiter (2005) daraus, dass die Wirkungsweise des PFT abhängig vom betrachteten Gewebe sein könnte, und dass

weder PFT α noch PFT β als generelle Inhibitoren der p53-Funktion angesehen werden dürfen. Ein weiterer Punkt, der bei der Betrachtung des p53 in Zusammenhang mit der CK2 nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Tatsache, dass p53 in der Lage ist, die CK2 durch Bindung an die regulatorische Untereinheit zu inhibieren (Schuster et al., 2001). Für die LNCaP-Zellen könnte sich daraus ein verstärkender Rückkopplungsmechanismus ergeben, in dem das nach CK2-Inhibition stabilisierte p53 seinerseits zu einer weiteren Hemmung der Kinase beiträgt.

Um die Wirkungsweise der CK2 und die Induktion der Apoptose durch ihre Inhibition besser zu verstehen und um die unterschiedliche Reaktion der Karzinomzellen gegenüber den Zellen aus der benignen Prostatahyperplasie erklären zu können, bildet die Suche nach Signalwegen, über welche die Apoptoseinduktion geschieht, einen weiteren Aspekt dieser Arbeit. Es ist bekannt, dass bei der Entstehung von Prostatatumoren die vermehrte Expression von NF κ B und bcl-2 eine Rolle spielen (Catz und Johnson, 2003; Abate-Shen und Shen, 2000; Coffey et al., 2001), zudem stellt bcl-2 ein von NF κ B transkriptionell reguliertes Protein dar (Kucharczak et al., 2003). In einer Westernblotanalyse zeigte sich, dass die Zelllinien BPH-1 und LNCaP mehr NF κ B exprimieren als die PC-3-Zellen, allerdings zeigte sich keine Verbindung zum bcl-2-Gehalt der Zellen: Die BPH-1-Zellen exprimierten deutlich weniger bcl-2 als die beiden Karzinomzellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Unempfindlichkeit der BPH-1-Zellen gegenüber einer Apoptoseinduktion nach CK2-Hemmung nicht durch eine Überexpression des anti-apoptotisch wirkenden bcl-2 verursacht wird. Andererseits könnte aber in BPH-1-Zellen die Aktivierung anderer anti-apoptotischer Signalwege durch den hohen Gehalt an NF κ B im Vordergrund stehen. Da dieser allerdings mit dem Gehalt in LNCaP-Zellen vergleichbar zu sein scheint, müssten auch in nachgeordneten Signalwegen Unterschiede zu finden sein. Bei der Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg spielen die Mitglieder der bcl-2-Familie eine entscheidende Rolle (Tsujiimoto und Shimizu, 2000; Gross et al., 1999; Green und Reed, 1998). Grundvoraussetzung für die Freisetzung von Cytochrom c ist die Verschiebung des Gleichgewichtes von Seiten der anti-apoptotisch wirkenden bcl-2-Familien-Proteine auf die Seite der pro-apoptotisch agierenden bcl-2-Familienproteine. Wie es im Detail zur Freisetzung von Cytochrom

c kommt, ist noch nicht verstanden, möglicherweise trägt aber die Fähigkeit der proapoptotischen bcl-2-Familien-Proteine Kanäle zu bilden dazu bei. Daher ist in der Mehrzahl aller Fälle eine Abnahme von bcl-2 im Zusammenhang mit einer über das Mitochondrium vermittelten Apoptose nachweisbar. Dies konnte zumindest in LNCaP-Zellen nach Behandlung mit den beiden CK2-Inhibitoren nachgewiesen werden. Dadurch wird die Vermutung unterstützt, dass die Apoptose nach CK2-Inhibition über den mitochondrialen Weg vermittelt wird. Um Hinweise zu bekommen, welche Proteine, die nicht unmittelbar an Apoptosevorgängen beteiligt sind, noch in diesen Prozess involviert sein könnten, wurde eine Micro-Array Analyse mit TBB-behandelten LNCaP-Zellen durchgeführt. Es zeigten sich eine Reduktion der mRNA des „inhibitor of apoptosis protein“ (IAP) Survivin, sowie eine Zunahme des mRNA-Gehaltes an „p53 inducible gene 3“ (PIG3) und an dem Transkriptionsfaktor cFos. Survivin ist ein etwa 16.5 kDa großes Protein aus der Familie der IAP-Proteine, die unter anderem durch eine so genannte BIR(baculovirus IAP repeat)-Domäne charakterisiert sind. IAP-Proteine wirken vor allem als Inhibitoren der Caspasen 3, 7 und 9. Survivin wirkt als Inhibitor der Caspase 9 auf einer den Mitochondrien nachgeschalteten Ebene. Eine Überexpression dieser Proteine könnte also einer Apoptoseinduktion entgegenwirken und eine Tumorentstehung fördern. Eine erhöhte Expression an Survivin konnte für zahlreiche Tumorformen (Li, 2003; Zaffaroni et al., 2005), unter anderem auch für das Prostatakarzinom (Xing et al., 2003) bestätigt werden. Hayashi und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass das Einbringen eines adenoviralen Antisensekonstruktes gegen Survivin zu einer geringeren Expression des Proteins und zur Apoptose der Prostatakrebszelllinien PC-3 und DU-145 führt. Sie konnten in einem Xenograftmodell das Tumorstadium durch eine Injektion des adenoviralen Antisensekonstruktes drastisch verlangsamen. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von subletalen Dosen Etoposid oder Docetaxel gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten Pennati und Mitarbeiter (2004) durch den Einsatz von sog. „hammerhead“ Ribozymen. Ein weiteres Ergebnis, das Survivin zu einem interessanten Ziel für eine mögliche Therapie macht, wurde von Zhang und Mitarbeitern (2005) veröffentlicht: Survivin scheint an der Vermittlung der Resistenz von Prostata Tumoren gegenüber einem Hormonentzug beteiligt zu sein. In androgensensitiven LNCaP-Zellen führt die Gabe von Dihydrotestosteron zu einem Anstieg der Survivinexpression, während eine Behandlung mit dem Antiandrogen Flutamid zur Verminderung der Survivinexpression und damit zur Apoptose führt. Der

