

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Nuklearmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. S. N. Reske

**Transfektion von Tumorzellen mit triplexbildenden
Oligodeoxynukleotiden zur Inhibierung
der Expression von Bcl-2 und Survivin**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

Bülent Polat

Mutlangen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Andreas K. Buck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Flentje

Tag der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	III
1 <i>Einleitung</i>	1
1.1 Lymphome	1
1.2 Triplexbildende Oligodeoxynukleotide (TBO)	2
1.3 Apoptose	5
1.4 Zielsetzung	13
2 <i>Material und Methoden</i>	14
2.1 Triplexbildende Oligodeoxynukleotide (TBO)	14
2.2 Plasmide	17
2.3 Transfektionsreagenzien / Liposome	19
2.4 Zellkulturen	20
2.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	21
2.6 Transfektion	22
2.7 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	24
2.8 Western Blot	25
2.9 Luciferase Assay	28
2.10 Apoptosefärbung	28
2.11 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	29
2.12 Fluoreszenzmikroskopie	30
2.13 Rasterelektronenmikroskopie	30
3 <i>Ergebnisse</i>	31
3.1 Bcl-2 Downregulation an der 3' UTR	31
3.2 Bcl-2 Downregulation an der Promotorregion	41
3.3 Survivin Downregulation und Apoptoseinduktion	57

4	<i>Diskussion</i>	67
4.1	Oligonukleotide in der Tumorthherapie	67
4.2	Liposomale Transfektion	77
5	<i>Zusammenfassung</i>	81
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	83
	<i>Danksagung</i>	102

Abkürzungsverzeichnis

3' UTR	3' untranslatiertes Ende
5' UTR	5' untranslatiertes Ende
AS	Antisense
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B-Zellen Lymphom 2)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserum)
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
nt	Nukleotid
Dox	Doxycyclin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal calf serum (Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
GFP	Green fluorescence protein
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
μ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
ODN	Oligodeoxynukleotid
PBS	Phosphate buffered solution (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pM	Pikomolar
PO	Phosphodiester
PS	Phosphorthioat
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered solution (Tris-Puffer)
TBO	Triplexbildende Oligodeoxynukleotide
TBO-BB	TBO - binding buffer (TBO-Bindungspuffer)

1 Einleitung

1.1 Lymphome

Die Einteilung der Lymphomerkrankungen erfolgt in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Bei letzteren handelt es sich um eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen der Lymphozyten. Zur weiteren Einteilung in die unterschiedlichen Subgruppen dient die 1995 eingeführte REAL (Revised European American Lymphoma) und die neuere, hierauf beruhende WHO-Klassifikation der NHL. Es wird zunächst nach B- oder T- Zell Neoplasien unterschieden. Zusätzlich beeinflussen immunologische sowie genetische Eigenschaften der Tumorzellen deren Einteilung. Des Weiteren kommen unterschiedliche Malignitätsgrade (Grading) sowie eine modifizierte Ann-Arbor-Stadieneinteilung hinzu [60, 90, 116].

Epidemiologisch zeigt sich eine im Verlauf steigende Inzidenz von aktuell ca. 5-10 / 100000 Einwohner sowie eine steigende Mortalität. Therapeutisch sind vor allem Strahlen- und Chemotherapie - angepasst an das jeweilige Erkrankungsstadium - von Bedeutung. Niedriggradige (häufig auch indolente Lymphome genannt) NHL haben einen prinzipiell günstigeren Verlauf, sind aber paradoxerweise seltener kurativ behandelbar (ca. 80% 5-Jahres-Überlebensrate) [66]. Gerade bei jüngeren Patienten sind deshalb neuere Behandlungskonzepte gefragt. Zusätzlich zu Weiterentwicklungen der vorhandenen Chemotherapieprotokolle, oder dem Einsatz von Interferon- α und der Stammzelltransplantation, ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern ein viel versprechender Ansatz, der zurzeit in klinischen Studien erprobt wird. Bei den NHL insbesondere Rituximab, einem selektiven Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD-20, welches auf einem Großteil der Lymphome vom B-Zell-Typ exprimiert wird [91, 102]. Eine Weiterentwicklung des Rituximab stellt der mit einer Strahlenquelle versehene Antikörper dar - Zevalin (^{90}Y - Ibritumomab Tiuxetan) beziehungsweise Bexxar (^{131}I - Tositumomab). Beide werden derzeit in klinischen Studien zur Rezidiv- bzw. auch in der Primärtherapie überprüft [47, 63, 71, 125, 178]. Eine weitere neuartige Strategie zur gezielten Tumorthherapie sind die so genannten Antisense bzw. Triplexbildende – Oligonukleotide. Diese können sequenzspezifisch an die mRNA bzw. DNA binden und somit gezielt die Proteinbiosynthese bestimmter Zielgene inhibieren. Am Beispiel des Bcl-2 Proteins, welches zum Beispiel in follikulären Lymphomen überexprimiert wird, soll gezeigt werden, wie dessen Synthese gezielt gehemmt werden kann. Durch die Inhibierung der

antiapoptotischen, zytoprotektiven Wirkung des Bcl-2 sollen die Tumorzellen nun besser auf die bisherige Therapie ansprechen.

1.2 Triplexbildende Oligodeoxynukleotide

Neue Entwicklungen in der Oligonukleotidtechnologie brachten mehrere Werkzeuge für die *in vivo* Genmanipulation hervor. Oligonukleotide wurden dazu entwickelt um Sequenzspezifisch an DNA (triplexbildende Oligonukleotide), RNA (Antisense oder Ribozyme) oder an Proteine (Aptamer) zu binden [168]. Antisense und Ribozym- Oligonukleotide werden eingesetzt, um mRNA spezifisch zu schädigen bzw. ihre Translation zu verhindern. Der Antisense-Ansatz ist der weitestentwickelte genetisch-therapeutische Ansatz, bei dem inzwischen mehrere Substanzen in der klinischen Erprobung sind [120, 153]. Aptamere werden eingesetzt, um mit Proteinen zu interferieren oder selektiv die Funktion einzelner Proteine zu stimulieren. Oligonukleotide besitzen mehrere Vorzüge um als potentielle Wirkstoffe eingesetzt zu werden: Sie können in großer Menge automatisch synthetisiert werden und es können zahlreiche chemische Modifikationen, wie die Veränderung des Zuckers, der Basen oder des Phosphodiester-Rückgrates, zur *in vivo* Stabilitätserhöhung oder zur Verbesserung Bindungseigenschaften durchgeführt werden.

Triplex bildende Oligonukleotide (TBO) besitzen die Eigenschaft mit doppelsträngiger DNA eine Tripelhelix auszubilden. Dies möchte man sich v. a. in der Gentherapie zunutze machen, denn es eröffnet sich die Möglichkeit, gezielt Gene in ihrer Expression zu beeinflussen. Ein weiterer Vorzug der TBO ist im Vergleich zu Antisense bzw. Ribozyme, dass prinzipiell nur 2 Zielstrukturen, nämlich die entsprechenden DNA-Abschnitte auf den beiden Chromatiden, und nicht tausende von mRNA Transkripte vorliegen. Die TBO sind nicht nur in der Lage, die Transkription eines Gens zu hemmen, sondern auch Mutationen oder eine Sensibilisierung bezüglich homologer Rekombination auszulösen [82, 165, 166, 168].

Tripel-helikale Nukleinsäuren wurden erstmals 1957 durch Felsenfeld und Mitarbeiter entdeckt [42]. Sie konnten eine stabile und spezifische Bindung eines Einzelstrang Polyuridin Oligonukleotids an eine Doppelstrang Polyuridin / Polyadenosin DNA nachweisen. Die Tripelhelix (Triplex)-Bildung entsteht, wenn ein RNA oder DNA-Oligonukleotid an einen DNA-Abschnitt bindet, der aus Homopurinen besteht. Die Bindung erfolgt spezifisch in der „Major Groove“ (Hauptfurche) der DNA, wobei so genannte Hoogsteen- (parallel, d.h. in 5'-3'-Richtung) oder reverse Hoogsteen-

(antiparallel, d.h. in 3'-5'-Richtung) Bindungen zwischen den Basen des purinreichen DNA-Stranges und des TBO ausgebildet werden [16].

Seit dem ersten Strukturmodell 1957 mittels Röntgenstrukturanalyse [42] wurden zahlreiche weitere Analysen, wie Elektrophorese, Affinitätsstudien, enzymatische Aufschlüsselung, Infrarot-Spektroskopie, Röntgen-Strukturanalysen und Magnetresonanz-Untersuchungen der Triplex-Struktur durchgeführt [44]. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Bindung an zwei „Motiven“ erfolgt, dem Purin – Motiv und dem Pyrimidin – Motiv.

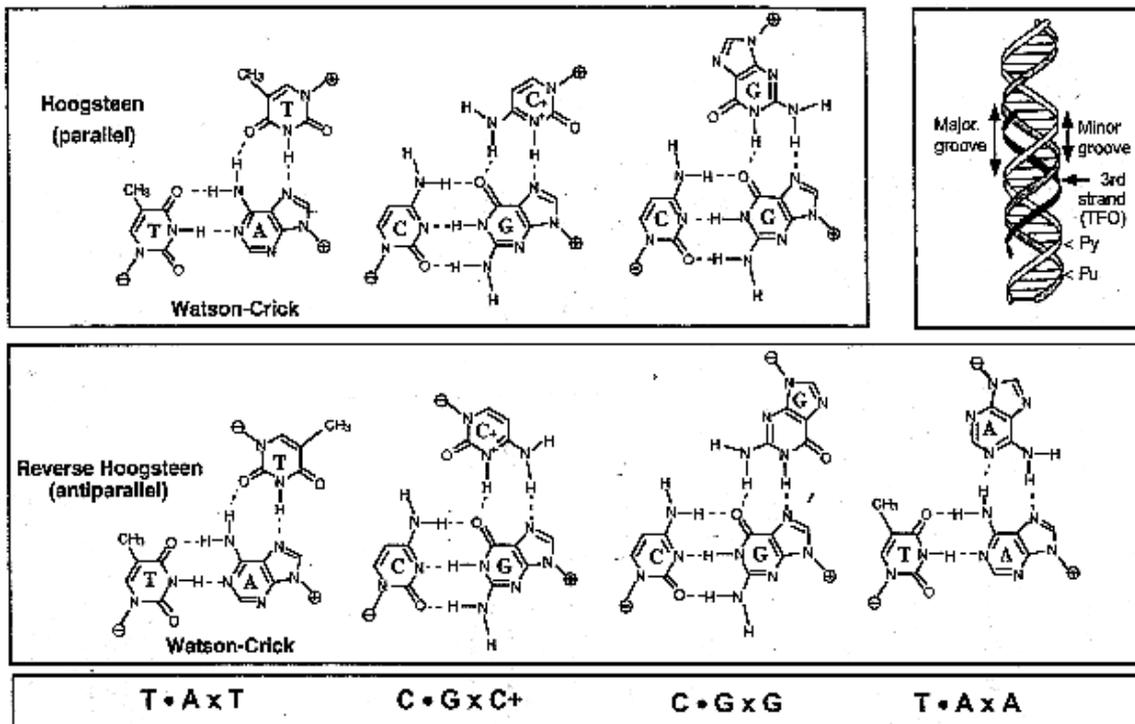


Abb. 1 Darstellung der Triplexbildung (mit „x“ symbolisiert) über Hoogsteen-Bindungen and die Basen der Doppelstrang DNA. TBO-Strukturmodelle modifiziert nach Frank-Kamenetskii und Mirkin 1995, Chan und Glazer 1997, Knauert und Glazer 2001, Vasquez und Wilson 1998. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Beim Pyrimidin-Motiv bindet ein Cytosin (C) oder ein Thymin (T) über eine Hoogsteen-Bindung parallel an den purinreichen DNA-Strang. Das Thymin des dritten Stranges bindet an ein Adenin (A), also $T * A - T$, protoniertes Cytosin (C^+) bindet an Guanin (G), entsprechend $C^+ * G - C$ [43, 92, 113]. Die Protonierung an N^3 ist notwendig, um eine regelrechte Hoogsteen-Bindung am N^7 des Guanins des Doppelstrangs zu bilden. Dies geschieht aber nur unter sauren Bedingungen. Wegen dieser Einschränkung binden Pyrimidin-Oligonukleotide normalerweise nicht an die DNA bei physiologischem pH-Wert. Um dies zu umgehen, müssen spezielle Modifikationen am Cytosin vorgenommen werden [145].

Beim Purin-Motiv bindet das TFO, bestehend aus Adenin (A), Guanin (G) und Thymin (T), antiparallel über reverse Hoogsteen-Bindung an den purinreichen DNA-Strang. Folgende Triplex-Bildungen kommen hierbei vor: A * A – T, G * G – C und T * A – T [9].

Die Purin-basierten Triplexe benötigen keine Basenprotonierungen und sind daher in der Lage weitgehend pH - unabhängig Triplexe auszubilden, müssen allerdings einen hohen Guaninanteil (> 65%) enthalten, um stabile Bindungen auszubilden [21]. Sowohl Purin- als auch Pyrimidin-Motive werden durch das Vorhandensein von zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) und natürlich vorkommenden Polyaminen wie Spermin, Spermidin und Putrescin in ihrer Triplex-Bindung stabilisiert [42, 58, 155]. Eine weitere Möglichkeit die Triplexe zu stabilisieren, ist das Anbringen von unspezifischen DNA-bindenden Substanzen an die TBOs. Die hierdurch vorliegende freie Bindungsenergie erlaubt die Bindung an kurzen Polypurin-Sequenzen oder an Abschnitte mit mehreren fehlerhaften DNA-Bindungen. Zusätzlich könnten diese Substanzen die Resistenz gegenüber Nukleasen erhöhen, die zelluläre Aufnahme verbessern und die intrazelluläre Lokalisation begünstigen [16]. An TBOs gekoppelte interkalierende Substanzen, wie Acridin oder Oxazolopyridocarbazol [114] verbessern die Bindung an kurzen oder sogar fehlerhaften Oligonukleotiden, indem sie sich an Purin/Pyrimidin und an Triplex/Duplex Übergängen einlagern. Oligonukleotide, die mit Polyaminen endkonjugiert sind, bilden ebenfalls stabile Triplexe, selbst bei Abwesenheit von freien Polyaminen oder Kationen aus, wahrscheinlich durch die hohe lokale Polyaminkonzentration [162]. Psoralen, eine photoreaktive, interkalierende kreuz - vernetzende Substanz, erhöht die Triplex-Bildung, wenn es an TBO gebunden ist und lagert sich zwischen einem Adenin und Thymin ($5' TpA^{3'}$ bzw. $5' ApT^{3'}$) ein. Wird es nun langwelligem UV-Licht ausgesetzt, kommt es zu einer kovalenten Quervernetzung der Tripelhelix [46].

1.2.1 Anwendungen der TBO

Da die TBOs sequenzspezifisch an die DNA binden, versucht man gezielt an bestimmten Sequenzen Mutationen und Spaltungen zu induzieren, die Transkription zu inhibieren oder Rekombinationen auszulösen. An TBO gebundenes EDTA-Fe kann sequenzspezifisch das Schneiden an der entsprechenden DNA induzieren [113].

Zahlreiche Forschergruppen befassen sich mit der Inhibition der Transkription von klinisch relevanten Genen durch TBOs, die an die Promotorregion binden. Die *in vitro*

Transkriptionshemmung wurde erstmals 1988 bei c-myc von Cooney et al. gezeigt und wurde seither auch bei anderen Genen wiederholt [25, 85, 99, 182]. Zur Erklärung dieses „Antigen“-Effekts wurden mehrere Modelle vorgeschlagen. Einige Experimente konnten durch die Ausbildung einer Triplex-Struktur an einem regulierenden Genabschnitt die Transkriptionsinitiation blockieren, indem sie beispielsweise das Binden des Transkriptionsfaktors SP1 [100, 104, 105], der Bakteriophagen T7-Polymerase [146], von NFκB [147], des Progesteronrezeptors [69] verhindern oder indem sie mit der Formation des Initiationskomplexes interagieren [39]. Alternativ kann die Triplexbildung innerhalb der zu transkribierenden DNA die Elongation behindern [182]. Eine weitere Möglichkeit könnte in einer Konformationsänderung der DNA liegen, was eine normale Transkription behindern würde [61].

Der Triplex – vermittelte Ansatz wurde bei zahlreichen Genen, die in einem klinisch relevanten Zusammenhang stehen, angewandt. Um die Auswirkungen der TBOs auf die Gen-Expression in Zellen zu untersuchen, wurden diese an vorgefertigte Konstrukte (z.B. Plasmide), vor oder nach deren Transfektion in die Zielzellen, gebunden [39, 85]. Oder sie waren gegen chromosomale Ziele, wie integriertes HIV [108], c-myc [128, 156], HER2/neu [127], Interleukin 2 – Rezeptor [124], EGF – Rezeptor [122], Aldehyddehydrogenase [161], TNF [6] und „multi drug resistance, mdr“ [142]. Im Mittel zeigten diese Studien eine 50 – 90%ige Reduktion der mRNA bzw. der Proteinmenge des Zielgenes.

Die Kinetik der Transkriptionshemmung variiert in Abhängigkeit von der Bindungsstärke, dem Einsatz von nukleasefesten Oligonukleotiden, dem Bindungsmotiv, dem Einsatz von stabilitätsverbessernden Substanzen und weiteren Faktoren.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass eine effektive Gen – Inhibierung erreichbar ist und dass sie eine signifikante Verbesserung gegenüber der klassischen Antisense-Strategie, aufgrund der geringeren Anzahl der Angriffspunkte, bedeutet.

1.3 Apoptose

Unter Apoptose (griech.: „Herabfallen“ der Blätter im Herbst) versteht man den programmierten Zelltod. Bei mehrzelligen Organismen spielt er eine wichtige Rolle während der Entwicklung und dient zur Aufrechterhaltung der Gewebe – Homöostase. Aber auch bei einer Vielzahl von Krankheiten kommt es sowohl zu einer abnormen Zu- als auch Abnahme der Apoptoserate, was in einem vermehrten Absterben bzw. in einem verlängerten Überleben der Zellen resultiert. Vor allem bei malignen Erkrankungen wurde

in vielen verschiedenen Krebszellen eine reduzierte Apoptoserate festgestellt [77]. Das Gegenteil, das vorzeitige Absterben von Zellen tritt v. a. bei degenerativen, viralen oder chron. entzündlichen Erkrankungen auf [136].

1972 wurde von Kerr et al. Apoptose als ein Vorgang, der ein bestimmtes morphologisches Verlaufsmuster aufweist, beschrieben und grenzten ihn vom bisher bekannten Zelltod aufgrund unspezifischer Schädigungen, der Nekrose, ab. Während der Apoptose beobachtet man Zytoplasmakondensation, Chromatinaggregation, eine Segmentation des Zellkerns sowie das Auftreten von Membranausstülpungen, sog. Membranblebs. Zuletzt kommt es zur Bildung von Membran umgebenen, kondensiertes Chromatin enthaltenden „apoptotic bodies“, die der Apoptose ihren Namen verliehen. Diese werden dann von Zellen phagozytiert, ohne dass hierbei eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird [77]. Durch dieses Vorgehen ist der Organismus in der Lage, einzelne Zellen spezifisch zu eliminieren.

1.3.1 Caspasen

Caspasen sind die Hauptakteure der Apoptose. Sie gehören einer Familie von genetisch konservierten Cysteinproteasen an, die in unterschiedlichen Organismen mehrere homologe Domänen aufweisen [13, 20, 37]. Bisher hat man bei Menschen und Mäusen 14 dieser Caspasen identifiziert. Sie liegen als inaktive Proteine im Zytoplasma vor und können, z.B. rezeptorvermittelt (APO 1 / Fas / CD 95), durch Proteolyse aktiviert werden und initiieren ihrerseits mittels bestimmter Mechanismen eine Kaskade von weiteren Caspasen [7, 140].

Funktionell kann man die Caspasen in Initiator- und Effektorcaspasen einteilen [141]. In ihrem aktiven Zentrum findet sich die Aminosäure Cystein und die proteolytische Spaltung erfolgt nach der Aminosäure Asparagin (Asp – X). Die spezifische Substraterkennung wird durch 4 charakteristische Abschnitte am amino-terminalen Ende des zu spaltenden Proteins erreicht [158].

Durch diese Aktivierung der nachfolgenden Caspase entstehen zwei Untereinheiten, eine größere ca. 20 kD, und eine kleinere ca. 10 kD schwere Untereinheit. Zur Bildung eines funktionierenden Enzyms ist eine Heterodimerisierung von zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, die jeweils zwei aktive Zentren pro Untereinheit aufweisen, notwendig [28, 157].

Ca. 100 Substrate für Caspasen wurden mittlerweile entdeckt und es werden sicherlich noch weitere folgen [37, 119]. 1980 wurde von Wyllie [179] diejenige Nuklease entdeckt,

die für die Entstehung der DNA-Leiter verantwortlich ist. Er hat herausgefunden, dass diese Nuklease die DNA zwischen den Nukleosomen schneidet und so die bekannten Fragmente der Länge von 180 – 200 Basenpaaren erzeugt. Wang und Nagata konnten schließlich nachweisen, dass besagte Nuklease (CAD, Caspase aktivierte DNase) in einer inaktiven Form, gebunden an eine inhibierende Einheit (ICAD), bereits im Zellkern vorliegt. Indem Caspase 3 die inhibierende Untereinheit ICAD abspaltet, wird das katalytische Zentrum von CAD freigelegt und somit aktiviert [40, 97, 118, 139].

Ebenfalls tragen Caspasen zu den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen bei. So wird z.B. durch Spalten von Kern-Laminen das Schrumpfen des Zellkerns und der Verlust der Zellform wahrscheinlich durch Zerstörung von Strukturproteinen wie Fodrin und Gelsolin bewirkt [14, 131]. Das Blebbing wird vermutlich durch die Spaltung von PAK2, einem Mitglied der von p21 aktivierten Kinase – Familie, vermittelt [84].

1.3.2 Der Apoptoseweg

Molekularbiologisch gesehen gibt es zwei Hauptwege der Apoptose, einen extrinsischen (rezeptorvermittelten) und einen intrinsischen (mitochondrialen) Weg [62]. Diese sind jedoch durch gegenseitige Wechselwirkungen eng miteinander verbunden. Beide haben eine gemeinsame Endstrecke und münden über Caspase-3 in zuvor beschriebenem Zelluntergang. Zu Beginn des extrinsischen Weges steht die rezeptorvermittelte Aktivierung von Caspase 8, beim intrinsischen Weg Caspase 9 [57, 73, 88, 164]. Abbildung 2 zeigt eine vereinfachte graphische Übersicht über den Ablauf der Apoptose.

Mittels eines transmembranären Rezeptors, auch „Todesrezeptor“ genannt, aus der Familie der TNF-Rezeptoren, z.B. CD 95/Fas, wird über Signal vermittelnde Proteine wie FADD (Fas – associated death domain) Caspase 8 aktiviert [19, 117]. Die Aktivierung von Caspase 9 wurde bereits oben beschrieben.

Beide Wege konvergieren auf Höhe von Caspase 3 und münden in eine gemeinsame Endstrecke, die ebenfalls nach fest vorgeschriebenem Muster zum Untergang der Zelle führt. Die einzelnen Schritte der Apoptose können durch unterschiedliche Mechanismen direkt oder indirekt reguliert werden. So können z.B. Caspase 3 und 9 durch Mitglieder der IAP-Familie (Inhibitor of Apoptosis Protein) blockiert werden [36, 89]. Andererseits kann die Wirkung der IAPs wiederum durch Smac/DIABLO, welches zeitgleich zu Cytochrom c aus den Mitochondrien ausgeschleust wird, gehemmt werden [15, 35].

Wechselwirkung zwischen dem ex- und intrinsischen Weg ist z.B. durch Bid möglich. Caspase 8 vermittelte Spaltung von Bid steigert dessen proapoptotische Eigenschaften und

bewirkt die Translokation an die Mitochondrienmembran. Hier sorgt es für die Freisetzung von Cytochrom c, was die Aktivierung von Caspase 9 zur Folge hat [55, 181].

Proteine, die unmittelbar die Aktivierung der in- und extrinsischen Caspasen beeinflussen, kommen in Form von Familien vor, die anhand gemeinsamer AS-Sequenzen bzw. struktureller Ähnlichkeit identifiziert werden können. Interaktionen zwischen diesen Proteinen werden häufig über Domänen vermittelt, die direkt die Apoptose beeinflussen. Diese sind: CARD (caspase-associated recruitment domain), DD (death domain), DED (death effector domain), BH (bcl-2 homology domain der Bcl-2 Familie), IAP (baculovirus inhibitor of apoptosis proteins), BIR (repeat domains der IAP Familie) und NB-ARC Domäne, der Nukleotid-bindenden Oligomerisationsdomäne der CED-4/Apaf-1 Proteinfamilie [136].

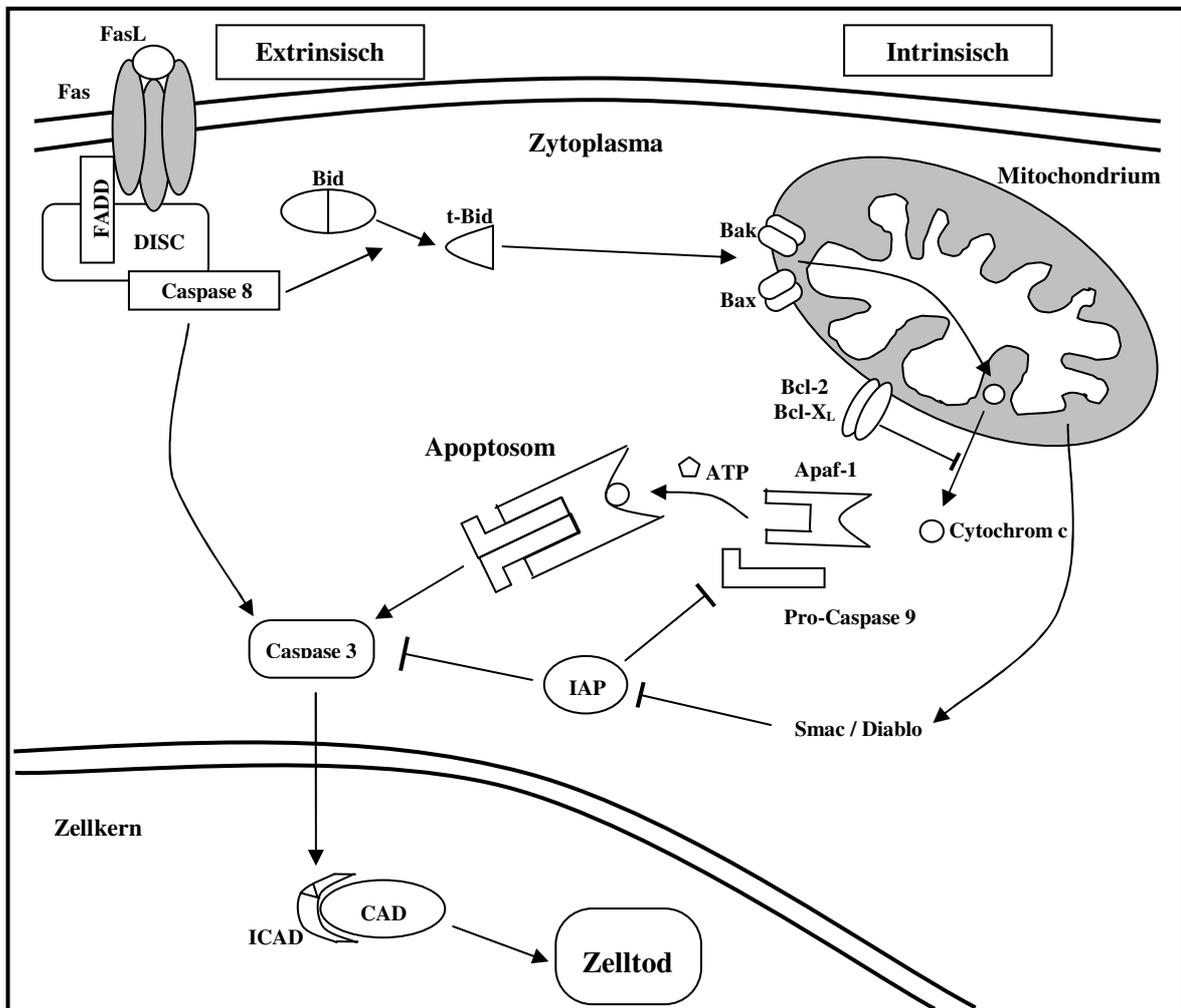


Abb. 2 Dargestellt sind die verschiedenen exemplarisch aufgeführten Akteure des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges. FasL: Fas – Ligand, FADD: Fas Associated Death Domain, DISC: Death Inducing Signalling Complex, t-Bid: truncated Bid, IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins, CAD: Caspase Activated DNase, ICAD: Inhibitor of CAD, Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1. Pfeile: —| hemmende, → stimulierende Wirkung. Modifiziert nach Hengartner 2000 und D’Amelio 2007 [29, 62].

1.3.3 Bcl-2 Proteinfamilie

Der mitochondriale Apoptoseweg wird hauptsächlich durch Mitglieder der Bcl-2 Familie kontrolliert, an deren Spitze das Bcl-2 Protein steht. Bei Menschen umfasst die Genfamilie ca. 20 Mitglieder, die sowohl anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-W und Boo/Diva) als auch pro-apoptotische (Bax, Bak, Bok/Mtd, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-X_S, APR/Noxa, p193, Bcl-G, Nip 3 und Nix/BNIP) Eigenschaften besitzen. Einige dieser Gene besitzen zwei oder mehrere Genprodukte (alternatives Spleißen), die zum Teil entgegengesetzte Wirkungen aufweisen. Des Weiteren können die selben Proteine proapoptotische oder anti-apoptotische Wirkung besitzen, je nach dem, welche äußeren Bedingungen vorliegen [18, 70, 109, 148]. Das relative Verhältnis unter den pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen entscheidet über die Empfänglichkeit bzw. Resistenz der Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli, wie Mangel an Wachstumsfaktoren / Neurotrophinen, Hypoxie, Strahlung, Chemotherapeutika, oxidativen Stress oder Ca²⁺-Überschuss.

Die Proteine der Bcl-2 Familie haben sich während der Evolution nur gering verändert. Sie sind in Säugetieren, Fischen, Vögel, Amphibien und Invertebraten wie *C. elegans*, *Drosophila* oder in marinen Schwämmen zu finden. Die meisten Proteine sind aneinander gebunden und bilden Homo- oder Heterodimere. Sie haben bis zu vier homologe Domänen innerhalb ihrer AS-Sequenz, die mit BH 1 – 4 bezeichnet wurden und entsprechen α -Helices [1, 54, 75, 132, 133, 135]. Viele der antiapoptotischen Mitglieder weisen konservierte Sequenzen in allen vier Domänen auf, wo hingegen proapoptotische Proteine häufig nur geringe Gemeinsamkeiten in der ersten α -Helix (BH4) besitzen. Die entscheidende Todes-Domäne der pro-apoptotischen Mitglieder ist die BH3 Domäne. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass es proapoptotische Proteine gibt, die nur in der BH3 Domäne übereinstimmen.

Die meisten pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteine liegen in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor so lange keine apoptotischen Reize vorliegen. Anti-apoptotische Mitglieder sind zunächst in Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum oder in der Kernmembran integriert [30, 65, 86, 186]. Im Gegensatz hierzu finden sich pro-apoptotische Proteine im Cytosol und am Zytoskelett [53, 67, 130].

Wird nun die Apoptose eingeleitet, kommt es zu einer Konformationsänderung, die es den pro-apoptotischen Proteinen ermöglicht, sich Membranen, v. a. an die äußere Mitochondrienmembran, anzulagern. Ein wichtiger Schlüsselpunkt dieses Apoptoseweges stellt das Verhältnis von Bax (pro-apoptotisch) zu Bcl-2 (anti-apoptotisch) dar, welches bei

Überwiegen der pro-apoptotischen Seite folgende Konsequenzen nach sich zieht: Mitochondriale Dysfunktion mit anschließender Aktivierung von Caspase 9. Mitochondriale Dysfunktion beinhaltet eine Änderung des Membranpotentials, Entstehen von „reaktiven Sauerstoff-Spezies“ (ROS), Öffnen der „Permeabilitäts Transitions Pore“ (PTP) und die Freisetzung von Cytochrom c, einem intermembranären Protein. Freiliegendes Cytochrom c bewirkt, wie bereits zuvor beschrieben, das Binden und Aktivieren von Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1), welches nun die Aktivierung von Caspase 9 bewirkt und folglich die Apoptose fortleitet [54].

Bcl-2 stellt den Prototyp der Apoptoseinhibierung dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen während einer Radio- bzw. Chemotherapie [134, 149]. Das Genprodukt ist ein ca. 25 kDa schweres Protein, welches an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und bei unterschiedlichen Tumorentitäten überexprimiert wird.

Das Bcl-2 Proto-onkogen besitzt 3 Exons mit einem nicht-translatierten Exon1. Der Hauptpromotor P1 befindet sich 1386-1423 bp vor dem eigentlichen Translationsstart. Transkripte, die ab dem untergeordneten Promotor P2 (1,3 kbp nach P1) starten, wurden nur in einigen Geweben gefunden [143, 160]. Die bcl-2 Expression wird sowohl auf Höhe der Transkription als auch posttranskriptionell reguliert [59, 106, 180]. Die unkontrollierte Expression resultiert aus der Translokation t(14;18) des bcl-2 Gens in den Immunglobulin Schwerketten-Genlocus (IgH) von Chromosom 18, welches die Transkriptionsaktivität und die posttranskriptionelle Regulation der bcl-2 mRNA im Sinne einer Überexpression verändert [22, 183].

Im transgenen Bcl-2 überexprimierenden Mausmodell konnte eine verlängerte Lebensdauer von B- und T-Zellen gezeigt werden, was zu Lymphomen dieser beiden Zelltypen führte [74].

Bei bcl-2 ^{-/-} „Knockout“ – Mäusen wurde eine starke Involution der B- und T-Zellen bereits kurz nach Geburt festgestellt [169]. Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten die Auswirkungen einer Blockade der bcl-2 Expression in Tumorzellen, vorwiegend durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden. Diese können spezifisch an die bcl-2 mRNA binden und so die Translation der mRNA verhindern. Durch die Antisense – Strategie konnte eine Reduktion von Bcl-2 Protein und eine Proliferationshemmung der Tumorzellen nachgewiesen werden [126, 185, 187]. Diese Daten zeigen, dass das oligonukleotidvermittelte Blockieren der bcl-2 Expression einen interessanten Ansatz darstellt, der zu weiteren Untersuchungen ermutigt.

1.3.4 IAP Proteinfamilie

Unter „Apoptose-inhibierendes Protein“ (IAP) versteht man eine Apoptose – blockierende Proteinfamilie, die wie Bcl-2, genetisch konserviert bei Säugetieren, Insekten und bestimmten Viren vorliegt [33, 89, 110]. Sie enthalten eine charakteristische, ca. 70 AS umfassende Domäne BIR (Baculovirus IAP Repeat). Der Name leitet sich von ihrer Entdeckung durch Miller et al. aus dem Baculovirusgenom ab [11, 27]. Sämtliche Mitglieder dieser Familie enthalten mindestens eine Kopie der BIR-Sequenz, einer Zink-bindenden Einheit, die für die anti-apoptotische Wirkung verantwortlich ist [64, 150, 171]. Viele Mitglieder der IAP Familie weisen aber noch zusätzliche Domänen auf, wie RING Zinkfinger, CARD, Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und möglicherweise eine Nukleotid-bindende Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass IAPs an aktivierte Caspasen binden und diese effektiv hemmen können. Die Caspasen 3, 7 und 9 werden z.B. durch XIAP, cIAP1 und cIAP2 gehemmt [34, 138]. Die ersten beiden BIR-Domänen, BIR1 und BIR2, sind für die Suppression von Effektorcaspasen verantwortlich, BIR3 wird zur Hemmung von Caspase 9 benötigt [32, 152].

