

Aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. Mathias Montenarh

Hemmung der Proteinkinase CK2: Auswirkungen auf zwei verschiedene Tumorzelllinien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von:

Tasja Sokolowsky

geboren am 20.02.1988 in Hannover

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	4
2.1	Das Karzinom des Cervix uteri	4
2.2	Das hepatozelluläre Karzinom	4
2.3	Die Proteinkinase CK2	5
2.4	Das endoplasmatische Retikulum.....	7
2.5	Aktivierender Transkriptionsfaktor 4 und seine Targets.....	9
2.6	Apoptose.....	10
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
4	MATERIALIEN UND METHODEN	14
4.1	Materialien.....	14
4.1.1	Materialien und Geräte	14
4.1.2	Chemikalien.....	15
4.1.3	Puffer und Lösungen	16
4.1.4	Antikörper	18
4.1.4.1	Primärantikörper.....	18
4.1.4.2	Sekundärantikörper.....	19
4.1.5	Proteinstandards	19
4.2	Methoden.....	20
4.2.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	20

4.2.1.1	Zelllinien.....	20
4.2.1.2	Kultivieren von Zellen.....	20
4.2.1.3	Passagieren von Zellen	20
4.2.1.4	Einfrieren von Zellen.....	21
4.2.1.5	Tauen von Zellen	21
4.2.1.6	Beseitigung von Kontaminationen	21
4.2.1.7	Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer	22
4.2.1.8	Die Behandlung der Zellen mit Hemmstoffen	22
4.2.1.9	Ernten von Zellen	23
4.2.2	Proteinbiochemische Methoden	23
4.2.2.1	Herstellung von Zellextrakten	23
4.2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
4.2.2.3	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE).....	24
4.2.2.4	Western Blot Analyse.....	25
4.2.2.5	Immunologischer Proteinnachweis.....	25
4.2.2.6	MTT- Assay.....	26
4.2.2.7	Überlebenskurve.....	26
5	ERGEBNISSE	27
5.1	HeLa- Zellen und der Hemmstoff der Proteinkinase CK2, TBB	27
5.1.1	Wachstumskurve von HeLa- Zellen, die mit TBB behandelt wurden	27
5.1.2	MTT- Assay von HeLa- Zellen nach Behandlung mit TBB	28
5.1.3	Apoptose der mit TBB behandelten HeLa- Zellen.....	29
5.1.4	ER- Stress der mit TBB behandelten HeLa- Zellen	30
5.1.5	ATF4 Expression in mit TBB behandelten HeLa- Zellen.....	32
5.1.6	ATF3 Expression in mit TBB behandelten HeLa- Zellen.....	33
5.2	HeLa- Zellen und der Hemmstoff der Proteinkinase CK2, Quinalizarin.....	34

5.2.1	Wachstumskurve von HeLa- Zellen, die mit Quinalizarin behandelt wurden	34
5.2.2	MTT- Assay von HeLa- Zellen nach Behandlung mit Quinalizarin.....	35
5.2.3	Apoptose der mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen.....	36
5.2.4	ER- Stress der mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen.....	38
5.2.5	ATF4 Expression in mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen	39
5.2.6	ATF3 Expression in mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen	40
5.3	HepG2- Zellen und die Hemmstoffe der Proteinkinase CK2, TBB und Quinalizarin .	41
5.3.1	Wachstumskurve von HepG2- Zellen, die mit TBB oder Quinalizarin behandelt wurden.....	42
5.3.2	MTT- Assay von HepG2- Zellen nach Behandlung mit TBB oder Quinalizarin .	43
5.3.3	Apoptose der mit Quinalizarin oder TBB behandelten HepG2- Zellen.....	44
5.3.4	ER- Stress der mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen	46
5.3.5	ATF4 Expression in mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen.....	47
5.3.6	ATF3 Expression in mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen.....	49
6	DISKUSSION	51
7	LITERATURVERZEICHNIS	58
7.1	Bücher.....	58
7.2	Internetseiten	58
7.3	Journals.....	58
8	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	68
8.1	Publikation.....	68
8.2	Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Apaf-1	„Apoptotic protease activating factor-1“
APS	Ammoniumpersulfat
ATF3	„activating transcription factor 3“
ATF4	„activating transcription factor 4“
ATF6	„activating transcription factor 6“
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	„immunoglobulin heavy chain-binding protein homolog“
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
CHOP	„CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein“
CK2	Proteinkinase CK2
CRE	„cAMP reponse element“
CREB	„cAMP-responsive element-binding protein
deion.	deionisiert
DISC	„death- inducing signalling complex“
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

eIF	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER vermittelte Degradation
ERK8	„extracellular-signal-regulated-kinase 8“
FADD	“Fas- associated death domain protein”
FCS	fötales Kälberserum
G	Glycin
GADD34	„growth arrest and DNA damage-inducible protein”
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GRP94	Glucose Regulierendes Protein 94
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HPV	Humanes Papillom Virus
IRE1	„inositol-requiring enzyme 1“
kDa	Kilodalton
μ	Micro
MNK1	[MAPK (mitogen-activated protein kinase)- interactin Kinase 1]
min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Nano
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	„phosphate buffered saline“

PDI	Protein-disulfid-isomerase
PERK	„double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase“
PKD1	Protein kinase D1
PP1c	„protein phosphatase 1c“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Threonin
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uORF	„upstream open reading frame“
UPR	„unfolded protein response“
UPS	Ubiquitin/Proteasom System
WHO	World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die statistische Wahrscheinlichkeit an einem Tumorleiden zu erkranken steigt mit der immer älter werdenden Bevölkerung in Europa an. Laut den neuesten Veröffentlichungen der Welt-Gesundheits- Organisation (WHO) ist Krebs in über der Hälfte der Länder der europäischen Region bereits die häufigste Ursache des vorzeitigen Todes (www.euro.who.int). Und obwohl sich Labore auf der ganzen Welt mit dem Thema Tumorerkrankungen und deren Heilung beschäftigen, bis heute die Heilungschance, weiter unbefriedigend. Die wichtigste Voraussetzung zur Behandlung einer Krankheit ist das Wissen über deren Pathogenese. Ein immer weiter in den Fokus der Tumorforschung gerücktes Zielmolekül in der Eindämmung des unaufhaltbaren Tumorwachstums bietet die Proteinkinase CK2. CK2 wird in vielen Tumorzellen überexprimiert und schützt diese vor Apoptose. Das besondere Interesse an der CK2 in der Tumorforschung ergibt sich daraus, dass sich ihre Aktivität von außen regulieren lässt. Bis heute konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Hemmung der CK2- Kinaseaktivität in verschiedenen Tumorzelllinien zur Induktion von Apoptose führt. Über welche Signalwege diese Induktion erfolgt und ob es im Verlauf der Signalwege noch weitere Eingriffsmöglichkeiten als Ansatzpunkt der Tumorthherapie gibt, ist noch nicht ausreichend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden an zwei verschiedenen Tumorzelllinien, HeLa und HepG2, Signalwege der Apoptoseinduktion in Zusammenhang mit induziertem Stress am endoplasmatischen Retikulum untersucht. Zur Hemmung der Kinaseaktivität der CK2 wurden zwei spezifische Hemmstoffe, TBB und Quinalizarin, verwendet. Zunächst wurde untersucht, in wie weit die gewählten Tumorzelllinien durch die CK2- Hemmung in ihrer Proliferation beeinflusst werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide CK2- Hemmstoffe einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen haben, musste im nächsten Schritt überprüft werden, welche Auswirkung diese Hemmung auf molekularer Ebene für die Tumorzellen hat. In einer vorausgegangenen Arbeit aus unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 zu Stress am endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Hierdurch kommt es zur Expression vieler verschiedener Proteine die dafür zuständig sind, das Gleichgewicht für das Überleben der Zelle wieder herzustellen. Als Nachweis von Stress im ER gilt die Phosphorylierung von eIF2 α . Der Nachweis von p-eIF2 α gelang in beiden Zelllinien, jedoch gab es Unterschiede in der Ausprägung der Phosphorylierung nach der Behandlung mit beiden CK2- Hemmstoffen. Eine wichtige Rolle in der Stress- Phase am endoplasmatischen Retikulum nimmt der aktivierende Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) ein. Die Aufgabe von ATF4

besteht darin, entweder das Zellüberleben oder aber die Einleitung der Apoptose zu bewirken. Dementsprechend wurde in den HepG2 und HeLa- Zellen nach ATF4 und einem ihrer Targets, ATF3, einem weiteren Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie geschaut und nachgewiesen. Von großem Interesse war außerdem die, als Indikator für Apoptose geltende, PARP (Poly(ADP- Ribose)- Polymerase)- Spaltung. Die PARP- Spaltung konnte in den HeLa- Zellen durch beide Hemmstoffe induziert werden, in den HepG2- Zellen lediglich durch Quinalizarin. Insgesamt konnte diese Arbeit zeigen, dass es keinen zwingenden Zusammenhang zwischen der Induktion von ER- Stress und der Einleitung von Apoptose in Tumorzellen gibt. Es gibt noch zu viele unbekannte Variablen um vorhersagen zu können, welcher Signalweg in einer Tumorzelle durch Hemmung oder Aktivierung einzelner Komponenten eingeschlagen wird.

1.2 Abstract

The statistical probability of developing a tumor increases with the aging population in Europe. According to the latest publications of the World Health Organization (WHO), cancer is, in more than half the countries in the European region, already the most common cause of premature death (www.euro.who.int). The most important prerequisite for treating a disease, is the knowledge and understanding of their pathogenesis. In cancer research the focus is increasing on protein kinase CK2, a target molecule used in curbing the relentless tumor growth. CK2 is overexpressed in many tumor cells and protects them from apoptosis. The special interest in CK2 in tumor research arises from the fact that their activity can be regulated externally. To date, our research group has been able to demonstrate that inhibition of CK2 kinase activity leads in different tumor cell lines to the induction of apoptosis. Through which signal pathways this induction takes place, and whether there are other possibilities for intervention as a starting point for tumor therapy in the course of the signal pathways, has not yet been sufficiently clarified. In the study signal pathways for apoptosis induction in relation to induced stress on the endoplasmic reticulum on two different tumor cell lines, HeLa and HepG2, were investigated. Two specific inhibitors, TBB and Quinalizarin, were used to inhibit the kinase activity of CK2. First, it was investigated how much the proliferation of the selected tumor cell lines are affected by the CK2 inhibition. After it was shown that both CK2 inhibitors have an effect on the proliferation of tumor cells, the next step was to check the effect of this inhibition on the tumor cells at a molecular level. In a previous study from our research group it has been shown that inhibition of CK2 leads to stress on the endoplasmic reticulum (ER), resulting in the expression of many different proteins that are responsible for

restoring the balance for cell survival. The phosphorylation of eIF2 α is taken as evidence of stress in the ER. The detection of p-eIF2 α succeeded in both cell lines. However, there were differences in the phosphorylation of p-eIF2 α after treatment of cells with both inhibitors. The activating transcription factor 4 (ATF4) plays an important role in the stress phase on the endoplasmic reticulum. The task of ATF4 is to cause either cell survival or the induction of apoptosis. Accordingly, the presence of ATF4, and one of its targets, ATF3, another member of the family of transcription factors, was investigated and confirmed in HepG2 and HeLa cells. Also the PARP (poly (ADP-ribose) -polymerase) -cleavage, believed to be an indicator of apoptosis, was of great interest. The PARP- cleavage was induced in HeLa cells by both inhibitors, however in HepG2 cells only through Quinalizarin. Overall, this work demonstrated that there is no definitive link between the induction of ER stress and the initiation of apoptosis in tumor cells. There are still too many unknown variables to be able to predict which signal pathway is adopted in a tumor cell by inhibiting or activating individual components.

2 Einleitung

2.1 Das Karzinom des Cervix uteri

Das Zervixkarzinom ist innerhalb der letzten 40 Jahre unter anderem aufgrund von verbesserter Genitalhygiene und Früherkennungsuntersuchungen mittels zytologischen Abstrichs in Deutschland zu einem weniger häufigen Tumor geworden (Seifert und Klug 2014). 1971 galt es als das häufigste Karzinom der Frau, wohingegen es 2010 lediglich Platz 12 der häufigsten Tumoren mit 2.1% der Gesamtinzidenz aller Malignome der Frau einnimmt. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen 40 und 59 Jahren (RKI. Krebs in Deutschland 2009/10). Die Genese scheint multifaktoriell, wobei sozioepidemiologische Faktoren als auch Virusinfektionen eine wichtige Rolle spielen. Bei 20% der Frauen, die mit einem Virus der sogenannten high-risk- Gruppe (HPV- Typ 16, 18, 31, 45, 51, 52) infiziert sind, kann eine Persistenz des Virus über mehrere Jahre beobachtet werden. Mit Persistenz der Infektion steigt das Risiko der Entstehung einer Epitheldysplasie und eines Zervixkarzinoms. Die angebotenen Therapien richten sich sowohl nach dem Alter der Patientin, ihrer Familienplanung als auch dem Tumorstadium bei Erstdiagnose. Die Therapieoptionen reichen von der Durchführung von Kontrollzytologien über die Konisation bis hin zur Hysterektomie mit der Ausräumung der pelvinen Lymphknoten und Radiatio und Chemotherapie (Stauber und Weyerstahl 2005).

Sehr berühmte und in den Laboren auf der ganzen Welt in der Forschung eingesetzte Zervixkarzinom- Zellen wurden 1951 in Baltimore einer Frau entnommen und werden seither in Kultur gehalten. Es handelt sich hierbei um HeLa- Zellen. Die Abkürzung HeLa steht für Henriette Lacks, dem Namen der Frau, der diese Adenokarzinom Zervixzellen vor ihrem Tod entnommen wurden (Skloot 2012). Es handelt sich hierbei um Epithelzellen (ATCC- Nr.: CCL-2), die mit dem humanen Papillomvirus 18 infiziert sind und sich auch sonst durch eine Reihe von Chromosomenabberationen von normalen Epithelzellen unterscheiden (Kraemer et al. 1974). Diese Tumorzellen sind die ältesten, in Kultur gehaltenen Zellen (Gey et al. 1952) und zeichnen sich durch eine extrem hohe Teilungsrate, über das Hayflick Limit hinaus, aus.

2.2 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den achthäufigsten Tumorerkrankungen der Welt. Als Präkanzerose wird die Leberzirrhose durch zum Beispiel chronische Hepatitis- C- und B- Infektion, alkoholinduzierte Zirrhose oder Morbus Wilson gesehen. Bis heute ist die Gesamtprognose des HCC in der Regel schlecht. Bei Diagnosestellung handelt es sich meis-

tens bereits um ein multilokuläres Geschehen. Hinzu kommt der meist schlechte Allgemeinzustand des Patienten bei Leberzirrhose. Als Therapieverfahren kommen neben der chirurgischen Intervention mit kurativem Ansatz verschiedene interventionelle Verfahren zum Einsatz, welche allerdings nur bei kleinen Tumoren oder einem palliativen Therapieansatz empfohlen werden. Zu diesen interventionellen Methoden gehören unter anderem die Katheterbeziehungweise Chemoembolisation des Tumors, die perkutane Alkoholinjektion oder die intraarterielle Hochfrequenzablation (Renz- Polster und Krautzig 2008).

Auch für diesen Tumor gibt es in Kultur gehaltene Zellen, welche in der Tumorforschung ihren häufigen Einsatz finden. Es handelt sich hierbei um HepG2- Zellen. Dies sind Epithelzellen (ATCC- Nr.: HB-8065), die von einem gut differenzierten humanen hepatozellulären Karzinoms stammen. Sie wurden einem jungen, kaukasischstämmigem Mann entnommen und weisen einen variierenden Chromosomensatz zwischen 50 – 60 Chromosomen auf (Papachristou et al. 2013). Im Gegensatz zu beispielweise HepB3- oder PLC- Zellen, ebenfalls Zelllinien eines hepatozellulären Karzinomos, weisen HepG2- Zellen keine Anzeichen eines Hepatitis- B Virus in ihrem Genom auf (Wong et al. 2000)

In der Tumorthherapie ist nicht nur das Abtöten des Tumors von großer Bedeutung, es gilt auch den Organismus, der den Tumor beherbergt, so wenig wie möglich zu schaden. Es gibt verschiedene Ansatzpunkte, um dieses Ziel zu verwirklichen. Ein Ansatzpunkt ist es Kinasen, die eine essentielle Funktion für das Überleben des Organismus haben, als chemotherapeutische Zielmoleküle zu verwenden (Castillo et al. 2012, Stone et al. 2012; Takeuchi und Ito 2011; Zhang und Daly 2012). Zum einen weisen vielen Kinasen eine anormale Aktivität beziehungsweise einen veränderten Proteingehalt in Tumorzellen auf, zum anderen lassen sich Kinase von außen regulieren. Eine Kinase, die für die Tumorthherapie in Frage kommt, ist die Proteinkinase CK2.

2.3 Die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2, früher bekannt als Caseinkinase II, ist eine Serin/ Threonin Proteinkinase und wurde erstmals 1954 von Burnett und Kennedy isoliert (Burnett und Kennedy 1954). Sie ist in eine Vielzahl von wichtigen zellulären Prozessen involviert, wie zum Beispiel der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose und kommt ubiquitär in der Zelle vor. Wie in Abbildung 1 zu sehen, ist sie ein Heterotetramer und besteht aus zwei katalytischen α - bzw. α' und zwei nicht- katalytischen β - Untereinheiten.

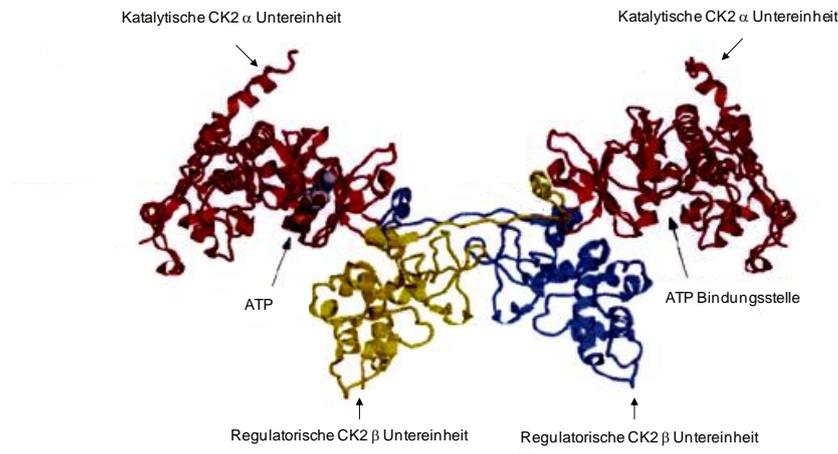


Abb. 1: Die Struktur der Proteinkinase CK2 (Litchfield 2003)

Die Untereinheiten kommen auch isoliert oder an andere Zellproteine gebunden vor (Montenarh 2014). Die in *in vitro* Studien nachgewiesene Aktivität der Untereinheiten als Monomere konnte in *in vivo* Experimenten allerdings noch nicht bestätigt werden (Guerra et al. 1999; Salvi et al. 2006). Eine Besonderheit welche die CK2 auszeichnet ist, dass sie sowohl ATP als auch GTP als Phosphatdonor verwenden kann. Ihre Aktivität kann durch Magnesium, Calcium und Zink positiv beeinflusst werden (Charriaut-Marlangue et al. 1991; Edelman et al. 1987; Chantalat et al. 1999). Es sind in der Zwischenzeit mehr als 300 Substrate der CK2 beschrieben, wobei sie Serin- und Threoninreste phosphoryliert. Zu ihren Substraten gehören unter anderem Rezeptoren (Paramanik und Thakur 2012; Juhl et al. 2011; Kimura und Matsuki 2008), Transkriptionsfaktoren (Meng et al. 2010; Apopa et al. 2008; Shanware et al. 2010; Ubeda und Habener 2003), Strukturproteine (Lim et al. 2004; Faust et al. 2002; Raleigh et al. 2011) und Kanäle und ihre Regulator- Proteine (Meng et al. 2010; Venerando et al. 2011; Luz et al. 2011; Taylor et al. 2012; Brechet et al. 2008; Bachhuber et al. 2008). Wie unverzichtbar die CK2 für das Überleben eines Organismus ist, wurde in „knock- out“- Experimenten gezeigt. Es wurden für die einzelnen Untereinheiten von CK2 „knock- out“- Mäuse gezüchtet (Deshiere et al. 2011; Dominguez et al. 2011; Landesman-Bollag et al. 2011). Der CK2α- und CK2β- „knock- out“ führte zur embryonalen Letalität der Mäuse (Escalier et al. 2003). Der alleinige „knock- out“ der CK2α'- Untereinheit führt zur Infertilität der männlichen Mäuse (Xu et al. 1999). Wie genau die CK2 die embryonale Entwicklung beeinflusst ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Publikationen in denen beschrieben wird, dass die CK2 unter anderem an der Angiogenese, Organogenese und Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten beteiligt ist (Montenarh 2014). In vielen Tumoren, zum Beispiel Mammakarzinom (Landesman-Bollag et al. 2001), Prostatakarzinom (Laramas et al. 2007) und verschiedenen Kopf- Hals- Tumoren (Faust et al. 1996), ist eine hochregulierte

CK2- Kinaseaktivität beschrieben, welche eine natürliche Induktion der Apoptose verhindert und das unkontrollierte Wachstum der Zellpopulation fördert. Aufgrund der Überexpression und vermehrten Aktivität von CK2 in Tumorzellen wird seit einiger Zeit nach spezifischen Hemmstoffen gesucht, welche im besten Fall irgendwann in der Tumorthherapie ihren Einsatz finden (Götz 2009). Es besteht die Hoffnung, dass durch die spezifische Hemmung der CK2, die kontrollierte Apoptose in Tumorzellen induziert werden kann.

In einer vorausgegangenen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 mit spezifischen Hemmstoffen in einzelnen Tumorzellen zur Induktion von Stress am endoplasmatischen Retikulum führt und darüber hinaus die Apoptose eingeleitet wird. Ist dies ein genereller Mechanismus, der sich auf alle Tumorzellen übertragen lässt?