Wachstumsfaktor IGF-1 führte ebenfalls zu einer gesteigerten Survivinexpression und unterdrückte darüber hinaus die durch Flutamid induzierte Apoptose. Eine Abnahme des Proteingehaltes an Survivin konnte auch nach CK2-Inhibition sowohl mit Emodin als auch mit TBB in dieser Arbeit sowohl für hormonsensitive LNCaP- als auch für hormoninsensitive PC-3-Zellen erreicht werden. Obwohl für Survivin auch andere Regulationsmechanismen zu existieren scheinen, kann anhand dieser Daten für LNCaP-Zellen eine Beteiligung von p53 als Transkriptionsfaktor nicht völlig ausgeschlossen werden, da die Transkription von PIG3 durch p53 aktiviert (Gomez-Lazaro et al., 2004) und diejenige von Survivin durch p53 reprimiert (Fridman und Lowe, 2003) wird. Allerdings zeigt die Abnahme des Survivingehaltes in den p53-negativen PC-3-Zellen, dass es andere Wege zur Kontrolle des Survivingehaltes einer Zelle geben muss. Hier wäre z.B. eine stabilisierende Phosphorylierung durch cdc2 an Thr34 des Survivin zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung maßgeblich die Stabilität des Survivin beeinflusst. Liegt diese Phosphorylierung nicht vor, leiten die Zellen die Apoptose ein, was unter anderem für PC-3-Zellen gezeigt wurde (O'Connor et al., 2000; O'Connor et al., 2002; Wall et al., 2003). Da die CK2 vielfältige Aufgaben in der Proliferationsregulation wahrnimmt, wäre es denkbar, dass es nach einer Inhibition zu Störungen in den beteiligten Signalwegen kommt, die eine verminderte Aktivität der cdc2 und damit eine geringere Phosphorylierung des Survivin zur Folge haben. CK2 und cdc2 sind außerdem in der Lage, sich gegenseitig zu phosphorylieren. Dabei wird die regulatorische Untereinheit der CK2 abhängig vom Zellzyklus und die α -Untereinheit in der Mitosephase phosphoryliert (Olsten und Litchfield, 2004; Bosc et al., 1995; Litchfield et al., 1992; Mulner-Lorillon et al., 1990). Umgekehrt wird cdc2 in der G₁-Phase an Ser39 durch die CK2 phosphoryliert (Allende und Allende, 1995; Russo et al., 1992). Erneut gibt die Abnahme des Survivingehaltes Anlass zu der Vermutung, dass die beobachtete Apoptose über das Mitochondrium ausgelöst wird, da Survivin ein Inhibitor der Caspase 9 ist (O'Connor et al., 2000; O'Connor et al., 2002; Li, 2003), die vor allem über den intrinsischen Weg aktiviert wird. Eine Abnahme im Survivingehalt würde eine Aktivierung der Caspase 9 unterstützen.

PIG 3 (**p**53 **i**nducible **g**ene 3) wurde in einem Screen nach p53 induzierbaren Genen von Polyak und Mitarbeitern (1997) identifiziert. Dabei wurden einige Proteine gefunden, von denen man annahm, dass sie an der Regulation des Redox-Status

einer Zelle beteiligt sein könnten, so auch PIG3. PIG3 scheint stark mit der pflanzlichen NADPH-Oxidoreduktase TED2 verwandt zu sein, die eine Rolle bei apoptotischen Prozessen spielt, die zur Meristembildung führen. Der nächste Verwandte von PIG3 in Säugerzellen ist eine NADPH-Chinon-Oxidoreduktase, die stark zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) beiträgt. Polyak und Mitarbeiter schlagen deshalb ein kaskadenartiges Modell vor, in dem p53 Gene transaktiviert, die an der Kontrolle des Redox-Status beteiligt sind und zur Bildung von ROS mit anschließender Schädigung der Mitochondrien und so zur Apoptose führen. Für LNCaP-Zellen könnte hier also die Induktion von p53 nach CK2-Inhibition mit folgender Aktivierung von PIG3, Bildung von ROS und Schädigung der Mitochondrien mit Cytochrom c-Freisetzung eine Rolle spielen. Yi und Mitarbeiter (2004) beschreiben die Induktion der Apoptose in Hela-Zellen durch Arsenitoxid nach einer Emodinbehandlung. Dieser Effekt kommt durch eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Emodin zustande. Die Beteiligung von ROS an einer durch Emodin induzierten Apoptose in Hepatomzellen wurde auch von Jing und Mitarbeitern (2002) gezeigt, so dass dies ebenfalls in LNCaP- und PC-3-Zellen der Fall sein könnte. cFos ist ein Mitglied der Fos-Proteinfamilie, die durch eine basische Leucinzipperregion charakterisiert ist. Über diese wird die Bildung von Heterodimeren mit Proteinen aus der Jun- oder ATF-Familie vermittelt. Dieser Komplex wird als Transkriptionsfaktor AP-1 bezeichnet. Abhängig von seiner Zusammensetzung, vom Zellsystem und vom Stimulus kann er pro- oder anti-apoptische Aufgaben wahrnehmen. Die Kontrolle der Zellproliferation durch AP-1 wird vor allem durch die Expressionsregulation Zellzyklus steuernder Proteine wie der Cycline D1, A und E sowie p53, p21^{WAF1}, p16Ink4a und p19 ARF vermittelt (Hess et al., 2004).