IAPs sind selektive Inhibitoren und hemmen vor allem Effektorcaspasen und blockieren die Apoptose auf Höhe der gemeinsamen Endstrecke, d.h. sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Weges.

Survivin ist ein Protein aus der IAP – Familie und wird im Fetus und in häufig vorkommenden Tumoren überexprimiert. Es kommt jedoch in gesunden ruhenden Zellen nicht vor, was es zu einem interessanten neuen Tumormarker macht [2, 8]. In genomischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Survivin eines der wohl tumorspezifischsten Gene darstellt [170]. Survivin ist während des Zellzyklus in der späten G2/M-Phase aktiv und ist an die in Mitose befindlichen Chromosome und an den mitotischen Spindelapparat gebunden. Hier spielt es eine zentrale Rolle in der Vermittlung der regelrechten Chromosomentrennung während der Anaphase und in der abschließenden Zelltrennung [96].

Jedoch exprimieren nicht alle Tumorentitäten Survivin. Niedriggradige Non-Hodgkin-Lymphome weisen kaum Survivin auf [8]. Die Suppression von survivin mittels Antisense oder durch dominant-negative Mutation resultiert in Polyploidie, Aneuploidie und Apoptose [94]. Der Inhibitor der menschlichen IAPs, Smac/DIABLO, kann an viele Mitglieder der IAP-Familie binden und ermöglicht so, einen ungestörten Ablauf der Apoptose [35, 172]. Die entsprechenden Inhibitoren bei Insekten, Reaper, Grim und Hid binden ebenfalls direkt an IAPs und verstärken die Apoptose [52, 173, 175]. Bei *Xenopus*

laevis kann das nukleäre Protein Scythe, Reaper binden und somit die Apoptose modulieren [159]. Wirkstoffe, die die Apoptose beeinflussen, befinden sich mittlerweile in der klinischen Erprobung nachdem Ihre Wirksamkeit im Zell- und Tierversuch nachgewiesen werden konnte. Antisense Oligonukleotide (z.B. Bcl-2, FLIP, Survivin), rekombinantes TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) und klassische gegen Caspasen gerichtete Pharmaka sind drei Beispiele für fortgeschrittene und viel versprechende Therapieansätze [29, 68, 120, 153].

1.4 Zielsetzung

Am Beispiel des folliculären Non-Hodgkin-Lymphoms soll ein neuartiger Therapieansatz etabliert werden. Da die bekannte Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins zur Tumorprogression beiträgt, ist ein Ziel der Arbeit, die Expression mittels der beschriebenen Oligonukleotide zu blockieren. Zusätzlich wurde ein zweites Protein, Survivin, welches ebenfalls antiapoptotische Eigenschaften besitzt, in seiner Biosynthese blockiert, um die Wirksamkeit der spezifischen Inhibierung der Oligonukleotide zu belegen. Zunächst müssen geeignete Zielsequenzen innerhalb der beiden Zielgene identifiziert und dazu passende TBO entwickelt werden. In einem zweiten Schritt soll die spezifische Bindung der TBO nachgewiesen werden und schließlich auch auf Proteinebene die Expressionsrate der beiden Gene untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, die zelluläre Aufnahme der Oligonukleotide zu verbessern. Hierzu werden verschiedene liposomale Transfektionsverfahren etabliert und fluoreszenzmikroskopisch sowie mittels Durchflußzytometrie miteinander verglichen.

Da eine Bcl-2 Überexpression nicht nur in der DOHH₂ Lymphom-Zelllinie vorkommt, wird die Wirksamkeit der TBO sowie der unterschiedlichen Transfektionsmittel an weiteren etablierten Zelllinien aus soliden Tumoren untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Triplexbildende Oligodeoxynukleotide

2.1.1 bcl-2

Innerhalb des humanen bcl-2 Gens findet sich am untranslatierten 3' Ende eine 18 bp lange purin- / pyrimidinreiche Sequenz von +1946 bis +1963. Diese enthält jedoch eine einzelne C – G Unterbrechung. Die TBO, die an der 3' UTR binden wurden mit TFO 1 – 4 bezeichnet. Der Unterschied zwischen den einzelnen TFO liegt zum einen in der Base, die an die C – G Unterbrechung binden soll (TFO 1: T*C – G, TFO 4: C*C – G) und zum anderen an den Endmodifizierungen der TFO, die eine schnelle Degradierung verhindern sollen (TFO 1 und 2: Phosphorthioat- und Amino- Modifizierungen; TFO 4: nur Aminogruppe am 3' Ende, siehe Tabelle 1). Die Kontrolloligonukleotide (INV, SCR, PUR2) wurden kommerziell erworben (Thermo Hybaid, Ulm, Deutschland). Ihre Sequenz wurde so ausgewählt, dass sie keine Triplexbindung mit der Ziel-DNA eingehen können, bei vergleichbarer Nukleotidzahl und den gleichen Endmodifizierungen. Zur Fluoreszenzmikroskopie und zum FACS wurden die Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (FITC). Alle TBO wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und HPLC aufgereinigt. Die Zielsequenz innerhalb des bcl-2 Gens und die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind in Tabelle 1 dargestellt.

Weitere purin- / pyrimidinreiche Sequenzen befinden sich in der Promotorregion von bcl-2: Target B (-666 bis -647, 20 bp), Target C (-934 bis -916, 19 bp) und Target D (-113 bis -1094, 20 bp). Auch hier findet sich jeweils eine Pyrimidin-Unterbrechung in der Homopurinsequenz. Die TBO, die mit GA bezeichnet wurden, enthalten ein Guanin um an G - C und ein Adenin um an T – A zu binden sowie Thymin oder Cytosin für die T – A Unterbrechung. Die GT –TBO enthalten Guanin für die G – C Bindung, Thymin für A – T und schließlich Thymin oder Cytosin für die Pyrimidinunterbrechung. Das Kontrolloligonukleotid SCR20 enthält die gleichen Basen wie B-GAT20-PO, wobei die Reihenfolge von 4 Nukleotiden ausgetauscht wurde (5' A*AAAATGGGAGGGAGGGAGG*- amino 3'). Alle TBO haben entweder ein durchgängiges Phosphorthioatgerüst (PS) oder weisen dies nur am 5' und 3' – Ende auf, waren dann aber am 3'-Ende mit einer Aminogruppe versehen (PO). Die TBO wurden so konstruiert, dass sie bezüglich dem Purinstrang in antiparalleler Ausrichtung, das heißt sie verlaufen entgegen der 5' – 3' Richtung, binden. Sowohl die TBO als auch die Kontrolloligonukleotide wurden von Thermo Hybaid gekauft und mittels HPLC

aufgereinigt. Die TBO-Sequenzen und die Promotor – Zielsequenz werden in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle1: Sequenzen der TBO und der Ziel –DNA in der 3’UTR von bcl-2

*, Phosphorthioatverbindungen am 5’ und 3’ Ende des TBO; -amino, Aminogruppe am 3’ Ende des TBO

Target DNA	5´	CAGGG CCTCTGTTTCCTTCCTCT ACAGTG	3´
	3´	GTCCC GGAGACAAGGAAGGGAGAT GTCAC	5´
TFO1:	5´	*GGTGT T TTGGTTGGGTGT*-amino	3´
TFO2:	5´	*GGAGAT A AAGGAAGGGAGA*-amino	3´
TFO3:	5´	GGTGT T TTGGTTGGGTGT	3´
TFO4:	5´	GGTGT C TTGGTTGGGTGT-amino	3´
INV	5´	*TACCGTGTGCGACCCTCTTG*-amino	3´
SCR	5´	*GTTATC T CCCGCCACGTGCG*-amino	3´
PUR2	5´	*GTGGTGTGTTTGTGT*-amino	3´

Tabelle 2: Sequenzen der TBO und der Ziel –DNA innerhalb des Promotors von bcl-2

*, Phosphorthioatverbindungen am 5’ und 3’ Ende des TBO; -amino, Aminogruppe am 3’ Ende des TBO

Target B	5´	CCTAA TTTTTACTCCCTCTCCCCC GACTC	3´
	3´	GGATT AAAAATGAGGGAGAGGGGG CTGAG	5´
B-GAT20-PO	5´	*AAAAA T GAGGGAGAGGGGGG*-amino	3´
B-GAT20-PS	5´	AAAAA T GAGGGAGAGGGGGG	3´
B-GAC20-PO	5´	*AAAAA C GAGGGAGAGGGGGG*-amino	3´
B-GAC20-PS	5´	AAAAA C GAGGGAGAGGGGGG	3´
B-GTT20-PO	5´	*TTTTT T GTGGGTGTGGGGGG*-amino	3´
B-GTT20-PS	5´	TTTTT T GTGGGTGTGGGGGG	3´
B-GTC20-PO	5´	*TTTTT C GTGGGTGTGGGGGG*-amino	3´
B-GTC20-PS	5´	TTTTT C GTGGGTGTGGGGGG	3´
B-GA14-PO	5´	*GAGGGAGAGGGGGG*-amino	3´

Target C	5´	TCCCA TCTCCCCTGTCTCTCTCCT GGGGA	3´
	3´	AGGGT AGAGGGGACAGAGAGAGGA CCCCT	5´
C-GAT19-PO	5´	*AGAGGGGA T AGAGAGAGGA*-amino	3´
C-GAC19-PO	5´	*AGAGGGGA C AGAGAGAGGA*-amino	3´
C-GAC19-PS	5´	AGAGGGGA C AGAGAGAGGA	3´
C-GTT19-PO	5´	*TGTGGGGT T TGTGTGTGGT*-amino	3´
C-GTC19-PO	5´	*TGTGGGGT C TGTGTGTGGT*-amino	3´
Target D	5´	CACCA CCTCCTTCTCCCCACCCCTC GCCGC	3´
	3´	GTGGT GGAGGAAGAGGGGTGGGGAG CGGCG	5´
D-GAT20-PO	5´	*GGAGGAAGAGGGG T GGGGAG*-amino	3´
D-GAT20-PS	5´	GGAGGAAGAGGGG T GGGGAG	3´
D-GAC20-PS	5´	GGAGGAAGAGGGG C GGGGAG	3´
D-GTT20-PS	5´	GGTGGTTGTGGGG T GGGGTG	3´
D-GTC20-PS	5´	GGTGGTTGTGGGG C GGGGTG	3´

2.1.2 survivin

Das survivin Gen enthält zwei geeignete Purin- / Pyrimidinabschnitte innerhalb von Intron II (3013 bis 3036, 24 bp und 3077 bis 3099, 23 bp) und zwei weitere Abschnitte im 3'UTR (12263 bis 12286, 24 bp und 12329 bis 12350, 22 bp). Eine Übersicht hierzu findet sich in Tab. 3 bzw. in Abbildung 43. Die entsprechenden TBO, sur4 ,5 und 7, enthalten jeweils 2 (sur4, sur5) bzw. eine (sur7) Pyrimidinbase um an die jeweilige Pyrimidinbase der Doppelstrang – DNA zu binden. Die Kontrolle SCR 24-PS (5'GAGAGAGGAAGGGTGGGATAGAGG 3') besitzt die gleiche Anzahl von Basen, jedoch in vertauschter Reihenfolge wie das TBO sur4-GAT24-PS. Alle TBO weisen ganz oder nur teilweise ein Phosphorthioatgerüst auf. Die Orientierung verläuft wie auch bei den bcl-2 TBO antiparallel zur bindenden DNA – Sequenz. Die Oligonukleotide wurden von Thermo Hybaid hergestellt und mit HPLC aufgereinigt.

Tabelle 3: Sequenzen der TBO und der Ziel –DNA innerhalb von survivin

*, Phosphorthioatverbindungen am 5' und 3' Ende des TBO

Target sur4	5´	GCCG CCCTCCCCTCCCCGTCCTGTCCCC AGCG	3´
	3´	CGGC GGGAGGGGAGGGG <u>CAGGAC</u> CAGGGG TCGC	5´
Sur4-GAT24-PO	5´	*GGGAGGGGAGGGG T AGGA T AGGGG*	3´
Sur4-GAT24-PS	5´	GGGAGGGGAGGGG T AGGA T AGGGG	3´
Sur4-GTT24-PS	5´	GGGTGGGGTGGGG T TGGT T TGGGG	3´
Target sur5	5´	CCGG CCTCCCCTCCCTGCTTTGTCCCC ATCG	3´
	3´	GGCC GGAGGGGAGGGAC <u>GAAAC</u> CAGGGG TAGC	5´
Sur5-GAT23-PO	5´	*GGAGGGGAGGG T GAAA T AGGGG*	3´
Sur5-GAT23-PS	5´	GGAGGGGAGGG T GAAA T AGGGG	3´
Sur5-GTT23-PS	5´	GGTGGGGTGGGT T GTTT T TGGGG	3´
Target sur6	5´	GGCTG CTTCTCTCTCTCTCTCTTTTTT GGGGG	3´
	3´	CCGAC GAAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAA CCCCC	5´
Sur6-GA24-PO	5´	*GAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAA*	3´
Sur6-GA24-PS	5´	GAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAAA	3´
Sur6-GT24-PO	5´	GTTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTTT	3´
Target sur7	3´	GTCCA CTCTTCACTCCCTCCTTCTTCC GTCAC	5´
	5´	CAGGT GAGAAGT <u>GAGGGAGGAAGAAGG</u> CAGTG	3´
Sur7-GAC22-PO	3´	*GAGAAG C GAGGGAGGAAGAAGG*	5´
Sur7-GAC22-PS	3´	GAGAAG C GAGGGAGGAAGAAGG	5´
Sur7-GTC22-PO	3´	GTGTTG C GTGGGTGGTTGTTGG	5´

2.2 Plasmide

2.2.1 pSPT18-bcl2

Das Plasmid pUC19-bcl2, (zur Verfügung gestellt von: Dr. Carlo Croce, Jefferson Cancer Institute, USA) welches das open reading frame (ORF) des bcl2-Gens enthält, wird mit EcoR I verdaut und das gewünschte 0,91 kb lange Fragment isoliert. Der Vektor pSPT18 wird ebenfalls mit EcoR I verdaut und das Fragment mit dem bcl-2 ORF wird eingefügt um das Plasmid pSPT18-bcl2 zu erhalten.

2.2.2 pTRE-bcl2-tri

Die Gesamt-RNA aus DOHH₂-Zellen wurde mittels High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Schweiz) isoliert. Das 3'UTR des bcl-2 Gens, das die TBO-Zielsequenz (+1760 bis +2328, 569 bp) enthält wird mittels reverser Transcriptase Polymerasen Ketten Reaktion (RT-PCR) unter Verwendung von AMV und Tag DNA Polymerase (Gibco BRL) und GeneAmp® PCR System 2400 (PerkinElmer, MA, USA) vervielfältigt. Nach Aufreinigen der PCR Produkte und schneiden mit EcoR I werden sie in das mit EcoR I und Xba I geschnittene Plasmid pSPT18 ligiert und kloniert. Das neue Plasmid heißt nun pSPT-tri. Die Sequenz dieses klonierten 3'UTR wurde mittels Sequenzieren bestätigt. Nun wird das Plasmid pSPT18-bcl2, das den ORF des bcl-2 Proto-onkogens beinhaltet, mit EcoR I linearisiert und mit dem 3'UTR Fragment, das man durch schneiden mit EcoR I und Xba aus pSPT-tri erhält, ligiert. Jetzt wird das ganze 4500 bp lange Fragment nochmals mit Xba verdaut und es kommt durch Selbstligation zum Plasmid pSPT-bcl2-tri. Das insgesamt 1500 bp lange DNA-Stück, welches das bcl-2 ORF und 3'UTR enthält, wird aus pSPT-bcl2-tri herausgeschnitten und in den Vektor pTRE (ClonTech) einkloniert. Das erhaltene Plasmid wird als pTRE-bcl2-tri bezeichnet, und ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

2.2.3 pGEM-T/bcl-2 B

Das Plasmid LB 322 enthält das Luciferase Gen, das unter der Kontrolle des vollständigen bcl-2 Promotors (P1 und P2, 3,9 kb) steht, wurde freundlicherweise von L. M. Boxer (Stanford Universität, Medizinische Fakultät) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollplasmid dient der Luciferase-Vektor pGL2 (6047 bp, Promega, WI, USA) ohne den bcl-2 Promotor. Ein 203 bp Fragment, das als TBO Zielsequenz dient (Target B, -758 bis -567) wird in Plasmid LB 322 ligiert, mit PCR amplifiziert und dann in das Plasmid pGEM-T easy vector (Promega) kloniert und mittels Sequenzierung bestätigt. Das neue Plasmid wird mit pGEM-T/bcl-2 B benannt.

2.2.4 pGEM-T/bcl-2 C

Das Plasmid pGEM-T/bcl-2 C wurde analog zu pGEM-T/bcl-2 B hergestellt. Der Unterschied liegt in dem einklonierten DNA-Fragment (enthält Target C), nämlich -1034 bis -870, 165 bp lang, aus einer anderen Region des bcl-2 Promotors.

2.3 Transfektionsreagenzien / Liposome

Unter einem Liposom kann man sich ein Fettkügelchen vorstellen, das eine spezielle zweischichtige Lipidmembran aufweist und somit der menschlichen Plasmamembran ähnelt. Da die Liposome eine Kugelform ausbilden, kann man gezielt ins Innere der Kugel Substanzen einbringen und es somit als Transportmittel einsetzen. Werden die Liposome nun auf Zelloberflächen gebracht, verschmelzen die Membranen der Zellen und der Liposome miteinander und der Inhalt der Zellen gelangt somit ins Zellinnere.

Unterschiede in der einzelnen Zusammensetzung der Liposomenmembran sowie der Polarität des Liposoms kennzeichnen die von verschiedenen Firmen synthetisch hergestellten Produkte. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung einer Vergleichsstudie nur eine geringe Auswahl unterschiedlicher Liposome eingesetzt und das Liposom mit den besten Transfektionseigenschaften für die weiteren Experimente herausgesucht.

2.3.1 Dosper

Dosper (Roche) ist ein mehrfach kationisches Lipid, das dadurch besonders gut an die äußere Zellmembran – die ja nach außen hin negativ geladen ist – binden soll und im Inneren vorzugsweise negativ geladene Moleküle (z.B. DNA) beherbergen kann. Die chemische Bezeichnung lautet: 1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid mit der Molekülformel: $C_{58}H_{113}O_{13}N_5$.

2.3.2 Effectene

Effectene (Qiagen) ist im Gegensatz zu Dosper ein nicht liposomales Reagenz, das aber aus Lipiden zusammengesetzt ist. Zunächst wird der zu transfizierenden DNA der sogenannte „Enhancer“, dieser kondensiert die TBO auf ein kleines Volumen, hinzugefügt und dann wird Effectene zugegeben. Jetzt kommt es zur Ausbildung von Micellen, die sich um den Komplex aus Enhancer und TBO formieren und die in Größe und Form konstant bleiben. Hierdurch soll eine gesteigerte Transfektionsrate gegenüber den herkömmlichen Liposomen erreicht werden.

2.3.3 FuGene 6

Bei FuGene 6 (Roche) handelt es sich ebenfalls um ein nicht liposomales Transfektionsreagenz, bestehend aus einem Lipidgemisch und weiteren Zusätzen, die vom

Hersteller nicht näher bezeichnet werden. FuGene6 wurde speziell dazu entwickelt, besonders schwer zu transfizierende eukaryote Zelllinien bzw. primäre Zellkulturen mit DNA zu transfizieren, da es laut Hersteller auch in serumhaltigen Medien und bei geringer Zelldichte eingesetzt werden kann. Zusätzlich ist das Protokoll vereinfacht worden, so dass nur noch wenige Schritte erforderlich sind um effiziente Transfektionsraten zu erzielen.

Allen oben genannten Transfektionsmitteln wurde von den Herstellern eine ausgesprochen geringe Zytotoxizität nachgewiesen.

2.4 Zellkulturen

2.4.1 HeLa

Die humane Zervixkarzinom Zelllinie HeLa wurde von ClonTech (CA, USA) erworben. Hierbei handelt es sich um eine „Tet-on“ Zelllinie, die stabil mit dem Plasmid pTET-ON transfiziert wurde [180]. Sie wird in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) kultiviert. An Zusätzen kommen noch 10% fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µg/ml G418 hinzu. Die Zellen werden bei 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.4.2 SK-Mel 28

Zelllinie eines malignen Melanoms. Diese wurde von der American Type Culture Collection (Wesel, Deutschland) kommerziell erworben. Ähnlich wie die HeLa Zelllinie wird auch die Melanomzellen gehalten: Als Medium dient DMEM plus 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen werden bei 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.4.3 DOHH₂

DOHH₂ Zellen entstammen einer humanen B-Zell-Lymphomlinie, die die Translokation t(14; 18) aufweisen und Bcl-2 überexprimieren. Sie wurden 1990 aus einem Patienten mit zentrozytisch / zentroblastischem folliculärem Lymphom entnommen. Die Zelllinie wurde vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) erworben. Folgende Kulturbedingungen sind hierfür erforderlich: RPMI 1640 als Medium und zusätzlich 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Inkubatorbedingungen: 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt. Als einzige Zelllinie handelt es sich bei DOHH₂ um Suspensionszellen.

2.4.4 A 549

Diese Zelllinie wurde 1972 aus einem Patienten mit Bronchialkarzinom etabliert und ebenfalls vom DMSZ erworben. Die Kulturbedingungen sind die gleichen, wie bei 2.4.2 SK-Mel 28 beschrieben.

2.5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

2.5.1 DNA Fragmente (30-200 bp)

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden von Thermo Hybaid (Ulm, Deutschland) synthetisiert und in ddH₂O zu einer Konzentration von 1 pmol/μl aufgelöst. Komplementäre Oligonukleotide werden zu gleichen Teilen in einem Reagenzgefäß auf 75 °C für 10 min erhitzt und dann langsam auf RT abgekühlt. Der so entstandene Doppelstrang wird nun mittels T4 Polynukleotidkinase (Ready-To-Go™ T4 PNK, Amersham Pharmacia Biotech. Inc., NJ, USA) mit dATP (³²P) endmarkiert und schließlich durch eine Sephadex G50 Säule (Micro Spin™ G50 Columns, Amersham Pharmacia Biotech. Inc., NJ, USA) gereinigt. Ungefähr 1 pmol der Duplex-Oligonukleotide werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von spezifischen TBO oder Kontrollen in 10μl TBO-Bindungspuffer (TBO-BB) gemischt und über Nacht oder für mindestens 4 Stunden bei RT inkubiert. Der TBO-BB besteht aus 50 mM MOPS: 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Spermin, pH 7,2. Danach erfolgt die Analyse durch ein nicht denaturierendes 4-20% oder 20%iges Polyacrylamidgel (TBE Gel, Invitrogen, Holland). Um die Triplexen zu stabilisieren wird zusätzlich als Laufpuffer 0,5 x TBM (45mM Tris-Borsäure, 5mM MgCl₂, pH 7,2) eingesetzt. Zum darstellen der Banden werden die Gele an einem Phosphor-Image-Screen (Amersham Pharmacia Biotech) für 20 Minuten bei RT exponiert und dann gescannt (STORM, Molecular Dynamics Inc.).

2.5.2 Plasmid pTRE-bcl-2-tri

Das TBO wird mit dATP (³²P) mittels T4 Polynukleotidkinase wie oben beschrieben markiert. 1,2 pmol von ³²P markiertem TFO2 wird mit unterschiedlichen Konzentrationen des Plasmids vermischt und 6 Stunden bei RT inkubiert. Als Puffer kommt 50 mM MOPS, pH 7,2, 50 mM NaAc, 10 mM MgAc₂ zum Einsatz. Die Triplexausbildung wird dann auf einem 2%igen Agarose-Gel ausgewertet; Laufzeit: 20 min bei 80 V. Laufpuffer: TAE-Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 8,0), das zusätzlich 3 mM MgAc₂ enthält.

2.5.3 Plasmid pGEM-T/bcl-2B

0,6 pmol des radioaktiv (^{32}P) markierten TBO GA20 werden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Plasmids in 10 μl TBO-BB vermischt und bei RT über Nacht inkubiert. Die Proben werden auf einem 4-20%igen nicht denaturierenden Gradienten-Polyacrylamidgel (Invitrogen, Holland) ausgewertet; Laufbedingungen: 2h bei 200V, 0,5xTBM-Puffer (45 mM Tris-Borat, 5 mM MgCl_2). Danach Exponieren des Gels an einem Phosphor image screen für 20 min bei RT und anschließend Scannen des Screens.

2.6 Transfektion

2.6.1 Transfektion mit Dosper

Adhärente Zellen werden am Tag vor der Transfektion in einer 6-well-Platte zu je $1 - 3 \times 10^5$ pro well ausgesät. Etwa 3,0 bis 6,0 μg Einzel- oder Doppelstrang DNA werden mit 500 μl Serum freien Medium DMEM verdünnt. Gleichzeitig wird 6 – 12 μl Dosper (ROCHE) ebenfalls in 500 μl Serum freies Medium verdünnt. Nun werden Liposom und DNA zusammengegeben, vorsichtig geschüttelt und für 30 min bei RT oder 37°C inkubiert. Direkt vor der Transfektion werden die Zellen 2malig mit sterilem, Ca^{2+} und Mg^{2+} freiem PBS gewaschen. Anschließend wird 1 ml der DNA / Liposom-Komplexe auf die Zellen pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 4-6 h bei 37°C wird den einzelnen Platten 1ml serumhaltiges DMEM (20% FCS) hinzugefügt, so dass jedes well ein Gesamtvolumen von 2 ml aufweist. Es folgt eine weitere Inkubationsphase von 24 –96 h bei 37°C .

Die Suspensionszellen (DOHH_2) werden analog zu den adhären Zellen transfiziert. Vor der Transfektion werden die Zellen 1malig mit PBS gewaschen und hoch konzentriert (1×10^7 - 8). Das fertige DNA/Liposom-Gemisch wird dann vorsichtig mit ca. 1×10^6 Zellen vermischt und auf eine 6 well-Platte verteilt. Es folgt wiederum eine Inkubationszeit von 4-6 h mit anschließender Zugabe von 1 ml serumhaltigem Medium (DMEM, 20% FCS).

2.6.2 Transfektion mit Effectene

Am Vortag werden ca. $1-3 \times 10^5$ Zellen pro well einer 6 well Platte ausgesät. Direkt vor der Transfektion erfolgt das Absaugen des Mediums, einmaliges Waschen der Zellen mit PBS und Auffüllen des wells mit serumfreien Medium auf 1,6 ml. Nun folgt das Herstellen der Liposom / TBO-Komplexe indem man 0,4 μg TBO in 100 μl mitgelieferten Puffer

„EC“ gibt. Hinzu kommt nun der unter 2.3.2 erwähnte „Enhancer“, wobei darauf zu achten ist, dass das Verhältnis zwischen TBO und Enhancer bei 1:8 liegen muß. Das Gemisch wird kurz geschüttelt 2-5 min bei RT inkubiert und kurz abzentrifugiert. Jetzt wird noch 10 µl Effectene zugegeben, für 10 Sekunden geschüttelt (Vortexer) und für 5-10 min bei RT inkubiert. Danach wird 0,6 ml serumfreies Medium hinzugegeben, gut vermischt und das ganze tröpfchenweise auf die Zellen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 h gibt man serumhaltiges Medium hinzu, so dass im Gesamtvolumen 10% FCS enthalten sind.

2.6.3 Transfektion mit FuGene 6

Es werden ca. $1-3 \times 10^5$ Zellen pro well einer 6 well Platte am Vortag ausgesät. FuGene6 wird für ca. 10 min bei RT aufgetaut. Man gibt 100 µl serumfreies Medium in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und pipettiert diesem 3-6 µl FuGene6 hinzu ohne jedoch dabei die Gefäßwand zu treffen. Nach leichtem Schütteln gibt man 1-2 µg TBO zu (Maximalvolumen 50 µl), erneutes vorsichtiges schütteln und 15-45 min bei RT inkubieren. Nun wird das Gemisch wieder tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und die 6 well Platte leicht geschwenkt.

2.6.4 Stabile Ko-Transfektion der Plasmide pTRE-bcl-tri und pTK-Hyg

5×10^5 Tet-on (ClonTech) HeLa Zellen, die das Expressionssystem Tet-on enthalten (dieses ist ein von Tet kontrollierter Transkriptionsaktivator (tTA), bestehend aus der Fusion des Wildtyp Tet-Repressor mit der VP16 Aktivierungsdomäne (AD) aus Herpes-Simplex Virus), werden am Vortag pro well einer 6 well Platte aufgetragen. Nach der Kotransfektion der beiden Plasmide (1,3 µg pTRE-bcl-tri, 82 ng pTK-Hyg (ClonTech) und 3 µg Liposom Dosper) und einer Inkubationszeit von 6 h wird das Medium durch serumhaltiges (10% FBS) ersetzt. Nach 24 h werden die Zellen auf 10 cm Schalen transferiert. Nach 72 h wird komplettes Medium mit 300 µg/ml Hygromycin eingesetzt und nach einer Woche werden einzelne Zellkolonien herausgenommen und auf 24 well Platten übertragen, wobei die Hygromycinkonzentration nun 50 µg/ml beträgt. Das Plasmid pTK-Hyg enthält nämlich ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin. Die überlebenden Zellklone werden mit ELISA untersucht und das Ergebnis mittels Western-Blot bestätigt.

2.6.5 Transfektion von präformierten Triplexen

Drei Mikrogramm des Plasmids pTRE-bcl2-tri, welches das 3'UTR enthält, wird mit 4,6 µg Phosphorothioat-Oligonukleotid in TBO-BB bei RT für 2 h inkubiert und anschließend in 500 µl serumfreien Medium DMEM verdünnt. In der Zwischenzeit wird 12 µg des Liposoms (Dosper) ebenfalls in 500 µl serumfreies DMEM zugefügt und dann werden beiden Lösungen miteinander vermischt und 30 min bei RT belassen. Am Vortag wurden bereits 1×10^6 Zellen pro well einer 6 well Platte ausgesät und werden direkt vor Transfektion zwei mal mit Ca^{2+} und Mg^{2+} freiem PBS gewaschen. Nun werden die DNA/Liposom Komplexe auf die einzelnen wells pipettiert –jeweils 1ml pro well. Es folgt eine 6 stündige Inkubation bei 37 °C dann wird 1 ml DMEM (20% FCS, 10 µg/ml Doxycyclin (Dox)) hinzugegeben. Zu bestimmten Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) werden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 200 µl Zell-Lysepuffer (150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 2 mM EDTA und 1% NP-40) aufgelöst. Um die Proteine vor Degradation durch Proteasen zu schützen, wird noch eine Tablette eines Proteasen – Inhibitors (Boehringer Mannheim) in 10 ml Lysepuffer aufgelöst und hinzugegeben. Die Proteinkonzentration wird dann mittels Bradford Methode (BioRad, München) bestimmt. Für den Luciferase-Assay benötigt man 0,1 pmol Plasmid (LB 322 oder pGL2) das mit 200 pmol TBO in TBO-BB über Nacht bei RT inkubiert wird. Als Kontrollprobe wird ein gleiches Volumen H₂O statt den 200 pmol TBO eingesetzt. Die überschüssigen TBO, die nicht an das Plasmid binden konnten, werden mittels Chroma-Spin 100 (ClonTech) verworfen. Die so aufgereinigte DNA mit gebundenen TBO wird in 500 µl serumfreies Medium gegeben und mit parallel hierzu angefertigtem Liposom (in 500 µl serumfreies DMEM) vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT werden die DNA/Liposom-Komplexe auf Zellen, die bereits am Vortag - in analoger Weise wie oben beschrieben - vorbereitet wurden , aufgebracht. Die Zellen werden zunächst 6 h lang bei 37 °C inkubiert und danach mit jeweils 1 ml serumhaltigen Medium (20% FCS) versehen. Nun folgt eine Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C. Die Triplexausbildung wird dann an einem Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory, CA, USA) ausgewertet. Jede Versuchsreihe wurde doppelt angesetzt und dreifach wiederholt.

2.7 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Am Vortag werden ungefähr 1000 Zellen pro well auf eine 96 well Platte aufgetragen. Nach den entsprechenden Versuchen werden die Zellen für 30 min fixiert (20 ml Methanol, 300 µl 30% H₂O₂) und 6 mal mit PBS gewaschen. Nun werden sie mit PBS, das

2% Kaninchenserum und 3% BSA enthält, für 1 h geblockt. Der erste Antikörper wird in PBS (3% BSA) aufgelöst, für 1 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert und anschließend wird 6-mal gewaschen. Der zweite Antikörper wird auf die gleiche Weise wie der erste Antikörper vorbereitet, auf die einzelnen wells gebracht und nach der Inkubationszeit von einer Stunde wird nochmals mehrfach gewaschen. Jetzt wird OPD (o-Phenylendiamin) für 15 min hinzugefügt und die Reaktion mit 50 µl 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die OD – Werte (optical density) werden bei einer Wellenlänge von 492 nm und 650 nm von einem ELISA-Reader bestimmt.

2.8 Western Blot

2.8.1 Proteinextraktion

Die Zellen, die zuvor in Kulturflaschen kultiviert wurden, werden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Danach wird 6-10ml (je nach Probenanzahl) Medium – inaktiviert das Trypsin – dazugegeben und auf eine entsprechende Anzahl von Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) aufgeteilt. Es folgt das Zentrifugieren bei 13000 Upm für 2min. Der Überstand wird verworfen und mit PBS gewaschen. Danach wird der Überstand erneut verworfen und 50 µl Cell Lysis Buffer zugegeben (1 ml aqua dest., 1 Tbl. Proteininhibitor, 9 ml cell lysis buffer), 10 min auf Eis gestellt und zentrifugiert (13 000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird auf Eppendorf-Tubes (1,5ml) verteilt und im Gefrierfach (-80°C) gelagert.

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit der Bradford - Methode am Photometer bestimmt. Zuerst wird eine Standardreihe zur Ermittlung der Eichgeraden erstellt. Hierzu fertigt man eine Proteinverdünnungsreihe (z.B. 1, 2, 4, 6, 8, 10 µg BSA), dem man nur noch 200 µl Protein Assay Lösung (Bio Rad) zugibt und ins Photometer stellt. Die eigenen Proben lässt man auftauen und entnimmt ihnen etwa 1 bis 2 µl und überführt es in ein neues Eppendorf-Röhrchen. Nun gibt man 800 µl H₂O und 200 µl von der Protein Assay Lösung hinzu, vortext das Gemisch vorher kurz nochmal und bestimmt photometrisch die Konzentration in µg / µl. Jetzt muß noch Probenpuffer (SDS –haltig, zum Denaturieren der Proteine) zugegeben werden. Auf 50µl Protein kommt etwa 18µl Probenpuffer. Mischen und dann 5 min auf 100° C (Heizblock) stellen und anschließend kurz abzentrifugieren. Die Proben können nun auch bei RT gelagert werden.