2.4 Das endoplasmatische Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) übernimmt in einer eukaryotischen Zelle eine Vielzahl von Aufgaben und sichert so das Überleben der Zelle. Man unterscheidet zwischen dem agranulären „glatten“ und dem granulären „rauen“ ER. Das glatte ER übernimmt vor allem Aufgaben bei der Synthese verschiedener Lipide, des Kohlenhydratstoffwechsels oder der Speicherung von Calcium und findet sich vorzugsweise in Parenchymzellen von Leber und Niere. Das „raue“ ER hingegen spielt eine Rolle in der Proteinbiosynthese und befindet sich hauptsächlich in Zellen exokriner Drüsen, Nerven- und Embryonalzellen. Die raue Oberfläche entsteht durch die, an die Oberflächenmembran gebundenen, Ribosomen. Nicht nur die Synthese der Proteine sondern auch die Modifizierung und Faltung der Proteine obliegt der Kontrolle des ERs. Sobald sich ein Fehler bei der Synthese, Modifizierung oder Faltung des Proteins findet, werden jene durch die ER- vermittelte Degradation (ERAD) eliminiert.

Nach Abschluss der Transkription erfolgt die Überführung der RNA- Transkripte aus dem Nukleus in das Cytoplasma der Zelle, wo sich die Translation anschließt. Die Translation ist in drei Einzelschritte unterteilt: Initiation, Elongation und Termination. Die Translation findet auf der dem Zytosol zugewandten Seite der Ribosomen statt. Die Ribosomen sind an die Membran des ERs gebunden und bestehen aus einer 40S und einer 60S Untereinheit. Die noch ungefalteten Polypeptidketten werden über den Sec61- Complex in das ER- Lumen transportiert (Pilon et al. 1998). Hier erfolgt die N- Glykosylierung mit anschließender sekundärer und tertiärer Faltung. Die Strukturen werden durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert (Kornfeld und Kornfeld 1985). Die Faltung der Proteine übernehmen verschiedene Chaperone, wie zum Beispiel das Chaperon GRP94 (Glucose Regulierendes Protein94), die Aminosäure cis- trans Isomerase und das Ig heavy chain binding protein (BiP) (Bulleid und

Freedman 1988). Die Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen übernimmt die Proteindisulfidisomerase (PDI) (van Anken und Braakman 2005). Neben der Faltung sind die Chaperone auch für die Qualitätskontrolle der gefalteten Proteine zuständig. Erst wenn alle Kontrollen überstanden sind, können die Proteine das ER verlassen und zu ihrem Zielort transportiert werden (Ellgaard und Helenius 2003; Schröder und Kaufman 2005; Brodsky 2007). Nicht immer läuft die Translation reibungslos ab. Es gibt viele Fehlerquellen, die dazu führen können, dass sich fehlgefaltete Proteine im ER stauen und somit die Homöostase im endoplasmatischen Retikulum gestört wird. Die Störung der Homöostase bedeutet Stress für das ER. Aus diesem Grund werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt, die versuchen das Gleichgewicht wieder herzustellen um den Zelltod zu verhindern, die sogenannte UPR (unfolded protein response). Möglichen Ursachen für Stress sind Folgende: 1: zu wenig verfügbare Chaperone oder Energie um die Chaperon- Protein- Interaktion einzuleiten; 2: verminderter Calciumspiegel; 3: Störungen im Redoxsystem; 4: inadäquate Faltung der Proteine auf Grund von Proteinmutationen; 5: verminderte Disulfidbrückenbindungen (Patil und Walter 2001; Marciniak und Ron 2006; Zhang und Kaufman 2006; Ron und Walter 2007). Zur Problemlösung werden folgende Mechanismen genutzt: 1: verminderte Zufuhr neuer Proteine, zur Verhinderung weiterer Fehlfaltung und Überladung des ERs; 2: Vermehrte Bereitstellung von Chaperonen zur Steigerung der Proteinverarbeitung; 3: Steigerung des Abbaus fehlgefalteter Proteine an Proteasomen. Sollten diese Vorgänge nicht zum gewünschten Erfolg führen, dass heißt, sollte das Gleichgewicht nicht wieder hergestellt werden können und die Zelle den Stress nicht überwinden können, so wird die Apoptose eingeleitet (Eizirik et al. 2008). Zur Bereitstellung der benötigten Proteine und mRNAs ist es notwendig, dass eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die die Anforderungen an den Zellkern weiterleitet. In Abbildung 2 werden drei bekannte Transmembranproteine gezeigt, die an der Signalkaskade beteiligt sind: die Proteinkinase IRE1 (Inositol- requiring Enzyme 1), PERK (double-stranded RNA- activated kinase (PKR)- like ER kinase) und ATF6 (activating transcription factor 6). Durch die Anhäufung fehlgefalteter Proteine kommt es zu der Dissoziation von BiP von den Transmembranproteinen, wodurch diese aktiviert werden. Die Aktivierung von PERK bewirkt die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF) 2 α . Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zu einem generellen Translationsstopp. Es gibt nur wenige Ausnahmen, unter anderem ATF4 (aktivierender Transkriptionsfaktor 4), die paradox auf den generellen Translationsstopp reagieren (Hinnebusch 1993; Harding et al. 2000). Das erhöhte Aufgebot von ATF4 führt zur Induktion der Expression ihrer Targets, wie ATF3 und CHOP (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein) (Ma et al. 2002; Jiang et al.

2004; Pirot et al. 2007), zwei proapoptotischen Proteinen. Durch die Expression von GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible gene 34) und die Interaktion mit PP1c (protein phosphatase 1c) kommt es zur Dephosphorylierung von eIF2 α und somit zur erneuten Induktion der generellen Translation und Hemmung der Überexpression von ATF4 und ihrer Targets (Connor et al. 2001; Novoa et al. 2001; Brush et al. 2003; Kojima et al. 2003; Ma und Hendershot 2003; Novoa et al. 2003). Der Translationsstopp verschafft der Zelle Zeit, um beispielsweise fehlgefaltete Proteine über ERAD (ER-associated degradation) zu eliminieren. Dies geschieht durch die Retrotranslokation in das Zytosol über einen Retrotranslokationskanal mit anschließender Degradation über das Ubiquitin/Proteasom System (UPS) (Meusser et al. 2005).

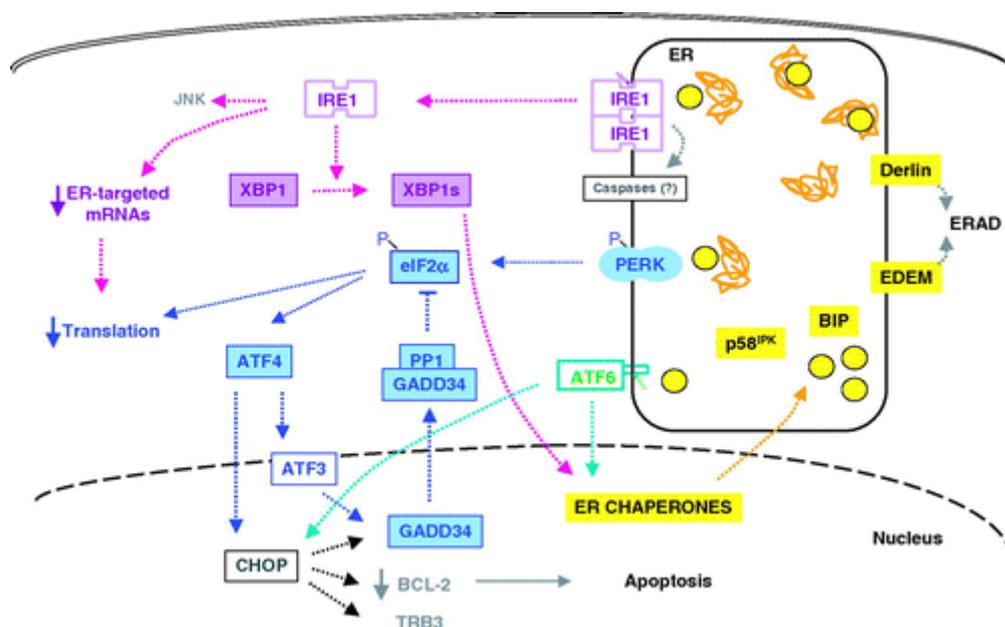


Abb. 2: Die Abbildung zeigt einen Überblick über die UPR. (Eizirik et al. 2008)

Viele Vorgänge am endoplasmatischen Retikulum, wie z.B. Stress, Apoptoseinduktion und Regenerationsmechanismen, sind bis dato nicht hinreichend geklärt.

2.5 Aktivierender Transkriptionsfaktor 4 und seine Targets

Die Hemmung der Proteinkinase CK2 als vermuteter Auslöser von Stress am endoplasmatischen Retikulum mit anschließender Induktion der Apoptose läuft, wie oben dargestellt, über verschiedene Signalwege ab. Ein Signalweg ist in unserer Arbeitsgruppe auf Grund seiner Vielfalt und seiner zentralen Rolle in der UPR auf großes Interesse gestoßen. Es handelt sich um den Signalweg rund um den aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (ATF4). ATF4 gehört zu der Familie der ATF/ CREB Transkriptionsfaktoren. Dies sind typischerweise basische Leucin- Zipper und können Heterodimere und Homodimere bilden oder mit anderen Leucin-

Zipper- Proteinen dimerisieren (Vallejo et al. 1993; Vlahopoulos et al. 2008; Ameri und Harris 2008). Wie andere Mitglieder der ATF- Familie kann auch ATF4 cAMP responsive Elemente (CRE) binden. CRE beinhalten meistens die Konsensussequenz „TGACGTCA“ (Benbrook und Jones 1990). Nach der Bindung an CRE kommt es zur Expression der Zielgene wie z.B. ATF3 (Jiang et al. 2004). Durch die Expression von Proteinen des Aminosäuremetabolismus und der Glutathionbiosynthese erhält sie den Stoffwechsel von Zellen aufrecht und schützt diese vor oxidativem Stress (Harding et al. 2003). Auf der anderen Seite kann ATF4 auch die Expression vom CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) und ATF3 induzieren (Ma et al. 2002; Jiang et al. 2004; Pirot et al. 2007). Wobei CHOP als proapoptotisches Protein gilt und bei anhaltendem ER- Stress den Zelltod auslösen kann. Die Regulation der Aktivität von ATF4 erfolgt auf unterschiedliche Weise. Zum einen weist die mRNA von ATF4 vor dem Initiationscodon zwei upstream open reading frames (uORF) auf. Wobei sich das Startcodon von ATF4 im uORF2 befindet, was im Normalzustand der Zelle bedeutet, dass ATF4 nicht translatiert wird. Unter Stress setzen die Ribosomen jedoch vermehrt am Initiationscodon von ATF4 und nicht dem uORF2 an, wodurch es zu einer vermehrten Translation von ATF4 kommt (Lu et al. 2004; Vattam und Wek 2004). Zum Anderen gibt es einen indirekten Weg der Regulierung über die eigenen Targets. So bewirkt eine erhöhte Konzentration von ATF4 die vermehrte Expression ihrer Zielgene. Unter diesen Zielgenen befinden sich auch Transkriptionsfaktoren, welche die allgemeine Translation fördern, wodurch es wiederum zu einer verminderten Expression von ATF4 kommt (Ma und Hendershot 2003; Novoa et al. 2001). So induziert ATF3 die Expression von GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible gene 34) und deren Interaktion mit der katalytischen Untereinheit PP1c (protein phosphatase 1c) was zur Dephosphorylierung von eIF2 α führt und somit die Translation von ATF4 hemmt (Connor et al. 2001; Novoa et al. 2001; Brush et al. 2003 Kojima et al. 2003; Ma und Hendershot 2003; Novoa et al. 2003). Die direkte Regulation der Aktivität erfolgt über eine Protein-/ Protein-Wechselwirkung. Hierzu wurden verschiedene Proteine nachgewiesen. Zum Einen „prolyl-4-hydroxylase domain 3“, diese Bindung bewirkt eine Stabilisierung von ATF4 (Köditz et al. 2007). Zum Anderen „prolyl-4-hydroxylase domain 1“, diese Bindung hat die Reduktion der transkriptionellen Aktivität von ATF4 zur Folge (Hiwatashi et al. 2011).

2.6 Apoptose

Das Wort Apoptose, aus dem Griechischen: apo „ab, weg“ und ptosis „das Fallen“, diente griechischen Dichtern in der Antike zur Beschreibung der fallenden Blätter im Herbst. Heute

steht dieser Begriff vorzugsweise für die Beschreibung des programmierten Zelltodes. Die Apoptose findet sich überall und zu jedem Zeitpunkt in einem Organismus. Die in Apoptose gehende Zelle schützt mit ihrem altruistischen Verhalten den Gesamtorganismus. Sie verhindert zum Beispiel, dass Krankheitserreger, die sich in ihrem Inneren befinden, benachbarte Zellen infizieren, da sie die Freilassung der Erreger durch ihre Schrumpfung mit anschließender Phagozytose unterbindet. Würde sie nicht frühzeitig ihren eigenen Tod induzieren, würde das Vermehren der Krankheitserreger die Zellmembran im Verlauf zerstören und diese somit freisetzen. Aber auch bei der Ausbildung der normalen Morphogenese der Finger und Zehen in der Embryogenese oder der Entwicklung des Nervensystems ist die Apoptose unabdingbar (Campbell und Reece 2009). In der Apoptose finden sich zwei verschiedene Systeme der Aktivierung. Zum einen gibt es den intrinsischen, im Mitochondrium der Zelle beginnenden und zum anderen den extrinsischen, über Rezeptoren vermittelten Weg.

Der extrinsische Signalweg beginnt bei einem der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) zugehörigen Todesrezeptor. Nach Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor, werden das intrazelluläre Adapterprotein FADD (Fas- associated death domain protein) und die Procaspasen 8 und 10 rekrutiert. Dieser nun entstandene Komplex wird als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet. Die Zusammenführung des DISC führt zur Spaltung und somit auch zur Aktivierung der Procaspasen (Kischkel et al. 1995; Sprick et al. 2000). An dieser Stelle gibt es zwei Möglichkeiten über den weiteren Ablauf der Apoptoseinduktion. Zum einen kann die aktivierte Caspase 8 direkt die Spaltung und damit Aktivierung der Exekutionscaspasen 3, 6 und 7 einleiten und über die Aktivierung der nachfolgenden Substrate die Apoptose induzieren (Kurokawa und Kornbluth 2009). Oder aber es erfolgt die zusätzliche Aktivierung von Signalen über das Mitochondrium (Scaffidi et al. 1998). Über die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und weiteren proapoptotischen Faktoren (Zamzami und Kroemer 2001; Martinou und Green 2001). Dies leitet die Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Apaf- 1 (apoptotic protease activating factor- 1), ATP und Procaspase 9 ein. Das Apoptosom aktiviert Caspase 9 (Riedl und Salvesen 2007; Bao und Shi 2007), diese ist wiederum in der Lage, die Procaspasen 3, 6, und 7 proteolytisch zu spalten und damit zu aktivieren. Die Procaspasen aktivieren ihre Substrate wie zum Beispiel LaminA, Actin, Gas2 oder PARP (Poly (ADP-Ribose)- Polymerase) und induzieren somit die Apoptose. Am Ende der beiden Wege kommt es über die Aktivierung der Caspasen (Cystein- Aspartat- Proteasen) zur Induktion der Apoptose.

Es galt die Frage zu beantworten, ob durch die Hemmung der CK2 in den ausgewählten Tumorzellen ebenfalls Apoptose induziert wird. Als Beweis hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit nach der Spaltung von PARP geschaut.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie von Karzinomen stellt in der heutigen Zeit ein wichtiges Standbein in der Medizin dar. Mit Hilfe der Forschung konnten bis jetzt viele verschiedene Ansätze zur Heilung von Patienten aufgedeckt werden. In unserer Arbeitsgruppe ist es bereits gelungen nachzuweisen, dass es über die Hemmung der CK2 zu Stress am endoplasmatischen Retikulum kommt und über den Signalweg von ATF4 und Expression ihrer Zielgene die Apoptose ausgelöst werden kann. Jetzt stellte sich die Frage in wie weit diese Beobachtung allgemeine Gültigkeit besitzt. Es galt herauszufinden, ob mit Gewissheit gesagt werden kann, dass es sich hierbei um einen sich ständig wiederholenden Vorgang in Tumorzellen handelt oder ob jede entartete Zelle in sich so individuell ist, dass selbige Behandlung unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen hat. Führt die Hemmung der CK2 immer zur Minderung der Viabilität der Zellen? Gibt es einen Unterschied zwischen den einzelnen Hemmstoffen und ihren Auswirkung auf die Zelllinien? Ist immer eine Korrelation zwischen einem verminderten Zellwachstum und der Apoptoseinduktion vorhanden? Von großer Bedeutung ist außerdem die Antwort auf die Frage, ob Stress am endoplasmatischen Retikulum immer in der Induktion von Apoptose endet.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Materialien und Geräte

1.5 ml/ 2 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth, Karlsruhe
15 ml/ 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
6-/ 24-/ 96- Lochplatten	Greiner, Nürtingen
6 cm/ 10 cm Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
Airflow Laminair (HBB2448)	Heraeus, Hanau
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Autoklav Varioklav®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank 6220 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer Mighty Small™ SE250	Serva (Hoefer), Heidelberg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Filterpapier 3MM	Macherey- Nagel, Düren
Hamilton Microliter Spritze	Hamilton, Bonaduz
Halb- Mikro- Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Heizblöcke	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Infinite M200 Pro multimode Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma, München
Labor- Glaswaren	Schott, Mainz
Magnetrührer MR3000, MR3002	IKA- Labortechnik, Staufen
Milli- Q Plus Wasserfiltrations- Reinigungssystem	Millipore, Schwalbach/ Ts
Molecular Imager Universal Hood II	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH- Meter: pH537	WTW, Weilheim
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel
Pipettenspitzen 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
PVDF- Membran	Roche, Mannheim
Radiochemikalien: [³² P]-γ-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Typhoon™ 9410 GE	Healthcare, Freiburg
Ultraschallbad Transonic 460 Elma	Htw, Singen

Umkehrmikroskop: Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena
UV- Vis- Spektralphotometer Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
Wasserbad	GFL, Burgwedel
4.1.2 Chemikalien	
Acrylamid-Stammlösung: Rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Amphotericin	Biochrom, Berlin
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories, Österreich
Complete™, Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DMEM-Medium	Gibco/ Invitrogen, Darmstadt
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> - FCS)	PAA Laboratories, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L- Glutamin	Sigma- Aldrich, München
Luminol „Lumi-Light“	Roche, Mannheim
MTT- Substratlösung	Sigma-Aldrich, München
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
PCA (p- Coumaric Acid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Biochrom, Berlin
Prestained SDS- Molekulargewichtsstandard	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Quinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxyanthraquinon)	Labotest OHG, Niederschöna
Streptomycin	Biochrom, Berlin
4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB)	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Fulka, Neu-Ulm
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Tween20	Fulka, Neu-Ulm

4.1.3 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung (Gellösung A)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
Blockpuffer für Western Blot	0.1% (v/v) Tween 20 5% (w/v) Trockenmilchpulver in PBS (1x), pH 7.4
Complete™ Proteaseinhibitor	1 Tablette gelöst in 10 ml PBS (1x), pH 7.4
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 1% (w/v) SDS 10 mM EDTA ohne Proteaseinhibitor
ECL-Lösungen für die Western Blot Detektion	
ECL1	5 ml Tris-HCl, 1 M, pH 8.5 500 µl Luminol (250 mM in DMSO) 220 µl PCA (90 mM in DMSO) ad 50 ml H ₂ O _{deion}
ECL2	5 ml Tris-HCl, 1 M, pH 8.5 32 µl 32% H ₂ O ₂ ad 50 ml H ₂ O _{deion}
Elektrophoresepuffer (10 x)	250 mM Tris-HCl, pH 8.8 1.92 M Glycin 35 mM SDS
Gellösungen für SDS-Gele	
Gellösung B	4 g SDS 181.5 g Tris-HCl, pH 8.8 ad 1000 ml H ₂ O

Gellösung C	4 g SDS 60 g Tris-HCl, pH 6.8 ad 1000 ml H ₂ O
MTT- Substratlösung	5 mg MTT in 1 ml PBS (1x)
PBS (1 x)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% TritonX-100 0.1% SDS
SDS-Probenpuffer	200 mM DTT 120 mM Tris-HCl, pH 6.8 10 mM β-Mercaptoethanol 20% (v/v) Glycerin 0.02% Bromphenolblau 4% (w/v) SDS
Solubilisierungslösung	10% (w/v) SDS 0.01 M HCl
Transferpuffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8.3 1.5 M Glycin
Trypsin/EDTA-Lösung	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% EDTA

Waschpuffer für Western Blot	0.1% (v/v) Tween20 1% bzw. 5% (w/v) Trockenmilchpulver in 1 x PBS, (pH 7.4)
------------------------------	--

4.1.4 Antikörper

4.1.4.1 Primärantikörper

ATF4- Antikörper

Die Detektion von ATF4 erfolgt mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper der Firma SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC[®]. Dieser Antikörper detektiert im Western Blot eine Bande bei 38 kDa, er wird im Verhältnis 1:100- 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

ATF3- Antikörper

Zur Detektion von ATF3 wird der polyklonale Kaninchenantikörper der Firma SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC[®] eingesetzt. Der Antikörper detektiert im Western Blot eine Bande bei 21 kDa. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:100- 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

p-eIF2 α - Antikörper

Die Detektion von Phospho- eIF2 α erfolgt mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper der Firma Cell Signaling[®]. Der Antikörper detektiert eIF2 α ausschließlich wenn dieses am Ser51 phosphoryliert ist. Im Western Blot wird eine Bande bei 38 kDa detektiert. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

eIF2 α - Antikörper

Für den Nachweis von eIF2 α , wird ein polyklonaler Kaninchenantikörper von Cell Signaling[®] angewendet. Dieser Antikörper detektiert im Western Blot eine Bande bei 38 kDa, er wird im Verhältnis 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

GAPDH- Antikörper

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase wird mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper der Firma SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC[®] nachgewiesen. Der Antikörper

per erkennt im Western Blot eine Bande bei 37 kDa, er wird im Verhältnis 1:100- 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

α -Tubulin- Antikörper

Der Nachweis von α -Tubulin erfolgt mit einem monoklonalen Mausantikörper der Firma SIGMA[®]. Der Antikörper detektiert im Western Blot eine Bande bei 55 kDa, er wird im Verhältnis 1:500 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

PARP- Antikörper

Die Detektion von PARP erfolgt mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper der Firma Cell Signaling[®]. Es wird eine Bande des Volllängenproduktes von PARP bei 116 kDa, eine Bande des großen Spaltproduktes bei 89 kDa und eine Bande des kleinen Spaltproduktes bei 24 kDa von diesem Antikörper im Western Blot erkannt. Der Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:1000 in PBS (pH 7.4) mit 1% Trockenmilchpulver verdünnt verwendet.

