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

Zelluläre Signaltransduktionswege nach Hemmung der Proteinkinase CK2

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von

Dipl. Chem. Carolin Schneider

geboren am: 22. August 1982 in Ottweiler/Saar



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung/Summary.....	1
1.1 Zelluläre Signaltransduktionswege nach Hemmung der Proteinkinase CK2...1	
1.2 Cellular signaling pathways after inhibition of protein kinase CK2	3
2. Einleitung.....	5
2.1 Die Proteinkinase CK2	5
2.2 Bedeutung der Proteinkinase CK2 für das Prostatakarzinom	7
2.3 Inhibition und Inhibitoren der Proteinkinase CK2	9
2.4 Apoptose.....	12
2.5 Fragestellung der Arbeit.....	14
3. Materialien und Chemikalien	16
3.1 Materialien und Geräte.....	16
3.2 Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	17
3.3 Verwendete Plasmide	22
3.4 Verwendete siRNAs	22
3.5 Verwendete Antikörper.....	23
4. Methoden	27
4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden	27
4.1.1 Zelllinien	27
4.1.2 Kultivierung der Zellen	28
4.1.3 Passagieren der Zellen.....	29
4.1.4 Einfrieren von Zellen.....	29
4.1.5 Tauen von Zellen	30
4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen	30
4.1.7 TBB-, DMAT- und Quinalizarin-Behandlung	30

4.1.8 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer.....	31
4.1.9 Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen	31
4.1.10 Transfektion von Zellen mit Plasmiden	32
4.1.11 Transfektion von Zellen mit siRNA.....	33
4.1.12 Ernten von Zellen.....	33
4.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	34
4.2.1 Herstellung von Zellextrakten	34
4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	34
4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
4.2.4 Westernblot.....	36
4.2.5 Immunfärbung der Proteine	36
4.3 Nukleinsäuretechniken.....	37
4.3.1 Transformation von <i>E. coli</i>	37
4.3.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	37
4.3.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	38
4.4 Sonstige Methoden	39
4.4.1 CK2-Kinaseaktivitätstest.....	39
4.4.2 Reporterassay	39
4.4.3 Caspaseassay	42
5. Ergebnisse	43
5.1 Vergleich der CK2-Hemmung und Apoptoseinduktion durch TBB in verschiedenen Prostatakarzinomzellen	43
5.2 Untersuchungen zur Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 in der durch TBB induzierten Apoptose	49
5.3 Untersuchung zur Rolle des Androgenrezeptors in der TBB-induzierten Apoptose	56
5.4 Identifizierung des apoptotischen Signalweges nach CK2-Inhibition in LNCaP- und PC-3-Zellen.....	58
5.5 Alternatives Tumormodell	69

Inhaltsverzeichnis

5.6 Alternative Möglichkeiten zur Hemmung der Proteinkinase CK2	76
5.6.1 Inhibition der CK2 durch Quinalizarin	76
5.6.2 Inhibition der Proteinkinase CK2 durch siRNA.....	79
6. Diskussion	87
7. Literaturverzeichnis	107
8. Publikationen.....	127
Danksagung	128
Lebenslauf.....	129

Abkürzungsverzeichnis

A λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
Caspase	Cystein-Aspartat-Protease
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
CK2	Proteinkinase CK2
cpm	counts per minute
C-Terminus	Carboxy-Terminus
deion.	deionisiert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum, foetales Kälberserum
G ₁ -Phase	erste Gap-Phase des Zellzyklus
G ₂ -Phase	zweite Gap-Phase des Zellzyklus

Abkürzungsverzeichnis

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	Micro
m	Milli
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-Phase	Mitosephase
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	Nonidet P40
N-Terminus	Amino-Terminus
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
p53	Wachstumssuppressorprotein p53
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCA	Prostatakarzinom
PBS	phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	relative light units
rpm	revolutions per minute

Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
Quinalizarin	1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Phase	Synthesephase
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	units
wt	Wildtyp
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1. Zusammenfassung/Summary

1.1 Zelluläre Signaltransduktionswege nach Hemmung der Proteinkinase CK2

CK2 als ubiquitär vorkommende Serin/Threoninkinase ist hochkonserviert und liegt als tetrameres Holoenzym aus 2 katalytischen (α , α') und 2 regulatorischen (β) Untereinheiten vor. CK2 spielt neben anderen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der Apoptose. Im Prostatakarzinom sind die Expression und die Aktivität dieser Proteinkinase stark erhöht. Sie ist zudem an der Vermittlung von androgenen Signalen beteiligt. Die Hemmung der Proteinkinase CK2 ist ein interessanter Ansatz zur Inhibition des Wachstums von Prostatakarzinomzellen und zur Einleitung von Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dieser Ansatz für verschiedene Prostatakarzinomzelllinien und eventuell andere Tumore wie das Melanom gültig ist. Dazu wurden vier Prostatakarzinomzelllinien verglichen, die unterschiedliche Stadien des Karzinoms repräsentieren. Nach Behandlung der Zellen mit dem CK2-Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) wird in den 22Rv1- und LNCaP-Zellen Apoptose eingeleitet und dabei das Tumorsuppressorprotein p53 hochreguliert. In beiden Zelllinien liegt p53 in der Wildtyp-Form vor. Die DU145- und PC-3-Zellen dagegen gehen nicht in Apoptose und in den DU145-Zellen kommt es auch nicht zur Hochregulation von p53, das hier in mutierter Form vorliegt. Die PC-3-Zellen exprimieren kein p53. Das Tumorsuppressorprotein ist aber nicht alleine für die Vermittlung der apoptotischen Signale verantwortlich. Auch die Androgensensitivität ist nicht der Grund dafür, dass die Zellen in Apoptose gehen.

In den hormonsensitiven Prostatakarzinomzellen kommt es über die Aktivierung der Caspase 3 zur PARP-Spaltung. Die Caspase 3 wird wiederum über Caspase 8, DR5 und CHOP aktiviert. In den hormoninsensitiven Prostatakarzinomzellen fehlt die Induktion von CHOP und damit die Einleitung des extrinsischen Signalweges. In den LNCaP-Zellen kommt es möglicherweise durch die Bildung eines AP-1-Komplexes aus c-Jun und ATF3, welcher die Expression von CHOP induziert, zu dessen Expression. In den PC-3-Zellen werden dagegen beide Transkriptionsfaktoren spätestens nach 48 Stunden abgebaut. Eine Caspase 9-Aktivierung bleibt in beiden

1. Zusammenfassung/Summary

Zelllinien aus, wobei die Hitzeschockproteine 90, 70 und 27 dabei weitestgehend von der Regulation des Apoptosoms ausgeschlossen werden können.

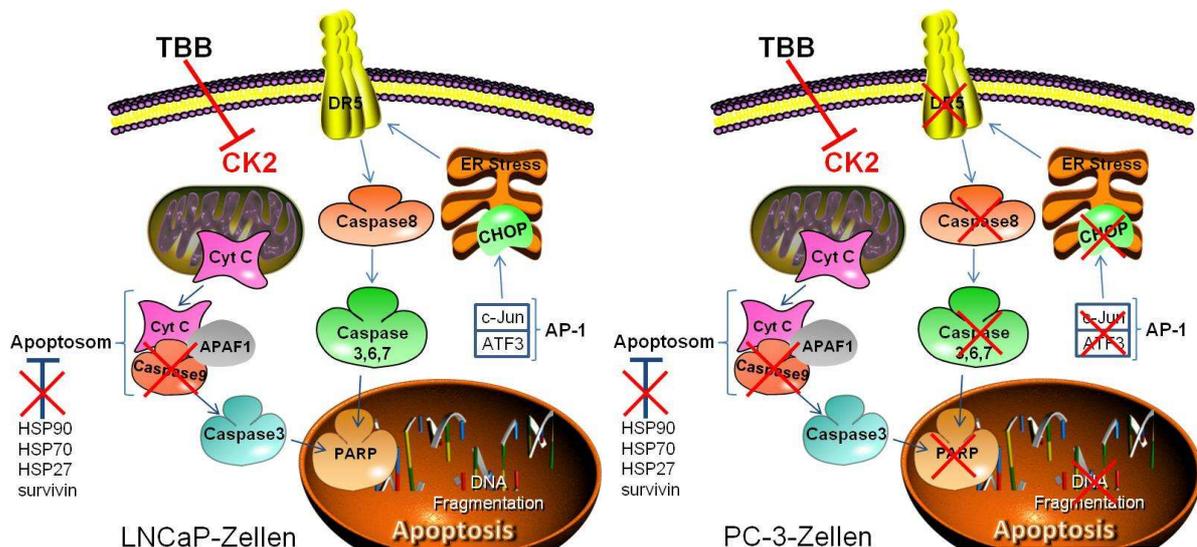


Abb. 1: Darstellung der Signalwege in den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (links) und PC-3 (rechts) nach Hemmung der CK2 durch TBB. Erläuterungen im Text. Darstellungen der Organellen und teilweise der Proteine wurden den pathways auf der Homepage von SA Biosciences/Qiagen (www.sabiosciences.com) entnommen.

In einem zweiten Modellsystem, malignes Melanom der Haut (SK-Mel28) und normale Hautfibroblasten (1BrhTert (mit Telomerase immortalisiert)), konnte durch die Inhibitoren TBB und 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (DMAT) die Kinaseaktivität in beiden Zelllinien reduziert werden. Durch die Hemmung der CK2 gehen die SK-Mel28-Zellen in Apoptose, die 1BrhTert werden nicht in ihrem Wachstum eingeschränkt. Nach CK2-Hemmung kommt es auch in diesem Modell zum Anstieg des Wildtyp-p53-Proteingehalts. Der Einsatz von CK2-Inhibitoren als Tumorthapeutika besteht nicht nur für Prostatakarzinome, sondern auch für andere Tumore. Normale Zellen scheinen dabei nicht geschädigt zu werden, was einen weiteren wichtigen Vorteil darstellt.

Ein neuer Inhibitor Quinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon) wurde ebenfalls auf seine Wirkungen auf Kinaseaktivität und Lebensfähigkeit im Prostatakarzinom getestet, um TBB-spezifische Effekte auszuschließen. Bei Einsatz dieses Inhibitors kommt es konzentrationsabhängig zur Hemmung der CK2 in den Zelllinien LNCaP-

und PC-3. Hierbei werden beide Zelllinien in ihrer Viabilität eingeschränkt, wobei dies in den LNCaP-Zellen durch Apoptose geschieht.

Weiterhin wurden siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten der CK2 eingesetzt, um die mit den Inhibitoren gewonnenen Daten auf eine weitere spezifische Weise zu bestätigen. Dabei konnte bei einer Restproteinmenge von 30% eine Hemmung der Kinaseaktivität nach Herunterregulation der CK2 α -Untereinheit auf 60% festgestellt werden. Nach siRNA-Transfektion gegen die CK2 α' -Untereinheit kam es nicht zu einer Hemmung der Kinaseaktivität. Bei gleichzeitiger Herunterregulation beider Untereinheiten kommt es zur gleichen Hemmung wie bei Transfektion der siRNA gegen CK2 α , so dass CK2 α' offenbar keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität im Prostatakarzinom hat. Weiterhin kommt es zur Herunterregulation der CK2 β -Untereinheit. Aufgrund dieser vielfältigen Effekte wurde auf die Analyse der Apoptosewege verzichtet.

1.2 Cellular signaling pathways after inhibition of protein kinase CK2

CK2 is an ubiquitous and highly conserved serine/threonine kinase. It exists as a tetrameric holoenzyme that consists of two catalytic and two regulatory subunits. CK2 plays an important role in cell proliferation and apoptosis. Its expression and activity is highly up regulated in prostate carcinoma and mediates androgen signaling. Therefore the inhibition of CK2 is an interesting strategy to stop growth of prostate carcinoma cell lines and to induce apoptosis.

The present study tried to verify if this above mentioned approach is transferable to different prostate carcinoma cell lines as well as to other tumors like melanoma. Thus, four different prostate carcinoma cell lines representing different states of the carcinoma were used. After treatment with the CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB), in 22Rv1 and LNCaP cells induction of apoptosis and up regulation of tumor suppressor protein p53 can be observed. Both cell lines possess a wild type p53. DU145 and PC-3 cells do not induce apoptosis and in DU145 cells, which contain a mutated p53, an up regulation of p53 is not detectable. PC-3 cells are negative for p53. The tumor suppressor protein as well as the androgen receptor are not the main cause for apoptosis induction.

In the LNCaP-cells activation of Caspase 3 followed by PARP cleavage can be found. Caspase 3 is activated by caspase 8, DR5 and CHOP. CHOP was not induced in the hormone refractory cells and therefore no induction of the extrinsic pathway succeeded. An AP-1 complex consisting of c-Jun and ATF3 might induce the expression of CHOP. In the PC-3 cells there is a reduction of both transcription factors by 48 hours at the latest. In both cell lines no activation of caspase 9 was found and the heat shock proteins 90, 70 and 27 can be excluded, as far as possible, from participating in the regulation of the apoptosome formation.

In a second model system, malignant skin melanoma (SK-Mel28) and primary immortalized skin fibroblasts (1BrhTert), the CK2 activity was reduced by the inhibitors TBB and 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole (DMAT). Only SK-Mel28 cells induce apoptosis whereas 1BrhTert cells are not affected. Moreover, SK-Mel28 cells show an increase in wt p53 protein level. Thus, there is the possibility to use CK2 inhibitors for tumor therapy not only for prostate carcinoma but also for other tumors. Normal cells do not seem to be affected by CK2 inhibition, which is a huge advantage for a therapeutic agent.

A new inhibitor quinalizarine (1,2,5,8-tetrahydroxyanthrachinone) was tested in prostate carcinoma cell lines to exclude TBB specific effects on kinase activity and cell viability. The CK2 activity was reduced in a dose dependent manner in LNCaP and PC-3 cells leading to loss in cell viability in both cell lines. Only in LNCaP apoptosis seems to be the main event for the loss in cell viability.

Furthermore siRNAs against the catalytic subunits were used to emphasize the results in a more specific way. A down regulation of CK2 α of 70% led to a kinase activity of 60%. Down regulating CK2 α' did not show a decrease in CK2 activity. 60% CK2 residual activity was found when both catalytic subunits were reduced. It seems that CK2 α' has no effect on CK2 activity in prostate carcinoma cell lines. Moreover a decrease in CK2 β was detected. Due to these many different effects the apoptotic signaling was not analyzed.

2. Einleitung

2.1 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2 ist seit 1954 bekannt (1). Als hochkonservierte Serin/Threoninkinase kommt sie ubiquitär vor und phosphoryliert bevorzugt Serin- oder Threoninreste, die sich in saurer Umgebung befinden. Am wichtigsten ist dabei die Aminosäure in Position $n+3$. In 90% aller Substrate der CK2 ist diese Aminosäure eine saure Aminosäure. Die Proteinkinase ist in der Lage, sowohl ATP als auch GTP als Phosphatdonator zu nutzen. In Abbildung 2 ist die Struktur der CK2 dargestellt. Als Holoenzym besteht sie aus zwei katalytischen α -Untereinheiten (α 42 kDa, α' 38 kDa) und zwei die α -Untereinheiten verbindenden regulatorischen β -Untereinheiten (28 kDa). Die α -Untereinheiten unterscheiden sich lediglich in den Sequenzen ihrer C-Termini.

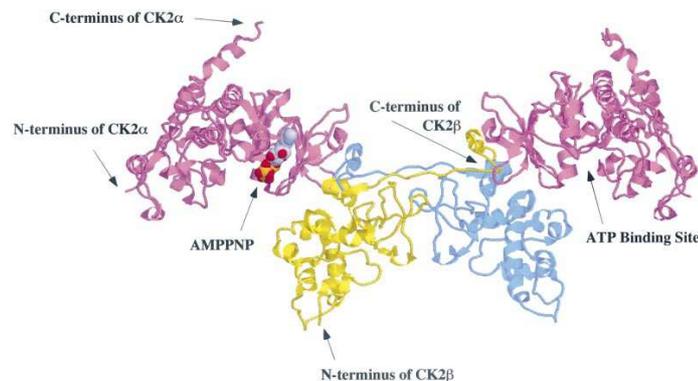


Abb. 2: Strukturdarstellung der Proteinkinase CK2; rot: die katalytischen α -Untereinheiten, blau, gelb: die regulatorischen β -Untereinheiten (2)

Neben dem Holoenzym können die Untereinheiten auch frei in der Zelle vorkommen. Dabei verlieren die α -Untereinheiten ihre katalytische Aktivität nicht. Die konstitutive Aktivität der α -Untereinheiten wird allerdings durch die Assoziation mit der β -Untereinheit substratabhängig moduliert. Wird Phosvitin als Substrat verwendet, erhöht sich die Aktivität (3), wohingegen mit Calmodulin als Substrat die Aktivität verringert wird (4). Eine weitere Aufgabe der β -Untereinheiten ist die Erhöhung der

2. Einleitung

Stabilität (5). Eine Besonderheit der CK2 ist, dass sie nicht von bekannten „second messengern“ abhängig ist, wie das für viele andere Kinasen der Fall ist (6). Für die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 sind mittlerweile einige Bindungspartner gefunden worden. So binden hPrp3p und Tubulin an beide katalytischen Untereinheiten (7,8), Cyclin H an die α -Untereinheit (9), KIF5C an die CK2 α' -Untereinheit (10). Das Tumorsuppressorprotein p53 bindet dagegen an die regulatorische β -Untereinheit (11). Einige Interaktionspartner sind dabei in der Lage die Aktivität der Proteinkinase zu beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist das Tumorsuppressorprotein p53, das durch die Bindung an die β -Untereinheit die Aktivität der Proteinkinase inhibiert (12). Im Jahr 2003 waren es bereits über 300, wobei immer mehr Substrate aus Bereichen wie Transkription, Translation, Zellzyklusregulation und Apoptose gefunden werden (13).

Die Anzahl der Substrate gibt schon einen Anhaltspunkt dafür, wie wichtig und vielfältig die Aufgaben der CK2 sind. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick wie und an welchen Stellen CK2 an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. Sie ist an Signalwegen beteiligt, die durch Stress ausgelöst werden, oder auch an Signalwegen, die das Überleben und das Wachstum von Zellen betreffen. Die CK2 kann dabei positiv wie negativ regulatorisch wirksam werden (14).

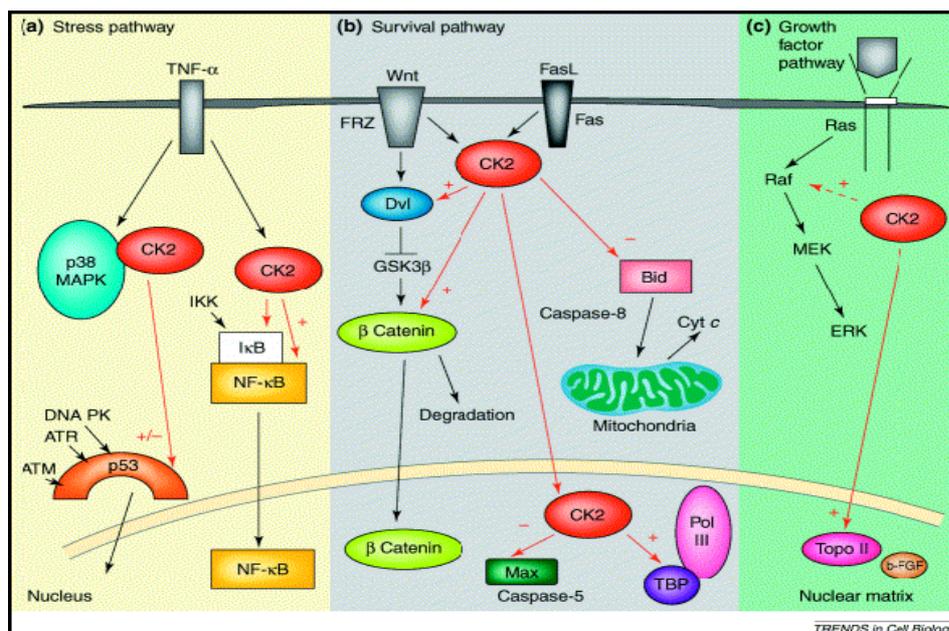


Abb. 3: Beteiligung der CK2 an verschiedenen Signalwegen (14)

Bei der Proliferation spielt CK2 eine besondere Rolle. Das wurde durch „knock-out“-Experimente deutlich. Ausschalten der α -Untereinheiten in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. der α - oder der β -Untereinheit in Mäusen hat letale Folgen (15- 17). Inaktivierung der α' -Untereinheit führt nicht zum Tod, sondern zur Infertilität der männlichen Mäuse (18). Diese Beobachtungen legen nahe, dass CK2 α und CK2 α' trotz ihrer hohen Homologie unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression der CK2 α zu verstärkter Proliferation und Tumorigenese (19,20).

2.2 Bedeutung der Proteinkinase CK2 für das Prostatakarzinom

Krebs ist nach den Koronarerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa und den USA. Dabei ist das Prostatakarzinom (PCA) die häufigste Krebserkrankung beim Mann. Etwa ein Viertel aller neuerkannten Krebsfälle bei Männern betrifft die Prostata. Bei den durch Krebs bedingten Todesfällen liegt das Prostatakarzinom hinter Lungenkrebs auf Platz zwei. Das Prostatakarzinom ist ein hormonabhängiger Krebs, was bedeutet, dass Androgene und der Androgenrezeptor eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Karzinoms spielen, auch wenn die Mechanismen bislang noch nicht vollkommen verstanden sind. Infolgedessen liegt ein therapeutischer Angriffspunkt momentan im Entzug von Hormonen um den Tumor einzudämmen. Der Nachteil der Hormonentzugstherapie liegt allerdings in einem erhöhten Selektionsdruck hin zu hormonunabhängig wachsenden Tumorzellen. Der daraus resultierende Tumor lässt sich wiederum nur noch durch Operation entfernen (21). Die Proteinkinase CK2 ist im Krebsgewebe im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe stark erhöht. Im Fall des Prostatakarzinoms liegen die verstärkte Expression und Aktivität um den Faktor 3-5 höher als im Normalgewebe. Diese Erhöhung kann mit dem Malignitätsgrad (gleason score) des Tumors korreliert werden (20). Eine vermehrte Kernlokalisierung der katalytischen CK2 α -Untereinheit kann nach Ergebnissen von Laramas *et al.* ebenfalls mit dem gleason score korreliert werden und stellt einen prognostischen Marker für das PCA dar (22). Die Hochregulation der CK2 muss auf post-transkriptionaler Ebene stattfinden, weil sich die mRNA-Mengen vom normalen zum Krebsgewebe nicht unterscheiden (20). Die Proteinkinase stimuliert nicht nur direkt die Proliferation, sondern bietet auch einen

2. Einleitung

Schutz gegen Apoptose (20). Guo *et al.* fanden, dass Zellen nach Überexpression von CK2 schlechter in Apoptose gehen als bei normaler Expression der Proteinkinase (23). Darüber hinaus werden verschiedene Proteine durch CK2-vermittelte Phosphorylierung vor apoptotischer Degradation geschützt. Die Inhibition der CK2 könnte so eine Möglichkeit zur Therapie des Prostatakarzinoms darstellen. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass die Inhibition der CK2 durch 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) oder Emodin eine Verminderung der transkriptionellen Aktivität des Androgenrezeptors zur Folge hat. Dies wurde durch Herunterregulation von PSA (prostate specific antigen), einem endogenen Zielgen des Androgenrezeptors, nachgewiesen (24). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Proteinkinase CK2 mit Apigenin zu einem apoptotischen Wachstumsrückgang in hormonsensitiven Prostatakarzinomzellen führt (25). Im Mausmodell fand man ebenfalls, dass die Gabe von Emodin zu vermindertem Wachstum der Prostatakrebszellen führt (26). Von Ahmed *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation der CK2 mittels „antisense“ Oligonukleotiden zu einem Wachstumsrückgang in Prostatakarzinomzelllinien (ALVA-41, PC3-LN4, PC-3) sowie im Xenograftmodell führt (27,28). Dabei ablaufende Signalwege bleiben zum größten Teil offen, es wird beschrieben, dass es zu Cytochrom C-Freisetzung, Caspase 3-Aktivierung und Translokation von NF- κ B sowie Degradation von I κ B kommt (28). Eine Behandlung mit dem CK2-Inhibitor TBB führte zu einer Sensibilisierung von ALVA-41- und PC-3-Zellen auch im Bezug auf eine von dem Liganden TRAIL induzierte Apoptose (29). Diese Sensibilisierung konnte durch Überexpression der CK2 α -Untereinheit auch für die Liganden TNF- α und Fas-L wieder aufgehoben werden (29,30). Bei Untersuchungen bezüglich der Wirkung des CK2-Hemmstoffes TBB in LNCaP- und PC-3-Zellen konnte von Frau Dr. Hessenauer gezeigt werden, dass es durch Apoptose zur Abnahme der Lebensfähigkeit in den LNCaP-Zellen kommt, die PC-3-Zellen dagegen zeigen keinen Rückgang in ihrer Lebensfähigkeit (31). Weiterhin konnte für beide Zelllinien die Einleitung des intrinsischen Signalweges der Apoptose mit der Abnahme des pro-apoptotischen Proteins Bcl2 und der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium gezeigt werden (31). Darüber hinaus kommt es zur Abnahme des „inhibitor of apoptosis“ Proteins survivin (32), und in den LNCaP-Zellen wird das Tumorsuppressorprotein p53 hochreguliert (31). Der komplette Signalweg in den LNCaP-Zellen und die Unterschiede zu den PC-3-Zellen sind bis dato nicht geklärt.

2.3 Inhibition und Inhibitoren der Proteinkinase CK2

Beim Vergleich des CK2-Niveaus in Krebsgeweben und dazugehörigen Normalgeweben wurde deutlich, dass die Proteinkinase in den Krebsgeweben verstärkt exprimiert und die Aktivität entsprechend erhöht ist. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine Hemmung der CK2 ein Ansatz für die Therapie von Tumoren darstellt. Die konstitutive Aktivität der CK2 wird durch die Interaktion des N-terminalen Segments mit dem „activation loop“ aufrecht erhalten (Abb. 4) (33).

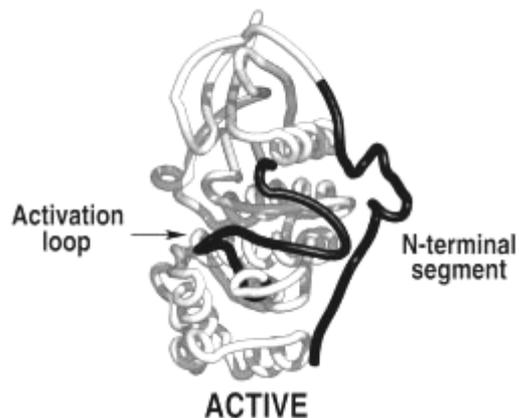


Abb. 4: Struktur der α -Untereinheit der Proteinkinase CK2 (33)

Im Gegensatz zu anderen Kinasen, die durch Signalweiterleitung aktiviert werden, muss die CK2 selbst in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Dazu gibt es mehrere Ansatzpunkte (34):

1. Analoge des Phosphoakzeptors, d.h. des Substrates
2. Analoge des Phosphatdonors
3. Komponenten, die die Interaktion zwischen „activation loop“ und N-terminalem Segment stören
4. Komponenten, die die Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit verhindern
5. Komponenten, die an die N-terminale Domäne der β -Untereinheit binden und so Substratbindung verhindern

2. Einleitung

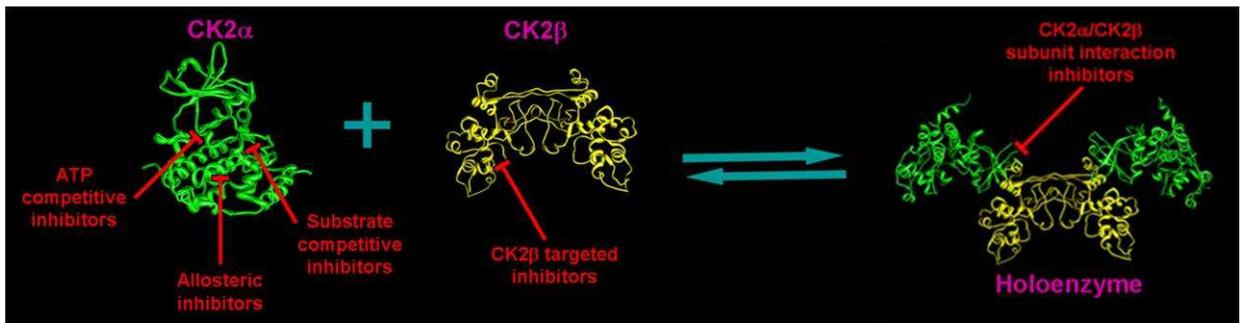
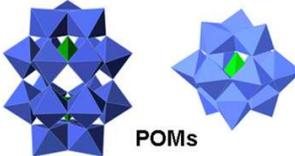
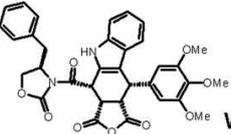


Abb. 5: Angriffspunkte zur CK2-Hemmung, modifiziert nach (34)

Mittlerweile sind Inhibitoren für alle oben aufgeführten Möglichkeiten gefunden worden (Tabelle 1) (34).

Tabelle 1: Beispiele für Inhibitoren, die CK2 auf verschiedene Weise hemmen (34)

Mode of Inhibition	Class of molecule	Examples	References
ATP-competitive inhibitor	Organic molecules	 TBB	Pagano et al., 2004
Allosteric inhibitors	Inorganic molecules	 POMs	Prudent et al., 2008
CK2β-targeted inhibitor	Peptide	GKMNGVLPLAWPSLYLRL P1 Peptide	Martel et al., 2006
CK2α/CK2β subunit interaction inhibitors	Cyclic peptide & Organic molecules	GCRLYGFKIHGCG Pc Peptide  W16	Laudet et al., 2007 Laudet et al., 2008
Substrate-targeted inhibitor	Cyclic peptide	CWMSPRHLGTC P15 Peptide	Perera et al., 2008

Die am besten erforschten und meist verwendeten, kommerziell erhältlichen Inhibitoren sind diejenigen, die kompetitiv mit ATP um die Bindungsstelle im

2. Einleitung

katalytischen Zentrum konkurrieren. Aufgrund der Analogie zu ATP, das viele Kinasen als Phosphatdonator nutzen, ist die Spezifität noch immer ein großes Problem dieser Hemmstoffe. Als einer der ersten synthetischen Inhibitoren wurde DRB (5,6-Dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)-benzimidazol) verwendet (35), durch Weiterentwicklung wurde 2001 TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol) als spezifischer Hemmstoff beschrieben. Die K_i - und IC_{50} -Werte von 0,05 μ M und ca. 1 μ M waren bis dahin die niedrigsten, die für CK2-Inhibitoren beschrieben wurden (36). Weitere Forschungen haben zu DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol) geführt, das mit einem K_i -Wert von 0,05 μ M und einem IC_{50} -Wert von 0,1 μ M noch besser zu sein schien (37). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden aber nur ca. 20 Kinasen (Abb. 6: rot) in Gegenwart der Inhibitoren auf ihre Aktivität hin überprüft. Eine Wiederholung der Kinaseaktivitätstests mit ca. 80 Kinasen (Abb. 6: blau) ließ die Inhibitoren wieder in einem anderen Licht erscheinen. Dabei wurde deutlich, dass DMAT nicht so spezifisch war, wie es schien. Bei TBB waren die Auswirkungen nicht ganz so dramatisch, obgleich auch TBB nicht mehr als 100%-ig spezifischer Inhibitor angesehen werden kann (38). Dennoch ist TBB der Hemmstoff, der die wenigsten getesteten Kinasen in gleichem Maß wie CK2 hemmt und daher Verwendung findet, gerade auch wegen seiner Wirksamkeit in Zellsystemen und wegen der bereits vorhandenen Informationen. In folgender Abbildung (Abb. 6) ist das humane Kinom, die Gesamtheit aller, auch putativen, humanen Kinasen, dargestellt. Bei Betrachtung der großen Anzahl von Kinasen wird klar, dass 80 getestete Kinasen immer noch nur einen Bruchteil darstellen und die Spezifität in Frage gestellt bleiben muss. So geht auch die Suche nach noch spezifischeren Hemmstoffen weiter. 2009 kamen wieder Naturstoffe als CK2-Inhibitoren ins Gespräch: Resorufin, Quinalizarin und Hematein (39- 41). Im Fall des Resorufin wurden etwa 50 Kinasen auf ihre Aktivität hin getestet und im Vergleich mit dem Naturstoff Emodin betrachtet. Hierbei schnitt Resorufin (39) bedeutend besser ab. Hematein ist als nicht ATP-kompetitiver Hemmstoff ziemlich spezifisch, aber noch wenig untersucht. Quinalizarin besitzt einen K_i -Wert von 0,05 μ M und einen IC_{50} -Wert von 0,11 μ M, im Vergleich zu TBB scheint es selektiver gegenüber der CK2 zu sein, allerdings ist auch dieser Hemmstoff noch wenig untersucht (40).

2. Einleitung

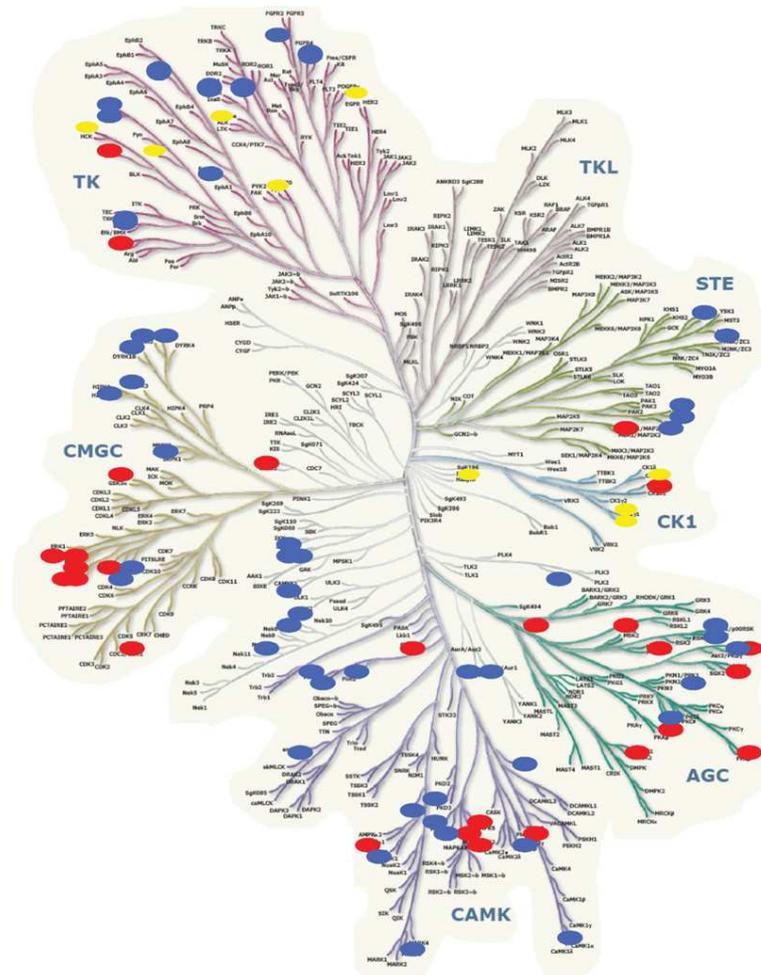


Abb. 6: Das humane Kinom mit Darstellung der Kinasen, die bei Selektivitätsanalysen von CK2-Inhibitoren getestet wurden; blau: 2008 getestet für TBB und DMAT, rot: 2001 getestet für TBB, gelb: nur von Pagano *et al.* getestet 2008 (38)

2.4 Apoptose

Die Zellzahl in einem Organismus muss konstant gehalten werden, daher liegen Mitose, Differenzierung und Apoptose in einem Gleichgewicht vor. Der Organismus macht sich die Apoptose beispielsweise zu Nutze, um die Größe von Organen zu bestimmen oder entartete Zellen wieder zu entsorgen (42). Der Begriff Apoptose wurde von Kerr und Kollegen Anfang der 70er Jahre geprägt. Dabei beschrieben sie morphologische Merkmale, die die Apoptose eindeutig von anderen Formen des Zelltods abgrenzen (43). Apoptose wird von Zellen selbst eingeleitet, nachdem sie bestimmten Stimuli ausgesetzt waren. Solche Stimuli können DNA-Schäden, Stress oder Wachstumsfaktorentzug sein. Bei der Apoptose werden zwei Signalwege unterschieden: der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Der extrinsische

2. Einleitung

Signalweg wird über Rezeptoren vermittelt, wohingegen der intrinsische Signalweg vom Mitochondrium vermittelt wird. Eine Darstellung beider Wege ist in Abb. 7 gegeben.