Für die anschließende Gel-Elektrophorese benötigt man ca. 25 – 50 µg Protein pro Linie bei einem Gesamtvolumen von ca. 20 µl. Das Volumen ist so zu wählen, dass überall die gleiche Menge an Protein enthalten ist, damit die einzelnen Banden auch vergleichbar sind.

2.8.3 SDS-PAGE

Das SDS – Polyacrylamidgel besteht aus zwei Anteilen, dem oberen Sammelgel und unteren Trenngel (siehe Tabelle 4), die jeweils unterschiedlich zusammengesetzt sind. Die Proben werden nun bei 180 V für 1h auf dem Gel aufgetrennt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels und der einzelnen Puffer.

Sammelgel, 5%		Trenngel, 9%		Probenpuffer pH 6,8	
Puffer	1.3 ml	Puffer	3.1 ml	Tris 1 M	6.25 ml
30% Acrylamid	0.75 ml	30% Acrylamid	3.6 ml	Glycerol	10g
ddH ₂ O	2.9 ml	ddH ₂ O	5.3 ml	SDS	2.3g
10% APS	50 µl	10% APS	100 µl	β-Mercaptoethanol	5 ml
TEMED	5 µl	TEMED	6 µl		
Puffer für Sammelgel pH 6.8		Puffer für Trenngel pH 8.8		Laufpuffer pH 8.3	
Tris base	6.06 g	Tris base	8.17 g	Tris	0.38 g
SDS	0.4 g	SDS	0.4 g	Glyzin	144.00 g
mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen		mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen		SDS	10.00 g

2.8.4 Immunoblotting

Zunächst bereitet man 3 Schalen, mit folgenden Inhalten vor:

1. Transferpuffer: TBS 38 g, Glycerin 14.4 g, 20% Methanol, 0.02% SDS, pH 8,5, Auffüllen auf 1000 ml mit H₂O,
2. Aqua dest.
3. 20% Methanol

Als nächstes nimmt man 3 zugeschnittene Blotting Papier Stücke legt sie in die erste Schale und dann auf das Transfergerät. Dann nimmt man eine Nylonmembran (Amersham), legt sie schrittweise in die 3 Schalen (von 3. nach 1.) und dann auf das Blotting Papier. Nach durchgeführter Gelelektrophorese nimmt man das Gel aus der Apparatur heraus und legt es auf die Membran. Als letztes legt man drei weitere Blotting Papiere oben auf das Gel und schließt den Deckel des Geräts. Es folgt eine Transferzeit von 30 min bei 100 mA.

Danach blockt man die Membran mit 1% BSA (100 ml TBS) für 30 min, verwirft die Lösung und gibt den 1. Antikörper hinzu. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Morgen folgt 3maliges Waschen der Membran mit Waschpuffer, der TBS und 500 µl Tween 20 enthält. Anschließend gibt man den 2. Antikörper hinzu inkubiert diesen für 1 h und wäscht die Membran erneut wie oben beschrieben.

Die Visualisierung der spezifischen Banden auf der Nylonmembran erfolgt mittels dem Enhanced Chemiluminescence System (ECL, Pierce, Rockford, IL, USA). Danach legt man die Membran in Frischhaltefolie, bringt sie in eine Filmkassette ein und schiebt sie nach ca. 10 – 20 sek Belichtungszeit in die Entwicklermaschine.

2.8.5 Antikörper

2.8.5.1 β -Actin

β -Actin ist ein Protein des Zytoskeletts der Zelle und dient hier als so genanntes „Housekeeping-Protein“ als eine Positivkontrolle, da es von allen untersuchten Zellen exprimiert wird. Zum Einsatz kommt ein 1:5000 verdünnter monoklonaler Mausantikörper gegen Actin (Sigma). Der sekundäre Antikörper ist ein HRP-gekoppelter anti Maus IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 000 (Jackson Immuno Research Laboratories, Newmarket, Suffolk, UK).

2.8.5.2 Bcl-2

Analog zum β -Actin Antikörper, nur dass es sich um einen monoklonalen Mausantikörper gegen Bcl-2 handelt. Es wird derselbe sekundäre Antikörper eingesetzt.

2.8.5.3 Survivin

Der primäre Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Survivin (500 $\mu\text{g/ml}$, Alexis, Schweiz) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wird ein peroxidasekonjugierter sekundärer Ziege anti Kaninchen Antikörper (Sigma Aldrich) in einer Verdünnung von 1:5000 hinzu gegeben und 1 h inkubiert.

2.9 Luciferase Assay

Nach einer Inkubationszeit von 48 h der mit präformierten Triplexe (LB322, s. 2.6.5) transfizierten Zellen, werden diese mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Zum Lysieren der Zellen wird 50 μl cell lysis Puffer (Luciferase Assay System, Promega) in jedes 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Danach wird für 5 min bei 12000 g zentrifugiert und jeweils 20 μl des Überstandes in ein Gefäß mit 50 μl Luciferase Assay Reagenz (Promega) pipettiert. Dann wird es unverzüglich in ein Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) für 10 Sekunden eingebracht. Um eine vergleichbare Proteinmenge zu verwenden, bestimmt man die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben mit der Bradford Methode (Bio-Rad).

2.10 Apoptosefärbung

Annexin V

Eine Methode um Apoptose darzustellen, bedient sich der Eigenschaft, Translokationen, die nur bei der Apoptose stattfinden, nachzuweisen. Phosphatidylserin (PS), das in normalen Zellen an der inneren Plasmamembran lokalisiert ist, wird kurz nach Einleiten der Apoptose an der äußeren Plasmamembran exprimiert und steht nun mit der extrazellulären Umgebung in Kontakt. Da dies ein Vorgang ist, der schon fast zu Beginn der Apoptose stattfindet, kann man mit dieser Methode frühzeitig apoptotische Zellen nachweisen. An der Zelloberfläche befindliches PS kann man mit Annexin V, einem 35.8 kDa großen Protein, das eine hohe Affinität gegenüber PS besitzt, darstellen.

Zunächst werden die Zellen mit gepuffertem Formaldehyd (4%) fixiert, dann mit Tris-gepuffertem NaCl und 0,5% Albumin (TNB-Puffer) geblockt und anschließend wird

biotiniertes Annexin V, 1:30 in TBS aufgelöst, auf die Zellen gegeben. Nach einstündiger Inkubation und 3 Waschschritten wird Streptavidin-PE für eine Stunde hinzugegeben. Die Zellen werden wiederum 3 mal gewaschen und die Zellkerne mit Bisbenzimid gefärbt. Zur FACS - Analyse wird statt Annexin V Annexin V-EGFP verwendet. Die Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion mit TBO trypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. Nun fügt man Annexin V-EGFP (ClonTech) hinzu (2 µg/ml), wartet 15 min, wäscht die Zellen nochmals mit PBS, resuspendiert die Zellen mit 500 µl PBS und wertet mittels FACS das Ergebnis aus.

2.11 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Die FACS Analyse erfolgt am FacsCalibur Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter der Verwendung der CellQuest Software an einem Apple Mackintosh Rechner. Adhärenente Zellen werden nach der entsprechenden Inkubationszeit mit fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. FITC, PI, EGFP) von der Kulturschale mit Trypsin abgelöst, gewaschen und in PBS resuspendiert.

Bei den Suspensionszellen entfällt entsprechend das Trypsinieren. Die Zellen werden direkt mit PBS gewaschen, resuspendiert und in speziellen FACS - Röhrchen ins Gerät gestellt. Für eine Messung werden ca. 100 000 Zellen benötigt.

FacsCalibur verfügt über 2 Laser mit steuerbaren Wellenlängen – je nach verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Zunächst werden Kontrollzellen eingebracht, die für jede Zellart geeigneten Systemparameter eingestellt und in den entsprechenden Kanälen ausgewertet. Im Sidescatter werden die Zellen nach Gehalt der Zellgranula, im Frontscatter nach Größe und im Fluoreszenzkanal nach Intensität des Fluoreszenzsignals aufgetrennt. Pro Messung wurden jeweils 10 000 Zellen ausgewertet. Die Graphische Darstellung der FACS-Ergebnisse erfolgte mittels der Microsoft Excel Software.

2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Um die transfizierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE 300, Düsseldorf) auszuwerten, müssen sie in den Kulturschalen auf entsprechenden Deckgläsern kultiviert werden (ca. 5×10^4 Zellen / well). Da die Fluoreszenz bei normalem Licht schnell an Intensität verliert, muss man darauf achten, zügig und bei abgedunkelten Verhältnissen zu arbeiten. Die Auswertung erfolgt bei 40facher Vergrößerung. Mittels angeschlossener monochromer Digitalkamera können Bilder aufgezeichnet und mit der mitgelieferten Lucia Software nachbearbeitet und archiviert werden.

2.13 Rasterelektronenmikroskopie

Am Vortag wird eine vergleichbare Anzahl von Zellen, wie unter 2.11, auf Deckgläsern kultiviert nach beschriebenem Vorgehen mit TBO/Liposom transfiziert und nach 24 h mit PBS gewaschen und fixiert. Danach wurden die Zellen an die Sektion Elektronenmikroskopie der Universität Ulm weitergegeben. Hier wurden sie mit einer nur wenige Nanometer messenden Schicht aus Platin bedampft. Anschließend legt man die so präparierten Zellen in eine spezielle Halterung in das Rasterelektronenmikroskop. Nach Aufbau eines Vakuums kann man anschließend die Zelloberflächen bildlich darstellen. Zur Dokumentation können die Proben in verschiedenen Vergrößerungen digital fotografiert und elektronisch gespeichert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Down-Regulation der bcl-2 Expression durch triplexbildende Oligonukleotide an der 3' UTR

3.1.1 Triplex – Bildung mit einer Duplex DNA

Die Ausbildung einer Tripelhelix konnte durch den electrophoretic mobility shift assay (EMSA), wie in Abb. 4 dargestellt, nachgewiesen werden. Aufgrund der nun geringeren Ladungsdichte wandern die Triplexe langsamer als die doppelsträngige DNA in der Elektrophorese. In der Abbildung ist beispielhaft der EMSA von TBO2 gezeigt. Man erkennt deutlich, dass bei gleichbleibender DNA-Konzentration die Ausbildung der Triplexstruktur kontinuierlich mit der Konzentrationszunahme der TBO ansteigt. Nach Zugabe eines Kontroll-Oligonukleotides (INV, SCR oder PUR2) lässt sich wie erwartet keine unspezifische Anlagerung an die target DNA nachweisen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Oligonukleotid TFO2 eine besonders stabile Triplexbindung ausbildet. Die k_d (Dissoziationskonstante, TBO-Konzentration, bei der 50% der target DNA eine Triplexbindung aufweist) liegt hier bei ca. 60 μM bei einem physiologischen pH-Wert. TFO1, 3 und 4 bildeten ebenfalls stabile Triplexe mit ähnlichen k_d -Werten aus (Ergebnisse nicht dargestellt).

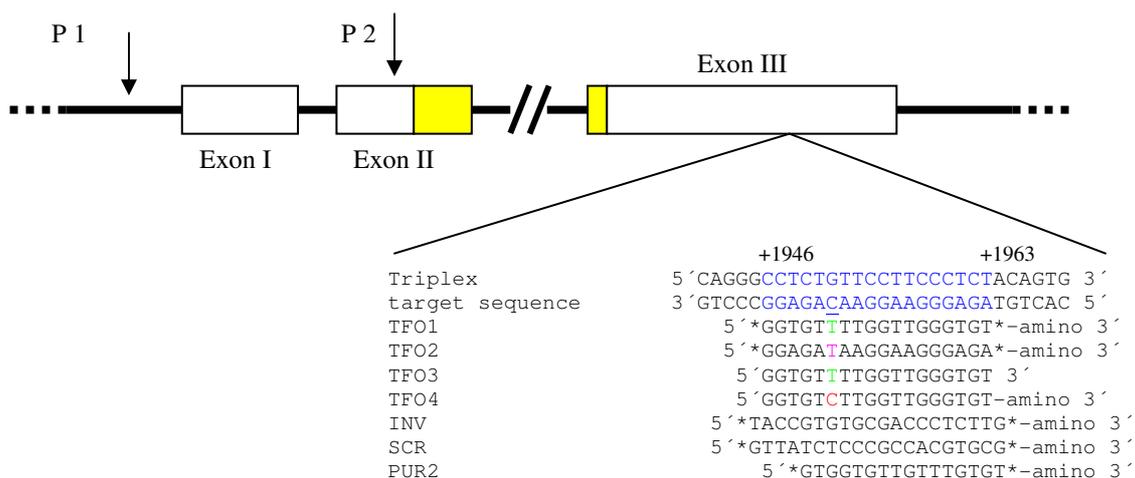


Abb. 3 Schematische Darstellung des humanen bcl-2 Gens (GenBank M13994) und der Sequenzen der Ziel-DNA (18 bp) innerhalb des 3'UTR sowie der entsprechenden TBOs einschließlich Kontrollen.

*, Phosphorthioatmodifizierungen am 5' und 3' Ende des TBO; -amino, Aminogruppe am 3' Ende des TBO; P1, 2, Promotorregion 1 und 2

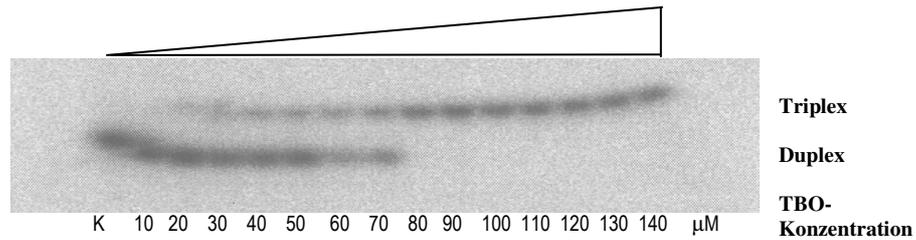


Abb. 4 EMSA zum Nachweis der Tripelhelixbildung eines phosphorthioatmodifizierten TBO (TFO2), welches an der 3'UTR Duplex (29 bp) bindet. Tripelxbildung erfolgte wie oben beschrieben in einem TBO-BB. Duplex-DNA Konzentration lag bei 1 μ M. Die Zahlen unter den einzelnen Banden entsprechen den jeweiligen TFO 2 Konzentrationen. K, Kontrolle = unspezifische Oligonukleotid-Sequenz.

3.1.2 Tet-on Expressions – System

Im Response-Plasmid pTRE-bcl2-tri befindet sich eine 569 bp lange Sequenz aus der 3'UTR, die die gewünschte Zielsequenz beinhaltet. Das 3'UTR Fragment befindet sich zwischen dem bcl-2 ORF (Transkriptionsstart) und dem SV 40 poly A tail (Transkriptionsende). Kontrolliert wird dieses Konstrukt durch einen vorgeschalteten Promotor (P_{hCMV-1}), der ein Tetracyclin-Response-Element (TRE) und $P_{min CMV}$ (weiterer Promotor) enthält. HeLa Zellen, die stabil mit dem Regulations-Plasmid pTet-on transfiziert wurden, exprimieren einen Tet-kontrollierten Transkriptionsaktivator (rtTA), der ein Fusionsprotein aus dem Wildtyp Tet-Repressor (Tet R) und der VP 16 Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus ist. In HeLa Zellen, die zusätzlich mit pTRE-bcl2-tri transfiziert wurden, bindet rtTA nun an das TRE und aktiviert hierdurch die Expression des gewünschten Gens, allerdings nur nach Zugabe von Doxycyclin.

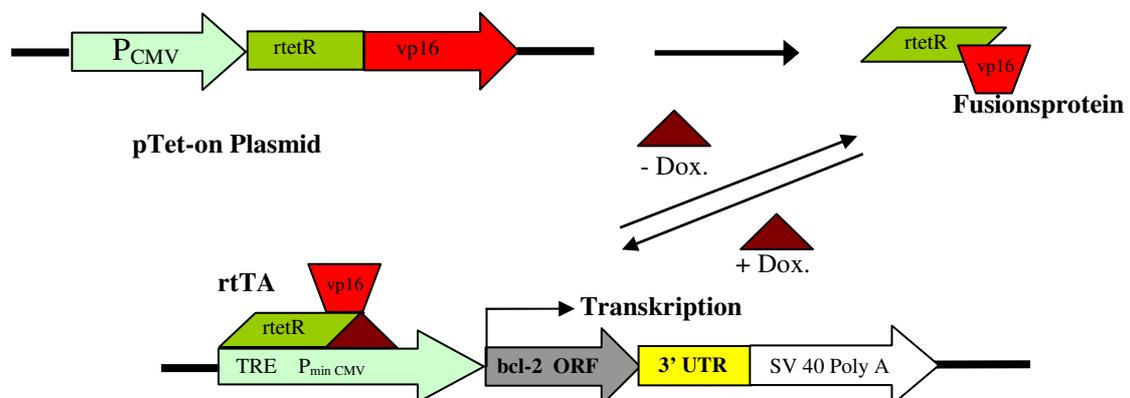


Abb. 5 Darstellung des Tet-on Expressionssystems. Das regulatorische Plasmid pTet-on, das stabil chromosomal integriert wurde, exprimiert Tet-kontrolliert den Transkriptionsaktivator rtTA. Dieser bindet dann in Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) an TRE des Response Plasmid pTRE-bcl2-tri und die eigentliche Transkription kann starten.

3.1.3 Konstruktion des Response Plasmid pTRE-bcl2-tri

Das 569 bp lange nicht translatierte Ende (3' UTR), welches die TBO Bindungsstelle (+1760 bis +2328) enthält, wurde mit RT-PCR amplifiziert. Zuvor wurde die gesamte RNA aus DOHH₂ Lymphomzellen isoliert und anschließend die RT-PCR mit folgendem Primer-Paar durchgeführt: forward 5' TCCAGGGA TGATCAACAGGGTAGT 3' und reverse 5' CAGATCTCTTTATAGTTCCCCACCATG ATT 3'. Das PCR Produkt wurde dann in die EcoR I und Xba I Schnittstellen des Vektors pSPT18 inkloniert. Dieses Plasmid wurde als pSPT-tri bezeichnet. Die Sequenz des klonierten 3' UTR wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid pSPT-bcl2, das den ORF des bcl-2 Proto-Onkogens enthält wurde durch partiellen Enzymverdau mit EcoR I linearisiert und mit dem 3' UTR Fragment aus pSPT-tri ligiert. Nachdem es mit Xba I geschnitten wurde, wurde das nun entstandene 4500 bp lange Fragment mit sich selbst ligiert und wurde als pSPT-bcl2-tri bezeichnet. Das hierin enthaltene 1500 bp lange Fragment mit dem bcl-2 ORF und dem 3' UTR wurde aus pSPT-bcl2-tri herausgeschnitten und in den neuen Vektor pTRE (Clontech) inkloniert. Dieses wurde nun als pTRE-bcl2-tri bezeichnet.

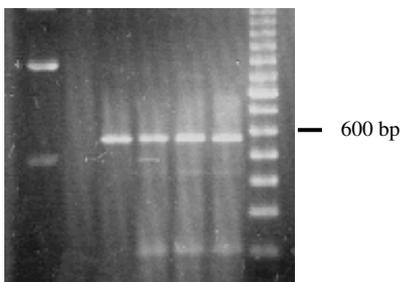


Abb. 6 Amplifikation des 569 bp langen DNA-Fragments des bcl-2 Gens durch RT-PCR. Hier Darstellung der gewünschten Bande in der Gelelektrophorese

3.1.4 Transiente Expression des Plasmids pTRE-bcl2-tri

Es wurden 4,6 mg des Plasmids pTRE-bcl2-tri mit ca. $0,5 \times 10^6$ HeLa Zellen / well unter Verwendung von 6 μ g Dospers (Liposom) transfiziert. Im Zellmedium war jeweils 0,2 μ g / ml Doxycyclin enthalten. Die entsprechenden Kontrollen enthielten kein Doxycyclin. Nach 48 Stunden wurde eine Western-Blot Analyse zur Darstellung des Bcl-2 Proteinlevels durchgeführt. Das Ergebnis bestätigte, dass die Proben mit Doxycyclin eine hohe Bcl-2 Expression und die ohne Doxycyclin nur eine geringe Expression aufwiesen (s. Abb. 7). Somit konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt pTRE-bcl2-tri mit Doxycyclin regulierbar ist und eine Überexpression von Bcl-2 erreicht werden kann.

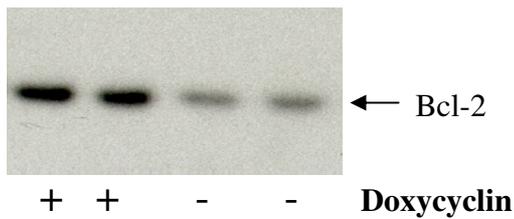


Abb. 7 Transiente Transfektion von pTRE-bcl2-tri in HeLa Zellen (Tet-on). Je nach Zugabe oder Weglassen von Doxycyclin stellt sich eine kräftige bzw. schwache Bande des Bcl-2 Proteins im Western-Blot dar.

3.1.5 Entwicklung einer bcl-2 überexprimierenden Zelllinie

Um die Effekte der gegen bcl-2 gerichteten TBO auf zellulärer Ebene beurteilen zu können, etablierten wir eine Zelllinie, die Bcl-2 überexprimiert indem wir die HeLa Tet-on Zellen stabil mit dem Plasmid pTRE-bcl2-tri transfizierten. Nach der Ko-Transfektion der Plasmide pTRE-bcl2-tri und pTK-Hyg (1,3 µg pTRE-bcl2-tri, 82 ng pTK-Hyg, 3µg Liposom) und doppelter Selektion mit G418 und Hygromycin wurden mittels ELISA und Western-Blot die positiven Zellklone ausgewählt. Zunächst selektierten wir durch ELISA 8 positive Zellklone von insgesamt 30, die sowohl Doxycyclin sensitiv waren als auch Bcl-2 überexprimierten. In einem zweiten Schritt wurden diese acht Zellklone im Western-Blot analysiert und 2 Klone mit der stärksten Bcl-2 Expression ausgewählt. Dann erstellten wir eine Doxycyclin Titrationsreihe und werteten diese nach 48h Inkubation im Western-Blot aus. Hier zeigte sich dass die Zellklone bei einer Konzentration von 1 µg /ml Doxycyclin kräftig Bcl-2 exprimierten.

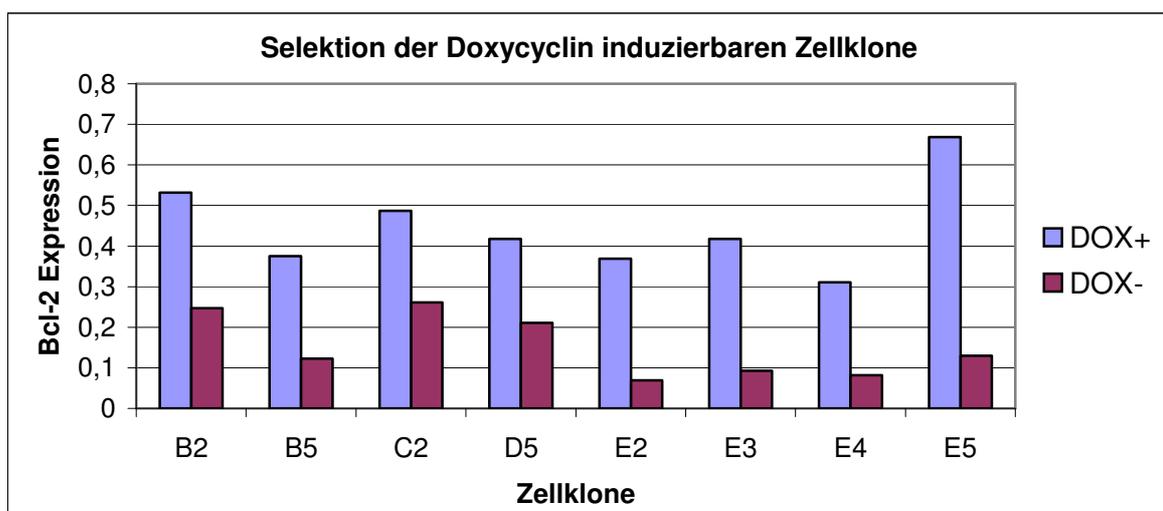


Abb. 8 ELISA Auswertung der Zellklone. Darstellung der Doxycyclin (2µg/ml) induzierbaren Bcl-2 Expression. Verwendung eines monoklonalen Bcl-2 Antikörpers.

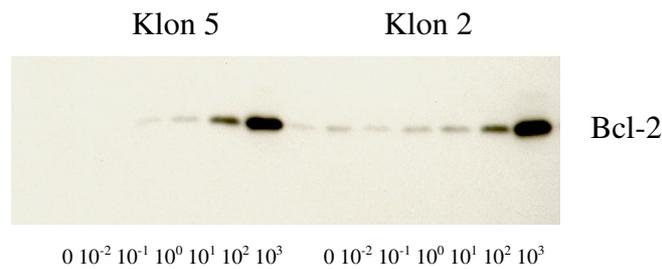


Abb. 9 Selektion der Doxycyclin induzierbaren Bcl-2 überexprimierenden Zellklone im Western-Blot. Die einzelnen Klone wurden jeweils mit unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen behandelt.

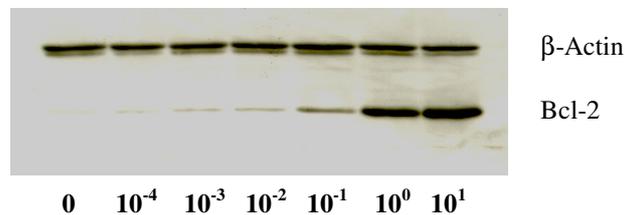


Abb. 10 Western-Blot Wiederholung der Doxycyclin abhängigen Bcl-2 Expression in den transfizierten HeLa Zellklonen. Zusätzlich Darstellung eines zweiten Proteins, β -Actin, zur Kontrolle der verwendeten Proteinmengen.

3.1.6 Transfektion FITC-markierter TBO

Da Phosphorothioat modifizierte TBO resistenter gegen die Degradation durch zelluläre Nukleasen sind, haben sie gegenüber den Phosphodiester TBO deutliche Vorteile bei *in vivo* Anwendungen. Bei unseren Versuchen verwendeten wir Phosphorothioat Modifizierungen am 5' und 3' Ende der Oligonukleotide und zusätzlich eine Aminogruppe am 3' Ende. Wie in Abb. 3 dargestellt, sind diese nur partiell modifizierten TBO mindestens für 48h nach Transfektion in den Zellen stabil. Die zelluläre Aufnahme der TBO stellt ein Haupthindernis für Oligonukleotid-basierte Therapien dar. Wir testeten deshalb die Aufnahme FITC-konjugierter TBO in die Zellen unter Verwendung eines Liposoms aus. Etwa 95% der HeLa Zellen wiesen auf diese Weise ein Fluoreszenzsignal in der FACS – Untersuchung auf.

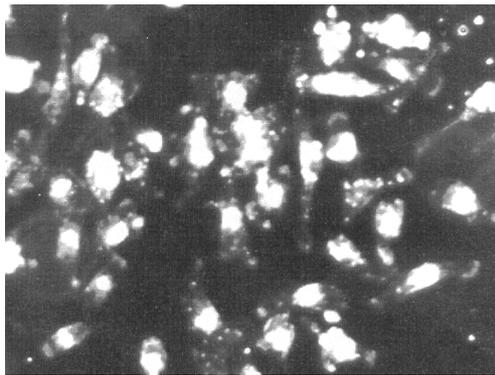


Abb. 11 Zelluläre Aufnahme der FITC-markierten TBO in HeLa Zellen 24h nach Transfektion. Hier Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von HeLa Zellen, die mit TFO2 und dem Liposom Dosper behandelt wurden.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich ein deutliches Signal innerhalb des Zellkerns 48 Stunden nach Transfektion dar. Bei den Lymphomzellen DOHH₂ war der Hauptanteil des Fluoreszenzsignals nur oberflächlich auf den Zellen nachzuweisen. Nur ein sehr schwaches Signal war im Zellkern zu sehen.

3.1.7 Triplexbildung mit dem Plasmid pTRE-bcl2-tri

Die Triplexbildung mit einem nicht linearisierten Plasmid konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Hierzu inkubierten wir TFO2 mit dem Plasmid pTRE-bcl2-tri.

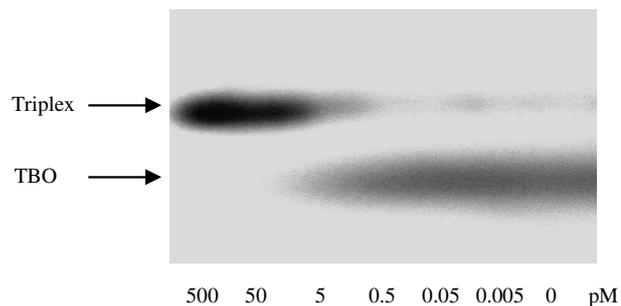


Abb. 12 EMSA von TFO2 mit Plasmid pTRE-bcl2-tri. Einsatz von 1,2 pmol von ³²P-markiertem TFO2 und sinkenden Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem Plasmid. 6h Inkubation bei RT mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung.

Zusätzlich untersuchten wir die spezifische Bindung des TBO an seiner Zielsequenz mit einem Luciferase-Assay. Hier bestätigte sich, dass die TBO (TFO 1-4) keine unspezifischen Bindungen auf der Ziel DNA eingingen.

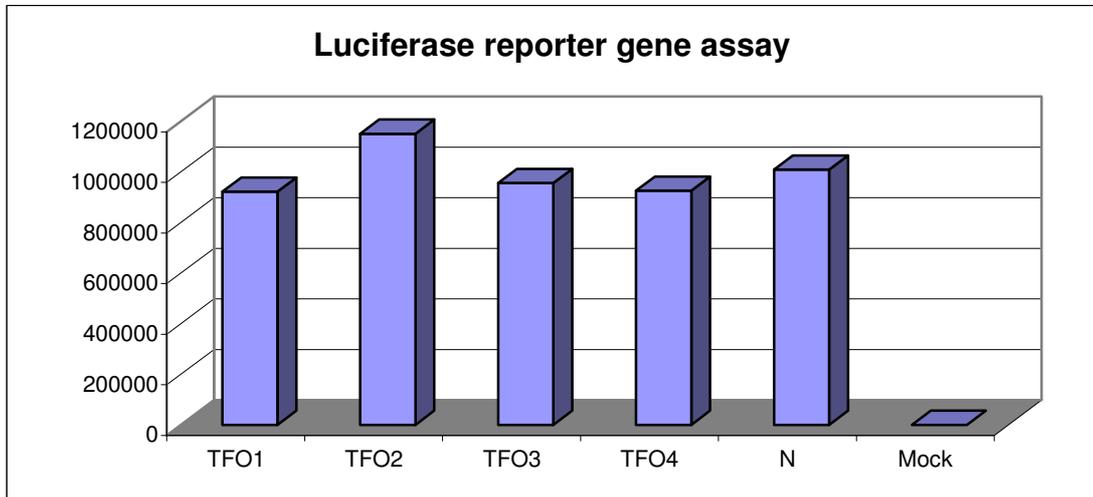


Abb. 13 Luciferase Assay zum Nachweis, dass alle TFO eine spezifische Bindung an ihrer Zielsequenz eingehen. Plasmid pGL2 wurde mit den TBO inkubiert und anschließend in HeLa Zellen transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und die Luciferase Aktivität gemessen. Mock: Negativ-Kontrolle.

3.1.8 Einfluss der TBO auf die bcl-2 Expression *in vitro*

Die transienten Transfektionsversuche dienten zur Evaluierung des Einflusses der Phosphorothioat TBO auf die Expression des bcl-2 Gens in der HeLa Zelllinie. Wie bereits unter 3.1.2 geschildert, verwandten wir das Tet-on Expressionssystem. Wenn nun die TBO an die Zielsequenz in der 3' UTR binden, blockieren sie hierdurch die Transkriptionsmaschinerie, indem die Elongation der mRNA nicht fortgeführt werden kann. Somit kann auch die nachgeschaltete Poly-A Sequenz nicht mehr angefügt werden und die RNA wird sehr schnell abgebaut. Als wir Plasmid und TBO inkubierten, achteten wir darauf, die Menge an Plasmid bei jeder Reaktion konstant zu halten um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten. In Abb. 14 wird gezeigt, dass bei gleichen Plasmidmengen nach Inkubation mit verschiedenen TBOs, nur TBO2 (Purin-Motiv) und nicht die Kontrolloligonukleotide in der Lage sind, die Bcl-2 Expression signifikant zu hemmen. TBO1 (Pyrimidin-Motiv) war nur teilweise in der Lage, die bcl-2 Expression zu inhibieren. Abb. 15 zeigt, dass auch geringe Verhältnisse zwischen TFO2 und Plasmid (z.B. 12,5 : 1) und sogar ein Verhältnis von 1,25 : 1 in der Lage sind, die Expression zumindest teilweise zu hemmen.

TFO4, das an das C-G Basenpaar der Zielsequenz mit einer Cytosin-Base bindet, hemmt ebenfalls signifikant die bcl-2 Expression. TFO3 weist fast keine hemmende Wirkung auf.

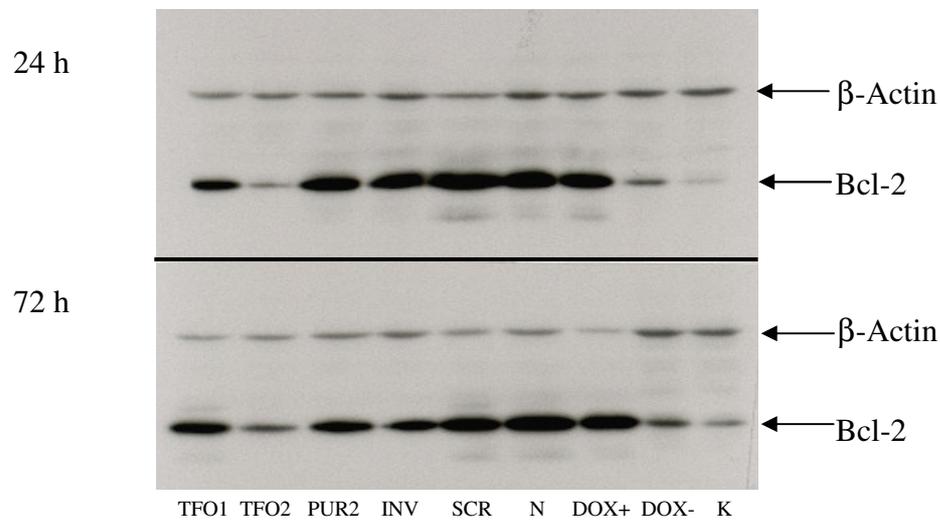


Abb. 14 Western-Blot mit Nachweis der Bcl-2 Hemmung durch TBO 24 (oben) und 72 Stunden (unten) nach Inkubation verschiedener TBO (TFO1 und 2) sowie unterschiedlicher unspezifischer Oligonukleotid-Kontrollen (PUR2, INV, SCR). N: nur Plasmid pTRE-bcl2-tri ohne TBO; DOX+, DOX-: mit oder ohne Zugabe von Doxycyclin; K: nicht transfizierte Zellen.