Von der Hemmung der CK2 in Prostatakarzinomzellen scheint also eine Vielzahl von Signalwegen betroffen zu sein. Dieser Sachverhalt beinhaltet eine Reihe von Vorteilen für die Therapie des Prostatakarzinoms. Die Hemmung der CK2 bietet eine Alternative zur Hormonentzugstherapie, da der Aufbau eines Selektionsdruckes zu Gunsten hormonunabhängig wachsender Zellen unterbleibt. Beispielsweise sind Fälle bekannt, in denen der Androgen-Antagonist Flutamid oder andere Steroidhormone als Aktivator des Androgenrezeptors (AR) wirken kann, was durch eine Mutation (T877A) des Rezeptors in der Liganden-Bindungsdomäne verursacht wird. Diese Mutation führte aber nicht zur Resistenz gegenüber anderen Androgen-

Antagonisten, wie z.B. Bicalutamid. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Häufigkeit der Mutationen im AR in Tumoren nach Androgenentzugstherapie deutlich erhöht ist (Feldman und Feldman, 2001). Das gleiche Phänomen wird ebenfalls für Bicalutamid beschrieben (Kasamon und Dawson, 2004). Ein weiterer Nachteil dieser Therapie liegt in dem damit einhergehenden Verlust an Knochenmasse und dadurch verursachte Knochenbrüche. Hinzu kommt, dass bei etwa 80% der Patienten die Knochen durch Metastasen betroffen sind. Diese Nebenwirkung versucht man durch den Einsatz von Biphosphonaten, einer Stoffklasse, die zur Prophylaxe und Behandlung der Osteoporose bei Frauen entwickelt wurde, zu umgehen. Allerdings konnte erst von Zoledronsäure, einem Biphosphonat der dritten Generation, die gewünschte Wirkung einschließlich einer Tumorsuppression gezeigt werden. Die bis jetzt vorhandenen Daten lassen aber noch keinen routinemäßigen Einsatz von Biphosphonaten zur Therapie des Prostatakarzinoms zu (Kasamon und Dawson, 2004). Über eine Rolle der CK2 bei der Knochenbildung ist nichts bekannt, so dass möglicherweise auch diese Nebenwirkung durch eine Inhibition der CK2 ausgeschlossen werden könnte. Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung von, vor allem hormoninsensitiven, Prostata Tumoren bieten Bestrahlungen und Chemotherapeutica. Zellzyklusinhibitoren wie Flavopiridol oder Genistein befinden sich dazu in klinischen Testphasen (Reese, 2001). Flavopiridol ist unter anderem als Inhibitor der cdc2-Kinase bekannt (Reese, 2001), die wesentlich für die Stabilität des bereits erwähnten IAP-Proteins Survivin verantwortlich ist. Eine Abnahme an Survivin konnte aber auch nach CK2-Inhibition in dieser Arbeit gezeigt werden. Darüber hinaus ist die Beeinflussung des Zellzyklus durch die CK2 hinreichend bekannt, so dass es durchaus lohnend erscheint, weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet anzustellen. Ein weiterer Ansatz besteht darin pro-apoptotische Signalwege zu fördern bzw. anti-apoptotische Signale zu inhibieren, wie es z. B. mit bcl-2 versucht wird. Bcl-2 Antisense-Oligonucleotide verlangsamten unter anderem die Neuentstehung hormonrefraktärer Tumoren (Miyake et al., 2000). Anti-bcl-2 spezifische „Hammerhead“ Ribozyme sind in LNCaP-Zellen ebenfalls in der Lage, die bcl-2-Expression drastisch zu senken und so die Fähigkeit der Apoptoseinduktion wieder herzustellen (Reese, 2001; Dorai et al., 1997). Eine Auswirkung einer CK2-Inhibition auf den Gehalt an bcl-2 in LNCaP-Zellen konnte hier ebenfalls nachgewiesen werden. Vermutlich ließen sich verschiedene Strategien zur Behandlung des Prostatakarzinoms, nämlich die Induktion von Apoptose durch