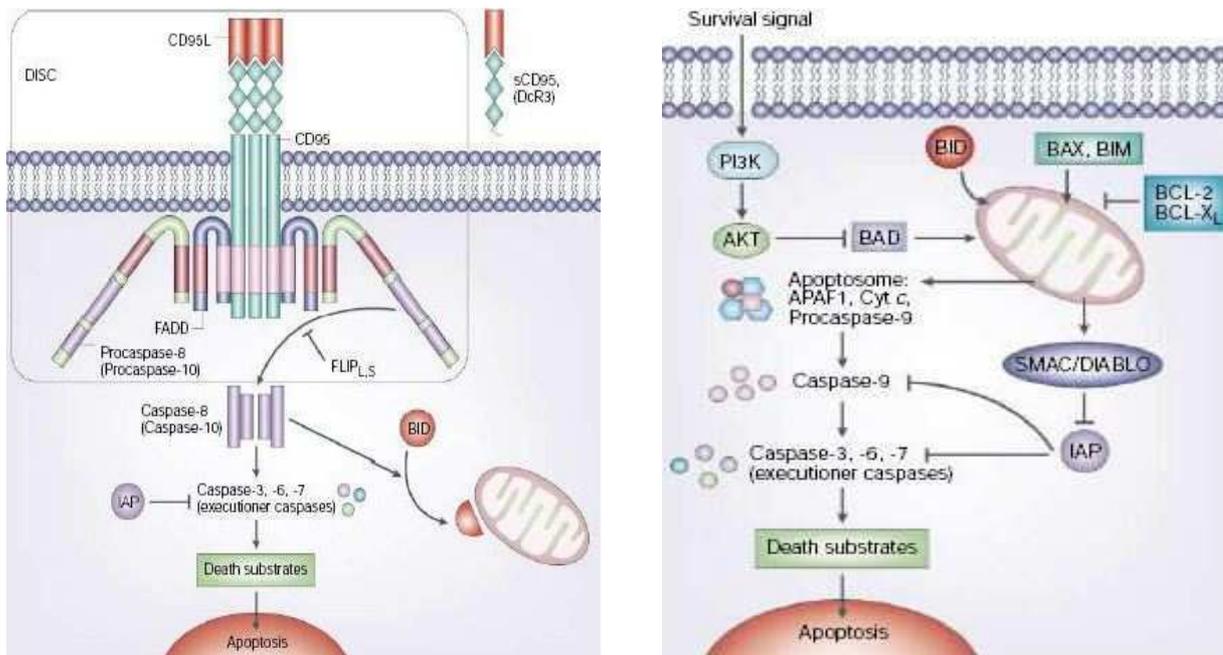


Abb. 7: Verschiedene Wege der Apoptoseinduktion; links: extrinsischer Signalweg, rechts: intrinsischer Signalweg (44)

Beim rezeptorvermittelten, extrinsischen Signalweg, beginnt die Signalkaskade bei einem Todesrezeptor. Todesrezeptoren gehören zur Superfamilie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne, die zur Weiterleitung der Signale wichtig ist (45,46). Hat ein Ligand an den entsprechenden Rezeptor gebunden, rekrutiert dieser intrazellulär das Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein), das seinerseits die Procaspasen 8 und 10 rekrutiert. Dieser Komplex aus Todesrezeptor, FADD und Procaspase wird als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet. Die Procaspasen werden dadurch gespalten und somit aktiviert (47,48). Für den Fall, dass diese Aktivierung nicht ausreicht um die Signalkaskade bis zur Vollendung der Apoptose weiterzuleiten, besteht die Möglichkeit, zusätzliche Signale über das Mitochondrium hervorzurufen (49). Dazu muss Bid (BH3-interacting domain death agonist) von Caspase 8 zu tBid gespalten und aktiviert werden. Das aktive tBid transloziert zum Mitochondrium und

schädigt das mitochondriale Membranpotential. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen apoptotischen Faktoren (50,51). Cytochrom C kann im Cytosol mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Procaspase 9 das Apoptosom bilden. In diesem Komplex kommt es zur Aktivierung der Caspase 9 (52,53). Diese kann nun die Exekutionscaspasen 3, 6, 7 proteolytisch spalten und aktivieren, wodurch diese wiederum ihre Substrate aktivieren können. Caspase 8 ist aber auch selbst in der Lage, die Spaltung und damit einhergehend die Aktivierung der Exekutionscaspasen einzuleiten (54). Beiden Wegen ist also die Aktivierung der Cystein-Aspartat-Proteasen (Caspasen) gemeinsam.

Die Apoptose kann und muss natürlich reguliert werden. Dies kann auf verschiedene Weise geschehen. Eine Möglichkeit zur Regulation der Apoptose liegt in der Bcl2-Familie. Diese Familie hat pro-apoptotisch wirkende Mitglieder und solche, die anti-apoptotisch wirken. Die Bcl2-Familie ist am intrinsischen Signalweg beteiligt. Liegen die pro- und anti-apoptotischen Proteine dieser Familie im Gleichgewicht vor, so ist das mitochondriale Membranpotential intakt. Im Fall der Apoptose verschiebt sich eben dieses Gleichgewicht zu Gunsten der pro-apoptotischen Mitglieder. Eine weitere Möglichkeit, die Apoptose zu regulieren haben die IAPs, die „inhibitor of apoptosis“ Proteine. IAPs sind durch Bindung an die Caspasen dazu in der Lage, deren Aktivierung zu hemmen (55- 57). Im Zuge der Apoptose gibt es allerdings auch Proteine wie SMAC und DIABLO (second mitochondria derived activator of caspase und direct IAP binding protein with low pI), die IAPs binden und die Caspasekaskade dadurch verstärken (58,59).

2.5 Fragestellung der Arbeit

Da die Proteinkinase CK2 an Prozessen beteiligt ist, die die Proliferation und Tumorigenese fördern, liegt nahe, dass die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität ein Mittel darstellt, die Proliferation vor allem von Tumoren zu stoppen und entsprechende Hemmstoffe als Tumorthapeutika einzusetzen. Dies gilt auch für das Prostatakarzinom.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Ergebnisse, die für androgenabhängige LNCaP- und androgenunabhängige PC-3-Zellen nach Hemmung der CK2 durch 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) gewonnen wurden,

2. Einleitung

auf zwei weitere Prostatakarzinomzelllinien übertragen lassen. Dazu sollten die hormonresponsiven Zellen 22Rv1 und die hormoninsensitiven Zellen DU145 mit TBB behandelt werden und auf die Auswirkungen dieses Hemmstoffes auf die CK2-Kinaseaktivität und die Lebensfähigkeit der Zellen hin untersucht werden. Bei den offensichtlichen Unterschieden, die diese Zellen aufweisen, sollte ausgeschlossen werden, dass diese für das unterschiedliche Verhalten im Bezug auf die Hemmung der CK2 verantwortlich sind. Hierzu sollten das Tumorsuppressorprotein p53 sowie der Androgenrezeptor betrachtet werden.

Des Weiteren war die Frage zu klären, welche apoptotischen Signalwege in den LNCaP- und PC-3-Zellen nach TBB-Behandlung ablaufen und welche Unterschiede sich dabei von den hormonabhängigen zu den –unabhängigen Zellen ergeben.

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die mögliche therapeutische Nutzung von CK2-Inhibitoren ist die Beeinflussung von normalen Zellen durch die CK2-Hemmung, sowie die Übertragbarkeit auf andere Tumore außer dem Prostatakarzinom. So wurde die Frage aufgeworfen, welche Auswirkungen die Hemmung der CK2 in einem Modellsystem aus malignem Melanom der Haut sowie primären immortalisierten Hautfibroblasten hinsichtlich der Kinaseaktivität, der Viabilität und des Proteingehalts des Tumorsuppressorproteins p53 hat.

Um TBB-spezifische Effekte auf das Prostatakarzinom ausschließen zu können, wurde ein weiterer spezifischer Hemmstoff 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon (Quinalizarin) auf die Hemmwirkung und den Einfluss auf die Lebensfähigkeit von LNCaP- und PC-3-Zellen getestet. Des Weiteren kamen siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten der CK2 zum Einsatz, um etwaige unspezifische Effekte der ATP-kompetitiven Inhibitoren auszuschließen.

3. Materialien und Chemikalien

3.1 Materialien und Geräte

15 ml/50 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten polysorp, weiß	Nunc, Wiesbaden
24-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
6-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Kulturschalen 94 mm/60 mm	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer Mighty Small™ SE250	Serva (Hoefler), Heidelberg
„ELISA-Reader“: Model 3550-UV Microplate Reader	BioRad, München
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma, München
Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
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
Universal Hood II	BioRad, München

UV-Vis-Spektralphotometer Ultrospec III

Pharmacia, Freiburg

3.2 Chemikalien und Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Acrylamid-Stammlösung: rotiphorese® Gel30

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Agar-Agar

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Caspase Glo®-Assays

Promega GmbH, Mannheim

cell culture lysis reagent 5x

Promega GmbH, Mannheim

complete™, Proteaseinhibitor cocktail

Roche, Mannheim

DMAT

Calbiochem® Merck Biosciences
GmbH, Schwalbach

DMSO

Fluka, Neu-Ulm

EDTA

Sigma, München

Effectene® Transfection Reagent

Qiagen GmbH, Hilden

FCS

GIBCO BRL, life technologies

Glycerin

Fluka, Neu-Ulm

Glycin

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

HiPerFect® Transfection Reagent

Qiagen GmbH, Hilden

LB-Medium (Luria/Miller)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Luciferase Assay System

Promega GmbH, Mannheim

Lumi-light-Detektionslösung

Roche, Mannheim

MTT

Sigma, München

Penicillin/Streptomycin

Biochrom KG, Berlin

o-Phosphorsäure

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Prestained SDS-Molekulargewichtsstandard

Fermentas GmbH, St.Leon-Rot

Proteinassay-Kit

BioRad, München

3. Materialien und Chemikalien

Quinalizarin	Labotest.OHG, Niederschöna
TBB	Calbiochem® Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
TEMED	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
TritonX-100	Fluka, Neu-Ulm
Tween20	Fluka, Neu-Ulm

Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig); Lösung A

30% (w/v)	Acrylamid
0.8% (w/v)	Bisacrylamid

Elektrophoresepuffer

25 mM	Tris-HCl, pH 8.8
0.2 M	Glycin
0.1% (w/v)	SDS

Gellösungen

Lösung B

1.5 M	Tris-HCl, pH 8.8
14 mM	SDS

Lösung C

495 mM	Tris-HCl, pH 6.8
14 mM	SDS

3. Materialien und Chemikalien

Kinasepuffer für CK2-Kinaseassay

50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
100 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

LB-Agar

2% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium

LB-Medium

25 g/l LB-Medium in H₂O; pH 7.4

Lysepuffer für Caspaseassay

10 mM	Tris-HCl, pH 7.4
10 mM	MgCl ₂
150 mM	NaCl
0.5% (v/v)	NP-40
1x	complete®
10 mM	DTT

100x Mg-Lösung für β -Galactosidaseassay

0.1 M	MgCl ₂
4.5 M	β -Mercaptoethanol

3. Materialien und Chemikalien

MTT-Lösung

5 mg/ml MTT in PBS

Natriumphosphatpuffer für β -Galactosidaseassay

41 ml 0.2 M Na_2HPO_4

9 ml 0.2 M NaH_2PO_4

ad 100 ml H_2O ; pH 7.5

ONPG-Lösung für β -Galactosidaseassay

4 mg/ml ONPG in Natriumphosphatpuffer für β -Galactosidaseassay

PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8 mM Na_2HPO_4

1.5 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4

Proteinpuffer für Caspaseassay

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

10 mM KCl

5% (v/v) Glycerin

3. Materialien und Chemikalien

RIPA-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
0.5% (w/v)	Natriumdeoxycholat
1% (v/v)	TritonX-100
0.1% (w/v)	SDS

SDS-Probenpuffer 2x

4% (w/v)	SDS
130 mM	Tris-HCl, pH 6.8
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
20% (v/v)	Glycerin
0.02% (w/v)	Bromphenolblau

Solubilisierungslösung für MTT-Assay

10% (w/v)	SDS
99.4% (v/v)	DMSO
0.6% (v/v)	CH ₃ COOH

Transferpuffer

20 mM	Tris-HCl, pH 8.3
150 mM	Glycin

Trypsin/EDTA-Lösung

0.25% (w/v) Trypsin

0.1% (w/v) EDTA

in PBS, pH 7.1

Waschpuffer für Westernblot

0.1% (v/v) Tween20

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

3.3 Verwendete Plasmide

pcDNA3.1/Hygro/lacZ: Reporterkonstrukt der Firma Invitrogen GmbH (Darmstadt), das unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promoters für β -Galactosidase (lacZ) codiert.

pBR322pl-LUC-pig3prom: Luciferasereporterkonstrukt, das den Pig3-Promoter von -5602 bis +537 enthält (60). Dieses Plasmid wurde freundlicher Weise von B. Vogelstein zur Verfügung gestellt.

pGL3-DR5p: Luciferasereporterkonstrukt, das den DR5-Promoter ab Basenpaar -1523 enthält (61). Diese Plasmid wurde freundlicher Weise von H.-G. Wang zur Verfügung gestellt.

3.4 Verwendete siRNAs

Alle verwendeten siRNAs wurden über die Firma Qiagen bezogen. Die Targetsequenzen sind im Folgenden angegeben.

p53 Targetsequenz: AAG GAA ATT TGC GTG TGG AGT (SI02655170)

CK2 α Targetsequenz: TCC ATT GAA GCT GAA ATG GTA (SI02660497)

CK2 α' Targetsequenz: CAG GAG TAC AAT GTT CGT GTA (SI00605409)

Kontroll-siRNA: AllStars Negative Fluorescein

3.5 Verwendete Antikörper

ATF3

ATF3 wird mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Kaninchenantikörper C-19 von Santa Cruz nachgewiesen. Dieser Antikörper war ein freundliche Gabe von der AG Prof. Dr. G. Thiel.

α -Tubulin-Antikörper

Zum Nachweis von α -Tubulin wird der monoklonale Mausantikörper DM 1A von Sigma verwendet.

Caspase 3

Der monoklonale Kaninchenantikörper 8G10 von Cell Signaling Technology ist in der Lage, das Vollängenprotein der Caspase 3 zu detektieren, sowie die 17 bzw. 19 kDa großen Spaltprodukte. Der Antikörper wurde gegen eine Aminosäuresequenz angrenzend an die Spaltstelle Asp175 hergestellt.

Caspase 9

Caspase 9 sowie die 37/35 kDa großen Spaltprodukt werden mit dem monoklonalen Mausantikörper 10-1-87 von assay designs nachgewiesen. Der Antikörper wurde gegen das rekombinante humane Vollängenprotein hergestellt.

CHOP/GADD153

Zum Nachweis von CHOP/GADD 153 wird der monoklonale Mausantikörper B-3 von Santa Cruz verwendet. Dieser Antikörper ist gegen das Mausvollängenprotein gerichtet.

c-Jun

Der affinitätsgereinigte polyklonale Kaninchenantikörper H-79 von Santa Cruz wird zum Nachweis von c-Jun verwendet. Das Epitop, das dieser Antikörper erkennt, liegt zwischen den Aminosäuren 1-79 im N-Terminus des humanen c-Jun. Dieser Antikörper wurde freundlicher Weise ebenfalls von der AG Prof. Dr. G. Thiel zur Verfügung gestellt.

FLAG-Antikörper

Um Fusionsproteine mit FLAG-tag nachzuweisen, wird der monoklonale Mausantikörper M2 der Firma Sigma verwendet.

GAPDH-Antikörper

Zur Detektion der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase wird der polyklonale Kaninchenantikörper FL-335 der Firma Santa Cruz benutzt, der die Aminosäuren 1-335 erkennt.

HSP27

Das Hitzeschockprotein 27 wird mit dem monoklonalen Mausantikörper G3.1 von assay designs detektiert. Dieser Antikörper wurde gegen das native humane HSP27-Protein hergestellt.

HSP70

Das Hitzeschockprotein 70 wird mit dem monoklonalen Mausantikörper 2A4 von Acris Antibodies GmbH nachgewiesen. Der Antikörper erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 437-479.

HSP90

Das Hitzeschockprotein 90 wird mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper H-114 detektiert. Dieser Antikörper von Santa Cruz wurde gegen die Aminosäuren 610-723 der β -Untereinheit des Proteins hergestellt. Der Antikörper ist in der Lage, sowohl α als auch β zu erkennen.

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) (62,63).

p53-Serum

Das Kaninchenserum zur Detektion von p53 wurde gegen das Vollängenprotein hergestellt.

PARP-Antikörper

Zur Detektion von Poly(ADP-ribose)-Polymerase, und entsprechender Spaltprodukte, wird der polyklonale Kaninchenantikörper der Firma Cell Signaling Technology® verwendet.

Seren gegen CK2

Es werden gegen die Untereinheiten der CK2 gerichtete, spezifische, polyklonale Kaninchenserum verwendet. Serum #212 (entspricht #26) erkennt die α -Untereinheit der CK2, Serum #30 die α' -Untereinheit und Serum #269 (entspricht #32) 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 (8). Ein weiteres polyklonales Kaninchenserum gegen die β -Untereinheit wurde gegen das Vollängenprotein hergestellt.

Sekundärantikörper

Für die Westernblot-Analysen wird ein Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Myerrettich-Peroxidase-Antikörper bzw. ein Ziege-anti-Maus-Ig-Myerrettich-Peroxidase-Antikörper, beide von Dianova (Hamburg) verwendet. Die Konjugate besitzen eine Konzentration von 0.8 mg/ml. Sie werden in den Verdünnungen 1:30000 bzw. 1:10000 eingesetzt.

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.1.1 Zelllinien

PC-3

Die Zelllinie PC-3 (ATCC-Nummer: CRL-1435) wurde 1976 aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms gewonnen. Es handelt sich dabei um eine androgeninsensitive Form des Prostatakarzinoms (64). Die verwendeten PC-3-Zellen exprimieren kein p53 Protein und darüber hinaus auch keinen Androgenrezeptor (65,66).

DU145

Die Zelllinie DU145 (ATCC-Nummer: HTB-81) entstammt einer intrazerebralen Metastase eines Prostatakarzinoms epithelialen Ursprungs (Adenokarzinom) (67). Es handelt sich dabei um eine androgeninsensitive Form des Prostatakarzinoms. DU145 exprimieren ein mutiertes p53 (P223L und V274F), aber ebenfalls keinen Androgenrezeptor (66).

LNCaP

Die LNCaP-Linie (ATCC-Nummer: CRL-1740) stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms. Diese Zellen sind im Gegensatz zu PC-3 hormonsensitiv (68) und repräsentieren damit ein weniger malignes Stadium des Karzinoms als die PC-3-Zellen. Diese Zellen exprimieren einen Androgenrezeptor mit der Mutation T877A.

22Rv1

Die Zelllinie 22Rv1 (ATCC-Nummer: CRL-2505) ist eine humane epitheliale Prostatakarzinomzelllinie, die aus einem Xenograft aus Mäusen gewonnen wurde und als hormonsensitiv beschrieben wird (69). Im p53 Gen liegt hier eine

heterozygote Mutation CAG→CGG vor, so dass p53 in dieser Zelllinie als wt p53 angesehen wird (66). Der Androgenrezeptor wird in zwei Formen exprimiert. Eine 114 kDa große Form entsteht durch Verdopplung des Exons 3 und kleinere 75-80 kDa große Formen entstehen durch Deletionen des C-Terminus (70).

HeLa S3

HeLa S3-Zellen (ATCC-Nummer: CCL-2.2) sind menschliche Epithelzellen, die einem Zervixkarzinom entstammen.

HCT 116 p53 wt

HCT 116 (ATCC-Nummer: CCL-247) p53 wt-Zellen sind epitheliale Zellen, die aus einem Colonkarzinom stammen. Sie wurden in der Arbeitsgruppe von B. Vogelstein in verschiedenen Varianten hergestellt (71).

SK-Mel28

Die Zelllinie SK-Mel28 (ATCC-Nummer: HTB-72) ist eine humane Zelllinie eines malignen Melanoms der Haut.

1BrhTert

Es handelt sich um humane, primäre mit Telomerase immortalisierte Hautfibroblasten, die freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Prof. Löbrich zur Verfügung gestellt wurden.

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.

LNCaP, 22Rv1, DU145 und SK-Mel28 werden in RPMI 1640 (PAA) mit 10% FCS (foetales Kälberserum) ohne den Indikator Phenolrot gehalten, weil dieser Indikator eine Androgen ähnliche Wirkung auf die hormonsensitiven Zelllinien haben könnte.

PC-3-Zellen werden in DMEM (GIBCO) mit 10% FCS und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert.

HeLa werden in DMEM (Sigma-Aldrich) mit 10% FCS und 1% L-Glutamin gehalten.

HCT 116 p53 wt-Zellen werden in McCoy's 5A-Medium (PromoCell) gehalten, dem ebenfalls 10% foetales Kälberserum zugesetzt wird.

1BrhTert werden in MEM (PAA) mit 20% FCS kultiviert.

4.1.3 Passagieren der Zellen

Das Medium über den Zellen wird abgesaugt und die Zellen mit 1-2 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 wieder in den Brutschrank gestellt. In der Zwischenzeit werden die Schalen, in die die Zellen ausgesät werden sollen, mit etwa 5 ml Medium gefüllt. In die vorbereiteten Schalen werden dann die abtrypsinieren Zellen, die zunächst in Medium suspendiert wurden, ausgesät.

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 abgelöst, in Medium aufgenommen und für 7 Minuten 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 und sie danach durch langsame, tropfenweise Zugabe des 10-fachen Volumens an Zellkulturmedium verdünnt. Die Zellen werden 5 Minuten bei 4°C und 250xg abzentrifugiert, das Sediment in frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS resuspendiert und in eine Kulturschale überführt.

4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen

Bei auftretenden Kontaminationen werden die Zellen wie folgt behandelt, bis die Kontamination beseitigt ist. 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 Minuten bei 4°C und 250xg zentrifugiert. 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.

4.1.7 TBB-, DMAT- und Quinalizarin-Behandlung

4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB; Calbiochem), 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (DMAT; Calbiochem) bzw. 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon (Quinalizarin; Labotest.OHG) werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) als 10 mM Stocklösungen steril gelöst. Die Zellen werden dann ausgehend von dieser Stammlösung mit den Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen behandelt, indem die Lösung zum Medium pipettiert wird. Die Zellen werden mindestens einen Tag vor der Behandlung ausgesät, damit sie sich absetzen und anwachsen können. Als Kontrolle dienen Zellen, die entsprechend mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt werden.

4.1.8 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Die Zellen werden abtrypsiniert und in Medium aufgenommen. Die Suspension wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 20 µl entnommen. In einem Eppendorfgesäß wird die Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt die toten Zellen in der Suspension an. Die Kammern der Neubauer Kammer werden mit 6 µl der Suspension gefüllt und die 4 äußeren Großquadrate des Rasters ausgezählt. Anschließend wird die Abweichung der Summen der beiden Kammern bestimmt. Wenn die Abweichung weniger als 15% beträgt, 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 ml besitzt.

4.1.9 Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen

Die Messung des Anteils metabolisch aktiver Zellen erfolgt mittels MTT-Assay. Dieses Verfahren beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen, Tetrazoliumsalze in Formazane umzusetzen. In diesem Fall wird das gelbe 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch metabolisch aktive Zellen unter Beteiligung von NADH und NADPH zu violetter Formazan reduziert. Diese Reaktion ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Reduktion erfolgt durch die Succinat-Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen unabhängig vom Zellzyklus. Die Reaktion ist somit ein Maß für die Vitalität einer Zellprobe. Die entstehenden Formazankristalle werden mit Solubilisierungslösung gelöst und die farbige Lösung im „ELISA-Reader“ (BioRad) vermessen.

Eine größere Anzahl lebender Zellen entspricht einer höheren metabolischen Aktivität. Ein Anstieg in der gemessenen Absorption korreliert daher mit den durch lebende Zellen gebildeten Formazankristallen.

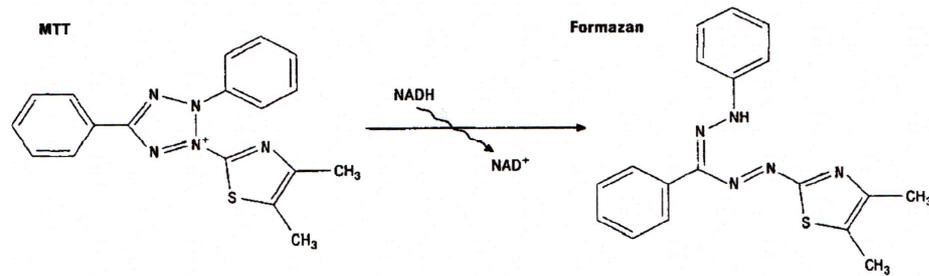


Abb. 8: Reduktion von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan durch die Succinat-Dehydrogenase (Roche molecular biochemicals: Apoptosis and cell proliferation, 2nd edition)

Die Zellen werden in entsprechender Anzahl ($1-2 \times 10^4/500 \mu\text{l}$) in $500 \mu\text{l}$ Medium in 24-Loch-Platten ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Danach erfolgt die Behandlung der Zellen und nach entsprechender Inkubationszeit werden $50 \mu\text{l}$ MTT-Lösung (5 mg/ml) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde im Brutschrank bei 37°C werden $500 \mu\text{l}$ Solubilisierungslösung zugegeben und die Zellen so lysiert. Jeweils 2 mal $200 \mu\text{l}$ werden in eine 96-Loch-Platte überführt, um die Extinktion bei 595 nm (Referenz: 650 nm) im „ELISA-Reader“ zu bestimmen. Zur Auswertung wird die Extinktion der Lösungsmittelkontrolle als 100% lebende Zellen gesetzt.

4.1.10 Transfektion von Zellen mit Plasmiden

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Es gibt chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden. Hier erfolgt die Transfektion der Zellen mit dem Effectene® Transfection Reagent von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Da Effectene® ein Lipid ist, handelt es sich 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 (72). Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen in entsprechender Anzahl ($2 \times 10^5/\text{Kavität}$ in 6-Loch-Platten) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Transfektion von Zellen in einem Ansatz einer 6-Loch-Platte wird $1 \mu\text{g}$ DNA in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ DNA-Kondensationspuffer EC aufgenommen, $3.2 \mu\text{l}$ Enhancer-Lösung zugegeben und kurz gemischt. Nach einer Inkubation von 5

Minuten bei Raumtemperatur werden 10 µl Effectene® Transfektionsreagenz zugegeben, erneut gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Während dessen wird ein Mediumwechsel vorgenommen (1.6 ml/Kavität). Nach erfolgter Inkubation werden 600 µl Medium zu jedem Transfektionsansatz gegeben, den man dann auf die Zellen gibt. Zur gleichmäßigen Verteilung der Komplexe werden die Platten kurz geschwenkt und zurück in den Brutschrank gestellt.

4.1.11 Transfektion von Zellen mit siRNA

Zur Transfektion von siRNA wird das Transfektionsreagenz HiPerFect® der Firma Qiagen nach deren Benutzerhandbuch verwendet. Für die Transfektion von siRNA gegen p53 werden 10-30 nM und für siRNA gegen α und α' werden 10-50 nM verwendet. Die LNCaP-Zellen werden in entsprechender Dichte (2×10^5 /Kavität in 6-Loch-Platten) ausgesät. Nachdem siRNA und 24 µl HiPerFect® gut gemischt und zehn Minuten bei RT inkubiert worden sind, gibt man die gebildeten Transfektionskomplexe unter Schwenken tropfenweise auf die Zellen, die dann für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert werden.

4.1.12 Ernten von Zellen

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen unter Zugabe von kaltem PBS (pH 7.4) mit einem Schaber geerntet. Die Zellsuspension wird in ein Röhrchen auf Eis überführt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 7 Minuten 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.

4.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

4.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen werden wie beschrieben geerntet und sedimentiert (4.1.12). Alle Schritte werden unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wird anschließend in etwa dem doppelten Volumen an RIPA-Puffer mit zugesetztem Proteaseinhibitor (complete™ 1:25) resuspendiert. Danach erfolgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis, dann wird die Zellsuspension 3 mal 1 Minute im Eisbad sonifiziert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 16000×g und 4°C wird mit dem erhaltenen Überstand eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Lagerung der Extrakte erfolgt kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C.

4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts 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 wird der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 verwendet. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm. Die Stabilisierung des Farbstoffs durch die Komplexbildung mit dem Protein ist vermutlich der Grund für diese Verschiebung.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wird das Proteinassay Kit von BioRad verwendet. Zu 800 µl A. dest. und 200 µl Bradfordreagenz wird 1 µl des Zellextraktes gegeben und nach 10 Minuten Inkubation die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert aus A. dest. und Bradfordreagenz gemessen. Der Proteingehalt ergibt sich mit Hilfe einer Rinder-IgG-Eichgeraden in µg/µl.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte erfolgt elektrophoretisch über ein SDS-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

4. Methoden

Lösung Radikale stabilisiert. 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-Polyacrylamidgelelektrophorese angewendet. Dazu werden zwei Gele unterschiedlicher Dichte übereinander gegossen: ein engporiges Trenngel und ein weitporiges Sammelgel.

Die Gele werden in einem vertikalen Gießstand hergestellt, in dem 4 bis 5 Gele gleichzeitig gegossen werden können. Das Zubehör wird vor der Benutzung gereinigt und mit Ethanol entfettet. Die Kammer wird zusammengebaut und das Trenngel nach dem angegebenen Pipettierschema (Tabelle 2) hergestellt. Die Lösung wird in die Gelkammer gegossen, bis diese zu etwa $\frac{3}{4}$ gefüllt ist. Entstandene Luftblasen werden durch Aufklopfen des Gießstandes entfernt und die Oberfläche der Gellösung mit Isopropanol überschichtet. Die Kämme werden als Abstandshalter eingesteckt und die Gele auspolymerisieren gelassen. Anschließend wird das Sammelgel (Tabelle 2) hergestellt und eingefüllt, danach werden die Kämme eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels werden die Gele getrennt und können verwendet oder feucht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verschiedenen Polyacrylamidgele mit Mengenangaben für 4-5 Gele

Lösung A: Acrylamid-Stammlösung: 30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) Bisacrylamid

Lösung B: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 14 mM SDS

Lösung C: 495 mM Tris-HCl, pH 6.8, 14 mM SDS

Trenngel [%]	7.5	10	12.5	15	20	Sammelgel [%]	4.3
Lösung A [ml]	9	12	15	18	24	Lösung A [ml]	2.2
Lösung B [ml]	9	9	9	9	9	Lösung C [ml]	3.8
Wasser [ml]	18	15	12	9	3	Wasser [ml]	9
APS [μ l]	200	200	200	200	200	APS [μ l]	100
TEMED [μ l]	20	20	20	20	20	TEMED [μ l]	40

Zur Probenvorbereitung entnimmt man dem Gesamtzelleextrakt ein Volumen, das einer bestimmten Proteinmenge entspricht. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Durch den Überschuss an SDS und die

Temperatur von 95°C werden die Tertiär- und die Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe von β -Mercaptoethanol aufgespalten. Zusätzlich erhält man eine negative Ladung an den Polypeptidketten.

Danach kann man die Proben in die Geltaschen füllen und bei 25 mA in Elektrophoresepuffer auftrennen. Als Größenmarker dient der vorgefärbte Molekulargewichtsstandard „Prestained Molecular Weight Marker“ (Fermentas), da die Proteine im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Der Marker 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).

4.2.4 Westernblot

Bei einem Westernblot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Die Haftung der Proteine an die Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen. Es wird eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran verwendet. Zum Transfer wird ein vertikaler Puffertank benutzt, in dem sich an den Seitenwänden Elektroden befinden, die das Feld erzeugen. Der Tank wird mit Transferpuffer gefüllt und die „Sandwiches“, bestehend aus Gel und Membran zwischen Filterpapieren, Schwämmen und zwei Gitterplatten, in den Tank geschoben. Der Transfer erfolgt bei 120 mA über Nacht.

4.2.5 Immunfärbung der Proteine

Die Proteine werden indirekt immunologisch detektiert. Es werden entsprechende Primärantikörper verwendet und ein Peroxidase-Konjugat als Sekundärantikörper. Mit der Peroxidase „Lumi-Light“ (Roche) als Substrat erfolgt dann der chemilumineszente Nachweis der geblotteten Proteine.

Zur Detektion der Proteine wird die Membran nach Beendigung des Blots für 1 h in einem Blockpuffer aus PBS (pH 7.4) mit 0.1% Tween20 und 5% Trockenmilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach wird für 1 h mit

dem Primärantikörper in PBS (pH 7.4) mit 0.1% Tween20 und 1% Trockenmilchpulver inkubiert. Nach dem Waschen (2 mal 10 Minuten) mit PBS (pH 7.4), 0.1% Tween20, 1% Trockenmilchpulver wird mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Danach wird 2 mal 10 Minuten mit PBS (pH 7.4), 0.1% Tween20 gewaschen. Zur Inkubation mit den Primärantikörpern wird die Konzentration dem Datenblatt des Herstellers entnommen. Die Sekundärantikörper gegen Kaninchen und Maus bzw. Ziege werden in einer Verdünnung von 1:30000 bzw. 1:10000 eingesetzt. Die Detektion mit „Lumi-Light“ kann jetzt durchgeführt werden. Bei Bedarf werden die Membranen kurz in Methanol geschwenkt, getrocknet und zwischen Filterpapieren bei 4°C gelagert. Bei erneuter Verwendung werden die Membranen in Methanol geschwenkt und können dann wie oben beschrieben nochmals inkubiert werden.

4.3 Nukleinsäuretechniken

4.3.1 Transformation von *E. coli*

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in Bakterien. Diese Technik dient dazu, Plasmide zu vermehren. Zur Transformation gibt es verschiedene Möglichkeiten; hier wird eine Hitzeschock-Transformation durchgeführt. Dazu werden 500 µl einer Bakteriensuspension mit 1 µg Plasmid gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C vorgenommen und die Suspension sofort wieder auf Eis abgekühlt. Diesem Ansatz werden 800 µl LB-Medium zugefügt und bei 37°C und 1400 rpm für 1 h inkubiert. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Die Zellen werden in dem Mediumrest resuspendiert, auf eine Selektionsplatte aufgebracht und mit einem Drigalsky-Spatel verteilt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und können am nächsten Tag weiterverwendet oder gelagert werden.

4.3.2 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 Zellen zu einer Denaturierung der DNA. Durch anschließende Neutralisation wird die Plasmid-DNA renaturiert, während die chromosomale DNA einzelsträngig bleibt, ausfällt und mit den Zelltrümmern abzentrifugiert werden kann. Die Plasmid-DNA wird durch Fällung mit Isopropanol aus dem Überstand gewonnen.

Um die Plasmid-DNA isolieren zu können, muss sie erst propagiert werden. Dazu wird ein Klon von einer Selektionsplatte in 100 ml LB-Medium überimpft, das zuvor mit einem Selektionsantibiotikum versetzt wird. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag werden die Bakterien bei 4°C, 5300×g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase) resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Zu dieser Suspension werden 4 ml Puffer S2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 4 ml Puffer S3 (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) zugegeben, die Suspension wird wieder vorsichtig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension filtriert, um genomische DNA und Zelltrümmer abzutrennen. Das Filtrat wird auf eine NUCLEOBOND-Säule gegeben, die zuvor mit Puffer N2 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, 0.15% TritonX-100, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) equilibriert wird. Nach zweimaligem Waschen mit 2.5 ml Puffer N3 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1.15 M KCl, pH 6.3 mit H₃PO₄ eingestellt) wird die Plasmid-DNA mit Puffer N5 (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8.5 mit H₃PO₄ eingestellt) in ein silanisiertes Corexröhrchen eluiert. Durch Zugabe von 3.6 ml Isopropanol wird die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation bei 4°C, 99 00×g für 30 Minuten abgetrennt. Die gefällte DNA kann dann an der Luft getrocknet und in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen werden.

4.3.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration, nutzt man die Eigenschaft aus, dass die Basen der DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm haben. Man misst die Absorptionen bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer. Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, daher kann man aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA bestimmen. Der Quotient sollte etwa 1.8 ergeben. Die DNA-Konzentration ergibt sich aus der Beziehung $1 A_{260}=50 \mu\text{g/ml DNA}$.

4.4 Sonstige Methoden

4.4.1 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 (73). Die Menge des eingebauten Phosphats wird über die Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt.

Dem Gesamtzellextrakt wird ein Aliquot entnommen, das 50 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 benötigten Komponenten bereitgestellt. Die Endkonzentrationen im 50 μl Testansatz betragen: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 50 μM ATP, 0.19 mM synthetisches Substratpeptid. Danach werden 10-20 μCi [^{32}P]- γ -ATP pro 0.5 ml dem CK2-Mix zupipettiert. Nach Zugabe des CK2-Reaktionsmix zu den Proben werden diese für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Von jeder Probe werden 40 μl auf ein Whatman P81 Filterpapier pipettiert. Durch die Argininreste kann das Substratpeptid an das Kationenaustauscherfilterpapier gebunden werden und überschüssiges, nicht gebundenes [^{32}P]- γ -ATP kann durch Waschen entfernt werden. Dazu werden die Filter in 85 mM Phosphorsäure gegeben, bevor sie getrocknet sind, und darin 3 mal für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wird einmal mit Ethanol gewaschen und die Filter zum Trocknen ausgelegt. Die trockenen Filter werden in Szintillationsgefäße überführt und in einem Szintillationszähler ausgewertet.

4.4.2 Reporterassay

Das Reporterassay gibt Aufschluss über die Promotoraktivität der zu untersuchenden Gene. Hierzu werden Vektoren verwendet, die hinter dem interessierenden Promotor ein sog. Reporter gen enthalten. Als Reportergene werden z. B. GFP, β -Galactosidase oder Luciferase verwendet, die bei Aktivierung ein leicht zu

4. Methoden

messendes, optisches Signal erzeugen. Die Firefly-Luciferase (61 kDa) katalysiert die Monooxygenierung des Substrates Beetle-Luciferin. Beetle-Luciferin ist ein stabiles Molekül, das in Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) vorkommt. Das Beetle-Luciferin wird in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert, dabei kommt es zur Chemilumineszenz. Die Reaktion ist in Abbildung 9 dargestellt.

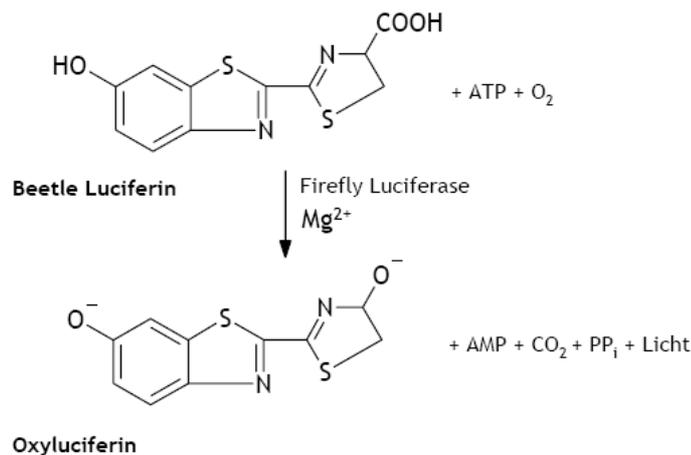


Abb. 9: Die Luciferasereaktion (74)

Die Promotoren werden entweder aktiviert oder reprimiert, was sich in der Luciferaseaktivität widerspiegelt. Bei aktivem Promotor wird das Reportergen verstärkt abgelesen und es wird vermehrt Luciferase gebildet. Bei Repression ergibt sich ein umgekehrtes Bild. Die Menge an Luciferase steht für das Protein, dessen Gen normalerweise durch Aktivierung des Promotors transkribiert würde.