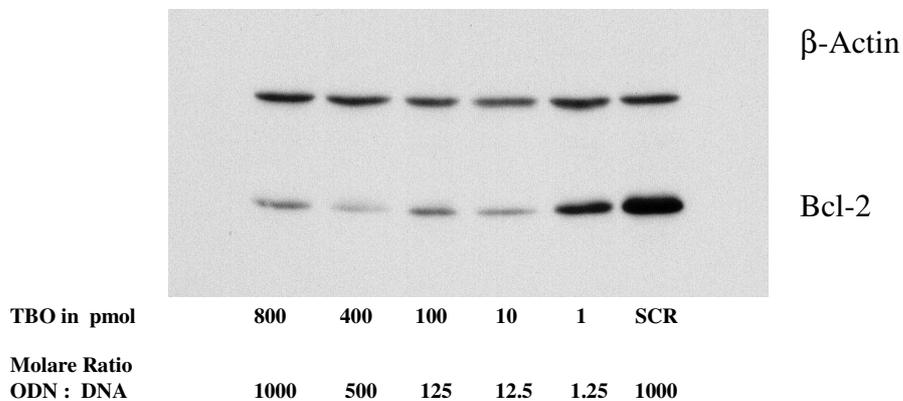


Abb. 15 Western-Blot zur Darstellung der Bcl-2 Hemmung in unterschiedlichen Konzentrationen (in pmol) des TBO und somit in verschiedenen Verhältnissen der TBO zur Plasmid-DNA. SCR, scrambled (=zufällige Nukleotidsequenz des Oligonukleotids), Kontrolle.

In Abb. 16 wird schließlich gezeigt, dass der inhibierende Effekt über die Zeit bis zu 72 Stunden nach Transfektion andauern kann. Somit konnten wir nachweisen, dass eine Blockierung der Transkription des bcl-2 Gens im Bereich der 3' UTR in vitro möglich ist und dass diese Region wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Genregulierung spielt.

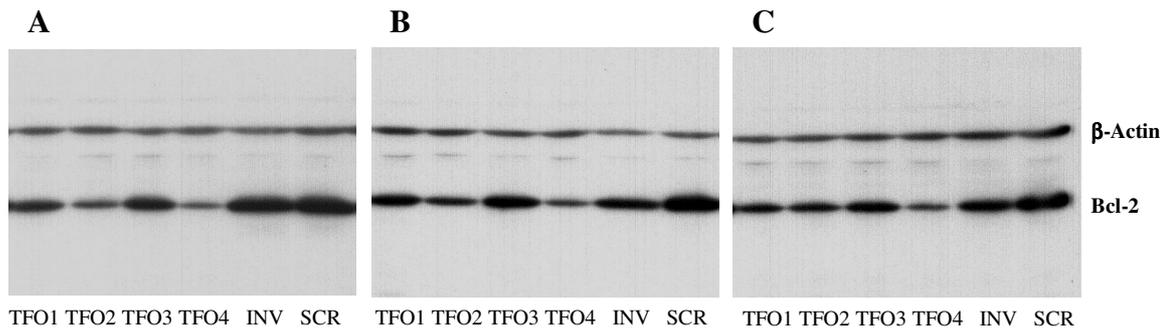


Abb. 16 Wirkung der TBO auf die BCL-2 Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten: A 24 Stunden, B 48 Stunden und C 72 Stunden. Western-Blot Auswertung nach Inkubation von TFO1 – 4 sowie der Kontrollen INV und SCR in den HeLa Zellen, die mit dem pTet-on Expressionssystem transfiziert waren.

3.1.9 Einfluss der TBO auf die bcl-2 Expression *in vivo*

3.1.9.1 bcl-2 überexprimierende (Tet-on) HeLa Zellen

Tet-on HeLa Zellen, bei denen das bcl-2 überexprimierende Plasmid pTRE-bcl2-tri stabil in die DNA integriert wurde, wurden mit TBO in einer Konzentration von 400 nM mit Hilfe von Liposom transfiziert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mit Western-Blot ausgewertet. Hier zeigte sich, dass in den transfizierten Zellen die TBO keinen wesentlichen Einfluss auf die bcl-2 Expression hatten.

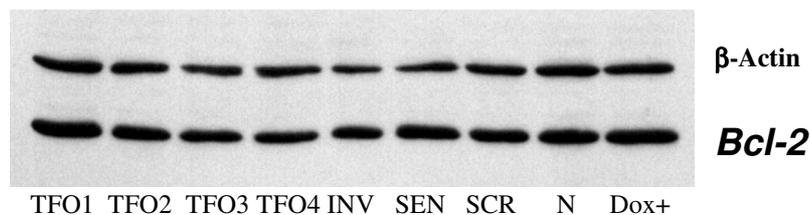


Abb. 17 Wirkung der TFO1 – 4 auf die bcl-2 Expression in stabil transfizierten HeLa Zellen. Western-Blot 48h nach Transfektion mit TBO und Kontrollen (INV, SEN, SCR, N und Doxycyclin).

3.1.9.2 DOHH₂ Lymphomzellen

Die DOHH₂ Zellen wurden ebenfalls mit unterschiedlichen TBO und anderen Oligonukleotiden bei einer Konzentration von 500 nM mit Hilfe von Liposom inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Western-Blot. Wie in Abb. 18 dargestellt, lässt sich nur nach 24 Stunden eine minimale Hemmung von Bcl-2 erkennen, die mit TFO1, TFO2 und einem Antisense Oligonukleotid (5'-*GTTCTCCCAGCGTGCGCCAT*-amino 3'), das an die ersten 18 Nukleotide ab dem

Startkodon der mRNA von bcl-2 bindet. Zu den späteren Zeitpunkten war keine Bcl-2 Hemmung mehr nachzuweisen.

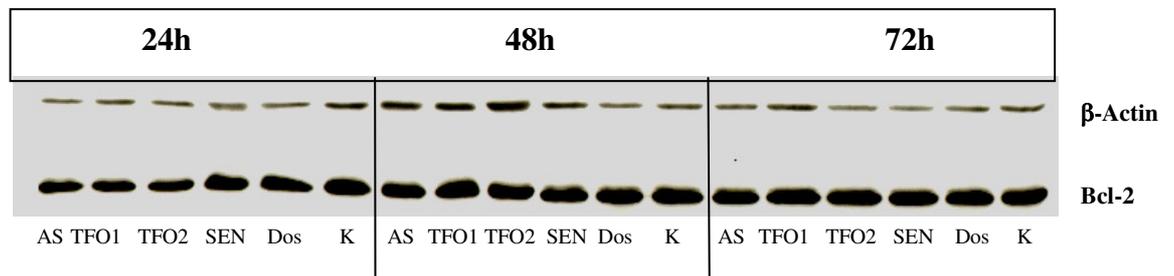


Abb. 18 Western-Blot nach Transfektion der Oligonukleotide (AS, Antisense; TFO1,2, TBO; SEN, sense; Dos, Liposom allein, K, negativ Kontrolle) bei einer Konzentration von 500 pmol (3 μ g). Zellzahl lag bei ca. 6x 10⁶ DOHH₂ Zellen je well.

3.2. Down-Regulation der bcl-2 Expression durch triplexbildende Oligonukleotide in der Promotorregion

Die Promotorregion des humanen bcl-2 Proto-Onkogens enthält zwei jeweils 20 bp lange Purin-reiche Abschnitte, die, bezogen auf den Translationstartpunkt, bei -666 bis -647 und bei -1113 bis -1094 liegen (Target B und D).

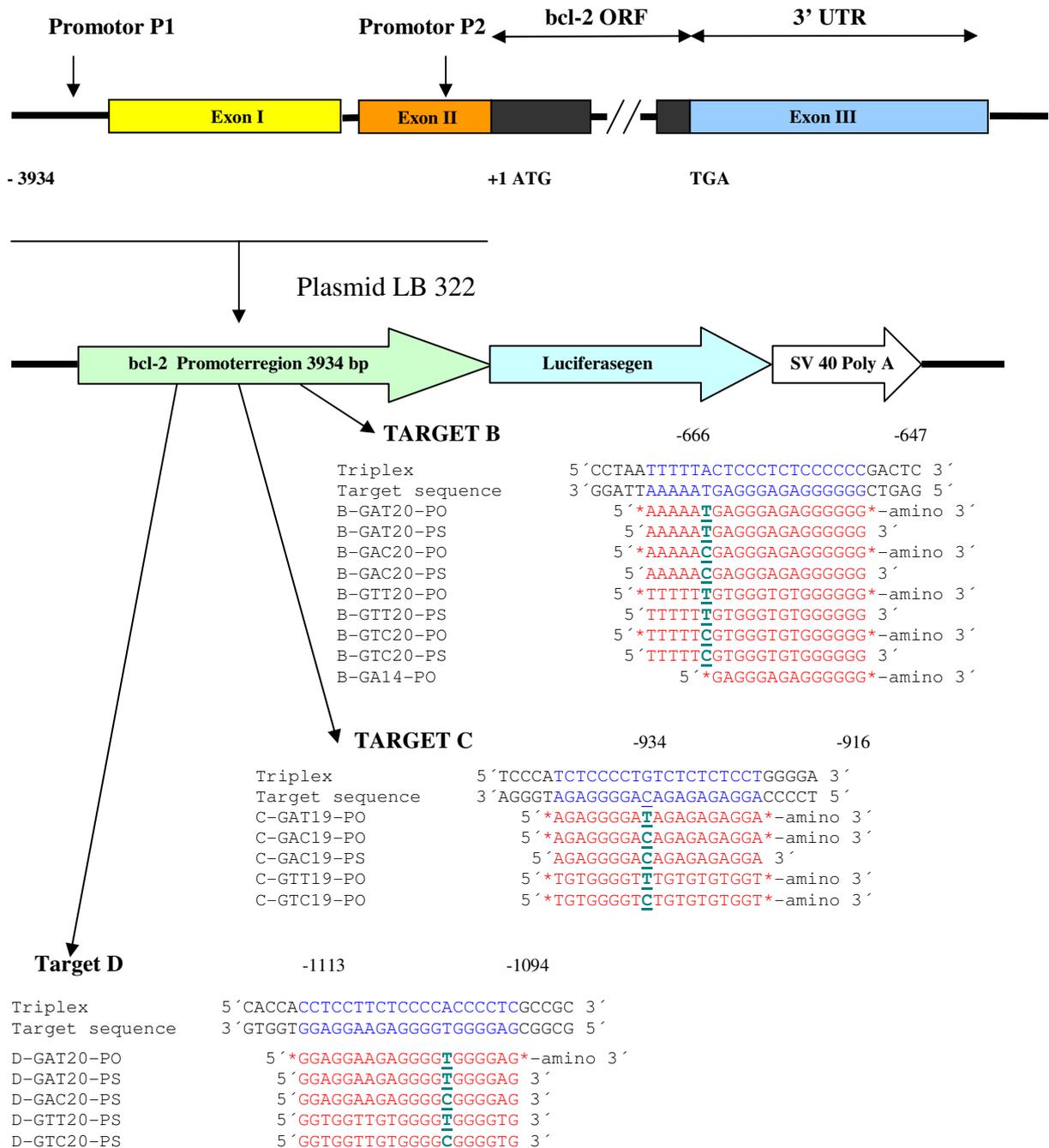


Abb. 19 Schematische Darstellung des bcl-2 Gens (GenBank: M13994) mit den entsprechenden TBO Bindungsstellen (Target B, C und D) und den Sequenzen der einzelnen TBO. Die Promotorregion wurde in das Plasmid LB322 mit dem Luciferase Reportersystem einkloniert

Zusätzlich gibt es noch einen dritten purinreichen Abschnitt von 19 bp Länge (-934 bis -916). Die Basenpaarsequenz aller drei Abschnitte sind nicht zu 100% purin- bzw. pyrimidinhaltig. Sie weisen je eine Pyrimidinunterbrechung (Thymin bzw. Cytosin) im Homopurinstrang auf. Aus diesem Grund testeten wir unterschiedliche TBO-Modifizierungen, jeweils in antiparalleler Orientierung aus, um die TBO mit den besten Bindungseigenschaften zu finden.

3.2.1 Ausbilden einer stabilen Tripelhelix in der Promotorregion

Der Promotor P1 stellt im *bcl-2* Gen den Hauptpromotor dar. Transkripte ab dem Promotor P2 sind nur in wenigen Geweben nachzuweisen (Tsujimoto und Croce 1986; Seto et al. 1988). Falls die TBO nach dem Promotor P1 binden, so könnte die Elongation der Transkription blockiert werden. Die spezifische Bindung von TBO an den *bcl-2* Promotor wurde bereits von Olivas und Maher, 1996 nachgewiesen. Bei unseren aktuellen Untersuchungen verwendeten wir Zielsequenzen, die vom Promotor P1 weiter entfernt (in Richtung Exon 1) liegen. Die TBO hatten hauptsächlich ein Purin-Motiv, um an den *bcl-2* Promotor zu binden. Sowohl GA und GT – Motive können spezifisch stabile antiparallele Triplexbindungen mit dem Purinstrang der DNA bei physiologischem pH-Wert eingehen (Abb. 20-23).

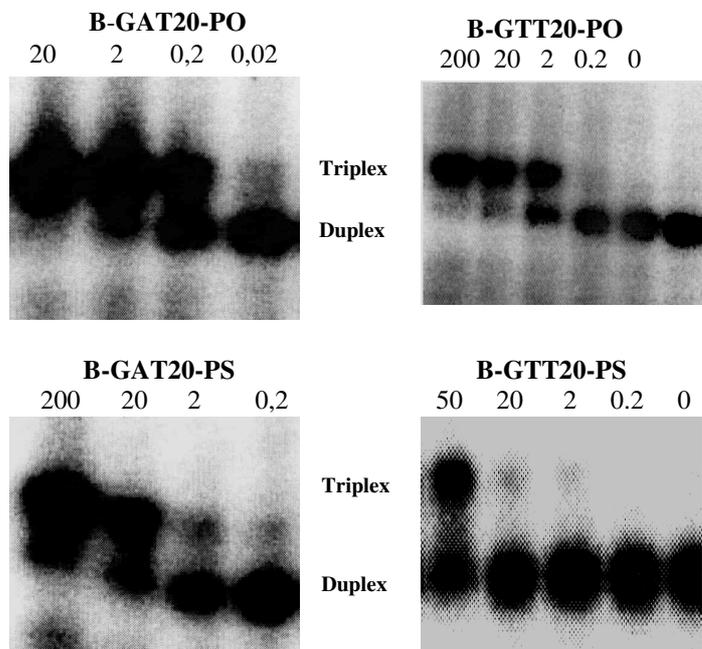


Abb. 20 EMSA der TBO mit einer Thymin-Base gegenüber der Thymin-Base des Ziel DNA-Stranges im Target B. Unterschiedliche TBO Mengen in pmol.

Bei diesen Experimenten ließen wir die Konzentration der duplex-DNA konstant bei 0,1 μM (1 pmol in 10 μl Reaktionsvolumen). Um die Triplexbildung zu stabilisieren, fügten wir zusätzlich 1mM Spermin hinzu und inkubierten das Gemisch über Nacht. Abb. 21 zeigt eine sehr hohe Bindungsaffinität des GA-Motiv B-GAT20-PO, da ca. die Hälfte des TBO eine Tripelhelix bei einer Konzentration von 0,2 μM ausbildet. Auch das GT-Motiv B-GTC20-PO geht eine stabile Bindung bei einer etwa 10-fach höheren Konzentration ein.

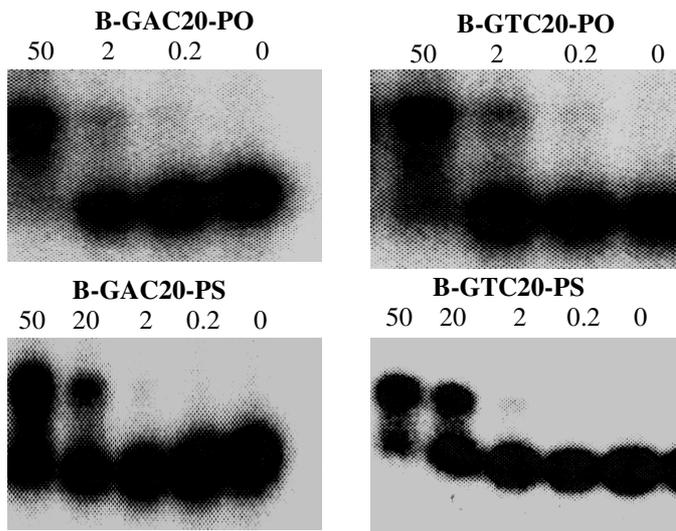


Abb. 21 EMSA der TBO mit einer Cytosin-Base gegenüber der Thymin-Base des Ziel DNA-Stranges im Target B. Unterschiedliche TBO Mengen in pmol.

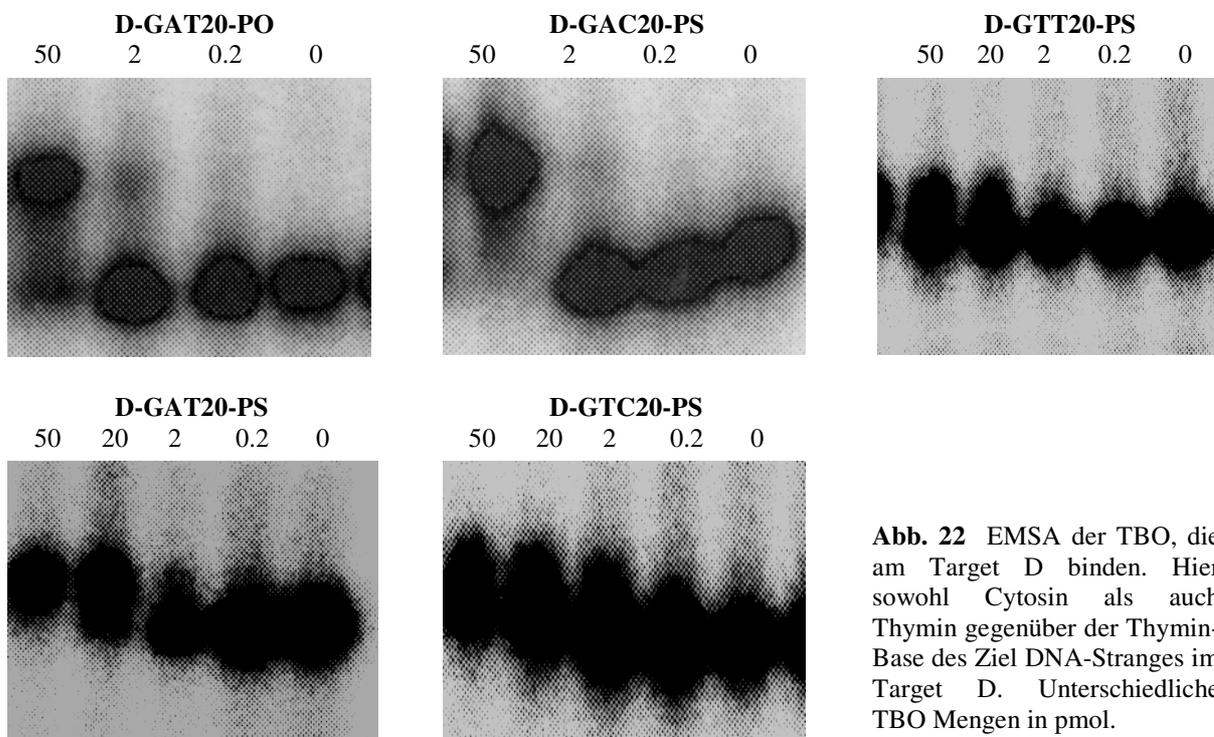


Abb. 22 EMSA der TBO, die am Target D binden. Hier sowohl Cytosin als auch Thymin gegenüber der Thymin-Base des Ziel DNA-Stranges im Target D. Unterschiedliche TBO Mengen in pmol.

Innerhalb Target B gibt es eine weitere kürzere Homopurin, -pyrimidin Sequenz (14bp). Deshalb wurde ein entsprechendes 14 bp langes GA-Motiv TBO ausgetestet. Im EMSA zeigten sich ähnliche Bindungseigenschaften wie bei dem längeren B-GAT20-PO.

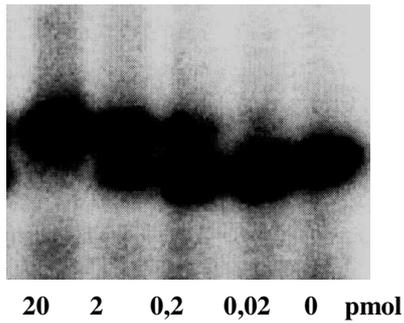


Abb. 23 EMSA des TBO B-GA14-PO, das an Target B bindet. Eine Pyrimidinunterbrechung ist nicht vorhanden. Unterschiedliche TBO Mengen in pmol.

An der Inversionsstelle, an der eine Pyrimidinbase die Homopurinkette in der DNA-Bindungsstelle unterbricht und somit die Bindungsaffinität der TBO vermindert, wird empfohlen, für eine parallele Ausrichtung der TBO vorzugsweise G * T – A, T * C – G oder C * C – G zu verwenden. Für eine antiparallele Ausrichtung werden folgende Kombinationen empfohlen: C * T – A und T * C – G (Vasquez und Wilson, 1998). Wie in Abb. 21, 23 und 24 zu sehen ist, wirkt sich die T * T – A Verbindung nicht negativ auf die Triplexbindung bei Target B (B-GAT20-PO, B-GAT20-PS, B-GTT20-PO und B-GTT20-PS) oder D (D-GAT20-PO, D-GAT20-PS und D-GTT20-PS) aus.

Die Stabilität der TBO in den Zellen, im Serum oder aber im Blutkreislauf ist wichtiger Gesichtspunkt für den Erfolg Oligonukleotid-basierter Therapieansätze. Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die 5' und 3' Phosphorthioat modifizierten Enden als auch das Amino-modifizierte 3' Ende die TBO in den Zellen für mindestens 48 Stunden stabil hielten und die Bindungseigenschaften nicht wesentlich einschränkten. McGuffie et al. wiesen nach, dass TBO mit einem kompletten Phosphorthioat Grundgerüst ebenfalls Triplexe *in vitro* ausbilden und von Leukämiezellen aufgenommen werden können, in denen sie bis zu 72 Stunden stabil sind. Funktionell blockierten diese TBO die endogene c-myc Expression, was zu einer Reduktion der Proliferation, Störung des Zellzyklus und Apoptoseinduktion führte. Entsprechende Modifikationen hatten wir an TBO, die gegen Target B (B-GAT20-PS, B-GAC20-PS, B-GTT20-PS, B-GTC20-PS) und D (D-GAT20-PS; D-GAC20-PS, D-GTT20-PS, D-GTC20-PS) durchgeführt und ihre Bindungseigenschaften im EMSA getestet.

In den Abbildungen 21, 22 und 24 weisen diese TBO ebenfalls stabile Triplexbindungen auf, wobei im Gegensatz zu den nur teilweise Phosphorthioat modifizierten TBO hierfür eine höhere Konzentration an TBO erforderlich war.

Um die spezifische Bindung der TBO nochmals nachzuweisen, untersuchten wir die Bindung von B-GAT20-PO an einem 203 Basenpaar langen DNA Fragment B und einem Plasmid (pGEM-T/bcl-2B), die beide die Ziel DNA (Target B) enthielten. Das DNA Fragment wurde dem Plasmid LB 322, welches ja die Promotorregion von bcl-2 enthält, entnommen, indem wir mittels PCR und geeigneten Primern, die eine EcoR I Schnittstelle besitzen, das gewünschte Teilstück amplifizierten. Zusätzlich erstellten wir analog ein zweites 178 bp langes Fragment C, welches das Target C beinhaltet.

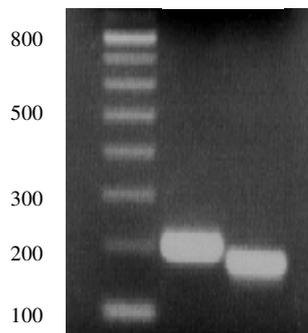


Abb. 24 PCR Produkte der TBO Targets B und C der bcl-2 Promotorregion nach Auftrennen in der Gelelektrophorese. Rechts stehen die bp Längen der DNA Leiter.

Bei der Durchführung der EMSA verwendeten wir jeweils $0,06 \mu\text{M}$ [^{32}P] dATP markiertes B-GAT20-PO. In Abb. 25 ist zu sehen, dass das TBO an das 203 bp lange Fragment und an das Plasmid bindet. Wie zu erwarten, finden sich keine unspezifischen Bindungen des TBO mit dem Kontrollfragment bzw. dem Kontrollplasmid pGEM-T/bcl-2C selbst bei höheren Konzentrationen. Allerdings zeigt sich eine zunächst nicht erwartete Bande die zwischen ungebundenem TBO und der Triplex verläuft. Cogoi und Mitarbeitern ist bei ihren Untersuchungen dieselbe Bande aufgefallen (Cogoi et al., 2001). Ursache hierfür könnte z.B. eine veränderte Ladung der TBO, die radioaktive Markierung oder eine Di- bzw. Polymerisierung sein. Zusammenfassend kann man sagen, dass die TBO stabile und spezifische Triplexbindungen mit ihrer Zielsequenz im bcl-2 Promotor eingehen.

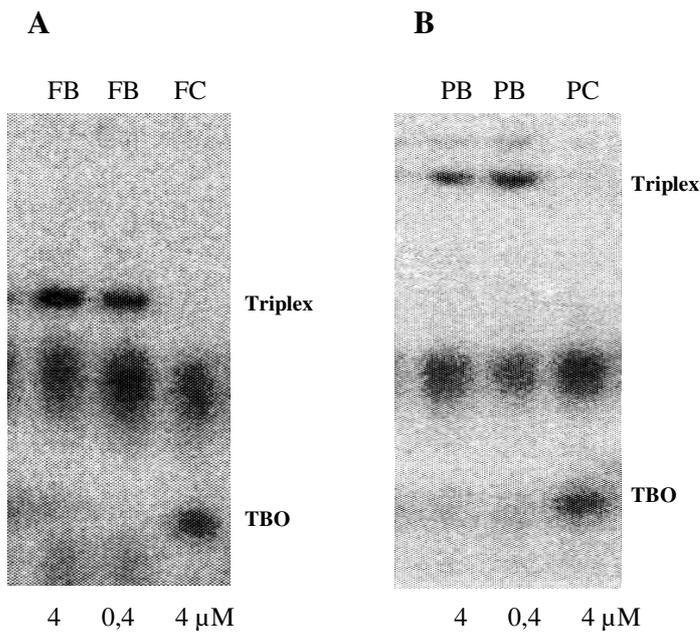


Fig 25 Triplexbildung von B-GAT20-PO mit dem (A) 203 bp DNA Fragment und dem (B) Plasmid pGEM-T/bcl-2B. Jede Probe enthielt 0,6 pmol [γ - 32 P] dATP markiertes B-GAT20-PO. Die Konzentrationen der Target DNA sind jeweils unterhalb dargestellt. FB steht für das 203 bp Fragment B und FC für das 178 bp Kontroll DNA Fragment C; PB and PC stehen für das Plasmid pGEM-T/bcl-2B und das Kontrollplasmid pGEM-T/bcl-2C.

3.2.2 Hemmung der bcl-2 Transkription in HeLa Zellen

In diesem Versuch konnten wir den Abbruch der Transkription durch eine reduzierte Luciferaseaktivität nachweisen. Das Kontroll-TBO wies keine unspezifischen Bindungen am bcl-2 Promotor auf (Abb. 26). Wir untersuchten verschiedene TBO, die im EMSA unterschiedliche Bindungsaffinitäten hatten, auf ihre transkriptionshemmenden Eigenschaften in HeLa Zellen. In einem *in vitro* Versuch benutzen wir das Luciferase Reporter Gen System um Transkriptionshemmung zu quantifizieren. Das Plasmid LB 322 enthält die cDNA des Luciferasengens, die unter der Kontrolle des bcl-2 Promotors steht. In Abb. 27 konnten wir eine über 80%ige Reduktion der Luciferaseaktivität nach Inkubation mit dem TBO B-GAT20-PO nachweisen. Interessanterweise zeigte auch B-GAT20-PS, welches eine ca. 10-mal niedrigere Bindungsaffinität im EMSA aufwies, eine ähnlich starke Hemmung der Transkriptionselongation. B-GA14-PO wies auch bei seiner eher kurzen Länge erstaunlicherweise gute Ergebnisse auf. SCR20, ein Kontroll-TBO konnte die Transkription in nur geringem Umfang unspezifisch hemmen.

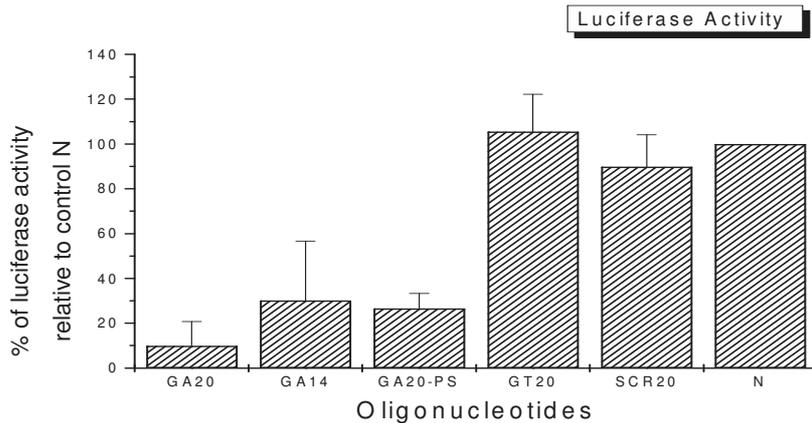


Abb. 26 Hemmung der Luciferase Reportergen Expression durch TBO gegen den humanen bcl-2 Promotor. Das Plasmid LB 322 mit dem Reportergen wurde mit TBO (GA20 = B-GAT20-PO, GA20-PS = B-GAT20-PS, GT20 = GTT20-PO, GA14 = B-GA14-PO), unspezifischem Oligonukleotid (SCR20) oder mit keinem Oligonukleotid (N) präinkubiert und anschließend in HeLa Zellen transfiziert. Die relativen Werte beziehen sich auf die Kontrolle N, die auf 100% gesetzt wurde.

3.2.3 Hemmung der bcl-2 Transkription in DOHH₂ Zellen

Um nachzuweisen, ob die TBO auch *in vivo* die bcl-2 Expression down-regulieren können, inkubierten wir die DOHH₂ Lymphomzellen mit TBO bei einer Konzentration von 400 nM und unter Verwendung von Liposom. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und eine Western-Blot Untersuchung durchgeführt. Zu beiden Zeitpunkten war keine signifikante Abnahme der Bcl-2 Mengen zu sehen.

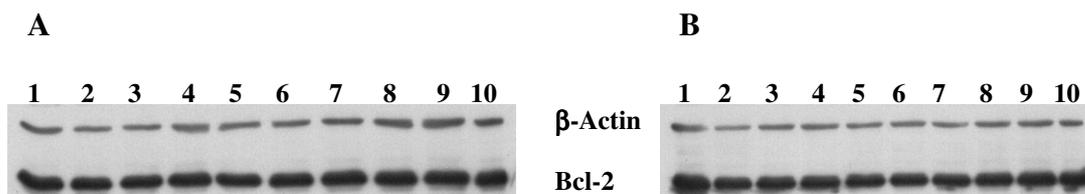


Abb. 27 Western-Blot nach 48 (A) und 72 (B) Stunden Inkubation von TBO (1-10) gegen die bcl-2 Promotorregion in DOHH₂ Zellen. 1, D-GAT20-PO; 2, D-GAC20-PS; 3, B-GAT20-PO; 4, B-GAC20-PO; 5, B-GTT20-PO; 6, B-GTC20-PO; 7, C-GAC19-PO; 8, C-GAT19-PO; 9, C-GTT19-PO; 10, C-GTC19-PO

3.2.4 Hemmung der bcl-2 Transkription in SK-MEL-28 Zellen

Auch in dieser adherenten bcl-2 überexprimierenden Zelllinie wollten wir untersuchen, ob die TBO die endogene Transkription von bcl-2 blockieren können. Die Inkubation erfolgte analog wie in 3.2.3 bei den DOHH₂ Zellen. Wieder nach 48 und 72 Stunden führten wir

eine Western-Blot Auswertung durch. Leider ist auch in diesem Versuch keine sichtbare Bcl-2 Reduktion eingetreten.

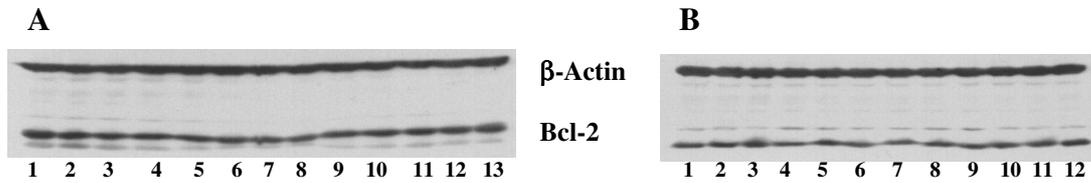


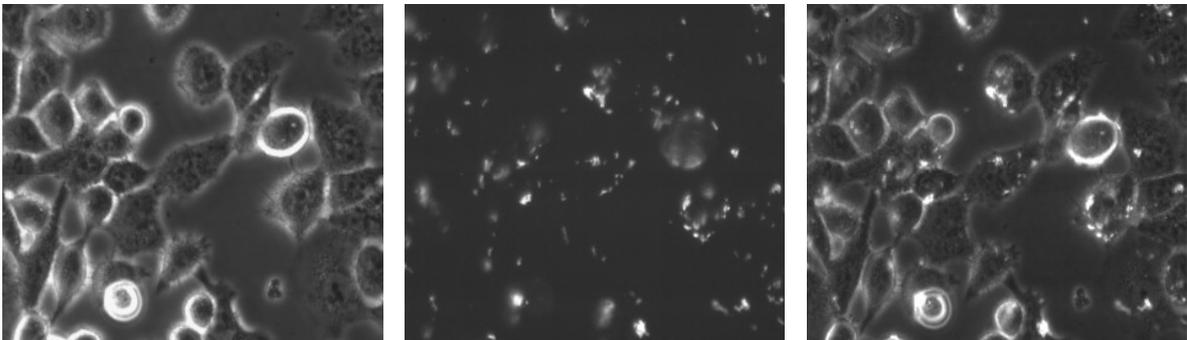
Abb. 28 Western-Blot nach 48 (A) und 72 (B) Stunden Inkubation von TBO (1-13) gegen die bcl-2 Promotorregion in DOHH₂ Zellen. 1, D-GAT20-PO; 2, D-GAC20-PS; 3, B-GAT20-PO; 4, B-GAC20-PO; 5, B-GTT20-PO; 6, B-GTC20-PO; 7, C-GAC19-PO; 8, C-GAT19-PO; 9, C-GTT19-PO; 10, C-GTC19-PO; 11, 3'UTR GAT18-PO; 12, 3'UTR GTC18-PO; 13, 3'UTR GAC18-PO.