4.1.4.2 Sekundärantikörper

Western Blot Analyse

Die Analyse der monoklonalen Mausantikörpern erfolgt mit einem Ziege- Anti- Maus- Ig- Meerrettich- Peroxidase- Antikörper, dieser wird im Verhältnis 1:15000 verdünnt in PBS (pH 7.4) mit 1% Milchpulver eingesetzt. Die Detektion der polyklonale Kaninchenseren erfolgt mit Hilfe eines Ziege- Anti- Kaninchen- Ig- Meerrettich- Peroxidase- Antikörper im Verhältnis 1:30000 verdünnt in PBS (pH 7.4) mit 1% Milchpulver. Die Antikörper besitzen eine Konzentration von 0.8 mg/ ml und werden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

4.1.5 Proteinstandards

„Prestained Protein Molecular Weight Marker“ ist ein Proteinstandard mit 6 Proteinen, diese 6 Proteine decken ein Molekulargewicht von 20 bis 120 kDa ab.

- 117 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*)
- 85 kDa: Rinderserumalbumin (Rinderplasma)
- 48 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß)
- 34 kDa: Carboanhydrase (Rindererythrocyten)
- 26 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch)
- 21 kDa: Lysozym (Hühnereiweiß)

Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ wird zur Darstellung der Proteinauftrennung und zur Abschätzung der Proteingröße genutzt. Er ist für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Verifizierung der Western Blot-Transfereffizienz auf PVDF-, Nylon- und Nitrocellulosemembranen geeignet. Die Proteine des Markers sind kovalent an einen blauen Chromophor gekoppelt.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1.1 Zelllinien

HeLa

Die, Abkürzung HeLa steht für Henriette Lacks. Es handelt sich hierbei um Epithelzellen (DSMZ-Nr.: ACC-57; ATCC- Nummer: CCL-2), die mit dem humanen Papillomvirus 18 infiziert sind und eine Mutation in dem humanen Leukozyten- Antigen vorweisen können, was dazu führt, dass sie zu Tumorzellen entartet sind. Sie zeichnen sich durch eine extrem hohe Teilungsrate, durch ihre aktive Telomerase, über das Hayflick Limit hinaus, aus.

HepG2

Diese Epithelzellen (DSMZ-Nr.: ACC-180; ATCC- Nummer: HB-8265) stammen von einem gut differenzierten humanen hepatozellulären Karzinom und weisen eine Chromosomenanzahl zwischen 50 und 60 Chromosomen auf.

4.2.1.2 Kultivieren von Zellen

Die Zellen werden in 10 cm Kulturschalen der Firma Greiner kultiviert. Bei konstanten 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂- Gehalt von 5% werden die Zellen in einem Brutschrank kultiviert. Das Nährmedium DMEM (Dulbecco´s modified Eagle medium) wird in 400 ml Flaschen abgefüllt. Vor der Verwendung werden den jeweils 400 ml Medium noch 40 ml/ 10% fetales Kälberserum (FCS) und 4 ml/ 1% L- Glutamin hinzugefügt.

4.2.1.3 Passagieren von Zellen

Das Medium wird zuerst abgesaugt, anschließend werden die Zellen aus der Schale abgelöst, dies geschieht durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) und Inkubation von 2 Minuten, bei 37°C/ 95% RH/ 5% CO₂. Durch das Ethylendiaminetetraacetat (EDTA) werden die für die Zell- Zell- Bindung wichtigen Ca²⁺- Ionen chelatiert. Die Protease Trypsin löst die Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen

und zwischen den Zellen und dem Schalenboden. Nach 2 Minuten wird die Trypsin/EDTA-Lösung abgesaugt und es wird frisches Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Zusammen mit dem frischen Kulturmedium werden die Zellen in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Der komplette Vorgang wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern.

4.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Damit Säugetierzellen über längere Zeit aufbewahrt werden können, werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür werden die Zellen, wie beim Passagieren, zunächst mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst, anschließend werden sie ohne Zusätze in DMEM resuspendiert und bei 400 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden in 0.5 ml eiskaltem DMEM + 40% FCS erneut resuspendiert. Anschließend werden tropfenweise, bei dauerhaftem, leichtem Schütteln, 0.5 ml vorgekühltes DMEM + 20% DMSO hinzugegeben. Diese Zellsuspension wird in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und über 2 Stunden in der Gasphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hier werden die Zellen langsam heruntergekühlt, bevor sie anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

4.2.1.5 Tauen von Zellen

Die Zellen werden möglichst schnell, innerhalb von einer Minute, bei 37°C, in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wird die Suspension in ein steriles Röhrchen überführt. Die Suspension wird mit Zellkulturmedium langsam, für 5- 10 Minuten, unter gelegentlichem Schütteln, um das 10- fache Volumen verdünnt. Die Zellen werden bei 4°C und 250 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment wird in frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS resuspendiert und in eine Zellkulturschale ausgesät.

4.2.1.6 Beseitigung von Kontaminationen

Kontaminierte Zellen sollten entsorgt werden, um ein Übergreifen der Kontamination auf andere Zellen zu verhindern. Sind die Zellen allerdings unersetzlich, sollte versucht werden, die Kontamination zu beseitigen.

Bakterielle Kontamination

Die Zellen werden zunächst mehrfach mit DMEM- Medium (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend werden 10 µl Penicillin/ Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ ml Streptomycin, Biochrom, Berlin) pro Milliliter Medium hinzugefügt. Bei einer hochgradigen Kontamination werden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert und mit 5 ml DMEM- Medi-

um in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Ganze wird bei 4°C und 250 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen werden in 5 ml DMEM- Medium mit 10% FCS resuspendiert. Die Zellen werden anschließend, unter Antibiotika- Zugabe, in eine neue Schale ausgesät.

Hefe-/ Pilzkontamination

Diese Kontaminationen werden mit 10 µl Amphotericin B (250 µg/ ml, Biochrom, Berlin) pro Milliliter DMEM- Medium behandelt.

4.2.1.7 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Die Neubauer- Zählkammer (Faktor 10^4) dient zur Bestimmung der Zellzahl. Hierzu werden frisch trypsinisierte Zellen in ein kleines Volumen Kulturmedium aufgenommen. 20 µl dieser Suspension werden mit ebenfalls 20 µl Trypanblau vermischt. Das Trypanblau färbt die toten Zellen an. Es werden 6 µl der Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Die äußeren 4 Quadrate werden ausgezählt und es wird die Abweichung der Summe der beiden Kammern bestimmt. Liegt die Abweichung unter 15%, so wird der Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat errechnet. Durch die Multiplikation mit 2, wird die Verdünnung durch das Trypanblau berücksichtigt. Jedes Quadrat enthält das Volumen 0.1 ml, durch die Multiplikation mit 10^4 wird die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter errechnet.

4.2.1.8 Die Behandlung der Zellen mit Hemmstoffen

Die verschiedenen Hemmstoffe werden steril in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Anschließend werden die Zellen mit den in DMSO gelösten Hemmstoffen behandelt. Hierzu werden die angelegten Stocklösungen auf die gewünschte Konzentration mit Zellkulturmedium verdünnt und für die gewählten Zeiträume auf die, in Zellkulturschalen gehaltenen Zellen, gegeben. Um sicher zu stellen, dass sich die Zellen abgesetzt haben und auf den Kulturschalen angewachsen sind, werden die Zellen erst 24 Stunden nach dem Überführen in die Gewebekulturschale mit dem Hemmstoff behandelt. Die Kontrolle, für die Behandlung mit den Hemmstoffen, erfolgt mit Zellen, die mit dem äquivalenten Volumen an DMSO behandelt werden.

Behandlung mit Quinalizarin

Die Behandlung mit Quinalizarin erfolgt, wie oben beschrieben, ausgehend von einer Stocklösung von 10 mM.

Behandlung mit 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol

Die Behandlung mit 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) erfolgt, wie oben beschrieben, ausgehend von einer Stocklösung von 10 mM.

4.2.1.9 Ernten von Zellen

Zunächst wird das Medium von der Zellkulturplatte pipettiert, anschließend werden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS (pH 7.4) abgewaschen und unter Zuhilfenahme eines Gummizellschabers von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen werden in ein Röhrchen auf Eis überführt und bei 7°C und 250 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Das hierdurch entstandene Zellpellet kann nun entweder direkt weiter verarbeitet werden oder in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und bei -20°C, bis zur Verarbeitung, gelagert werden.

4.2.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Bei einer Konfluenz der Zellen von ungefähr 80%, werden die Zellen wie in 4.2.1.9 beschrieben geerntet. Das daraus entstandene Pellet wird in dem doppelten Volumen an Lysepuffer (RIPA- Puffer: 50 mM Tris- HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% TritonX-100, 0.1 Natriumdodecylsulfat, Proteaseinhibitor Complete™ (1:25)) resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension 3-mal für eine Minute in einem Eisbad sonifiziert. Es wird eine 30 Sekundenpause zwischen jeder Sonifizierungsphase eingehalten. Die Zelltrümmer werden bei 4°C und 15000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C gelagert werden.

4.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode basiert auf der Farbreaktion des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) in saurem Milieu. CBBG bildet in saurem Milieu mit kationischen und unpolaren Seitenketten Komplexe. In diesen Komplexen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Der Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum, in Anwesenheit von Proteinen, bei 595 nm, welches mit dem Photometer gemessen werden kann. Die gemessene Intensität ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen. Für die Bestimmung des Proteingehalts wird das Proteinassay-Kit von BioRad verwendet. Hierzu wird 1 µl Zellextrakt mit 800 µl H₂O_{deion.} und 200 µl Bradford-

Reagenz gemischt. Nach 10 Minuten wird die Exstinktion bei 595 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgt mit einem Ansatz aus 800 µl H₂O_{deion.} und 200 µl Bradford- Reagenz. Der Proteingehalt wird in µg/µl mit Hilfe einer BSA- Eichkurve bestimmt.

4.2.2.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)

Bei der SDS- PAGE werden die Proteine anhand ihrer Größe getrennt. Die Trennung erfolgt ausschließlich anhand der Größe der Proteine. Sie wird dadurch gewährleistet, dass die Proben mit einem Probenpuffer versetzt werden, welcher Natriumdodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) enthält. Das SDS bildet Mizellen um die Proteine herum und verleiht ihnen somit eine negative Ladung. Das β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol spaltet die Disulfidbrücken, welche die Tertiärstruktur der Proteine formen. Durch das Erhitzen der Proben auf 95°C vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel, werden die Sekundär- und Tertiärstruktur durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Die negativ geladenen Proteine wandern von der Kathode zur Anode durch die Polyacrylamid- Gelmatrix, wobei vor allem ihre Größe die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt. Kleinere Proteine wandern schneller durch die Matrix als größere.

Die Gelkammer wird vor dem Zusammenbau gründlich mit Ethanol gereinigt. Die Kammer wird zu 75% mit Trenngel gefüllt, dieses wird mit Isopropanol überschichtet. Um sicher zu stellen, dass sich das Trenngel gleichmäßig verteilt, werden Kämme in die einzelnen Gelkammern gesteckt. Ist das Trenngel ausgehärtet, werden die Kämme entfernt und das Isopropanol abgegossen. Anschließend wird das Sammelgel in die Kammern gefüllt und die Kämme werden erneut in die Kammern gesteckt. Sobald auch das Sammelgel ausgehärtet ist, werden die Gelkammern auseinander gebaut und die einzelnen Gele in einer feuchten Verpackung bei 4°C, bis zu Verwendung, gelagert.

Beide Gele werden mit einer Acrylamid- Stammlösung (Gellösung A) der Firma Carl Roth GmbH & Co hergestellt. Hinzu kommen die Gellösungen B und C. Das Pipettierschema für die Herstellung der SDS- Polyacrylamidgele ist in Tabelle 1 dargestellt.

Trenngel (%)	10	12.5	Sammelgel (%)	4.3
Gellösung A (ml)	12	15	Gellösung A (ml)	2.2
Gellösung B (ml)	9	9	Gellösung C (ml)	3.8
Wasser (ml)	15	12	Wasser (ml)	9
APS (μ l)	200	200	APS (μ l)	100
TEMED (μ l)	20	20	TEMED (μ l)	40

Tabelle 1: Pipettierschema der verschiedenen Polyacrylamidgele

Es werden jeweils gleiche Proteinmengen mit 3 x SDS Probenpuffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Marker wird der „Prestained Molecular Weight Marker“ der Firma Fermentas verwendet.

4.2.2.4 Western Blot Analyse

Die aufgetrennten Proben werden nach der SDS- PAGE mittels Tankblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Roche Mannheim) transferiert. Die hierfür verwendete Apparatur wird nach folgendem Schema zusammengebaut:

- Kathode
- Schwamm
- 3 Blatt Whatman- Papier
- Nitrozellulosemembran
- SDS- Polyacrylamidgel
- 3 Blatt Whatman- Papier
- Schwamm
- Anode

Die Schwämme und das Whatman- Papier werden vor dem Zusammenbau in Transferpuffer, die Nitrozellulosemembran zur Aktivierung in Methanol getaucht. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 120 mA.

4.2.2.5 Immunologischer Proteinnachweis

Die PVDF- Membran wird nach dem Blotten zunächst für eine Stunde in Blockpuffer (1x PBS- Tween (pH 7.4), 0.1% Tween20, 5% Trockenmilchpulver) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blocken wird zunächst der Primärantikörper (in dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis verdünnt in 1 x PBS- Tween (pH 7.4),

0.1% Tween20, 5% Trockenmilchpulver) für eine gewisse Zeit auf die Membran gegeben. Um den nicht gebundenen Anteil des Antikörpers zu entfernen, wird die Membran zweimal für 10 Minuten mit PBS- Tween ((pH 7.4), 0.1% Tween20) gewaschen. Anschließend wird der Sekundärantikörper, welcher je nach Primärantikörper, gegen Maus oder Kaninchen gerichtet ist, auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Die nicht gebundenen Sekundärantikörper werden durch erneutes Waschen (zweimal für 10 Minuten mit PBS- Tween ((pH 7.4), 0.1% Tween20)) entfernt. Nach dem Waschen wird „Lumi- Light“ der Firma Roche auf den Blot gegeben, die Detektion kann nun erfolgen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe der Software Quantity One 4.6.5 (Band Analysis) durchgeführt.

Nach der Detektion wird die Membran in Methanol geschwenkt und getrocknet. Im trockenen Zustand kann die Membran bei 4°C aufbewahrt werden.

4.2.2.6 MTT- Assay

Für den MTT- Assay werden die Zellen auf eine 96- Well Gewebekulturplatte gesplittet, wobei die Zellzahl von dem verwendeten Zelltyp abhängig ist. Pro Kavität werden 10 µl MTT- Substratlösung (5 mg MTT (von der Firma Sigma[®]) pro ml PBS) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt für 1- 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C/ 95% RH/ 5% CO₂. Anschließend wird im Lichtmikroskop kontrolliert ob die Zellen sich tatsächlich blau gefärbt haben. Bei den angefärbten Zellen handelt es sich um die lebenden Zellen. Das Medium und die MTT- Substratlösung werden abgenommen. Pro Kavität werden 100 µl Solubilisierungslösung (10% SDS, 0.01 M HCl) hinzugegeben. Die Zellen lysieren jetzt und das umgesetzte blaue Produkt nimmt eine bräunliche Färbung an. Um sicher zu stellen, dass die Kavitäten gleichmäßig gefärbt sind, muss gut gemischt werden. Die Messung erfolgt mit dem TECAN Infinite[®] 200 PRO.

4.2.2.7 Überlebenskurve

Diese Methode dient zur Überprüfung, ob und wann sich die Hemmstoffe auf das Überleben der verwendeten Zelllinien auswirken. Hierzu werden die verschiedenen Zellreihen in 10 cm Gewebekulturschalen gleichmäßig ausgesät und mit verschiedenen Hemmstoffen behandelt. Zu verschiedenen, vorher festgelegten Zeitpunkten werden die lebenden Zellen wie in 4.2.1.7 beschrieben mit der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die Ergebnisse werden in eine Exceltabelle übertragen, graphisch dargestellt und ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 HeLa- Zellen und der Hemmstoff der Proteinkinase CK2, TBB

Die Proteinkinase CK2 ist in vielen Tumoren überexprimiert und zeigt eine erhöhte Kinaseaktivität. Ihr wird zugeschrieben, dass sie Tumorzellen vor der Apoptose schützt (Intemann et al. 2014). Die Hemmung der CK2- Kinaseaktivität wurde daher als vielversprechende Möglichkeit gesehen, das Tumorwachstum einzudämmen. In den vergangenen 10 Jahren wurden eine Fülle von verschiedenen Substanzen als Inhibitoren der CK2 getestet. Im Zuge dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass eine Hemmung der CK2 viele verschiedene Tumorzellen in Apoptose bringt (Intemann et al. 2014). In unserer Arbeitsgruppe waren zum Beginn der vorliegenden Arbeit erste Hinweise auf eine Induktion von ER- Stress mit nachfolgender Signaltransduktion durch die Hemmung der CK2 erarbeitet worden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der zum Beginn der Arbeit als hochspezifisch geltender Hemmstoff TBB, einem ATP/ GTP- kompetitive Inhibitor der CK2 mit einem K_i - Wert von $0.05 \mu\text{M}$ und einem IC_{50} - Wert von $1 \mu\text{M}$, an einer Tumorzelllinie untersucht werden. Hierzu wurden die seit Jahren als klassische Tumorzelllinie bekannten HeLa- Zellen, kultivierte Gebärmutterhalskrebszellen, gewählt.

5.1.1 Wachstumskurve von HeLa- Zellen, die mit TBB behandelt wurden

Zuerst interessierte uns, ob die CK2- Hemmung einen Einfluss auf das Wachstum von HeLa- Zellen hat. Hierzu wurden Wachstumskurven von HeLa- Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen erstellt.

Es wurden 1×10^4 HeLa- Zellen pro Kavität in 24- Well- Gewebekulturschalen ausgesät und mit $50 \mu\text{M}$ TBB behandelt. Da TBB in DMSO gelöst werden muss, wurden zur Kontrolle Zellen mit der äquivalenten Menge DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden geerntet und mit Trypanblau versetzt. Die toten Zellen verfärben sich. Dies ermöglicht es, die toten von den lebenden Zellen zu unterscheiden und gewährleistet, dass lediglich die lebenden Zellen gezählt werden. Die Zellzahl wird mit der Neubauerzählkammer manuell ermittelt und anschließend graphisch dargestellt. Hierbei zeigt sich, wie in Abbildung 3 dargestellt, dass die mit TBB behandelten Zellen, sowie die zur Kontrolle mit DMSO behandelten Zellen bis 96 Stunden einen fast identischen Wachstumsverlauf aufweisen. Nach 96 Stunden verzeichnen die mit TBB behandelten Zellen im Gegensatz zur Kontrollpopulation eine Abnahme der Zellzahl. Die mit DMSO behandelten Zellen verzeichnen weiterhin eine Zunahme.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von HeLa- Zellen mit dem CK2- Hemmstoff TBB eine Auswirkung auf ihre Proliferation hat.

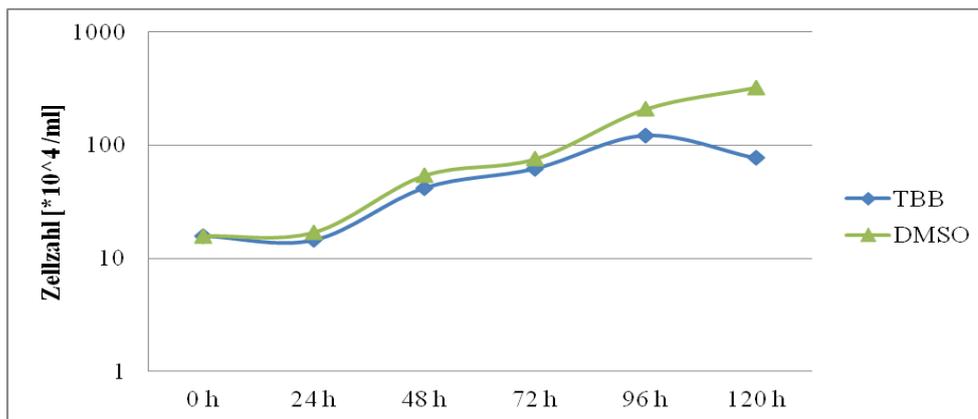


Abb. 3: Wachstumskurve von HeLa- Zellen nach der Behandlung mit TBB. Es wurden 1×10^4 HeLa- Zellen ausgesät und anschließend mit $50 \mu\text{M}$ TBB behandelt. Als Kontrolle wurde dieselbe Menge an Zellen mit dem Lösungsmittel von TBB, DMSO behandelt. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden (h) wurden die Zellen geerntet, mit Trypanblau angefärbt und anschließend mit Hilfe der Neubauerzählkammer manuell ausgezählt. Diese Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis nachdem das Experiment 3-mal durchgeführt wurde.