4.4.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Luciferaseassays werden mittels des Luciferase Assay System der Firma Promega durchgeführt.

Nachdem 2×10^5 Zellen/Kavität in eine 6-Loch-Platte ausgesät, mit entsprechenden Vektoren transfiziert und behandelt wurden, werden die Zellen geerntet.

4. Methoden

Das Medium wird abgesaugt und es werden pro Ansatz 400 µl einer 1:5-Verdünnung des Lysepuffers (cell culture lysis reagent 5x; 125 mM Tris-phosphat, pH 7.8, 10 mM DTT, 10 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 50% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) Triton X-100) in Wasser auf die Zellen gegeben. Die Platte wird für 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert und die Zellysate anschließend in 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 2-3 Minuten bei 9900×g zentrifugiert. Der Überstand wird dann zur Proteinbestimmung, sowie für Luciferase- und β-Galactosidase-Assays verwendet.

4.4.2.2 Luciferase-Assay

Die Messung der Luciferase erfolgt in einem Microplate Luminometer. Hierzu werden 50 µl des Luciferasereagenzes (Luciferase Assay System) pro Kavität einer weißen 96-Loch-Platte vorgelegt. Zu diesem Reagenz werden 20 µl der Extrakte gegeben und vermessen. Die Bestimmung erfolgt jeweils doppelt.

4.4.2.3 β-Galactosidase-Assay

Die Messung der β-Galactosidaseaktivität dient dazu die Effizienz der Transfektionen zu überprüfen. Hierzu wird pcDNA3.1 Hygro/lacZ in die Zellen cotransfiziert. Dieses Reporterkonstrukt codiert für β-Galactosidase (lacZ) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Der CMV-Promotor ist konstitutiv aktiv, so dass ständig β-Galactosidase synthetisiert wird.

Durch Zugabe von 60 µl Extrakt zu einer Mischung aus 201 µl 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.5 und 3 µl 100× Mg-Lösung, sowie 66 µl ONPG-Lösung (4 mg ONPG/ml 0.1 M Natriumphosphatpuffer), kann nach Inkubation der Proben bei 37°C die Absorption bei 405 nm im „ELISA-Reader“ gemessen werden. Die Proben werden dabei so lange inkubiert bis eine gelbe Farbe auftritt, deren Absorption idealerweise zwischen 0.2 und 0.8 liegen sollte. Die Probenansätze werden jeweils doppelt gemacht und diese dann auch doppelt in einer 96-Loch-Platte mit 100 µl/Kavität gemessen.

Daraus kann man nun die Effizienz der Transfektion in den einzelnen Proben vergleichen und die Luciferaseaktivitäten entsprechend normieren.

4.4.3 Caspaseassay

Zur Bestimmung der Caspaseaktivität, verwendet man ein Caspase®-Glo Assay der Firma Promega, welches sich die Proteaseaktivität der Caspasen zunutze macht. Das Assay enthält ein luminogenes Caspasesubstrat, das eine Caspase spezifische Peptidsequenz enthält, nach deren Abspaltung Aminoluciferin entsteht, was wiederum als Substrat für die Luciferase dient und so eine Lumineszenz erzeugt. Die Reaktion ist in Abb. 10 am Beispiel der Caspase 8 dargestellt.

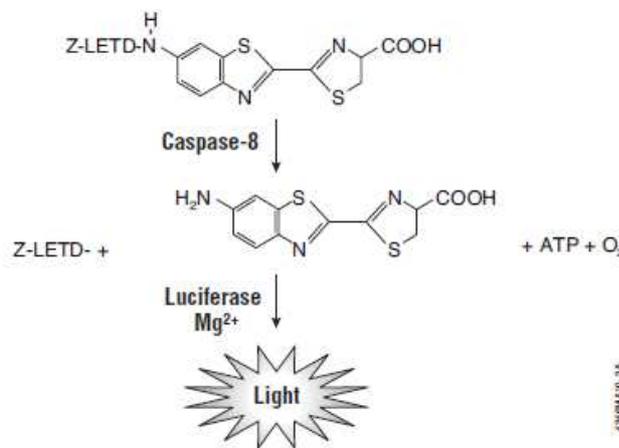


Abb. 10: Funktionsweise des Caspaseassay am Beispiel der Caspase 8 (Promega Manual)

Das Assay wurde nach (75) folgendermaßen modifiziert:

Die Zellen werden wie beschrieben ausgesät und behandelt. Nach dem Ernten werden die Zellen mit Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1xcomplete®, 10 mM DTT) lysiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss 10 Minuten bei 16000xg und 4°C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird diese auf 1 µg/µl mit Lysepuffer eingestellt und mit Proteinpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM KCl, 5% Glycerin) auf 100 ng/µl (1:10) verdünnt. Danach werden je 20 µl verdünnter Proteinextrakt mit 20 µl Caspase-Glo® Reagenz 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend kann man die Lumineszenz im Luminometer messen.

5. Ergebnisse

Die Expression sowie die Kinaseaktivität der Proteinkinase CK2 sind im Prostatakarzinom (PCA) und anderen Tumoren stark erhöht. Dadurch, dass die CK2 an der Vermittlung von Wachstumssignalen speziell im PCA beteiligt ist, liegt im Umkehrschluss nahe, dass eine Inhibition der CK2 eine Möglichkeit zur Therapie dieser Tumore darstellt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition der CK2 zu Apoptose führen kann. In den meisten Fällen handelt es sich dabei allerdings um hormonsensitive Zellen, in denen es bei moderaten Konzentrationen der Hemmstoffe zu Apoptose kommt, wohingegen hormoninsensitive Zellen nicht in gewünschtem Maße mit Apoptose reagieren. Im Hinblick auf die Verwendung von CK2-Inhibitoren als Antitumortheraeutika ist es von besonderem Interesse die Signalwege aufzudecken, die zur Apoptose führen, bzw. die Signale ausfindig zu machen, die in hormoninsensitiven Zellen die Apoptose verhindern. So werden im Folgenden mehrere Zelllinien, die verschiedene Stadien des Prostatakarzinoms repräsentieren, auf die apoptotischen Signale nach Hemmung der CK2 hin untersucht und gegenübergestellt.

Ein Teil der Experimente mit LNCaP- und PC-3-Zellen, die zu Beginn des Ergebnisteils beschrieben werden, sind der Dissertation „Auswirkungen einer Proteinkinase CK2-Inhibition auf Prostatazellen“ von Frau Dr. Hessenauer (31) und der Diplomarbeit „CK2 in der Signaltransduktion (Apoptose) des Prostatakarzinoms“ (Carolin Schneider) (32) entnommen und dienen hier als Vergleich und Argumentationsgrundlage.

5.1 Vergleich der CK2-Hemmung und Apoptoseinduktion durch TBB in verschiedenen Prostatakarzinomzellen

Um die Wirkung des CK2-Inhibitors TBB auf die CK2-Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden vier verschiedene Prostatakarzinomzelllinien herangezogen; zwei hormonsensitive Zelllinien, LNCaP und 22Rv1, sowie zwei hormoninsensitive Zelllinien, PC-3 und DU145. Die Zellen wurden jeweils mit 50 μ M TBB über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden behandelt. Als Kontrollen wurden Zellen mit dem

5. Ergebnisse

Lösungsmittel DMSO behandelt. Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurden Zellextrakte hergestellt, die dann im CK2-Kinaseaktivitätstest untersucht wurden. Dabei gibt der Einbau eines radioaktiven Phosphats aus [^{32}P]- γ -ATP in das CK2-spezifische Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD Aufschluss über die Aktivität der Proteinkinase im Zellextrakt. Die durch die Phosphorylierung des Serinrestes hervorgerufene Strahlung ist dabei proportional zur Kinaseaktivität (76). Nach Messung der radioaktiven Strahlung im Szintillationszähler ergibt sich für die vier Zelllinien eine ähnliche Abnahme der CK2-Aktivität. Für die Zelllinien LNCaP und 22Rv1 liegt die Restaktivität bei etwa 30%, für PC-3-Zellen bei etwa 40%. Bei den DU145-Zellen ergibt sich eine Restaktivität von etwa 20% (Abb. 11). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden bewirkt in keiner der Zelllinien eine weitere Reduktion der Kinaseaktivität.

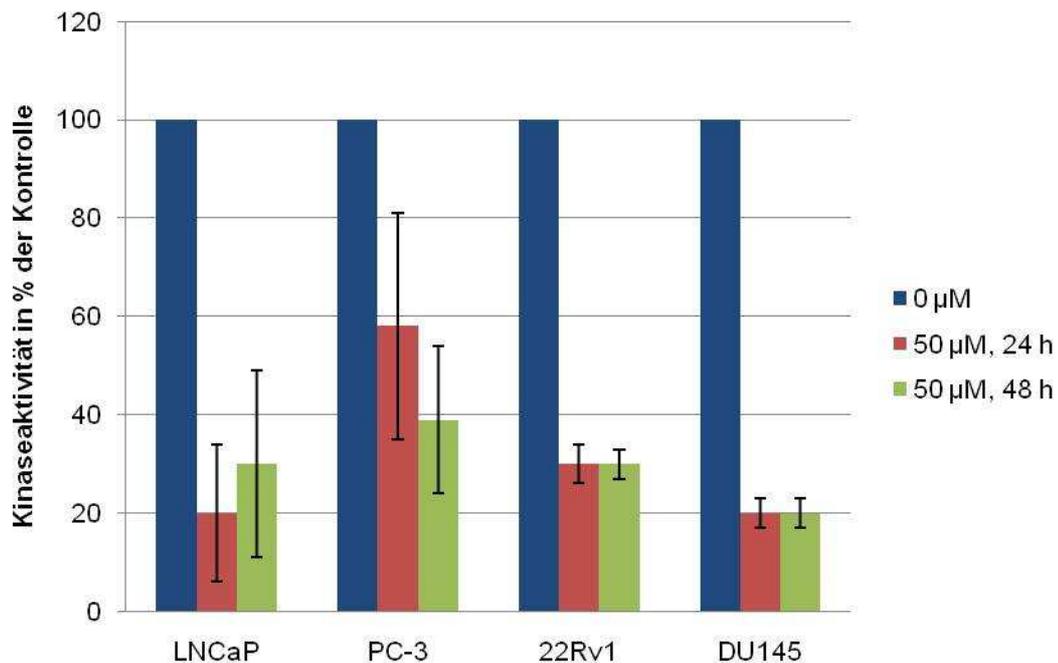


Abb. 11: CK2-Kinaseaktivitätstest nach TBB-Behandlung von Prostatakarzinomzellen: Die Zellen wurden jeweils für 24 und 48 Stunden mit 50 μM TBB behandelt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit entsprechender Menge DMSO behandelt wurden. Die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [^{32}P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die CK2-Aktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Daten für die LNCaP- und PC-3-Zellen sind aus (31) übernommen.

5. Ergebnisse

Es wird mehrfach beschrieben, dass die Hemmung der Kinaseaktivität zu Apoptose führt. Deshalb wurde zunächst eine Untersuchung der Lebensfähigkeit mittels MTT-Assay durchgeführt. Beim MTT-Assay handelt es sich um ein kolorimetrisches Assay, das auf der Fähigkeit der Mitochondrien beruht, Tetrazoliumsalze in Formazankristalle umzusetzen. Diese Umsetzung ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Mitochondrien und somit zur Lebensfähigkeit der Zellen. Die Zellen wurden nach Aussaat mit 50 μ M TBB behandelt. Im Anschluss an die Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden wurde das Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) auf die Zellen gegeben. Nach weiterer Inkubation wurden die Zellen mit Solubilisierungslösung lysiert und im „ELISA-Reader“ bei 595 nm vermessen. Folgende Abbildung 12 zeigt, dass die LNCaP- und 22Rv1-Zellen nach einer TBB-Behandlung in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt sind. Nach 24 Stunden ist die Lebensfähigkeit der LNCaP-Zellen um 20% gemindert, nach weiteren 24 Stunden um weitere 20%. Die Verminderung der Lebensfähigkeit tritt bei den 22Rv1-Zellen erst ab einer Inkubationszeit von 48 Stunden auf, dabei liegt die Lebensfähigkeit bei etwa 90%. PC-3- und DU145-Zellen zeigen dagegen keinen Rückgang in ihrer Lebensfähigkeit, weder nach 24 noch nach 48 Stunden Inkubationszeit.

5. Ergebnisse

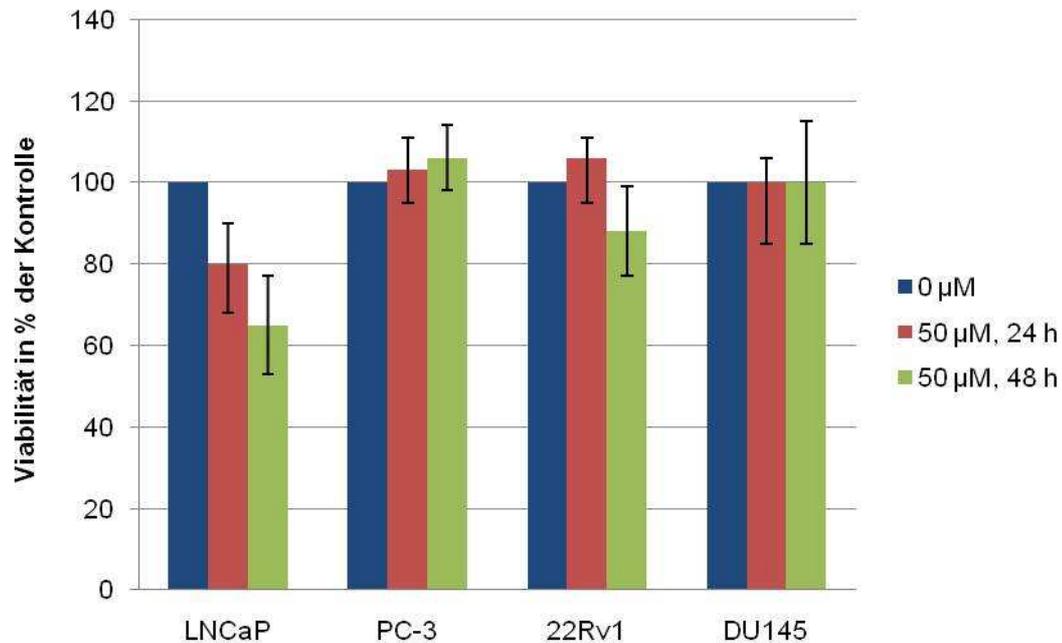


Abb. 12: Untersuchung zur Lebensfähigkeit der Prostatakarzinomzellen nach TBB-Behandlung:

Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert, mit 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt und ein MTT-Assay durchgeführt. Die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Daten für die LNCaP- und PC-3-Zellen sind aus (31) übernommen.

Nach einer Veröffentlichung von Ahmed, gehen auch PC-3-Zellen in Apoptose, wenn sie mit höheren Konzentrationen von TBB behandelt werden (28). Weil für die bisher durchgeführten MTT-Assays nur 50 μM TBB verwendet wurde, sollte untersucht werden, ob die Erhöhung der TBB-Konzentration auf 80 μM einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der PC-3-Zellen hat. Dazu wurden die PC-3-Zellen ausgesät und mit 80 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt und im Anschluss ein MTT-Assay durchgeführt. Die PC-3-Zellen werden auch mit 80 μM TBB nicht in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt, so dass in diesem Fall die Beobachtung der Arbeitsgruppe von Ahmed nicht bestätigt werden konnte.

5. Ergebnisse

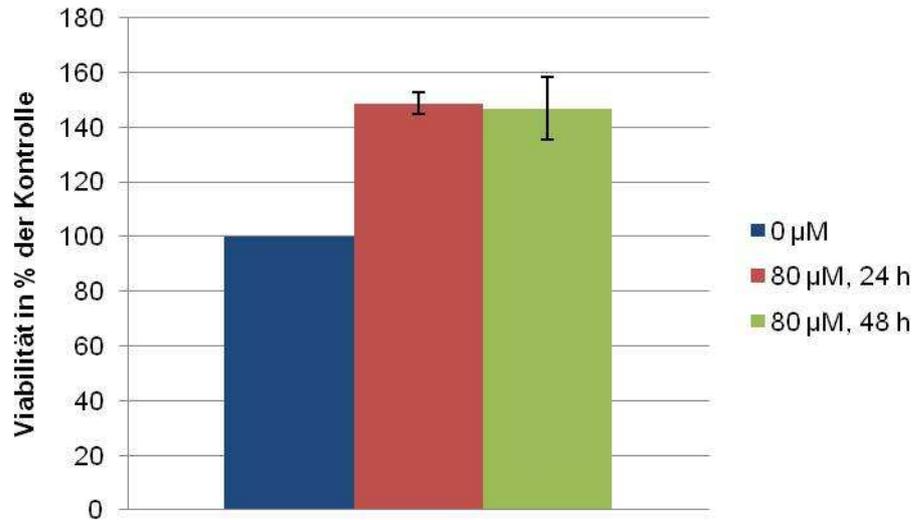


Abb. 13: Untersuchung zur Lebensfähigkeit der PC-3-Zellen bei Behandlung mit 80 μM TBB: Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert, mit 80 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt und ein MTT-Assay durchgeführt. Die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Ein MTT-Assay gibt keinen Aufschluss über die Art und Weise, wie der Rückgang der Lebensfähigkeit zustande kommt, ob durch Apoptose oder Zellzyklusarrest. So wurde die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) untersucht, deren Spaltung als relativ spätes apoptotisches Ereignis anzusehen ist. Nach Inhibition der CK2 für 24 und 48 Stunden durch TBB wurden Zellextrakte hergestellt, die mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet wurden. Der Westernblot in Abbildung 14 zeigt, dass es in den LNCaP- und 22Rv1-Zellen nach TBB-Behandlung (Spuren 2 und 4) zur Spaltung von PARP kommt. Bei den PC-3- und DU145-Zellen tritt diese Spaltung nicht auf. In Übereinstimmung mit dem MTT-Assay zeigen die Zellen, die eine Verminderung der Lebensfähigkeit aufweisen auch das apoptotische Ereignis der PARP-Spaltung, wohingegen die Zellen, die in ihrer Lebensfähigkeit nicht eingeschränkt sind auch keine Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zeigen. Im Vergleich von LNCaP- und 22Rv1-Zellen spiegelt sich ebenso die Aussage des MTT-Assays wieder. Nach 24 Stunden CK2-Hemmung in den 22Rv1-Zellen, zeigen diese nur ein schwaches Spaltprodukt. Nach 48 Stunden ist das Spaltprodukt deutlich stärker vorhanden.

5. Ergebnisse

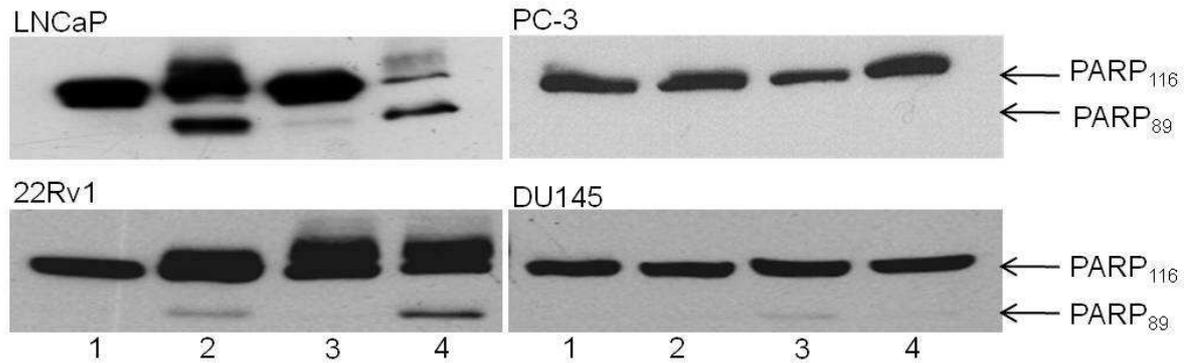


Abb. 14: Westernblot zur Detektion der PARP-Spaltung in Prostatakarzinomzellen nach TBB-Behandlung: 150 μg Zellextrakt wurden über ein 10% (für LNCaP, PC-3) und 7.5% (für 22Rv1, DU145) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper wurde das Volllängenprotein (PARP₁₁₆) sowie das Spaltprodukt (PARP₈₉) von PARP detektiert. Spur 1: 0 μM TBB, 24 h; Spur 2: 50 μM TBB, 24 h; Spur 3: 0 μM TBB, 48 h; Spur 4: 50 μM TBB, 48 h. Der Westernblot für die LNCaP-Zellen ist aus (31) und der Westernblot für die PC-3-Zellen aus (32) übernommen.

Zur Bestätigung des MTT-Assays, das für PC-3-Zellen auch nach einer Behandlung mit 80 μM TBB keine Beeinflussung der Lebensfähigkeit zeigte (Abb. 13), sollte hier nochmals die Apoptose überprüft werden. Dazu wurde ein Westernblot angefertigt, mit dem die Spaltung der PARP untersucht wurde (Abb. 15). Dabei stellte sich in Übereinstimmung mit dem MTT-Assay heraus, dass es auch bei einer Behandlung der PC-3-Zellen mit 80 μM TBB über 24 und 48 Stunden nicht zur Spaltung der PARP kommt. Daher wird für die folgenden Versuche eine TBB-Konzentration von 50 μM verwendet.

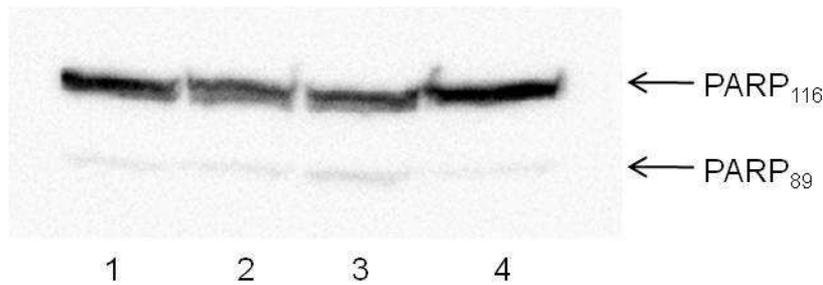


Abb. 15: Westernblot zur Detektion der PARP-Spaltung in PC-3-Zellen nach Behandlung mit 80 μM TBB: 150 μg Zellextrakt wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper wurde das Volllängenprotein (PARP₁₁₆) sowie das Spaltprodukt (PARP₈₉) von PARP detektiert. Spur 1: 0 μM TBB, 24 h; Spur 2: 80 μM TBB, 24 h; Spur 3: 0 μM TBB, 48 h; Spur 4: 80 μM TBB, 48 h

5.2 Untersuchungen zur Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 in der durch TBB induzierten Apoptose

Ein auffallender Unterschied, der vier verwendeten Zelllinien, ist der Status des Tumorsuppressorproteins p53. Die LNCaP-Zellen exprimieren wt p53. Das p53 Gen in den 22Rv1-Zellen weist zwar eine Mutation (CAG→CGG) auf, diese liegt heterozygot vor, so dass auch hier wt p53 vorzuliegen scheint (69). Die hormoninsensitiven Zellen exprimieren kein p53 (PC-3-Zellen) bzw. ein mutiertes p53 (P223L und V274F, DU145-Zellen) (66). p53 wird als Protein beschrieben, das in der Lage ist Zellzyklusarrest oder Apoptose einzuleiten. Bei Mutationen oder Deletion des Proteins, kann diese Funktion nicht mehr ausgeübt werden. Zur Untersuchung der Auswirkung einer CK2-Hemmung mit 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden auf das Tumorsuppressorprotein p53, wurden nach Ernte und Lyse der Zellen Westernblots angefertigt. Zur Detektion von p53 wurde der monoklonale Mausantikörper DO-1 verwendet. In den LNCaP- und 22Rv1-Zellen lässt sich eine Induktion des p53-Proteins nach Behandlung der Zellen mit TBB (Abb. 16; Spuren 2 und 4) erkennen. Wie erwartet, zeigen die PC-3-Zellen das Tumorsuppressorprotein nicht, und in den DU145-Zellen zeigt sich keine Veränderung des Proteinlevels von p53. HCT 116 p53 wt-Zellen dienen im Blot mit PC-3-Zellen als Positivkontrolle.

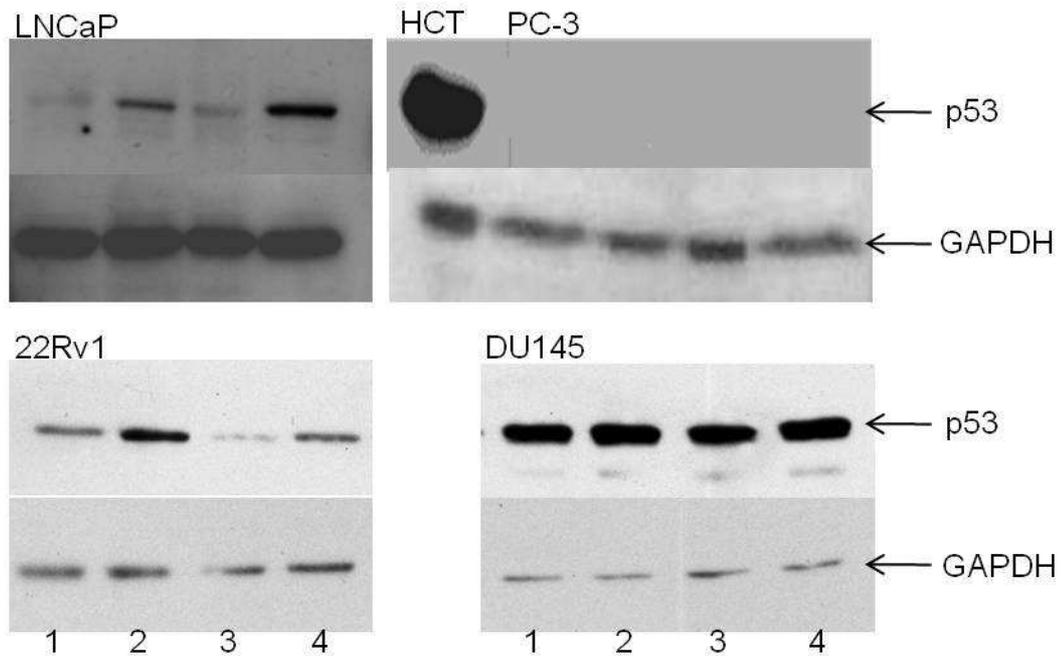


Abb. 16: Westernblot zur Detektion von p53 nach TBB-Behandlung von Prostatakarzinomzellen: 50 μ g Zellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der monoklonale Mausantikörper DO-1 verwendet. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. Spur 1: 0 μ M TBB, 24 h; Spur 2: 50 μ M TBB, 24 h; Spur 3: 0 μ M TBB, 48 h; Spur 4: 50 μ M TBB, 48 h; HCT: Extrakt aus HCT 116 p53 wt-Zellen als Positivkontrolle. Der Westernblot für die LNCaP-Zellen ist aus (31) und der Westernblot für die PC-3-Zellen aus (32) übernommen.

Damit p53 Apoptose einleiten kann, muss es seine Transaktivierungsfunktion ausüben können. Ein Protein, welches direkt durch p53 im Zusammenhang mit Apoptose induziert wird, ist das p53-inducible gene 3 (PIG3) (60). Die Untersuchung von PIG3 im Reporterassay gibt Aufschluss darüber, ob p53 seine Transaktivierungsfunktion ausüben kann und PIG3 so an dem apoptotischen Signalweg beteiligt ist. Das Reporterkonstrukt pBR322pl-LUC-pig3prom (0.5 μ g) wurde dazu mittels transienter Transfektion in die Zellen eingebracht. Nach 30 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen für 18 Stunden mit TBB behandelt und nach insgesamt 48 Stunden geerntet, lysiert und im Luciferaseassay analysiert. Das Diagramm (Abb. 17) zeigt die Aktivierung des PIG3-Promoters in den LNCaP- und 22Rv1-Zellen. Dabei ist die Induktion des PIG3-Promotorkonstruktes in den LNCaP-Zellen mit 40% etwa doppelt so hoch wie bei den 22Rv1-Zellen, die 20% Induktion

5. Ergebnisse

zeigen. Die beiden Zelllinien PC-3 und DU145 zeigen dagegen keine Induktion der Aktivität des PIG3-Promotors.

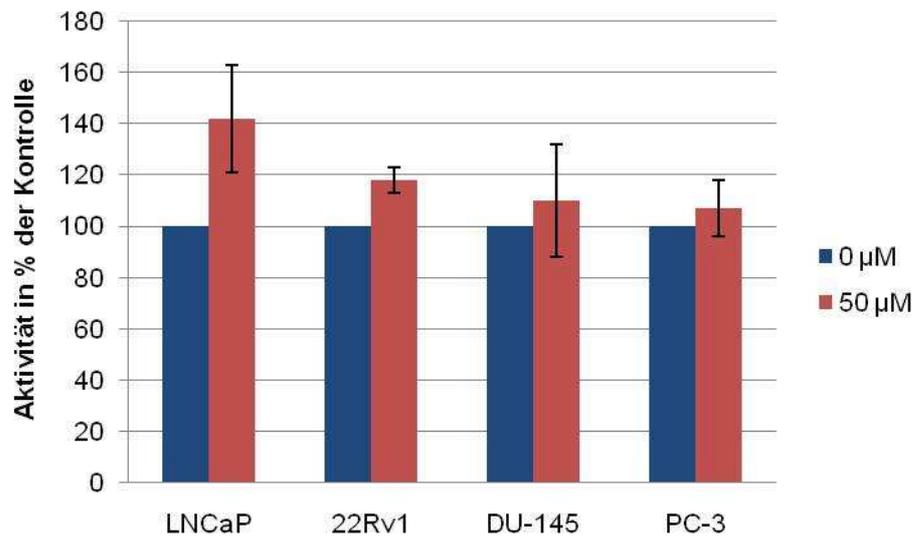


Abb. 17: Funktionsanalyse für p53 in Prostatakarzinomzellen nach TBB-Behandlung mittels Reporterassay für PIG3: Das Plasmid pBR322pl-LUC-pig3-prom (0.5 μg) wurde mit dem Effectene® Transfection Reagent über 30 Stunden transfiziert und die Zellen über weitere 18 Stunden mit 0 und 50 μM TBB behandelt. Die Luciferaseaktivität wurde mit einem Luminometer bestimmt und die Messwerte auf die Proteinmenge sowie die β -Galactosidaseaktivität bezogen. Die Werte der Lösungsmittelkontrollen wurden 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Werte für die LNCaP- und PC-3-Zellen sind aus (32) übernommen.

p53 wird, wie oben gezeigt, in den Zelllinien, die wt p53 besitzen, auf Proteinebene hochreguliert und ist in der Lage PIG3 zu induzieren. Bei den Zelllinien, die kein oder mutiertes p53 enthalten, ist dies nicht der Fall. Es stellt sich die Frage, ob wt p53 dafür verantwortlich ist, die Apoptose in den LNCaP- und 22Rv1-Zellen zu induzieren und ob das Fehlen des wt p53 der Grund dafür ist, dass PC-3- und DU145-Zellen die Apoptose nicht einleiten können. Zur Beantwortung dieser Frage wurde das wt p53 in LNCaP-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Nach anschließender Behandlung mit TBB wurde die Induktion der Apoptose untersucht. Die siRNA gegen p53 wurde über 72 Stunden mit HiPerFect® transfiziert und die Behandlung im Anschluss wie oben über 24 und 48 Stunden mit 50 μM TBB durchgeführt. Abbildung 18 A zeigt die Menge an p53 in mit siRNA transfizierten und kontrolltransfizierten Zellen. Spur 2

5. Ergebnisse

zeigt die Menge an p53 nach 72 Stunden Transfektion, Spur 4 zeigt den Proteingehalt nach 72 Stunden Transfektion und weiteren 48 Stunden für den Behandlungszeitraum. Man sieht eine erfolgreiche Herunterregulation von p53 nach 72 Stunden. Darüber hinaus bleibt die Menge an p53 auch über die weiteren 48 Stunden reduziert. Abbildung 18 B zeigt nun, dass die Spaltung von PARP als apoptotisches Ereignis auch nach Transfektion von p53 siRNA sowohl nach 24 wie 48 Stunden Behandlung mit TBB (Spuren 2 und 4) immer noch auftritt.

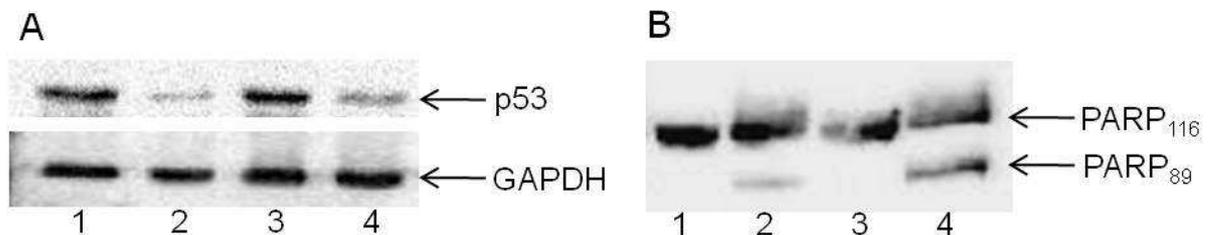


Abb. 18: Untersuchung der Beteiligung von p53 in der TBB-induzierten Apoptose in LNCaP-Zellen. A: Herunterregulation von p53 mittels siRNA in LNCaP-Zellen: LNCaP-Zellen wurden unter Verwendung von HiPerFect® über 72 und 120 Stunden mit 10 nM siRNA gegen p53 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. 50 µg Zellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion von p53 diente der Antikörper DO-1. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. Spur 1: Kontroll-siRNA 72 h; Spur 2: p53 siRNA 72 h; Spur 3: Kontroll-siRNA 120 h; Spur 4: p53 siRNA 120 h; **B: Westernblot zur Detektion von PARP in p53 siRNA transfizierten LNCaP-Zellen mit anschließender TBB-Behandlung:** LNCaP-Zellen wurden unter Verwendung von HiPerFect® über 72 Stunden mit 10 nM siRNA gegen p53 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Im Anschluss wurden die transfizierten Zellen mit 50 µM TBB bzw. DMSO behandelt. 150 µg Zellextrakt wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Zur Detektion von Volllängen-PARP (PARP₁₁₆) und dem Spaltprodukt (PARP₈₉) wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper der Firma Cell Signalling Technology® verwendet. Spur 1: p53 siRNA, 0 µM TBB, 24 h; Spur 2: p53 siRNA, 50 µM TBB, 24 h; Spur 3: p53 siRNA, 0 µM TBB, 48 h; Spur 4: p53 siRNA, 50 µM TBB, 48 h

Nachdem das Herunterregulieren von p53 in den LNCaP-Zellen nicht dazu führt, dass die Apoptoseinduktion nach TBB-Behandlung ausbleibt, muss daraus geschlossen werden, dass das Tumorsuppressorprotein nicht allein in der Lage ist, die Apoptose zu induzieren.

5. Ergebnisse

Um die aus LNCaP-Zellen erhaltenen Resultate weiter zu untermauern, sollte auch in den 22Rv1-Zellen das Tumorsuppressorprotein p53 herunterreguliert werden. Ebenso wie in den LNCaP-Zellen wurde die p53 siRNA verwendet. Zunächst wurden drei verschiedene Konzentrationen an siRNA ausgetestet (10, 20 und 30 nM). Die siRNA wurde über 72 Stunden mit der im Handbuch angegebenen Menge HiPerFect® Transfection Reagent von Qiagen transfiziert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, lysiert und die erhaltenen Zellextrakte über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Westernblot angefertigt. Nachdem im ersten Versuch die Herunterregulation erfolgreich war (Abb. 19 A), fiel die Entscheidung für weitere Experimente auf die Konzentration von 20 nM. Es zeigte sich aber, dass in allen folgenden Versuchen die Herunterregulation nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 19 B).

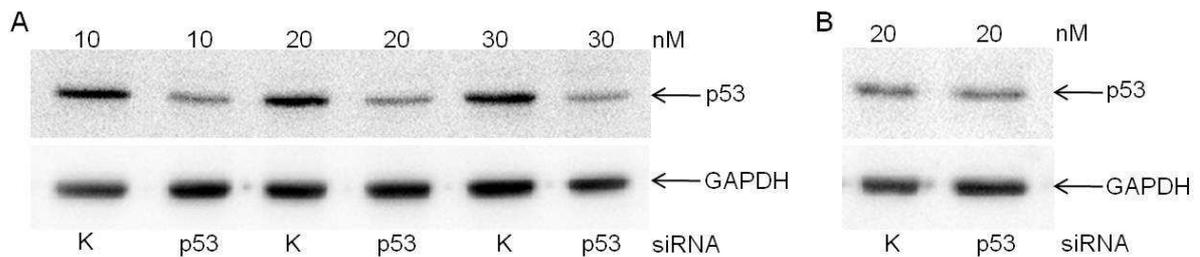


Abb. 19: Herunterregulation von p53 mittels siRNA in 22Rv1-Zellen: 22Rv1-Zellen wurden mit siRNA gegen p53 bzw. einer Kontroll-siRNA (K) über 72 Stunden mit HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurden 50 µg Gesamtzellextrakt über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. p53 wurde mit dem Antikörper DO-1 von Santa Cruz nachgewiesen. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **A:** Transfektion der siRNA in verschiedenen Konzentrationen (10, 20 und 30 nM). **B:** Transfektion von 20 nM siRNA.

Daher wurde eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung der LNCaP-Daten in Betracht gezogen. Die DU145-Zellen exprimieren ein p53, das nach Temperaturshift von 37°C auf 31°C die wt-Konformation annehmen soll und dann seine transkriptionellen Fähigkeiten wieder ausüben sollte (77). Im Folgenden wurde untersucht, ob die DU145-Zellen ein wt p53 nach Temperaturshift auf 31°C exprimieren und ob dieses dann nach TBB-Behandlung zu Apoptose führt. Nach Herstellung von Zellextrakten wurden Westernblots gegen p53 durchgeführt um festzustellen, ob sich allein durch

5. Ergebnisse

die Kultivierung bei 31°C im Vergleich zu 37°C schon Unterschiede ergeben. Dazu wurden der monoklonale Antikörper DO-1 (Abb. 20 A) und ein polyklonales Kaninchenserum (Abb. 20 B) verwendet. Es ergab sich keine Änderung im Proteingehalt von p53 durch die Kultivierung bei 31°C im Vergleich zur Kultivierung bei 37°C.