3.2.5 Vergleich unterschiedlicher Transfektionsreagenzien

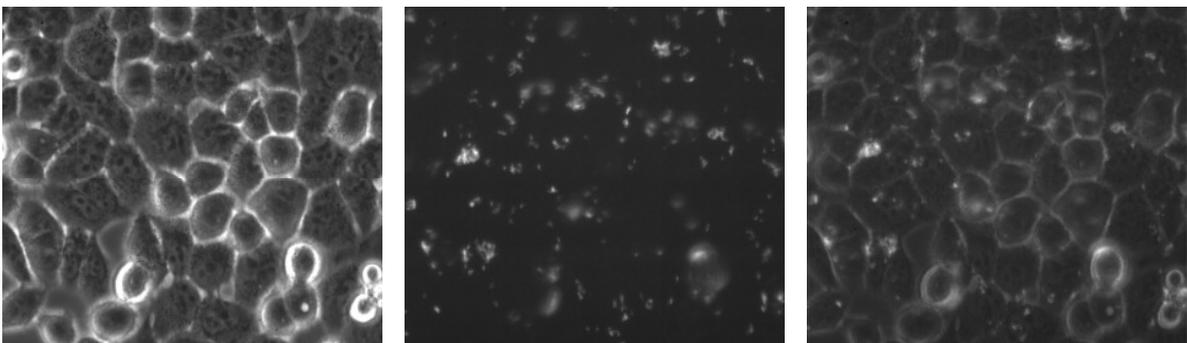
3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

3.2.5.1 A HeLa Zellen, DOSPER

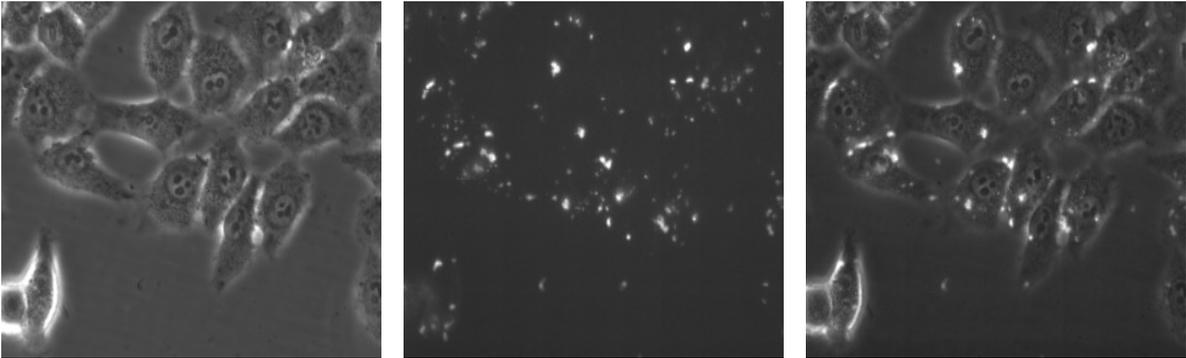
A 1h



B 6h



C 24h



D 48h

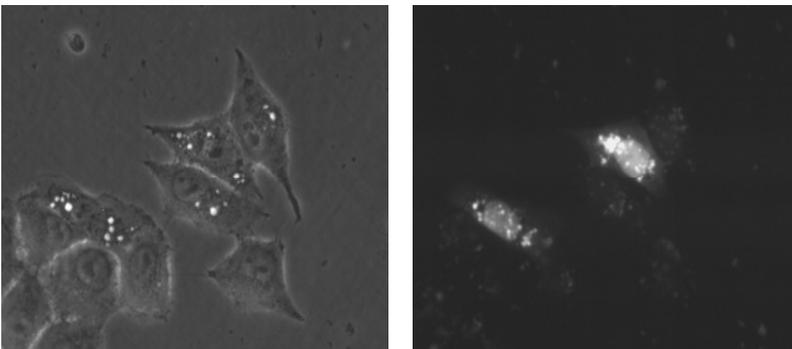
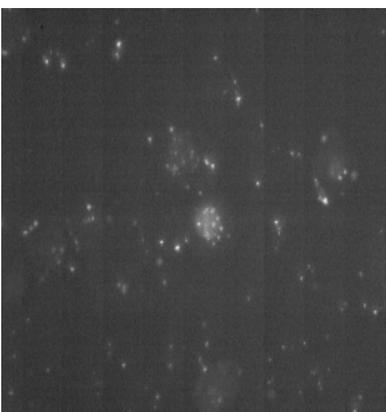


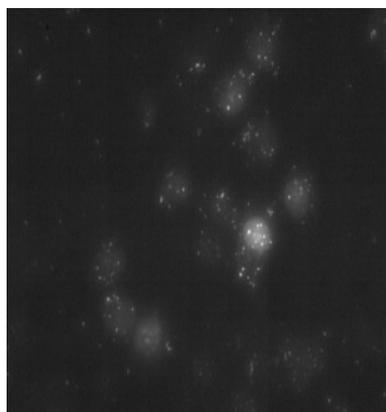
Abb. 29 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A – D) inkubierten HeLa Zellen. Verhältnis Dosper : B-GAT20-PO = 6 μ l : 4 μ g. Links: Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme; Mitte: Reines Fluoreszenzsignal; rechts: Überlagerung beider Signale. Erst nach 24 und 48 Stunden erkennt man auch ein Signal aus den Zellkernen.

3.2.5.1 B HeLa Zellen, Effectene

A 24h



B 48h



C 72h

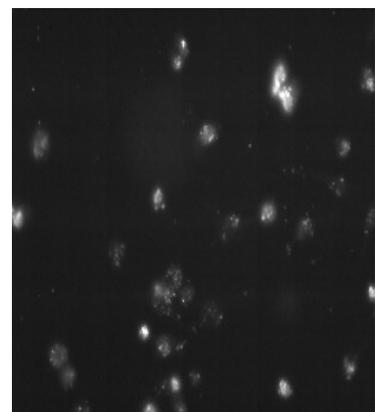


Abb. 30 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A – C) inkubierten HeLa Zellen. Verhältnis Effectene: B-GAT20-PO = 10 μ l : 0,4 μ g. Nach 24 bis 72 Stunden erkennt man ein zunehmendes Signal in den Zellkernen.

3.2.5.1 C HeLa Zellen, FuGene 6

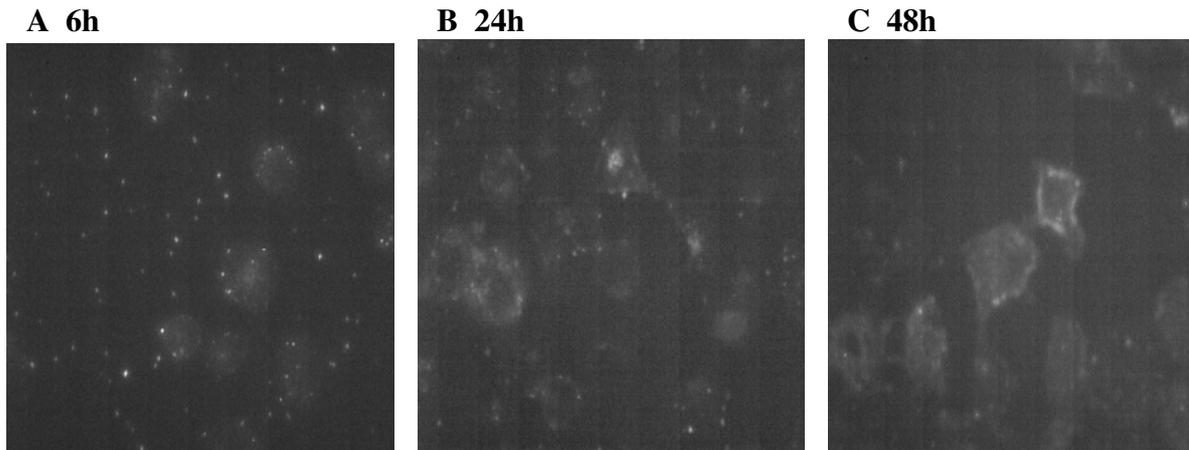


Abb. 31 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Unterschiedliche Verhältnisse von FuGene 6 : B-GAT20-PO (3 : 1 bis 6 : 3). Insgesamt zeigt sich ein schwächeres Signal im Vergleich zu Dosper oder Effectene.

3.2.5.2 A SK MEL-28 Zellen, DOSPER

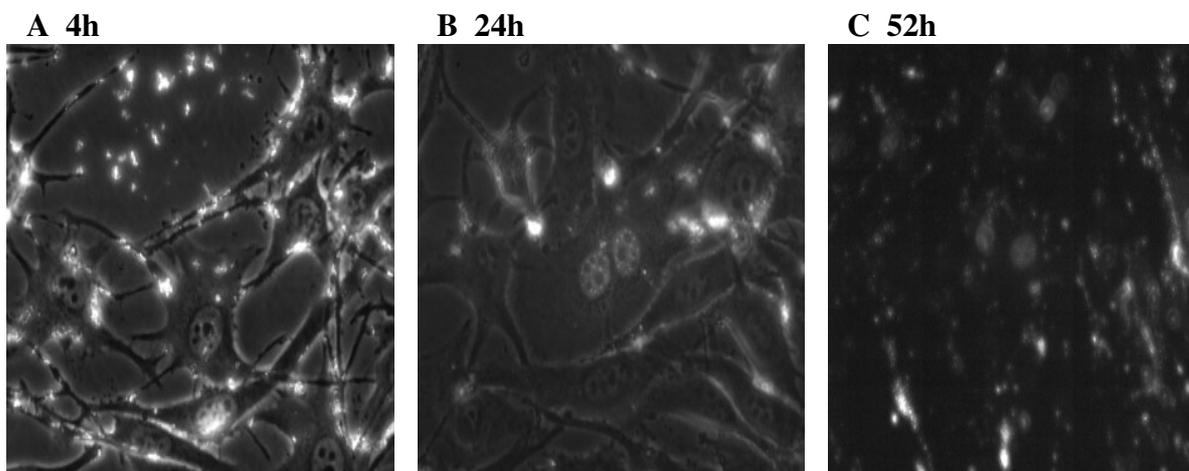


Abb. 32 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A – C) inkubierten Melanomzellen. Nur geringes nukleäres Signal nach Transfektion mit Dosper. Ein Großteil der Fluoreszenz zeigt sich randständig im Zytoplasma bzw. an der Zelloberfläche

3.2.5.2 B SK MEL-28 Zellen, Effectene

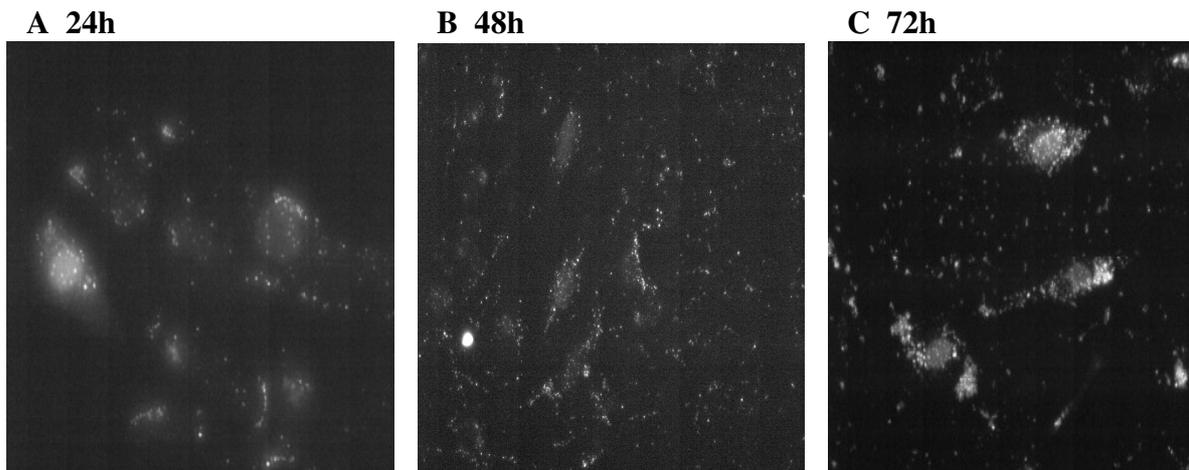


Abb. 33 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A – C) inkubierten Melanomzellen. Etwas bessere nukleäre Aufnahme als nach Transfektion mit Dospere.

3.2.5.2 C SK MEL-28 Zellen, FuGene 6

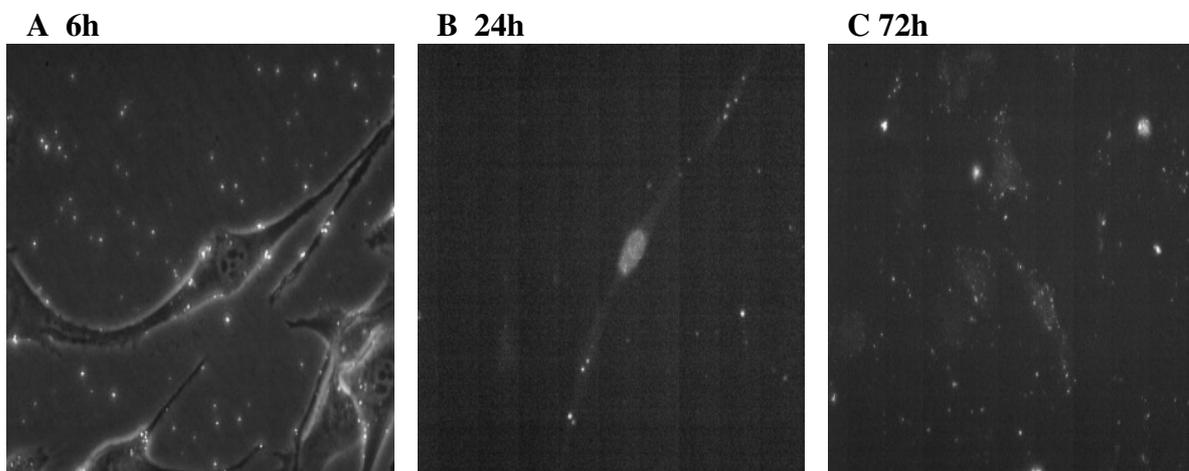


Abb. 34 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A – C) inkubierten Melanomzellen. Nur gelegentliche nukleäre Aufnahme der TBO.

3.2.5.3 DOHH₂ Zellen, Dosper

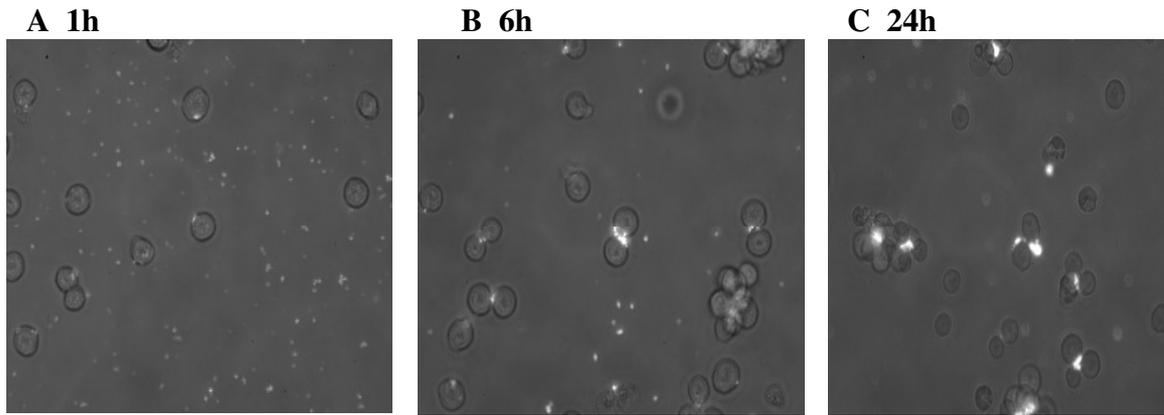


Abb. 35 Darstellung der DOHH₂ Zellen nach Transfektion mit Dosper nach 1, 6 und 24 Stunden. Kein Nachweis intrazellulärer FITC-markierter TBO.

Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der übrigen Transfektionen der DOHH₂ Zellen mit Effectene und FuGene 6 sind nicht dargestellt, da diese kaum ein zelluläres Signal aufwiesen.

3.2.6 FACS – Analyse

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der FACS-Analyse dargestellt. Untersucht wurden die einzelnen Zelllinien, die jeweils mit einem Gemisch aus den verschiedenen Liposomen und FITC-markierten TBO inkubiert wurden. Im Vergleich zu einer Kontrolluntersuchung, lässt sich im entsprechenden Fluoreszenzkanal eine mehr oder weniger ausgeprägte Verschiebung der beiden Kurven nachweisen. Hierbei lassen sich zwei Werte ablesen. Zum einen, wie viele Zellen transfiziert wurden und zum anderen, wie stark das Fluoreszenzsignal (Intensitätsverteilung) ist, das heißt, ob wenige oder viele TBO in die Zellen gelangt sind. Beispielhaft ist dies in Abbildung 36 dargestellt. Die hieraus abgeleiteten Ergebnisse sind im Weiteren in Form von Diagrammen dargestellt.

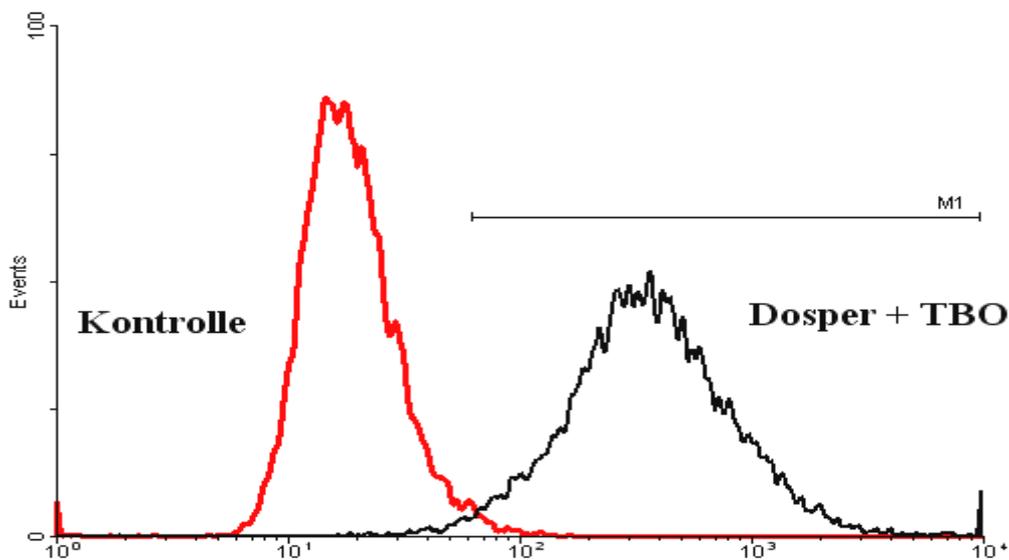


Abb. 36 FACS Darstellung. Überlagerung beider Kurven (Kontrolle: nur TBO ohne Liposom und nach Zugabe von TBO + Dosper). Auswertung nach 48 Stunden. X-Achse: Fluoreszenzkanal; Y-Achse: Zellzahl. M1: Markerregion. Man erkennt eine deutliche Verschiebung der Kurve nach rechts nach TBO-Zugabe.

Es wurden bei jeder Messung 10 000 Zellen ausgewertet. Anschließend wurde eine Markerregion (M1) ab einem Wert von ca. 100 gesetzt (s. Abb.36), um die relative Zellzahl der fluoreszierenden Zellen zu bestimmen.

3.2.6.a HeLa, Dosper

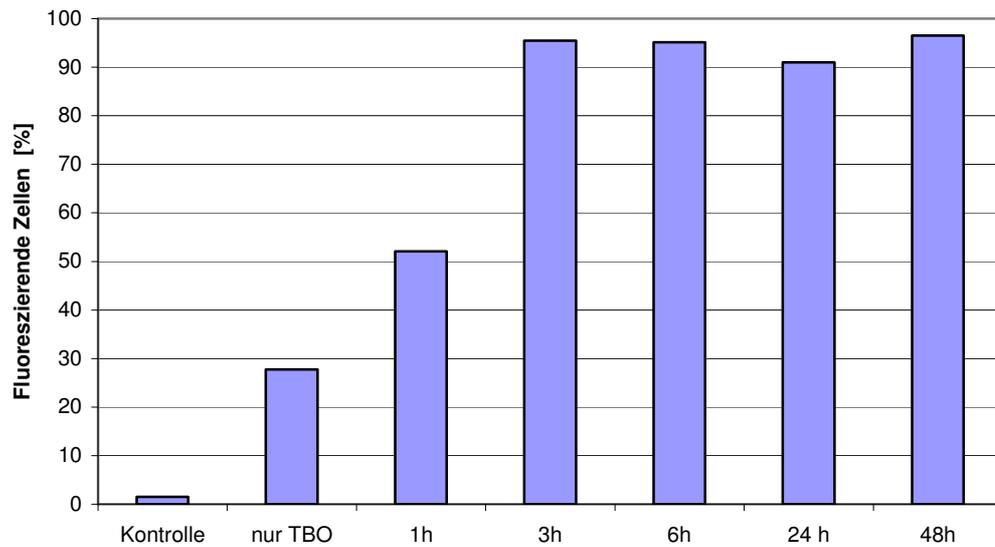


Abb. 37 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; nur TBO: TBO ohne Zugabe von Liposom.

3.2.6.b HeLa, Effectene

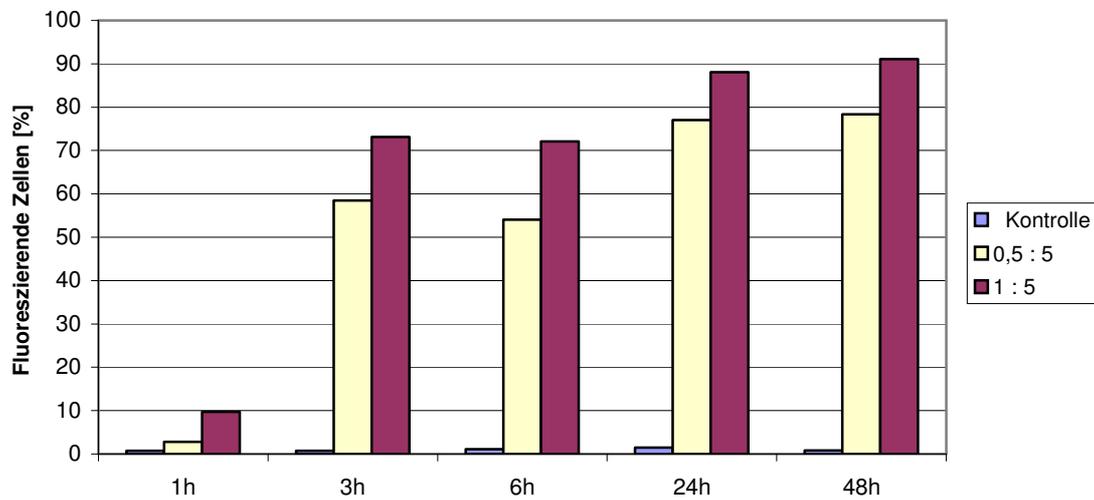


Abb. 38 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO zu Effectene: 0,5 μ g TBO zu 5 μ l Effectene bzw. 1 μ g zu 5 μ l.

3.2.6.c HeLa, FuGene 6

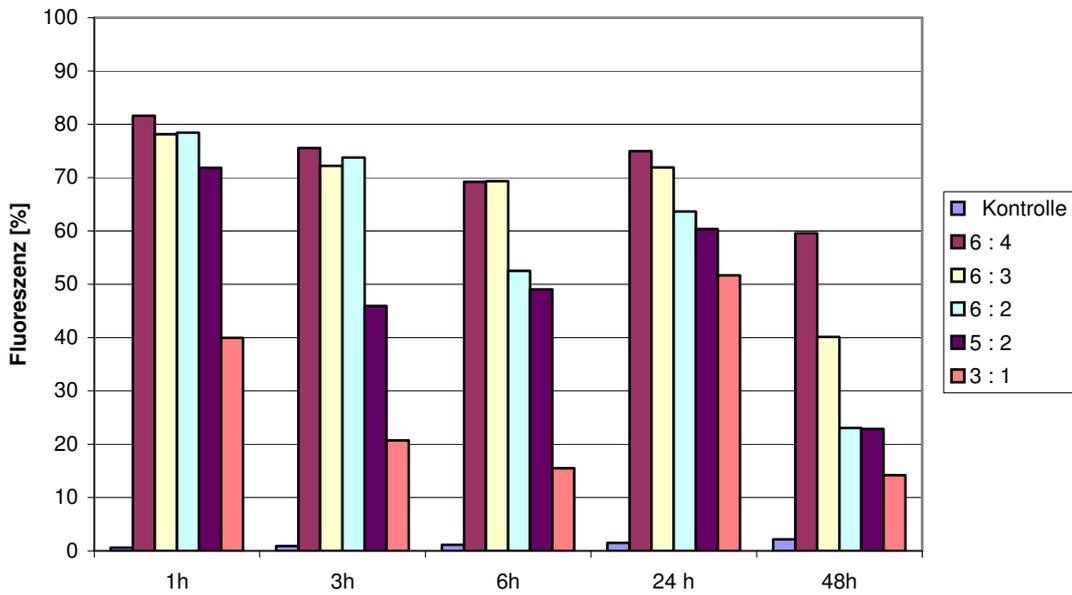


Abb. 39 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO in μg zu FuGene 6 in μl

3.2.6.d SK-Mel-28, Dosper

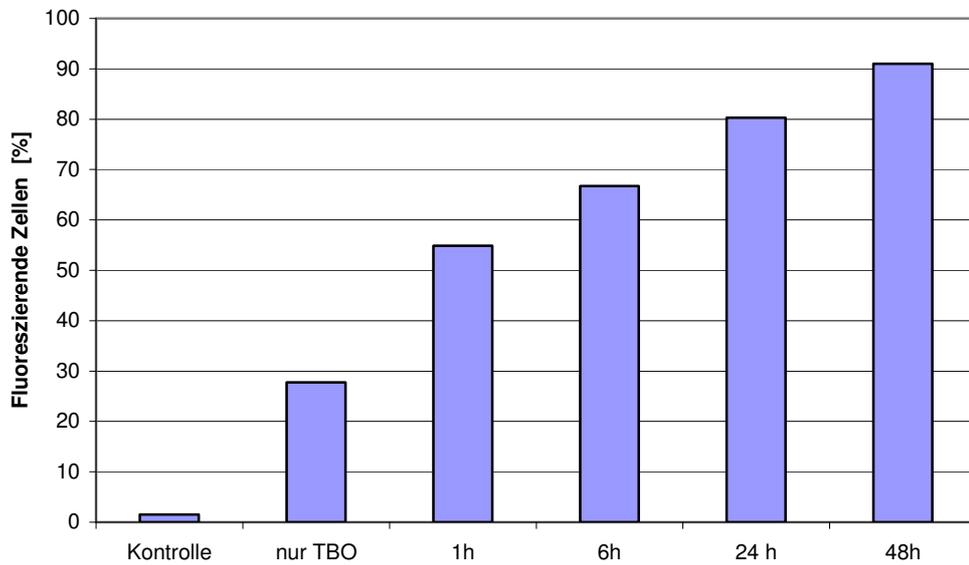


Abb. 40 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO zu Dosper konstant $4 \mu\text{g} : 6 \mu\text{l}$

3.2.6.e SK-Mel-28, Effectene

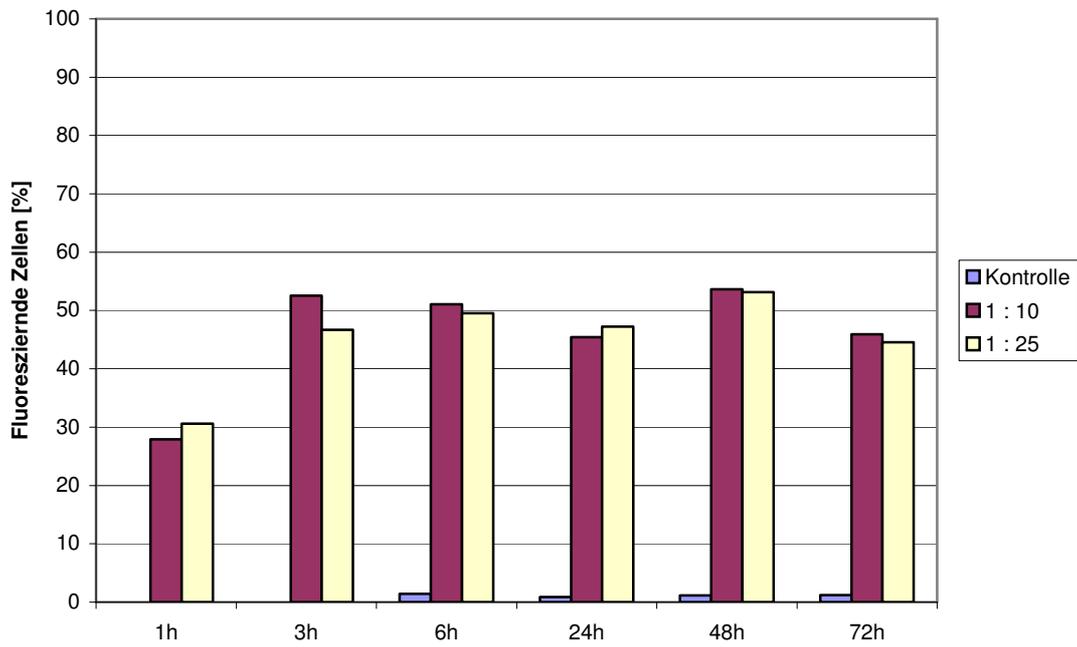


Abb. 41 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO in μg zu Effectene in μl .

3.2.6.f SK-Mel-28, FuGene 6

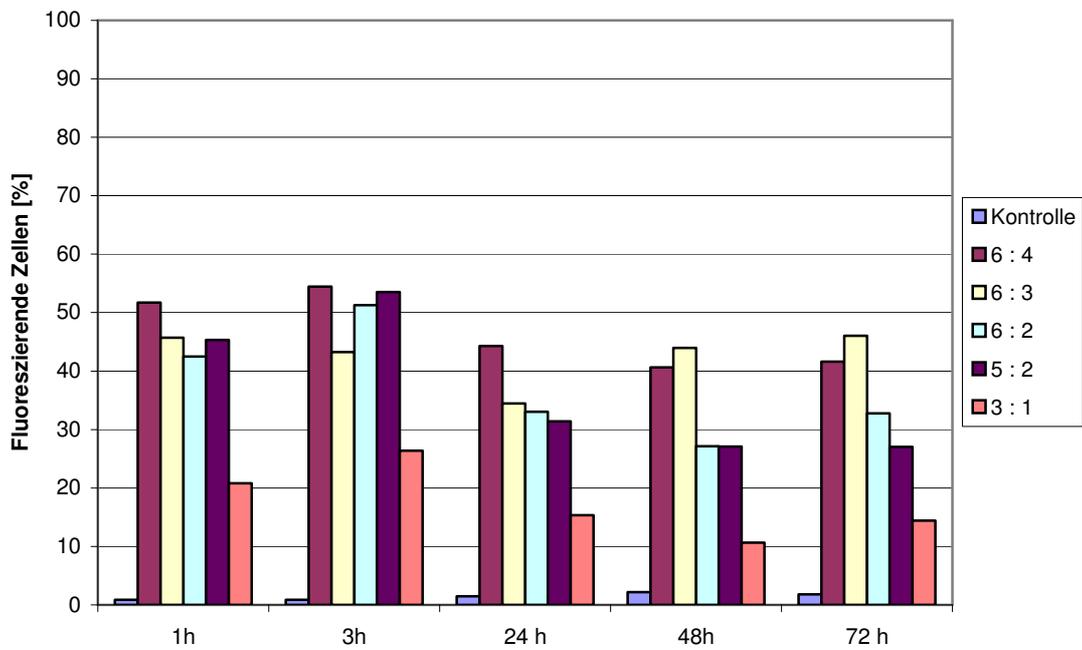


Abb. 42 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO in μg zu FuGene 6 in μl .

3.3. TBO vermittelte Inhibition der survivin Expression und Apoptoseinduktion in humanen Bronchialkarzinom Zellen

Das vollständige survivin Gen besteht aus 14 796 Basenpaaren (GenBank: U75285), das Transkript 426 Nukleotide (ATG 2811, TGA 12042) und das Survivin Peptid 142 Aminosäuren (16,5 kDa). Es gibt allerdings verschiedene Splice-Varianten, die in der Zelle unterschiedliche Funktionen haben. Eine Isoform ist z.B. das survivin- β / 2B, eine dominant negative Isoform. Das menschliche survivin Gen enthält 2 purin- bzw. pyrimidinreiche Sequenzen in Intron II (3013 bis 3036 und 3077 bis 3099) und zwei in der 3' UTR (12 263 bis 12 286 und 12 329 bis 12350).

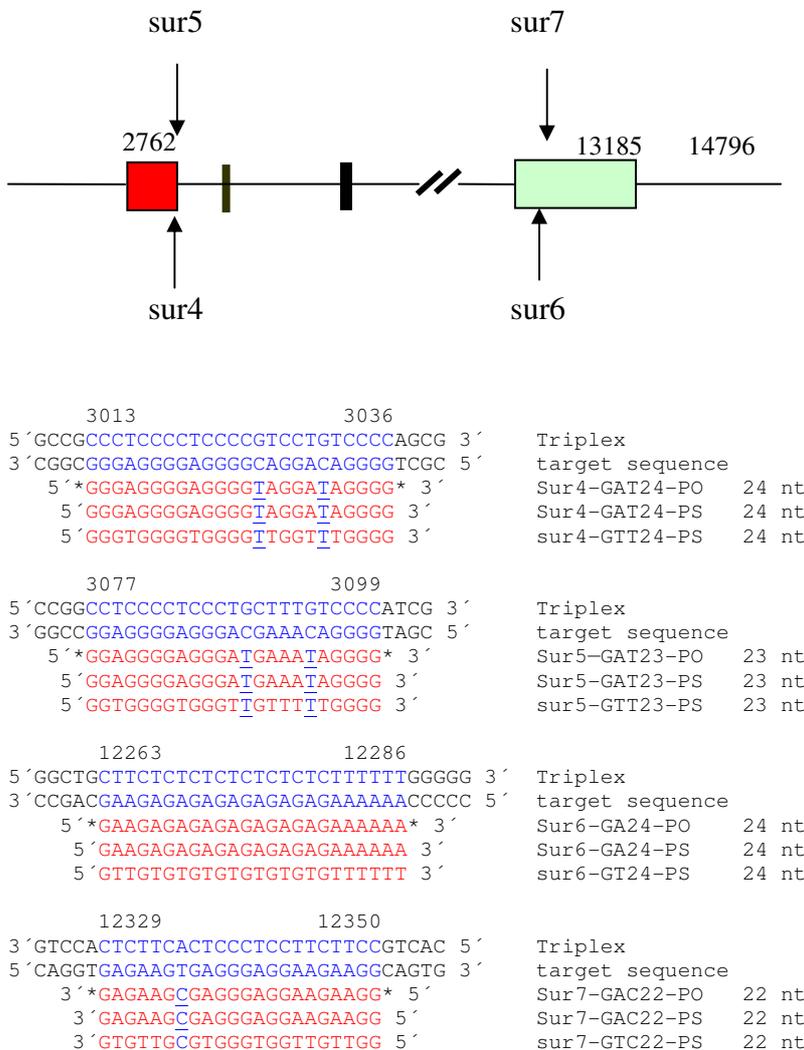


Abb. 43 Schematische Darstellung des survivin Gens mit seinen 4 Exons und den TBO Zielsequenzen. In Intron II und in der 3' UTR befinden sich jeweils zwei potentielle Bindungsstellen. Die einzelnen Sequenzen der Target – DNA und der TBO sind unterhalb abgebildet. Eine Amino-Modifikation wurde bei diesen TBO nicht angewendet.