5.1.2 MTT- Assay von HeLa- Zellen nach Behandlung mit TBB

Nachdem im obigen Versuch gezeigt wurde, dass es unter der Behandlung von TBB zu einer Abnahme der Zellzahl im Gegensatz zu der Kontrolle kommt, sollte untersucht werden, ob der Rückgang der Proliferation mit einer Abnahme lebender Zellen einhergeht. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Viabilität von Zellen zu untersuchen. In unserer Arbeitsgruppe hat sich hierfür der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]-Assay bewährt. Hierzu wurden erneut HeLa- Zellen gleichmäßig in 24- Well- Gewebekulturschalen ausgesät und mit $50 \mu\text{M}$ TBB behandelt. Die Kontrolle wurde mit der gleichen Menge DMSO kultiviert. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden mit MTT- Substratlösung behandelt. Die lebenden Zellen färben sich blau, können mit dem TECAN infinite M200 PRO® gemessen und anschließend graphisch dargestellt werden. Wie die Auswertung in der Abbildung 4 zeigt, führt die Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ TBB nach 24 Stunden zunächst zu keinem Effekt auf die Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf über 48 und 72 Stunden zeichnet sich jedoch ab, dass die Behandlung der Tumorzellen mit TBB einen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat. Die graphische Darstellung der Werte zeigt, dass beim Vergleich der mit TBB und den mit DMSO behandelten Zellen ein deutlicher Abfall der überlebenden Zellen auf Seiten der mit dem CK2- Hemmstoff behandelten Zellen zu verzeichnen ist. Nach 48 Stunden zeigt sich eine Verringerung der lebenden

Zellen um 15% auf 85% und nach 72 Stunden um 17% auf 83% im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen. Mit einem MTT- Assay kann die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt werden. Der Mechanismus, der zum Rückgang der Zellzahl führt, wie zum Beispiel Zellzyklusarrest, Apoptose oder Nekrose, kann mit diesem Experiment nicht festgestellt werden.

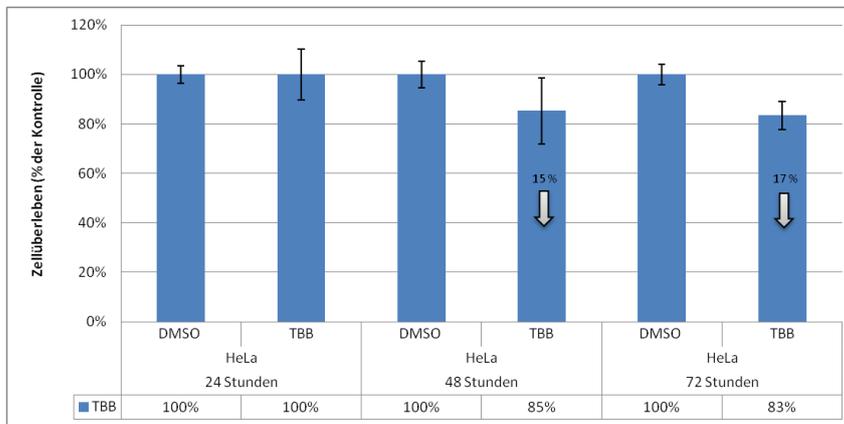


Abb. 4: Viabilität von HeLa- Zellen nach der Behandlung mit TBB. Die Behandlung der HeLa-Zellen erfolgte mit 50 μM TBB und der äquivalenten Menge DMSO. Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mit MTT- Substratlösung im Brutschrank bei 37°C / 95% RH / 5% CO₂ inkubiert. Die anschließende graphische Darstellung erfolgte nachdem das Experiment zweimal unabhängig voneinander durchgeführt wurde und die Anzahl der lebenden Zellen mit dem TECAN infinite M200 PRO[®] bestimmt wurde. Die DMSO Kontrolle wird jeweils auf 100% gesetzt, die anderen Werte werden darauf bezogen.

5.1.3 Apoptose der mit TBB behandelten HeLa- Zellen

Der Nachweis, dass es nach der Behandlung von HeLa- Zellen mit TBB zur Verminderung der Zellzahl kommt, warf die Frage auf, auf welchen Mechanismus der Rückgang der Zellzahl zurückzuführen ist. Sollte es sich bei dem Vorgang um Apoptose handeln, stellt der Nachweis der Spaltung von PARP (Poly(ADP- Ribose)- Polymerase) eine etablierte Methode dar. Die PARP- Spaltung wird in der Literatur als ein spätes Ereignis der Apoptose beschrieben (Elmore 2007). Die Hemmung der CK2 erfolgte mit 50 μM TBB, als Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge an DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden, die Kontrolle nach 4 Stunden geerntet. Es wurden Zellextrakte hergestellt, die Proteine im Zellextrakt mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran überführt. Die Western Blots wurden mit einem PARP- spezifischen Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle in diesem Experiment dient das ubiquitär vorkommende Protein α - Tubulin. Die Abbildung 5 zeigt den Western Blot der Proteine der behandelten Zellen. Es ist zu sehen, dass sowohl das Vollängen Produkt von PARP

(PARP, VL) als auch das PARP- Spaltprodukt (PARP, SP) vorhanden sind. Bei dem Vollängenprodukt kann eine Abnahme im Verlauf der Zeitreihe zu den späteren Zeitpunkten hin verzeichnet werden. Bei dem Spaltprodukt zeigt sich ein schwankender Verlauf mit einem Peak bei 12 und 16 Stunden. Um die Proteinmenge des Produktes zu veranschaulichen, wurden die Banden des Western Blots quantifiziert, auf die α -Tubulin Kontrolle normiert und unter dem Western Blot in Form von Prozentangaben dargestellt. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Nach der Quantifizierung zeigte sich deutlich, dass es sich lediglich um einen minimalen Anstieg der Proteinmenge des Spaltproduktes von PARP handel, es im Bezug auf den Nullstundenwert zu fast allen Zeitpunkten sogar zu einer Abnahme des Spaltproduktes kommt.

Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass der Rückgang der Zellzahl von HeLa- Zellen nach Behandlung mit dem CK2- Hemmstoff TBB in der Wachstumskurve (Abb. 3) und dem Viabilitäts- Assay (Abb. 4) auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sind.

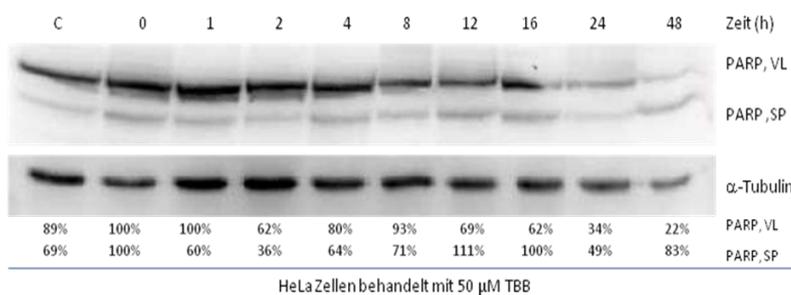


Abb. 5: PARP- Spaltung in HeLa- Zellen nach Behandlung mit TBB. Es erfolgte die Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses nach zweifacher Durchführung des Experimentes. Die HeLa- Zellen wurde mit 50 μ M TBB behandelt. Geerntet wurden die Zellen nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden. Die Kontrollzellen (C) wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Die Proben wurden durch eine SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran transferiert. Der Nachweis der Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) erfolgte mit einem PARP- spezifischen Antikörper. Der Antikörper markiert das Volllängenprodukt von PARP (PARP, VL) bei 116 kDa und das Spaltprodukt von PARP (PARP, SP) bei 89 kDa. Als Ladekontrolle dient ein α -Tubulin- Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle abgeglichen, der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Ergebnisse wurden unter dem Western Blot dargestellt. Die obere Ziffernreihe zeigt die Ergebnisse des Volllängenproduktes von PARP und die untere Reihe die des Spaltproduktes.

5.1.4 ER- Stress der mit TBB behandelten HeLa- Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hemmung der CK2 durch TBB zur Apoptose in HeLa- Zellen führt, sollte untersucht werden, ob die Hemmung eine Auswirkung auf das

endoplasmatische Retikulum (ER) der Zellen hat. In verschiedenen Publikationen, unter anderem von unserer Arbeitsgruppe (Schneider et al. 2012), wird beschrieben, dass die Hemmung der Proteinkinase CK2 zu Stress im ER führt. Stress im endoplasmatischen Retikulum führt zur Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α). Aus diesem Grund kann bei ER- Stress vermehrt die phosphorylierte Form von eIF2 α nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zu einem generellen Translationsstopp. Zum Nachweis von phosphoryliertem eIF2 α (p-eIF2 α) wurden HeLa- Zellen mit 50 μ M TBB behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO, diese wurde nach 4 Stunden geerntet. Es wurde ebenfalls die Expression des gesamten eIF2 α untersucht. Nach dem Herstellen von Zellextrakten erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine über ein SDS- Polyacrylamidgel und die Überführung auf eine PVDF- Membran. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern für das gesamte und das phosphorylierte eIF2 α inkubiert. Die Expression von eIF2 α und p-eIF2 α in mit TBB behandelten HeLa- Zellen wird in Abbildung 6 gezeigt. Das phosphorylierte eIF2 α zeigt eine oszillierende Expression, während das eIF2 α über den gesamten Zeitraum im Wesentlichen konstant bleibt. Besonders große Mengen an p-eIF2 α können nach einer Stunde, 8 bis 12 Stunden und nach 48 Stunden verzeichnet werden.

Dieses Experiment bestätigt, dass es auch in HeLa- Zellen durch die Hemmung von CK2 durch TBB zu Stress am endoplasmatischen Retikulum kommt. Die Phosphorylierung von eIF2 α legt die Vermutung nahe, dass der induzierte Stress am endoplasmatischen Retikulum die Signalkaskade um den aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) in den HeLa- Zellen aktiviert.

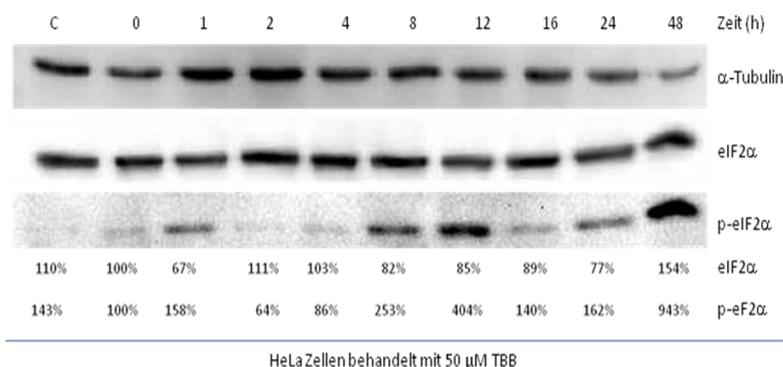


Abb. 6: Expression von p-eIF2 α und eIF2 α in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB. Die Zellen wurden nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Die Kontrolle (C) wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Die Proben werden über ein 12.5%iges SDS- Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran transferiert. Zum Nachweis von p-eIF2 α und eIF2 α wurde die PVDF- Membran mit dem jeweils spezifischen Anti-

körper inkubiert. Als Ladekontrolle dient ein spezifischer Antikörper für das ubiquitär vorkommende Protein α -Tubulin. Die Banden wurden quantifiziert, gegen die Ladekontrolle normiert und unterhalb des Western Blots in der Abbildung dargestellt. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Repräsentatives Ergebnis nach vierfacher Durchführung des Experimentes.

5.1.5 ATF4 Expression in mit TBB behandelten HeLa- Zellen

ATF4 ist ein Mitglied der Familie der ATF/ CREB Proteine. In der Literatur ist beschrieben, dass ATF4 trotz des generellen Translationsstopps bei ER- Stress verstärkt exprimiert wird (Harding et al. 2000). Um nachzuweisen, dass es sich bei dem eingeschlagenen Signalweg, durch die Hemmung der CK2 durch TBB, um ER- Stress und nachfolgenden Signalweg über ATF4 handelt, wurde als nächstes die Expression des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4 (ATF4) analysiert. Es wurde die Behandlung von HeLa- Zellen mit 50 μ M TBB durchgeführt. Die behandelten Zellen wurden nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO, welche nach 4 Stunden geerntet wurde. Es wurden Zellextrakte hergestellt und die Proteine im Zellextrakt nach Größe mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Überführung auf eine PVDF-Membran. Die Western Blots wurden mit einem ATF4- spezifischen Antikörper inkubiert. Abbildung 7 zeigt die Expression von ATF4 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB. Es ist eine Zunahme der Proteinmenge von ATF4 zwischen 0 und 16 Stunden zu verzeichnen. Nach Überschreitung der 16- Stunden Kontrolle zeigt sich ein Rückgang der Proteinmenge von ATF4. Zur Verdeutlichung des Anstiegs wurden die Banden des Western Blots quantifiziert, auf die α -Tubulin- Kontrolle normiert und unter dem Western Blot in Prozent angegeben. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet.

Dieses Experiment bestätigt die Vermutung, dass es nach der Phosphorylierung von eIF2 α zur vermehrten Expression von ATF4 in HeLa- Zellen kommt. Der Rückgang der Proteinmenge nach über 16 Stunden kann möglicherweise mit der Überwindung des ER- Stresses der HeLa- Zellen in Zusammenhang stehen. Die Überwindung des ER- Stresses würde eine Dephosphorylierung von eIF2 α und einen Rückgang der Expression von ATF4 bedeuten.

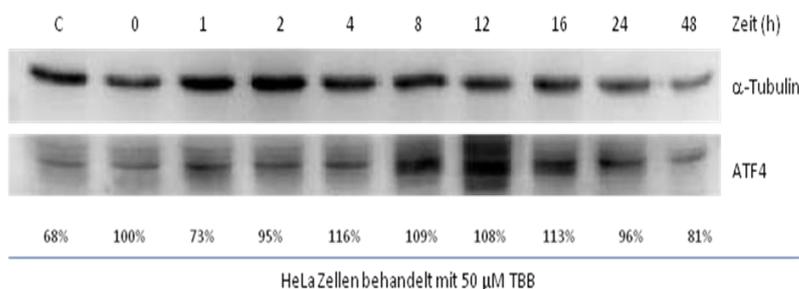


Abb. 7: Expression von ATF4 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB. Das Ernten der behandelten Zellen erfolgte nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden. Zur Kontrolle (C) wurden Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Die Zellen wurden lysiert, mit einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörpern mit nachfolgender ECL- Behandlung. Zur Detektion von ATF4 wurde die PVDF- Membran mit einem ATF4- spezifischen Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein α -Tubulin- spezifischer Antikörper. Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und ATF4 wurde im Vergleich zu α -Tubulin normiert. Der Nullstundenwert wurde auf 100% gesetzt. Das Experiment wurde fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt und ist hier repräsentativ dargestellt.

5.1.6 ATF3 Expression in mit TBB behandelten HeLa- Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem induzierten Signalweg um Apoptose durch ER- Stress handelt, stellte sich die Frage, was mit den Targets von ATF4 geschieht wenn ATF4, durch die Hemmung der CK2, verstärkt exprimiert wird. Eines der Zielgene von ATF4 in der Signalkaskade des ER- Stresses ist ATF3. ATF3 gehört ebenfalls zu der Transkriptionsfaktorfamilie der ATF/ CREB Proteine. Für den Nachweis von ATF3 in den HeLa- Zellen, wurden diese mit 50 μ M TBB behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet und lysiert. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO, welche nach 4 Stunden geerntet wurde. Die Proteine wurden mittels Western Blot analysiert. Die Western Blots wurden mit einem ATF3- spezifischen Antikörper inkubiert. Die Abbildung 8 zeigt die Proteine der HeLa- Zellen nach der Behandlung mit TBB. Es kommt zu einer stetigen Zunahme von ATF3 ab 2 Stunden nach Beginn der CK2- Hemmung. Die Prozentangaben unter dem Western Blot verdeutlichen die stetige Zunahme des Proteins ATF3. ATF3 wurde gegen α -Tubulin normiert und der Nullstundenwert auf 100% gesetzt.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass TBB über die Hemmung der CK2, ER- Stress auslöst und die Signalkaskade von ATF4 mit ihren Targets in Gang setzt.

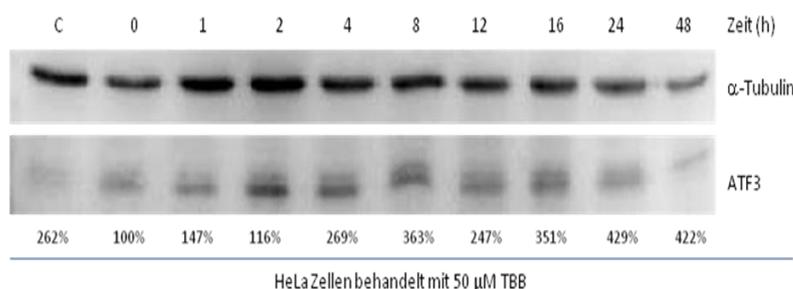


Abb. 8: Expression von ATF3 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB. Das Ernten und Lysieren der Zellen fand nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden statt. Die Kontrolle (C)

wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Es wurden Zellextrakte hergestellt und die Eluate wurde über ein 12.5%iges SDS- Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF- Membran geblotet. Der Nachweis von ATF3 erfolgte mit einem ATF3- spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente ein α -Tubulin- spezifische Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert, ATF3 gegen die Kontrolle normiert, der Nullstundenwert wurde auf 100% gesetzt und unter dem Western Blot dargestellt. Die Durchführung des Experimentes erfolgte fünfmal.

In den obigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der CK2- spezifische Hemmstoff TBB in den HeLa Zellen über ER- Stress die ER- Signalkaskade um ATF4 in Gang setzt. Das die Behandlung mit TBB letztlich zu Apoptose in HeLa- Zellen führt, kann auf Grund der geringen PARP- Spaltung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Im Laufe der Experimente für diese Arbeit ist ein weiterer Hemmstoff, Quinalizarin in den Fokus der Forschung gerückt (Cozza et al. 2009). Quinalizarin gilt als spezifischer im Bezug auf die Hemmung der CK2 als TBB. Die Sicherstellung, dass die Induktion des ER- Stresses tatsächlich durch die Hemmung der CK2 ausgelöst wird und nicht durch die Hemmungen weiterer Kinasen, ist vor allen Dingen wichtig, da wir auf der Suche nach Ansatzpunkten für die zukünftige Tumortherapie sind. Können wir nicht eine bestimmte Kinase hemmen, können wir nicht mit Sicherheit feststellen, dass der ausgelöste Signalweg durch die Hemmung unserer Zielkinase kommt. Dies wiederum führt dazu, dass wir keine Aussage darüber treffen können, ob es einen sinnvollen Ausgangspunkt für die Tumortherapie darstellen könnte. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit den HeLa- Zellen ebenfalls mit dem CK2- Hemmstoff Quinalizarin durchgeführt.

5.2 HeLa- Zellen und der Hemmstoff der Proteinkinase CK2, Quinalizarin

5.2.1 Wachstumskurve von HeLa- Zellen, die mit Quinalizarin behandelt wurden

Zu Beginn meiner Arbeit habe ich HeLa- Zellen mit dem Hemmstoff TBB behandelt um zu sehen, ob der Hemmstoff eine Auswirkung, und wenn ja welche, auf das Wachstum der Zellen hat. Dies gilt es nun ebenso für den Hemmstoff Quinalizarin und die Tumorzellen HeLa herauszufinden. Quinalizarin ist ein CK2- Hemmstoff der neueren Generation, der während meiner Forschungen an HeLa- Zellen in das Blickfeld der Forschung gerückt ist. Quinalizarin ist ein ATP- kompetitiver Hemmstoff. Er zeichnet sich durch spezifische Hemmung der CK2 mit einem Ki- Wert von 50 nM und einem IC50- Wert von 0.11 μ M aus. Des Weiteren gilt er als gut zellpermeabel (Cozza et al. 2009). Als Anfangsexperiment wurde die Wachstumskur-

ve gewählt. In 24 Well- Gewebekulturschalen wurden pro Kavität 1×10^4 HeLa Zellen ausgesät und mit $50 \mu\text{M}$ Quinalizarin oder der äquivalenten Menge DMSO, dem Lösungsmittel von Quinalizarin, behandelt. Die mit DMSO behandelten Zellen dienten als Kontrollgruppe. Nach dem Ernten nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurden die Zellen mit Trypanblau gemischt, woraufhin sich die toten Zellen anfärbten. Es folgte die manuelle Auszählung mit der Neubauerzählkammer. In der graphischen Darstellung in Abbildung 9 zeigt sich, dass die Zellzahl der mit Quinalizarin behandelten Zellen über den gesamten Zeitraum des Experimentes konstant bleibt, wohingegen die Kontrollpopulation eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen hat.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass Quinalizarin einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von HeLa- Zellen hat, die Behandlung mit DMSO jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation nimmt.