Hormonentzug, das Targeting von Zellzyklusregulatoren und von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen in einer Inhibition der CK2 vereinen, ohne die bei der Hormonentzugstherapie auftretenden Nebeneffekte in Kauf nehmen zu müssen. Im Falle einer CK2-Inhibition mit Emodin könnten sich sogar noch weitere synergistische Effekte einstellen. Cha und Mitarbeiter (2005) konnten, übereinstimmend mit dieser Arbeit, zeigen, dass Emodin zu einem Wachstumsrückgang von Prostatakarzinomzellen führt. Darüber hinaus führt es zu einer Degradation des AR über das Proteasom, so dass es zu einer Unterbrechung des androgenen Signalweges kommt. Im Mausmodell kam es durch die Verabreichung von Emodin zu einer verlangsamten Tumorentwicklung, wodurch die Tiere länger überlebten. Aus der vorliegenden Arbeit wird damit deutlich, dass die Inhibition der CK2 eine viel versprechende Alternative zu bisherigen Therapieformen des Prostatakarzinoms darstellt. Ebenso wären Kombinationen von anderen Behandlungsstrategien mit einer CK2 Inhibition denkbar. Um die Entwicklung solcher Behandlungsformen voranzutreiben, sollten in jedem Fall weitere Untersuchungen zur Inhibition der CK2 und ihrer Folgen unternommen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Abate-Shen C. and Shen M. M. (2000): Molecular genetics of prostate cancer; *Genes & Development* 14: 2410 – 2434.
2. Ahmed K. (1994): Significance of the casein kinase system in cell growth and proliferation with emphasis on studies of the androgenic regulation of the prostate; *Cellular and Molecular Biology Research* 40(1): 1 – 11.
3. Ahmed K. (1999): Nuclear matrix and protein kinase CK2 signaling; *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 9(3&4): 329 – 336.
4. Ahmed K., Gerber D. A. and Cochet C. (2002): Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2; *TRENDS in Cell Biology* 12(5): 226 – 230.
5. Allende J. E. and Allende C. C. (1995): Protein kinase CK2: An enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation; *The FASEB Journal* 9: 313 – 323.
6. Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Canotti G. and Pinna L. A. (2001): Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP-site directed tetrabromo-2-benzotriazole; *Protein Science* 10: 2200 – 2206.
7. Battistutta R., Sarno S., De Moliner E., Papinutto E., Canotti G. and Pinna L. A. (2000): The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2; *The Journal of Biological Chemistry* 275(38): 29618-29622.
8. Benninghoff J., Kartarius S., Teleb Z., Selter H., Unteregger G., Zwergel T., Wullich B. and Montenarh M. (1999): Two different forms of p53 localized differently within cells of urogenital tumours; *Cancer Letters* 144: 55 – 64.
9. Bosc D. G., Slominski E., Sichler C. and Litchfield D. W. (1995): Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2; *The Journal of Biological Chemistry* 270(4): 25872 – 25878.
10. Buchou T., Vernet M., Blond O., Jensen H. H., Pointu H., Olsen B. B., Cochet C., Issinger O.-G., Boldyreff B. (2003): Disruption of the regulatory β subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality; *Molecular and Cellular Biology* 23(3): 908 – 915.
11. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldmann T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage; *Science* 282: 1497 – 1501.

12. Carroll A. G., Voeller H. J., Sugars L. and Gelmann E. P. (1993): p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines; *Prostate* 23: 123 – 134.
13. Catz S. D. and Johnson J. L. (2003): Bcl-2 in prostate cancer: A minireview; *Apoptosis* 8: 29 – 37.
14. Cha T.-L., Qiu L., Chen C.-T., Wen Y. and Hung M.-C. (2005): Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth; *Cancer Research* 65(6): 2287 – 2295.
15. Channavajhala P. L. and Seldin D. C. (2002): Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis; *Oncogene* 21(34): 5280 – 5288.
16. Chipuk J. E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N. M., Newmeyer D. D., Schuler M. and Green D. R. (2004): Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis; *Science* 303: 1010 – 1014.
17. Chipuk J. E., Maurer U., Green D. R. and Schuler M. (2003): Pharmacologic activation of p53 elicits bax-dependent apoptosis in the absence of transcription; *Cancer Cell* 4: 371 – 381.
18. Coffey R. N. T., Watson W. G. and Fitzpatrick J. M. (2001): Signaling for the caspases: Their role in prostate cell apoptosis; *The Journal of Urology* 165: 5 – 14.
19. Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1993): *Molekulare Zellbiologie*; Verlag Walter de Gruyter, Berlin; 2. Auflage.
20. De Moliner E., Moro S., Sarno S., Fagotto G., Zanotti G., Pinna L. A. and Battistutta R. (2003): Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone related compounds: a structural insight; *The Journal of Biological Chemistry* 278(3): 1831 – 1836.
21. Denmade P. and Issacs J. T. (1996): Activation of programmed (apoptotic) cell death for the treatment of prostate cancer; *Advances in Pharmacology* 35: 281 – 306.
22. Deshager S., Osen-Sand A., Montessuit S., Magnenat E., Vilbois F., Hochmann A., Journot L., Antonsson B. and Martinou J.-C. (2001): Phosphorylation of Bid by Casein Kinases I and II regulates its cleavage by Caspase 8; *Molecular Cell* 8: 601 – 611.
23. Dorai T., Olsson C. A., Katz A. E. and Buttyan R. (1997): Development of hammerhead ribozyme against bcl-2: A preliminary evaluation of a potential gene therapeutic agent for hormone-refractory prostate cancer; *Prostate* 32: 273 – 279.

-
24. Eferl R. and Wagner E. F. (2003): AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis; *Nature Reviews in Cancer* 3: 859 – 868.
 25. Faust R. A., Niehans G., Gapany M., Hoistad D., Knapp D., Cherwitz D., Davis A., Adams G. L. and Ahmed K. (1999): Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31: 941 – 949.
 26. Faust M., Schuster N. and Montenarh M. (1999): Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin; *FEBS Letters* 462: 51 – 56.
 27. Feldman B. J. and Feldman D. (2001): The development of androgen-independent prostate cancer; *Nature Reviews Cancer* 1: 34 – 45.
 28. Fridman J. S. and Lowe S. W. (2003): Control of apoptosis by p53; *Oncogene* 22: 9030 – 9040.
 29. Gannon J. V., Greaves R., Iggo R. and Lane D. p. (1990): Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form; *The EMBO Journal* 9(5): 1595 – 1602.
 30. Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L. and Kroemer G. (2001): Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 433 – 442.
 31. Genzlinger A. (1998): Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußcytometrie, Agarosegelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α,β -ungesättigte Aldehyde und Ketone; Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
 32. Glover C. G. (1998): On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*; *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59: 95 – 133.
 33. Gomez-Lazaro M., Fernandez-Gomez F. J. and Jordán J. (2004): p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection; *The Journal of Physiological Biochemistry* 60(4): 287 – 308.
 34. Gossen M. and Bujard H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters; *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 5547 – 5551.
 35. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W. and Bujard H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells; *Science* 268(5218): 1766 – 1769.
 36. Green D. R. and Reed J. C. (1998): Mitochondria and apoptosis; *Science* 281: 1309 – 1312.