3.3.1 Ausbilden einer stabilen Tripelhelix innerhalb des survivin Gens

In den Abbildungen 44 und 45 wird dargestellt, dass die TBO Sur4-GAT24-PO und Sur4-GAT24-PS eine stabile Bindung mit der Duplex DNA bei hoher Affinität eingehen können. Wie aus den Voruntersuchungen erwartet, ist die Bindungsaffinität von Sur4-GAT24-PO etwa 10 mal so hoch als die von Sur4-GAT24-PS. Die Eigenschaften von Sur5-GAT23-PO und Sur5-GAT23-PS sind den eben genannten TBO ähnlich. Allerdings binden die TBO Sur6-GA24-PO, Sur6-GA24-PS, Sur7-GAC22-PO und Sur7-GAC22-PS deutlich schlechter als die TBO der Sur4 Reihe. Im Sur4 DNA Target sind drei GGGG und eine GGG Sequenz enthalten, im Sur5 Target zwei GGGG und eine GGG Sequenz. Diese kurzen Guanin Abschnitte tragen wohl entscheidend zur Bindungsaffinität der TBO bei. In den Sur6 und Sur7 Targets sind nämlich keine längeren zusammenhängenden Guanin Abschnitte enthalten, entsprechend werden höhere TBO Konzentrationen benötigt. Also kann man festhalten, dass der Guaningehalt in dem Purinstrang der Duplex-DNA einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der TBO hat. Der Guanin Anteil der genannten TBO Sur4, Sur5, Sur6 und Sur7 beträgt 71%, 61%, 37,5% beziehungsweise 54,5%. Entsprechend schlecht binden Sur6-GA24-PS und Sur6-GA24-PO obwohl sie keine Pyrimidin Unterbrechung in ihrer Sequenz aufweisen.

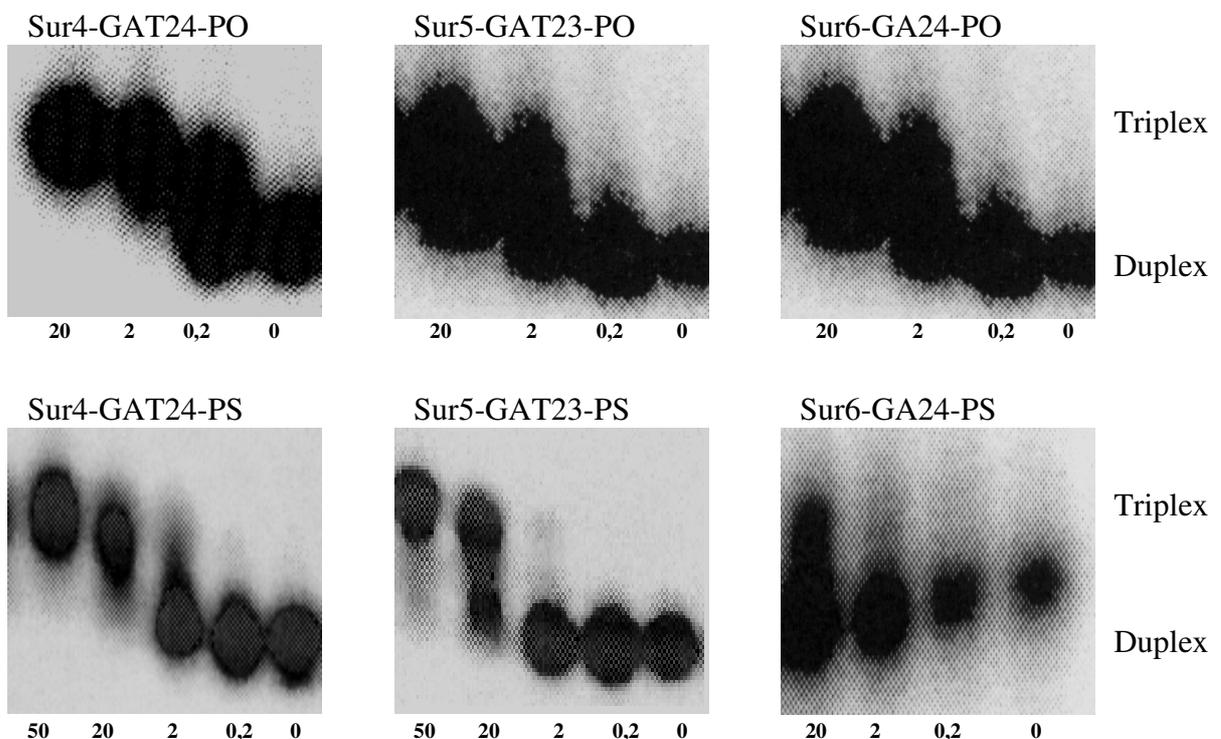


Abb. 44 EMSA Darstellung der Triplexbildung der TBO Sur4 bis Sur6 in verschiedenen Konzentrationen (TBO in pmol).

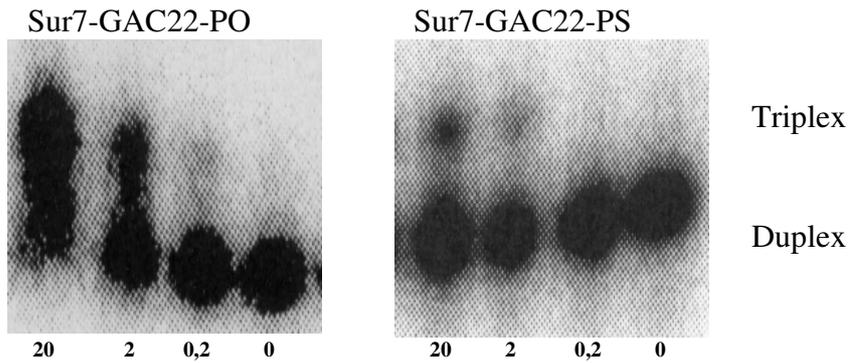


Abb. 45 EMSA Darstellung der Triplexbildung der TBO Sur7-GAC22-PO und PS in verschiedenen Konzentrationen (TBO in pmol).

3.3.2 Einfluss verschiedener Transfektionsmittel auf die Transfektionseffizienz

Analog zu den Versuchen unter 3.2.5 wurden auch bei den A₅₄₉ Zellen die beschriebenen Liposome untersucht, um bestmögliche Transfektionsraten zu erzielen.

3.3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

3.3.2.1 a Dosper

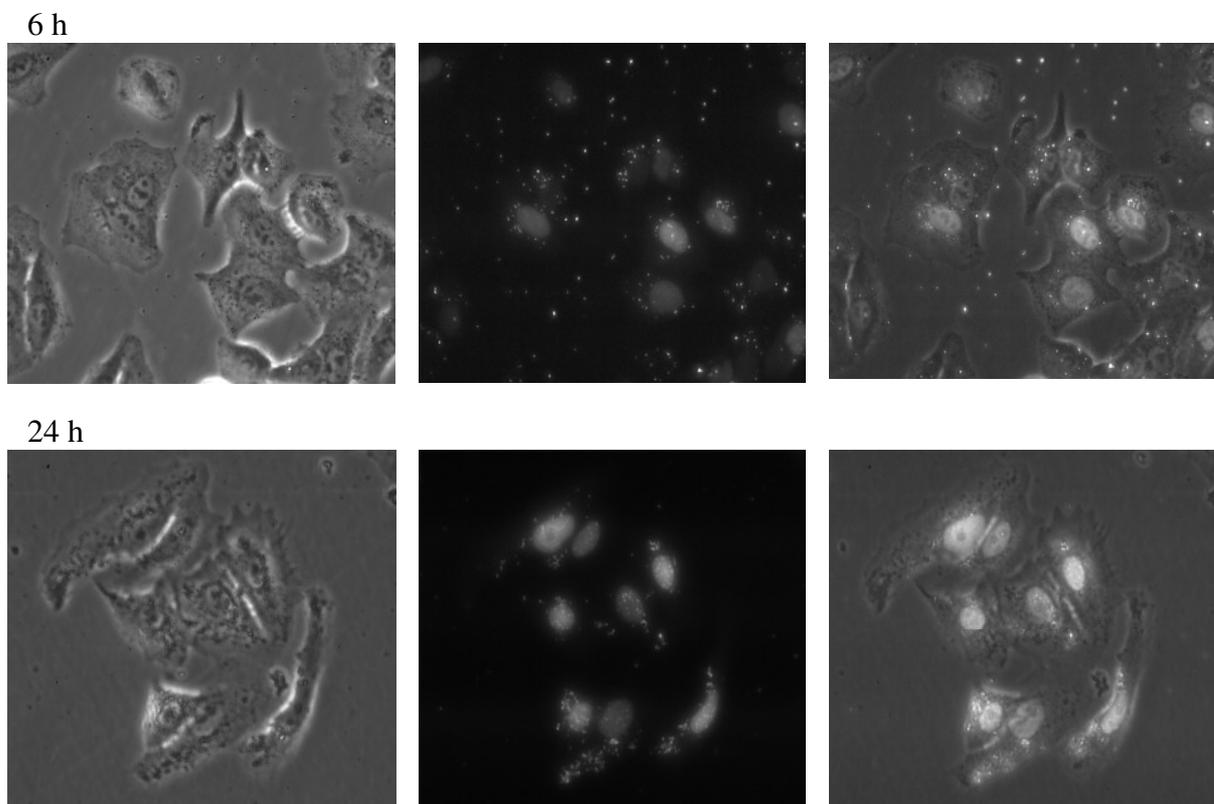


Abb. 46 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der A₅₄₉ Zellen nach Transfektion mit Dosper zu verschiedenen Zeitpunkten. V.l.n.r.: Phasenkontrast-, Fluoreszenzaufnahme und Überlagerung beider Bilder.

48 h

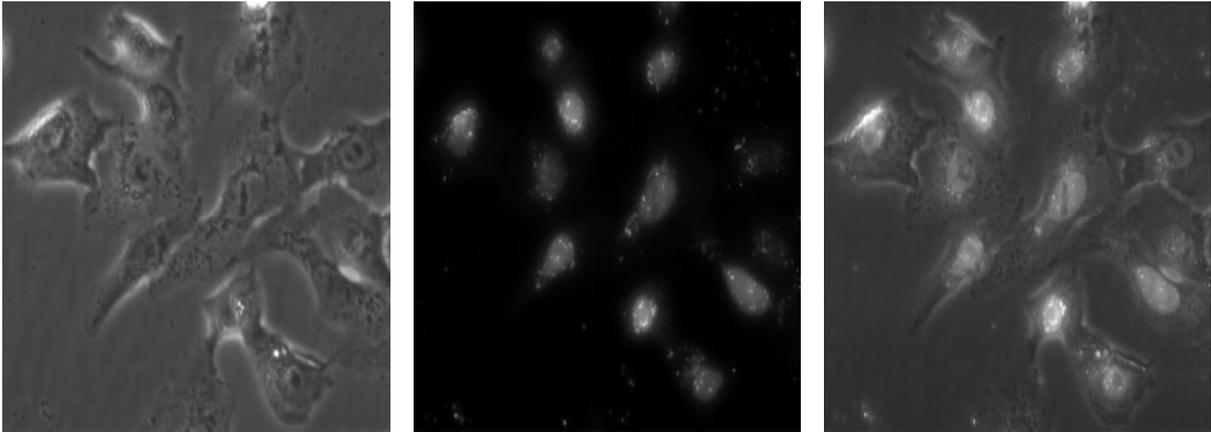
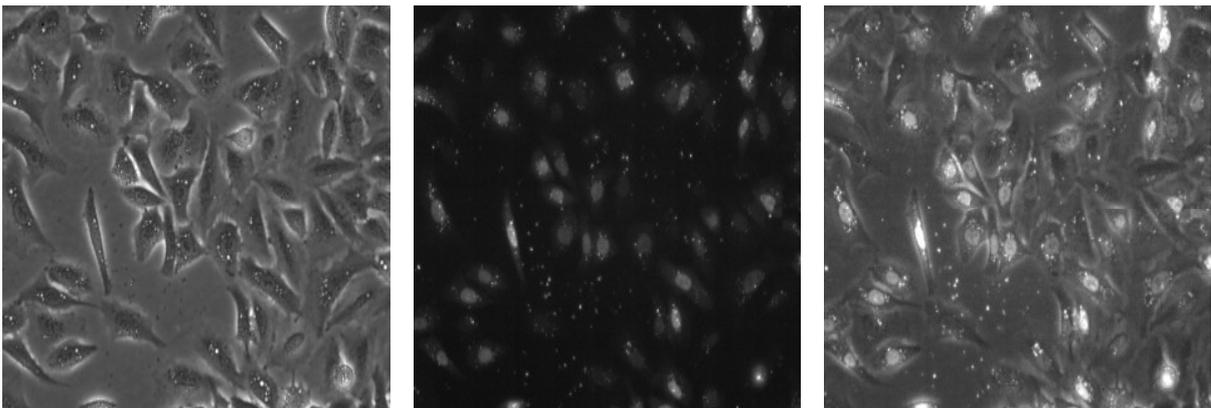


Abb. 47 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der A₅₄₉ Zellen nach Transfektion mit TBO / Dosper nach 48 Stunden. V.l.n.r.: Phasenkontrast-, Fluoreszenzaufnahme und Überlagerung beider Bilder.

3.3.2.1 b Effectene

24 h



48 h

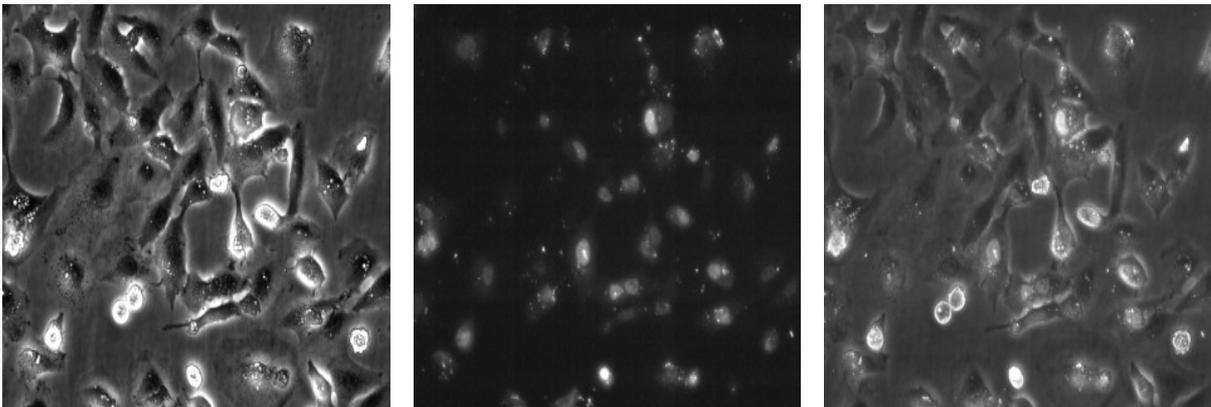


Abb. 48 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der A₅₄₉ Zellen nach Transfektion mit TBO / Effectene nach 24 und 48 Stunden. V.l.n.r.: Phasenkontrast-, Fluoreszenzaufnahme und Überlagerung beider Bilder.

3.3.2.1 c FuGene 6

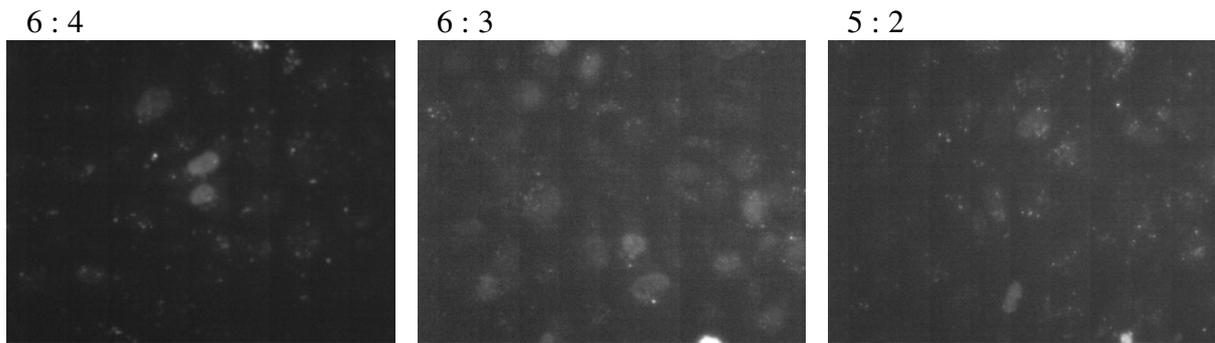


Abb. 49 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der A₅₄₉ Zellen nach Transfektion mit TBO : FuGene 6 in [µg] : [µl] nach 24 Stunden.

3.3.2.2 FACS gestützte Analyse

Auch hier wurden wie in 3.6.2.1 die Zellen jeweils in einem zweiten Ansatz nach Inkubation mit dem Gemisch aus FITC-TBO und Liposom für die FACS Analyse aufbereitet. Pro Ansatz wurden 10 000 Zellen ausgewertet und die Anzahl der fluoreszierenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrolle bestimmt. Die einzelnen Werte sind graphisch in Diagrammen dargestellt. Beispielhafte Darstellung der Intensitätsverteilung der mit FITC-TBO transfizierten Zellen.

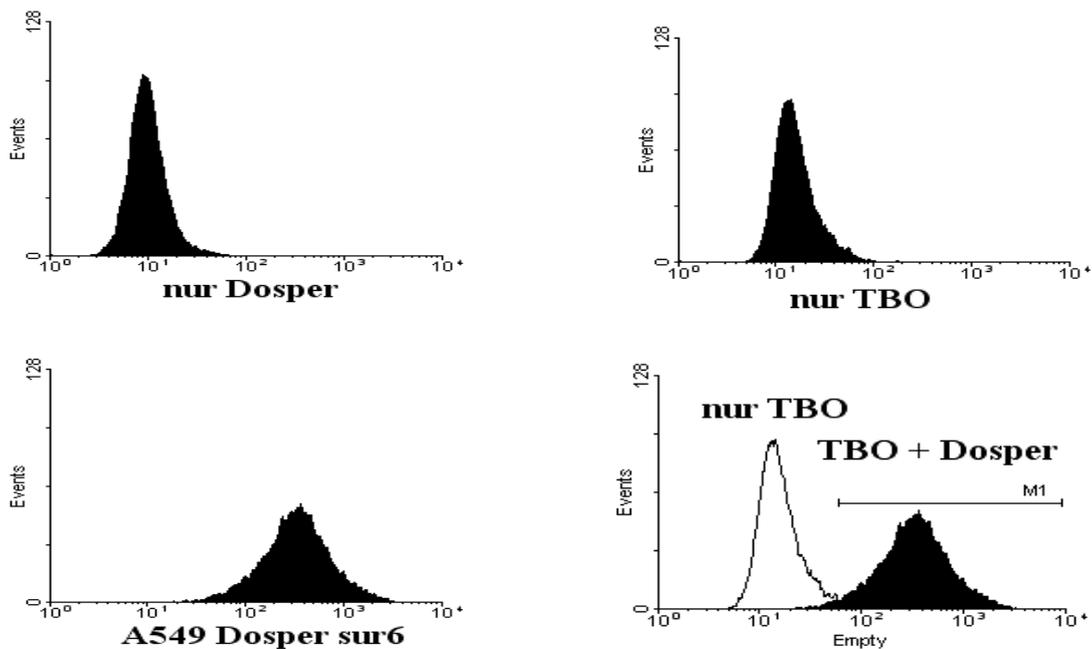


Abb. 50 Darstellung der FACS Analyse. Ordinate: Intensitätsverteilung, Abszisse: Zellzahl. Rechts unten Überlagerung der Abbildungen oben rechts mit unten links. Nur Dosper: Gabe des Liposoms ohne TBO, A549 Dosper sur6: Inkubation von Liposom + TBO (Sur6-GA24-PO).

3.3.2.2 a Dosper

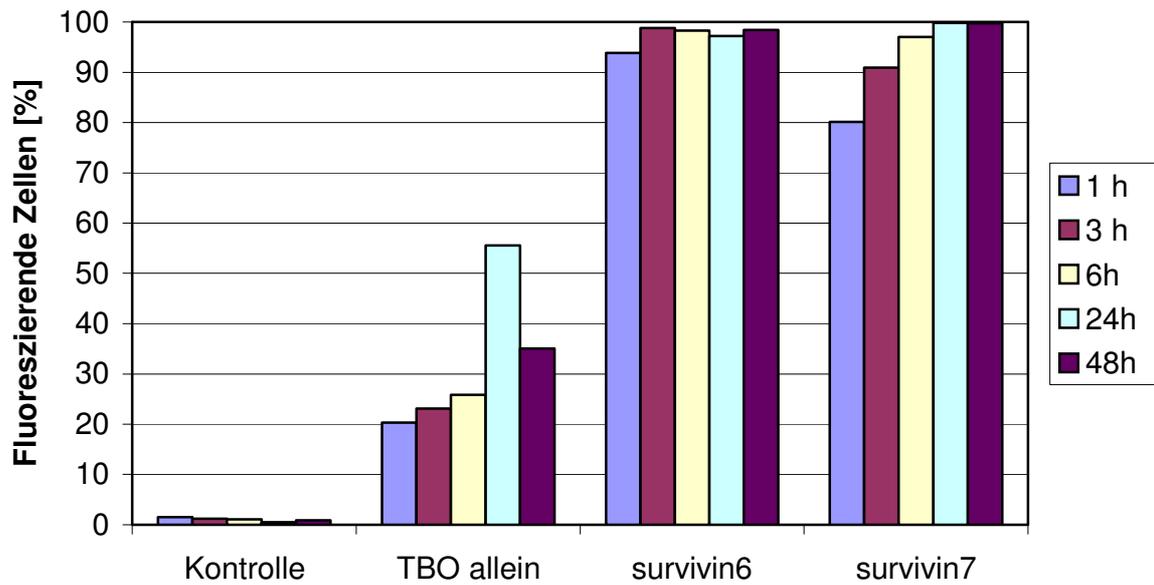


Abb. 51 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; TBO allein: ohne Zugabe von Liposom; Verhältnisse der TBO (survivin6 und survivin7) zu Dosper: jeweils 4 µg zu 6 µl.

3.3.2.2 b Effectene

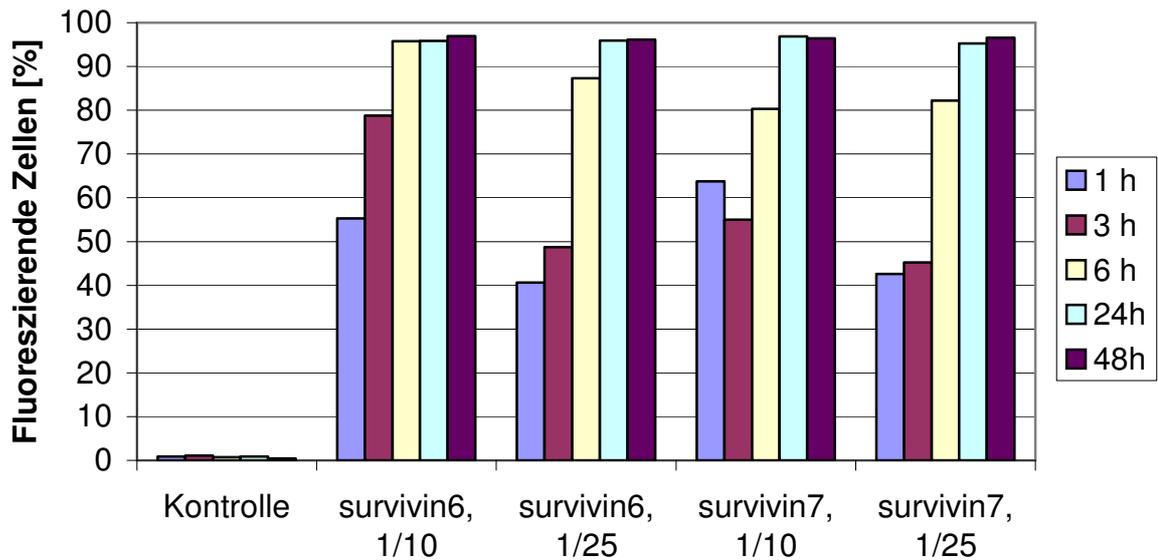


Abb. 52 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO (survivin6 und survivin7) in µg zu Effectene in µl.

3.3.2.2 c FuGene 6

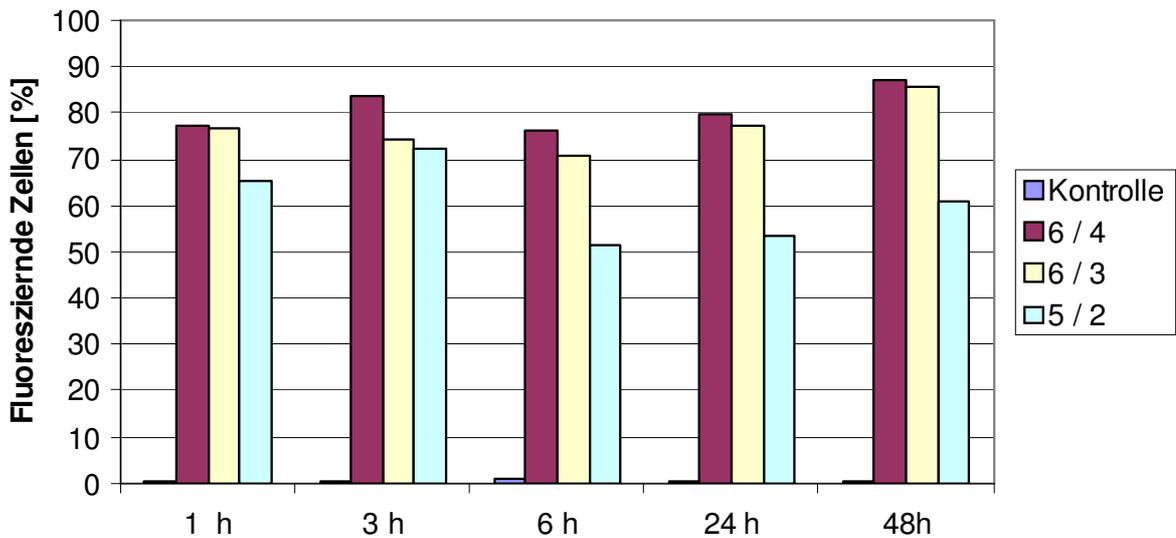


Abb. 53 Relative Anzahl fluoreszierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Kontrolle: ohne Zugabe von TBO; Verhältnisse der TBO (survivin 6) in μg zu FuGene 6 in μl .

3.3.3 Hemmung der Proteinexpression

Die beschriebenen A549 Zellen wurden mit TBO / Liposom für 5 Stunden inkubiert. Eine weitere Transfektion bei den gleichen Zellen erfolgte erneut nach 24 und 48 Stunden. Anschließend führten wir eine Proteinextraktion nach 48, 72 und 96 Stunden nach Inkubation durch. Die Survivin Proteinmengen wurden mit Western-Blot ermittelt. Abbildung 54 zeigt, dass die TBO sur6-GA24-PS, sur6-GA24-PO und sur7-GAC22-PO die survivin Expression reduzieren können, die Kontrollen die Proteinbildung nicht beeinflussen.

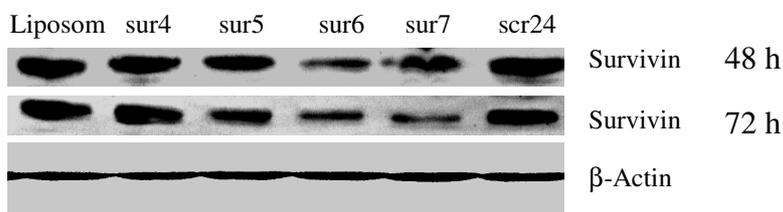


Abb. 54 Western-Blot nach Inkubation von A549 Zellen mit TBO (sur4 bis sur7) plus Liposom und den beiden Kontrollen (Liposom allein und scr24, einem unspezifischen 24 Basen langen Oligonukleotid).

3.3.4 Antiproliferative Effekte

Wie unter 3.3.3 wurden die A_{549} Zellen wiederholt mit den spezifischen TBO und Kontrollen inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Zellzahl dann ermittelt. In jedem well einer 6 well Platte befand sich die gleiche Zellzahl (2×10^5). Die Zellen wurden trypsiniert, immer im selben Volumen aufgelöst und schließlich ausgezählt. Abbildung 55 zeigt, dass sur6-GA22-PS und sur7-GAC24-PO gute antiproliferative Eigenschaften besitzen. Zusätzlich zeigen auch komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide (PS) ihre biologische Wirksamkeit.

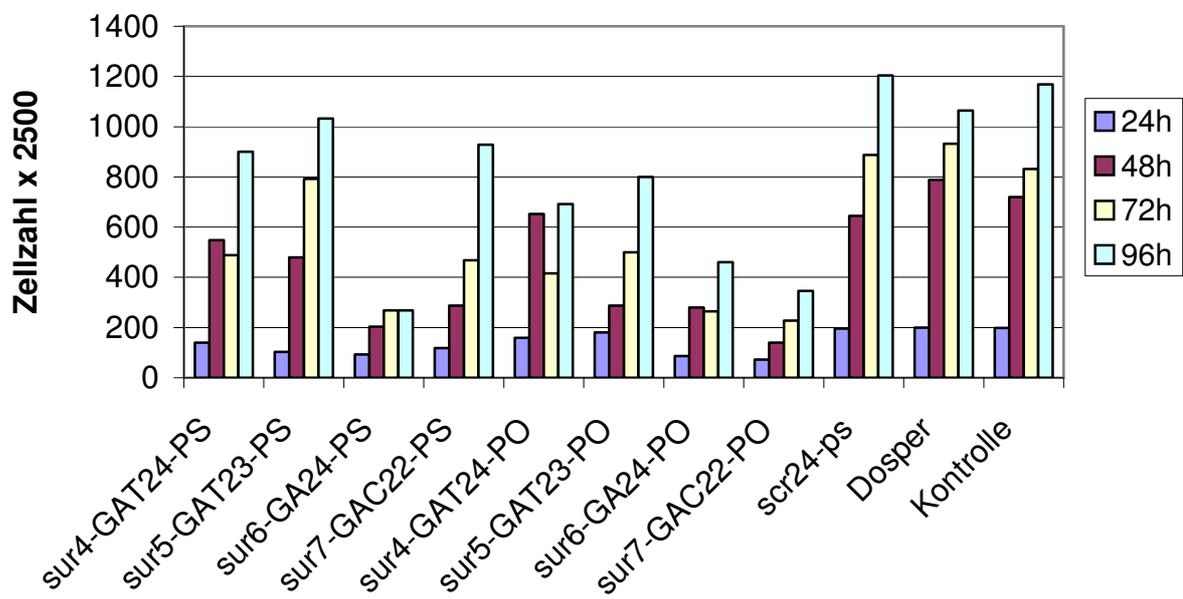


Abb. 55 Nach Inkubation von A_{549} Zellen mit den jeweiligen TBO bzw. Kontrollen wurde die Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

3.3.5 Apoptoseinduktion durch TBO in A_{549} Zellen

Erneut wurden die Zellen wie oben beschrieben mit TBO inkubiert. Zu den einzelnen Zeitpunkten wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und mit Annexin V – EGFP bei Raumtemperatur für 15 min. behandelt, nochmals gewaschen und in $500 \mu\text{l}$ Bindungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann im FACS – Gerät untersucht. Die Ergebnisse, in Abbildung 56 dargestellt, weisen sur6-GA24-PS als effektivsten Vertreter zur Apoptose-induktion aus. Allerdings tritt Apoptose zu einem gewissen Grad auch bei den Kontrollen auf.

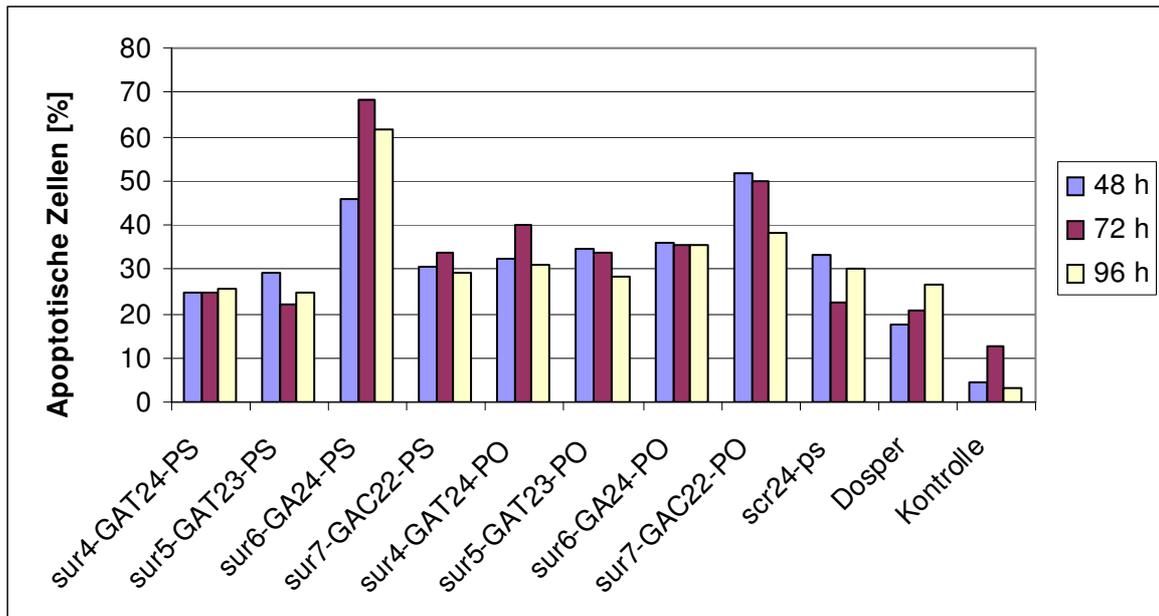


Abb. 56 Apoptoseinduktion in A549 Zellen mit den jeweiligen TBO bzw. Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Werte wurden aus der FACS - Analyse nach Inkubation mit fluoreszierendem Annexin V – EGFP gewonnen.

3.3.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

In den Abbildungen 57 - 59 sind die einzelnen behandelten Zellen dargestellt.

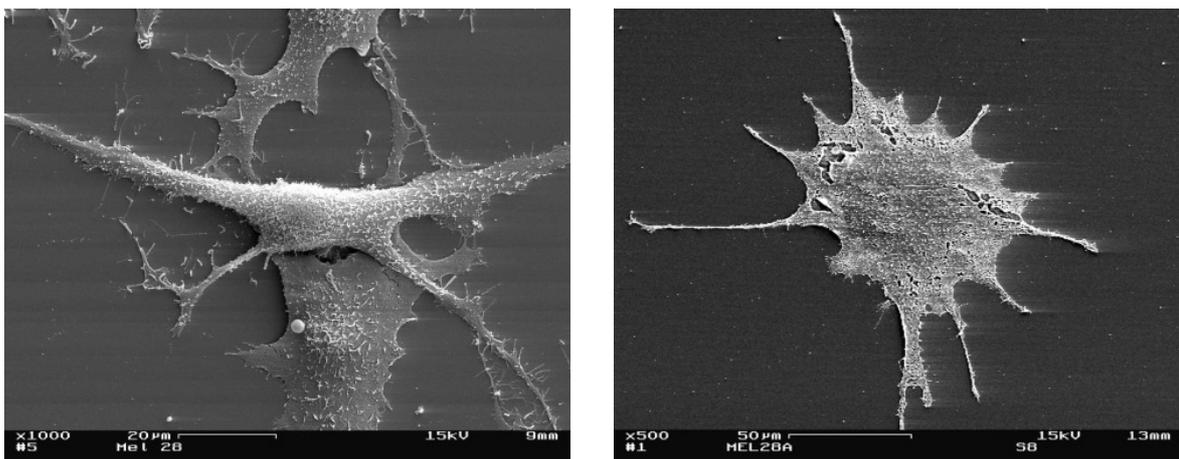


Abb. 57 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Melanomzellen nach Inkubation mit TBO / Liposom.