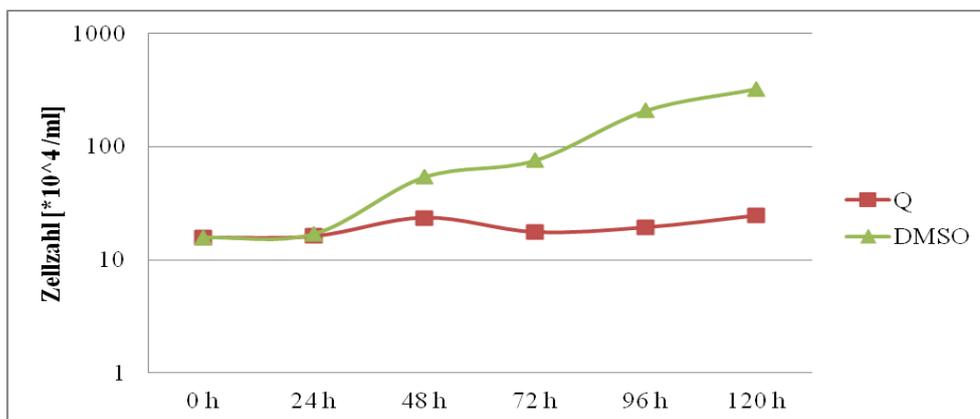


Abb. 9: Wachstumskurve von HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin (Q). Die HeLa-Zellen wurde mit $50 \mu\text{M}$ Quinalizarin behandelt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen mit dem Lösungsmittel von Quinalizarin, DMSO, behandelt kultiviert. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden (h) wurden die Zellen geerntet und anschließend mit Hilfe der Neubauerzählkammer manuell ausgezählt und graphisch dargestellt. Ergebnisse von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.2.2 MTT- Assay von HeLa- Zellen nach Behandlung mit Quinalizarin

Ist die nachgewiesene Reduktion der Zellzahl von HeLa- Zellen nach Behandlung mit Quinalizarin auf die Abnahme von lebendigen Zellen zurückzuführen? Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein MTT- Assay durchgeführt. Der MTT- Assay ist eine etablierte Methode zur Messung der Viabilität von Zellen. Die HeLa- Zellen wurden in 24- Well- Gewebekulturschalen ausgesät und mit $50 \mu\text{M}$ Quinalizarin behandelt. Die Kontroll- Zellen wurden mit DMSO behandelt. Die Inkubation der Zellen in der MTT- Substratlösung erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden. Die lebenden Zellen können anschließend mit dem TECAN infinite M200 PRO[®]

gemessen und graphisch dargestellt werden. Es zeigt sich, dass die Behandlung mit Quinalizarin in den ersten 24 Stunden keinen Effekt auf die Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zu der Kontrolle hat. Erst im Verlauf der 48 und 72 Stunden zeichnet sich ab, dass die Behandlung mit Quinalizarin einen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen hat. Die Behandlung mit Quinalizarin führt bei den HeLa- Zellen zu einem Rückgang des Zellüberlebens im Vergleich zur Behandlung mit DMSO. Nach 48 Stunden beträgt die Viabilität der mit Quinalizarin behandelten Zellen 84% im Vergleich zu den Zellen, die mit DMSO behandelt wurden und nach 72 Stunden sinkt die Viabilität auf 80% (Abbildung 10).

Der Rückgang der Zellzahl der HeLa- Zellen, nach der Behandlung mit Quinalizarin, ist vergleichbar mit dem Rückgang der Zellzahl aus dem oben gezeigten Experiment in Abbildung 4 nach Behandlung von HeLa- Zellen mit TBB.

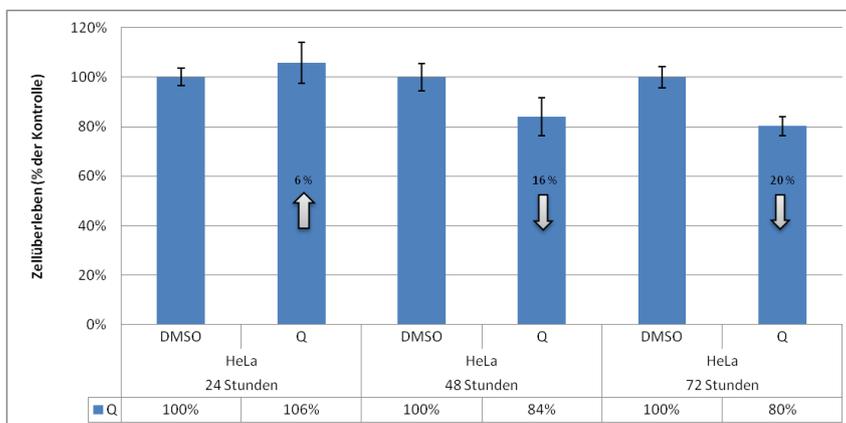


Abb. 10: Viabilität von HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin (Q). Die HeLa- Zellen wurden mit 50 μ M Quinalizarin, die Kontrollzellen (C) mit DMSO behandelt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mit MTT- Substratlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C / 95% RH / 5% CO₂. Die Anzahl der lebenden Zellen wird mit dem TECAN infinite M200 PRO[®] bestimmt und graphisch dargestellt. Als 100%- Referenzwert gilt jeweils die DMSO- Kontrolle. Ergebnisse nach dreimaliger Durchführung des Experiments.

5.2.3 Apoptose der mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Verminderung der Zellzahl nach der Behandlung durch den CK2- Hemmstoff Quinalizarin auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen ist oder ob die Behandlung mit Quinalizarin, ebenso wie die mit TBB, lediglich zu Stress am ER führt. Hierfür bietet sich der Nachweis der Spaltung der Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) an. Nach der Behandlung der Zellen mit 50 μ M Quinalizarin und der gleichen Menge an DMSO wurden sie nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden und die Kontrolle nach 4 Stunden geerntet. Die Proteine wurden aus den hergestellten Zellextrakten mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran überführt. Anschlie-

End erfolgte die Inkubation mit einem PARP- spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle wurde GAPDH gewählt. Die Abbildung 11 zeigt, dass sowohl das Volllängen Produkt von PARP als auch das PARP- Spaltprodukt vorhanden sind. Bei dem Volllängenprodukt kann zwischen 0 und 2 Stunden ein starker Anstieg verzeichnet werden. Danach folgt eine stetige Abnahme bis zum 24 Stunden Zeitpunkt und erst bei 48 Stunden steigt das Produkt wieder sehr stark an. Bei dem Spaltprodukt hingegen kann ein Anstieg zwischen 0 und 4 Stunden beobachtet werden. Zwischen 8 und 12 Stunden verdoppelt sich die Proteinmenge um bei 16 Stunden wieder um 50% zu sinken und bei 48 Stunden sehr stark zu steigen. Zur Verdeutlichung der Veränderungen der Proteinmengen, wurden die Banden des Western Blots quantifiziert, gegen GAPDH normiert und der Nullstundenwert wurde auf 100% gesetzt. Es erfolgte die Darstellung in Prozentzahlen unter dem Western Blot. Die oberer Zahlenreihe bezieht sich hierbei auf das Volllängen Produkt von PARP (PARP, VL) und die untere Reihen auf das Spaltprodukt (PARP, SP).

Mit diesem Experiment konnten ersten Hinweise dafür gewonnen werden, dass der Rückgang der Zellzahl von HeLa- Zellen nach Behandlung mit dem CK2- Hemmstoff Quinalizarin in der Wachstumskurve (Abb. 9) und dem MTT- Assay (Abb. 10) auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sind.

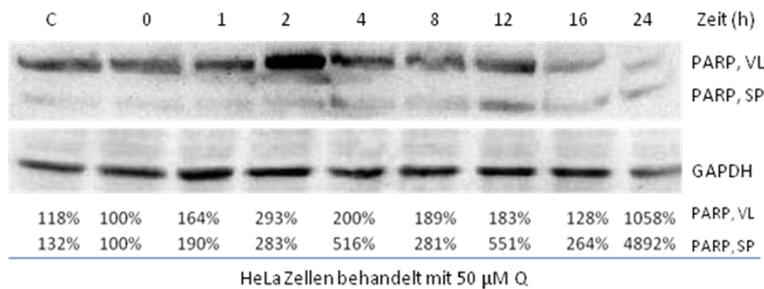


Abb. 11: Expression des Volllängenproduktes (PARP, VL) und des Spaltproduktes (PARP, SP) von PARP in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin (Q). Die mit 50 µM Quinalizarin behandelte HeLa- Zellen wurden nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Die als Kontrolle (C) dienenden Zellen wurden mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Nach dem Lysieren der Zellen werden die Proteine im Zellextrakt mittels SDS- Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF- Membran geblottet. Die Detektion von Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) erfolgte mit einem PARP- spezifischen Antikörper. Der Antikörper markiert das Volllängenprodukt von PARP bei 116 kDa und das Spaltprodukt bei 89 kDa. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Die Banden wurden quantifiziert und gegen GAPDH normiert. Der Nullstundenwert wurde als Referenzwert verwendet. Die Ergebnisse der Quantifizierung wurden unter dem Western Blot dargestellt. Die obere Reihe der Prozentangaben bezieht sich auf das Volllängenprodukt von PARP, die untere Reihe auf das Spaltprodukt. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses nach zweimaliger Durchführung des Experiments.

5.2.4 ER- Stress der mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen

Nachdem es gelungen war, zu zeigen, dass der CK2- Hemmstoff Quinalizarin Apoptose in HeLa- Zellen induziert, sollte hier nach dem Signalweg der Apoptose geschaut werden. Der erste Schritt sollte der Nachweis von eIF2 α und p-eIF2 α sein, da es bei einer Induktion von ER- Stress durch die Behandlung mit Quinalizarin zu einer vermehrten Phosphorylierung von eIF2 α kommen müsste. Hierfür wurden HeLa- Zellen mit 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet und anschließend lysiert. Als Kontrolle diente die Behandlung mit der äquivalenten Menge DMSO. Die Kontrolle wurde nach 4 Stunden geerntet. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden über ein 12.5%iges SDS- Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. Die Western Blots wurde mit eIF2 α - und p-eIF2 α - spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörpern mit nachfolgender ECL- Behandlung. Auf dem SDS- Polyacrylamidgel in Abbildung 12 zeigt sich, dass es bei dem gesamten eIF2 α im Verlauf der Zeitreihe zu einem Anstieg der Proteinmenge bis 4 Stunden kommt. Über den Zeitraum zwischen 4 und 48 Stunden bleibt die Proteinmenge mit leichten Schwankungen konstant. Beim phosphorylierten eIF2 α kommt es zu einem Anstieg der Proteinmenge bis zu einem Spitzenwert von 410% nach 12 Stunden, bezogen auf den Referenzwert, dem Nullstundenwert und anschließend einem Abfall auf 116% nach 48 Stunden. Die durchgeführte Quantifizierung der Banden wurde nach ihrer Normierung gegen GAPDH in Form von Prozentangaben unter der Grafik dargestellt. Der Nullstundenwert wurde auf 100% gesetzt.

Die Expression von phosphoryliertem eIF2 α zeigt, dass es durch die Behandlung der Tumorzellen mit Quinalizarin zu ER- Stress kommt.

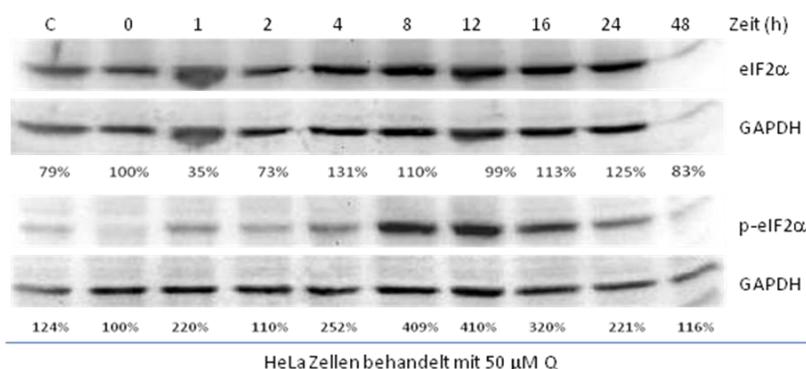


Abb. 12: Expression von eIF2 α und phosphoryliertem eIF2 α in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin (Q). HeLa- Zellen wurden mit 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet, die Kontrolle (C) wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Der Nachweis von p-eIF2 α und eIF2 α erfolgte nach elektrophoretischer Auf-

trennung der Eluate über ein 12.5%iges SDS- Polyacrylamidgel im Western Blot. Die PVDF-Membran wurde mit p-eIF2 α und eIF2 α spezifischen Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle dient GAPDH. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert wobei der Nullstundenwert als Referenzwert verwendet wurde. Repräsentatives Ergebnis nach zweifacher unabhängiger Durchführung des Versuchs.

5.2.5 ATF4 Expression in mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen

Auch in dieser Versuchsreihe wurde als nächstes der aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) analysiert. Dies erfolgte, um nachzuweisen, dass es sich bei dem eingeschlagenen Signalweg, durch die Hemmung der CK2 mit Quinalizarin, um ER- Stress mit generellem Translationsstopp und Überexpression von ATF4 handelt. Hierzu wurden die HeLa- Zellen mit 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Als Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit DMSO welche nach 4 Stunden geerntet wurde. Es erfolgte die Herstellung von Zelllysaten. Die Proteine aus den Lysaten wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Dies erfolgte mittels 12.5%igem SDS- Polyacrylamidgel. Anschließend erfolgte die Überführung auf eine PVDF- Membran. Die Western Blots wurde in einem ATF4- spezifischen Antikörper inkubiert. Die Proteinbanden wurden anschließend densitometrisch analysiert und ATF4 wurde gegen die Ladekontrolle abgeglichen. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Abbildung 13 zeigt, dass es zu einer stetigen Zunahme von ATF4 zwischen 0 und 16 Stunden kommt. Nach 24 Stunden ist eine Abnahme, nach 48 Stunden eine erneute Zunahme zu verzeichnen.

Hieraus lässt sich schließen, dass durch die Hemmung der CK2 mit Quinalizarin ein Translationsstopp induziert wird.

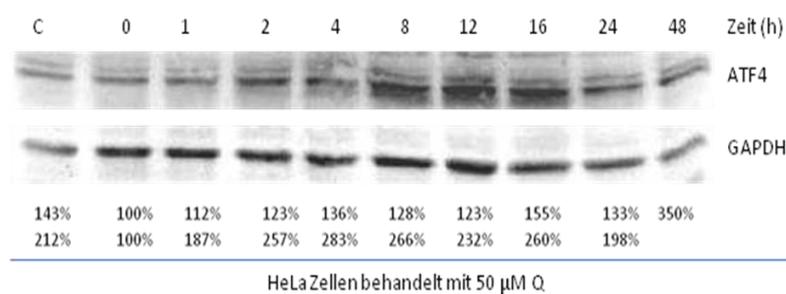


Abb. 13: Expression von ATF4 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin. Die HeLa-Zellen wurden mit 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet und lysiert. Die Kontrolle (C) wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Die Eluate wurden mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF- Membran überführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörpern mit nachfolgender ECL- Behandlung. Zur Detektion von ATF4 und GAPDH wurden spezifische Antikörper verwendet. Die Proteinbanden wurden

quantifiziert und ATF4 wurde gegen GAPDH normiert. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Ergebnisse der Quantifizierung wurden unter dem Western Blot dargestellt. Die obere Reihe der Prozentangaben bezieht sich auf die bei ATF4 obere sichtbare Bande, die untere Zahlenreihe auf die unteren Bande von ATF4. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

5.2.6 ATF3 Expression in mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen

Die Expression von ATF4 in den mit Quinalizarin behandelten HeLa- Zellen konnte in den vorangegangenen Experimenten nachgewiesen werden. Nun war vorallem von Interesse, in wie weit auch in dieser Versuchsreihe die Signalkaskade des ER- Stresses in Gang gesetzt wurde. Zur Überprüfung der Signalkaskade wurde ATF3 als ein Target von ATF4 ausgewählt. Es erfolgte die Behandlung von HeLa- Zellen für 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden mit Quinalizarin. Die Zellen wurden anschließend geerntet und es wurden Zellextrakte hergestellt. Als Kontrolle dient die Behandlung mit DMSO welche nach 4 Stunden geerntet wurde. Die Proteine im Zellextrakt wurden mittels SDS- Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran überführt. Die Western Blots wurden mit einem ATF3- spezifischen Antikörper inkubiert. Die Abbildung 14 zeigt, dass es zu einer stetigen Zunahme von ATF3 zwischen 1 und 4 Stunden kommt, anschließend kommt es zu einer Abnahme, welche durch einen leichten Anstieg bei 16 Stunden unterbrochen wird. Unter der Abbildung sind die Ergebnisse der Quantifizierung der Banden, zur Berücksichtigung der Schwankungen in der Ladekontrolle, in Prozent angegeben.

Der Nachweis von ATF3 als direktes Target von ATF4 verstärkt die These, dass es zur Induktion von Apoptose über die Signalkaskade von ATF4, durch die Behandlung von HeLa- Zellen mit Quinalizarin kommt.

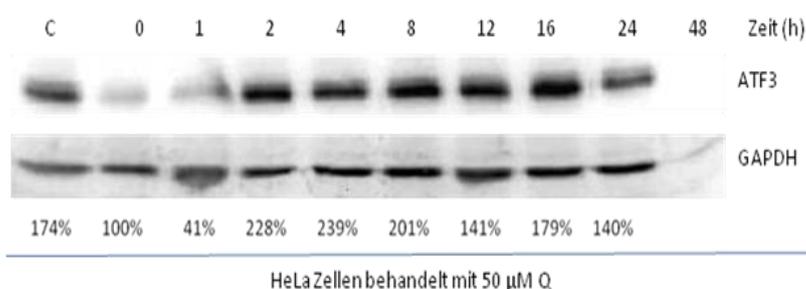


Abb. 14: Expression von ATF3 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin. Die HeLa- Zellen wurde mit 50 μM Quinalizarin für 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden behandelt. Die Kontrolle (C) wurde mit DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Es erfolgte das Herstellen von Zellextrakten und die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Überführung auf eine PVDF- Membran. Der Nachweis von ATF3 erfolgte mit einem ATF3- spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Zur Berücksichti-

gung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle normiert. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Nach zweimaliger Durchführung des Versuchs ist hier ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

In den obigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch Quinalizarin als CK2-spezifischer Hemmstoff die Signalkaskade der Apoptose über ER-Stress in HeLa-Zellen in Bewegung setzt. Bis zu diesem Zeitpunkt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl TBB als auch Quinalizarin als CK2-spezifische Hemmstoffe die selbe Signalkaskade in HeLa-Zellen in Gang setzen. Die Hemmung der CK2 durch TBB oder Quinalizarin führt zu ER-Stress in den HeLa-Zellen. Dies bewirkt über die Phosphorylierung von eIF2 α den generellen Translationsstopp, durch welchen die Expression von ATF4 verstärkt wird. Die Expression über ATF4 und ATF3 induziert letztendlich die PARP-Spaltung, also die Apoptose der Tumorzellen. HeLa-Zellen sind Zellen einer Tumorzelllinie die unter anderem mit HPV 18 infiziert sind. Dementsprechend ist es interessant zu erfahren, in wie weit sich Daten, die mit HeLa-Zellen erhoben wurden, auf andere Tumorzelllinien übertragbar sind. Aus diesem Grund wurden alle Versuche mit einer anderen Tumorzelllinie wiederholt. Für diese Wiederholung wurden HepG2-Zellen, gut differenzierte Zellen eines hepatozellulären Karzinoms eines 15-jährigen Jungen mit einer Chromosomenanzahl die zwischen 50- 60 Chromosomen variiert gewählt (Papachristou et al. 2013).

5.3 HepG2- Zellen und die Hemmstoffe der Proteinkinase CK2, TBB und Quinalizarin

Neben der, in den vorangegangenen Experimenten verwendeten Tumorzelllinie HeLa, gibt es noch viele weitere kultivierte Tumorzelllinien. Wie schon beschrieben, weisen HeLa-Zellen einige Besonderheiten auf, welche unter Umständen dafür verantwortlich sein könnten, dass die Experimente nicht auf eine andere Zelllinie übertragen werden können. Daher haben die obigen Experimente mit einer zweiten Tumorzelllinie wiederholt. Hierfür wurden HepG2-Zellen gewählt, das sind kultivierte Zellen eines hepatozellulären Karzinoms, die im Gegensatz zu einigen anderen in Kultur gehaltenen Zelllinien von hepatozellulären Karzinomen (PLC und Hep3B) keinen Hinweis auf einen Hepatitis-B Virus in ihrem Genom tragen (Wong et al. 2000). Ein wichtiger Unterschied der HepG2-Zellen zu den HeLa-Zellen ist, dass soweit bekannt, die HepG2-Zellen keine DNA-Sequenzen eines humanen Papillomavirus in sich tragen (Durzyńska und Barton 2014).

5.3.1 Wachstumskurve von HepG2- Zellen, die mit TBB oder Quinalizarin behandelt wurden

Zu Beginn der neuen Testreihe interessierte besonders, ob TBB und Quinalizarin einen Effekt auf die Proliferation von HepG2- Zellen haben. Hierfür wurden Wachstumskurven über 120 Stunden angelegt. Die Zellen wurden in 24- Loch- Platten kultiviert (1×10^4 HepG2- Zellen pro Kavität), mit $50 \mu\text{M}$ TBB oder $50 \mu\text{M}$ Quinalizarin behandelt und nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden geerntet. Als Kontrolle wurden Zellen mit den jeweils gleichen Mengen an DMSO behandelt. Die Zellzahl wurde nach dem Färben der Zellen mit Trypanblau in der Neubauerzählkammer manuell ermittelt und anschließend graphisch dargestellt. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Wachstumskurven der mit TBB oder Quinalizarin behandelten Zellen im Gegensatz zu der Kontrolle (Abbildung 15). Die mit den Hemmstoffen behandelten HepG2- Zellen zeigen von Beginn der Versuchsreihe an eine Abnahme der Zellzahl, was darauf schließen lässt, dass die Proliferation von Beginn an gehemmt wird. Im Gegensatz hierzu zeigen die mit DMSO behandelten Zellen eine relativ gleichmäßige Zellproliferation bis 96 Stunden mit einer anschließenden Stagnation beziehungsweise einer minimalen Abnahme der Zellzahl bis 120 Stunden.

Mit diesem Experiment kann eindeutig gezeigt werden, dass sowohl TBB als auch Quinalizarin einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von HepG2- Zellen haben wohingegen das Lösungsmittel der beiden Hemmstoffe, DMSO, keinen Einfluss auf die Proliferation zu haben scheint.