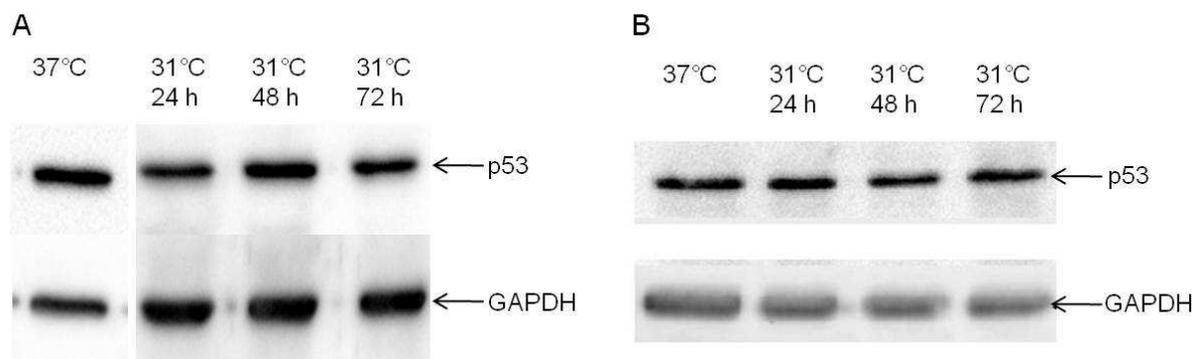


Abb. 20: Westernblot zur Detektion von p53 nach Temperaturshift von DU145-Zellen von 37°C auf 31°C: DU145-Zellen wurden bei 37°C bzw. über 24-72 Stunden bei 31°C kultiviert, geerntet und aufgeschlossen. Zellextrakt wurde über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. **A:** Zur Detektion wurde der monoklonale Mausantikörper DO-1 verwendet. **B:** Zur Detektion wurde ein polyklonales Kaninchenserum verwendet. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert.

Die Hemmung der CK2 mit TBB führt in Prostatakarzinomzellen, welche wt p53 exprimieren, zur Induktion von p53. Deshalb wurden DU145-Zellen nach 24 Stunden Temperaturshift auf 31°C über weitere 24 und 48 Stunden mit 50 µM TBB bzw. entsprechender Menge DMSO behandelt und bei 31°C weiter kultiviert. Nachdem die Zellen geerntet und aufgeschlossen worden waren, wurde der Zellextrakt im Westernblot analysiert. Die folgende Abbildung 21 zeigt eine Zunahme an p53 nach Inhibition der CK2 mit TBB nach 24 sowie nach 48 Stunden bei Kultivierung bei 31°C. Des Weiteren wurde nach Behandlung mit TBB die PARP-Spaltung als apoptotisches Ereignis untersucht und ein MTT-Assay durchgeführt, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu beurteilen. Nach TBB-Behandlung bei 31°C konnte ebenso wie bei 37°C keine Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase gezeigt werden. Das hier durchgeführte MTT-Assay zeigt entsprechend dazu auch keine Einschränkung der Lebensfähigkeit. Um sicherzustellen, dass TBB auch bei 31°C die

5. Ergebnisse

CK2 hemmt, wurde deren Aktivität im Kinaseassay ermittelt. Dabei ergab sich eine deutliche Abnahme in der Aktivität, wenngleich auch etwas geringer als bei einer Kultivierung und Behandlung der Zellen bei 37°C.

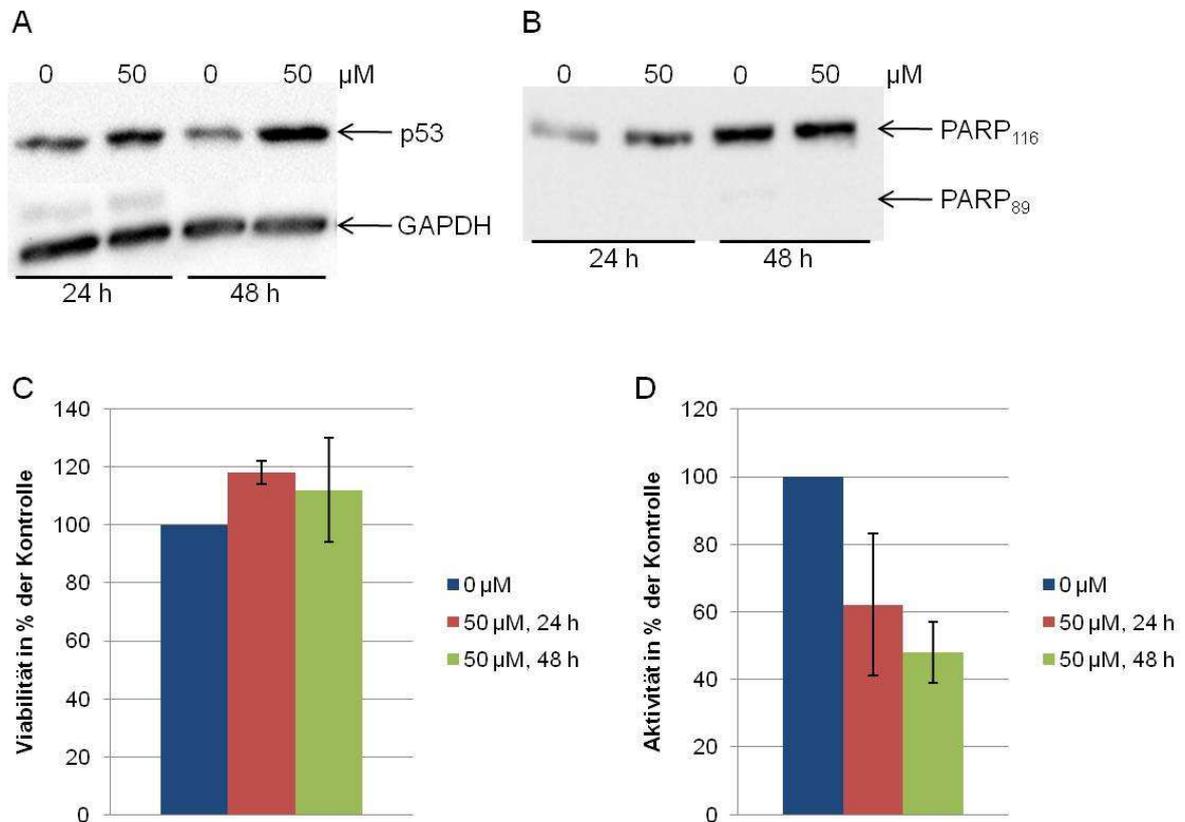


Abb. 21: Untersuchung von p53, PARP, Lebensfähigkeit und CK2-Kinaseaktivität von DU145-Zellen nach Kultivierung bei 31°C und anschließender TBB-Behandlung: Zellen wurden für 24 Stunden bei 31°C kultiviert und anschließend über 24 bzw. 48 Stunden mit 0 bzw. 50 μM TBB behandelt. **A: Detektion von p53 im Westernblot:** 50 μg Gesamtzellextrakt wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12.5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Mausantikörper DO-1 von Santa Cruz. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Westernblot zur Detektion von PARP:** 150 μg Gesamtzellextrakt wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (7.5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des Volllängen-PARP (PARP₁₁₆) sowie des Spaltproduktes (PARP₈₉) erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper von Cell Signalling Technology®. **C: Untersuchung der Lebensfähigkeit:** Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten für 24 Stunden bei 31°C kultiviert, danach mit 0 und 50 μM TBB behandelt und weitere 24 bzw. 48 Stunden bei 31°C kultiviert. Im Anschluss wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die DMSO-behandelten Zellen wurden 100% gesetzt. **D: Untersuchung der CK2-Kinaseaktivität:** Die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [³²P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die CK2-Aktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Nach Temperaturshift der DU145-Zellen von 37°C auf 31°C und anschließender TBB-Behandlung wird die Kinaseaktivität gehemmt und p53 wird hochreguliert. Die Hochregulation lässt auf ein wt p53 schließen, da bei 37°C Kultivierungstemperatur keine Hochregulation nach TBB-Behandlung zu sehen war. Allerdings induzieren die DU145-Zellen keine Apoptose, so dass auch hier geschlossen werden muss, dass p53 alleine für die Einleitung der Apoptose nicht ausreichend ist.

5.3 Untersuchung zur Rolle des Androgenrezeptors in der TBB-induzierten Apoptose

Neben p53 unterscheiden sich die vier verwendeten Zelllinien auch in der Expression des Androgenrezeptors (AR). Die hormonsensitiven Zellen LNCaP und 22Rv1 exprimieren den Androgenrezeptor. In den LNCaP-Zellen liegt der Androgenrezeptor in einer mutierten Form vor. Die Mutation T877A führt dazu, dass der AR in den LNCaP-Zellen auch auf andere Steroide als Androgene anspricht (65). Die 22Rv1-Zellen exprimieren zwei Varianten des AR, ein 114 kDa und 75-80 kDa großes Protein. Die 114 kDa große Variante des AR entsteht durch Verdopplung des Exons 3. Der 75-80 kDa großen Form des AR fehlt dagegen ein Teil des C-Terminus (70). Die hormoninsensitiven Zellen PC-3 und DU145 exprimieren keinen Androgenrezeptor (65). Wegen der unterschiedlichen Hormonsensitivität muss untersucht werden, ob dies nicht der Grund dafür ist, dass LNCaP- und 22Rv1-Zellen nach Hemmung der CK2 in Apoptose gehen und PC-3- und DU145-Zellen nicht. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die PC-3-Zellen transient mit dem Expressionsvektor p3XFLAG-AR wt (1 µg) für den Androgenrezeptor transfiziert (Effectene® Transfection Reagent, Qiagen). Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen mit 0 und 50 µM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt. Zur Kontrolle wurde der Leervektor p3XFLAG-CMV7.1 (1 µg) transfiziert. Nach Zellernte und –aufschluss wurden die Gesamtzellextrakte über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und Westernblots angefertigt. Die Transfektion des Androgenrezeptors wurde mit dem FLAG-Antikörper M2 (Sigma-Aldrich) überprüft. Man sieht in Abb. 22 A, dass die Transfektion erfolgreich war, und dass die Proteinmenge des AR mit der Hemmung der CK2 abnimmt. Die Abnahme des Androgenrezeptors bestätigt in LNCaP-Zellen durchgeführte Experimente. Hier kam es nach Hemmung der CK2 mit TBB ebenso zur Abnahme des endogenen

5. Ergebnisse

Androgenrezeptors und dessen transkriptioneller Aktivität (24). In Abbildung 22 B ist die Untersuchung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, als apoptotisches Ereignis, dargestellt. Es konnte keine Einleitung der Apoptose nach Transfektion des AR und folgender Behandlung mit TBB festgestellt werden. Die leichte Spaltung der PARP beruht lediglich auf der Transfektion des Androgenrezeptors, nicht aber auf der CK2-Hemmung.

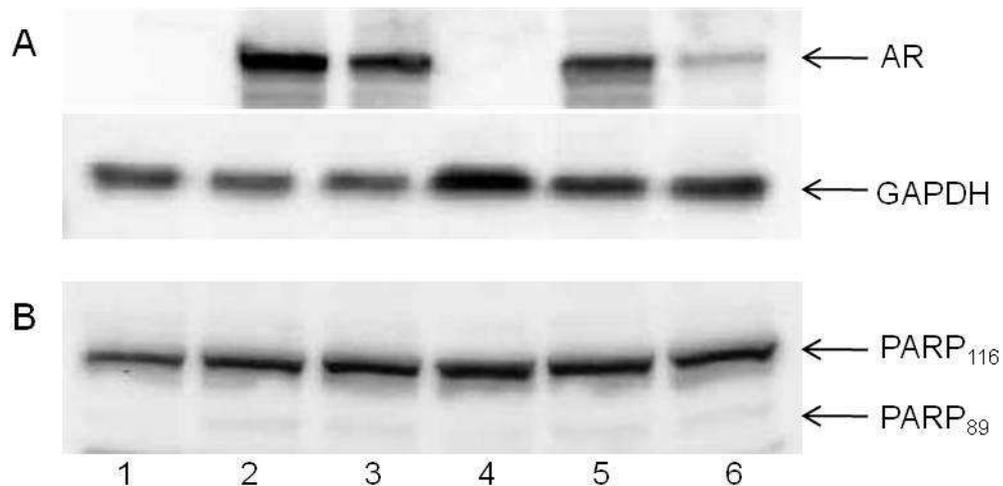


Abb. 22: Transfektion des Androgenrezeptors in PC-3-Zellen mit anschließender Behandlung mit TBB über 24 und 48 Stunden: PC-3-Zellen wurden mit dem Effectene® Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Als Vektor wurde 1 µg p3XFLAG-AR wt verwendet. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 und 48 Stunden mit TBB bzw. DMSO behandelt. 30 bzw. 150 µg Gesamtzelleextrakt wurden über ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Spur 1: p3XFLAG-CMV7.1, 48 h; Spur 2: p3XFLAG-AR + 0 µM TBB, 24 h; Spur 3: p3XFLAG-AR + 50 µM TBB, 24 h; Spur 4: p3XFLAG-CMV7.1, 72 h; Spur 5: p3XFLAG-AR + 0 µM TBB, 48 h; Spur 6: p3XFLAG-AR + 50 µM TBB, 48 h **A: Westernblot zur Detektion des Androgenrezeptors:** Hier wurde der FLAG-Antikörper M2 von Sigma-Aldrich verwendet. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Westernblot zur Detektion von PARP:** Hier wurde zur Detektion des Volllängen-PARP (PARP₁₁₆) und des PARP-Spaltproduktes (PARP₈₉) der polyklonale Kaninchenantikörper von Cell Signalling Technology® verwendet.

Offenbar spielt auch die Androgensensitivität der Prostatazellen keine Rolle in der durch TBB-induzierten Apoptose, da auch nach Transfektion des AR in PC-3-Zellen keine Apoptose durch TBB induziert werden kann.

Die Inhibition der CK2 in den vier Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, 22Rv1, PC-3 und DU145 führt nur in den hormonsensitiven Zelllinien zu verminderter Lebensfähigkeit durch Apoptose. Im Zuge der Apoptose wird das Tumorsuppressorprotein p53 induziert, welches seinerseits die Expression von PIG3 fördert. Dies alles lässt sich in den hormoninsensitiven Zellen nicht zeigen. Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass der Status von p53 offensichtlich für die Apoptoseinduktion keine Rolle spielt. Ebenso ist die unterschiedliche Hormonsensitivität nicht der Grund dafür, da PC-3-Zellen auch nach Transfektion des Androgenrezeptors nicht mit Apoptose auf die Inhibition der CK2 reagieren.

5.4 Identifizierung des apoptotischen Signalweges nach CK2-Inhibition in LNCaP- und PC-3-Zellen

Zur Aufklärung der Signalwege, die nach Hemmung der CK2 eingeleitet werden und zu Apoptose führen, bzw. um die Unterschiede darin aufzudecken, wurden im Folgenden LNCaP- und PC-3-Zellen verwendet. Die LNCaP-Zellen zum einen wegen ihres wt p53 und zum anderen, weil sie schon nach 24 Stunden Hemmung der Proteinkinase CK2 mit Apoptose reagieren. Bei den 22Rv1-Zellen tritt Apoptose erst ab 48 Stunden Behandlung auf, zudem liegt eine Mutation im p53 Gen vor (69). Die PC-3-Zellen haben kein p53 und wurden den DU145-Zellen mit den beiden p53-Mutationen (P223L und V274F) (77) vorgezogen.

Im vorherigen Abschnitt wurde die PARP-Spaltung als apoptotischer Marker betrachtet. PARP ist direktes Substrat der Caspasen 3 und 7 (78). Die Aktivierung der Caspasen 3/7 wird also benötigt um die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zu initiieren. Im Caspaseassay wurde die Aktivierung der Caspasen 3/7 nach Inhibition der CK2 mit 50 µM TBB über 24 und 48 Stunden bestimmt. Zellen, die mit einer entsprechenden Menge DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach der Behandlung wurden sie geerntet, aufgeschlossen und mittels modifiziertem Caspase-Glo® 3/7-Assay im Luminometer analysiert (75). Nach Messung der Caspaseaktivität in LNCaP- und PC-3-Zellen ergab sich, dass die PC-3-Zellen keine erhöhte Aktivität der Caspasen 3/7 aufweisen (Abb. 23). Die Caspaseaktivität in den LNCaP-Zellen steigt von zweifach nach 24 Stunden auf eine mehr als zehnfache

5. Ergebnisse

Aktivität nach 48 Stunden Behandlung mit TBB an. Als Positivkontrolle dienten HeLa-Zellen, die mit Doxorubicin (20 µg/ml) über 24 Stunden behandelt wurden. Die Aktivität der Caspasen 3/7 beträgt in den HeLa-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung etwa das zwölfwache gegenüber der Kontrolle.

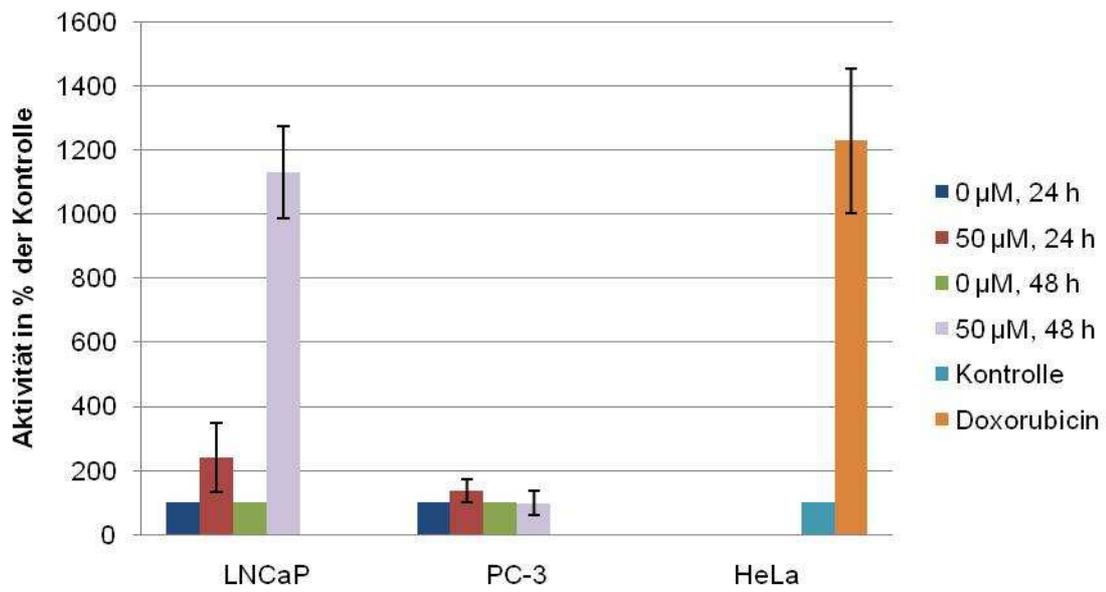


Abb. 23: Caspase 3/7-Assay nach Hemmung der CK2 in LNCaP- und PC-3-Zellen mit TBB: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden über 24 und 48 Stunden mit 50 µM TBB bzw. DMSO behandelt. HeLa-Zellen wurden als Positivkontrolle über 24 Stunden mit 20 µg/ml Doxorubicin behandelt. Nach Durchführung eines modifizierten Caspase-Glo® 3/7-Assay wurden die Caspaseaktivitäten luminometrisch bestimmt und die Kontrollen als 100% Aktivität gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen für LNCaP-, aus vier unabhängigen Versuchen für PC-3- und aus zwei unabhängigen Versuchen für HeLa-Zellen.

Zur Verifizierung des Caspaseassays wurde ein Westernblot durchgeführt, der in folgender Abbildung gezeigt ist. Dabei zeigen auftretende Spaltprodukte eine Aktivierung der Procaspase. Gesamtzellextrakte von TBB-behandelten Zellen wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach Detektion mit dem Caspase 3-Antikörper 8G10 zeigen sich die Spaltprodukte der Caspase 3 nur in den TBB-behandelten LNCaP-Zellen, nicht aber in den PC-3-Zellen (Abb. 24). Als Positivkontrolle wurde im

5. Ergebnisse

Westernblot ebenfalls ein Aliquot eines Zellextraktes von Doxorubicin-behandelten HeLa-Zellen aufgetragen, auch hier ist die Spaltung sichtbar.

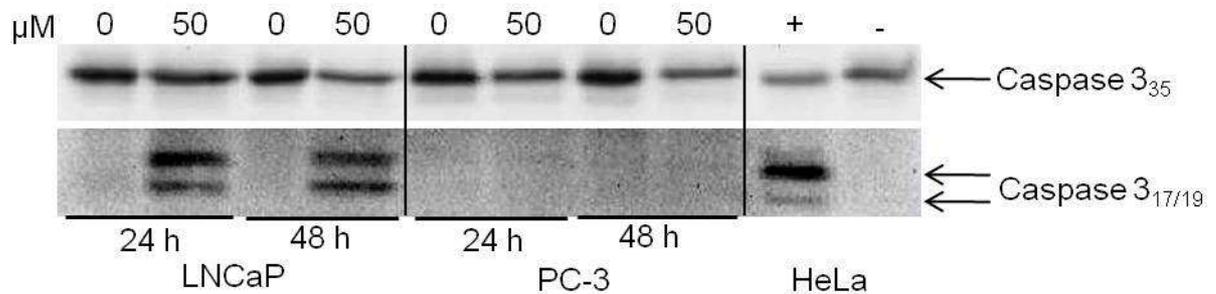


Abb. 24: Aktivierung der Caspase 3 nach TBB-Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden mit 0 und 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt, geerntet und aufgeschlossen. HeLa-Zellen wurden als Positivkontrolle über 24 Stunden mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxorubicin (+) behandelt. 200 μg Gesamtzellextrakt wurden elektrophoretisch über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Detektiert wurde die Caspase 3 mit dem Antikörper 8G10 von Cell Signalling Technology®, der die Procaspase 3 (Caspase 3₃₅) und die Spaltprodukte (Caspase 3_{17/19}) erkennt.

Caspase 3 kann unter anderem über den mitochondrialen Weg aktiviert werden. Dazu kommt es nach Zusammenbau des Apoptosoms aus Apaf1, Cytochrom C und Procaspase 9 zur autoproteolytischen Aktivierung der Procaspase (53,79). Die aktive Caspase 9 ist wiederum in der Lage Caspase 3 zu aktivieren. Da Frau Dr. Hessenauer die Freisetzung von Cytochrom C in beiden Zelllinien nachweisen konnte, stellte sich die Frage, ob die Zelllinien sich bezüglich der Aktivierung der Caspase 9 unterscheiden. Hierzu wurde ebenfalls ein Westernblot wie oben durchgeführt und die Aktivierung der Caspase 9 mit dem Antikörper 10-1-87 von assay designs detektiert. Die Abbildung 25 zeigt, dass weder in den LNCaP- noch in den PC-3-Zellen eine Spaltung der Caspase 9 auftritt. Die untere Bande, die in den behandelten Prostatakarzinomzellen und den unbehandelten HeLa-Zellen auftritt, muss als unspezifisch betrachtet werden. HeLa-Zellen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Bei dieser Behandlung ist deutlich die Spaltung in zwei Fragmente (Caspase 9_{35/37}) zu sehen.

5. Ergebnisse

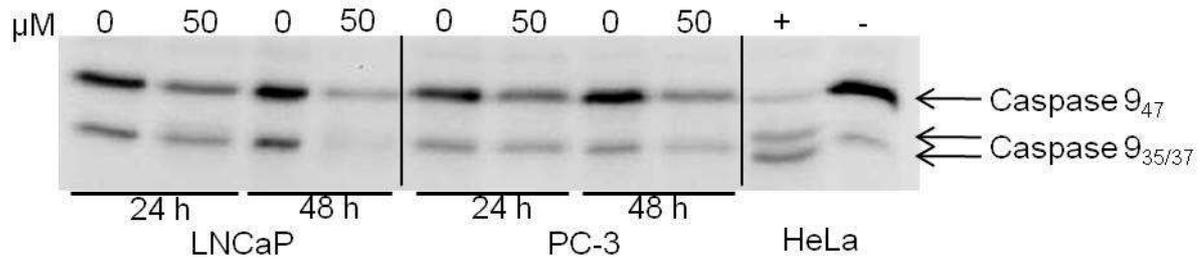


Abb. 25: Aktivierung der Caspase 9 nach TBB-Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden mit 0 und 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt, geerntet und aufgeschossen. HeLa-Zellen wurden als Positivkontrolle über 24 Stunden mit 20 μg/ml Doxorubicin (+) behandelt. 200 μg Gesamtzellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Detektiert wurde die Caspase 9 mit dem Antikörper 10-1-87 von assay designs, der die Procaspase 9 (Caspase 9₄₇) und die Spalprodukte (Caspase 9_{35/37}) erkennt.

Caspase 9 wird nach TBB-Behandlung weder in LNCaP- noch in PC-3-Zellen aktiviert. So stellt sich die Frage, warum die Aktivierung trotz Cytochrom C-Freisetzung nicht initiiert wird. Zur Klärung dieser Frage kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Eine ganze Familie, die einen Einfluss auf die Aktivierung der Caspase 9 hat, sind die Hitzeschockproteine (HSPs). Die HSPs 90 und 70 sind dabei in der Lage, mit Apaf-1 zu interagieren (80,81). Apaf-1 steht dann nicht für die Bildung des Apoptosoms zur Verfügung und es kann nicht zur Aktivierung der Caspase 9 kommen. Das HSP27 verhindert die Aktivierung der Caspase 9 dadurch, dass es freigesetztes Cytochrom C abfängt, welches dann auch nicht im Apoptosom zur Verfügung steht (82,83). Allen drei Proteinen kommt so eine anti-apoptotische Aufgabe zu. Zur Analyse der HSPs wurden LNCaP- und PC-3-Zellen mit 0 und 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt. Danach wurden sie geerntet und lysiert. Der gewonnene Zellextrakt wurde über ein 12.5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der HSPs erfolgte mit folgenden Antikörpern: HSP90: H-114 (Santa Cruz); HSP70: 2A4 (Acris Antibodies GmbH) und HSP27: G3.1 (assay designs). Für die HSPs 90 und 70 konnte keine Veränderung im Proteingehalt nach Inhibition der CK2 gezeigt werden. Das HSP27 dagegen zeigt eine Abnahme des Proteingehalts in beiden untersuchten Zelllinien (Abb. 26). In den LNCaP-Zellen nimmt der Proteingehalt bis auf ca. 20% ab, in den PC-3-Zellen bis auf etwa 60%.

5. Ergebnisse

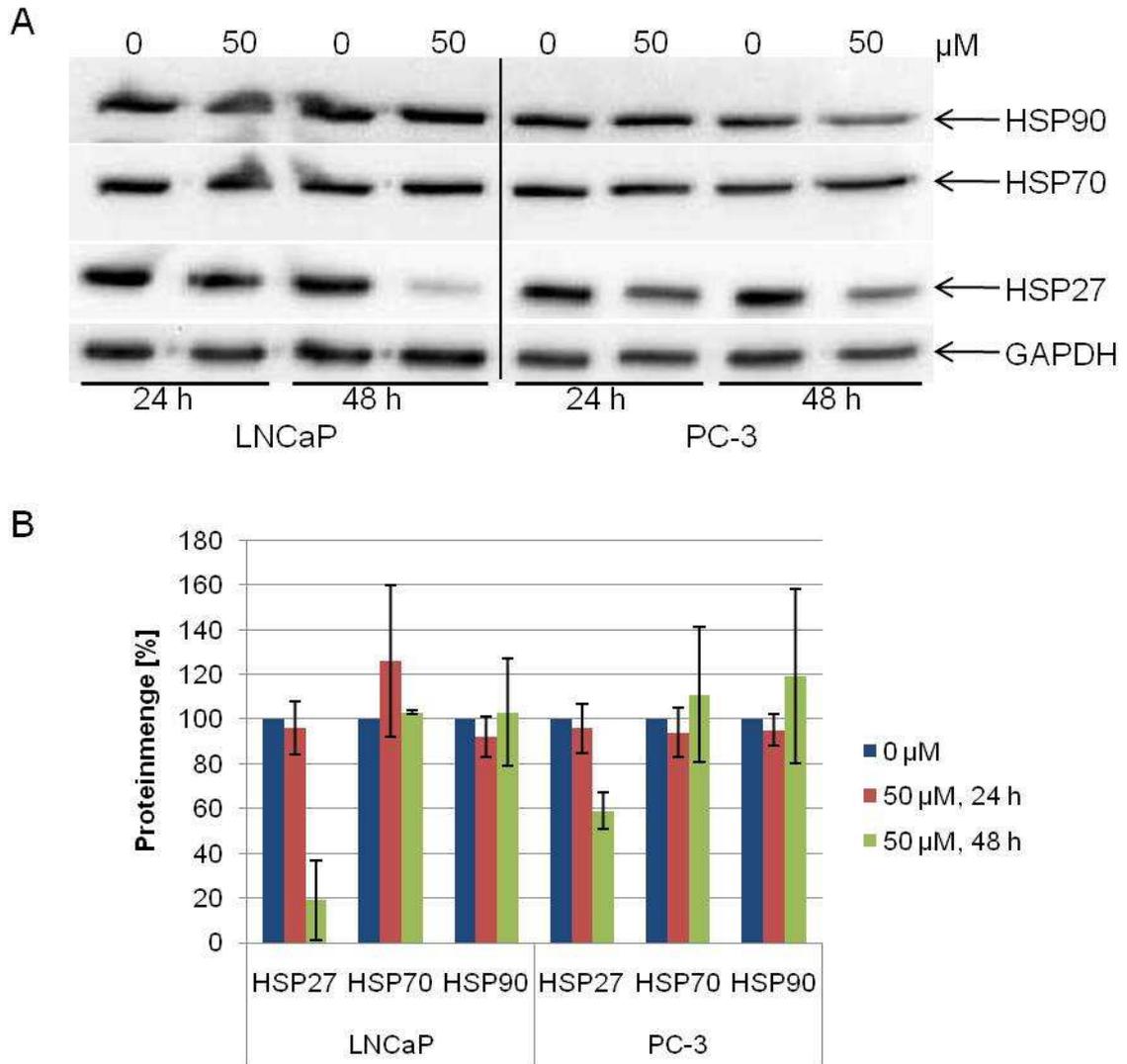


Abb. 26: A: Westernblots zur Detektion der HSPs 90, 70 und 27 nach Hemmung der CK2 durch TBB in LNCaP- und PC-3-Zellen: Nachdem LNCaP- und PC-3-Zellen über 24 und 48 Stunden mit DMSO bzw. TBB (50 μM) behandelt wurden, wurden 50 μg Zellextrakt über ein 12.5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Verwendete Antikörper: HSP90: H-114 (Santa Cruz); HSP70: 2A4 (Acris Antibodies GmbH) und HSP27: G3.1 (assay designs). GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung der Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die HSPs scheinen in Folge des gleichbleibenden bzw. abnehmenden Proteingehalts nicht für die Hemmung der Caspase 9-Aktivierung verantwortlich zu sein.

5. Ergebnisse

Da die Signalweiterleitung im mitochondrialen Weg durch die Caspase 9 nicht geschieht, ergibt sich die Frage nach alternativen Wegen, die zur Aktivierung der Caspase 3 führen. Eine Möglichkeit bietet hier die Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER). Bei ER-Stress vermittelter Apoptose wird u. a. der Transkriptionsfaktor CHOP/GADD153 induziert (61,84). CHOP ist ein Substrat der CK2, deren Phosphorylierung die Transaktivierungsfähigkeit von CHOP hemmt (85). Aus diesem Grund wird hier die Expression von CHOP untersucht. Dazu wurden Gesamtzellextrakte der LNCaP- und PC-3-Zellen nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit 50 μM TBB gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach Detektion mit dem spezifischen Antikörper B-3 ergab sich, dass nach Hemmung der CK2 mit 50 μM TBB in den LNCaP-Zellen bereits nach 24 Stunden CHOP induziert wird. Die PC-3-Zellen weisen keine solche Induktion auf (Abb. 27).

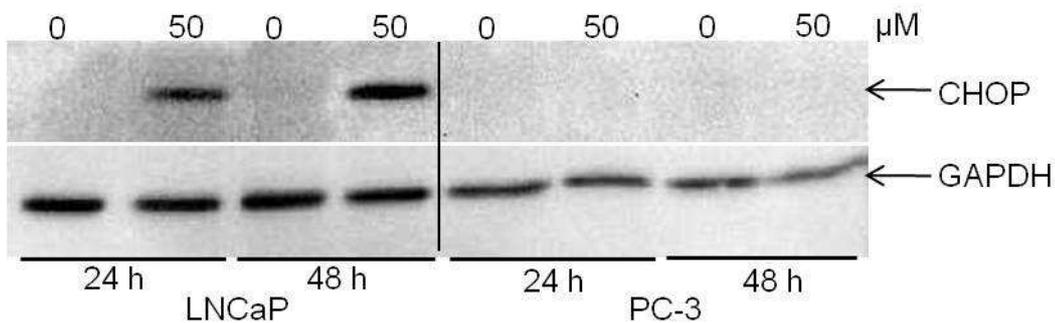


Abb. 27: Induktion von CHOP/GADD153 nach TBB-Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen: Die Zellen wurden mit 0 und 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt. Die anschließend gewonnenen Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Detektion von CHOP erfolgte mit dem Antikörper B-3 von Santa Cruz. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert.

CHOP ist in der Lage, die Expression des DR5-Todesrezeptors und dessen Ligand TRAIL zu induzieren und so den extrinsischen Signalweg der Apoptose einzuleiten. Im Folgenden wurde mittels Reporterassays untersucht, ob es nach der oben gezeigten Induktion von CHOP auch zur Aktivierung des Promotors von DR5 kommt. Hierzu wurden Zellen mit dem beschriebenen DR5-Reporterkonstrukt pGL3-DR5p (0.5 μg) 30 Stunden transfiziert (Effectene® Transfection Reagent, Qiagen) und im

5. Ergebnisse

Anschluss für 42 Stunden mit 50 μM TBB behandelt. Nach Aufschluss der Zellen mit dem entsprechenden Lysepuffer wurden die Extrakte luminometrisch analysiert, und auf Proteinkonzentration und β -Galactosidaseaktivität normalisiert. Das Diagramm (Abb. 28) zeigt eine verstärkte Promotoraktivität von DR5 in den LNCaP-Zellen, die CHOP-Induktion aufweisen. Die PC-3-Zellen zeigen im Vergleich dazu keine verstärkte Aktivität des DR5-Promotors.

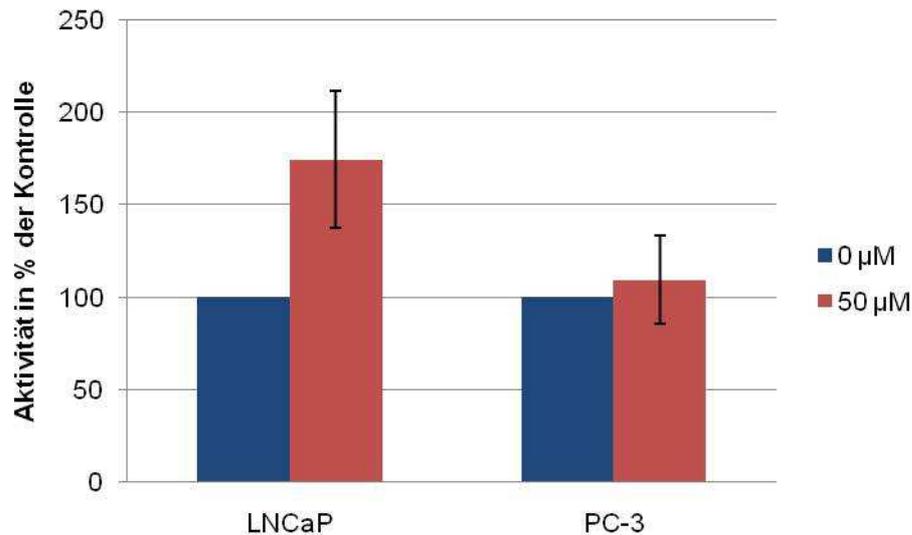


Abb. 28: Untersuchung der Beteiligung des Todesrezeptors DR5 an TBB-vermittelter Apoptose in LNCaP- und PC-3-Zellen: Die Zellen wurden über 30 Stunden mit dem Reporterkonstrukt pGL3-DR5p (0.5 μg) transfiziert (Effectene® Transfection Reagent, Qiagen) und anschließend über 42 Stunden mit 0 und 50 μM TBB behandelt. Die Extrakte wurden luminometrisch vermessen und auf Proteinmenge und β -Galactosidaseaktivität normiert. Die Reporterogenaktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde als 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Wird der rezeptorvermittelte Signalweg z. B. über den Todesrezeptor DR5 eingeleitet, kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung der Procaspase 8 im DISC-Komplex. Daher wurde die Aktivität der Caspase 8 mittels Caspase-Glo® 8-Assay analysiert. Die Zellen wurden mit 0 und 50 μM TBB behandelt und anschließend mit dem modifizierten Caspaseassay (75) untersucht. Nachdem die Caspaseaktivität im Luminometer bestimmt wurde, ergab sich, dass die LNCaP-Zellen eine um das 1.5-fach erhöhte Caspase 8-Aktivität nach TBB-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen. In den PC-3-Zellen ist dagegen keine Caspase 8-Aktivität nachzuweisen (Abb. 29).