-
37. Gross A., McDonnell J. M. and Korsmeyer S. (1999): Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis; *Genes & Development* 13: 1899 – 1911.
 38. Guerra B. and Issinger O.-G. (1999): Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology; *Electrophoresis* 20: 391 – 408.
 39. Guerra B., Boldyreff B. and Issinger O.-G. (2001): Fas-associated factor 1 interacts with protein kinase CK2 in vivo upon apoptosis induction; *International Journal of Oncology* 19: 1117 – 1126.
 40. Guerra B., Sarno S., Cesaro L., Issinger O.-G. and Pinna L. A. (1999): CK2: A protein kinase in need of control; *Pharmacology & Therapeutics* 82(2-3): 303-313.
 41. Guo C., Yu S., Davies A. T. and Ahmed K. (1999): Nuclear matrix targeting of the protein kinase CK2 signal as a common downstream response to androgen or growth factor stimulation of prostate cancer cells; *Cancer Research* 59: 1146 – 1151.
 42. Guo C., Yu S., Davies A. T., Wang H., Green J. E. and Ahmed K. (2001): A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells; *The Journal of Biological Chemistry* 276(8): 5992 – 5999.
 43. Hajra K. M. and Liu J. R. (2004): Apoptosome dysfunction in human cancer; *Apoptosis* 9: 691 – 704.
 44. Harlow E., Crawford L. V., Pim D. C. and Williamson N. M. (1981): Monoclonal antibodies specific for SV40 tumor antigens; *Journal of Virology* 39: 861 – 869.
 45. Hayashi N., Asano K., Suzuki H., Yamamoto T., Tanigawa N., Egawa S. and Manome Y. (2005): Adenoviral infection of survivin antisense sensitizes prostate cancer cells to etoposide in vivo; *Prostate* 65: 1 – 19.
 46. Hayward S. W., Dahiya R., Cunha G. R., Bartek J., Deshpande N. and Narayan P. (1995): Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1; *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 31A: 14 – 24.
 47. Hess J., Angel P. and Schorpp-Kistner M. (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings; *Journal of Cell Science* 117(25): 5965 – 5973.
 48. Horoszewicz J. S., Leong S. S., Kawinski E., Karr J. P., Rosenthal H., Chu T. M., Mirand E. A. and Murphy G. P. (1983): LNCaP model of human prostatic carcinoma; *Cancer Research* 43: 1809 – 1818.
 49. Huppertz B., Frank H.-G. and Kaufmann P. (1999): The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization; *Anatomy and Embryology* 200: 1 – 18.

-
50. Huppi K., Martin S. E. and Caplen N. J. (2005): Defining and assaying RNAi in mammalian cells; *Molecular Cell* 17: 1 – 10.
51. Igney F. H. and Krammer P. H. (2002): Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis; *Nature Reviews Cancer* 2: 277 – 288.
52. Izeradjene K., Douglas L., Delany A. and Houghton J. A. (2005): Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines; *Oncogene* 24: 2050 – 2058.
53. Jayasuriya H., Koonchanok N. M., Geahlen R. L., McLaughlin J. L. and Chang C.-J. (1992): Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*; *Journal of Natural Products* 55(5): 696 – 698.
54. Jensen H. H., Hjerrild M., Guerra B., Larsen M. R., Højrup P. and Boldyreff B. (2001): Phosphorylation of the Fas associated factor FAF1 by protein kinase CK2 and identification of serines 289 and 291 as the in vitro phosphorylation sites; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33: 577 – 589.
55. Jiang X., Kim H.-E., Shu H., Zhao Y., Zhang H., Kofron J., Donnelly J., Burns D., Ng S.-C., Rosenberg S. and Wang X. (2003): Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway; *Science* 299: 223 – 226.
56. Jing X., Ueki N., Cheng J., Imanishi H. and Hada T. (2002): Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin; *Japanese Journal of Cancer Research* 93: 874 – 882.
57. Kaighn M. E., Shankar Narayan K., Ohnuki Y., Lechner J. F. and Jones L. W. (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3); *Investigative Urology* 17: 16 – 23.
58. Kaji A., Zhang Y., Nomura M., Bode A. M., Ma W.-Y., She Q.-B. and Dong Z. (2003): Pifithrin- α promotes p53-mediated apoptosis in JB6 cells; *Molecular Carcinogenesis* 37: 138 – 148.
59. Kasamon K. M. and Dawson N. A. (2004): Update on hormone-refractory prostate cancer; *Current Opinion in Urology* 14: 185 – 193.
60. Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; *British Journal of Cancer* 26: 239 – 257.
61. Kiechle F. L. and Zhang X. (2002): Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications; *Clinica Chimica Acta* 326: 27 – 45.
62. Klumpp S., Mäurer A., Zhu Y., Aichele D., Pinna L. A. and Kriegelstein J. (2004): Protein kinase CK2 phosphorylates Bad at threonine-117; *Neurochemistry International* 45: 747 – 752.
-