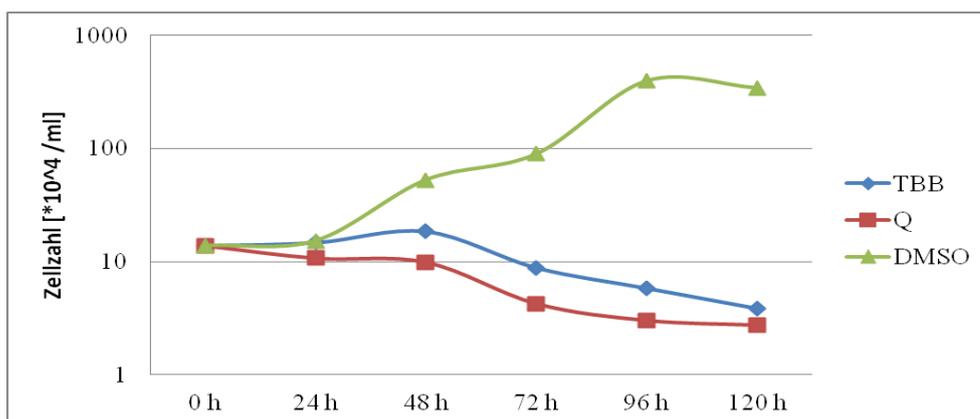
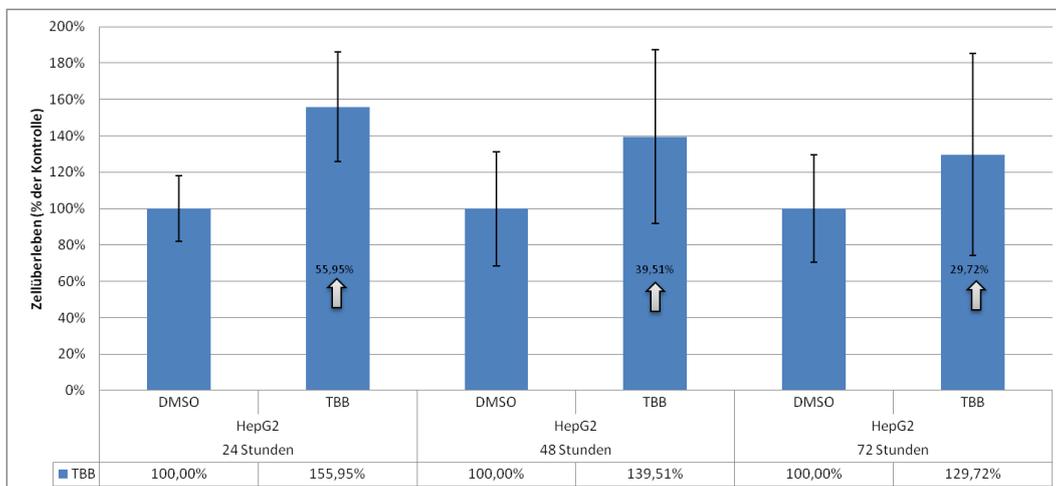


Abb. 15: Wachstumskurve von HepG2- Zellen nach der Behandlung mit TBB ($50 \mu\text{M}$), Quinalizarin ($50 \mu\text{M}$) und DMSO ($50 \mu\text{M}$). Die HepG2- Zellen wurde nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden (h) geerntet, mit Trypanblau gefärbt und anschließend mit Hilfe der Neubauerzählkammer manuell ausgezählt und graphisch dargestellt. Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.3.2 MTT- Assay von HepG2- Zellen nach Behandlung mit TBB oder Quinalizarin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl TBB als auch Quinalizarin eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von HepG2- Zellen haben, sollte im nächsten Schritt festgestellt werden, ob es sich bei der Abnahme der Zellzahl um eine Verringerung der lebenden Zellen handelt. Es wurden HepG2- Zellen gleichmäßig in 24- Well- Gewebekulturschalen kultiviert und mit 50 μ M TBB, 50 μ M Quinalizarin oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden mit MTT- Substratlösung versetzt. Die lebenden Zellen konnten mit dem TECAN infinite M200 PRO[®] gemessen und die Zellzahl graphisch dargestellt werden. Die Kontrolle wurde jeweils als 100% gewertet. Das Diagramm in Abbildung 16 zeigt, dass die Behandlung mit 50 μ M TBB zu einem Ergebnis führt, welches so nicht zu erwarten war. Die HepG2- Zellen werden in ihrer Viabilität durch TBB nicht gehemmt sondern gefördert. Die Differenz zwischen den mit DMSO und den mit TBB behandelten Zellen wird im Zeitverlauf zwar geringer, es ist dennoch deutlich zu sehen, dass die Zellen, die mit TBB behandelt worden sind, eine höhere Viabilität aufweisen als die, die mit DMSO behandelt worden sind. Bei den mit Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen ist bei 24 Stunden noch kein Effekt auf das Überleben der Zellen zu beobachten, bei 48 und 72 Stunden wird jedoch deutlich, dass Quinalizarin die Viabilität der HepG2- Zellen hemmt.



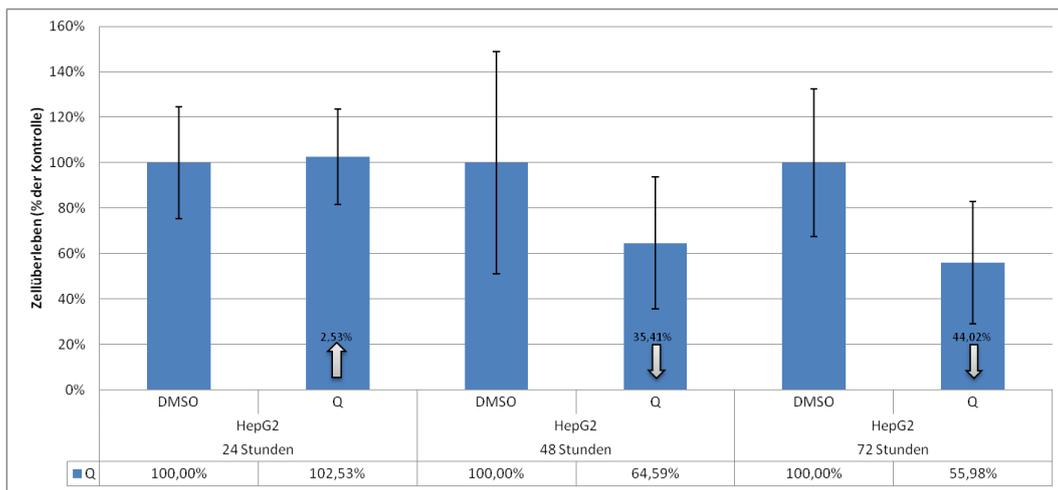


Abb. 16: Viabilität von HepG2- Zellen nach der Behandlung mit jeweils 50 μM TBB oder Quinalizarin (Q). Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden wurden MTT- Assays durchgeführt und die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wurde 100% gesetzt. Repräsentative Ergebnisse nach drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

5.3.3 Apoptose der mit Quinalizarin oder TBB behandelten HepG2- Zellen

Das Viabilitätsassay der HepG2- Zellen zeigte eine unterschiedliche Auswirkung der CK2-Hemmstoffe TBB und Quinalizarin auf das Zellüberleben. Bei den Zellen, die mit Quinalizarin behandelt worden sind, konnte ein Rückgang der Viabilität nach 48 beziehungsweise 72 Stunden verzeichnet werden, dementsprechend liegt die Überlegung nahe, dass die HepG2 Zellen nach der Behandlung mit Quinalizarin in Apoptose gehen. Bei den Zellen, die mit TBB behandelt wurden, konnte kein Rückgang in der Viabilität festgestellt werden. Daher stellte sich die Frage, ob die HepG2- Zellen die Behandlung mit TBB vollständig unbeschadet überstehen oder ob auch hier, wenn auch nur eine geringe Anzahl der Zellen durch die Hemmung der CK2 in Apoptose gehen. Es erfolgte die Durchführung eines Experimentes zum Nachweis des Spaltproduktes der Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) in HepG2- Zellen. Die Hemmung der CK2 erfolgte mit 50 μM TBB oder 50 μM Quinalizarin, über 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden. Die Zellen wurden anschließend lysiert, die Proteine wurden elektrophoretisch über ein SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran geblottet. Die Proteine auf der Membran wurde mit einem PARP- spezifischen Antikörper und ECL- Lösung visualisiert. Die Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse aus diesem Experiment. Die mit TBB behandelten Zellen weisen lediglich eine Bande auf der Membran auf. Diese findet sich bei 116 kDa und zeigt folglich das Volllängenprodukt von PARP. Das Volllängenprodukt weist einen schwankenden Verlauf auf. Es erfolgt ein Anstieg der Proteinmenge zwischen 1 und 2 Stunde, mit einem anschließenden Abfall über 4 bis 8 Stunde. Zwischen 12 und

48 Stunden kommt es zu einem erneuten Anstieg mit einer Abnahme der Proteinmenge bei 24 Stunden. Im Gegensatz zur Behandlung der Zellen mit TBB zeigen Zellen, die mit Quinalizarin behandelt wurden, sowohl das Volllängenprodukt von PARP (PARP, VL) als auch das Spaltprodukt (PARP, SP). Das Volllängenprodukt zeigt zunächst eine Zunahme der Proteinmenge bis 4 Stunden und folgend einen leicht schwankenden Abfall bis 48 Stunden. Das Spaltprodukt hingegen zeigt nach einem Anstieg bis 2 Stunden zunächst einen Abfall des Produktes bis 24 Stunden und bei 48 Stunden einen erneuten Anstieg. Zur Veranschaulichung der Proteinmengen auf den Abbildungen wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle normiert. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Prozentangaben, die sich aus der Quantifizierung ergeben haben, wurden unter der Abbildung dargestellt.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass der Rückgang der Zellzahl von HepG2- Zellen nach Behandlung mit dem CK2- Hemmstoff Quinalizarin in der Wachstumskurve (Abb. 15) und dem MTT- Assay (Abb. 16) auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sind und dass die Behandlung der HepG2- Zellen mit TBB keine Apoptose in den Zellen induziert.

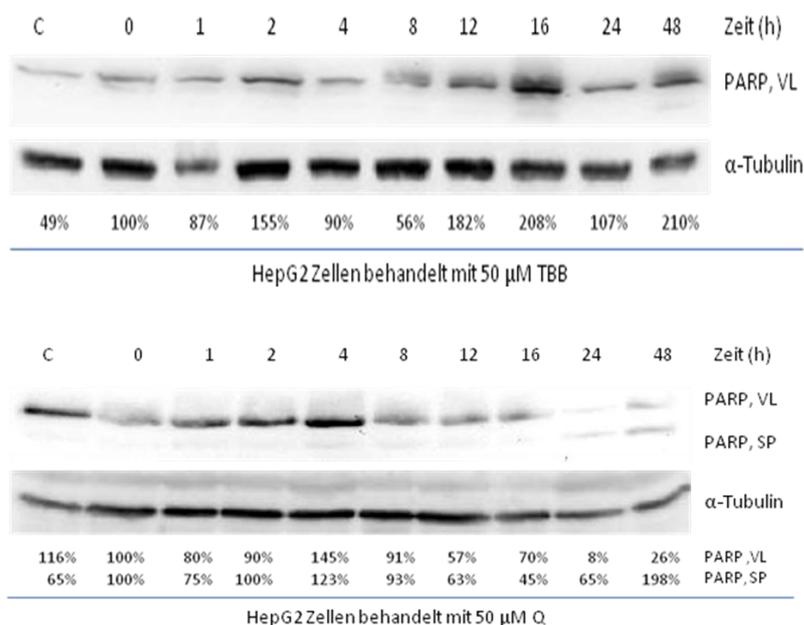


Abb. 17: Expression von PARP in HepG2- Zellen nach der Behandlung mit TBB (50 μ M) oder Quinalizarin (Q) (50 μ M). Die Behandlung erfolgte über 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden. Die Kontrolle (C) wurde für 4 Stunden mit DMSO behandelt. Die Proben wurden geerntet, lysiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis der Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) wurde die PVDF- Membran mit einem anti- PARP Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle dient ein α -Tubulin- Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert, gegen α -Tubulin abgeglichen und der Nullstundenwert wurde auf 100% gesetzt. Die Durchführung der Experimente erfolgte dreimal unabhängig voneinander.

5.3.4 ER- Stress der mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen

Die Hemmung der CK2 führt, so wird es in der Literatur beschrieben (Schneider et al. 2012), zu Stress am endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Durch Stress im ER wird der eukaryotische Initiationsfaktor 2α (eIF2 α) phosphoryliert. Ist es möglich in HepG2- Zellen nach der Hemmung der CK2 durch Quinalizarin oder TBB p-eIF2 α nachzuweisen? Auch wenn TBB in HepG2- Zellen nicht zur Induktion von Apoptose führt, ist es durchaus vorstellbar, dass TBB zu ER- Stress in HepG2- Zellen führt. Hierzu wurden HepG2- Zellen mit 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Die Kontrollen wurden mit der jeweils gleichen Menge DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Es folgte die Herstellung von Zellextrakten, die Proteine im Zellextrakt wurden mit Hilfe der SDS- PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Western Blots wurden mit eIF2 α - und p-eIF2 α - spezifischen Antikörpern inkubiert und mittels Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender ECL- Behandlung visualisiert. Es erfolgte die Quantifizierung der Proteinbanden und die Normalisierung gegen die Ladekontrollen. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. In Abbildung 18 werden die Proteine der Zellen dargestellt, die mit TBB oder Quinalizarin behandelt wurden. Die mit TBB behandelten Zellen weisen beim phosphorylierten eIF2 α einen stark schwankenden Verlauf auf. Es können Proteinmengenspitzen bei 4 und bei 48 Stunden verzeichnet werden. Das eIF2 α hingegen hat einen relativ stabilen Verlauf mit erhöhten Werten bei 1, 4 und 48 Stunden. Die mit Quinalizarin behandelte Zellen zeigen, dass es bei dem phosphorylierten eIF2 α zu einem oszillierenden Verlauf kommt. EIF2 α weist lediglich einen leicht schwankenden Verlauf mit einem niedrigen Wert bei einer Stunde und erhöhten Werten zwischen 16 und 48 Stunden auf.

Wie erwartet, ließen sich in den mit Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen deutlich größerer Mengen des phosphorylierten Proteins eIF2 α nachweisen. Da auch in der Kontrolle der Nachweis von p-eIF2 α erfolgte, kann spekuliert werden, ob es sich um einen durch die Behandlung mit TBB induzierten ER- Stress handelt oder ob alleine die Kultivierung und Behandlung der Zellen zu ER- Stress geführt hat. Die deutlich größeren Mengen an phosphoryliertem Protein in den mit Quinalizarin behandelten Zellen lassen sich auf der anderen Seite gut mit den vorangegangenen Ergebnissen vereinbaren, dass sich durch Quinalizarin ER- Stress in HepG2- Zellen induzieren lässt.

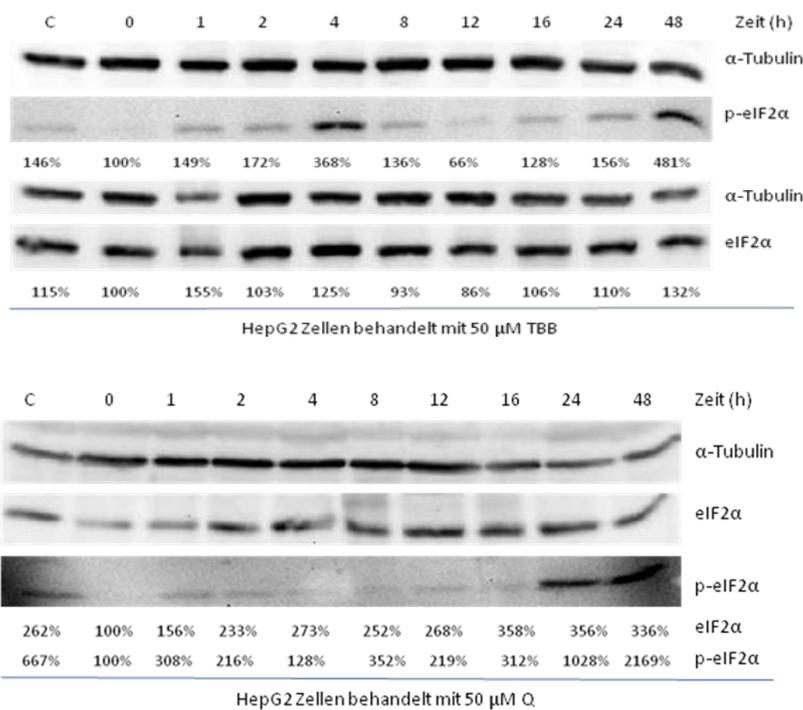


Abb. 18: Expression von eIF2 α und p-eIF2 α in HepG2- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB oder Quinalizarin (Q). Die Zellen wurden nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet, die Kontrollen (C) wurde mit der jeweils gleichen Menge DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Die Eluate wurden mittels SDS- PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis von p-eIF2 α und eIF2 α erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle diente ein α -Tubulin- Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle normiert, der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis nach dreifacher Durchführung des Experiments.

5.3.5 ATF4 Expression in mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen

Quinalizarin führt in HepG2- Zellen laut den oben dargestellten Ergebnissen über ER- Stress zu einem generellen Translationsstopp. Laut Literatur wird ATF4 bei einem generellen Translationstopp verstärkt exprimiert (Connor et al. 2001; Novoa et al. 2001; Brush et al. 2003; Kojima et al. 2003; Novoa et al. 2003). Dementsprechend sollte es möglich sein, ATF4 in den mit Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen nachzuweisen. Die Behandlung mit TBB führt lediglich zu einem geringen beziehungsweise fraglichen Auslösen von Stress am endoplasmatischen Retikulum. Es ist dementsprechend fraglich, ob es gelingt, nach der Behandlung der Zellen mit TBB ATF4 nachzuweisen. Es wurden erneut Western Blot- Analysen von HepG2- Zellen nach der Behandlung mit 50 μ M TBB oder Quinalizarin über 48 Stunden durchgeführt. Das SDS- Polyacrylamidgel in Abbildung 19 zeigt, dass es zu einer Zunahme von ATF4, mit einem Peak bei 16 Stunden und einer geringen Abnahme über 24 und 48 Stunden nach der

Behandlung mit TBB kommt. Nach der Behandlung mit Quinalizarin ist zu sehen, dass es zu einer stetigen Zunahme der Proteinmenge von ATF4 kommt, welche zwischen 8 und 16 Stunden ihren Höhepunkt erreicht und anschließend wieder abfällt.

In diesen Experimenten zeigt sich, dass beide CK2- Hemmstoffe eine vermehrte Expression von ATF4 bewirken. Die mit Quinalizarin behandelten Zellen scheinen den vermuteten Signalweg über den generellen Translationsstopp durch die Phosphorylierung von eIF2 α nach Stress am ER zu gehen. Über welchen Signalweg es in den mit TBB behandelten HepG2-Zellen zur Expression von ATF4 kommt oder ob die geringe Phosphorylierung von eIF2 α ausreicht, um die Überexpression von ATF4 zu induzieren, ist nicht zu beantworten.

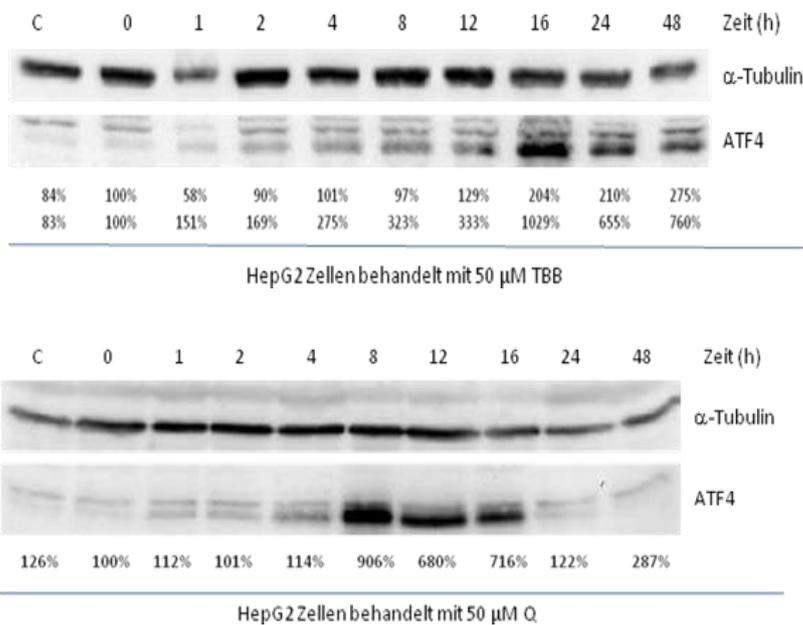
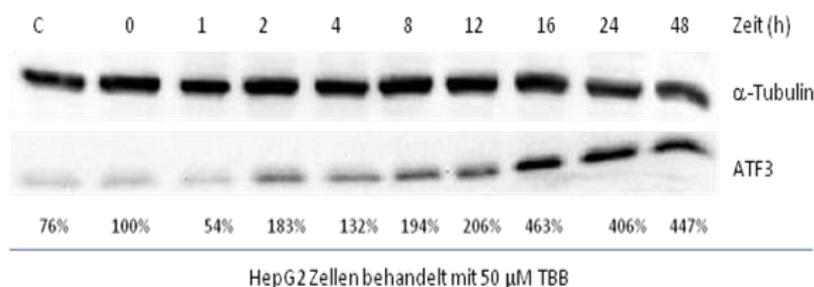


Abb. 19: Expression von ATF4 in HepG2- Zellen nach der Behandlung mit TBB oder Quinalizarin (Q). Die HepG2- Zellen wurden mit 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Die Kontrollen (C) wurde mit der jeweils gleichen Menge DMSO behandelt und nach 4 Stunden geerntet. Es wurden Zellextrakte hergestellt, die Proteine im Zellextrakt mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF- Membran überführt. Zum Nachweis von ATF4 wurde die PVDF- Membran mit einem ATF4- spezifischen Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente ein α -Tubulin- spezifischer Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle normiert. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet. Die Experimente wurden dreimal voneinander unabhängig durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

5.3.6 ATF3 Expression in mit TBB oder Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen

Nachdem im vorangegangenen Experiment die Expression von ATF4 nach der Behandlung von HepG2- Zellen mit TBB als auch mit Quinalizarin gezeigt werden konnte, galt es nun auch hier festzustellen, wie sich die Targets von ATF4 verhalten. Für den Nachweis von ATF3 in den HepG2- Zellen wurden diese mit 50 μ M TBB oder 50 μ M Quinalizarin behandelt und nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO, welche nach 4 Stunden geerntet wurde. Es wurden Zellysate hergestellt. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellysaten elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran geblottet. Die Western Blots wurden mit einem ATF3- spezifischen Antikörper inkubiert. Die Proteine der HepG2- Zellen, die mit TBB behandelt wurden, sind im oberen Western Blot der Abbildung 20 zu sehen. Es zeigt sich, dass es zu einer leicht schwankenden, jedoch eindeutigen Zunahme von ATF3 zwischen 1 und 48 Stunden kommt. Der untere Western Blot zeigt die Proteine der mit Quinalizarin behandelten HepG2- Zellen. Auch hier zeigt sich, dass es zu einer stetigen Zunahme von ATF3 über die gesamte Behandlungszeit kommt.