5. Ergebnisse

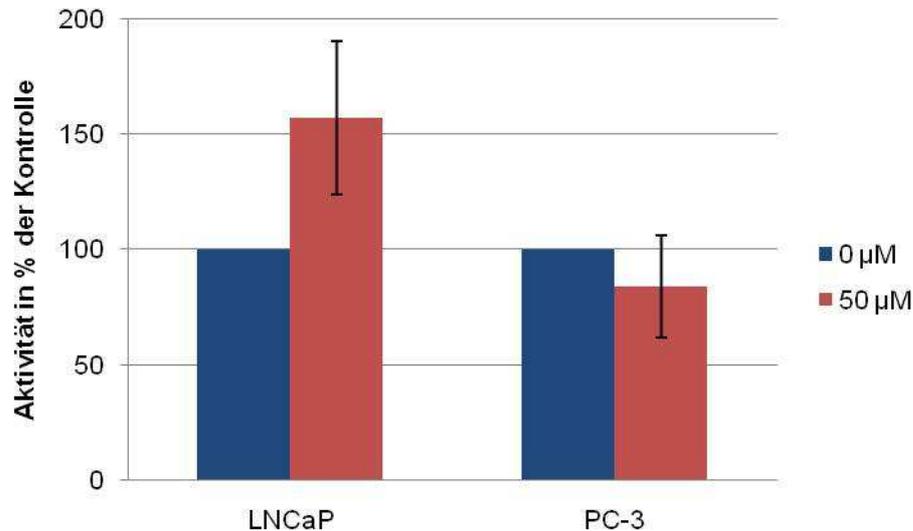


Abb. 29: Caspase 8-Assay nach TBB-Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden über 48 Stunden mit 0 und 50 µM TBB behandelt und im Anschluss mit dem Caspase-Glo® 8-Assay in modifizierter Form luminometrisch analysiert. Die Caspase 8-Aktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass LNCaP-Zellen auf Grund der TBB-Behandlung die Expression von CHOP induzieren und so den extrinsischen Weg der Apoptose über den Todesrezeptor DR5 und anschließende Spaltung der Caspase 8 durchlaufen. PC-3-Zellen dagegen exprimieren in Folge der TBB-Behandlung kein CHOP und sind so auch nicht in der Lage, den extrinsischen Signalweg zu durchlaufen.

Grundsätzlich exprimieren PC-3-Zellen aber CHOP. Dies wurde durch Tunicamycin- (86) und Capsaicin-Behandlung (87) von PC-3-Zellen gezeigt. Zur Überprüfung, ob die Einleitung der Apoptose im Prostatakarzinom von der Induktion von CHOP abhängig ist, wurde hier FLAG-CHOP in den PC-3-Zellen überexprimiert. Dies erfolgte durch Transfektion des Expressionsvektors p3XFLAG-CHOP (1 µg) mit Effectene® Transfection Reagent (Qiagen). Nach 48 Stunden wurden die Zellextrakte über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Im Anschluss erfolgte die Detektion des FLAG-CHOP-Fusionsproteins mit dem Antikörper M2 von Sigma-Aldrich gegen das FLAG-Epitop. Zur Analyse der Apoptose wurden die PARP-Spaltung sowie die Aktivierung der

5. Ergebnisse

Caspasen 3/7 gewählt. Die PARP-Spaltung wurde mittels Westernblot nach vorheriger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachgewiesen. Hier wurde der polyklonale Kaninchenantikörper von Cell Signalling Technology® verwendet. Die Aktivierung der Caspasen 3/7 wurde mittels modifiziertem Caspase-Glo® 3/7-Assay dargestellt. Abbildung 30 A zeigt die erfolgreiche Expression von FLAG-CHOP in den PC-3-Zellen. Abbildung 30 B zeigt die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase nach Expression von FLAG-CHOP und in Abbildung 30 C ist die Aktivierung der Caspasen 3/7 nach Expression von FLAG-CHOP dargestellt, die einer Spaltung der PARP vorausgeht.

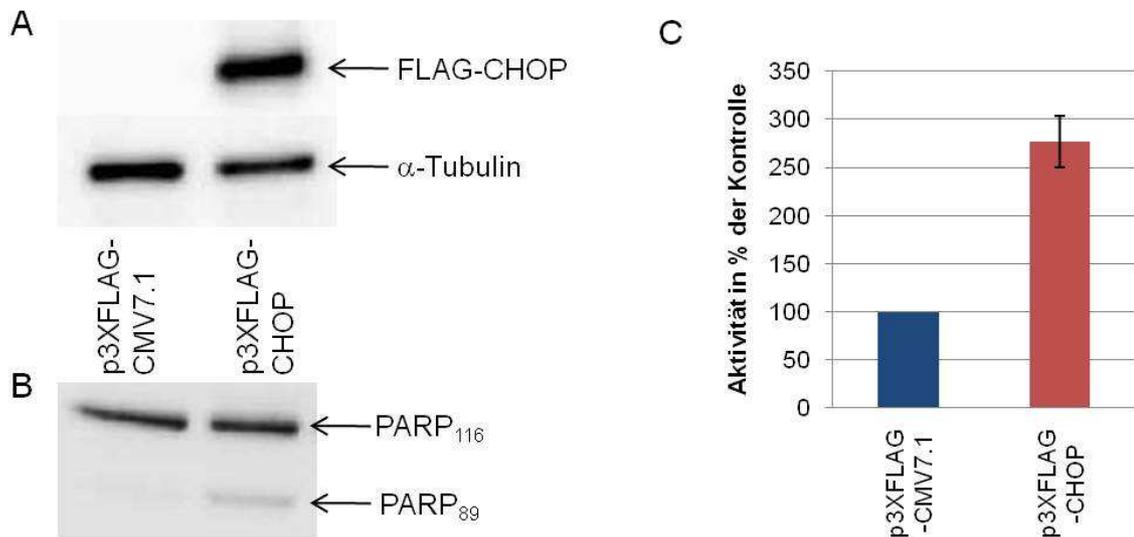


Abb. 30: Auswirkung einer CHOP-Transfektion auf PC-3-Zellen: PC-3-Zellen wurden mit dem Plasmid p3XFLAG-CHOP (1 µg) sowie dem entsprechenden Kontrollvektor über 48 Stunden transfiziert. Danach wurden die Zellen geerntet und aufgeschossen. **A: Überprüfung der Transfektion:** Die Zellextrakte wurden über ein 12.5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von FLAG-CHOP erfolgte mit dem monoklonalen Mausantikörper M2 (Sigma-Aldrich). α-Tubulin wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper DM 1A von Sigma-Aldrich detektiert. **B: PARP-Spaltung nach Expression von FLAG-CHOP:** Die Zellextrakte wurden über ein 7.5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von Vollängen-PARP (PARP₁₁₆) sowie des PARP-Spaltproduktes (PARP₈₉) erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenantikörper von Cell Signalling Technology®. **C: Caspase 3/7-Assay:** Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellextrakte mit dem Caspase-Glo® 3/7-Assay in modifizierter Form luminometrisch analysiert. Die Caspaseaktivität der Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Die nähere Untersuchung der Signalwege, die nach Hemmung der CK2 eingeleitet werden und die Apoptose induzieren zeigt, dass die LNCaP-Zellen im Vergleich zu den PC-3-Zellen nur deshalb in der Lage sind die Apoptose zu vollenden, weil hier über die Aktivierung der ER-Stress-Antwort der extrinsische Signalweg der Apoptose angeschaltet wird.

Es gilt nun herauszufinden, warum die Induktion von CHOP in den PC-3-Zellen nicht abläuft. Im CHOP-Promotor ist eine AP-1-Bindestelle vorhanden, durch die die Expression von CHOP eingeleitet werden kann (88). AP-1 (activating protein-1) ist ein Dimer, das aus Mitgliedern der Jun und Fos-Familie bestehen kann, genauso wie aus Mitgliedern der ATF-, JDP- oder Maf-Familie (89,90). Die Dimerisierung erfolgt dabei über die Leuzin-Zipper-Domäne, die all diesen Transkriptionsfaktoren gemein ist. Nur nach erfolgter Dimerisierung kann die Bindung an die AP-1-Bindestelle über die basische Region erfolgen, die ebenfalls alle Transkriptionsfaktoren aufweisen. Zur Untersuchung der Frage, ob AP-1 bei der Expression von CHOP nach CK2-Inhibition durch TBB eine Rolle spielt, wurde der Proteingehalt von c-Jun, das als Hauptbestandteil des AP-1 gilt, betrachtet. Hierzu wurden sowohl LNCaP- als auch PC-3-Zellen mit 0 und 50 μ M TBB über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und lysiert. Der erhaltene Zellextrakt wurde über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Westernblot ist in folgender Abbildung 31 A dargestellt und zeigt, dass es nach TBB-Behandlung von LNCaP-Zellen zur Zunahme der Proteinmenge von c-Jun kommt. Eine densitometrische Auswertung (Abb. 31 B) ergab, dass bereits nach 24 Stunden TBB-Behandlung fast eine Verdopplung der c-Jun-Proteinmenge vorliegt, die sich nach einer längeren Behandlung über 48 Stunden auf das 3.5-fache erhöht. In den PC-3-Zellen kommt es dagegen zur Abnahme des Proteingehalts. Hier ergab die densitometrische Auswertung, dass nach 48-stündiger Behandlung mit TBB nur noch etwa die Hälfte der c-Jun-Proteinmenge im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen vorliegt.

5. Ergebnisse

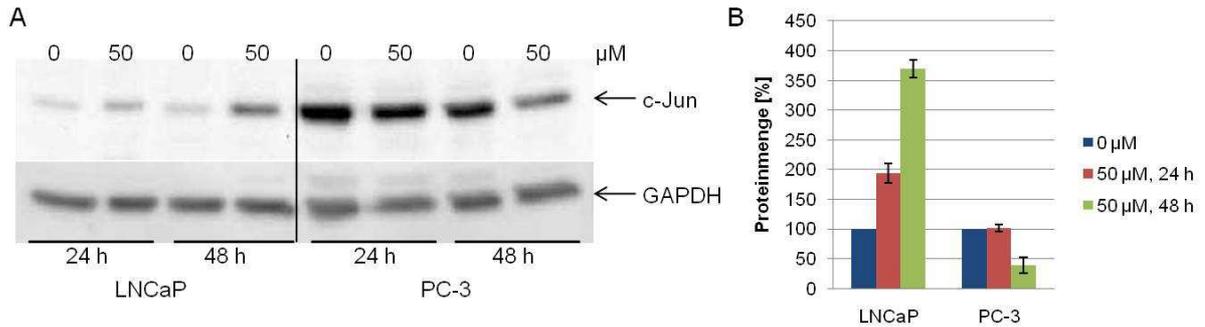


Abb. 31: Westernblot zur Detektion von c-Jun nach Hemmung der CK2 durch TBB in LNCaP- und PC-3-Zellen: **A:** Die Zellen wurden mit 0 und 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend gewonnene Zellextrakte wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von c-Jun erfolgte mit dem Antikörper H-79 von Santa Cruz. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung der Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7. Das Diagramm zeigt den Mittelwert aus drei densitometrischen Auswertungen.

So könnte die Zunahme des c-Jun in den LNCaP-Zellen eine vermehrte Bildung des AP-1-Komplexes bedeuten, was in PC-3-Zellen durch die Abnahme der Proteinmenge möglicherweise nicht der Fall ist.

Eine weitere Proteinfamilie, die an der Bildung des AP-1-Komplexes beteiligt sein kann, ist die schon erwähnte ATF-Familie. Ein Mitglied dieser Familie, ATF3, dimerisiert mit c-Jun (91). ATF3 wird außerdem im Zusammenhang mit Stress und durch verschiedene Stimuli induzierter Apoptose beschrieben (92,93). Nach Hemmung der CK2 in LNCaP- und PC-3-Zellen mit 50 μM TBB über 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. ATF3 wurde mit dem polyklonalen Antikörper C-19 von Santa Cruz nachgewiesen. Folgende Abbildung 32 A zeigt im Westernblot, dass ATF3 in LNCaP-Zellen nach CK2-Hemmung induziert wird. Nach Quantifizierung (Abb. 32 B) liegt die Induktion bei knapp dreifach und wird nach längerer Inkubationszeit mit TBB bis auf etwa das Vierfache erhöht. In den PC-3-Zellen übersteigt die Induktion, die nach 24 Stunden Behandlung vorliegt nicht den basalen Level in den LNCaP-Zellen. Nach 48 Stunden ist in den PC-3-Zellen ATF3 mehr zu detektieren.

5. Ergebnisse

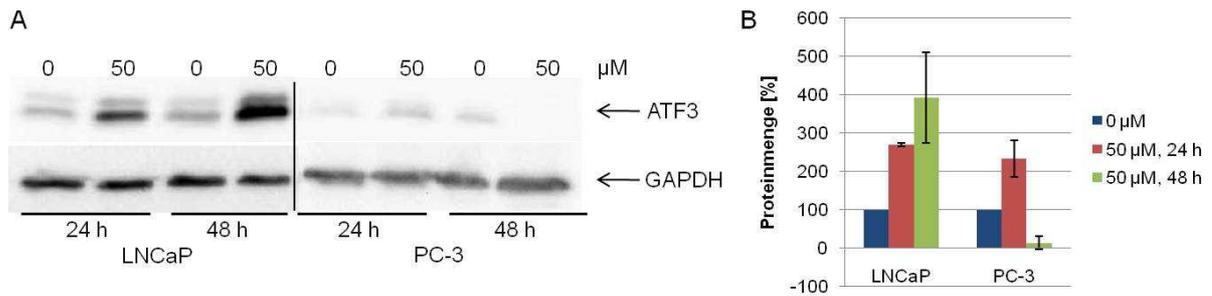


Abb. 32: Westernblot zur Detektion von ATF3 in LNCaP- und PC-3-Zellen nach Hemmung der CK2 durch TBB: A: Die Zellen wurden mit 0 und 50 μ M TBB über 24 und 48 Stunden behandelt. Die anschließend gewonnenen Zellextrakte wurden über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von ATF3 erfolgte mit dem Antikörper C-19 von Santa Cruz. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung der Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus zwei densitometrischen Auswertungen.

Der erhöhte ATF3-Proteingehalt in LNCaP-Zellen, deutet darauf hin, dass ATF3 in diesen Zellen pro-apoptotisch wirkt und zusammen mit c-Jun einen AP-1-Komplex bilden kann, der zu verstärkter Expression von CHOP führt. In den PC-3-Zellen liegt ATF3 nach Hemmung der CK2 nicht stark vermehrt vor, so dass es weder eine pro-apoptotische Wirkung ausüben noch in einem AP-1-Komplex vorliegen kann.

5.5 Alternatives Tumormodell

Um CK2-Hemmung therapeutisch nutzen zu können, ist es wichtig, dass normale Zellen durch die Hemmung der CK2 nicht beeinflusst werden. Es sollten nur Tumorzellen durch die Inhibition in Apoptose gehen. Im Modell des Prostatakarzinoms standen keine normalen Zellen zur Verfügung, so dass ein anderes System ausprobiert werden sollte. Ein anderes System bietet ferner die Möglichkeit zu untersuchen, ob die in Prostatakarzinomzellen erlangten Erkenntnisse auf andere Tumore zu übertragen sind, oder ob sie spezifisch für diesen Tumor sind. So wurden primäre Hautfibroblasten (1BrhTert (mit Telomerase immortalisiert)) und Zellen eines malignen Melanoms der Haut (SK-Mel28) verwendet.

Als erstes wurde der Status an CK2 in diesen Zellen sowie die Kinaseaktivität überprüft. Hierzu wurden ohne Behandlung kultivierte Zellen geerntet,

5. Ergebnisse

aufgeschlossen und die Zellextrakte im Westernblot bzw. Kinaseassay verwendet. Abb. 33 A zeigt den Westernblot gegen die Untereinheiten der CK2 α , α' und β . Abb. B zeigt die CK2-Kinaseaktivität im Vergleich der 1BrhTert- zu den SK-Mel28-Zellen. Auffällig ist, dass die primären Hautfibroblasten fast keine CK2 α -Untereinheit exprimieren. Die Untereinheiten α' und β liegen allerdings in gleicher Menge vor, wie in den SK-Mel28-Zellen. Beim Vergleich der CK2-Kinaseaktivität von 30 μ g Gesamtzellextrakt wird deutlich, dass die Tumorzellen knapp dreimal so viel CK2-Kinaseaktivität aufweisen, wie die 1BrhTert-Zellen (Abb. 33 B). Im Zusammenhang mit dem gezeigten Westernblot liegt die geringere CK2-Aktivität möglicherweise daran, dass die 1BrhTert-Zellen kaum CK2 α exprimieren im Vergleich zu den Melanomzellen. Insgesamt würde die geringere CK2-Aktivität die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse widerspiegeln, dass die CK2-Aktivität in Tumoren erhöht ist.

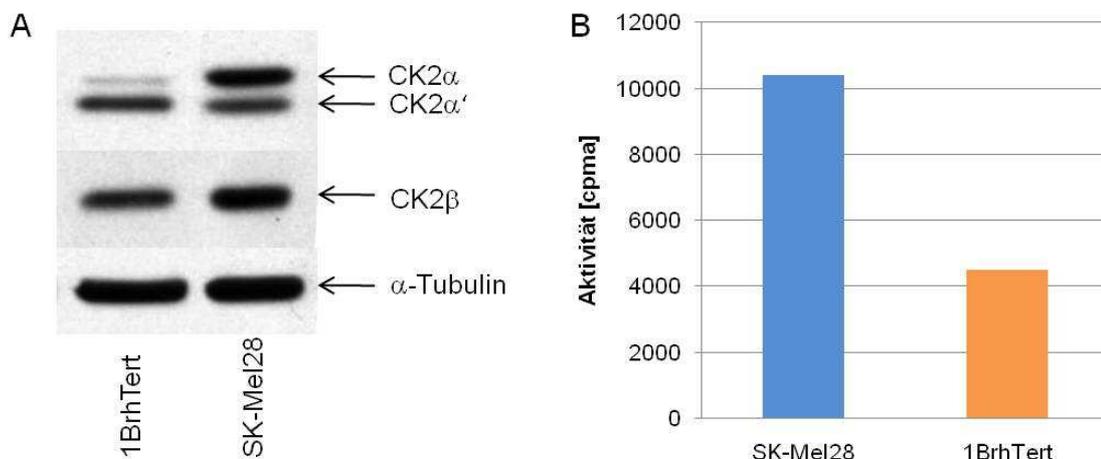


Abb. 33: Vergleich der CK2-Untereinheiten sowie der CK2-Kinaseaktivität in den Hautzellen: 1BrhTert- und SK-Mel28-Zellen wurden geerntet und aufgeschlossen. **A: Westernblot zur Detektion der CK2-Untereinheiten:** 50 μ g Gesamtzellextrakt wurden über ein 12.5% SDS—Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der CK2-Untereinheiten wurden die Kaninchenserum #212 (α), #30 (α') und #269 (β) verwendet. **B: CK2-Kinaseaktivitätstest:** Die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [32 P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD.

5. Ergebnisse

Ein weiterer wichtiger Punkt im Vergleich von normalen zu Tumorzellen ist der Status an p53. Dieses sollte in normalen Zellen wenig bis gar nicht vorhanden sein, wogegen p53 in Tumoren verstärkt auftritt. Um dies zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Westernblot von den Zellextrakten normal kultivierter Zellen angefertigt. Der Westernblot ist in Abb. 34 dargestellt und zeigt, dass das p53, welches die 1BrhTert-Zellen exprimieren, im Vergleich zu den SK-Mel28-Zellen unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Der Westernblot zeigt also das erwartete Bild, in den normalen Zellen liegt kaum p53 vor.

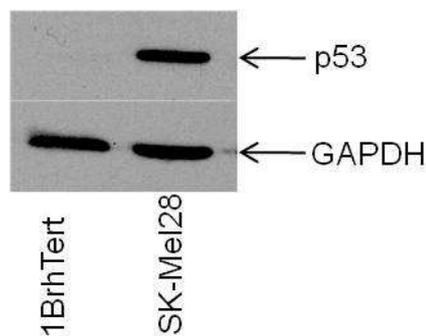


Abb. 34: Westernblot zum Vergleich des p53-Proteingehalts in den Hautzellen: Normal kultivierte Zellen wurden geerntet und aufgeschossen. 50 μ g Gesamtzellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von p53 erfolgte mit dem monoklonalen Mausantikörper DO-1 (Santa Cruz). GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert.

Im Folgenden wurde nun die Hemmung der CK2 mittels zweier Inhibitoren, TBB und DMAT, untersucht. Es wurden zwei Inhibitoren verwendet, um eventuell auftretende Nebeneffekte ausschließen und die im Folgenden untersuchten Auswirkungen der Inhibition auf die Hautzellen tatsächlich der Proteinkinase CK2 zuschreiben zu können. Hierzu wurden die Zellen mit DMSO, 50 μ M TBB oder 30 μ M DMAT über 24 bzw. 48 Stunden behandelt und danach geerntet. In den im Anschluss gewonnenen Zellextrakten wurde zunächst die CK2-Kinaseaktivität bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in folgendem Diagramm (Abb. 35) gezeigt. Die Behandlung der SK-Mel28-Zellen resultiert in einer Reduktion der Kinaseaktivität auf etwa 45% für TBB und etwa 25% für DMAT. Eine verlängerte Inkubationszeit hat keinen förderlichen Einfluss auf die Hemmung. Im Fall der 1BrhTert-Zellen konnte für die Kinaseaktivität

5. Ergebnisse

nach TBB-Behandlung ein Rückgang von 15% und für DMAT ein Rückgang von 45% festgestellt werden.

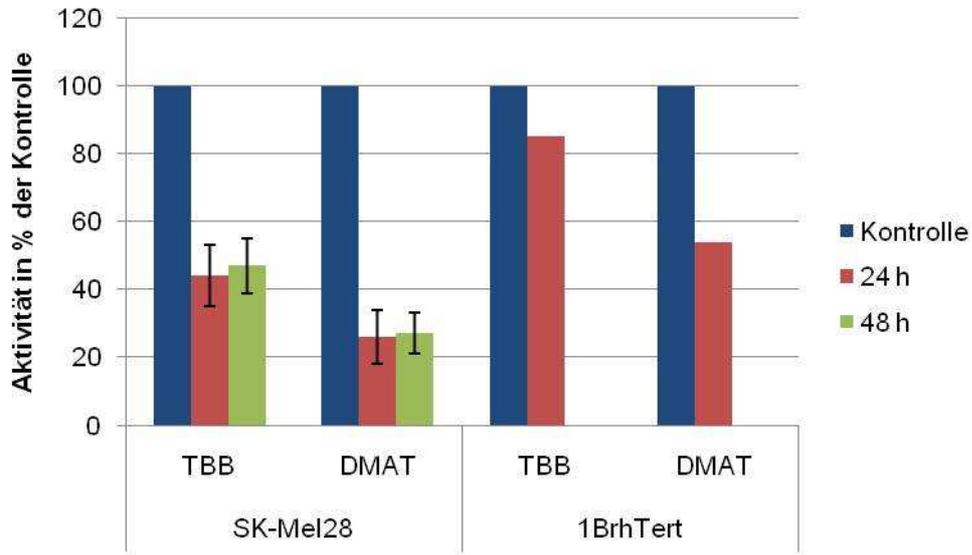


Abb. 35: CK2-Kinaseaktivitätstest nach TBB/DMAT-Behandlung von Hautzellen: Die Zellen wurden jeweils für 24 bzw. 48 Stunden mit 50 μM TBB oder 30 μM DMAT behandelt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit entsprechender Menge DMSO behandelt wurden. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ in das Substratpeptid RRRDDSDDDD. Die Aktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen für SK-Mel28 und Werte aus einem Versuch für 1BrhTert.

Wie im Modell des Prostatakarzinoms sollte auch hier nachgewiesen werden, welchen Einfluss die Inhibition der CK2 auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat. Dazu wurden die Zellen über die Zeiträume 24, 48 und 72 Stunden mit 50 μM TBB bzw. 30 μM DMAT und als Kontrolle mit entsprechender Menge DMSO behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Das Ergebnis des Assays ist in Abb. 36 wiedergegeben. Die SK-Mel28-Zellen zeigen einen deutlichen, zeitabhängigen Rückgang der Lebensfähigkeit nach TBB-Behandlung. Diese Einschränkung der Lebensfähigkeit ist bei der Verwendung von DMAT noch größer. Im Gegensatz dazu zeigen die 1BrhTert-Zellen keinerlei Abnahme in ihrer Viabilität, weder bei TBB-Gabe noch bei Behandlung mit DMAT.

5. Ergebnisse

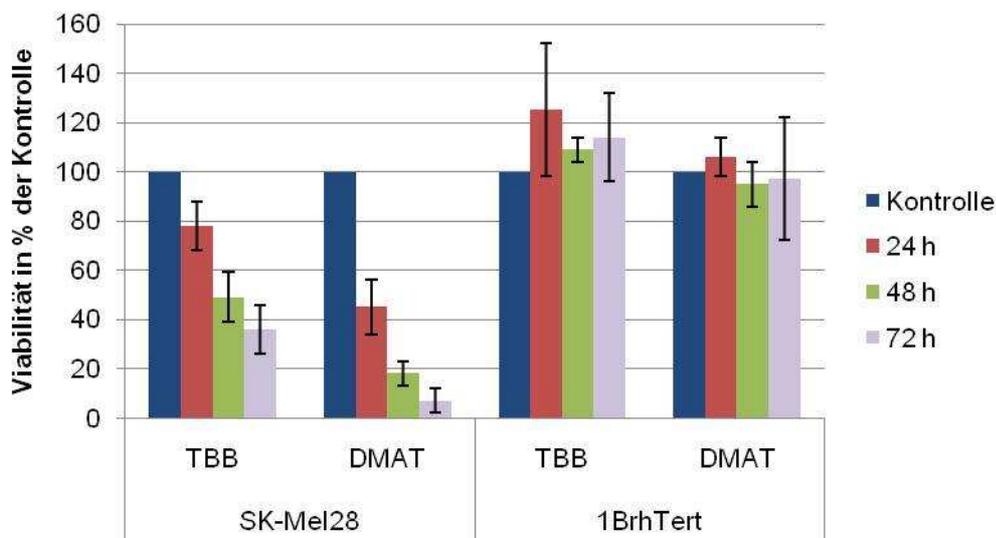


Abb. 36: Untersuchung zur Lebensfähigkeit der Hautzellen nach Hemmung der CK2 durch TBB/DMAT: Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert, behandelt (50 μM TBB bzw. 30 μM DMAT über 24 und 48 Stunden) und ein MTT-Assay durchgeführt. Die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Versuchen für SK-Mel28-Zellen und aus drei voneinander unabhängigen Versuchen für 1BrhTert-Zellen.

Nachdem im MTT-Assay keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob der Rückgang in der Lebensfähigkeit auf Grund von Apoptose oder Zellzyklus-Arrest erfolgt, wurde ein Westernblot angefertigt, um die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase zu untersuchen, deren Spaltung ein Zeichen für Apoptose ist. Nach Behandlung der Zellen mit DMAT oder TBB über 24 und 48 Stunden ergab sich, dass die Spaltung der PARP nur in den SK-Mel28-Zellen auftritt, nicht in den 1BrhTert. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass die Spaltung der PARP sehr viel stärker ist, wenn die Zellen mit 30 μM DMAT behandelt wurden, im Gegensatz zu mit 50 μM TBB behandelten Zellen. Der Westernblot (Abb. 37) unterstreicht also die Ergebnisse aus dem MTT-Assay (Abb. 36), in dem die Zellen mit DMAT wesentlich stärker in ihrer Viabilität eingeschränkt werden als mit TBB.

5. Ergebnisse

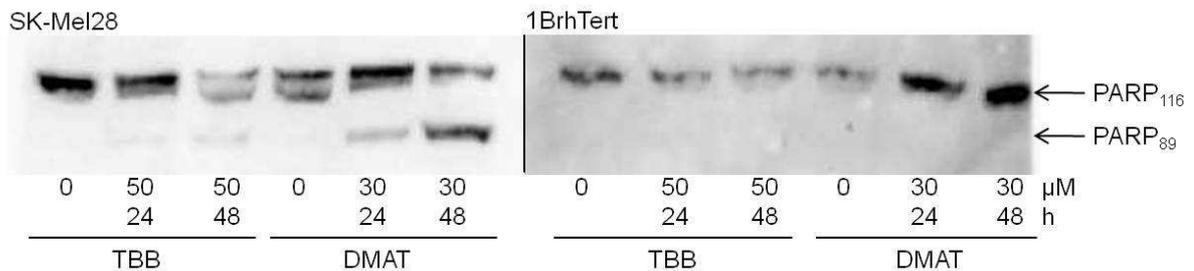


Abb. 37: Westernblot zur Detektion der PARP-Spaltung nach TBB/DMAT-Behandlung der Hautzellen: SK-Mel28- und 1BrhTert-Zellen wurden mit 50 μ M TBB oder 30 μ M DMAT bzw. mit DMSO über 24 und 48 Stunden behandelt, geerntet und aufgeschlossen. 150 μ g Zellextrakt wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet. Mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper wurde das Volllängenprotein (PARP₁₁₆) sowie das Spaltprodukt (PARP₈₉) von PARP detektiert.

Bei den Prostatakarzinomzellen, die wt p53 exprimieren, kam es zu dessen Zunahme im Proteingehalt. Von den SK-Mel28-Zellen ist bekannt, dass diese ebenfalls wt p53 exprimieren. Gleiches muss für die primären Hautfibroblasten 1BrhTert angenommen werden. So wurde untersucht, ob diese beiden Zelllinien mit einer Zunahme der Proteinmenge von p53 auf die Hemmung der CK2 mittels TBB reagieren. Dazu wurden die Zellen mit 50 μ M TBB über 24 und 48 Stunden behandelt, geerntet und aufgeschlossen. Der Gesamtzellextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein Westernblot angefertigt. Der Westernblot in Abb. 38 zeigt eine deutliche Zunahme der p53-Proteinmenge in den SK-Mel28-Zellen sowie eine gleichbleibende Proteinmenge in den 1BrhTert-Zellen.

5. Ergebnisse

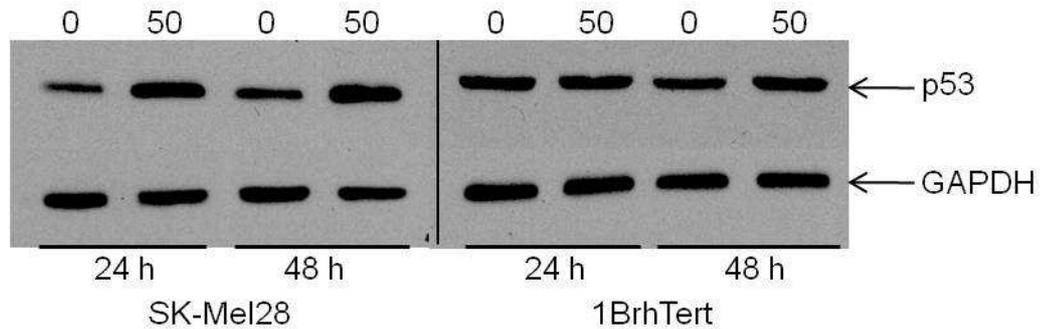


Abb. 38: Westernblot zur Detektion von p53 nach Inhibition der CK2 durch TBB in Hautzellen: SK-Mel28- und 1BrhTert-Zellen wurden über 24 und 48 Stunden mit 50 μ M TBB oder entsprechender Menge DMSO behandelt. Nach Ernten und Aufschluss wurden 50 μ g Gesamtzellextrakt über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von p53 erfolgte mit dem monoklonalen Mausantikörper DO-1 (Santa Cruz). Als Ladekontrolle wurde GAPDH mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz nachgewiesen.

Dieses Ergebnis aus den SK-Mel28-Zellen entspricht also dem Ergebnis, was bei Behandlung des Prostatakarzinoms erzielt wurde. Es kommt unabhängig von der Art des Tumors zur Induktion von wt p53 nach Hemmung der CK2 durch TBB. Da die 1BrhTert-Zellen nicht in Apoptose gehen, war hier auch kein Anstieg im p53 Proteingehalt zu vermuten.

Nach ersten Erkenntnissen scheinen normale Zellen nicht in Apoptose zu gehen, wenn die CK2 inhibiert wird. Des Weiteren scheint eine tumorübergreifende Wirkung von CK2-Inhibitoren sowohl auf Kinaseaktivität, wie Lebensfähigkeit und p53 Proteinmenge zu bestehen.

5.6 Alternative Möglichkeiten zur Hemmung der Proteinkinase CK2

5.6.1 Inhibition der CK2 durch Quinalizarin

Die Suche nach Inhibitoren, die eine weniger ungewünschte Hemmung anderer Kinasen aufweisen als ihre Vorgänger, bringt immer wieder neue Hemmstoffe auf den Markt (38,40,94- 96). So wurde 2009 Quinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon) nach screenen einer Datenbank und durch Strukturanalysen als neuer CK2-Hemmstoff publiziert (40). Nach der Beschreibung von TBB als CK2-Hemmstoff wurde dessen inhibierende Wirkung auf Kinasen nur im Vergleich zu ca. 20 anderen Kinasen getestet. Allerdings wurde in weiteren Untersuchungen mit über 70 Kinasen festgestellt, dass seine Wirkung auf einige dieser Kinasen ebenso drastisch war, wie die Wirkung auf CK2 (38). Im Falle des Quinalizarin wurden gleich über 70 Kinasen getestet und es kam nur zu einer fast vollständigen Hemmung von CK2, wogegen die anderen Kinasen so gut wie nicht gehemmt wurden (40). Im Folgenden wurde dieser Naturstoff in LNCaP- und PC-3-Zellen auf seine Auswirkung auf die CK2-Kinaseaktivität und die Lebensfähigkeit der Prostatakarzinomzellen hin getestet, um definitiv sagen zu können, dass die mit TBB gesehenen Effekte tatsächlich auf der Hemmung der CK2 beruhen und nicht durch etwaige Nebeneffekte hervorgerufen werden.

Zur Testung der Hemmwirkung von Quinalizarin, wurden LNCaP- und PC-3-Zellen mit Quinalizarin in steigenden Konzentrationen (10-50 μM) über 24 Stunden behandelt. Nachdem die Zellen geerntet und aufgeschlossen wurden, wurde ein Kinaseaktivitätstest durchgeführt. Das Diagramm (Abb. 39) zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der CK2-Aktivität in beiden Zelllinien bis auf 20-30% Restaktivität.

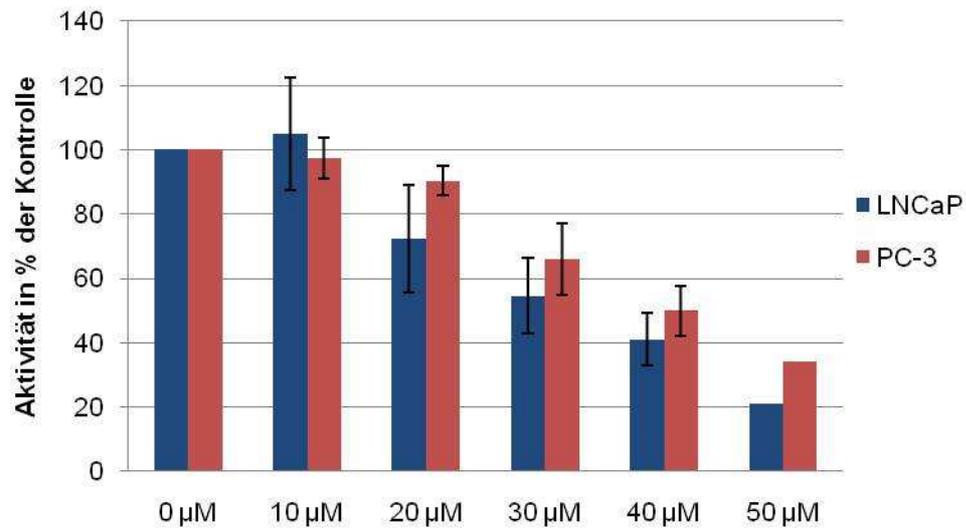


Abb. 39: CK2-Kinaseaktivitätstest nach Quinalizarin-Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen: Die Zellen wurden jeweils für 24 und 48 Stunden mit 10-50 µM Quinalizarin behandelt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit entsprechender Menge DMSO behandelt wurden. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [32 P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die CK2-Aktivität der DMSO-behandelten Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Messung für 50 µM wurde einmal durchgeführt.

Nachdem die CK2-Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration abnimmt, wurde die Auswirkung der Hemmung der CK2 auf die Lebensfähigkeit der Zellen überprüft. Nach Behandlung der Zellen mit Quinalizarin in steigenden Konzentrationen (10-50 µM) wurde ein MTT-Assay zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt (Abb. 40). Dabei ergab sich eine konzentrations- wie zeitabhängige Einschränkung der Viabilität in LNCaP- und PC-3-Zellen bis auf weniger als 10%.

5. Ergebnisse

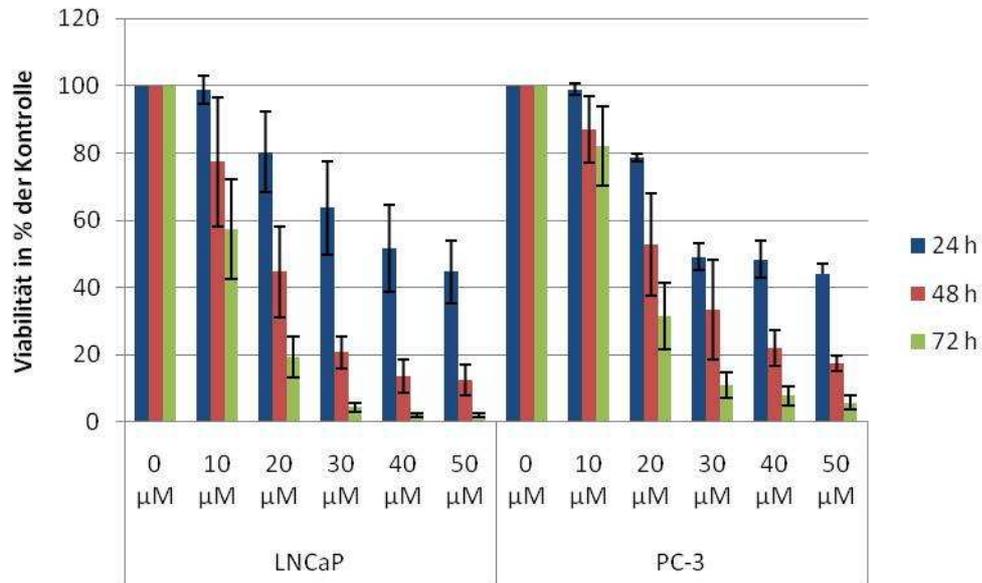


Abb. 40: Untersuchung zur Lebensfähigkeit der Prostatakarzinomzellen nach Quinalizarin-Behandlung: Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert, behandelt (10-50 µM Quinalizarin über 24, 48 und 72 Stunden) und ein MTT-Assay durchgeführt. Die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie nach TBB-Behandlung sollte auch nach Quinalizarin-Behandlung untersucht werden, ob der Rückgang der Lebensfähigkeit, der im MTT-Assay gefunden wurde, ebenfalls auf Apoptose beruht. Als apoptotisches Ereignis wurde auch hier die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase betrachtet. Im Westernblot (Abb. 41) wird deutlich, dass die LNCaP-Zellen mit der Spaltung von PARP auf die Hemmung der CK2 durch Quinalizarin reagieren, also Apoptose einleiten. Bei den PC-3-Zellen kann man aufgrund der sehr schwachen Spaltung von PARP nicht von Apoptose sprechen.