-
63. Komarov P. G., Komarova E. A., Kondratov R. V., Christov-Tselkov K.; Coon J. S., Chernov M. V. and Gudkov A. V. (1999): A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy; *Science* 285: 1733 – 1737.
64. Krek W., Maridor G. and Nigg E. A. (1992): Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme; *The Journal of Cell Biology* 116(1): 43 -55.
65. Krippner-Heidenreich A., Talanian R. V., Sekul R., Kraft R., Thole H., Ottleben H. and Lüscher B. (2001): Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1; *Biochemical Journal* 358: 705 – 715.
66. Kucharczak J., Simmons M. J., Fan Y. and Gélinas C. (2003): To be or not to be: NF κ B is the answer – role of Rel/NF κ B in the regulation of apoptosis; *Oncogene* 22: 8961 – 8982.
67. Kuo Y.-C., Sun C.-M., Ou J.-C. and Tsai W.-J. (1997): A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum ohwi*; *Life Sciences* 61(23): 2335 – 2344.
68. Landesman-Bollag E., Channavajhala P. L., Cardiff R. D. and Seldin D. C. (1998): p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2 α collaborate in the development of thymic lymphomas in mice; *Oncogene* 16: 2965 – 2974.
69. Lee H.-Z. (2001): Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma; *British Journal of Pharmacology* 134: 11 – 20.
70. Lee H.-Z. (2001): Protein kinase C involvement in aloe-emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell; *British Journal of Pharmacology* 134: 1093 – 1103.
71. Li F. (2003): Survivin study: What is the next wave? *Journal of Cellular Physiology* 197: 8 – 29.
72. Li P.-F., Li J., Müller E.-C., Otto A., Dietz R. and von Harsdorf R. (2002): Phosphorylation by protein kinase CK2: A signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC; *Molecular Cell* 10: 247 – 258.
73. Lim A. C. B., Tiu S.-Y., Li Q. and Qi R. Z. (2004): Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2; *The Journal of Biological Chemistry* 279(6): 4433 – 4439.
74. Litchfield D. W. (2003): Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death; *Biochemical Journal* 369: 1 – 15.
75. Litchfield D. W., Lüscher B., Lozeman F. J., Eisenman R. N. and Krebs E. G. (1992): Phosphorylation of casein kinase II by p34cdc2 in vitro and at mitosis; *The Journal of Biological Chemistry* 267(20): 13943 – 13951.
-

-
76. Loetscher H., Deuschle U., Brockhaus M., Reinhardt D., Nelboeck P., Mous J., Grünberg J., Haas C. and Jacobson H. (1997): Presenilins are processed by caspase-type proteases; *The Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20655 – 20659.
77. Martinez L. A., Yang J., Vazquez E. S., Rodriguez-Vargas M., Olive M., Hsieh J.-T., Logothetis C. J. and Navone N. M. (2002): p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells; *Carcinogenesis* 23(8): 1289 – 1296.
78. Marshak D. R. and Carrol D. (1991): Synthetic peptide substrates for casein kinase II; *Methods in Enzymology* 200: 134 – 156.
79. Meggio F. and Pinna L. A. (2003): One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *The FASEB Journal* 17: 349-368.
80. Meggio F., Shugar D. and Pinna L. A. (1990): Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1; *European Journal of Biochemistry* 187: 89 – 94.
81. Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria; *Molecular Cell* 11: 577 – 590.
82. Miller S. J., Lou D. Y., Seldin D. C., Lane W. S. and Neel B. G. (2003): Direct identification of PTEN phosphorylation sites; *FEBS Letters* 528: 145 – 153.
83. Miyake H., Tolcher A. and Gleave M. E. (2000): Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer with the use of antisense bcl-2 oligodesoxynucleotides; *Journal of the National Cancer Institute* 92: 34 – 41.
84. Miyato Y., Ibuki Y., Ohyama H., Yamada T. and Goto R. (2001): Phosphatidylserine induces apoptosis in CHO cells without mitochondrial dysfunction in a manner dependent on caspases other than caspases-1, -3, -8 and -9; *FEBS Letters* 504: 73 – 77.
85. Mulner-Lorrillon O., Cormier P., Labbé J.-C., Dorée M., Poulhe R., Osborne H. and Bellé R. (1990): M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the β subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity; *European Journal of Biochemistry* 193: 529 – 534.
86. Nicholson D. W. and Thornberry N. A. (2003): Life and death decisions; *Science* 299: 214 – 215.
87. Niefind K., Guerra B., Ermakowa I. and Issinger O.-G. (2001): Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme; *The EMBO Journal* 20(19): 5320 - 5331.

-
88. O'Conner D. S., Grossman D., Plescia J., Li F., Zhang H., Villa A., Tognin S., Marchisio P. C. and Altieri D. C. (2000): Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin; *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(24): 13103 – 13107.
89. O'Conner D. S., Wall R. N., Porter A. C. G., Altieri D. C. (2002): A p34cdc2 checkpoint in cancer; *Cancer Cell* 2: 43 – 54.
90. Olsten M. E. K. and Litchfield D. W. (2004): Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2; *Biochemical Cell Biology* 82: 681 – 693.
91. Ortigao J. F., Rosch H., Selter H., Fröhlich A., Lorenz A., Montenarh M. and Seliger H. (1992): Antisense effect of oligodesoxynucleotides with inverted terminal internucleotidic linkages: a minimal modification protecting against nucleolytic degradation; *Antisense Research and Development* 2(2): 129 – 146.
92. Ouyang X., Wang X., Xu K., Jin D.-Y., Cheung A. L. M., Tsao S. W. and Wong Y.C. (2001): Effect of p53 on centrosome amplification in prostate cancer cells; *Biochimie Biophysica Acta* 1541: 212 – 220.
93. Pagano M. A., Andrzejewska M., Ruzzene M., Sarno S., Cesaro L., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierczuk Z and Pinna L. A. (2004): Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole; *Journal of Medical Chemistry* 47: 6239 – 6247.
94. Pennati M., Binda M., Colella G., Zoppe M., Folini M., Vignati S., Valentini A., Citti L., De Cesare M., Pratesi G., Giacca M., Daidone M. G. and Zaffarano N. (2004): Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells; *Oncogene* 23: 386 – 394.
95. Petros A. M., Gunasekera A., Xu N., Olejniczak E. T. and Fesik S. W. (2004): Defining the p53 DNA-binding domain/bcl-XL-binding interface using NMR; *FEBS Letters* 559: 171 – 174.
96. Pinna L. A. (2002): Protein kinase CK2: A challenge to canons; *Journal of Cell Science* 115: 3873 – 3878.
97. Pinna L. A. (2003): The raison d' être of constitutively active protein kinases: The lesson of CK2; *Accounts of chemical research* 36(6): 378 – 384.
98. Polyak K., Xia Y., Zweier J. L., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (1997): A model for p53-induced apoptosis; *Nature* 389: 300 – 305.
99. Prowald K., Fischer H. and Issinger O.-G. (1984): Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures; *FEBS Letters* 176(2): 479 – 483.
100. Reese D. M. (2001): New agents for prostate cancer; *Hematology / Oncology Clinics of North America* 15(3): 547 – 557.
-