Hiermit lässt sich zeigen, dass es durch beide Hemmstoffe zu einer Expression von ATF4 und Induktion der Signalkaskade ihrer Targets kommt. Der Hemmstoff Quinalizarin scheint in HepG2- Zellen durch die Hemmung der CK2, Apoptose über den Signalweg des ER- Stresses auszulösen, was eine vermehrte Expression von ATF4 und ihrer Targets bewirkt. TBB scheint ebenfalls die Expression von ATF4 und deren Target zu fördern. Die Induktion von Apoptose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und auch der Nachweis von Stress am endoplasmatischen Retikulum ist nicht mit Sicherheit zu belegen. Es stellt sich also die Frage, wie viele weitere Signalwege in Tumorzellen zur Expression von ATF4 führen und wo sich entscheidet, welche Folge die Induktion von ATF4 hat.



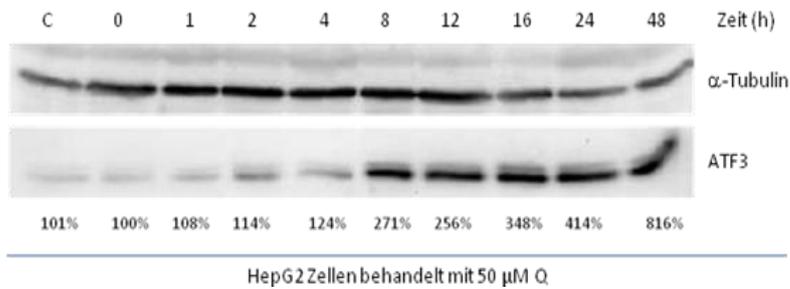


Abb. 20: Western Blot von HepG2- Zellen nach der Behandlung mit TBB (50 μM), Quinalizarin (50 μM) oder DMSO (50 μM) als Kontrolle (C). Nach 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden erfolgte das Ernten und Lysieren der Zellen. Anschließend wurden die Proteine über ein 12,5%iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF- Membran transferiert. Dieser Versuch wurde dreifach durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt. Der Nachweis von ATF3 erfolgte mit einem anti- ATF3 Antikörper. Als Ladekontrolle diente ein α -Tubulin- spezifische Antikörper. Zur Berücksichtigung von Schwankungen in der Ladekontrolle wurden die Banden quantifiziert und gegen die Ladekontrolle abgeglichen. Der Nullstundenwert wurde als 100% gewertet.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat sich mit der Auswirkung von zwei unterschiedlichen CK2-Hemmstoffen auf die Induktion von ER- Stress und Einleitung von Apoptose in zwei verschiedenen Tumorzelllinien beschäftigt. Für die Experimente wurden die Cervixkarzinomzellen HeLa und Zellen eines hepatozellulären Karzinoms, HepG2 verwendet. Als Hemmstoff wurde sowohl TBB als auch Quinalizarin genutzt.

TBB (4,5,6,7- Tetrabromobenzotriazol) ist ein seit langem in der Forschung verwendeter ATP/ GTP- kompetitiver Inhibitor der CK2 mit einem K_i - Wert von 50 nM und einem IC_{50} - Wert von 1 μ M und galt zu Beginn dieser Arbeit als sehr spezifisch für die CK2. Dies ist darauf zurück zu führen, dass TBB anfänglich auf 33 Kinasen getestet wurde. Hier zeigte es sich als spezifisch für die CK2 (Sarno et al. 2001). Inzwischen wurde TBB auf über 80 Kinasen getestet und es konnte gezeigt werden, dass es neben der CK2 einige andere Kinasen in gleichem Umfang hemmt (Sarno et al. 2011). Als weiterer Hemmstoff wurde Quinalizarin verwendet. Quinalizarin (1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon) ist ebenfalls ein kompetitiver ATP Hemmstoff und gehört zu den neueren Inhibitoren. Es weist einen K_i - Wert von 50 nM und eine IC_{50} - Wert von 0.11 μ M auf und gilt nach der Testung auf circa 60 Kinasen als CK2-spezifisch (Cozza et al. 2009).

Die ausgewählte Zelllinie HeLa ist eine seit vielen Jahren in Kultur gehaltenen Linie. Die meisten Erkenntnisse, die in den letzten 50 Jahren in der Tumorforschung mit Zellkulturmodellen gewonnen werden konnten, erfolgten in HeLa- Zellen (Masters 2002). In dieser Arbeit sollte ebenfalls mit gut etablierten und bekannten Zellen gearbeitet werden. Im Verlauf der Experimente stellte sich allmählich die Frage, in wie weit sich die Ergebnisse aus den HeLa-Zellen auch auf andere Tumorzellen übertragen ließen. Zum einen da sie bekanntermaßen HPV18 in sich tragen und einige nicht unerhebliche Mutationen besitzen und zum anderen ist es interessant zu wissen, in wie weit die gewonnen Ergebnisse auf andere Tumorzellen übertragen werden können. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit einer weiteren Tumorzelllinie, den HepG2- Zellen, durchgeführt. Sie besitzen einen Chromosomensatz von 50-60 Chromosomen (Papachristou et al. 2013) und traten erstmals 1980 in den Fokus der Forschung (Knowles et al. 1980).

Das Hauptaugenmerk der Experimente bezieht sich auf die Auswirkungen der Hemmung der CK2 im Bezug auf die Auslösung von Stress am endoplasmatischen Retikulum. Dies erfolgte da die CK2 am ER lokalisiert ist (Yamane und Kinselle 2005; Manni et al. 2012; Faust et al.

2001), sie Proteine phosphoryliert, die an das ER gebunden sind (Gruss et al. 1999; Götz et al. 2009; Ampofo et al. 2013; Hosoi et al. 2012) und da wir bereits wissen, dass die Hemmung der CK2 in LNCap- Prostatakarzinomzellen über den ER- Stresssignalweg Apoptose induziert (Hessenauer et al. 2011).

Meine Untersuchungen zur Hemmung der CK2 zeigen, dass es einen zeitlichen Unterschied auf das Ansprechen der Hemmung in beiden Zelllinien auf die Behandlung mit dem jeweiligen Hemmstoff gibt. Bei den Wachstumskurven der HepG2- Zellen zeichnet sich bereits nach 24- 48 Stunden ein deutlich geringeres Wachstum nach Hemmung mit sowohl TBB als auch mit Quinalizarin im Bezug auf die Kontrolle ab. Die Hemmung mit Quinalizarin zeigt in HeLa- Zellen ebenfalls nach 24- 48 Stunden seine Auswirkungen. Im Gegensatz dazu reagieren HeLa- Zellen auf die Hemmung mit TBB erst nach 96 Stunden mit einem kaum verminderten Wachstum. Dieses verzögerte Ansprechen kann mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit, das verzögerte Ansprechen von HeLa- Zellen auf die Behandlung mit TBB zu erklären ist, dass die Zellen die Behandlung beziehungsweise den vermutlich ausgelösten ER- Stress die ersten 3 Tage überwinden und die Zellproliferation aufrecht erhalten können, bevor es zu einer Hemmung der Proliferation kommt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass erst die Akumulation von TBB über einen längeren Zeitraum die benötigte Menge an TBB bereitstellt, um das Zellwachstum zu hemmen.

Bei der Überprüfung der Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit den Hemmstoffen zeigt sich, dass die Behandlung mit Quinalizarin die Viabilität der beiden Zelllinien deutlich herabsetzt, wohingegen TBB lediglich das Zellüberleben von HeLa- Zellen hemmt. Die Viabilität der HepG2- Zellen scheint durch die Behandlung mit TBB sogar verstärkt. Wie wir wissen wird durch TBB die katalytische α - Untereinheit der CK2 gehemmt (Zhao et al. 2013). Erst kürzlich ist eine Arbeit publiziert worden, in der gezeigt werden konnte, dass nicht nur die α - Untereinheiten von CK2, sondern auch die β - Untereinheiten eine eigenständige Funktion aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass die herabgesetzte Expression von CK2 β in Mammakarzinom- Zellen mit der ineffizienten Phosphorylierung und Zellkerntranslokation von Snail1 und Foxc2 korreliert und zur direkten Induktion der Umwandlung von Epithelzellen zu Zellen mit ependymalen Eigenschaften führt (Filhol et al. 2015). Die Funktion von CK2 β in HepG2- Zellen nach Hemmung mit TBB ist bis jetzt noch nicht untersucht. Demnach ist nicht auszuschließen, dass es durch die Hemmung mit TBB in HepG2- Zellen zu einer Veränderung der Funktion und damit zu einer noch nicht bekannten Auswirkung auf das Zellüberleben der HepG2- Zellen über CK2 β kommt. Ein weiterer Aspekt ist die inzwischen bekannte mäßige Selektivität von TBB für die CK2. Es ist bekannt, dass TBB weitere

Kinasen beeinflusst, die ebenfalls an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Zu diesen Kinasen gehören unter anderem MNK1 [MAPK (mitogen-activated protein kinase)-interacting kinase 1], ERK8 (extracellular-signal-regulated kinase 8) und PKD1 (protein kinase D1) (Cozza et al. 2009). Es ist also denkbar, dass durch die Hemmung anderer Kinasen durch TBB die Proliferation der Zellen gefördert werden könnte.

Der Nachweis von Apoptose erfolgte in anderen Tumorzellen bereits nach der Hemmung der CK2 durch die Spaltung von Poly (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP) (Hessenauer et al. 2011). Der Nachweis der PARP- Spaltung gelang sowohl in HepG2- als auch in HeLa- Zellen nach der Hemmung mit Quinalizarin. Somit ist bewiesen, dass die Behandlung mit Quinalizarin zumindest in diesen beiden Tumorzellen zur Induktion von Apoptose führt. Nach der Behandlung mit TBB kann in HepG2- Zellen keine und in HeLa- Zellen nur eine sehr geringe PARP- Spaltung nachgewiesen werden. Der Nachweis des Spaltproduktes von PARP in HeLa- Zellen gelang allerdings nicht nur in den behandelten Zellen, sondern auch in der Kontrolle und dem Nullstundenwert. Apoptose ist ein natürlicher Vorgang zu jeder Zeit in einer Zellkultur, dies würde den Nachweis der PARP- Spaltung in allen Proben der HeLa- Zellen erklären können. Eine von Beginn an vorhandenen PARP- Spaltung ist nur schwer auf die Behandlung mit TBB zurückzuführen. Es scheint also, dass es lediglich durch Quinalizarin, jedoch nicht durch die Behandlung mit TBB zur gesicherten Induktion von Apoptose in den untersuchten Tumorzellen kommt.

Die fehlende Induktion der Apoptose nach der Hemmung der CK2 durch TBB in den gewählten Tumorzellen ist jedoch nicht mit dem Fehlen von Stress am endoplasmatischen Retikulum gleichzusetzen. Die Hemmung der CK2 mit TBB führt über die Aktivierung von PERK zur Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2α (p-eIf2 α) und damit zum allgemeinen Translationsstopp. Der Nachweis von p-eIf2 α gelang in allen vier Versuchsansätzen. Es zeigt sich in beiden Tumorzellen eine variable Expression von p-eIf2 α , wobei es nach Hemmung der CK2 mit Quinalizarin zu einem größeren Anstieg der Proteinmenge kommt. Die Variationen in der Proteinexpression könnten durch die UPR (unfolded protein response) (Abb. 2) erklärt werden. Sich an die Phosphorylierung von eIf2 α anschließend erfolgen der generelle Translationsstopp und die gesteigerte Expression von ATF4. Über einen negativen Feedback- Mechanismus kommt es über GADD34 und PP1 zur Dephosphorylierung von p-eIf2 α (Eizirik et al. 2008). Sollte die Zelle den ER- Stress zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht überwunden haben, kommt es über PERK zur erneuten Phosphorylierung von eIf2 α . Es kommt also im zeitlichen Verlauf zu einer variablen Expression von p-eIf2 α .

Es ist bereits beschrieben worden, dass eine Korrelation zwischen der Phosphorylierung von eIF2 α , dem generellen Translationsstopp und der gesteigerten Expression des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4 (ATF4) in Tumorzellen vorliegt (Ampofo et al. 2013). Des Weiteren fördert ATF4 die Transkription von weiteren Genen, welche das Überleben der Zelle sichern (Schröder und Kaufman 2005). Ein weiteres Beispiel für die weiterhin translatierten Proteine ist ATF3. Die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren konnte in beiden Tumorzelllinien, nach Behandlung mit beiden Hemmstoffen gezeigt werden. Wenn auch die Expression von ATF4 in HeLa- Zellen nach der Behandlung mit TBB gering ausfällt, kann eine repräsentative Proteinmengensteigerung von ATF3 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Induktion der Expression von ATF3 nicht ausschließlich durch die geringe Menge ATF4 erfolgt. ATF3 ist bekanntermaßen an einer Vielfalt zellulärer Vorgänge beteiligt und nicht ein alleiniges Substrat von ATF4. In Mammakarzinomzellen wird ATF3 beispielsweise durch TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) induziert (Gokulnath et al. 2015).

Wie schon anhand der Wachstumskurven und mit dem MTT- Assay gezeigt wurde führt eine Behandlung von HeLa- Zellen zu einer Abnahme der Zellzahl nach über 96 Stunden. Darunter kommt es durch induzierten Stress am endoplasmatischen Retikulum zu einer gesteigerten Expression von ATF4 und ATF3. Der Nachweis von Apoptose, die PARP- Spaltung, gelingt allerdings nur in sehr geringem Umfang. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es durch die Hemmung der CK2 mit TBB in HeLa- Zellen zum Auslösen von ER- Stress mit Stressüberwindung zumindest in den ersten 48 Stunden kommt. Die Abnahme der Zellzahl nach 96 Stunden könnte ein Hinweis darauf sein, dass die HeLa- Zellen nach mehreren Tagen nicht mehr in der Lage sind, den Stress zu überwinden. Da ein Nachweis der PARP- Spaltung nur bis 48 Stunden erfolgt ist, könnte man spekulieren, dass es zu späteren Zeitpunkten zu einer signifikanten PARP- Spaltung kommt.

HeLa- Zellen, die mit Quinalizarin behandelt werden, zeigen eine deutliche Abnahme der Zellzahl bereits nach 24- 48 Stunden nach Behandlungsbeginn, auch der MTT- Assay zeigt eine deutliche Verringerung der Viabilität der behandelten Tumorzellen gegenüber den Kontrollzellen. Der Nachweis von p-eIF2 α , ATF4, ATF3 und PARP- Spaltung lässt darauf schließen, dass es über die Hemmung der CK2 zur Induktion von ER- Stress mit nachfolgender Einleitung von Apoptose aufgrund des unüberwindbaren ER- Stresses der Zellen kommt. Daraus lässt sich schließen, dass es in ein und derselben Zelllinie durch zwei verschiedene Inhibitoren der CK2 zu unterschiedlichen Effekten kommt. Daraus ergab sich natürlich die Frage, ob diese Beobachtung auch für eine andere Tumorzelllinie zutrifft.

Die Hemmung der CK2 mit TBB in HepG2- Zellen führte zu einer Abnahme der Zellzahl in der Wachstumskurve, jedoch zu einer im Bezug auf die Kontrollzellen gesteigerten Viabilität. Es erfolgte der Nachweis von Stress am endoplasmatischen Retikulum und der Expression von ATF4 und ATF3. Apoptose kann jedoch auch für HepG2- Zellen nach Behandlung mit TBB zumindest in den ersten 72 Stunden ausgeschlossen werden, da ein Nachweis der PARP-Spaltung nicht gelang. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen den ER- Stress überwinden können. Die Abnahme der Zellzahl in der Wachstumskurve könnte auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen sein. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TBB in beiden Tumorzelllinien eher ungeeignet ist, Zellen über die Einleitung des ER- Stresses in die Apoptose zu treiben.

Quinalizarin hingegen scheint in der Lage zu sein, über die Hemmung der CK2 und Induktion von Stress am ER, den Signalweg von ATF4 bis hin zu Apoptose in HepG2- Zellen in Gang zu setzen. Bereits nach 24- 48 Stunden kann eine Verringerung des Zellwachstums in der Wachstumskurve verzeichnet werden und auch die Viabilität wird im Vergleich zur Kontrollgruppe herabgesetzt.

Die Unterschiede in den Ergebnissen bieten mehrere mögliche Ansätze für Erklärungen. Neben den oben bereits aufgeführten Möglichkeiten der Induktion von multiplen Kinasen durch TBB mit ihren schwer überschaubaren Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen und der eigenständigen Funktion der CK2 β könnten in den unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Resistenzen gegenüber Pharmaka existieren (multidrug resistance) und eine unterschiedliche Bioverfügbarkeit der Hemmstoffe gegen CK2 vorliegen.

Die „multidrug resistance“ ist eines der Hauptprobleme in der Zytostatikatherapie von Tumoren in der Medizin. Sie ist auf die Heterogenität, genetische Instabilität und den Erwerb verschiedener Mutationen von Tumorzellen zurück zu führen (Flashner-Abramson et al. 2015). Das „multidrug resistance protein“ (MDR) gehört zu den ATP binding cassette Transportern (ABC- Transportern) und ist ein physiologisch in Leber, Niere oder Dünndarm vorkommendes Protein, das an der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten beteiligt ist. MDR ist in der Lage, eine Vielzahl an chemischen Substanzen direkt in der Zellmembran abzufangen und wieder hinauszubefördern (Schmidt und Lang 2007). Die Therapieresistenz gegenüber Infektionen und von verschiedenen Tumoren sind mit dem MDR assoziiert. In Tumoren führt die Überexpression dieses Transporters zur vermehrten Resistenz gegenüber verschiedener Therapeutika (McCormick et al. 2015). Es ist durchaus denkbar, dass sowohl HeLa- als auch HepG2- Zellen einen Großteil des Wirkstoffes TBB direkt wieder ausscheiden und die Konzentration, die in die Zelle gelangt, lediglich Stress am endoplasmatischen Retikulum bewirkt

und zur Auslösung der Apoptose nicht ausreicht. Daher ist es für zukünftige Experimente dringend erforderlich, diese Frage zu untersuchen.

Eine andere schon seit vielen Jahren bekannte Problematik ist die Sicherstellung der Bioverfügbarkeit eines Stoffes. Die Bioverfügbarkeit ist von zwei Faktoren abhängig: der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik. Die Pharmakokinetik beinhaltet die Aufnahme, die Verteilung, den Metabolismus und das Ausscheiden einer Substanz. Die Pharmakodynamik beschreibt die Bindung und den Effekt der Substanz auf die molekulare Zielstruktur. Vor allem um die Problematik der Verteilung und den Metabolismus zu umgehen, beschäftigen sich verschiedene Labore schon seit längerem mit der Herstellung von Medikamenten- bestückten Nanopartikeln. Sie können mit spezifischen Liganden versehen werden, um den Transport zum Zielmolekül zu gewährleisten. Neben einem verbesserten Transport des verwendeten Medikaments zum Zielort wird auch verhindert, dass die Substanz vor Erreichen des Zielortes bereits abgebaut wird oder nur eine geringe Menge des Ausgangwertes das Zielmolekül erreicht (Auffinger et al. 2013; Ahmed et al. 2015). Des Weiteren werden die Wirkungen der Substanz bei direktem Transport zum Zielort auf den restlichen Organismus verringert. In wie weit TBB oder Quinalizarin durch HeLa- und HepG2- Zellen verstoffwechselt werden, das heißt wie viel des Ausgangwertes der Substanzen letztendlich ins Zellinnere gelangen, wurde nicht getestet. Demnach ist auch dies ein möglicher Grund für das Fehlen der Induktion der Apoptose nach Hemmung der CK2 mit TBB in den ersten 48 Stunden nach Behandlung.

Zusammenfassend konnte in der vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass in HeLa- und in HepG2- Zellen die Hemmung der Proteinkinase CK2 mit TBB und Quinalizarin zur Induktion von ER- Stress führt, es jedoch einen gravierenden Unterschied in den Auswirkungen von ER- Stress bezogen auf das Zellüberleben gibt. Beide Zelllinien scheinen in der Lage zu sein, den durch TBB induzierten ER- Stress zu überwinden, wohingegen der mit Quinalizarin ausgelöste Stress die Apoptose zu induzieren scheint.