5. Ergebnisse

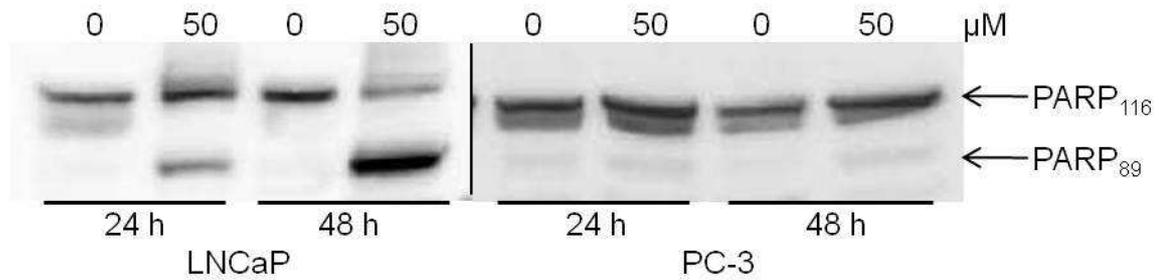


Abb. 41: Westernblot zur Detektion der PARP-Spaltung nach Quinalizarin-Behandlung von Prostatakarzinomzellen: LNCaP- und PC-3-Zellen wurden mit 50 µM Quinalizarin bzw. mit DMSO über 24 und 48 Stunden behandelt, geerntet und aufgeschlossen. 150 µg Zellextrakt wurden über ein 7.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper wurde das Volllängenprotein (PARP₁₁₆) sowie das Spaltprodukt (PARP₈₉) detektiert.

Beim Vergleich dieser Daten mit den Daten, die nach TBB-Behandlung erhalten wurden, kann festgestellt werden, dass die LNCaP-Zellen ebenso in Apoptose gehen, wenn sie mit Quinalizarin behandelt werden. Dabei wird die Lebensfähigkeit bei ähnlicher CK2-Hemmung noch viel stärker eingeschränkt. Die PC-3-Zellen dagegen wurden nach TBB nicht in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt. Nach Quinalizarinbehandlung werden auch diese Zellen in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt, dabei scheint dieser Rückgang aber nicht auf Apoptose zu beruhen.

5.6.2 Inhibition der Proteinkinase CK2 durch siRNA

Die verwendeten Inhibitoren üben eine hemmende Wirkung auf die CK2-Aktivität aus, indem sie mit ATP um dessen Bindungsstelle in der katalytischen Domäne der CK2 konkurrieren. Da viele Kinasen ATP als Phosphatdonator nutzen und eine entsprechende Bindungsstelle aufweisen, muss die Spezifität der Inhibitoren immer in Frage gestellt bleiben. Infolgedessen wurde nun versucht, die katalytischen Untereinheiten α und α' mittels entsprechender siRNA herunterzuregulieren. Die siRNAs gegen die α - bzw. die α' -Untereinheit der Proteinkinase, sowie eine Kontroll-siRNA wurden über die Firma Qiagen bezogen, ebenso das entsprechende Transfektionsreagenz HiPerFect®. Zunächst wurden die Konzentrationen der siRNAs ausgetestet, um eine größtmögliche Herunterregulation zu erreichen. 10 und 25 nM siRNA wurden mit dem HiPerFect® Transfection Reagent der Firma Qiagen

5. Ergebnisse

für 72 Stunden transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und im Westernblot analysiert. Die α - und α' -Untereinheiten wurden mit den Kaninchenseren #212 (α) und #30 (α') sichtbar gemacht. Man sieht in Abb. 42 eine Herunterregulation der katalytischen Untereinheiten auf etwa 50%. Die Quantifizierung des Westernblots (Abb. 42 B) wurde mit der Software Quantity One-4.6.7 durchgeführt.

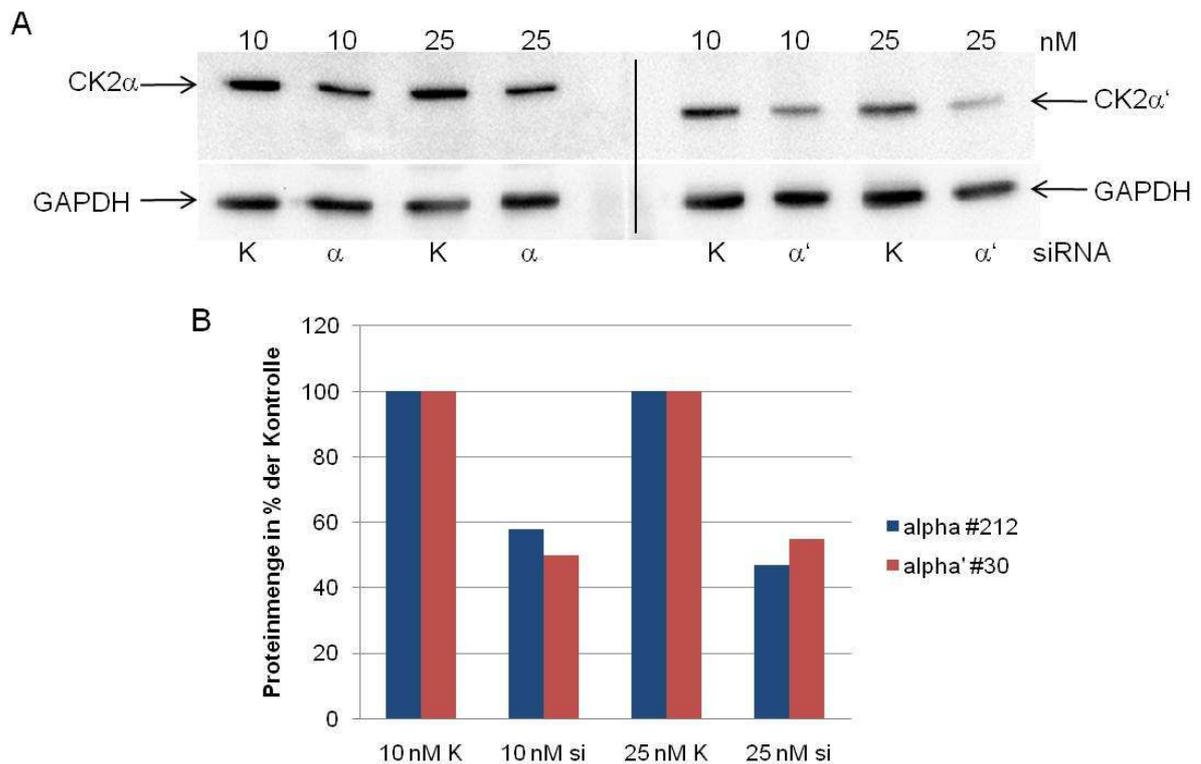


Abb. 42: Herunterregulation von CK2 α und CK2 α' mittels siRNA: LNCaP-Zellen wurden unter Verwendung von HiPerFect® über 72 Stunden mit siRNA gegen CK2 α , CK2 α' bzw. Kontroll-siRNA (K) (10 bzw. 25 nM) transfiziert **A: Westernblot zur Detektion von CK2 α und CK2 α' :** 50 μ g Zellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der Untereinheiten dienten die Kaninchenseren #212 und #30. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung des Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7.

5. Ergebnisse

Die oben erhaltene Herunterregulation wurde für weiterführende Experimente als nicht ausreichend betrachtet, so dass versucht wurde durch Einsatz höherer Konzentrationen von siRNA eine bessere Herunterregulation zu erzielen. Es wurden Konzentrationen von 40 und 50 nM ausgetestet. Die Transfektion der LNCaP-Zellen erfolgte über 72 Stunden mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect®. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Der gewonnene Zellextrakt wurde über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten wurden mit den Kaninchenseren #212 (α) und #30 (α') sichtbar gemacht. Als Resultat (Abb. 43) ergab sich mit beiden siRNA-Konzentrationen für die katalytischen Untereinheiten ein Restproteingehalt von etwa 30%, was im Hinblick auf Folgeexperimente als ausreichend betrachtet wurde.

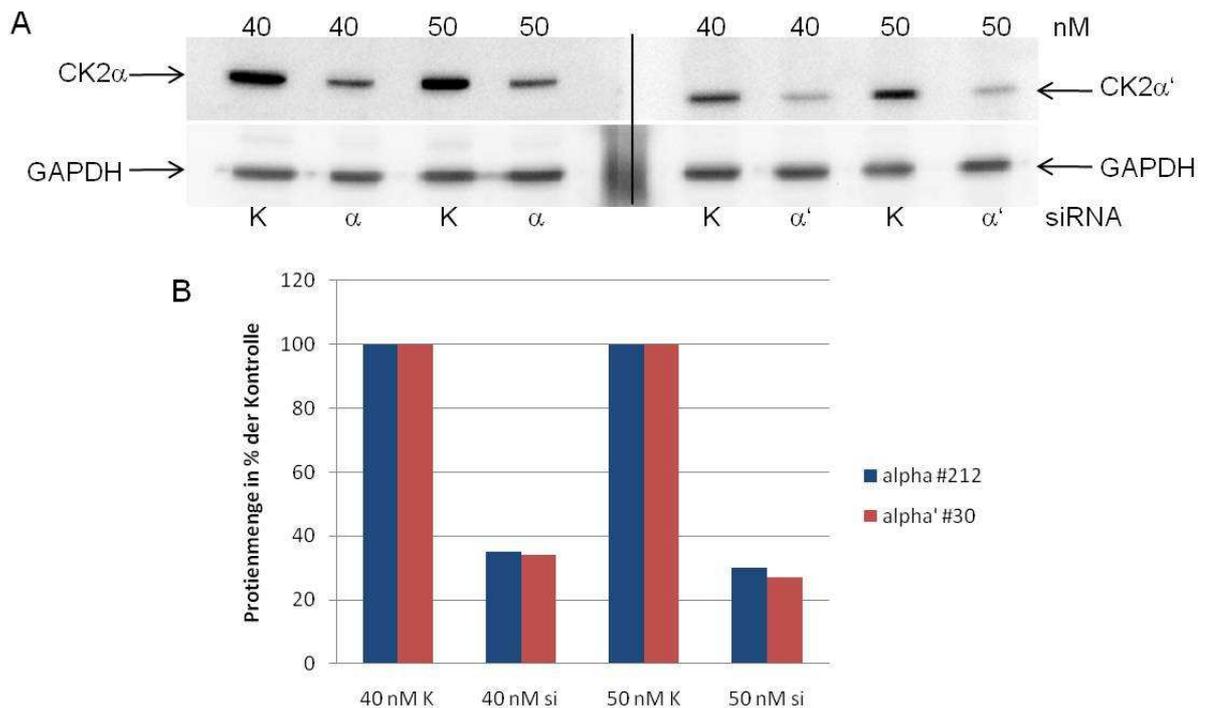


Abb. 43: Herunterregulation von CK2 α und CK2 α' mittels siRNA: LNCaP-Zellen wurden unter Verwendung von HiPerFect® über 72 Stunden mit siRNA gegen CK2 α , CK2 α' bzw. Kontroll-siRNA (K) (40 bzw. 50 nM) transfiziert **A: Westernblot zur Detektion von CK2 α und CK2 α' :** 50 μ g Zellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der Untereinheiten dienten die Kaninchenseren #212 und #30. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung des Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7.

5. Ergebnisse

Ebenso wie nach der Behandlung mit den CK2-Inhibitoren, wurde auch nach Transfektion der siRNAs gegen die CK2-Untereinheiten die CK2-Kinaseaktivität bestimmt, indem der Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in das Substratpeptid RRRDDDSDDD gemessen wurde. LNCaP-Zellen wurden zunächst mit 40 bzw 50 nM siRNA gegen CK2 α bzw. gegen CK2 α' mit HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen) transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschossen. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Das folgende Diagramm in Abb. 44 zeigt eine Verminderung der CK2-Kinaseaktivität um ca. 30%, wenn die LNCaP-Zellen mit siRNA gegen die CK2 α -Untereinheit transfiziert wurden. Wurde dagegen die CK2 α' -Untereinheit herunterreguliert, kann kaum ein Rückgang in der CK2-Kinaseaktivität gemessen werden.

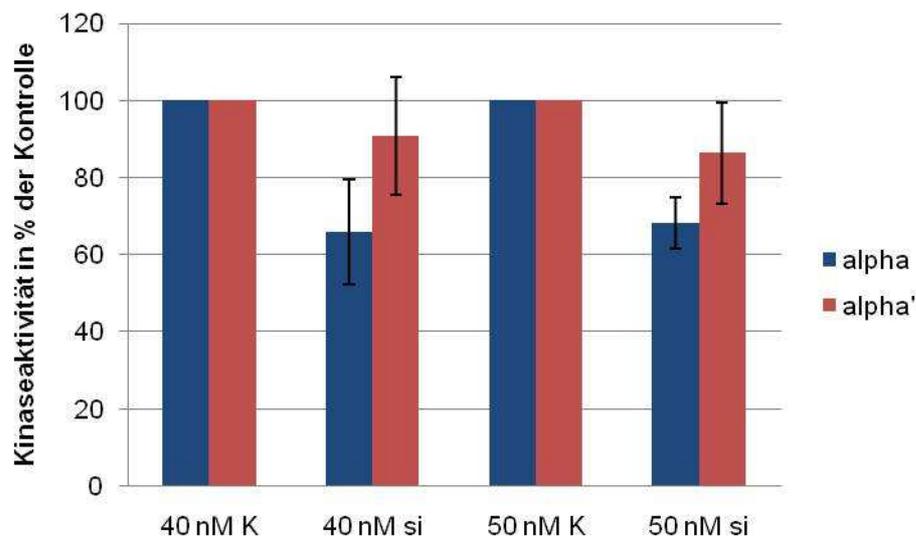


Abb. 44: CK2-Kinaseaktivitätstest nach Transfektion von siRNAs gegen CK2 α oder CK2 α' : Die Zellen wurden mit siRNA (40 bzw. 50 nM) gegen CK2 α bzw. CK2 α' mittels HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen) über 72 Stunden transfiziert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit entsprechender Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [^{32}P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die CK2-Aktivität der Kontroll-Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen.

5. Ergebnisse

Anscheinend ist die CK2 α -Untereinheit in der Lage bei geringerer Proteinmenge der CK2 α' -Untereinheit die Kinaseaktivität auszugleichen. Umgekehrt scheint dies nicht der Fall zu sein, da bei Herunterregulation der CK2 α -Untereinheit eine verminderte CK2-Aktivität festzustellen ist. Des Weiteren ist die Verminderung in der CK2-Kinaseaktivität nicht so drastisch wie die Restproteinmenge vermuten lässt. Bei ungefähr 30% Restprotein liegt noch immer etwa 60% Restaktivität vor.

Nachdem die Untereinheiten zunächst einzeln herunterreguliert wurden, wurde der Versuch einer gleichzeitigen Herunterregulation von CK2 α und CK2 α' unternommen. Die siRNAs gegen die Untereinheiten wurden 1:1 in einer Gesamtkonzentration von 40 nM eingesetzt und mittels HiPerFect® Transfection Reagent über 72 Stunden in die Zellen eingebracht. Nach Ernten und Aufschließen wurde mit dem gewonnenen Zellextrakt im Anschluss ein Westernblot angefertigt. Die CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten wurden mit den Kaninchenseren #212 (α) und #30 (α') sichtbar gemacht. Dieser Westernblot (Abb. 45 A) zeigt, dass die Untereinheiten bei gleichzeitiger Transfektion der jeweiligen siRNA etwa in gleichem Ausmaß auf eine Restproteinmenge von ca. 40% herunterreguliert werden.

5. Ergebnisse

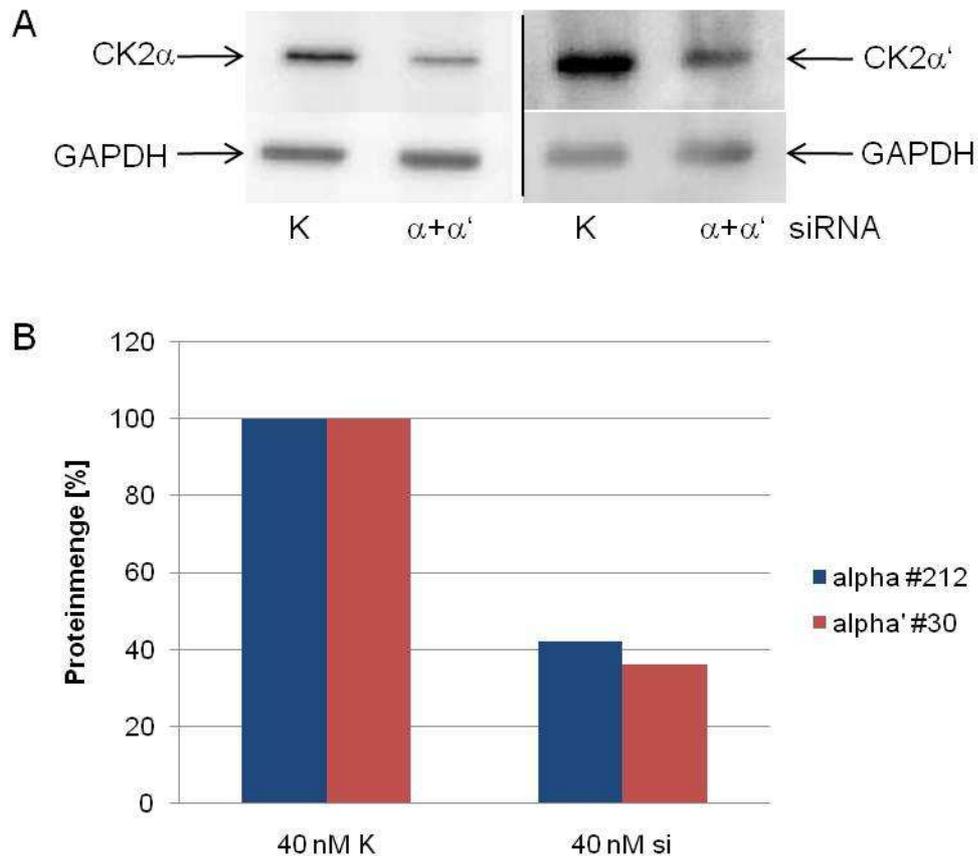


Abb. 45: A: Westernblot zur Detektion von CK2 α und α' nach Herunterregulation von CK2 α + α' mittels siRNA: LNCaP-Zellen wurden unter Verwendung von HiPerFect $\text{\textcircled{R}}$ über 72 Stunden mit siRNA gegen CK2 α +CK2 α' bzw. Kontroll-siRNA (K) (40 nM) transfiziert. 50 μ g Zellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der Untereinheiten dienten die Kaninchenseren #212 und #30. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert. **B: Quantifizierung des Westernblots** mit der Software Quantity One-4.6.7.

Ebenso wie bei der Herunterregulation der einzelnen Untereinheiten wurde auch hier die Kinaseaktivität der CK2 über den Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in das Substratpeptid untersucht. Hierzu wurden die LNCaP-Zellen mit 40 nM siRNA gegen CK2 α + α' transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels HiPerFect $\text{\textcircled{R}}$ Transfection Reagent von Qiagen über einen Zeitraum von 72 Stunden. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Der Zellextrakt wird dann im Kinaseaktivitätstest eingesetzt. Werden nun beide katalytischen Untereinheiten gleichzeitig herunterreguliert, vermindert sich die Kinaseaktivität auf etwa 60% gegenüber den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb. 46).

5. Ergebnisse

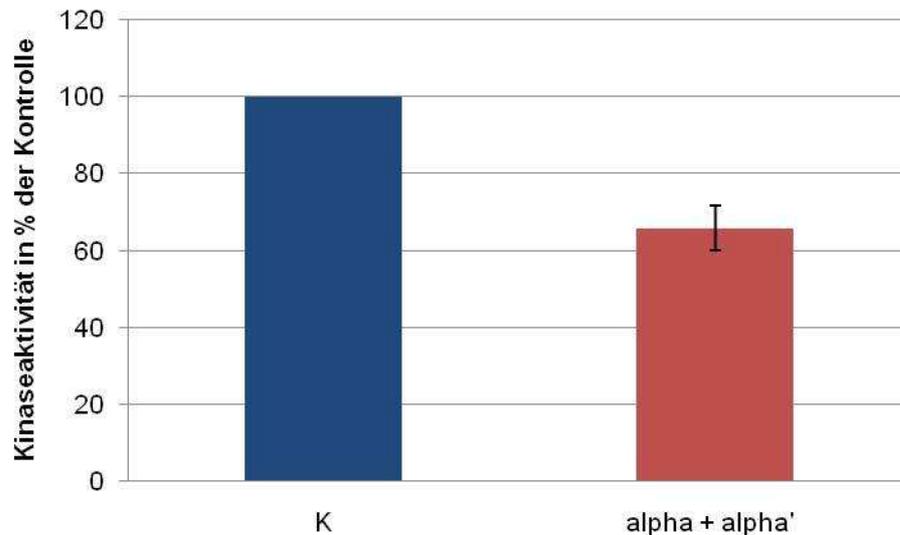


Abb. 46: CK2-Kinaseaktivitätstest nach Transfektion mit siRNA gegen CK2 α + α' : Die Zellen wurden mit 40 mM siRNA gegen CK2 α + α' mittels HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen) über 72 Stunden transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit entsprechender Kontroll-siRNA (K) transfiziert wurden. Die Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität erfolgte über den Einbau von radioaktivem Phosphat aus [32 P]- γ -ATP in das Substratpeptid RRRDDDSDDD. Die CK2-Aktivität der Kontroll-Zellen wurde 100% gesetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Auch eine gleichzeitige Herunterregulation der beiden katalytischen CK2-Untereinheiten führt nicht zu einer noch stärkeren Verringerung der Kinaseaktivität. Sie ist mit ca. 60% Restaktivität genauso groß wie die bei einer Transfektion der siRNA gegen die CK2 α -Untereinheit alleine. So scheint in diesem Fall die CK2 α -Untereinheit allein die CK2-Kinaseaktivität zu regulieren.

Nachdem die CK2-Untereinheiten einzeln als auch in Kombination erfolgreich herunterreguliert werden konnten, sollte die Auswirkung der Herunterregulation auf die regulatorische Untereinheit CK2 β und auf das Tumorsuppressorprotein p53 untersucht werden. Die Untersuchung der CK2 β -Untereinheit ist wichtig, da die Herunterregulation der katalytischen Untereinheiten eine Zerstörung des Holoenzym und einen Eingriff in die vorliegende Stöchiometrie bedeutet. Nach Transfektion der LNCaP-Zellen mit siRNA gegen die katalytischen Untereinheiten einzeln oder in Kombination über 72 Stunden mit HiPerFect®, wurden die Zellen

5. Ergebnisse

geerntet, aufgeschlossen und der Gesamtzellextrakt über ein 12.5%-iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die CK2 β -Untereinheit wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum dargestellt. Es kann festgestellt werden, dass sich für die β -Untereinheit eine Abnahme im Proteingehalt zeigt, sowohl bei den einzeln herunterregulierten katalytischen Untereinheiten, als auch wenn diese zusammen herunterreguliert werden (Abb. 47).

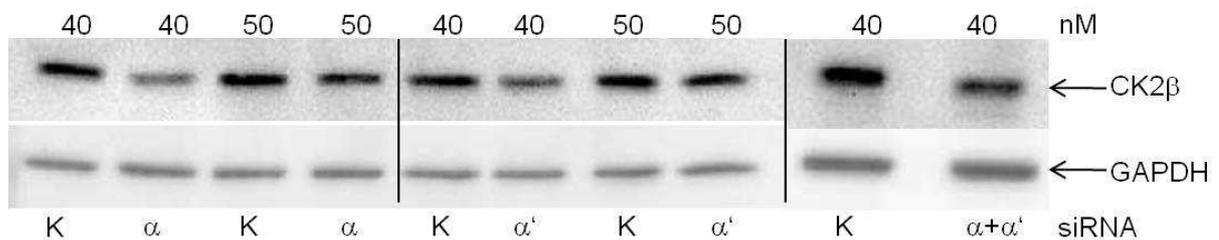


Abb. 47: Untersuchung von CK2 β nach Herunterregulation von CK2 α und CK2 α' : LNCaP-Zellen wurden mit siRNA gegen CK2 α bzw. CK2 α' oder in Kombination mit HiPerFect® Transfection Reagent über 72 Stunden transfiziert. Danach wurden die Zellen geerntet und lysiert. 50 μ g Gesamtzellextrakt wurden über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die CK2 β -Untereinheit wurde mit einem polyklonalen Kaninchenserum nachgewiesen. GAPDH wurde als Ladekontrolle mit dem Antikörper FL-335 von Santa Cruz detektiert.

Die Transfektion der siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten haben also auch Einfluss auf die regulatorische Untereinheit der CK2.

Beim Versuch die Transfektion der siRNA auf ein größeres Zellkulturformat zu übertragen, um für weitere Untersuchungen mehr Protein zur Verfügung zu haben, musste festgestellt werden, dass die Herunterregulation nicht im selben Ausmaß wie im 6-Loch-Format reproduziert werden konnte, weshalb keine weiteren Untersuchungen gemacht werden konnten.

6. Diskussion

Die Proteinkinase CK2 spielt eine essentielle Rolle bei Proliferation und Zellüberleben. Dies wird vor allem aus Versuchen ersichtlich, bei denen die CK2-Untereinheiten einzeln ausgeschaltet wurden. Das Ausschalten der CK2 α -Untereinheit in *S. cerevisiae* und das Ausschalten der α - bzw. der β -Untereinheit der CK2 in Mäusen ist letal (15- 17). Ein Ausschalten der α' -Untereinheit führt zu Infertilität bei männlichen Mäusen, wohingegen weibliche Tiere unauffällig bleiben (18).

In schnell proliferierenden Geweben wie Tumoren liegt eine erhöhte Expression, sowie damit einhergehend eine verstärkte enzymatische Aktivität der CK2 vor (20,97). Im Fall des Prostatakarzinoms (PCA) liegt die Erhöhung der Proteinmenge und CK2-Kinaseaktivität beim 3-5-fachen im Vergleich zum Normalgewebe (20).

Einerseits stimuliert die CK2 direkt die Proliferation, andererseits bietet sie einen Schutz gegen Apoptose. Durch Behandlung mit Etoposid wird in PC-3-Zellen und durch Behandlung von ALVA-41-Zellen mit Diethylstilbestrol wird Apoptose eingeleitet. Durch Überexpression der katalytischen α -Untereinheit als auch des Holoenzym wird die Apoptose unterdrückt (23). Eine Überexpression der katalytischen CK2 α -Untereinheit wirkt außerdem der durch die Liganden (TNF- α , TRAIL, Fas-L) der Todesrezeptoren induzierten Apoptose entgegen (29,30). Weiterhin kann die Phosphorylierung verschiedener Proteine durch CK2 zu deren Stabilität beitragen und vor der Spaltung durch Caspasen schützen, die während der Apoptose benötigt werden. Caspase- und CK2-Substrate weisen eine ähnliche Konsensussequenz auf, so dass darin der Grund für den Schutz liegen könnte (2). Bid ist ein Substrat der CK2, welches durch die Phosphorylierung der Proteinkinase vor der Spaltung durch Caspase 8 geschützt wird (98). Caspasen werden auch direkt von CK2 phosphoryliert und so gehemmt. Die Phosphorylierung der Caspase 2 verhindert deren Dimerisierung und damit deren Aktivierung (99). Caspase 9 wird in der Maus von CK2 phosphoryliert und kann daraufhin nicht mehr von Caspase 8 gespalten werden (100). Die Phosphorylierung des „apoptosis repressor with caspase recruitment domain“ (ARC) trägt zu einer Hemmung der Caspase 8 bei (101).

Die Hemmung der Kinaseaktivität der CK2 könnte die Proliferation von Tumoren stoppen und stellt so eine Möglichkeit dar, Tumore therapieren zu können. Dies könnte vor allem für die Behandlung des PCA einen großen Fortschritt bedeuten, da es bis jetzt noch nicht gelungen ist eine geeignete Therapie zu finden. Gleiches gilt auch für andere Tumore. Die Hormonenzugstherapie, die bei hormonresponsiven Prostatakarzinomen Verwendung findet, führt durch den aufgebauten Selektionsdruck meist zu hormoninsensitiven Tumoren, die nur durch Operation zu entfernen sind. Bei Verwendung von CK2-Inhibitoren, konnte bis dato hauptsächlich ein Ansprechen hormonsensitiver Zellen auf die Behandlung festgestellt werden (25). Daher galt es, in vorliegender Arbeit herauszufinden, welche apoptotischen Signalwege nach einer Hemmung der CK2 mittels 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) ablaufen und mögliche Unterschiede in androgensensitiven und -insensitiven Zellen aufzudecken. TBB ist als Hemmstoff mit einem K_i -Wert von $0.05 \mu\text{M}$ und einem IC_{50} -Wert von $1 \mu\text{M}$ sehr spezifisch (36). Darüber hinaus wird er häufig genutzt und es liegen schon einige Daten zu den Signalwegen im Prostatakarzinom mit diesem Hemmstoff vor (31,32). Außerdem ist TBB zellpermeabel, was durch die Wirkung auf die CK2-Kinaseaktivität in Zellsystemen deutlich wird. Zur Untersuchung der apoptotischen Signalwege wurden zunächst vier Prostatakarzinomzelllinien verwendet, die unterschiedliche Stadien des PCA repräsentieren. Die Zelllinien LNCaP und 22Rv1 sind als hormonsensitiv bzw. -responsiv, und die Zelllinien PC-3 und DU145 wurden als androgeninsensitiv beschrieben (65). LNCaP- und 22Rv1-Zellen stellen also ein weniger malignes Stadium des Prostatakarzinoms dar, wohingegen die androgeninsensitiven Zelllinien PC-3 und DU145 das Stadium repräsentieren, welches nur operativ entfernt werden kann. Eine Behandlung aller Zellen mit $50 \mu\text{M}$ des CK2-Hemmstoffes TBB resultiert in einer ähnlichen Hemmung der CK2-Kinaseaktivität. Die Kinaseaktivität wurde mittels radioaktivem Kinaseassay untersucht. Dabei wird ein CK2-spezifisches Substratpeptid verwendet, in das durch CK2 radioaktives Phosphat aus $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ eingebaut wird. Der Einbau des radioaktiven Phosphats in das Substratpeptid ist direkt proportional zur CK2-Kinaseaktivität und kann im Szintillationszähler gemessen werden. Die Restaktivität nach einer Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ TBB beträgt dabei etwa 30% der Aktivität, die in Zellen gemessen wurde, die als Kontrolle mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt wurden. Es stellte sich die Frage, welche Auswirkung die Hemmung der CK2 durch TBB auf die Lebensfähigkeit der Zellen

hat. Zur Ermittlung der Lebensfähigkeit wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dieses Assay beruht auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen ein gelbes Tetrazoliumsalz in violette Formazan umzusetzen. Die Umsetzung ist dabei direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und damit der Lebensfähigkeit (102). Die Hemmung der Kinaseaktivität führt in LNCaP- und 22Rv1-Zellen zu verminderter Lebensfähigkeit. Die PC-3- und DU145-Zellen werden dagegen nicht in ihrer Viabilität eingeschränkt. Die 22Rv1-Zellen zeigen im Vergleich zu den LNCaP-Zellen allerdings erst nach 48 stündiger Behandlung einen Rückgang im MTT-Assay. Das MTT-Assay gibt allerdings keinen Aufschluss darüber, ob und auf welche Weise die Zellen ihre metabolische Aktivität einbüßen. Dies kann durch Zellzyklus-Arrest, durch Apoptose oder andere Formen von Zelltod geschehen. Bei der Hemmung der CK2 mittels TBB wird dieser Rückgang durch Apoptose hervorgerufen. Bei Betrachtung eines relativ späten apoptotischen Ereignisses, der Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-polymerase (PARP), konnte das 89 kDa große PARP-Spaltprodukt gefunden werden. Dieses Spaltprodukt tritt nur bei Apoptose auf. Bei Nekrose beispielsweise wird PARP u.a. in ein ca. 50 kDa großes Fragment gespalten (103). Dabei zeigen nur die hormonsensitiven Zellen dieses Anzeichen für Apoptose. Für die 22Rv1-Zellen zeigt sich außerdem ein stärkeres Spaltprodukt nach 48 Stunden TBB-Behandlung. Von Ahmed und Kollegen wird auch für PC-3-Zellen nach TBB-Behandlung Apoptose gezeigt. Zur Behandlung wurde TBB in Konzentrationen von 10-150 μM eingesetzt. Bei 80 μM konnte nach 48 und 72 Stunden ein Rückgang der Viabilität der Zellen beobachtet werden (28). Der Effekt war aber weitaus deutlicher bei einer Konzentration von 100 μM TBB. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Befunde nicht bestätigt werden. Da bei sehr hohen Konzentrationen der Inhibitoren unspezifische Effekte nicht ausgeschlossen werden können, wurde in dieser Arbeit die geringstmögliche Konzentration an TBB verwendet, bei der in der Literatur ein Effekt aufgetreten war. Werden die PC-3-Zellen mit 80 μM TBB über 24 und 48 Stunden behandelt, konnte weder im MTT-Assay ein Rückgang der Lebensfähigkeit festgestellt, noch ein PARP-Spaltprodukt detektiert werden. Diese Unterschiede könnten auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. In der Arbeitsgruppe von Ahmed werden die Zellen in RPMI 1640-Medium kultiviert, in dieser Arbeit in DMEM. Darüber hinaus werden zwei nicht identische Methoden zur Bestimmung der Zellviabilität verwendet. Von Ahmed *et al.* wird das WST-Assay anstatt dem hier verwendeten MTT-Assay genutzt (28). Der Unterschied in beiden Assays besteht in

der Nutzung anderer Tetrazoliumsalze, die von den Zellen umgesetzt werden. Oder aber die hier betrachteten Inkubationszeiträume waren nicht ausreichend, um einen Effekt festzustellen. Da in der hier vorliegenden Arbeit keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit bei einer höheren Konzentration gefunden werden konnte, wurde in allen folgenden Versuchen die geringere Konzentration von 50 μM auch zur Behandlung der PC-3-Zellen gewählt.

Frühere Untersuchungen führten zur Annahme, dass es sich in den LNCaP-Zellen um eine p53-vermittelte Apoptose handelt (31). p53 als Tumorsuppressorprotein spielt in der Kontrolle des Zellzyklus sowie der Apoptose eine wichtige Rolle. Dieses Protein kann im Falle von DNA-Schäden beispielsweise den Zellzyklus anhalten und entsprechende Reparaturmechanismen in Gang bringen. Gelingt es der Zelle nicht, die Schäden zu reparieren, so leitet p53 die Apoptose der Zelle ein. Von Frau Dr. Hessenauer konnte schon gezeigt werden, dass die TBB-Behandlung der LNCaP-Zellen, die ein wildtyp (wt) p53 exprimieren, zur Induktion von p53 führt und dass sich in einem Microarray die mRNA-Mengen von p53-responsiven Genen wie survivin, PIG3 und c-fos änderten (31). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion von p53 auch in den 22Rv1-Zellen auftritt. Die 22Rv1-Zellen besitzen zwar eine Mutation im p53 Gen (CAG→CGG), exprimieren trotzdem ein wt p53, weil die Mutation heterozygot vorliegt (65). Die DU145-Zellen exprimieren dagegen ein mutiertes p53 (P223L und V274F) (65). Die DU145-Zellen reagieren dagegen nicht mit einer Änderung im p53-Proteingehalt auf die TBB-Behandlung. Die PC-3-Zellen sind defizient für p53 (65) und können daher keine Veränderung zeigen. Zusätzlich zu seiner Expression muss p53 in der Lage sein seine Transaktivierungsfunktion auszuüben (104). In einem Reporterassay wurde die Transaktivierungsfunktion von p53 gegenüber PIG3 (p53 inducible gene 3) untersucht. PIG3 wird in p53-abhängiger Apoptose direkt von p53 induziert (60). Als Chinon-Oxidoreduktase trägt PIG3 dazu bei, den Redoxstatus der Zelle während der Apoptose so zu verändern, dass es im Anschluss zur Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials kommt (60,105). PIG3 wird in den wt p53 exprimierenden Prostatazellen transaktiviert und trägt möglicherweise zur Apoptose bei. Dieses ist für die Zellen ohne p53 bzw. mutiertem p53 nicht der Fall. Campomenosi und Kollegen haben gezeigt, dass mutierte Formen des p53 nicht in der Lage sind, PIG3 zu induzieren, so dass die hier gefundenen Ergebnisse zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen passen (106). Es kann ebenfalls

festgestellt werden, dass die TBB-Behandlung der 22Rv1-Zellen nicht so starke Auswirkungen auf die PIG3-Promotoraktivität zeigt, wie die Behandlung der LNCaP-Zellen. Eventuell ist hierfür doch die beschriebene Mutation im p53 Gen verantwortlich. Bei Betrachtung dieser Resultate stellt sich die Frage, ob das wt p53 sowie die Induktion von PIG3 und daraus möglicherweise hervorgehende Änderungen im Redoxstatus für die TBB-vermittelte Apoptose notwendig ist. Bei früheren Untersuchungen konnte für die Behandlung mit TBB mit dem Farbstoff H₂DCFDA keine reaktiven Sauerstoffspezies gefunden werden (32,107). Ahmed und Kollegen beschreiben dagegen eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Apoptose, die durch CK2-Hemmung hervorgerufen wird. Die Arbeitsgruppe um Ahmed konnte mit einem ähnlichen Farbstoff CM-H₂DCFDA reaktive Sauerstoffspezies sowohl nach TBB-Behandlung als auch nach Einbringen von antisense Oligonukleotiden gegen die katalytischen CK2-Untereinheiten feststellen (108). Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich darin, welche Sauerstoffradikale detektiert werden. So könnte es sein, dass es sich in der Arbeit von Ahmed *et al.* um ein Radikal handelt, welches der Farbstoff H₂DCFDA nicht detektiert. Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an TBB-vermittelter Apoptose kann folglich nicht ausgeschlossen werden. Um die Bedeutung von p53 in der durch TBB induzierten Apoptose zu ermitteln, wurde p53 herunterreguliert. Durch den Einsatz von siRNA gegen p53 in den LNCaP-Zellen und anschließender TBB-Behandlung wurde gezeigt, dass auch nach Herunterregulation des Tumorsuppressorproteins noch Apoptose eingeleitet wird. So scheint p53 nicht essentiell für die eingeleitete Apoptose zu sein. Um diese Aussage zu untermauern, sollte auch in den 22Rv1-Zellen p53 mittels siRNA herunterreguliert werden. Leider ist dies nicht gelungen. Hierfür könnte die Mutation im p53 Gen verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit, die oben gemachte Aussage zu verifizieren, boten die DU145-Zellen. Die für diese Zellen beschriebene Mutation ist dadurch gekennzeichnet, dass nach Temperaturshift von 37°C auf 31°C wieder ein funktionsfähiges p53 in wt Konformation vorliegen soll (77). So wurden die Zellen nach Shift auf 31°C mit TBB behandelt. Es ergab sich noch immer eine Hemmung der CK2-Kinaseaktivität, wenngleich nicht mehr ganz so drastisch wie bei Kultivierung bei 37°C. Weiterhin konnte ein Anstieg im p53-Proteingehalt festgestellt werden, was auf die wt Funktion des p53 hindeuten könnte. Obwohl wt p53 vorzuliegen scheint, zeigen die DU145-Zellen weder einen Rückgang der Lebensfähigkeit noch eine Einleitung der

Apoptose, es kommt nicht zur PARP-Spaltung. Die Ergebnisse aus den LNCaP-Zellen und den DU145-Zellen lassen vermuten, dass p53 für die durch TBB induzierte Apoptose nicht alleine verantwortlich sein kann.