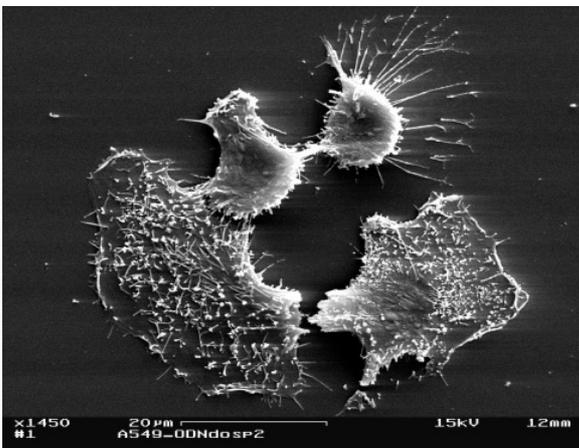
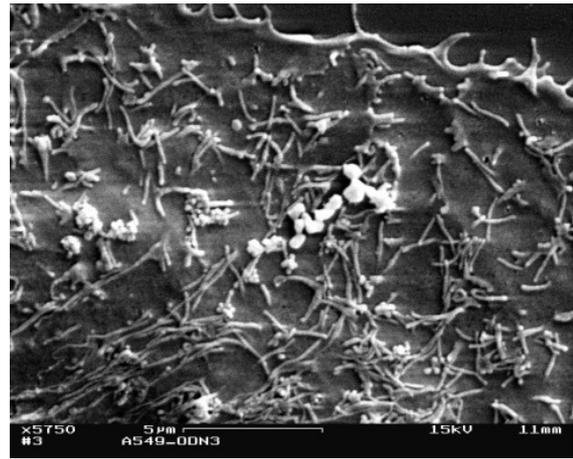
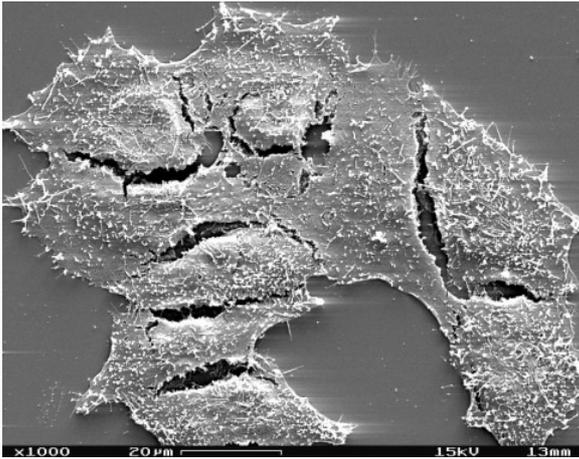


Abb. 58 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von A549 Zellen nach Inkubation mit TBO / Liposom. Rechts oben Ausschnittsvergrößerung mit Darstellung der kugelförmigen Liposomkomplexe.

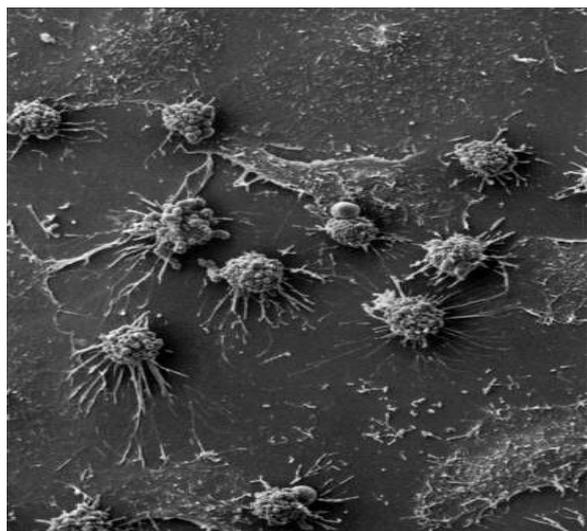
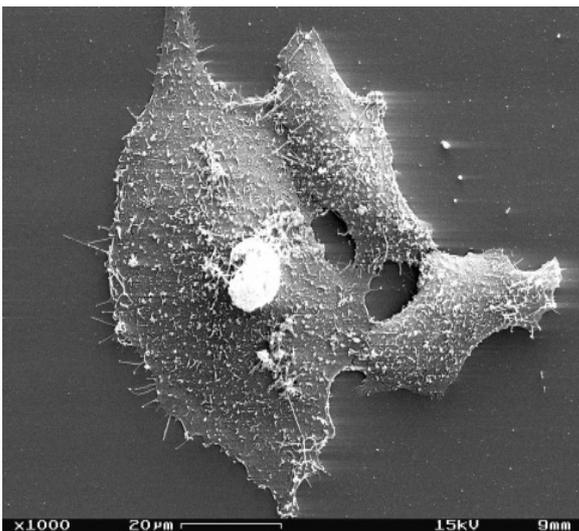


Abb. 59 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von HeLa Zellen nach Inkubation mit TBO / Liposom. Im rechten Bild könnte es sich bei den kugelförmigen Zellen um apoptotische Zellen handeln.

4 Diskussion

Generelles Ziel der Arbeit war die Gen-Inhibierung klinisch relevanter Proteine. Dies sollte mit geeigneten triplexbildenden Oligonukleotiden (TBO) erreicht werden. Bei einigen Tumorentitäten liegt ein Ungleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Signalwegen zugunsten der letztgenannten vor. Die Down-Regulation der beiden von uns ausgewählten antiapoptotischen Gene *bcl-2* und *survivin* wurde bereits mit Antisense Oligonukleotiden erreicht. Hierdurch konnte der programmierte Zelltod wieder in Gang gesetzt werden. Dadurch, dass nur zwei Zielgene statt vieler mRNA Transkripte pro Zelle vorliegen, sollen die TBO die Inhibierung der Proteinexpression im Vergleich zur Antisense Strategie weiter verbessern. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der Arbeit diskutiert und mit dem Stand der aktuellen Literatur verglichen.

4.1 Oligonukleotide in der Tumorthherapie

4.1.1 Inhibition der 3' untranslatierten Region (UTR) des *bcl-2* Gens

Mit den TBO konnte die *in vitro* Hemmung der Transkription sowie die Expression von weiteren Zielgenen im Zellkulturmodell durch Bindung an deren Promotoren nachgewiesen werden [10, 38, 48, 56, 72, 79, 83, 123, 137, 151, 174]. Die 3'UTR wurde bisher noch nicht als Bindungsstelle verwendet. Es mehren sich Hinweise, dass die 3' untranslatierte Region eine regulatorische Funktion zur Genexpression besitzt, wobei es schwierig ist dies nachzuweisen, da diese Region strukturell nicht so streng aufgebaut ist wie die Promotorregion, an die die Transkriptionsmaschinerie bindet [24, 93, 103]. Der Triplex-Ansatz könnte eine interessante Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der 3'UTR sein.

Der 3'UTR-Abschnitt von *bcl-2* wurde in dieser Arbeit zum einen wegen der Möglichkeit ausgewählt, eine wichtige Rolle in der Genregulierung zu spielen und zum anderen, dass durch die unterbrochene Elongation und das hierdurch verkürzte mRNA Transkript ohne den fehlenden poly-A tail instabil wird und einer raschen Degradierung unterworfen ist. Ein weiterer Grund zur Wahl der 3'UTR war, dass wir den möglichen Einsatz der TBO innerhalb eines Gens weiter auf die codierenden und nicht kodierenden Bereiche ausdehnen wollten.

Wir identifizierten einen 18bp langen purinreichen Abschnitt auf dem 3'UTR von *bcl-2*. Unsere Daten konnten nachweisen, dass es möglich ist, eine stabile Tripelhelix mit dem Polypurinstrang der target DNA in antiparalleler Ausrichtung auszubilden (Abb. 3). Die Fähigkeit des TBO die *bcl-2* Expression zu blockieren, ist gleichzeitig auch ein Nachweis sowohl für die Aufnahme des transfizierten Plasmids in den Zellkern als auch die Stabilität der formierten Tripelhelix innerhalb der Zelle. Unseres Wissens nach ist dies der erste Versuch TBOs gegen die 3'UTR eines Gens einzusetzen.

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität verwendeten wir den „electrophoretic mobility shift assay“ mit dem Ergebnis, dass stabile Triplexe bei physiologischen pH-Werten gebildet werden konnten. Als nächstes wurde getestet, ob die TBO auch an Plasmide binden können. Radioaktiv markierte TBO wurden hierzu mit dem Plasmid pTRE-*bcl2-tri* in steigender Konzentration inkubiert. Abbildung 12 stellt die konzentrationsabhängige Triplexbildung mit dem Plasmid dar. Die spezifische Triplexbildung konnte ebenfalls im Luciferase-Assay nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten größere unspezifische Bindungen am Reporterplasmid pGL-2 ausgeschlossen werden (Abb. 13). Um die inhibitorischen Eigenschaften der TBO *in vitro* zu zeigen, wurde ein Tetra- bzw. Doxycyclin induzierbares Tet-on Expressionssystem etabliert. Hierbei wurden HeLa-Zellen zunächst stabil mit einem regulatorischen Plasmid transfiziert, welches für ein Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (rtTA) kodiert. Unter Vorliegen von Doxycyclin fungiert dieser als Transkriptionsfaktor auf einem zweiten, dem Response Plasmid, das den gewünschten DNA-Abschnitt enthält. Abbildung 7 zeigt die Expression von *Bcl-2* bei Doxycyclinkonzentrationen von 200 ng/ml. Nach Inkubation TBO mit dem Plasmid *in vitro* wurden die präformierte Triplexstruktur komplett in die HeLa-Zellen transfiziert. Wie erwartet, zeigten im Western-blot nur TFO 1 und TFO 2 eine Reduktion von *Bcl-2* auf, die Kontrollen jedoch nicht. TFO 1, das eine Pyrimidinunterbrechung in seiner Sequenz aufweist, konnte nur teilweise die Transkription hemmen, was im Einklang zu den Untersuchungen von Svinarchuk et al. steht, dass besonders nur aus Purinbasen bestehende TBO ausgesprochen starke Triplexe formieren können. Einer anderen Arbeitsgruppe war eine unspezifische Inhibierung eines Plasmids durch Kontroll-Oligonukleotide aufgefallen, als diese im Überschuss vorlagen [80]. In der aktuellen Arbeit wurden keine signifikanten unspezifischen Wirkungen der Kontroll-TBO beobachtet, auch ohne zusätzliches Aufreinigen nach der Inkubation. Beal und Dervan konnten zeigen, dass G * G – C, A * A – T und T * A – T Triplexe die Tripelhelix stärker stabilisieren als die übrigen Verbindungen und dass eine Thyminbase besser als A, C oder G an die Cytosinbase des

DNA-Strangs bindet [9]. Bei unseren Versuchen wies allerdings das TBO mit der Cytosinbase (TBO4), statt die mit der Thyminbase (TBO1, 2), eine bessere bcl-2 Inhibierung auf (Abb. 16).

Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass die bcl-2 Expression bereits bei einem molaren Verhältnis von 12,5 : 1 zwischen TBO und Plasmid-DNA und teilweise sogar bei Verhältnissen von 1,25 : 1, blockiert werden kann (Abb. 15). Darüber hinaus unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass stabile Triplexbindungen auch ohne kovalente Verbindung speziell modifizierter Oligonukleotide mit der DNA, die Elongation des Transkriptionsvorganges hemmen können [41].

Mehrere Arbeiten konnten nachweisen, dass TBO, die an DNA Stellen binden, an die sonst positive Regulationsfaktoren binden, die Transkription wirksam inhibieren können. McShan et al. konnten die Transkription eines viralen Gens von HIV blockieren, indem sie TBOs einsetzten, die sich an die Sp1 Bindungsstelle innerhalb von „long terminal repeats“ (LTR) anlagern [108]. Durch Binden von TBO an den humanen Ki-ras oder Her-2 / Neu Promotor gelang es hierdurch bei Kernextrakten von HeLa-Zellen, das Anlagern von Proteinen an diese Region zu verhindern [39, 105]. In einem anderen Modell konnte die Transkription von c-myc, einem Proto-Onkogen, in einem zellfreien Transkriptionssystem blockiert werden. Die TBO konnten hier das Binden eines Transkriptionsfaktors, MAZ, an den P2 Promoter des c-myc Gens hemmen [78]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Sp1 durch eine Tripelhelix an seiner Bindung am Cyclin D1 Promotor gehindert werden konnte und hierdurch es nicht zur Expression des Proteins kam [79]. Die TBO vermittelte Transkriptionshemmung mag aber auch darin begründet sein, dass hierdurch das Ausbilden des Initiationskomplexes verhindert werden kann. Maher et al. konnten dies *in vitro* an TBO, die an die Promotorregion gebunden waren, nachweisen. Diese verhinderten nämlich eher das Zusammenlagern des Initiationskomplexes als das Anlagern des positiven Regulationsfaktor [100].

Kodierende Sequenzen, wie z. B. die 3'UTR bleiben eine potenzielle Zielregion der Triplexformierung und könnten hiermit die Anzahl der möglichen Zielsequenzen für die TBO innerhalb des gewünschten Gens erhöhen. Ein weiterer Vorteil an kodierenden Abschnitten der DNA zu binden, ist dass die TBO hier nicht mit eventuell gebundenen Transkriptionsfaktoren konkurrieren müssen [38].

Mit einer Phosphorthioat-Modifikation oder terminalen 3' Aminogruppe versehene TBO war es immer noch möglich, Tripelhelices zu bilden und die Aktivität des c-pim-1 Promotors zu hemmen [151]. Dies konnte auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt

werden, wie es Abbildung 14 zeigt. Am Beispiel von TFO4 zeigt sich, dass eine 3' amino Markierung die bcl-2 Expression bis zu 72 Stunden nach Transfektion zu hemmen vermag (Abbildung 16).

Um die *in vivo* Wirksamkeit der TBO zu testen, wurden HeLa mit dem beschriebenen Tet-on Expressionssystem stabil transfiziert, um eine konstante Bcl-2 Expression zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann mit Hilfe des Liposoms Dosper mit den jeweiligen TBO und mit Kontrollen transfiziert. Abbildung 17 zeigt allerdings keine nennenswerte Down-Regulierung des Proteins im Western-Blot. In einem zweiten Versuch wurde die Transfektion jeweils nach 24 Stunden wiederholt, falls die intrazelluläre Konzentration im vorherigen Versuch zu gering ausgefallen sein sollte. Aber auch hier zeigte sich kein inhibitorischer Effekt der TBO nach 24 bis 72 Stunden. Obwohl es *in vitro* möglich war, die Transkription des Proteins auf Höhe der 3' UTR zu hemmen, waren die TBO nicht fähig, dieses auch *in vivo* in den Zellen zu vollbringen. Auch in der Lymphom-Zelllinie DOHH₂ konnte der Nachweis der Protein-inhibierung nicht erbracht werden (Abb.18). Mögliche Ursachen hierfür können folgende sein:

- Unzureichende zelluläre Konzentration der TBO um an die Ziel DNA zu binden
- Schneller intrazellulärer Abbau der TBO
- Verbleiben der TBO in verschiedenen Zellkompartimenten
- Die Ziel-DNA ist für das TBO nicht erreichbar
- Das gebundene TBO kann die Transkriptions-Initiation, das Binden von Transkriptionsfaktoren, die Elongation oder die Chromatin Konfiguration nicht beeinflussen.

Diese Faktoren müssen zunächst geklärt werden, um eine effektive Triplex vermittelte Therapie durchführbar zu machen.

4.1.2 Bcl-2 Triplexbildende Oligonukleotide, Promotorregion

Zwar konnte *in vitro* die Bcl-2 Proteinexpression inhibiert werden, jedoch war dies *in vivo* sowohl in den transfizierten HeLa- als auch in den DOHH₂-Zellen nicht möglich. Potentielle Ursachen hierfür sind bereits oben genannt. Um auszuschließen, dass der Zielbereich in der 3'UTR an sich ungeeignet war, wurde eine weitere purinreiche Zielsequenz in der Promotorregion des bcl-2 Gens identifiziert. Das bcl-2 Proto-Onkogen

besitzt 3 Exons, von denen Exon I nicht translatiert wird. Der Hauptpromotor P1 ist 1,4 kb oberhalb der Translationsstarts lokalisiert. Ein weiterer, weniger starker Promotor P2 befindet sich 1,3 kb unterhalb von P1. Transkripte, die von diesem Promotor P2 ausgehen, wurden in einigen Geweben beschrieben [143, 160]. Eine spezifische Triplexbildung am P1 Promotor wurde in der Literatur bereits nachgewiesen [123]. In der aktuellen Arbeit wurden Zielsequenzen (Target B – D) etwas unterhalb des Promotors P1 ausgewählt, wie unter Abschnitt 3.2 dargestellt. Sollten die TBO hier binden, so könnten sie die Transkription ab P1 oder die Effektivität von P2 negativ beeinflussen. Da leider in jeder Zielsequenz eine Pyrimidinunterbrechung in dem Polypurinstrang vorkommt, wurden unterschiedliche Modifikationen an den TBO vorgenommen. In Abbildung 20 sind die jeweiligen TBO Sequenzen dargestellt. Über den „Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)“ wurden dann die TBO mit den besten Bindungseigenschaften ausgesucht. Hier zeigte sich, dass es bei Target C zu keiner ausreichenden Triplexbildung kam (Ergebnisse nicht abgebildet). Sowohl bei den Targets B und D waren bei den GA-Motiv TBO geringere Konzentrationen erforderlich, d.h. sie weisen eine höhere Bindungsaffinität auf, als bei den GT-Motiv TBO. Diese Ergebnisse passen zu früheren Daten, die ebenfalls besagen, dass die GA-Motiv TBO eine deutlich stärkere Bindung eingehen [151]. Generell sollten die TBO eine Länge von mindestens 13 Nukleotiden aufweisen. Innerhalb von Target B ist eine 14 bp lange Purinsequenz ohne eine Pyrimidinbase. Die hohen Affinitäten der TBO an Target B könnten hieraus resultieren (78.6% Guaninanteil). Wir untersuchten entsprechend ein nur 14 Basen langes Nukleotid Analog zu B-GAT20-PO, welches im EMSA fast die gleichen Affinitäten zeigte. Sollten die guten Bindungsaffinitäten der Target B TBO also auf diesen 14 Purinbasen beruhen, wären diese prinzipiell weniger für einen spezifischen TBO-Ansatz geeignet, da diese Sequenz nicht spezifisch für den bcl-2 Promotor sind.

Wie in der Einleitung erläutert, sind die bevorzugten Triplexe bei einer Pyrimidinunterbrechung im Polypurinstrang G*T–A, T*C–G und C*C–G bei paralleler und C*T–A and T*C–G bei antiparalleler Ausrichtung [168]. Die bei uns statt Adenin eingesetzte Thyminbase im Triplexstrang (T*T–A) zeigte allerdings keine zusätzlichen negativen Eigenschaften (s. Abb. 21 und 23). Dass bei Target C kein passendes TBO gefunden werden konnte, mag wohl an der zentral gelegenen Cytosinbase der Ziel-DNA liegen. Clarenc und Kollegen konnten zeigen, dass Purin-Motiv TBO reich an Guaninbasen sein müssen (>65%) [21]. In unserem Fall beträgt der Guaninanteil der Target B TBO lediglich etwa 55%. Dass hier trotzdem Triplexbindungen zustande

kommen, kann an den sechs Guaninbasen am 3'Ende des TBO liegen. Bei Target D, wo sehr stabile Triplexe ausgebildet werden, liegt der Anteil bei 70%, bei Target C nur bei 50%.

Die Stabilität von Oligonukleotiden in Zellen, Serum oder im gesamten Organismus ist von essentieller Bedeutung, sollen diese erfolgreich im klinischen Kontext eingesetzt werden. In eigenen Untersuchungen konnten wir die intrazelluläre Stabilität von TBO mit endständigen Phosphorthioat- und Aminomodifikationen für mindestens 48 Stunden nachweisen, ohne dass sie ihre Bindungseigenschaften verlieren [144]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls die Wirksamkeit von komplett phosphorthioat-modifizierten TBO gegen c-myc in einer Leukämiezelllinie nachweisen [107]. Analog hierzu wurden auch in unserer Arbeitsgruppe TBOs mit vollständigem Phosphorthioatgerüst eingesetzt. Ihre Triplexbildung konnte im EMSA, im Vergleich allerdings nur bei höheren Konzentrationen, nachgewiesen werden, was aufgrund der höheren zellulären und Serumstabilität jedoch gerne in Kauf genommen wird. Um eine spezifische Bindung der TBO nachzuweisen, inkubierten B-GAT20-PO mit einem 203 bp langen DNA-Fragment und dem Plasmid pGEM-T/bcl-2B, welche beide Target B beinhalten. Bei gleich bleibender Konzentration von radioaktiv markiertem TBO konnte eine spezifische Triplexbildung nachgewiesen werden. Auch bei hohen Konzentrationen der Kontrolltargets war keine unspezifische Triplexbindung nachweisbar. Allerdings zeigt sich eine zusätzliche nicht erwartete Bande, die zwischen ungebundenem TBO und der Triplex verläuft. Cogoi und Mitarbeitern ist bei ihren Untersuchungen dieselbe Bande aufgefallen [23]. Ursache hierfür könnte z.B. eine veränderte Ladung der TBO, eine instabile radioaktive Markierung oder eine Di- bzw. Polymerisierung sein. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die TBO stabile und spezifische Triplexbindungen mit ihrer Zielsequenz innerhalb der bcl-2 Promotorregion eingehen.

In einem weiteren Schritt konnten wir die eigentliche Wirkung der TBO, nämlich die Transkriptionshemmung in einem speziellen Luciferase Assay darstellen (Abbildung 27). Hierbei war das Plasmid LB322 mit Target B und dem Luciferase Gen bereits in vitro mit der TBO inkubiert und erst anschließend in die HeLa - Zelllinie transfiziert worden. Nach 48h wurde dann die Luciferaseaktivität gemessen. Interessanterweise hatte B-GAT20-PS, welches im EMSA eine etwa 10-fach niedrigere Bindung als B-GAT20-PO besitzt, eine vergleichbare hemmende Wirkung. Überraschend war, dass B-GTT20-PO, welches eigentlich eine stärkere Affinität zu Target B aufweist, nur eine sehr geringe Transkriptionshemmung aufzeigte. Eventuell lag hierfür eine schnellere intrazelluläre

Dissoziation vom Target aufgrund des höheren Pyrimidinanteils vor. In der aktuellen Arbeit sind wir dieser Fragestellung nicht weiter nachgegangen. Zum weiteren Spezifitätsnachweis hatten wir die TBO auch mit einem Kontrollplasmid mit dem Luciferase Gen aber ohne die Zielsequenz B inkubiert. Eine unspezifische Aktivitätsminderung konnte hier nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Zum Nachweis der in vivo Wirksamkeit hatten wir die Lymphomzelllinie DOHH₂ mit den TBO inkubiert. In der entsprechenden Western-blot Auswertung konnte jedoch keine Reduktion von Bcl-2 Protein nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache kann die schlechtere zelluläre Aufnahme der TBO speziell in den DOHH₂-Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sein. Deshalb haben wir in einer weiteren Zelllinie, Melanomzellen SK-Mel-28, den Versuch in analoger Weise wiederholt. Aber auch bei diesem Ansatz konnte keine signifikante Bcl-2 Reduktion nachgewiesen werden. Gründe hierfür könnten in erster Linie wie die zuvor unter 4.1.1 genannten sein.

4.1.3 Survivin Triplexbildende Oligonukleotide

Wie eingangs beschrieben, ist Survivin ein Mitglied der IAP-Proteinfamilie, welche die Apoptose inhibieren können. Es ist bei vielen Tumoren jedoch nicht in adultem Normalgewebe überexprimiert, was es zu einem interessanten und tumorspezifischen Zielmolekül macht [3, 8]. Vor allem beim Bronchial- und Mammakarzinom findet sich eine hohe Survivinexpression wieder [8, 154]. Eine erhöhte Survivinexpression wird als ein prognostisch relevanter Faktor bei Patienten mit soliden und hämatologischen Malignomen diskutiert [2, 4, 5, 31, 87, 98, 112, 163].

Die Promotorregion des humanen Survivin-Gens enthält keine TATA-Box sondern weist vielmehr zahlreiche CpG Inseln auf. Des Weiteren finden sich Bindungsdomänen für Zellzyklus abhängige Proteine, eine Zellzyklus Homologie-Region und viele Sp1 Regionen (spezielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1). Es gibt zwei Hauptbereiche für den Transkriptionsstart, bei -72 und bei -61 bzw. -57 relativ zum Startcodon ATG. Die Promotorregion enthält zusätzlich Verstärker- und Repressorsequenzen. Eine zweite weniger starke Promotorregion befindet sich etwa 230 Nukleotide proximal des Startcodons [95].

Es konnten 4 Zielsequenzen innerhalb des Survivin Gens für eine mögliche Triplexbildung identifiziert werden. In Intron II befindet sich eine 24 Nukleotid lange purin- / pyrimidinreiche Sequenz mit 2 C – G Unterbrechungen von Position 3016 bis 3036 sowie

eine weitere 23 nt lange Sequenz von 3077 bis 3099. Bei der erstgenannten liegt der Guaninanteil bei etwa 71% und beinhaltet drei vierer und zwei dreier Guaninabschnitte, GGGG bzw. GGG, was eine sehr gute Triplexbildung trotz der einzelnen Pyrimidinunterbrechung ermöglichen müsste. Bei der zweiten Sequenz liegt der Guaninanteil bei etwa 61% und enthält zwei GGGG- und einen GGG-Abschnitt. Entsprechend wurden TBO-Sequenzen, die in antiparalleler Ausrichtung an den Purinstrang binden sollen, ausgewählt. Für die Cytosin-Unterbrechung im Purinstrang der Target-DNA wurde jeweils eine Thyminbase ausgesucht. Falls die TBOs spezifisch an diesen DNA-Abschnitt in Intron II binden, würde das die Transkriptionselongation hemmen und somit kein funktionstüchtiges Survivin entstehen.

Zwei weitere Polypurinabschnitte finden sich in der 3'UTR des survivin-Gens. Der erste 24 nt lange Abschnitt hat einen zur Triplexbildung geringen Guaninanteil mit nur 37,5%, allerdings ohne Pyrimidinunterbrechung. Der zweite 22 nt lange Abschnitt weist eine Pyrimidinbase und einen Guaninanteil von 54.5% auf. Hier wurde bei den entsprechenden TBOs eine Cytosinbase zum Binden an die Pyrimidinunterbrechung ausgewählt.

In den nachfolgenden shift assays konnten zum Teil deutlich unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die einzelnen TBOs aufgezeigt werden. Vor allem die TBO, die an die Ziel-DNA mit dem geringeren Guaninanteil (sur6 und sur7) binden sollten, hatten schlechtere Bindungseigenschaften. Des Weiteren beeinflusste auch der Anteil der zusammenhängenden Guaninbasen (GGGG und GGG) die Bindungsstärke.

Um die Effektivität der TBO in vitro zu testen, wurde ein geeignetes Reportergensystem erstellt. Hierzu verwendeten wir ein fluoreszenzbasiertes System (EGFP) welches anschließend in einer FACS-Analyse ausgewertet wurde. Zunächst wurden die TBOs mit den Reporterplasmiden inkubiert und anschließend in die A549-Zellen liposomal transfiziert. Da die Arbeitsgruppe um Kim et al. bei einem ähnlichen Experiment eine unspezifische Inhibierung durch überschüssige, d.h. ungebundene TBO bemerkte, wurde bei unserem Versuch das Inkubationsgemisch aus TBO und Plasmid vor der Transfektion nochmals über eine sog. „Chroma-spin“ Säule (Clontech) aufgereinigt.

Im nächsten Schritt inkubierten wir die Lungenkarzinom - Zelllinie A₅₄₉ mit den TBO sur4-7. Mittels Western-Blot konnten wir eine spezifische Reduktion der Survivin Proteinlevel um fast 70% in vivo für die TBO sur6-GA24-PO, sur6-GA24-PS und sur7-GAC22-PS nachweisen. Überraschenderweise konnten die beiden TBO sur4-GAT24-PS und sur5-GAT23-PS, die eine sehr kräftige Bindung in vitro aufwiesen, fast keine Proteininhibierung bewirken. Ob eine alleinige Hemmung der Survivin Transkription in

eine Proliferationshemmung mündet, wollten wir mittels einfacher Zellzählung überprüfen. Auch hier konnten die sur6 und sur7 TBO im Vergleich zu Kontroll-ODN eine deutliche Reduktion in der Zellzahl aufweisen. So konnten wir gezielt nachweisen, dass eine Hemmung der Survivin Expression einen antiproliferativen Effekt nach sich zog. Dies lässt sich vielleicht in der zusätzlich zur antiapoptotischen Bedeutung des Survivin durch seine Rolle bei der Zellteilung erklären.

Durch das Abregulieren des Survivin Proteins könnte nun ein Überwiegen von pro-apoptotischen Signalen in den Zellen vorliegen, so dass zusätzlich zur Proliferationshemmung die Zellen vermehrt absterben. Hierzu bedienten wir uns einer speziellen Apoptosefärbung mittels Annexin V, welches in der FACS – Auswertung positiv nachzuweisen war. Die TBO sur6-GA24-PS und sur7-GAC22-PO wiesen einen deutlich höheren Anteil an apoptotischen Zellen als die verwendeten Kontrollen auf. Wobei sich auch eine geringe unspezifische Apoptoseinduktion durch alleinige Zugabe von Liposom oder Kontroll-ODN zeigte.

Ähnliche Ergebnisse konnten durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Beispielsweise konnten Marchand et al. ebenfalls die Elongationshemmung mit N3'-N5' phosphoramid-modifizierten TBO in Zellen nachweisen, die mit einer Polypurinsequenz von HIV I transfiziert waren [101]. Ortsabhängige Mutationen konnten auch durch unmodifizierte TBO induziert werden [167]. Die gleiche Gruppe konnte diesen Effekt in somatischen Zellen erstmals im Mausmodell erfolgreich darstellen [166]. Das bedeutet, dass auch chromosomale DNA im Tiermodell als Zielstruktur für Nukleinsäuren angreifbar ist [49]. Es konnte sogar ein spezifischer Gen- Knockout mittels 2'-O-aminoethyl TBOs erreicht werden [129].

Im Gegensatz zum bcl-2 Modell konnten wir bei survivin durch TBO, die ebenfalls am 3'UTR binden eine effektive Protein Downregulierung in vivo nachweisen, was in erstem Fall nur in vitro gelang.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch synthetische Oligonukleotide stabile Triplexe mit der DNA des humanen survivin-Gens ausgebildet werden können und hierdurch die Transkription in vitro blockiert wird. Darüber hinaus konnte die Hemmung Proteinexpression in vivo nachgewiesen werden, was mit einem verminderten Zellwachstum und einer gesteigerten Apoptoserate einherging. Zusätzlich ist festzuhalten, dass die in vitro gezeigten Effekte nicht einfach in die deutlich kompliziertere in vivo Welt zu übersetzen ist.

4.1.4 Antisense Oligonukleotide

Der Antisense (AS) – Ansatz wird bereits seit einigen Jahren zur spezifischen Hemmung einzelner Gene eingesetzt. Zamecnik et al konnten erstmals 1978 die virale Replikation des Rous sarcoma Virus mittels AS – ODN inhibieren [184]. Seither wurden zahlreiche AS ODN entwickelt um die unterschiedlichsten Zielgene - meist die Tumorentstehung bzw. – progression betreffend – zu blockieren.

Antisense Oligonukleotide bestehen aus kurzen DNA Einzelsträngen, die komplementäre Nucleinsäuresequenzen zum entsprechenden Abschnitt der zu blockierenden mRNA aufweisen. AS ODN der ersten Generation weisen chemische Modifikationen vor allem des Zucker – Phosphatgerüsts (Phosphorthioat) auf. Neuere Generationen beinhalten zum Beispiel Veränderungen am Zuckermolekül in Form einer Methyl- bzw. einer Methoxyethylgruppe am C2' der Ribose auf. Dies verbessert zum einen die Stabilität und zum anderen die Bindungseigenschaften an ihrer Zielsequenz auf dem mRNA – Strang. Allerdings kann hierdurch das Erkennen und der Abbau des Doppelstrangs durch die RNase H eingeschränkt werden. Deshalb versucht man zumindest nur die Enden der AS-DNA entsprechend zu modifizieren und zentral nur eine Phosphorthioat-Modifikation zu belassen um weiterhin das Binden von RNase H zu ermöglichen. Üblicherweise sind die AS – ODN 17 – 23 Nucleotide lang, da man annimmt, dass eine bestimmte Sequenz dieser Länge nur einmal im Genom auftritt und so unspezifisches Binden der AS – ODN verhindert werden kann. Der Wirkmechanismus beruht hauptsächlich auf der Degradierung doppelsträngiger DNA/RNA durch die RNase H. Zusätzlich wird eine Translationshemmung auf Höhe der Ribosomen oder das Behindern von posttranskriptionalen Modifikationen (Blockieren des Splicings, des Anbringens der 5' Cap-Struktur oder des 3' Poly-A Schwanzes) diskutiert.

Prinzipiell unterliegen die AS – Oligonukleotide ähnlichen Problemen wie sie für die TBO gelten. Auch sie müssen in einer ausreichend hohen Konzentration in die Tumorzellen gelangen um stabil an die Ziel mRNA binden zu können. Bisher konnte bei zahlreichen Genen eine effektive Down-Regulierung erreicht werden. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde der Antisense Ansatz beim bcl-2 Gen verfolgt [12]. Am besten untersucht ist dies am Beispiel des Bcl-2 Gens. Erstmals konnten Webb et al. 1997 in einer Phase I/II Studie die Wirksamkeit eines Bcl-2 Antisense ODN nachweisen [177]. In nachfolgenden Phase III Studien mit dem 18 bp langen ODN Oblimersen (alternativ auch G 3139) der Firma Genta® konnte ein durchdringender Erfolg trotz teilweise sehr ermutigender Ergebnisse bisher nicht nachgewiesen werden. Gemeinsam ist den Studien, dass wohl die alleinige

Applikation der AS – ODN nicht ausreichend ist. Vielmehr entfalten sie eine chemosensibilisierende synergistische Wirkung. Aktuelle Übersichtsarbeiten über die bisherigen Studien zur Therapie mit Antisense Oligonukleotiden wurden von Tamm [153] und Gleave [50] veröffentlicht.

4.2 Liposomale Transfektion

Zunächst gibt es bei der Transfektion zwei methodisch unterschiedliche Vorgehensweisen. Die viralen und non – viralen Transfektionen. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die non – virale Strategie der liposomalen Transfektion untersucht [45, 111]. Diese hat den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur Elektroporation nicht invasiv im lebenden Organismus eingesetzt werden kann und die Liposome eine relativ geringe Toxizität aufweisen. Es gibt bereits Medikamente, die von einem Liposom umhüllt sind um ihre zelluläre Konzentration und somit ihre Wirksamkeit zu steigern bzw. Nebenwirkungen zu minimieren. Genannt sei hier liposomales Doxorubicin (Caelyx®), welches für die Therapie beim fortgeschrittenen Mammakarzinom oder beim Ovarialkarzinom als second-line Therapie zugelassen ist [17, 51, 76, 115, 121].