Ein wichtiger Punkt, der in weiteren Experimenten geklärt werden sollte, ist, in wie weit die Induktion der Apoptose in Tumorzellen mit spezifischen Hemmstoffen der CK2 auf verschiedenen Tumorzelllinien übertragbar ist. Ein seit einiger Zeit verwendeter und sehr spezifischer Hemmstoff der CK2 ist CX-4945 (Silmisartib) (Battistutta et al. 2011). Er befindet sich bereits in einer klinischen Studie Phase I/II in Kombination mit Gemcitabine und Cisplatin zu Behandlung eines Cholangiokarzinoms (Registrienummer: NCT02128282). Durch die Spezifität dieses Hemmstoffes sollten die Auswirkungen, die er auf eine Zelle hat, auf die Hem-

mung der CK2 zurückzuführen sein. Sollte CX-4945 in der Lage sein, in HeLa- und in HepG2- Zellen über ER- Stress Apoptose zu induzieren, könnte gezeigt werden, dass die unspezifische Hemmung von mehreren Kinase durch TBB ein ausschlaggebender Grund für die fehlende Induktion von Apoptose ist. Auch sollte die Funktion von CK2 β nach Hemmung von CK2 durch einen spezifischen Hemmstoff untersucht werden, denn es scheint, dass sie eine nicht unerhebliche Funktion in intrazellulären Vorgängen spielt.

Sollte es gelingen, Apoptose in verschiedenen Tumorzellen mit spezifischen Hemmstoffen der CK2, wie beispielsweise CX-4945, zu induzieren und sollte es sich zeigen, dass es in normalen Zellen nicht zur Apoptoseinduktion durch die Hemmung der CK2 kommt, so wie es unsere Arbeitsgruppe bereits an ARPE-19- Zellen zeigen konnte (Intemann et al. 2014), scheint es, dass mit der Entdeckung der CK2 als Zielmolekül für die Tumorthherapie ein Meilenstein in der Behandlung vieler erkrankter Menschen gelungen ist.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Bücher

Campbell NA; Reece JB: Biologie. Pearson Studium ein Imprint der Pearson Education Deutschland GmbH München; 8. Auflage 2009

Renz- Polster H; Krautzig S: Basislehrbuch Innere Medizin. Urban und Fischer ein Imprint der Elsevier GmbH, München; 4. Auflage 2008

Schmidt RF; Lang F: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 30. Auflage 2007

Skloot R: The Immortal Life of Henrietta Lacks. Crown McMillian, New York; 1. Auflage 2012

Stauber M; Weyerstahl T: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2. Auflage 2005

7.2 Internetseiten

http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf?ua=1

RKI. Krebs in Deutschland 2009/10. 2013; Available from: http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/kreb_in_deutschland_2013.pdf;jsessionid=46DBFE3D158B3FAC7325A798CA3A803F.2_cid37?_blob=publicationFile.

7.3 Journals

Ahmed OA; Hosny KM; Al-Sawahli MM; Fahmy UA. (2015): Optimization of caseinate-coated simvastatin-zein nanoparticles: improved bioavailability and modified release characteristics. In: Drug Des Devel Ther. 9:655-662.

Ameri K; Harris AL. (2008): Activating transcription factor 4. In: Int J Biochem Cell Biol. 40:14-21.

Ampofo E; Sokolowsky T; Götz C; Montenarh M. (2013): Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. In: Biochim Biophys Acta. 1833:439-451.

Apopa PL; He X; Ma Q. (2008): Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. In: *J Biochem Mol Toxicol.* 22:63-76.

Auffinger B; Morshed R; Tobias A; Cheng Y; Ahmed AU; Lesniak MS. (2013): Drug-Loaded Nanoparticle Systems And Adult Stem Cells: A Potential Marriage For The Treatment Of Malignant Glioma? In: *Oncotarget.* 4:378-396.

Bachhuber T; Almaça J; Aldehni F; Mehta A; Amaral MD; Schreiber R; Kunzelmann K. (2008): Regulation of the epithelial Na⁺ channel by the protein kinase CK2. In: *J Biol Chem.* 283:13225-13232.

Bao Q; Shi Y. (2007): Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. In: *Cell Death. Differ.* 14:56-65.

Battistutta R; Cozza G; Pierre F; Papinutto E; Lolli G; Sarno S; O'Brien SE; Siddiqui-Jain A; Haddach M; Anderes K; Ryckman DM; Meggio F; Pinna LA. (2011): Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer. In: *Biochemistry.* 50:8478-8488.

Benbrook DM; Jones NC. (1990): Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. In: *Oncogene.* 5:295-302.

Bréchet A; Fache MP; Brachet A; Ferracci G; Baude A; Irondelle M; Pereira S; Leterrier C; Dargent B. (2008): Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. In: *J Cell Biol.* 183:1101-1114.

Brodsky JL. (2007): The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). In: *Biochem J.* 404:353-363.

Brush MH; Weiser DC; Shenolikar S. (2003): Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. In: *Mol Cell Biol.* 23:1292-1303.

Bulleid NJ; Freedman RB. (1988): Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. In: *Nature.* 335:649-651.

Burnett G; Kennedy EP. (1954): The enzymatic phosphorylation of proteins. In: *J Biol Chem.* 211:969-980

- Castillo JJ; Furman M; Winer ES. (2012): CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. In: *Expert Opin Investig Drugs*. 21:15-22.
- Chantalat L; Leroy D; Filhol O; Nueda A; Benitez MJ; Chambaz EM; Cochet C; Dideberg O. (1999): Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. In: *EMBO J*. 18:2930-2940.
- Charriaut-Marlangue C; Otani S; Creuzet C; Ben-Ari Y; Loeb J. (1991): Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10232-10236.
- Connor JH; Weiser DC; Li S; Hallenbeck JM; Shenolikar S. (2001): Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. In: *Mol Cell Biol*. 21:6841-6850.
- Cozza G; Mazzorana M; Papinutto E; Bain J; Elliott M; di Maira G; Gianoncelli A; Pagano MA; Sarno S; Ruzzene M; Battistutta R; Meggio F; Moro S; Zagotto G; Pinna LA. (2009): Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2. In: *Biochem J*. 421:387-395.
- Deshiere A; Duchemin-Pelletier E; Spreux E; Ciais D; Forcet C; Cochet C; Filhol O. (2011): Regulation of epithelial to mesenchymal transition: CK2beta on stage. In: *Mol Cell Biochem*. 356:11-20.
- Dominguez I; Degano IR; Chea K; Cha J; Toselli P; Seldin DC. (2011): CK2alpha is essential for embryonic morphogenesis. In: *Mol Cell Biochem*. 356:209-216.
- Durzyńska J; Barton E. (2014): IGF expression in HPV-related and HPV-unrelated human cancer cells. In: *Oncol Rep* 32:893-900.
- Edelman AM; Blumenthal DK; Krebs EG. (1987): Protein serine/threonine kinases. In: *Annu Rev Biochem*. 56:567-613.
- Eizirik DL; Cardozo AK; Cnop M. (2008): The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. In: *Endocr Rev*. 29:42-61.
- Ellgaard L; Helenius A. (2003): Quality control in the endoplasmic reticulum. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:181-191.
- Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicol Pathol*. 35:495-516.

- Escalier D; Silvius D; Xu X. (2003): Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha': failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. In: *Mol Reprod Dev.* 66:190-201.
- Faust M; Jung M; Günther J; Zimmermann R; Montenarh M. (2001): Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus. In: *Mol Cell Biochem.* 227:73-80.
- Faust M; Günther J; Morgenstern E; Montenarh M; Götz C. (2002): Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes. In: *Cell Mol Life Sci.* 59:2155-2164.
- Faust RA; Gapany M; Tristani P; Davis A; Adams GL; Ahmed K. (1996): Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation. In: *Cancer Lett.* 101:31-35.
- Filhol O; Giacosa S; Wallez Y; Cochet C. (2015): Protein kinase CK2 in breast cancer: the CK2 β regulatory subunit takes center stage in epithelial plasticity. In: *Cell Mol Life Sci.* doi 10.1007/s00018-015-1929-8.
- Flashner-Abramson E; Klein S; Mullin G; Shoshan E; Song R; Shir A; Langut Y; Bar-Eli M; Reuveni H; Levitzki A. (2015): Targeting melanoma with NT157 by blocking Stat3 and IGF1R signaling. In: *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2015.229.
- Gey GO; Coffman WD; Kubicek MT. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. In: *Cancer Res.* 12:264-265
- Gokulnath M; Partridge NC; Selvamurugan N. (2015): Runx2, a target gene for activating transcription factor-3 in human breast cancer cells. In: *Tumour Biol.* 36:1923-1931.
- Götz C. (2009): Die Proteinkinase CK2 als pharmakologisches Zielmolekül. In: *Magazin Forschung* 1/2009 Universität des Saarlandes
- Götz C; Müller A; Montenarh M; Zimmermann R; Dudek J. (2009): The ER-membrane-resident Hsp40 ERj1 is a novel substrate for protein kinase CK2. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 388:637-642.
- Gruss OJ; Feick P; Frank R; Dobberstein B. (1999): Phosphorylation of components of the ER translocation site. In: *Eur J Biochem.* 260:785-793.

- Guerra B; Siemer S; Boldyreff B; Issinger OG. (1999): Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. In: FEBS Lett. 462:353-357.
- Harding HP; Novoa I; Zhang Y; Zeng H; Wek R; Schapira M; Ron D. (2000): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. In: Mol Cell. 6:1099-1108.
- Harding HP; Zhang Y; Zeng H; Novoa I; Lu PD; Calton M; Sadri N; Yun C; Popko B; Paules R; Stojdl DF; Bell JC; Hettmann T; Leiden JM; Ron D. (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. In: Mol Cell. 11:619-633.
- Hessenauer A; Schneider CC; Götz C; Montenarh M. (2011): CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response. In: Cell Signal. 23:145-151.
- Hinnebusch AG. (1993): Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. In: Mol Microbiol. 10:215-223.
- Hiwatashi Y; Kanno K; Takasaki C; Goryo K; Sato T; Torii S; Sogawa K; Yasumoto K. (2011): PHD1 interacts with ATF4 and negatively regulates its transcriptional activity without prolyl hydroxylation. In: Exp Cell Res. 317:2789-2799.
- Hosoi T; Korematsu K; Horie N; Suezawa T; Okuma Y; Nomura Y; Ozawa K. (2012): Inhibition of casein kinase 2 modulates XBP1-GRP78 arm of unfolded protein responses in cultured glial cells. In: PLoS One. 7:e40144.
- Intemann, J; Saidu, NEB; Schwind L; Montenarh, M. (2014): ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945. In: Cell Signal 26:1567-1575.
- Jiang HY; Wek SA; McGrath BC; Lu D; Hai T; Harding HP; Wang X; Ron D; Cavener DR; Wek RC. (2004): Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. In: Mol Cell Biol. 24:1365-1377.
- Juhl C; Mörl K; Beck-Sickinger AG. (2011): Adiponectin receptor 1 interacts with both subunits of protein kinase CK2. In: Mol Cell Biochem. 356:185-189.
- Kimura R; Matsuki N. (2008): Protein kinase CK2 modulates synaptic plasticity by modification of synaptic NMDA receptors in the hippocampus. In: J Physiol. 586:3195-3206.
- Kischkel FC; Hellbardt S; Behrmann I; Germer M; Pawlita M; Krammer PH; Peter ME. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: EMBO J. 14:5579-5588.

- Knowles BB; Howe CC; Aden DP. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. In: *Science*. 209:497-499.
- Köditz J; Nesper J; Wottawa M; Stiehl DP; Camenisch G; Franke C; Myllyharju J; Wenger RH; Katschinski DM. (2007): Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. In: *Blood*. 110:3610-3617.
- Kojima E; Takeuchi A; Haneda M; Yagi A; Hasegawa T; Yamaki K; Takeda K; Akira S; Shimokata K; Isobe K. (2003): The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. In: *FASEB J*. 17:1573-1575.
- Kornfeld R; Kornfeld S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. In: *Annu Rev Biochem*. 54:631-664.
- Kraemer PM; Deaven LL; Crissman HA; Steinkamp JA; Petersen DF. (1974): On the nature of heteroploidy. In: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 38:133-144.
- Krammer PH. (1998): The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. In: *Toxicol. Lett*. 102-103:131-137
- Kurokawa M; Kornbluth S. (2009): Caspases and kinases in a death grip. In: *Cell* 138:838-854.
- Landesman-Bollag E; Romieu-Mourez R; Song DH; Sonenshein GE; Cardiff RD; Seldin DC. (2001): Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. In: *Oncogene*. 20:3247-3257.
- Landesman-Bollag E; Belkina A; Hovey B; Connors E; Cox C; Seldin DC (2011): Developmental and growth defects in mice with combined deficiency of CK2 catalytic genes. In: *Mol Cell Biochem*. 356:227-231.
- Laramas M; Pasquier D; Filhol O; Ringeisen F; Descotes JL; Cochet C. (2007): Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. In: *Eur J Cancer*. 43:928-934.
- Lim AC; Tiu SY; Li Q; Qi RZ. (2004): Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2. In: *J Biol Chem*. 279:4433-4439.
- Lu PD; Harding HP; Ron D. (2004): Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. In: *J Cell Biol*. 167:27-33.
- Luz S; Konqsuphol P; Mendes AI; Romeiras F; Sousa M; Schreiber R; Matos P; Jordan P; Mehta A; Amaral MD; Kunzelmann K; Farinha CM. (2011): Contribution of casein kinase 2

and spleen tyrosine kinase to CFTR trafficking and protein kinase A-induced activity. In: *Mol Cell Biol.* 31:4392-4404.

Ma Y; Brewer JW; Diehl JA; Hendershot LM. (2002): Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. In: *J Mol Biol.* 318:1351-1365.

Ma Y; Hendershot LM. (2003): Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. In: *J Biol Chem.* 278:34864-34873.

Manni S; Brancalion A; Tubi LQ; Colpo A; Pavan L; Cabrelle A; Ave E; Zaffino F; Di Maira G; Ruzzene M; Adami F; Zambello R; Pitari MR; Tassone P; Pinna LA; Gurrieri C; Semenzato G; Piazza F. (2012): Protein kinase CK2 protects multiple myeloma cells from ER stress-induced apoptosis and from the cytotoxic effect of HSP90 inhibition through regulation of the unfolded protein response. In: *Clin Cancer Res.* 18:1888-1900.

Marciniak SJ; Ron D. (2006): Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. In: *Physiol Rev.* 86:1133-1149.

Martinou JC; Green DR. (2001): Breaking the mitochondrial barrier. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:63-67.

Masters JR. (2002): HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. In: *Nature Reviews Cancer.* 2:315-319.

McCormick JW; Vogel PD; Wise JG. (2015): Multiple Drug Transport Pathways through human P-Glycoprotein. In: *Biochemistry.* 54:4374-4390

Meng R; Götz C; Montenarh M. (2010): The role of protein kinase CK2 in the regulation of the insulin production of pancreatic islets. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 401:203-206

Meusser B; Hirsch C; Jarosch E; Sommer T. (2005): ERAD: the long road to destruction. In: *Nat Cell Biol.* 7:766-772.

Montenarh M. (2014): Protein kinase CK2 and angiogenesis. In: *Adv Clin Exp Med.* 23:153-158.

Novoa I; Zeng H; Harding HP; Ron D. (2001): Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. In: *J Cell Biol.* 153:1011-1022.

- Novoa I; Zhang Y; Zeng H; Jungreis R; Harding HP; Ron D. (2003): Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. In: *EMBO J.* 22:1180-1187.
- Papachristou F; Chatzaki E; Petrou A; Kougioumtzi I; Katsikogiannis N; Papalambros A; Tripsianis G; Simopoulos C; Tsaroucha AK. (2013): Time course changes of anti- and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity. In: *Chin Med.* 8:9.
- Paramanik V; Thakur MK. (2012): Estrogen receptor beta and its domains interact with casein kinase 2, phosphokinase C and N-myristoylation sites of mitochondrial and nuclear proteins in mouse brain. In: *J Biol Chem.* 287:22305-22316.
- Patil C; Walter P. (2001): Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. In: *Curr Opin Cell Biol.* 13:349-355.
- Pilon M; Römisch K; Quach D; Schekman R. (1998): Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. In: *Mol Biol Cell.* 9:3455-3473.
- Pirot P; Ortis F; Cnop M; Ma Y; Hendershot LM; Eizirik DL; Cardozo AK. (2007): Transcriptional regulation of the endoplasmic reticulum stress gene chop in pancreatic insulin-producing cells. In: *Diabetes.* 56:1069-1077.
- Raleigh DR; Boe DM; Yu D; Weber CR; Marchiando AM; Bradford EM; Wang Y; Wu L; Schneeberger EE; Shen L; Turner JR. (2011): Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. In: *J Cell Biol.* 193:565-585.
- Riedl SJ; Salvesen GS. (2007): The apoptosome: signalling platform of cell death. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:405-413.
- Ron D; Walter P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:519-529.
- Salvi M; Sarno S; Marin O; Meggio F; Itarte E; Pinna LA. (2006): Discrimination between the activity of protein kinase CK2 holoenzyme and its catalytic subunits. In: *FEBS Lett.* 580:3948-3952.
- Sarno S; Reddy H; Meggio F; Ruzzene M; Davies SP; Donella-Deana A; Shugar D; Pinna LA. (2001): Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). In: *FEBS Letters.* 496:44-48.

Sarno S; Papinutto E; Franchin C; Bain J; Elliott M; Meggio F; Kazimierczuk Z; Orzeszko A; Zanotti G; Battistutta R; Pinna LA. (2011): ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update. In: *Curr Top Med Chem*. 11:1340-1351.

Scaffidi C; Fulda S; Srinivasan A; Friesen C; Li F; Tomaselli KJ; Debatin KM; Krammer PH; Peter ME. (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. In: *EMBO J*. 17:1675-1687.

Schneider CC; Ampofo E; Montenarh M. (2012): CK2 regulates ATF4 and CHOP transcription within the cellular stress response signalling pathway. In: *Cell Signal*. 24:1797-1802.

Schröder M; Kaufman RJ. (2005): The mammalian unfolded protein response. In: *Annu Rev Biochem*. 74:739-789.

Seifert U und Klug SJ. (2014): Early detection of cervical cancer in Germany: Evidence and implementation. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 57:294-301.

Shanware NP; Zhan L; Hutchinson JA; Kim SH; Williams LM; Tibbetts RS. (2010): Conserved and distinct modes of CREB/ATF transcription factor regulation by PP2A/B56gamma and genotoxic stress. In: *PloS One*. 5:e12173

Sprick MR; Weigand MA; Rieser E; Rauch CT; Juo P; Blenis J; Krammer PH; Walczak H. (2000): FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. In: *Immunity*. 12:599-609.

Stone A; Sutherland RL; Musgrove EA. (2012): Inhibitors of cell cycle kinases: recent advances and future prospects as cancer therapeutics. In: *Crit Rev Oncog*. 17:175-198.

Takeuchi K; Ito F. (2011): Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. In: *Biol Pharm Bull*. 34:1774-1780.

Taylor KM; Hiscox S; Nicholson RI; Hogstrand C; Kille P. (2012): Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. In: *Sci Signal*. 5:ra11

Thome M; Schneider P; Hofmann K; Fickenscher H; Meinel E; Neipel F; Mattmann C; Burns K; Bodmer JL; Schröter M; Scaffidi C; Krammer PH; Peter ME; Tschopp J. (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. In: *Nature*. 386:517-521.

Ubeda M; Habener JF. (2003): CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation. In: *J Biol Chem*. 278:40514-40520.

- Vallejo M; Ron D; Miller CP; Habener JF. (1993): C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 90:4679-4683.
- van Anken E; Braakman I. (2005): Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. In: Crit Rev Biochem Mol Biol. 40:191-228.
- Vattem KM; Wek RC. (2004): Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 101:11269-11274.
- Venerando A; Pagano MA; Tosoni K; Meggio F; Cassidy D; Stobbart M; Pinna LA, Mehta A. (2011): Understanding protein kinase CK2 mis-regulation upon F508del CFTR expression. In: Naunyn Schmiedebers Arch Pharmacol. 384:473-488.
- Vlahopoulos SA; Logotheti S; Mikas D; Giarika A; Gorgoulis V; Zoumpourlis V. (2008): The role of ATF-2 in oncogenesis. In: Bioessays. 30:314-327.
- Wong N; Lai P; Pang E; Leung TW; Lau JW; Johnson PJ. (2000): A comprehensive karyotypic study on human hepatocellular carcinoma by spectral karyotyping. In: Hepatology. 32:1060-1068.
- Xu X; Toselli PA; Russell LD; Seldin DC. (1999): Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. In: Nat Genet. 23:118-121.
- Yamane K; Kinsella TJ. (2005): CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation. In: Cancer Res. 65:4362-4367.
- Zamzami N; Kroemer G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. In: Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:67-71.
- Zhang K; Kaufman RJ. (2006): Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. In: Handb Exp Pharmacol. 69-91.
- Zhang L; Daly RJ. (2012): Targeting the human kinome for cancer therapy: current perspectives. In: Crit Rev Oncog. 17:233-246.
- Zhao T; Jia H; Li L; Zhang G; Zhao M; Cheng Q; Zheng J; Li D. (2013): Inhibition of CK2 enhances UV-triggered apoptotic cell death in lung cancer cell lines. In: Oncol Rep. 30:377-384.

8 Publikation / Danksagung

8.1 Publikation

Ampofo E; **Sokolowsky T**; Götz C; Montenarh M. (2013): Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. In: Biochim Biophys Acta. 1833:439-451

8.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Montenarh, der mir mit der Bereitstellung meines Themas und des Arbeitsplatzes die Möglichkeit gegeben hat, meine fachlichen Kompetenzen zu erweitern und diese Arbeit zu schreiben. Des Weiteren möchte ich mich für seine großartige Unterstützung und sein Vertrauen bedanken, welches er mir während jedem Arbeitsschritt, bis zur Beendigung meiner Dissertation entgegengebracht hat.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch Dr. E. Ampofo zukommen lassen, der mir bei allen theoretischen und praktischen Hürden helfend zur Seite stand und damit maßgeblich daran beteiligt ist, dass ich meine Arbeit abschließen konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die hervorragende Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ebenso wird mir die Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit immer in guter Erinnerung bleiben.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, besonders bei meinem Vater Jürgen und meinem Freund Janis, für ihre stetige Unterstützung und ihren Zuspruch bedanken, womit sie einen wichtigen Beitrag zu dem erfolgreichen Abschluss meines Studiums und dieser Arbeit geleistet haben.