Ein weiterer offensichtlicher Unterschied in den vier untersuchten Zelllinien liegt in der Expression des Androgenrezeptors (AR) und damit einhergehender Androgensensitivität. Die LNCaP- und 22Rv1-Zellen exprimieren beide den Androgenrezeptor (65). Der Androgenrezeptor in den LNCaP-Zellen weist dabei eine Mutation (T877A) auf, aufgrund derer sie nicht nur auf Androgene ansprechen, sondern auch auf andere Steroide (65). In den 22Rv1-Zellen kommt es sogar zur Expression zweier Formen des AR. Eine 114 kDa große Form wird durch Verdopplung des Exons 3 hervorgerufen, des Weiteren führt die Mutation H874Y zur Expression C-terminal deletierter Androgenrezeptoren von 75-80 kDa Größe (109). Die DU145- und PC-3-Zellen werden als AR-negativ beschrieben (65). Der Androgenrezeptor ist außerdem interessant, weil er durch die ARE (androgen receptor elements) unter anderem auf Caspase 2 und p53 Einfluss nehmen kann. So wird die Expression von p53 bei verstärktem Gehalt an Androgenrezeptor nach 5 α -Dihydrotestosteron (DHT)-gabe in LNCaP-Zellen verringert (110), und die Caspase 2-Aktivität wird bei Liganden-induzierter Apoptose gehemmt (110). Die Hemmung der Caspase 2-aktivität konnte auch nach Transfektion des AR in PC-3-Zellen gezeigt werden (110). Um die Androgensensitivität in PC-3-Zellen zu imitieren, wurde der Androgenrezeptor über Transfektion in diese Zellen eingebracht. Festzustellen war, dass auch nach Transfektion des AR, die PC-3-Zellen nicht mit Apoptose auf die Behandlung mit TBB reagieren. Eine leichte PARP-Spaltung tritt allerdings in allen mit dem Androgenrezeptor transfizierten Zellen auf, ob mit TBB- oder DMSO-behandelt. Dass androgeninsensitive Zellen nach Transfektion mit dem AR in Apoptose gehen, konnte z. B. von Yu und Kollegen gezeigt werden (111). Die Hemmung der CK2 in LNCaP-Zellen führt darüber hinaus zu verminderter transkriptioneller Aktivität des AR (24). Dabei kam es zum Rückgang des AR-Proteins, sowie zu verringerter Expression von PSA (prostate specific antigen) einem Zielgen des Androgenrezeptors (24). Auch ein AR-spezifisches Reporterassay ergab das gleiche Ergebnis (24). In den transfizierten PC-3-Zellen kommt es nach Behandlung mit TBB zum Rückgang der Proteinmenge des Androgenrezeptors. So kann zumindest die Beobachtung aus den LNCaP-Zellen in den transfizierten PC-3-Zellen bestätigt und vermutet werden, dass das Einbringen des Androgenrezeptors

in die PC-3-Zellen tatsächlich die Hormonsensitivität imitiert. Eine Behandlung mit 5α -Dihydrotestosteron von PC-3-Zellen, die stabil mit AR transfiziert wurden, machte deutlich, dass der transfizierte AR seine transkriptionelle Funktion ausüben kann (111). Aus den von mir gefundenen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass die Hormonsensitivität ebenfalls nicht der ausschlaggebende Punkt ist, ob die Prostatakarzinomzellen in Apoptose gehen oder nicht, wenn die CK2 mit TBB gehemmt wird.

Da die offensichtlichen Unterschiede in den Zellen nicht für die unterschiedlichen Antworten nach TBB-Behandlung verantwortlich gemacht werden konnten, mussten weitere Untersuchungen in die Details der Signalwege Einblicke gewähren. Die Wahl der Zellen fiel dabei auf die LNCaP- und die PC-3-Zellen, weil diese Zelllinien die eindeutigsten Merkmale für den Androgenrezeptor und das Tumorsuppressorprotein p53 aufweisen. Ansonsten müsste immer über die Einflüsse der in den Zelllinien 22Rv1 und DU145 enthaltenen Mutationen spekuliert werden. Zu Beginn wurde die PARP-Spaltung als apoptotisches Ereignis untersucht, die in den LNCaP- aber nicht in den PC-3-Zellen auftritt. Als Substrat der Caspase 3 geht der Spaltung von PARP die Aktivierung dieser Caspase voraus (78). Auch Caspase 3 wird nur in den LNCaP-Zellen aktiviert. In den PC-3-Zellen findet keine Aktivierung statt. Um Caspase 3 wiederum zu aktivieren, gibt es zum einen die Möglichkeit über den mitochondrialen Signalweg die vorangeschaltete Caspase 9 zu aktivieren. Dazu muss zunächst das Apoptosom gebildet werden. Das Apoptosom besteht aus Cytochrom C, welches aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, aus Apaf-1, ATP und der Procaspase 9, die in diesem Komplex dann autoproteolytisch gespalten und aktiviert wird (52,53). In keiner der beiden Prostatakarzinomzelllinien konnte die Spaltung der Caspase 9 festgestellt werden. Lediglich die als Positivkontrolle mit Doxorubicin-behandelten HeLa-Zellen weisen die Spaltung auf. Frau Dr. Hessenauer konnte für beide Zelllinien zeigen, dass Cytochrom C, welches im Apoptosom benötigt wird, freigesetzt wird (31). Das Mitochondrium wird zwar geschädigt, aber die apoptotischen Signale nicht über das Apoptosom vermittelt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Aktivierung der Caspase 9 nicht eingeleitet wird, weil der Zusammenbau des Apoptosoms nicht gewährleistet ist. So gibt es mehrere Faktoren, die den Zusammenbau verhindern können. Einerseits gibt es die IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), speziell survivin, das Caspase 9 direkt blockieren kann (112). Andererseits kommt die Familie der HSPs (heat shock proteins) in Frage, die mit

mehreren Komponenten des Apoptosoms interagieren und so den Zusammenbau stören können. Das IAP survivin wird als anti-apoptotisch beschrieben und spielt auch in der Mitoseregulation eine wichtige Rolle (113). Bei einer immunhistologischen Untersuchung von Prostatageweben konnte eine Korrelation zwischen der Expression von survivin und dem Differenzierungsgrad des Gewebes von normalen Geweben zu Krebsgeweben nachgewiesen werden (114). Auch in anderen Tumoren wird survivin verstärkt exprimiert (115). Im Prostatakarzinom trägt survivin zur Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Agenzien wie dem Antiandrogen Flutamid bei (116). Umgekehrt führt die Herunterregulation von survivin mittels siRNA in PC-3-Zellen dazu, dass die Zellen besser auf das Chemotherapeutikum Platinol ansprechen(117). Tapia und Kollegen fanden bei Behandlung von Kolonkarzinom, Brustkrebs oder embryonalen Nierenzellen mit TBB einen Rückgang des survivin-Proteingehalts(118). Die Regulation erfolgt dabei über den β -Catenin/TCF/Lef-Signalweg (118). Die Stabilität von β -Catenin wiederum ist abhängig von CK2, so dass eine Hemmung der CK2 zu verminderter Stabilität von β -Catenin und dadurch zu verminderter Expression von survivin führt. Die von Tapia und Kollegen gefundene Herunterregulation von survivin, kann auch für die Prostatakarzinomzellen LNCaP und PC-3 bestätigt werden (32). Folglich scheint das IAP survivin die Aktivierung der Caspase 9 nicht zu blockieren. Die Hitzeschockproteine 90 und 70 sind in der Lage, mit Apaf-1 zu interagieren und dadurch den Zusammenbau des Apoptosoms zu stören (80,81,119,120). Bei der Analyse der beiden Proteine konnte weder für HSP70 noch für HSP90 eine veränderte Proteinmenge festgestellt werden, in keiner der beiden Zelllinien. Hierbei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der detektierte Proteingehalt an sich schon ausreichend ist, das Apoptosom zu blockieren. HSP27 verhindert den Zusammenbau des Apoptosoms auf eine andere Art und Weise. Das kleine Hitzeschockprotein fängt cytosolisches Cytochrom C ab, so dass dieses im Apoptosom nicht zur Verfügung steht (82,83,121). Bei der Untersuchung des HSP27 zeigte sich, dass der Proteingehalt nach Behandlung von LNCaP- und PC-3-Zellen mit TBB in beiden Zelllinien abnimmt. In LNCaP-Zellen fällt die Abnahme dabei drastischer aus, als in den PC-3-Zellen. Aufgrund der Abnahme kann allerdings nicht angenommen werden, dass das HSP27 das freigesetzte Cytochrom C abfängt und so die Bildung des Apoptosoms hemmt. Die Herunterregulation von HSP27 nach CK2-Hemmung ist dennoch ein positiver Effekt. In androgen-unabhängigen Tumoren

liegt HSP27 verstärkt vor und spielt so eine cytoprotektive Rolle (122). Weiterhin ist bekannt, dass im Rahmen der Hormonentzugstherapie oder nach Chemotherapie der Proteingehalt von HSP27 ansteigt und dadurch die Tumorprogression begünstigt (123,124). Bei Nutzung von siRNA gegen HSP27 konnte in LNCaP-Zellen Apoptose induziert werden (124). Durch die Verringerung des HSP27-Proteingehalts, könnte so zu einer Sensibilisierung therapieresistenter Tumorzellen gegen verschiedene Apoptosestimuli kommen. Auch die oben beschriebene Herunterregulation von survivin könnte zu einer solchen Sensibilisierung beitragen. Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LNCaP sind PTEN negativ und exprimieren daher eine konstitutiv aktive AKT-Kinase (125). PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) ist eine Phosphatase, die durch Dephosphorylierung von AKT deren Aktivität reguliert (126). Caspase 9 wird von AKT am Serinrest 196 phosphoryliert und wird dadurch in ihrer Aktivierung gehemmt (127). Durch die konstitutive Aktivität könnte so möglicherweise begründet sein, warum die Caspase 9 nicht gespalten werden kann. Es wurde keine Cytochrom C induzierte Aktivierung der Caspase 9 beobachtet, wenn das Onkogen ras als Aktivator von AKT in 267B-Prostatazellen überexprimiert wird (127). Allerdings ist diese Phosphorylierungsstelle nicht über verschiedene Spezies konserviert. In Mäusen ist sie beispielsweise nicht vorhanden (128), so dass diese Möglichkeit der Hemmung der Caspase 9 spekulativ bleibt. AKT wird außerdem von CK2 an Serin129 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Umgekehrt wird diese Aktivität mit CK2-Hemmstoffen wieder unterbunden (129), so dass AKT möglicherweise doch nicht als konstitutiv aktiv angesehen werden kann.

Die Signalweiterleitung über das Mitochondrium ist offenbar in beiden Zellen gestört, daher muss es in den LNCaP-Zellen einen anderen Weg geben, über den die apoptotischen Signale bis zu Caspase 3 und PARP weitergeleitet werden. Eine Möglichkeit bietet dabei das Endoplasmatische Retikulum (ER). Die Proteinkinase CK2 und einige ihrer Substrate sind ER-lokalisiert (130- 132). Unter den ER-assoziierten Substraten der CK2 ist CHOP als Transkriptionsfaktor ein vielversprechender Kandidat (85). CHOP ist ein Mitglied der Familie der CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) Transkriptionsfaktoren und auch bekannt als GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible protein) (133). CHOP wird von CK2 phosphoryliert und dadurch in seiner transkriptionellen Fähigkeit gehemmt (85). Über CHOP ist außerdem bekannt, dass es in ER-Stress induzierter Apoptose

eine bedeutende Rolle einnimmt. So kommt es beispielsweise zur CHOP-Expression bei oxidativem oder genotoxischem Stress oder Nahrungsentzug (134- 136). Bei der Überprüfung der CHOP-Expression nach TBB-Behandlung in den Prostatakarzinomzellen konnte ich feststellen, dass es nur in den androgensensitiven Zellen zur Induktion dieses Transkriptionsfaktors kommt, wohingegen die hormoninsensitiven Zellen CHOP nicht exprimieren. Nach einer Veröffentlichung von Yamaguchi und Wang ist CHOP als Transkriptionsfaktor dazu in der Lage über eine entsprechende Bindestelle im Promotor des Todesrezeptors DR5 (TRAIL-2) nach einer Behandlung mit Thapsigargin, dessen Expression zu initiieren (61). Darüber hinaus wurde die Expression des entsprechenden Liganden TRAIL nach Thapsigargin-Behandlung ebenfalls nachgewiesen (137). Die Induktion des Liganden wird auch in der Veröffentlichung von Yamaguchi und Wang beschrieben, aber leider nicht in einer Abbildung gezeigt (61). In der vorliegenden Arbeit wurde eine verstärkte Aktivität des DR5-Promotors in den LNCaP-Zellen nach CK2-Hemmung festgestellt. Möglicherweise geht mit dieser Aktivierung des Promotors auch die Expression des Liganden TRAIL einher. In den PC-3-Zellen konnte dagegen keine Promotoraktivität nachgewiesen werden. DR5 als Todesrezeptor rekrutiert in nachfolgenden Schritten der apoptotischen Signalkaskade FADD (Fas-associated death domain protein) sowie die Caspase 8, die in diesem sog. DISC (death inducing signaling complex) gespalten und dadurch aktiviert wird (47,48). In der vorliegenden Arbeit folgt der Aktivierung des DR5-Todesrezeptors die Caspase 8-Aktivierung nur in den LNCaP-, nicht aber in den PC-3-Zellen. Caspase 8 wiederum ist in der Lage, die oben beschriebene Aktivierung der Caspase 3 einzuleiten (54).

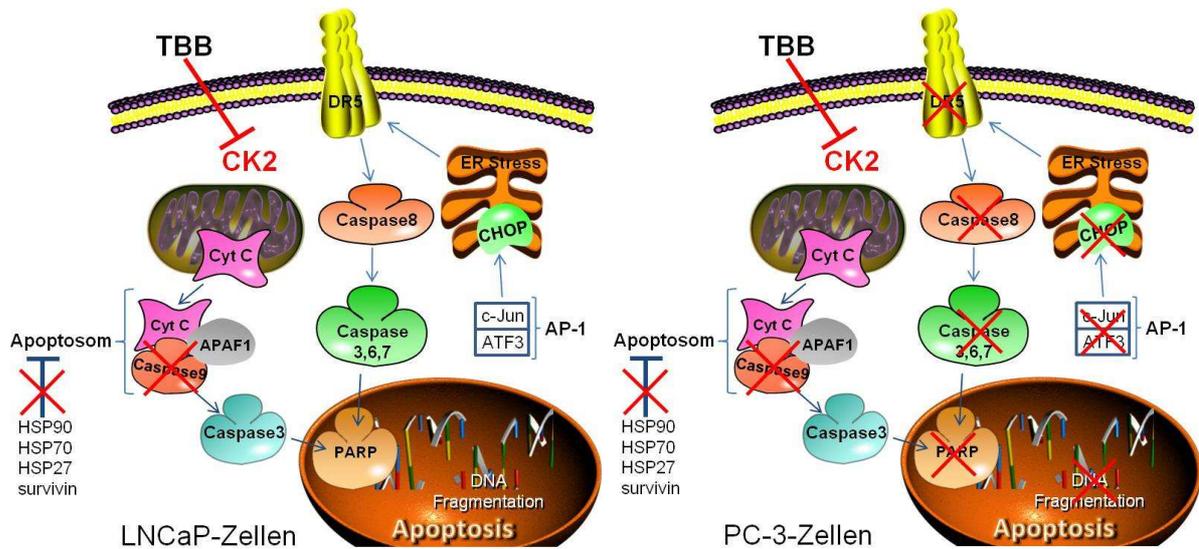


Abb. 48: Darstellung der Signalwege in den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (links) und PC-3 (rechts) nach Hemmung der CK2 durch TBB. Erläuterungen im Text. Darstellungen der Organellen und teilweise der Proteine wurden den pathways auf der Homepage von SA Biosciences/Qiagen (www.sabiosciences.com) entnommen.

Betrachtet man all diese Ergebnisse, kann man zusammenfassend sagen, dass in den LNCaP-Zellen durch die Expression von CHOP der extrinsische Apoptoseweg eingeleitet wird. In den PC-3-Zellen bleibt dies aus, weil hier CHOP nach TBB-Behandlung nicht exprimiert wird.

Dass die PC-3-Zellen aber in der Lage sind, CHOP zu exprimieren konnte nach Behandlung dieser Zellen mit Tunicamycin und Capsaicin demonstriert werden (87,138). Um in der vorliegenden Arbeit zu zeigen, dass die CHOP-Expression für die Einleitung der Apoptose im PCA unabdingbar ist, wurde in den PC-3-Zellen CHOP überexprimiert und im Anschluss apoptotische Merkmale überprüft. Nach CHOP-Transfektion konnten sowohl eine PARP-Spaltung als auch eine Aktivierung der Caspasen 3/7 verzeichnet werden. Daraus folgt, dass die CHOP-Expression direkt mit der Apoptoseinduktion einhergeht und die PC-3-Zellen nicht in Apoptose gehen, weil sie nach TBB-Behandlung nicht in der Lage sind, CHOP zu exprimieren.

Zur Beantwortung der Frage, warum die PC-3-Zellen nach Hemmung der CK2 durch TBB aber nicht in der Lage sind, CHOP zu induzieren, wurden CHOP-regulierende Faktoren betrachtet. Im CHOP-Promotor befinden sich ein ERSE (ER stress-

responsive element), eine C/EBP-ATF- und eine AP-1-Bindestelle (139). Die Induktion von CHOP durch Einleitung von ER Stress beispielsweise durch Tunicamycin-Behandlung wird über das ERSE vermittelt (140). Bei Aminosäureentzug oder Hemmung der Phosphatidylcholinsynthese verläuft die Induktion über die C/EBP-ATF-Bindestelle (139). Bei UV-Bestrahlung oder oxidativem Stress geschieht die Induktion über die AP-1-Bindestelle (134). AP-1 (activating protein-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der als Dimer vorliegt (141). Das Dimer kann auf verschiedene Weise gebildet werden. Es kann aus Mitgliedern der Jun und Fos-Familie bestehen, genauso wie aus Mitgliedern der ATF, JDP oder Maf-Familien. Die Dimerisierung erfolgt dabei über die Leuzin-Zipper-Domäne, die alle Mitglieder dieser Familien aufweisen. Allen gemeinsam ist auch eine basische Region für die Bindung an die DNA (90).

Bei der Untersuchung des am häufigsten im AP-1 vorliegenden Proteins c-Jun wurde deutlich, dass c-Jun in den LNCaP-Zellen nach Behandlung mit TBB vermehrt vorliegt, in den PC-3-Zellen wird das Protein dagegen abgebaut. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der im AP-1-Komplex beteiligt sein kann, ist der „activating transcription factor 3“ (ATF3) (91). Die Untersuchung von ATF3 ergab, dass in den LNCaP-Zellen eine deutliche Induktion dieses Transkriptionsfaktors vorliegt. In den PC-3-Zellen kommt es nach 24 Stunden zwar auch zur Induktion von ATF3, allerdings ist die dann vorhandene Proteinmenge noch immer unterhalb des basalen Gehalts, der in LNCaP-Zellen vorhanden ist. Nach 48 Stunden TBB-Behandlung ist das Protein nicht mehr zu detektieren. ATF3 kommt auch unabhängig von seiner Beteiligung am AP-1-Komplex eine pro-apoptotische Rolle zu. So konnte gezeigt werden, dass es in PC-3-Zellen zur vermehrten Expression von ATF3 kommt, nachdem der Krueppel-like factor 6 (KLF6) überexprimiert wurde. Bei dieser Überexpression wird die in den PC-3-Zellen eingeleitete Apoptose durch ATF3 vermittelt. Eine ATF3-Herunterregulation lieferte den entsprechenden Schutz gegen die durch KLF6-Überexpression induzierte Apoptose (142). Im vorliegenden Fall könnte eine proapoptotische Beteiligung des ATF3 in direktem Zusammenhang mit der Bildung eines AP-1-Komplexes zusammen mit c-Jun stehen.

Bis hierhin wurden nur Prostatakarzinomzelllinien verwendet, um die durch TBB-induzierte Apoptose zu untersuchen. Da CK2-Inhibitoren potentielle Tumortheraeutika darstellen, ist es wichtig, dass normale Zellen durch die

Hemmung der Proteinkinase nicht in Mitleidenschaft gezogen werden. Auf der anderen Seite wäre es von Vorteil, wenn nicht nur das Prostatakarzinom auf die Hemmung der CK2 mit Apoptose ansprechen würde. Daher wurde ein zweites Modellsystem, für das normale Zellen zur Verfügung standen, verwendet. Neben malignen Melanomzellen der Haut wurden passende primäre Hautfibroblasten verwendet. Bei Betrachtung der CK2-Untereinheiten α , α' , β fällt auf, dass die Melanomzellen SK-Mel28 wesentlich mehr CK2 α -Untereinheit exprimieren als die normalen Zellen 1BrhTert, die mit Telomerase immortalisiert sind. In diesen beiden liegt kaum CK2 α vor. Die Untereinheiten CK2 α' und CK2 β liegen dagegen etwa in gleichen Mengen in allen drei Zelllinien vor. Bei der Bestimmung der Kinaseaktivität zeigte sich, dass bei der gleichen eingesetzten Proteinmenge die Aktivität der Melanomzellen knapp das Dreifache der Kinaseaktivität der 1BrhTert-Zellen beträgt. Dies könnte allein auf die unterschiedliche Expression der CK2 α -Untereinheit zurückzuführen sein, spiegelt dennoch die beschriebene erhöhte Kinaseaktivität in Tumoren wieder (20). Gleiches gilt für das Tumorsuppressorprotein p53, welches in normalen Zellen nicht bis wenig exprimiert wird. Es kommt bei diesen Zellen erst nach aufgetretenen Schäden zur Anhäufung des Tumorsuppressors, damit p53 dann seine Aufgaben wahrnehmen und einen Zellzyklusarrest sowie DNA-Reparaturen einleiten kann. Bei irreparablen Schäden kann p53 dann die Apoptose einleiten (143). Liegen keine DNA-Schäden vor, ist für dieses Protein eine Halbwertszeit von 5-20 Minuten beschrieben (143). Die SK-Mel28-Zellen exprimieren ein wt p53, wovon auch für die normalen Zellen ausgegangen werden muss. Beim direkten Vergleich der beiden Zelllinien im Hinblick auf ihre p53-Proteinmenge, kann festgestellt werden, dass p53 in den 1BrhTert-Zellen unterhalb der Detektionsgrenze liegt und die SK-Mel28-Zellen dagegen viel p53 exprimieren. Zur Untersuchung der Auswirkung von CK2-Inhibitoren auf dieses Hautmodell, sollten zwei Inhibitoren gegenübergestellt werden, um Inhibitor-spezifische Effekte auf die Zellen ausschließen zu können. Hierzu wurden die Inhibitoren TBB und DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol) verwendet. Diese waren zum Zeitpunkt der Verwendung als spezifische Hemmstoffe mit den niedrigsten K_i - und IC_{50} -Werten beschrieben (36,37). Für TBB betragen diese Werte 0.05 und 1 μ M, für DMAT 0.05 und 0.1 μ M (36,37). Die Kinaseaktivität konnte mit TBB in den SK-Mel28-Zellen auf etwa 45% gesenkt werden, mit DMAT gelang eine weitere Hemmung auf ca. 25%. Diese Werte wurden nach 24 Stunden Inkubation festgestellt und konnten

durch Verlängerung der Inkubationszeit nicht weiter reduziert werden. In den normalen Zellen zeigte sich mit TBB lediglich eine Reduktion der Kinaseaktivität auf 85%, mit DMAT konnten 65% Restaktivität verzeichnet werden. Es kann nicht beurteilt werden, ob die Zellen die Hemmstoffe schlechter aufnehmen als die Tumorzellen oder ob sich eine Hemmung bei von Grund auf geringer Aktivität nicht so stark auswirkt. Ferner könnte es sein, dass die katalytische CK2 α -Untereinheit in anderer Weise von den Inhibitoren betroffen wird als die CK2 α' -Untereinheit. In den 1BrhTert-Zellen liegt wie oben beschrieben kaum CK2 α vor. Bei dem Hemmstoff Resorufin beispielsweise resultiert die Inkubation der jeweiligen katalytischen Untereinheit mit dem Inhibitor nicht in der gleichen Hemmung. Das Fusionsprotein His-CK2 α wird dabei stärker gehemmt, als His-CK2 α' (144). Weder für TBB noch DMAT wurden solche Untersuchungen bislang durchgeführt. In den SK-Mel28-Zellen tritt wie im Prostatakarzinom eine verminderte Lebensfähigkeit nach Hemmung der CK2 auf. Mit TBB wird die Viabilität von 80% nach 24 Stunden Behandlung auf etwa 39% nach 72 Stunden Behandlung reduziert. Mit einer DMAT-Behandlung wird schon nach 24 Stunden eine Lebensfähigkeit von nur noch 40% erreicht, die durch verlängerte Inkubation auf 5% absinkt. Die 1BrhTert-Zellen lassen sich im Gegensatz dazu weder mittels TBB noch DMAT in ihrem Wachstum einschränken. Die verminderte Viabilität der SK-Mel28-Zellen beruht dabei auf Apoptose, was durch die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase nachgewiesen wurde. Entsprechend dem MTT-Assay konnte auch das PARP-Spaltprodukt verstärkt in den DMAT-behandelten Zellen detektiert werden. Die 1BrhTert-Zellen zeigen keine PARP-Spaltung, ebenfalls im Einklang mit dem MTT-Assay. Diese Zellen sterben also nicht, wenn die CK2 mit TBB oder DMAT gehemmt wird. Diese Erkenntnis ist für die Möglichkeit, CK2-Inhibitoren zur Therapie zu nutzen schon sehr wichtig, schließlich sollten nur die Tumorzellen von der Therapie angesprochen und die normalen Zellen nicht geschädigt werden. Um festzustellen, ob die Hautzellen die gleichen Signalwege durchlaufen wie die Prostatakarzinomzellen, wurde der p53-Proteingehalt untersucht. In den Prostatakarzinomzellen, welche wt p53 exprimieren, kam es zur Zunahme der Proteinmenge des Tumorsuppressorproteins. Die SK-Mel28-Zellen exprimieren ebenfalls wt p53. Für die normalen Zellen sollte das auch gelten, da nur wt p53 seine Aufgaben in Zellzyklusregulation und Einleitung der Apoptose wahrnehmen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die SK-Mel28-Zellen mit einer Zunahme des p53-Proteingehalts auf die Hemmung der CK2 durch TBB

reagieren, während die 1BrhTert-Zellen keine Zunahme zeigen. Die normalen Zellen werden offensichtlich auch in diesem Punkt nicht durch den CK2-Hemmstoff beeinflusst. Die Melanomzellen verhalten sich offensichtlich ebenso wie die Prostatakarzinomzellen, die wt p53 exprimieren. Möglicherweise lassen sich die Signalwege, die im Prostatakarzinom durchlaufen werden auch auf maligne Melanome übertragen. Dazu müssten alle anderen Signale, die für das PCA aufgedeckt wurden, ebenfalls untersucht werden. Es besteht allerdings die Möglichkeit, CK2-Inhibitoren auf ein breiteres Spektrum von Tumoren anwenden zu können, ohne dass normale Zellen von der Behandlung betroffen werden. Für Glioblastome (94), Brustkrebs (145,146) und Pankreaskarzinome (147) sind CK2-Inhibitoren als Tumortheraeutika ebenfalls eine Möglichkeit. Für zwei Inhibitoren sind mittlerweile auch schon klinische Studien angelaufen. Eine klinische Phase I-Studie besteht bereits für einen CK2-Hemmstoff namens CX-4945. In dieser Studie werden neben dem Prostatakarzinom, Brustkrebs, Myelome und Pankreaskrebs untersucht (Cylene Pharmaceuticals, USA). Für den Inhibitor CIGB-300 wurden klinische Phase I Studien für zervikale Krankheiten durchgeführt (148,149).

Für die bis hierhin diskutierten Experimente wurden CK2-Hemmstoffe verwendet, die durch die Konkurrenz mit ATP die Kinaseaktivität der CK2 beeinflussen. Aufgrund der Konkurrenz mit ATP muss die Spezifität immer in Frage gestellt bleiben. Viele andere Kinasen benötigen ATP genauso als Phosphatdonator wie es die Proteinkinase CK2 tut. So besteht immer die Möglichkeit, dass andere Kinasen ebenfalls von den CK2-Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt werden. Das katalytische Zentrum der CK2 ist enger als bei vielen anderen Kinasen, so dass die Inhibitoren nicht so leicht wieder hinaus gelangen (150). Dennoch muss bei der Vielzahl von über 500 Kinasen, die theoretisch im humanen Genom kodiert sind (151,152), in Betracht gezogen werden, dass einige von ihnen auch betroffen werden. Bei der Erstbeschreibung des Hemmstoffes TBB wurden etwas mehr als 20 Kinasen zum Test der Hemmung des Inhibitors verwendet. Unter diesen 20 Kinasen war TBB spezifisch für CK2 (36). Mittlerweile wurden ca. 80 Kinasen untersucht und es stellte sich heraus, dass einige andere Kinasen auch von TBB mit gehemmt werden. Bei einer Untersuchung von DMAT stellte sich das Ausmaß, das der Hemmstoff auf die anderen getesteten Kinasen hatte, noch dramatischer dar. So werden 33 Kinasen bis zu über 50% von DMAT ebenfalls gehemmt, teilweise genauso gut wie die CK2 (38). Zurzeit werden bei Studien zu neuen Hemmstoffen

maximal 80 der bekannten Kinasen auf deren Aktivität hin getestet. So bleibt die Problematik der Spezifität immer noch bestehen. Ein neuer vielversprechender Hemmstoff ist Quinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon), das 2009 als CK2-Inhibitor durch screenen einer Datenbank und Strukturanalysen gefunden wurde (40). Bei einer Konzentration von 1 μM hemmt dieses Anthrachinonderivat nur die CK2 bis auf 5% Restaktivität. Bei der Analyse dieses Hemmstoffes in den Prostatakarzinomzellen ergab sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kinaseaktivität auf bis zu 20-30% bei einer Konzentration von 50 μM bei Behandlung von LNCaP- bzw. PC-3-Zellen. Bei Behandlung der Leukämiezelllinie Jurkat konnte schon mit einer Konzentration von 5 μM eine Hemmung von etwa 50% gefunden werden (40). Der Unterschied in den Konzentrationen, die benötigt werden, um die CK2 in ihrer Kinaseaktivität zu beeinflussen, ist entsprechend Zelltyp-abhängig. Leukämiezellen, reagieren stärker auf die CK2-Inhibitoren als es solide Tumorzellen tun. Die Abhängigkeit vom Zelltyp wird auch von Fritz *et al.* beschrieben. Bei diesen Untersuchungen wurden Brustkrebszellen und Kolonkarzinomzellen mit den Inhibitoren TBB, DMAT und Resorufin in jeweils gleichen Konzentrationen behandelt. Es zeigte sich, dass TBB und DMAT bei gleicher Konzentration in den Kolonkarzinomzellen die CK2 besser hemmen als in den Brustkrebszellen. Für den Hemmstoff Resorufin ergab sich das umgekehrte Bild, die Kolonkarzinomzellen werden bei gleicher Konzentration stärker in ihrer Aktivität eingeschränkt, als die Brustkrebszellen (153). Insgesamt bedeutet das auch, dass für alle Zellen, die zu Untersuchungen herangezogen werden sollen, immer erst festgestellt werden muss, wie sich die Inhibitoren auf die CK2-Kinaseaktivität auswirken. Bei der Gegenüberstellung von TBB und Quinalizarin in den Jurkat-Zellen hinsichtlich der Lebensfähigkeit wird deutlich, dass ca. ein Viertel der Zellen nach Behandlung mit 5 μM TBB sterben, mit Quinalizarin sind es ungefähr zwei Drittel der Zellen (40). Für hormonsensitive Prostatakarzinomzellen ist die zehnfache Konzentration an TBB nötig, um ein Viertel der Zellen in Apoptose zu treiben. Auch hier liegt die für die Hemmung der CK2 festgestellte Zelltyp-Abhängigkeit wieder vor. Von Fritz *et al.* konnte diese genauso gezeigt werden. Vor allem mit dem Inhibitor Resorufin zeigen die Brustkrebszellen in dieser Publikation ein deutlich anderes Verhalten bezüglich der Lebensfähigkeit als die Kolonkarzinomzellen. Die Kolonkarzinomzellen werden bis auf 20% ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt, wohingegen die Brustkrebszellen noch um die 80% Viabilität aufweisen (153). Das heißt genau wie für die

Kinaseaktivität muss die Lebensfähigkeit jeder Zelllinie, die in Betracht kommt, zunächst untersucht werden, weil man nie davon ausgehen darf, dass alle Zellen gleich auf die Inhibitoren für CK2 reagieren. Die von mir in den Prostatakarzinomzellen festgestellte Hemmung der CK2 resultiert auch für den Inhibitor Quinalizarin in einem konzentrations- sowie zeitabhängigen Rückgang der Lebensfähigkeit. Die Lebensfähigkeit geht dabei mit 50 μ M Quinalizarin nach 72 Stunden Inkubation in beiden Zelllinien LNCaP und PC-3 auf nahezu null zurück. Die Reduktion der Viabilität nach Quinalizarin-Behandlung beruht in den LNCaP-Zellen wie auch nach TBB-Behandlung auf Apoptose, was durch PARP-Spaltung nachgewiesen wurde. In den PC-3-Zellen dagegen tritt kaum ein PARP-Spaltprodukt auf. Daraus muss geschlossen werden, dass diese Zellen nicht hauptsächlich durch Apoptose sterben. Bei einer Behandlung mit Resorufin wird beschrieben, dass es zwar zu einem Rückgang in der Lebensfähigkeit in Prostata- und Kolonkarzinomzellen kommt, dieser aber nicht durch Caspase-vermittelte Apoptose zustande kommt (144). Quinalizarin wurde zwar im Hinblick auf die Art des ausgelösten Zelltodes untersucht und es wurde festgestellt, dass mehr Apoptose als Nekrose induziert wird, aber diese Untersuchung wurde nur für die Zelllinie Jurkat durchgeführt (40). Wie oben beschrieben sind sowohl Hemmung der CK2-Kinaseaktivität als auch die Lebensfähigkeit nach Behandlung mit den Inhibitoren Zelltyp-abhängig. Es ist also keinesfalls ausgeschlossen, dass dies auch für die Art des Zelltodes gültig ist. Möglicherweise liegt in vorliegender Arbeit nach Quinalizarin-Behandlung der PC-3-Zellen auch eine andere Form von Zelltod vor. Dieser Sachverhalt müsste näher untersucht werden, um festzustellen, auf welche Weise diese Zellen sterben.