-
101. Roche molecular biochemicals: Apoptosis and cell proliferation, 2nd edition; pp. 72 – 74.
 102. Russo G. L., Vandenberg M. T., Yu I. J., Bae Y.-S., Franza B. R. and Marshak D. R. (1992): Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle; *The Journal of Biological Chemistry* 267(28): 20317 – 20325.
 103. Ruzzene M., Penzo D. and Pinna L. A. (2002): Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS-1) in Jurkat cells; *Biochemical Journal* 364: 41 – 47.
 104. Samejima K. and Earnshaw W. C. (2005): Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis; *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 6: 677 – 688.
 105. Sarno S., Ghisellini P. and Pinna L. A. (2002): Unique activation mechanism of protein kinase CK2; *The Journal of Biological Chemistry* 277(25): 22509 – 22514.
 106. Sarno S., Moro S., Meggio F., Fagotto G., Dal Ben D., Ghibellini P., Battistutta R., Canotti G. and Pinna L. A. (2002): Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors; *Pharmacology & Therapeutics* 93: 159-168.
 107. Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M., Davies S. P., Donella-Deana A., Shugar D. and Pinna L.A. (2001): Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2; *FEBS Letters* 496: 44 – 48.
 108. Schimpf G. (Hrsg.) (2002): *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*; 3. Auflage; Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
 109. Schulze-Osthoff K., Walczak H., Dröge W. and Krammer P. H. (1994): Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis; *The Journal of Cell Biology* 127(1): 15 – 20.
 110. Schuster N., Götz C., Faust M., Schneider E., Prowald A., Jungbluth A. and Montenarh M. (2001): Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity; *Journal of Cellular Biochemistry* 81: 172 – 183.
 111. Seeber S., Issinger O.-G., Holm T., Kristensen L. P. and Guerra B. (2005): Validation of protein kinase CK2 as oncological target; *Apoptosis* 10: 875 – 885.
 112. Seliger H., Fröhlich A., Groger G., Krist B., Montenarh M., Rosch H., Rosch R. and Ortigao F. R. (1991): Synthetic oligonucleotides for biochemical applications; *Nucleic Acids Symposium Series* 24: 193 – 196.

-
113. Shah G. M., Shah R. G. and Poirier G. G. (1996): Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229(3): 838 – 844.
 114. Shieh D.-E., Chen Y.-Y., Yen M.-H., Chiang L.-C. and Lin C.-C. (2004): Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells; *Life Sciences* 74: 2279 – 2290.
 115. Shin S., Lee Y., Kim W., Ko H., Choi H. and Kim K. (2005): Caspas-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8; *The EMBO Journal*: 1 – 11.
 116. Slaton J. W., Unger G. M., Sloper D. T., Davies A. T. and Ahmed K. (2004): Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model; *Molecular Cancer Research* 2(12): 712 – 721.
 117. Srinivas G., Anto R. J., Srinivas P., Vidhyalakshmi S., Senan V. P. and Karunagaran D. (2003): Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9; *European Journal of Pharmacology* 473: 117 – 125.
 118. Stephen C. W., Helminen P. and Lane D. P. (1995): Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: Insights into antibody-peptide interactions; *Journal of Molecular Biology* 248: 58 – 78.
 119. Szyszka R., Grankowski N., Felczak K. and Shugar D. (1995): Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as selective inhibitors of protein kinase CK I and CKII from *Saccharomyces cerevisiae* and other sources; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208(1): 418 – 424.
 120. Unger G. M., Davis A. T., Slaton J. W. and Ahmed K. (2004): Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: Implications for cancer therapy; *Current Cancer Drug targets* 4: 77 – 84.
 121. Tawfic S. and Ahmed K. (1994): Growth stimulus-mediated differential translocation of casein kinase 2 to the nuclear matrix; *The Journal of Biological Chemistry* 269(40): 24615 – 24620.
 122. Tawfic S., Yu S., Wang H., Faust R., Davis A. and Ahmed K. (2001): Protein kinase CK2 signal in neoplasia; *Histology and Histopathology* 16: 1 – 10.
 123. Torres J., Rodriguez J., Myers M. P., Valiente M., Graves J. D., Tonks N. K. and Pulido R. (2003): Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3; *The Journal of Biological Chemistry* 278(33): 30652 – 30660.
 124. Tsujimoto Y. and Shimizu S. (2000): Bcl-2 family: Life-or-death switch; *FEBS Letters* 466: 6 – 10.