Andere Möglichkeiten die CK2 zu hemmen, bestehen zum Beispiel durch RNA-Interferenz, dabei kommt es zum Einsatz von siRNA oder antisense Oligonukleotiden. Ahmed und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Verwendung von antisense Oligonukleotiden das Wachstum von PCA-Zellen gehemmt wird. In ALVA-41- und PC-3-Zellen wurde nach Einbringen der antisense Oligonukleotide festgestellt, dass verstärkt reaktive Sauerstoffspezies auftreten und die Caspase 3-Aktivität zunimmt. Ebenso konnte Cytochrom C Freisetzung und verminderte Lebensfähigkeit einhergehend mit einer Zunahme im SubG1-Peak der Zellzyklusanalyse gefunden werden (108). Auch im Xenograft-Modell konnte die oben beschriebene Wirkung der antisense Oligonukleotide bestätigt werden (27). Für

die Herunterregulation der CK2 mittels siRNA oder antisense Oligonukleotide werden relativ hohe Konzentrationen benötigt, um eine konstante Rest-Proteinmenge zu erreichen. Von Seeber *et al.* wird der Einsatz von 300 nM siRNA berichtet (154). Dies beruht möglicherweise auf der hohen Stabilität der katalytischen Untereinheiten (154). Darüber hinaus könnte es eine Rolle spielen, ob die CK2 als Holoenzym oder in nicht komplexierter Form vorliegt (154). Außerdem könnten auch die zelluläre Lokalisation, sowie der Expressionsgehalt entscheidend für die Wirkung von siRNA oder antisense Oligonukleotiden sein (154). Außerdem ist die durch den Einsatz von siRNA eingeleitete Apoptose ebenso Zelltyp-abhängig (154), wie die durch die Inhibitoren eingeleitete. In der Arbeit von Seeber wurden allerdings keine Prostatakarzinomzellen verwendet, so dass in vorliegender Arbeit versucht werden sollte, siRNAs gegen die CK2-Untereinheiten α und α' einzusetzen, um unspezifische Effekte der Inhibitoren auszuschließen. So wurden die LNCaP-Zellen zunächst einzeln mit den siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten transfiziert. Nach Austesten verschiedener Konzentrationen wurde eine Konzentration von 40 nM als die geeignetste befunden, um weitere Experimente durchzuführen. Bei Transfektion von 40 nM siRNA gegen die α -Untereinheit besteht ein Restproteingehalt von 30%. Gleiches gilt für die CK2 α' -Untereinheit, auch hier liegen 30% Restprotein nach Transfektion von 40 nM siRNA vor. Bei Betrachtung der Kinaseaktivität fällt auf, dass nur nach Herunterregulation der α -Untereinheit die CK2 in ihrer Kinaseaktivität gehemmt wird. Reguliert man die CK α' -Untereinheit herunter, kann kaum ein Rückgang der Kinaseaktivität festgestellt werden. Die Restaktivität bei Verwendung der siRNA gegen CK2 α liegt bei 60%, die bei Verwendung der siRNA gegen CK2 α' liegt bei etwa 90%. Werden beide siRNAs zu gleichen Teilen gleichzeitig transfiziert, erhält man eine Reduktion der Kinaseaktivität um 40%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Wesentlichen die CK2 α -Untereinheit für die Kinaseaktivität im Prostatakarzinom verantwortlich ist, da sich kein zusätzlicher Effekt ergibt, wenn gleichzeitig siRNAs gegen beide katalytischen Untereinheiten transfiziert werden. Die Aktivität liegt auch dann bei 60%, dem Wert, der für die α -Untereinheit allein festgestellt wurde. Da eine Herunterregulation der katalytischen Untereinheiten eine Zerstörung des CK2-Holoenzym bedeutet, wurde die regulatorische β -Untereinheit betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass auch hier die Proteinmenge mit den katalytischen Untereinheiten abnimmt, sowohl bei Transfektion der siRNA gegen CK2 α als auch gegen CK2 α' . In der Literatur ist

beschrieben, dass die Herunterregulation der β -Untereinheit nur nach Transfektion der siRNA gegen CK2 α oder gegen beide katalytischen Untereinheiten gemeinsam auftritt (154). Hier konnte dies für alle drei Fälle in ähnlichem Ausmaß festgestellt werden. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass in vorliegender Arbeit ein anderes Zellsystem benutzt wurde als in der Literatur. Durch die unterschiedlichen Auswirkungen der siRNAs auf die Kinaseaktivität kommen den katalytischen Untereinheiten im Prostatakarzinom offensichtlich verschiedene Aufgaben zu, obwohl die katalytischen Untereinheiten zu 90% Homologie in ihren katalytischen Zentren aufweisen. Dass die katalytischen Untereinheiten verschiedene Aufgaben übernehmen, ist bereits bekannt. So führt ein „knock-out“ der CK2 α' -Untereinheit zu Infertilität männlicher Mäuse, wohingegen ein „knock-out“ der CK2 α -Untereinheit zu Letalität führt (17,18). Dies bedeutet, dass die CK2 α bei Verlust von CK2 α' deren Funktion mit übernehmen kann, anders herum scheint dies nicht möglich. Gleiches könnte auch für die in dieser Arbeit durchgeführte Herunterregulation der katalytischen Untereinheiten in den LNCaP-Zellen gelten. Die CK2-Kinaseaktivität beträgt bei Herunterregulation der α' -Untereinheit noch um die 90%, im Gegensatz dazu ca. 60% bei Herunterregulation der α -Untereinheit. Von Olsen *et al.* konnte bei der Analyse von Holoenzymen mit zwei CK2 α -Untereinheiten bzw. zwei CK2 α' -Untereinheiten festgestellt werden, dass sie sich in ihrer katalytischen Aktivität gegenüber dem, auch in dieser Arbeit verwendeten, Substratpeptid nicht unterscheiden (155). Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Analyse der thermischen Stabilität, das Holoenzym mit zwei CK2 α -Untereinheiten war dabei stabiler als das mit zwei CK2 α' -Untereinheiten (155). Außerdem zeigt das Holoenzym mit den CK2 α' -Untereinheiten keine Autophosphorylierung der CK2 β -Untereinheit (155). CK2 α wird bei der Mitose phosphoryliert und kann dann eine Interaktion mit der Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 eingehen und eine Aufgabe in der Zellteilung wahrnehmen (156). Bei CK2 α' kommt es nicht zu einer solchen Phosphorylierung während der Mitose. Bei „knock-out“ Studien oder der Verwendung von siRNAs, muss immer bedacht werden, dass Interaktionen, für die keine Kinaseaktivität benötigt wird, ebenso wenig erfolgen können, wie die Phosphorylierungen der Substrate. Pin1 interagiert z. B. mit CK2 ohne von der Proteinkinase phosphoryliert zu werden (156). Im Gehirn interagiert CK2 α unabhängig von der Kinaseaktivität mit den Komponenten des Komplexes aus Cdk5

und p35 und hemmt die Aktivierung der enzymatischen Aktivität von Cdk5 durch p35, indem CK2 α p35 aus dem Komplex verdrängt (157). Bei der Wahl der Mittel muss also bedacht werden, welches Ziel die Studie verfolgt. Gilt das Interesse Kinase-abhängigen Vorgängen, bleibt nur die Wahl zwischen dominant-negativen Mutanten und mehr oder weniger spezifischen Inhibitoren. Bei dominant-negativen Mutanten handelt es sich um Expressionsvektoren, die für die katalytischen CK2-Untereinheiten kodieren und eine Mutation von Lysin zu Alanin in der katalytischen Domäne enthalten, so dass das exprimierte Protein keine Kinaseaktivität aufweist. Bei den dominant-negativen Mutanten sollte die Stöchiometrie in der Zelle erhalten bleiben. Es besteht aber bei diesem System die Ungewissheit über die Effizienz der durchzuführenden Transfektion und darüber, ob der endogene CK2-Proteingehalt die Effekte der dominant-negativen Mutanten überschattet (158). Daher scheinen Inhibitoren noch immer die beste Wahl zu sein, wenn es darum geht, die Kinaseaktivität der CK2 zu beeinflussen. In letzter Zeit werden vermehrt Inhibitoren gefunden, die nicht das aktive Zentrum der CK2 blockieren, so dass in Zukunft die Möglichkeit gegeben sein wird, nicht mit ATP-kompetitiven Hemmstoffen arbeiten zu müssen.

Insgesamt betrachtet scheinen eher hormonsensitive Zellen als hormoninsensitive Zellen sich durch den CK2-Inhibitor TBB in Apoptose treiben zu lassen. Dabei scheint der apoptotische Prozess weder vom in den Zellen vorliegenden p53 noch vom Androgenrezeptor abhängig zu sein. Vielmehr scheint der Transkriptionsfaktor CHOP und damit möglicherweise einhergehende Auslösung der ER-Stress-Antwort, die in der Einleitung des extrinsischen Apoptosesignalweges resultiert, verantwortlich zu sein. Mit der Herunterregulation zweier anti-apoptotischer Proteine konnte zumindest eine Möglichkeit gefunden werden, hormoninsensitive Zellen für andere Therapeutika zu sensibilisieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 auch auf andere Tumore angewendet werden kann, was ein zusätzliches Potential als Therapeutikum ausmacht. Der Wirkmechanismus des neuen Inhibitors Quinalizarin konnte in dieser Arbeit nur angerissen werden, es bleibt herauszufinden, ob dieser Hemmstoff möglicherweise in der Lage ist, auch hormoninsensitive Zellen zu beeinflussen und warum dies dann der Fall ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Burnett,G. und Kennedy,E.P. The enzymatic phosphorylation of proteins. J. Biol. Chem. **211**: 969-980, 1954.
2. Litchfield,D.W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. Biochem. J. **369**: 1-15, 2003.
3. Ahmed,K., Wilson,M.J. und Davis,A.T. Phosvitin phosphate content. Implications for protein kinase assay. Biochim. Biophys. Acta **377**: 80-83, 1975.
4. Bidwai,A.P., Reed,J.C. und Glover,C.V. Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. Arch. Biochem. Biophys. **300**: 265-270, 1993.
5. Meggio,F., Boldyreff,B.S., Marin,O., Pinna,L.A. und Issinger,O.-G. CK2:Role of the β -subunit on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. Eur. J. Biochem. **204**: 293-297, 1992.
6. Guerra,B., Boldyreff,B., Sarno,S., Cesaro,L., Issinger,O.G. und Pinna,L.A. CK2: A protein kinase in need of control. Pharmacol. Ther. **82**: 303-313, 1999.
7. Lehnert,S., Götz,C. und Montenarh,M. Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p. Oncogene **27**: 2390-2400, 2008.
8. Faust,M., Schuster,N. und Montenarh,M. Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. FEBS Letters **462**: 51-56, 1999.
9. Faust,M., Kartarius,S., Schwindling,S.L. und Montenarh,M. Cyclin H is a new binding partner for protein kinase CK2. Biochem. Biophys. Res. Commun. **269**: 6-12, 2002.

7. Literaturverzeichnis

10. Schäfer,B., Götz,C., Dudek,J., Hessenauer,A., Matti,U. und Montenarh,M. KIF5C, a new binding partner for protein kinase CK2 with a preference for CK2 α' . *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 339-349, 2009.
11. Wagner,P., Appel,K., Issinger,O.G. und Montenarh,M. On the interaction of p53 with casein kinase II. *Int. J. Oncol.* **4**: 491-498, 1994.
12. Schuster,N., Götz,C., Faust,M., Schneider,E., Prowald,A., Jungbluth,A. und Montenarh,M. Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J. Cell. Biochem.* **81**: 172-181, 2001.
13. Meggio,F. und Pinna,L.A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *The FASEB Journal* **17**: 349-368, 2003.
14. Ahmed,K., Gerber,D.A. und Cochet,C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* **12**: 226-230, 2002.
15. Buchou,T., Vernet,M., Blond,O., Jensen,H.H., Pointu,H., Olsen,B.B., Cochet,C., Issinger,O.G. und Boldyreff,B. Disruption of the regulatory β subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 908-915, 2003.
16. Glover,C.V., III. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**: 95-133, 1998.
17. Lou,D.Y., Dominguez,I., Toselli,P., Landesman-Bollag,E., O'Brien,C. und Seldin,D.C. The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol. Cell Biol.* **28**: 131-139, 2007.
18. Xu,X., Toselli,P.A., Russell,L.D. und Seldin,D.C. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit. *Nature Genet.* **23**: 118-121, 1999.

7. Literaturverzeichnis

19. Channavajhala,P. und Seldin,D.C. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene* **21**: 5280-5288, 2002.
20. Tawfic,S., Yu,S., Wang,H., Faust,R., Davis,A. und Ahmed,K. Protein kinase CK2 signaling in neoplasia. *Histol. Histopathol.* **16**: 573-582, 2001.
21. Wang,G., Ahmad,K.A., Unger,G., Slaton,J.W. und Ahmed,K. CK2 signaling in androgen-dependent and -independent prostate cancer. *J. Cell Biochem.* **99**: 382-391, 2006.
22. Laramas,M., Pasquier,D., Filhol,O., Ringeisen,F., Descotes,J.L. und Cochet,C. Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **43**: 928-934, 2007.
23. Guo,C.H., Yu,S.H., Davis,A.T., Wang,H.M., Green,J.E. und Ahmed,K. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 5992-5999, 2001.
24. Götz,C., Bachmann,C. und Montenarh,M. Inhibition of protein kinase CK2 leads to a modulation of androgen receptor dependent transcription in prostate cancer cells. *The Prostate* **67**: 125-134, 2007.
25. Hessenauer,A., Montenarh,M. und Götz,C. Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **22**: 1263-1270, 2003.
26. Cha,T.L., Qiu,L., Chen,C.T., Wen,Y. und Hung,M.C. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Cancer Res.* **65**: 2287-2295, 2005.

7. Literaturverzeichnis

27. Slaton, J.W., Unger, G.M., Sloper, D.T., Davis, A.T. und Ahmed, K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Cell Growth Differ.* **2**: 712-721, 2004.
28. Wang, G., Unger, G., Ahmad, K.A., Slaton, J.W. und Ahmed, K. Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells--a potential approach to cancer therapy. *Mol. Cell Biochem.* **274**: 77-84, 2005.
29. Wang, G., Ahmad, K.A. und Ahmed, K. Role of protein kinase CK2 in the regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **66**: 2242-2249, 2006.
30. Wang, G., Ahmad, K.A. und Ahmed, K. Modulation of death receptor-mediated apoptosis by CK2. *Mol. Cell Biochem.* **274**: 201-205, 2005.
31. Hessenauer A. Auswirkungen einer Proteinkinase CK2-Inhibition auf Prostatazellen. 2006; Dissertation. Universität des Saarlandes
32. Schneider C.C. CK2 in der Signaltransduktion (Apoptose) des Prostatakarzinoms. 2007; Diplomarbeit. TU Kaiserslautern.
33. Sarno, S., Ghisellini, P. und Pinna, L.A. Unique activation mechanism of protein kinase CK2 - The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **277**: 22509-22514, 2002.
34. Prudent, R. und Cochet, C. New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box. *Chem. Biol.* **16**: 112-120, 2009.
35. Meggio, F., Shugar, D. und Pinna, L.A. Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* **187**: 89-94, 1990.

7. Literaturverzeichnis

36. Sarno,S., Reddy,H., Meggio,F., Ruzzene,M., Davies,S.P., Donella-Deana,A., Shugar,D. und Pinna,L.A. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Letters* **496**: 44-48, 2001.
37. Pagano,M.A., Meggio,F., Ruzzene,M., Andrzejewska,M., Kazimierczuk,Z. und Pinna,L.A. 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**: 1040-1044, 2004.
38. Pagano,M.A., Bain,J., Kazimierczuk,Z., Sarno,S., Ruzzene,M., Di Maira,G., Elliott,M., Orzeszko,A., Cozza,G., Meggio,F. und Pinna,L.A. The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2. An update. *Biochem. J.* **415**: 353-365, 2008.
39. Sandholt,I.S., Olsen,B.B., Guerra,B. und Issinger,O.G. Resorufin: a lead for a new protein kinase CK2 inhibitor. *Anticancer Drugs* **20**: 238-248, 2009.
40. Cozza,G., Mazzorana,M., Papinutto,E., Bain,J., Elliott,M., Di,M.G., Gianoncelli,A., Pagano,M.A., Sarno,S., Ruzzene,M., Battistutta,R., Meggio,F., Moro,S., Zagotto,G. und Pinna,L.A. Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem. J.* **421**: 387-395, 2009.
41. Hung,M.S., Xu,Z., Lin,Y.C., Mao,J.H., Yang,C.T., Chang,P.J., Jablons,D.M. und You,L. Identification of hematein as a novel inhibitor of protein kinase CK2 from a natural product library. *BMC. Cancer* **9**: 135 2009.
42. Hengartner,M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776, 2000.
43. Kerr,J.F., Wyllie,A.H. und Currie,A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257, 1972.

7. Literaturverzeichnis

44. Igney,F.H. und Krammer,P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 277-288, 2002.
45. Krammer,P.H. The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol. Lett.* **102-103**: 131-137, 1998.
46. Schmitz,I., Kirchhoff,S. und Krammer,P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 1123-1136, 2000.
47. Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H. und Peter,M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**: 5579-5588, 1995.
48. Sprick,M.R., Weigand,M.A., Rieser,E., Rauch,C.T., Juo,P., Blenis,J., Krammer,P.H. und Walczak,H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* **12**: 599-609, 2000.
49. Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H. und Peter,M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**: 1675-1687, 1998.
50. Zamzami,N. und Kroemer,G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 67-71, 2001.
51. Martinou,J.C. und Green,D.R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 63-67, 2001.
52. Riedl,S.J. und Salvesen,G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 405-413, 2007.

7. Literaturverzeichnis

53. Bao,Q. und Shi,Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death. Differ.* **14**: 56-65, 2007.
54. Kurokawa,M. und Kornbluth,S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* **138**: 838-854, 2009.
55. Deveraux,Q.L., Schendel,S.L. und Reed,J.C. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol. Clin.* **19**: 57-74, 2001.
56. Deveraux,Q.L. und Reed,J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**: 239-252, 1999.
57. Deveraux,Q.L., Roy,N., Stennicke,H.R., Van,A.T., Zhou,Q., Srinivasula,S.M., Alnemri,E.S., Salvesen,G.S. und Reed,J.C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* **17**: 2215-2223, 1998.
58. Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L. und Wang,X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42, 2000.
59. Verhagen,A.M., Ekert,P.G., Pakusch,M., Silke,J., Connolly,L.M., Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J. und Vaux,D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53, 2000.
60. Polyak,K., Xia,Y., Zweier,J.L., Kinzler,K.W. und Vogelstein,B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300-305, 1997.
61. Yamaguchi,H. und Wang,H.G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 45495-45502, 2004.

7. Literaturverzeichnis

62. Vojtesek,B., Bártek,J., Midgley,C.A. und Lane,D.P. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods* **151**: 237-244, 1992.
63. Stephen,C.W., Helminen,P. und Lane,D.P. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: Insights into antibody-peptide interactions. *J. Mol. Biol.* **248**: 58-78, 1995.
64. Kaighn,M.E., Narayan,K.S., Ohnuki,Y., Lechner,J.F. und Jones,L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* **17**: 16-23, 1979.
65. van Bokhoven,A., Varella-Garcia,M., Korch,C., Johannes,W.U., Smith,E.E., Miller,H.L., Nordeen,S.K., Miller,G.J. und Lucia,M.S. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**: 205-225, 2003.
66. Carroll,A.G., Voeller,H.J., Sugars,L. und Gelmann,E.P. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* **23**: 123-134, 1993.
67. Stone,K.R., Mickey,D.D., Wunderli,H., Mickey,G.H. und Paulson,D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* **21**: 274-281, 1978.
68. Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Kawinski,E., Karr,J.P., Rosenthal,H., Chu,T.M., Mirand,E.A. und Murphy,G.P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**: 1809-1818, 1983.
69. Sramkoski,R.M., Pretlow,T.G., Giaconia,J.M., Pretlow,T.P., Schwartz,S., Sy,M.S., Marengo,S.R., Rhim,J.S., Zhang,D. und Jacobberger,J.W. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **35**: 403-409, 1999.

7. Literaturverzeichnis

70. Tepper,C.G., Boucher,D.L., Ryan,P.E., Ma,A.H., Xia,L., Lee,L.F., Pretlow,T.G. und Kung,H.J. Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res.* **62**: 6606-6614, 2002.
71. Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W. und Vogelstein,B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497-1501, 1998.
72. Schrimpf G. (Herausg.) Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 3.Auflage ed. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag: 2002;
73. Marshak,D.R. und Carroll,D. Synthetic peptide substrates for casein kinase II. *Methods Enzymol.* **200**: 134-156, 1991.
74. Knerr S.; Bedeutung von Arylhydrocarbon Rezeptor regulierten Phase I Enzymen für die Kanzerogenität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). 2006; Dissertation. TU Kaiserslautern.
75. Volkmann,X., Fischer,U., Bahr,M.J., Ott,M., Lehner,F., MacFarlane,M., Cohen,G.M., Manns,M.P., Schulze-Osthoff,K. und Bantel,H. Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* **46**: 1498-1508, 2007.
76. Hastie,C.J., McLauchlan,H.J. und Cohen,P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat. Protoc.* **1**: 968-971, 2006.
77. Bajgelman,M.C. und Strauss,B.E. The DU145 human prostate carcinoma cell line harbors a temperature-sensitive allele of p53. *Prostate* **66**: 1455-1462, 2006.

7. Literaturverzeichnis

78. Nicholson,D.W., Ali,A., Thornberry,N.A., Vaillancourt,J.P., Ding,C.K., Gallant,M., Gareau,Y., Griffin,P.R., Labelle,M., Lazebnik,Y.A. und . Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43, 1995.
79. Riedl,S.J. und Salvesen,G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 405-413, 2007.
80. Pandey,P., Saleh,A., Nakazawa,A., Kumar,S., Srinivasula,S.M., Kumar,V., Weichselbaum,R., Nalin,C., Alnemri,E.S., Kufe,D. und Kharbanda,S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* **19**: 4310-4322, 2000.
81. Beere,H.M., Wolf,B.B., Cain,K., Mosser,D.D., Mahboubi,A., Kuwana,T., Taylor,P., Morimoto,R.I., Cohen,G.M. und Green,D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**: 469-475, 2000.
82. Paul,C., Manero,F., Gonin,S., Kretz-Remy,C., Viot,S. und Arrigo,A.P. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol. Cell Biol.* **22**: 816-834, 2002.
83. Bruey,J.M., Ducasse,C., Bonniaud,P., Ravagnan,L., Susin,S.A., Diaz-Latoud,C., Gurbuxani,S., Arrigo,A.P., Kroemer,G., Solary,E. und Garrido,C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**: 645-652, 2000.
84. Rasheva,V.I. und Domingos,P.M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* **14**: 996-1007, 2009.
85. Ubeda,M. und Habener,J.F. CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **278**: 40514-40520, 2003.

86. Shiraishi,T., Yoshida,T., Nakata,S., Horinaka,M., Wakada,M., Mizutani,Y., Miki,T. und Sakai,T. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 6364-6370, 2005.
87. Sanchez,A.M., Martinez-Botas,J., Malagarie-Cazenave,S., Olea,N., Vara,D., Lasuncion,M.A. und Diaz-Laviada,I. Induction of the endoplasmic reticulum stress protein GADD153/CHOP by capsaicin in prostate PC-3 cells: a microarray study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**: 785-791, 2008.
88. Guyton,K.Z., Xu,Q. und Holbrook,N.J. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem. J.* **314 (Pt 2)**: 547-554, 1996.
89. Eferl,R. und Wagner,E.F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 859-868, 2003.
90. Hess,J., Angel,P. und Schorpp-Kistner,M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **117**: 5965-5973, 2004.
91. Thompson,M.R., Xu,D. und Williams,B.R. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J. Mol. Med.* **87**: 1053-1060, 2009.
92. Hai,T., Wolfgang,C.D., Marsee,D.K., Allen,A.E. und Sivaprasad,U. ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* **7**: 321-335, 1999.
93. St,G.C., Niknejad,N., Ma,L., Garbuio,K., Hai,T. und Dimitroulakos,J. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3. *Neoplasia.* **12**: 527-538, 2010.

7. Literaturverzeichnis

94. Kaminska,B., Ellert-Miklaszewska,A., Oberbek,A., Wisniewski,P., Kaza,B., Makowska,M., Bretner,M. und Kazimierczuk,Z. Efficacy and mechanism of anti-tumor action of new potential CK2 inhibitors toward glioblastoma cells. *Int. J. Oncol.* **35**: 1091-1100, 2009.
95. Cozza,G., Bonvini,P., Zorzi,E., Poletto,G., Pagano,M.A., Sarno,S., Donella-Deana,A., Zagotto,G., Rosolen,A., Pinna,L.A., Meggio,F. und Moro,S. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J. Med. Chem.* **49**: 2363-2366, 2006.
96. Gianoncelli,A., Cozza,G., Orzeszko,A., Meggio,F., Kazimierczuk,Z. und Pinna,L.A. Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 7281-7289, 2009.
97. Prowald,K., Fischer,H. und Issinger,O.G. Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures. *FEBS Letters* **176**: 479-483, 1984.
98. Desagher,S., Osen-Sand,A., Montessuit,S., Magnenat,E., Vilbois,F., Hochmann,A., Journot,L., Antonsson,B. und Martinou,J.C. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* **8**: 601-611, 2001.
99. Shin,S., Lee,Y., Kim,W., Ko,H., Choi,H. und Kim,K. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* **24**: 3532-3542, 2005.
100. McDonnell,M.A., Abedin,M.J., Melendez,M., Platikanova,T.N., Ecklund,J.R., Ahmed,K. und Kelekar,A. Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8. *J. Biol. Chem.* **283**: 20149-20158, 2008.

7. Literaturverzeichnis

101. Li,P.F., Li,J., Muller,E.C., Otto,A., Dietz,R. und von,H.R. Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol. Cell* **10**: 247-258, 2002.
102. Mosmann,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63, 1983.
103. Gobeil,S., Boucher,C.C., Nadeau,D. und Poirier,G.G. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death. Differ.* **8**: 588-594, 2001.
104. Harris,S.L. und Levine,A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**: 2899-2908, 2005.
105. Porte,S., Valencia,E., Yakovtseva,E.A., Borrás,E., Shafqat,N., Debreczeny,J.E., Pike,A.C., Oppermann,U., Farres,J., Fita,I. und Pares,X. Three-dimensional structure and enzymatic function of proapoptotic human p53-inducible quinone oxidoreductase PIG3. *J. Biol. Chem.* **284**: 17194-17205, 2009.
106. Campomenosi,P., Monti,P., Aprile,A., Abbondandolo,A., Frebourg,T., Gold,B., Crook,T., Inga,A., Resnick,M.A., Iggo,R. und Fronza,G. p53 mutants can often transactivate promoters containing a *p21* but not *Bax* or *PIG3* responsive elements. *Oncogene* **20**: 3573-3579, 2001.
107. Schneider,C.C., Hessenauer,A., Götz,C. und Montenarh,M. DMAT:an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks. *Oncol. Rep.* **21**: 1593-1597, 2008.
108. Ahmad,K.A., Wang,G. und Ahmed,K. Intracellular hydrogen peroxide production is an upstream event in apoptosis induced by down-regulation of casein kinase 2 in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **4**: 331-338, 2006.

7. Literaturverzeichnis

109. Tepper,C.G., Boucher,D.L., Ryan,P.E., Ma,A.H., Xia,L., Lee,L.F., Pretlow,T.G. und Kung,H.J. Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res.* **62**: 6606-6614, 2002.
110. Rokhlin,O.W., Taghiyev,A.F., Guseva,N.V., Glover,R.A., Chumakov,P.M., Kravchenko,J.E. und Cohen,M.B. Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. *Oncogene* **24**: 6773-6784, 2005.
111. Yu,S.Q., Han,B.M., Shao,Y., Wu,J.T., Zhao,F.J., Liu,H.T., Sun,X.W., Tang,Y.Q. und Xia,S.J. Androgen receptor functioned as a suppressor in the prostate cancer cell line PC3 in vitro and in vivo. *Chin Med. J. (Engl.)* **122**: 2779-2783, 2009.
112. Marusawa,H., Matsuzawa,S., Welsh,K., Zou,H., Armstrong,R., Tamm,I. und Reed,J.C. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* **22**: 2729-2740, 2003.
113. Mita,A.C., Mita,M.M., Nawrocki,S.T. und Giles,F.J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **14**: 5000-5005, 2008.
114. Shariat,S.F., Lotan,Y., Saboorian,H., Khoddami,S.M., Roehrborn,C.G., Slawin,K.M. und Ashfaq,R. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer* **100**: 751-757, 2004.
115. Altieri,D.C. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* **27**: 6276-6284, 2008.
116. Zhang,M., Latham,D.E., Delaney,M.A. und Chakravarti,A. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* **24**: 2474-2482, 2005.

7. Literaturverzeichnis

117. Shen,J., Liu,J., Long,Y., Miao,Y., Su,M., Zhang,Q., Han,H. und Hao,X. Knockdown of survivin expression by siRNAs enhances chemosensitivity of prostate cancer cells and attenuates its tumorigenicity. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **41**: 223-230, 2009.
118. Tapia,J.C., Torres,V.A., Rodriguez,D.A., Leyton,L. und Quest,A.F. Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**: 15079-15084, 2006.
119. Lanneau,D., De,T.A., Maurel,S., Didelot,C. und Garrido,C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion.* **1**: 53-60, 2007.
120. Li,C.Y., Lee,J.S., Ko,Y.G., Kim,J.I. und Seo,J.S. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* **275**: 25665-25671, 2000.
121. Garrido,C., Schmitt,E., Cande,C., Vahsen,N., Parcellier,A. und Kroemer,G. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**: 579-584, 2003.
122. Rocchi,P., So,A., Kojima,S., Signaevsky,M., Beraldi,E., Fazli,L., Hurtado-Coll,A., Yamanaka,K. und Gleave,M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **64**: 6595-6602, 2004.
123. Andrieu,C., Taieb,D., Baylot,V., Ettinger,S., Soubeyran,P., De-Thonel,A., Nelson,C., Garrido,C., So,A., Fazli,L., Bladou,F., Gleave,M., Iovanna,J.L. und Rocchi,P. Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene* **29**: 1883-1896, 2010.

7. Literaturverzeichnis

124. Rocchi,P., Beraldi,E., Ettinger,S., Fazli,L., Vessella,R.L., Nelson,C. und Gleave,M. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res.* **65**: 11083-11093, 2005.
125. Skjoth,I.H. und Issinger,O.G. Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.* **28**: 217-229, 2006.
126. Maehama,T. und Dixon,J.E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* **9**: 125-128, 1999.
127. Cardone,M.H., Roy,N., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., Franke,T.F., Stanbridge,E., Frisch,S. und Reed,J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321, 1998.
128. Fujita,E., Jinbo,A., Matuzaki,H., Konishi,H., Kikkawa,U. und Momoi,T. Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**: 550-555, 1999.
129. Di Maira G., Brustolon,F., Pinna,L.A. und Ruzzene,M. Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 3363-3373, 2009.
130. Faust,M., Jung,M., Günther,J., Zimmermann,R. und Montenarh,M. Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus. *Mol. Cell Biochem.* **227**: 73-80, 2001.
131. Faust,M. und Montenarh,M. Subcellular localization of protein kinase CK2: A key to its function? *Cell Tissue Res.* **301**: 329-340, 2000.

7. Literaturverzeichnis

132. Götz,C., Müller,A., Montenarh,M., Zimmermann,R. und Dudek,J. The ER-membrane-resident Hsp40 ERj1 is a novel substrate for protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**: 637-642, 2009.
133. Ron,D. und Habener,J.F. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* **6**: 439-453, 1992.
134. Guyton,K.Z., Xu,Q. und Holbrook,N.J. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem. J.* **314 (Pt 2)**: 547-554, 1996.
135. Bruhat,A., Jousse,C., Wang,X.Z., Ron,D., Ferrara,M. und Fafournoux,P. Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* **272**: 17588-17593, 1997.
136. Luethy,J.D. und Holbrook,N.J. Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res.* **52**: 5-10, 1992.
137. He,Q., Lee,D.I., Rong,R., Yu,M., Luo,X., Klein,M., El-Deiry,W.S., Huang,Y., Hussain,A. und Sheikh,M.S. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* **21**: 2623-2633, 2002.
138. Shiraishi,T., Yoshida,T., Nakata,S., Horinaka,M., Wakada,M., Mizutani,Y., Miki,T. und Sakai,T. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 6364-6370, 2005.

139. van der Sanden, M.H., Meems, H., Houweling, M., Helms, J.B. und Vaandrager, A.B. Induction of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 expression during inhibition of phosphatidylcholine synthesis is mediated via activation of a C/EBP-activating transcription factor-responsive element. *J. Biol. Chem.* **279**: 52007-52015, 2004.
140. Ubeda, M. und Habener, J.F. CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4987-4997, 2000.
141. Shaulian, E. und Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**: E131-E136 2002.
142. Huang, X., Li, X. und Guo, B. KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *J. Biol. Chem.* **283**: 29795-29801, 2008.
143. Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F.J. und Jordan, J. p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J. Physiol Biochem.* **60**: 287-307, 2004.
144. Sandholt, I.S., Olsen, B.B., Guerra, B. und Issinger, O.G. Resorufin: a lead for a new protein kinase CK2 inhibitor. *Anticancer Drugs* **20**: 238-248, 2009.
145. Persson, T., Yde, C.W., Rasmussen, J.E., Rasmussen, T.L., Guerra, B., Issinger, O.G. und Nielsen, J. Pyrazole carboxamides and carboxylic acids as protein kinase inhibitors in aberrant eukaryotic signal transduction: induction of growth arrest in MCF-7 cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* **5**: 3963-3970, 2007.
146. Yde, C.W., Frogne, T., Lykkesfeldt, A.E., Fichtner, I., Issinger, O.G. und Stenvang, J. Induction of cell death in antiestrogen resistant human breast cancer cells by the protein kinase CK2 inhibitor DMAT. *Cancer Lett.* **256**: 229-237, 2007.

147. Hamacher,R., Saur,D., Fritsch,R., Reichert,M., Schmid,R.M. und Schneider,G.
Casein kinase II inhibition induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.*
18: 695-701, 2007.
148. Perea,S.E., Reyes,O., Baladron,I., Perera,Y., Farina,H., Gil,J., Rodriguez,A.,
Bacardi,D., Marcelo,J.L., Cosme,K., Cruz,M., Valenzuela,C., Lopez-Saura,P.A.,
Puchades,Y., Serrano,J.M., Mendoza,O., Castellanos,L., Sanchez,A., Betancourt,L.,
Besada,V., Silva,R., Lopez,E., Falcon,V., Hernandez,I., Solares,M., Santana,A.,
Diaz,A., Ramos,T., Lopez,C., Ariosa,J., et al. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide
that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro
and in vivo. *Mol. Cell Biochem.* **316**: 163-167, 2008.
149. Solares,A.M., Santana,A., Baladron,I., Valenzuela,C., Gonzalez,C.A., Diaz,A.,
Castillo,D., Ramos,T., Gomez,R., Alonso,D.F., Herrera,L., Sigman,H., Perea,S.E.,
Acevedo,B.E. und Lopez-Saura,P. Safety and preliminary efficacy data of a novel
Casein Kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels
in patients with cervical malignancies. *BMC. Cancer* **9**: 146 2009.
150. Pinna,L.A. The raison D'etre of constitutively active protein kinases: The lesson of
CK2. *Accounts Chem. Res.* **36**: 378-384, 2003.
151. Manning,G., Whyte,D.B., Martinez,R., Hunter,T. und Sudarsanam,S. The protein
kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934, 2002.
152. Johnson,S.A. und Hunter,T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat.*
Methods **2**: 17-25, 2005.
153. Fritz,G., Issinger,O.G. und Olsen,B.B. Selectivity analysis of protein kinase CK2
inhibitors DMAT, TBB and resorufin in cisplatin-induced stress responses. *Int. J.*
Oncol. **35**: 1151-1157, 2009.

7. Literaturverzeichnis

154. Seeber,S., Issinger,O.G., Holm,T., Kristensen,L.P. und Guerra,B. Validation of protein kinase CK2 as oncological target. *Apoptosis*. **10**: 875-885, 2005.
155. Olsen,B.B., Boldyreff,B., Niefind,K. und Issinger,O.G. Purification and characterization of the CK2alpha'-based holoenzyme, an isozyme of CK2alpha: A comparative analysis. *Protein Expr. Purif.* **47**: 651-661, 2005.
156. Messenger,M.M., Saulnier,R.B., Gilchrist,A.D., Diamond,P., Gorbsky,G.J. und Litchfield,D.W. Interactions between protein kinase CK2 and Pin1 - Evidence for phosphorylation-dependent interactions. *J. Biol. Chem.* **277**: 23054-23064, 2002.
157. Lim,A.C.B., Hou,Z.B., Goh,C.P. und Qi,R.Z. Protein kinase CK2 is an inhibitor of the neuronal Cdk5 kinase. *J. Biol. Chem.* **279**: 46668-46673, 2004.
158. Duncan,J.S. und Litchfield,D.W. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**: 33-47, 2008.

8. Publikationen

1. Schneider C. C., Hessenauer A., Götz C. and Montenarh M. (2009):

DMAT, an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks

Oncology Reports 21: 1593-1597
2. Schneider C. C., Hessenauer A., Montenarh M. and Götz C. (2010):

p53 is dispensable for the induction of apoptosis after inhibition of protein kinase CK2

The Prostate 70:126-134
3. Schneider C. C., Hessenauer A., Götz C. and Montenarh M. (2010):

CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response

Cellular Signalling; in Revision
4. Schneider C. C., Hessenauer A., Günther J., Götz C. and Montenarh M.:

Inhibition of CK2 in prostate cancer cells results in a severe knock-down of cdc25C expression; In Vorbereitung

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Montenarh für die Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes. Darüber hinaus möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Prof. Dr. Claudia Götz und Sabine Kartarius möchte ich mich für die vielen Anregungen theoretischer wie technischer Natur bedanken.

An Katja Kostelnik geht mein Dank, weil sie durch ihre F-Arbeit einen Teil zu diesem Werk beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken. Auch einigen Kollegen „benachbarter“ Arbeitsgruppen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, soll mein Dank gebühren.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Frau Dr. Andrea Hessenauer, die trotz Arbeitsplatzwechsel immer ein offenes Ohr und viele gute Ideen hatte und immer für Diskussionen zu haben war.

Der letzte, aber sehr wichtige Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die durch ihr Vertrauen in mich und ihre moralische Unterstützung einen nicht unwesentlichen Teil auf meinem Weg durch Studium und Promotion zum Erreichen dieses Ziels beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Carolin Carmen Schneider

Geburtsort: Ottweiler/Saar

Geburtsdatum: 22. August 1982

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung: 1989 – 1993: Grundschule Maximilian-Kolbe-Schule,
Neunkirchen-Wiebelskirchen

1993 – 2002: Gymnasium am Steinwald,
Neunkirchen

Studium: 2002-2007 Studium der Diplomchemie an der TU
Kaiserslautern mit Abschluss als Diplomchemikerin

Promotion: 01.11.2007 Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. Montenarh, Medizinische Biochemie und
Molekularbiologie, Universität des Saarlandes