-
125. Ubeda M. and Habener J. F. (2003): CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation; *The Journal of Biological Chemistry* 278(42): 40514 – 40520.
 126. Van Bokhoven A., Varella-Garcia M., Korch C., Johannes W. U., Smith E. E., Miller H. L., Nordeen S. K., Miller G. J. and Lucia M. S. (2003): Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines; *Prostate* 57: 205 – 225.
 127. Vojtesek B., Bártek J., Midgley C. A. and Lane D. P. (1992): An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53; *Journal of Immunological Methods* 151: 237 – 244.
 128. Wall N. R., O'Connor D. S., Plescia J., Pommier Y. and Altieri D. C. (2003): Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis; *Cancer Research* 63: 230 – 235.
 129. Walter J., Grünberg J., Schindzielorz A. and Haas C. (1998): Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated protein presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms; *Biochemistry* 37: 5961 – 5967.
 130. Walton M. I., Wilson S. C., Hardcastle I. R., Mirza A. R. and Workman P. (2005): An evaluation of the ability of Pifithrin- α and - β to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines; *Molecular Cancer Therapy* 4(9): 1369 – 1377.
 131. Weinberg R. A. (1996): Wie Krebs entsteht; *Spektrum der Wissenschaft Spezial* 5: Krebsmedizin: 7 – 15.
 132. Willingham M. C. (1999): Cytochemical methods for the detection of apoptosis; *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47(9): 1101 – 1109.
 133. Xing N., Qian J., Bostwick D., Bergstralh E. and Young C. Y. (2001): Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin; *Prostate* 48: 7 – 15.
 134. Xu X., Toselli P. A., Russell L. D. and Seldin D. C. (1999): Globozoospermia in mice lacking the casein kinase α' catalytic subunit; *Nature Genetics* 23: 118 – 121.
 135. Yamane K. and Kinsella T. J. (2005): CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation; *Cancer Research* 65(10): 4362 – 4367.
 136. Yamane K. and Kinsella T. J. (2005): Casein kinase 2 regulates both apoptosis and the cell cycle following DNA damage induced by 6-thioguanine; *Clinical Cancer Research* 11: 2355 – 2363.

-
137. Yi J., Yang J., He R., Gao F., Sang H., Tang X. and Ye R. D. (2004): Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling; *Cancer Research* 64: 108 – 116.
 138. Yim H., Lee Y. H., Lee C. H. and Lee S. K. (1999): Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor; *Planta Medica* 65: 9 – 13.
 139. Yu S., Wang H., Davis A. and Ahmed K. (2001): Consequences of CK2 signaling to the nuclear matrix; *Molecular and Cellular Biochemistry* 227: 67 – 71.
 140. Zaffaroni N., Pennati M. and Dandone M. (2005): Survivin as a target for new anticancer interventions; *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(2): 360 – 372.
 141. Zandomeni R. and Weinmann R. (1984): Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1- β -ribofuranosylbenzimidazole on a protein kinase; *The Journal of Biological Chemistry* 259(23): 14804 – 14811.
 142. Zhang M., Latham D. E., Delaney M. A. and Chakravarti A. (2005): Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer; *Oncogene* 24: 2474 – 2482.
 143. Zien P., Bretner M., Zastapilo K., Szyszka R. and Shugar D. (2003): Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole as an ATP-competitive potent inhibitor of protein kinase CK2 from various sources; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 129 – 133.

8. Publikationen

Hessenauer A., Goetz C., Montenarh M. (2003):

Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 22(6): 1263 - 1270.

Hessenauer A., Goetz C., Montenarh M. (2005):

Induction of the intrinsic apoptotic pathway by inhibition of protein kinase CK2 in LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Cell Biology* 84S1 Suppl. 55: 111.

Hessenauer A., Goetz C., Montenarh M.:

Inhibiting protein kinase CK2 leads prostate cancer cells into apoptosis while normal cells remain unaffected.

In Vorbereitung

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Montenarh für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, ebenso wie für seine stete Diskussionsbereitschaft, Anregungen und Kritik. Für die wissenschaftliche Unterstützung möchte ich mich ebenfalls bei Frau PD Dr. C. Götz bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Löbrich bedanke ich mich für die Übernahme der Zweitberichterstattung zu dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung der Zelllinien BPH-1, P1-289 und P1-373 möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. G. Unteregger bedanken, ebenso wie bei Herrn Professor Dr. K. Roemer für das Überlassen der Zelllinien HCT 116 p53 wt und HCT 116 p53 -/-. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Professor Dr. Seliger für die Synthese der Antisense-Oligonucleotide.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. O. Rössler, Frau M. Wirth, Frau Dr. C. Andres, Frau S. Kartarius, Frau T. Martin, Frau A. Rubeck und bei Herrn Dipl.-Chem. S. Lehnert bedanken, die durch ihre tatkräftige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. A. Krempler und Frau Dipl.-Biol. D. Deckbar für ihre Unterstützung bei den FACS-Analysen danken.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und zahlreiche praktische Anregungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Michael Gebhard, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Andrea Nina Hessenauer

Geburtsort: Homburg / Saar

Geburtsdatum: 06.02.1978

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung. August 1984 - Juli 1988:
Grundschule Homburg Bruchhof

August 1988 - Juni 1997:
Chr. v. Mannlich Gymnasium Homburg

Studium: Oktober 1997:
Beginn eines Biologiestudiums an der Universität
Kaiserslautern,

14.10.1999:
Vordiplom im Studiengang Diplom Biologie,

15.01.2002:
Abschluss des Studiums als Diplombiologin

Promotion: März 2002:
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von
Herrn Prof. Dr. Montenarh in der Medizinischen
Biochemie und Molekularbiologie; Universität des
Saarlandes

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den 13.12.05

Andrea Hessenauer