Damit die TBO überhaupt ihre Wirkung entfalten können müssen sie in ausreichender Konzentration in die Zelle und weiter bis in den Zellkern gelangen. Um die zelluläre Aufnahme der TBO zu verbessern, hatten wir bisher das Liposom Dospes verwendet. Durch seine mehrfach kationische Ladung kann es mit den negativ geladenen TBO stabile Komplexe ausbilden und sich gut an die oberflächlich negativ geladene Plasmamembran der Tumorzellen anlagern und seinen Inhalt über Endozytose ins Zellinnere einschleusen. Da es eine ganze Reihe an liposomalen und anderen transfektionsverbessernden Substanzen gibt, haben wir nur eine kleine Auswahl bei unseren Versuchen ausgetestet. Zum einen wollten wir wissen, wie sich die TBO in der Zelle verteilen und ob sie überhaupt bis in den Zellkern vordringen um ihre spezifischen Eigenschaften auszuüben. Wie bereits in den obigen Versuchen dargestellt, war nicht immer eine Inhibierung der Bcl-2 Produktion zu erkennen. Um festzustellen, ob hier die Transfektion der limitierende Schritt war, wollten wir messen, wie viel Prozent der Zellen erfolgreich transfiziert wurden. Hierfür entschieden wir uns für die Durchflußzytometrie mittels Fluoreszenz-Markierter TBO. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen aber nur eine zellassoziierte Fluoreszenz auf. Über die Verteilung der TBO innerhalb der Zellen kann sie in dieser Versuchsanordnung keine Auskunft geben. Deshalb wurden die Zellen in einem zweiten

Ansatz ebenfalls mit fluoreszierenden TBO transfiziert und anschließend qualitativ fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

Es zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede der Transfektionsraten zwischen den einzelnen Liposomen innerhalb der gleichen Zellreihe. Auch das Mischungsverhältnis aus Liposom und TBO hatte einen entscheidenden Einfluss. Zunächst waren wir streng nach den Vorgaben der Hersteller vorgegangen und haben dann auch unterschiedliche Konzentrationen getestet. Generell konnte gezeigt werden dass die Liposome keine wesentliche Eigenfluoreszenz aufwiesen und dass die TBO ohne den Zusatz von Liposom nur in geringem Umfang in die Zellen aufgenommen wurden. Bei den HeLa-Zellen war in der FACS-Auswertung bereits nach 3h eine über 70%ige Transfektion bei den Liposomen zu sehen. Diese steigerte sich bei Dosper und Effectene im zeitlichen Verlauf noch weiter, nur bei FuGene 6 sank die Transfektionsrate nach anfangs raschem Signalanstieg wieder. Im Mikroskop zeigte sich allerdings, trotz des sehr raschen und kräftigen Signalanstiegs im FACS, dass die Fluoreszenz bei Dosper zum Teil nur im Zytoplasma der Zellen nachzuweisen war. Eine deutlich bessere nukleäre Aufnahme konnte bei den HeLa-Zellen, die mit Effectene transfiziert wurden, nachgewiesen werden.

Mit den gleichen Versuchsbedingungen wurde nun die Melanomzelllinie SK-Mel-28 transfiziert. Hier zeigten sich in der Durchflußzytometrie für DOSPER die höchsten Transfektionsraten mit ca. 90% nach 48 Stunden. Bei Effectene und FuGene 6 lagen die Werte mit etwas über 50% deutlich niedriger. Analog zu den HeLa Zellen konnte man bei den mit Effectene transfizierten Melanom Zellen häufiger ein Signal innerhalb der Zellkerne beobachten. Das schwächste Signal war wiederum bei den Versuchen mit FuGene 6 zu sehen.

Nur die DOHH₂ Zellen waren im Vergleich mit den anderen Zelllinien am schlechtesten mit allen getesteten Liposomen zu transfizieren. Dies zeigte sich sowohl in der FACS - Messung als auch in der mikroskopischen Beurteilung. Es ließ sich nur eine randständige, wahrscheinlich oberflächliches Fluoreszenzsignal beobachten. Im Einklang hierzu konnte keine Inhibierung der Genexpression von Bcl-2 im Western – Blot nachgewiesen werden. Das heißt, dass die TBO vermutlich erst gar nicht ins Zellinnere eindringen konnten. Eigentlich ein überraschendes Ergebnis, da bereits dieselbe Zelllinie erfolgreich mit entsprechenden Antisense Oligonukleotiden in vitro und in vivo im Mausmodell transfiziert werden konnte [12, 26, 81]. Auch in klinischen Studien – hier allerdings ohne liposomale Formulierung – wurde Oblimersen, ein Bcl-2 Antisense ODN, bei Non Hodgkin Lymphomen mit nachweislicher Bcl-2 Reduktion eingesetzt [176, 177].

Bei dem zweiten Zielgen, Survivin, verglichen wir die Transfektion analog zu den Bcl-2 TBO mit den gleichen Liposomen in entsprechenden Mischungsverhältnissen nun mit TBOs gegen survivin. Es zeigte sich durchweg bessere Transfektionsraten zwischen 80% (FuGene6) und bis fast 100% (Dosper) nach 24 Stunden in der FACS-Auswertung. Im Unterschied zu den Transfektionen mit den Bcl-2 TBO wurden hier zwei verschiedene survivin TBO getestet. Es zeigten sich geringfügige Unterschiede in den ersten 24 Stunden nach Transfektion zugunsten von survivin 6. Im Fluoreszenzmikroskop konnte man in etwa gleich starke Signale aus den Zellkernen bei Dosper und Effectene sehen. Bei FuGene 6 war ein insgesamt schwächeres und weniger häufiges nukleäres Signal zu erkennen.

Gründe für die unterschiedlichen Transfektionsraten und für die intrazelluläre Verteilung der FITC-markierten TBO könnten zum einen in den verschiedenen Mischungsverhältnissen der Liposom – DNA Komplexe und den hieraus folgenden unterschiedlichen Größenverhältnissen liegen. Dies machte sich vor allem bei FuGene 6 bemerkbar. Zum anderen sind bestimmte Zelllinien nur schwer zu transfizieren und eher nicht liposomale Strategien vorzuziehen. Eventuell könnte auch die FITC-Markierung der Transfektion bzw. der Inkubation mit den Liposomen hinderlich sein. Bei den meisten Transfektionsversuchen wird DNA in Form von Plasmiden mit geeigneten Reportergenen in die Zellen geschleust. Das (sichtbare) Signal wird dann erst in einem zweiten Schritt erkennbar indem die zelleigene Transkription das Reportergen abgelesen hat. In unserem Ansatz handelt es sich um einen direkten Nachweis des zu transfizierenden Agens, da wir wissen wollten bei welchem Schritt die TBO einen möglichen Wirkungsverlust erfahren.

Wenn man sich die mikroskopischen Aufnahmen genauer betrachtet, erkennt man, dass die Liposomen-DNA Komplexe eher punktförmig verteilt in bzw. an den Zellen liegen. Eventuell wäre das ein Zeichen für eine Akkumulation in Endosomen in den Zellen bzw. für ein Haften an der Zelloberfläche und der Vorgang der Endozytose nicht ordnungsgemäß von statten läuft. Denn eigentlich besitzen gerade die kationischen Liposome die Eigenschaft, dass wenn sie erst in Endosomen eingeschleust sind sie dann eine membrandestabilisierende Wirkung entfalten, indem sie mit anionischen Lipiden in der Endosomenmembran wechselwirken und in den Membranen Lücken entstehen bzw. beide miteinander verschmelzen. Der Inhalt, in unserem Fall die TBO gelangen ins freie, das heißt ins Cytoplasma [111]. Was wir bei unseren Zellen aber nicht beobachten konnten war eine diffuse Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zellplasma. Entweder war das Signal relativ homogen im Nukleus oder aber punktförmig in den Zellen verteilt. Das bedeutet, dass die hier eingesetzten TBO im Cytoplasma stabil bleiben, denn ansonsten

dürfte kein kräftiges Signal aus dem Zellkern zu sehen sein. Zum anderen kann man schließen, dass die Verbindung zwischen dem Fluoreszein (FITC) und dem TBO nicht degradiert wird. Man würde für diesen Fall keine selektiv nukleäre Anreicherung erwarten. Man geht davon aus, dass kleinere Moleküle frei ins Innere des Zellkerns diffundieren können, ohne dass eine spezielle Kernlokalisationssequenz erforderlich ist. Dies ist vor allem bei größeren Proteinen notwendig, die in den Zellkern Translozieren. Was aber genau auf dem Weg der ODN nach Freisetzen aus den Endosomen ins Zytoplasma passiert und wie sie dann in die Zellkerne gelangen ist im Detail nicht bekannt.

In einem zusätzlichen Versuch wurden die verschiedenen Zellen erneut mit Liposom-TBO Komplexen inkubiert und anschließend rasterelektronenmikroskopisch beurteilt. Hier erhält man einen dreidimensionalen Eindruck des Oberflächenreliefs der Tumorzellen. Ob es sich bei den kugelig deformierten Zellen in den Abbildungen 56 und 57 tatsächlich um die so genannten Apoptosebläschen (cytoplasmatic blebbing) handelt ist rein spekulativ. Diese Zellformen waren allerdings nur bei den transfizierten Zellen zu beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass geeignete DNA-Abschnitte auf den beiden Zielgenen bcl-2 und survivin zur Triplexbildung identifiziert werden konnten. Ferner war es zum Teil in vitro als auch in vivo im Zellkulturmodell gelungen, diese in ihrer Expression zu inhibieren. Die Transfektion der Tumorzellen konnte mittels Liposomen unterschiedlich stark verbessert werden. Somit war es möglich, die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 und Survivin zu minimieren und die Tumore für eine eventuell begleitende Chemo- oder Strahlentherapie zu sensibilisieren.

5 Zusammenfassung

Triplexbildende Oligonukleotide (TBO) konnten bisher erfolgreich dazu eingesetzt werden das Binden von Proteinen an die DNA (Desoxyribonukleinsäure) zu blockieren oder die Genexpression spezifisch zu modifizieren. Zusätzlich kann man mit den TBO sequenzspezifische DNA Schäden oder Mutationen induzieren. Das Gleichgewicht zwischen anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und pro-apoptotischen Proteinen wie zum Beispiel Bax spielt eine entscheidende Rolle im Ablauf des intrinsischen Apoptoseweges. Survivin ein Mitglied der „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP) Familie spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Hemmung der Apoptose als auch bei der Regulation des Zellzyklus. Zugleich wird es in den meisten Tumoren überexprimiert. Mit der Triplex – Strategie kann man eine effiziente Gen-Inhibition erreichen, die im Vergleich zum Antisense Ansatz aufgrund der geringeren Zielstrukturen in den Zellen deutlich im Vorteil ist.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere potentielle TBO Bindungsstellen im Bcl-2 und Survivin Gen identifizieren und hierzu passende Oligonukleotide synthetisieren. Diese waren partiell am 5' und 3' Ende oder komplett Phosphorthioat-modifiziert um eine bessere Nukleasestabilität zu erreichen. Im „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) konnten wir die spezifische Bindung der TBO an die Ziel-DNA aufzeigen. Die spezifische Hemmung der Proteinexpression konnten wir in vitro mit einem speziellen Tet-on Expressionssystem sowie mit Luciferase- und EGFP-Reporter genen nachweisen. Um die Wirkung der TBO in vivo auf die Expression von bcl-2 und survivin zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe von Aufnahme verstärkenden Liposomen transfiziert. Die entsprechende Veränderung der Proteinmengen wurde mit dem Western-blot Verfahren bestimmt. Eine Induktion der Apoptose durch die TBO wurde mit der Durchflußzytometrie „fluorescence activated cell sorter“ (FACS) mit fluoreszierendem Annexin V untersucht.

Die gegen die Promotorregion und die 3' untranslatierte Region (3'UTR) gerichteten TBO können stabile Triplexe in vitro ausbilden. Im Tet-on Expressionssystem konnten diese TBO die Expression des bcl-2 Proto-onkogens in transient transfizierten HeLa Zellen unterdrücken. Im Luciferase Reporter System konnten TBO die an die Promotorregion des bcl-2 Gens binden, ebenfalls die Proteinexpression in vitro hemmen. Die Experimente, die wir analog am survivin Gen durchführten, konnten mit entsprechend ausgewählten TBO erfolgreich durchgeführt werden. Auch hier konnten die TBO in vitro stabile Triplexbindungen in der Promotorregion und in der 3'UTR eingehen und die

Genexpression unterdrücken. Darüber hinaus zeigten die letztgenannten TBO nicht nur einen in vitro Effekt sondern konnten auch in vivo die Proteinsynthese und die Zellproliferation hemmen sowie Apoptose induzieren. Allerdings muss festgehalten werden, dass zum Teil Erfolg versprechende in vitro Ergebnisse nicht immer in vivo nachvollzogen werden können. Auch mit dem Einsatz transfektionsverbessernder Liposome war es beispielsweise nicht gelungen, die Bcl-2 Produktion in den Zellen der Lymphomzelllinie (DoHH₂) effektiv zu blockieren.

Insgesamt implizieren unsere Ergebnisse eine Ausweitung der möglichen TBO Zielsequenzen von der Promotorregion auf die 3' untranslatierte Region eines beliebigen Zielgens. Es bedarf in Zukunft allerdings noch weiterer Studien um die hier verwendeten Oligonukleotide für klinische Anwendungen einzusetzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams JM und Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326 (1998)
2. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M und Altieri DC: Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351: 882-883 (1998)
3. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J und Altieri DC: Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 152: 43-49 (1998)
4. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC und Molina TJ: Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96: 1921-1925 (2000)
5. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC und Dombret H: Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 111: 196-203 (2000)
6. Aggarwal BB, Schwarz L, Hogan ME und Rando RF: Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* 56: 5156-5164 (1996)
7. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW und Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171 (1996)
8. Ambrosini G, Adida C und Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921 (1997)
9. Beal PA und Dervan PB: Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science* 251: 1360-1363 (1991)

10. Belousov ES, Afonina IA, Kutuyavin IV, Gall AA, Reed MW, Gamper HB, Wydro RM und Meyer RB: Triplex targeting of a native gene in permeabilized intact cells: covalent modification of the gene for the chemokine receptor CCR5. *Nucleic Acids Res* 26: 1324-1328 (1998)
11. Birnbaum MJ, Clem RJ und Miller LK: An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68: 2521-2528 (1994)
12. Buck AC, Shen C, Schirrmeister H, Schmid-Kotsas A, Munzert G, Guhlmann A, Mehrke G, Klug N, Gross HJ, Bachem M und Reske SN: Liposomal delivery of antisense oligonucleotides for efficient downregulation of Bcl-2 and induction of apoptosis. *Cancer Biother Radiopharm* 17: 281-289 (2002)
13. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X und Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290 (1999)
14. Buendia B, Santa-Maria A und Courvalin JC: Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 11): 1743-1753 (1999)
15. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X und Shi Y: Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862 (2000)
16. Chan PP und Glazer PM: Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. *J Mol Med* 75: 267-282 (1997)
17. Chan S, Davidson N, Juozaityte E, Erdkamp F, Pluzanska A, Azarnia N und Lee LW: Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 15: 1527-1534 (2004)
18. Chen J, Flannery JG, LaVail MM, Steinberg RH, Xu J und Simon MI: bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7042-7047 (1996)

19. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M und Dixit VM: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512 (1995)
20. Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A und David CN: Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 9: 959-962 (1999)
21. Clarenc JP, Lebleu B und Leonetti JP: Base Changes and Triple-Helix Hybridization Properties of GT Containing Third Strands: A Systematical Study. *Nucleosides Nucleotides* 13: 799 - 809 (1994)
22. Cleary ML, Smith SD und Sklar J: Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47: 19-28 (1986)
23. Cogo S, Rapozzi V, Quadrifoglio F und Xodo L: Anti-gene effect in live cells of AG motif triplex-forming oligonucleotides containing an increasing number of phosphorothioate linkages. *Biochemistry* 40: 1135-1143 (2001)
24. Conne B, Stutz A und Vassalli JD: The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 6: 637-641 (2000)
25. Cooney M, Czernuszewicz G, Postel EH, Flint SJ und Hogan ME: Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene in vitro. *Science* 241: 456-459 (1988)
26. Cotter FE, Johnson P, Hall P, Pocock C, al Mahdi N, Cowell JK und Morgan G: Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* 9: 3049-3055 (1994)
27. Crook NE, Clem RJ und Miller LK: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67: 2168-2174 (1993)
28. Cryns V und Yuan J: Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570 (1998)
29. D'Amelio M, Tino E und Cecconi F: The Apoptosome: Emerging Insights and New Potential Targets for Drug Design. *Pharm Res* (2007)

30. de Jong D, Prins FA, Mason DY, Reed JC, van Ommen GB und Kluin PM: Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 54: 256-260 (1994)
31. Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V und Topuz E: Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* (2007)
32. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS und Reed JC: Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18: 5242-5251 (1999)
33. Deveraux QL und Reed JC: IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252 (1999)
34. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS und Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304 (1997)
35. Du C, Fang M, Li Y, Li L und Wang X: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42 (2000)
36. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM und Thompson CB: A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 15: 2685-2694 (1996)
37. Earnshaw WC, Martins LM und Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424 (1999)
38. Ebbinghaus SW, Fortinberry H und Gamper HB, Jr.: Inhibition of transcription elongation in the HER-2/neu coding sequence by triplex-directed covalent modification of the template strand. *Biochemistry* 38: 619-628 (1999)
39. Ebbinghaus SW, Gee JE, Rodu B, Mayfield CA, Sanders G und Miller DM: Triplex formation inhibits HER-2/neu transcription in vitro. *J Clin Invest* 92: 2433-2439 (1993)

40. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A und Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50 (1998)
41. Escude C, Giovannangeli C, Sun JS, Lloyd DH, Chen JK, Gryaznov SM, Garestier T und Helene C: Stable triple helices formed by oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates inhibit transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4365-4369 (1996)
42. Felsenfeld G und Rich A: Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 26: 457-468 (1957)
43. Francois JC, Saison-Behmoaras T und Helene C: Sequence-specific recognition of the major groove of DNA by oligodeoxynucleotides via triple helix formation. Footprinting studies. *Nucleic Acids Res* 16: 11431-11440 (1988)
44. Frank-Kamenetskii MD und Mirkin SM: Triplex DNA structures. *Annu Rev Biochem* 64: 65-95 (1995)
45. Gao X, Kim KS und Liu D: Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *Aaps J* 9: E92-104 (2007)
46. Gasparro FP, Havre PA, Olack GA, Gunther EJ und Glazer PM: Site-specific targeting of psoralen photoadducts with a triple helix-forming oligonucleotide: characterization of psoralen monoadduct and crosslink formation. *Nucleic Acids Res* 22: 2845-2852 (1994)
47. Gibson AD: Updated results of a Phase III trial comparing ibritumomab tiuxetan with rituximab in previously treated patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 3: 87-89 (2002)
48. Giovannangeli C, Diviacco S, Labrousse V, Gryaznov S, Charneau P und Helene C: Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides: the integrated HIV-1 provirus as a target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 79-84 (1997)
49. Giovannangeli C und Helene C: Triplex technology takes off. *Nat Biotechnol* 18: 1245-1246 (2000)

50. Gleave ME und Monia BP: Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 468-479 (2005)
51. Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME und Lacave AJ: Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J Clin Oncol* 19: 3312-3322 (2001)
52. Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwig E und Steller H: Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* 19: 589-597 (2000)
53. Gross A, Jockel J, Wei MC und Korsmeyer SJ: Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17: 3878-3885 (1998)
54. Gross A, McDonnell JM und Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911 (1999)
55. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274: 1156-1163 (1999)
56. Guieysse AL, Praseuth D, Grigoriev M, Harel-Bellan A und Helene C: Detection of covalent triplex within human cells. *Nucleic Acids Res* 24: 4210-4216 (1996)
57. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM und Mak TW: Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339-352 (1998)
58. Hampel KJ, Crosson P und Lee JS: Polyamines favor DNA triplex formation at neutral pH. *Biochemistry* 30: 4455-4459 (1991)
59. Harigai M, Miyashita T, Hanada M und Reed JC: A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene* 12: 1369-1374 (1996)

60. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA und Bloomfield CD: The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol* 13: 193-207 (2000)
61. Helene C, Thuong NT und Harel-Bellan A: Control of gene expression by triple helix-forming oligonucleotides. The antigene strategy. *Ann N Y Acad Sci* 660: 27-36 (1992)
62. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776 (2000)
63. Hiddemann W, Buske C, Dreyling M, Weigert O, Lenz G und Unterhalt M: Current management of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 136: 191-202 (2007)
64. Hinds MG, Norton RS, Vaux DL und Day CL: Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6: 648-651 (1999)
65. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD und Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336 (1990)
66. Horning SJ: Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol* 20: 75-88 (1993)
67. Hsu YT und Youle RJ: Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272: 13829-13834 (1997)
68. Hunter AM, LaCasse EC und Korneluk RG: The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12: 1543-1568 (2007)
69. Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW und Tsai MJ: In vivo transcription of a progesterone-responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res* 21: 2789-2796 (1993)
70. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S und Nunez G: Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273: 32479-32486 (1998)

71. Jacene HA, Filice R, Kasecamp W und Wahl RL: Comparison of 90Y-Ibritumomab Tiuxetan and 131I-Tositumomab in Clinical Practice. *J Nucl Med* (2007)
72. Joseph J, Kandala JC, Veerapanane D, Weber KT und Guntaka RV: Antiparallel polypurine phosphorothioate oligonucleotides form stable triplexes with the rat alpha1(I) collagen gene promoter and inhibit transcription in cultured rat fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 25: 2182-2188 (1997)
73. Juo P, Kuo CJ, Yuan J und Blenis J: Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8: 1001-1008 (1998)
74. Katsumata M, Siegel RM, Louie DC, Miyashita T, Tsujimoto Y, Nowell PC, Greene MI und Reed JC: Differential effects of Bcl-2 on T and B cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11376-11380 (1992)
75. Kelekar A und Thompson CB: Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8: 324-330 (1998)
76. Keller AM, Mennel RG, Georgoulas VA, Nabholz JM, Erazo A, Lluch A, Vogel CL, Kaufmann M, von Minckwitz G, Henderson IC, Mellars L, Alland L und Tandler C: Randomized phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin versus vinorelbine or mitomycin C plus vinblastine in women with taxane-refractory advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 22: 3893-3901 (2004)
77. Kerr JF, Wyllie AH und Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 (1972)
78. Kim HG und Miller DM: Inhibition of in vitro transcription by a triplex-forming oligonucleotide targeted to human c-myc P2 promoter. *Biochemistry* 34: 8165-8171 (1995)
79. Kim HG und Miller DM: A novel triplex-forming oligonucleotide targeted to human cyclin D1 (bcl-1, proto-oncogene) promoter inhibits transcription in HeLa cells. *Biochemistry* 37: 2666-2672 (1998)

80. Kim HG, Reddoch JF, Mayfield C, Ebbinghaus S, Vigneswaran N, Thomas S, Jones DE, Jr. und Miller DM: Inhibition of transcription of the human c-myc protooncogene by intermolecular triplex. *Biochemistry* 37: 2299-2304 (1998)
81. Klasa RJ, Bally MB, Ng R, Goldie JH, Gascoyne RD und Wong FM: Eradication of human non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by BCL-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 6: 2492-2500 (2000)
82. Knauert MP und Glazer PM: Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet* 10: 2243-2251 (2001)
83. Kochetkova M, Iversen PO, Lopez AF und Shannon MF: Deoxyribonucleic acid triplex formation inhibits granulocyte macrophage colony-stimulating factor gene expression and suppresses growth in juvenile myelomonocytic leukemic cells. *J Clin Invest* 99: 3000-3008 (1997)
84. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ und Williams LT: Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298 (1997)
85. Kovacs A, Kandala JC, Weber KT und Guntaka RV: Triple helix-forming oligonucleotide corresponding to the polypyrimidine sequence in the rat alpha 1(I) collagen promoter specifically inhibits factor binding and transcription. *J Biol Chem* 271: 1805-1812 (1996)
86. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W und Reed JC: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4714 (1993)
87. Kren L, Brazdil J, Hermanova M, Goncharuk VN, Kallakury BV, Kaur P und Ross JS: Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12: 44-49 (2004)

88. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P und Flavell RA: Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94: 325-337 (1998)
89. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG und MacKenzie AE: The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259 (1998)
90. Leithäuser M und Freund M: Non-Hodgkin-Lymphome niedriger Malignität. In: S. Seeber und J. Schütte (Hrsg) *Therapiekonzepte Onkologie*, 4. Aufl, Springer Berlin Heidelberg New York, S. 364 - 438 (2003)
91. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhrsen U, Metzner B, Eimermacher H, Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, Martin S, Heidemann E, Aldaoud A, Parwaresch R, Hasford J, Unterhalt M und Hiddemann W: Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 23: 1984-1992 (2005)
92. Letai AG, Palladino MA, Fromm E, Rizzo V und Fresco JR: Specificity in formation of triple-stranded nucleic acid helical complexes: studies with agarose-linked polyribonucleotide affinity columns. *Biochemistry* 27: 9108-9112 (1988)
93. Lewis JD und Tollervey D: Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science* 288: 1385-1389 (2000)
94. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC und Altieri DC: Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1: 461-466 (1999)
95. Li F und Altieri DC: Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 344 Pt 2: 305-311 (1999)
96. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC und Altieri DC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580-584 (1998)

97. Liu X, Zou H, Slaughter C und Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184 (1997)
98. Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T und Altieri DC: Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 82: 923-928 (2003)
99. Maher LJ, 3rd, Dervan PB und Wold B: Analysis of promoter-specific repression by triple-helical DNA complexes in a eukaryotic cell-free transcription system. *Biochemistry* 31: 70-81 (1992)
100. Maher LJ, 3rd, Wold B und Dervan PB: Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. *Science* 245: 725-730 (1989)
101. Marchand P, Resch K und Radeke HH: Selective inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human embryonal kidney cells by specific triple helix-forming oligonucleotides. *J Immunol* 164: 2070-2076 (2000)
102. Marcus R und Hagenbeek A: The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* 5-14 (2007)
103. Marx J: Interfering with gene expression. *Science* 288: 1370-1372 (2000)
104. Mayfield C, Ebbinghaus S, Gee J, Jones D, Rodu B, Squibb M und Miller D: Triplex formation by the human Ha-ras promoter inhibits Sp1 binding and in vitro transcription. *J Biol Chem* 269: 18232-18238 (1994)
105. Mayfield C, Squibb M und Miller D: Inhibition of nuclear protein binding to the human Ki-ras promoter by triplex-forming oligonucleotides. *Biochemistry* 33: 3358-3363 (1994)
106. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE und Baldwin AS: WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Embo J* 18: 3990-4003 (1999)
107. McGuffie EM, Pacheco D, Carbone GM und Catapano CV: Antigene and antiproliferative effects of a c-myc-targeting phosphorothioate triple helix-forming oligonucleotide in human leukemia cells. *Cancer Res* 60: 3790-3799 (2000)

108. McShan WM, Rossen RD, Laughter AH, Trial J, Kessler DJ, Zendequi JG, Hogan ME und Orson FM: Inhibition of transcription of HIV-1 in infected human cells by oligodeoxynucleotides designed to form DNA triple helices. *J Biol Chem* 267: 5712-5721 (1992)
109. Middleton G, Nunez G und Davies AM: Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors. *Development* 122: 695-701 (1996)
110. Miller LK: An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 9: 323-328 (1999)
111. Monkkonen J und Urtti A: Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids. *Adv Drug Deliv Rev* 34: 37-49 (1998)
112. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A und Abad A: A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 17: 2100-2104 (1999)
113. Moser HE und Dervan PB: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* 238: 645-650 (1987)
114. Mouscadet JF, Ketterle C, Goulaouic H, Carteau S, Subra F, Le Bret M und Auclair C: Triple helix formation with short oligonucleotide-intercalator conjugates matching the HIV-1 U3 LTR end sequence. *Biochemistry* 33: 4187-4196 (1994)
115. Muggia F und Hamilton A: Phase III data on Caelyx in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 37 Suppl 9: S15-18 (2001)
116. Musshoff K und Schmidt-Vollmer H: Proceedings: Prognosis of non-Hodgkin's lymphomas with special emphasis on the staging classification. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 83: 323-341 (1975)
117. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS und Dixit VM: An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273: 2926-2930 (1998)
118. Nagata S: Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12-18 (2000)

119. Nicholson DW: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6: 1028-1042 (1999)
120. Nicholson DW: From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407: 810-816 (2000)
121. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L und Tendler C: Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 15: 440-449 (2004)
122. Okada T, Yamaguchi K und Yamashita J: Triplex-forming oligonucleotide binding represses transcription of the human c-erbB gene in glioma. *Growth Factors* 11: 259-270 (1994)
123. Olivas WM und Maher LJ, 3rd: Binding of DNA oligonucleotides to sequences in the promoter of the human bcl-2 gene. *Nucleic Acids Res* 24: 1758-1764 (1996)
124. Orson FM, Thomas DW, McShan WM, Kessler DJ und Hogan ME: Oligonucleotide inhibition of IL2R alpha mRNA transcription by promoter region collinear triplex formation in lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 19: 3435-3441 (1991)
125. Park SI und Press OW: Radioimmunotherapy for treatment of B-cell lymphomas and other hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 14: 632-638 (2007)
126. Pepper C, Thomas A, Hoy T, Cotter F und Bentley P: Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 107: 611-615 (1999)
127. Porumb H, Gousset H, Letellier R, Salle V, Briane D, Vassy J, Amor-Gueret M, Israel L und Taillandier E: Temporary ex vivo inhibition of the expression of the human oncogene HER2 (NEU) by a triple helix-forming oligonucleotide. *Cancer Res* 56: 515-522 (1996)

128. Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ und Hogan ME: Evidence that a triplex-forming oligodeoxyribonucleotide binds to the c-myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8227-8231 (1991)
129. Puri N, Majumdar A, Cuenoud B, Natt F, Martin P, Boyd A, Miller PS und Seidman MM: Targeted gene knockout by 2'-O-aminoethyl modified triplex forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 276: 28991-28998 (2001)
130. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM und Strasser A: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3: 287-296 (1999)
131. Rao L, Perez D und White E: Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135: 1441-1455 (1996)
132. Reed JC: Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236 (1998)
133. Reed JC: Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 34: 9-19 (1997)
134. Reed JC: Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Pharmacol* 41: 501-532 (1997)
135. Reed JC: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776 (1997)
136. Reed JC: Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-1430 (2000)
137. Rininsland F, Johnson TR, Chernicky CL, Schulze E, Burfeind P und Ilan J: Suppression of insulin-like growth factor type I receptor by a triple-helix strategy inhibits IGF-I transcription and tumorigenic potential of rat C6 glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5854-5859 (1997)
138. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS und Reed JC: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16: 6914-6925 (1997)
139. Sakahira H, Enari M und Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99 (1998)

140. Salvesen GS und Dixit VM: Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10964-10967 (1999)
141. Salvesen GS und Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446 (1997)
142. Scaggiante B, Morassutti C, Tolazzi G, Michelutti A, Bacarani M und Quadrifoglio F: Effect of unmodified triple helix-forming oligodeoxyribonucleotide targeted to human multidrug-resistance gene *mdr1* in MDR cancer cells. *FEBS Lett* 352: 380-384 (1994)
143. Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennett S, Goldman P und Korsmeyer SJ: Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the *Bcl-2-Ig* fusion gene in lymphoma. *Embo J* 7: 123-131 (1988)
144. Shen C, Buck A, Mehrke G, Polat B, Gross H, Bachem M und Reske S: Triplex forming oligonucleotide targeted to 3'UTR downregulates the expression of the *bcl-2* proto-oncogene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res* 29: 622-628 (2001)
145. Singleton SF und Dervan PB: Influence of pH on the equilibrium association constants for oligodeoxyribonucleotide-directed triple helix formation at single DNA sites. *Biochemistry* 31: 10995-11003 (1992)
146. Skoog JU und Maher LJ, 3rd: Repression of bacteriophage promoters by DNA and RNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 21: 2131-2138 (1993)
147. Song CS, Jung MH, Supakar PC, Chen S, Vellanoweth RL, Chatterjee B und Roy AK: Regulation of androgen action by receptor gene inhibition. *Ann N Y Acad Sci* 761: 97-108 (1995)
148. Song Q, Kuang Y, Dixit VM und Vincenz C: Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J* 18: 167-178 (1999)
149. Strasser A, O'Connor L und Dixit VM: Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245 (2000)
150. Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC und Fesik SW: NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401: 818-822 (1999)

151. Svinarchuk F, Debin A, Bertrand JR und Malvy C: Investigation of the intracellular stability and formation of a triple helix formed with a short purine oligonucleotide targeted to the murine c-pim-1 proto-oncogene promotor. *Nucleic Acids Res* 24: 295-302 (1996)
152. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS und Reed JC: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273: 7787-7790 (1998)
153. Tamm I: Antisense therapy in malignant diseases: status quo and quo vadis? *Clin Sci (Lond)* 110: 427-442 (2006)
154. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T und Reed JC: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58: 5315-5320 (1998)
155. Thomas T und Thomas TJ: Selectivity of polyamines in triplex DNA stabilization. *Biochemistry* 32: 14068-14074 (1993)
156. Thomas TJ, Faaland CA, Gallo MA und Thomas T: Suppression of c-myc oncogene expression by a polyamine-complexed triplex forming oligonucleotide in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 23: 3594-3599 (1995)
157. Thornberry NA und Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316 (1998)
158. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT und Nicholson DW: A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-17911 (1997)
159. Thress K, Henzel W, Shillinglaw W und Kornbluth S: Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *Embo J* 17: 6135-6143 (1998)
160. Tsujimoto Y und Croce CM: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5214-5218 (1986)

161. Tu GC, Cao QN und Israel Y: Inhibition of gene expression by triple helix formation in hepatoma cells. *J Biol Chem* 270: 28402-28407 (1995)
162. Tung CH, Breslauer KJ und Stein S: Polyamine-linked oligonucleotides for DNA triple helix formation. *Nucleic Acids Res* 21: 5489-5494 (1993)
163. Ulukus EC, Kargi HA, Sis B, Lebe B, Oztop I, Akkoclu A, Onen A und Sanli A: Survivin expression in non-small-cell lung carcinomas: correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15: 31-37 (2007)
164. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P und Wallach D: Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9: 267-276 (1998)
165. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z und Wilson JH: Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8403-8410 (2001)
166. Vasquez KM, Narayanan L und Glazer PM: Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* 290: 530-533 (2000)
167. Vasquez KM, Wang G, Havre PA und Glazer PM: Chromosomal mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27: 1176-1181 (1999)
168. Vasquez KM und Wilson JH: Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends Biochem Sci* 23: 4-9 (1998)
169. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR und Korsmeyer SJ: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75: 229-240 (1993)
170. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B,

- Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Kinzler KW und et al.: Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23: 387-388 (1999)
171. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T und Noel JP: Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 7: 602-608 (2000)
 172. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ und Vaux DL: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53 (2000)
 173. Vucic D, Kaiser WJ und Miller LK: Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol* 18: 3300-3309 (1998)
 174. Wang G, Seidman MM und Glazer PM: Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271: 802-805 (1996)
 175. Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Muller HA und Hay BA: The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* 98: 453-463 (1999)
 176. Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F und Cotter FE: Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 1812-1823 (2000)
 177. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M und Dziewanowska Z: BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349: 1137-1141 (1997)
 178. Witzig TE, Molina A, Gordon LI, Emmanouilides C, Schilder RJ, Flinn IW, Darif M, Macklis R, Vo K und Wiseman GA: Long-term responses in patients with recurring or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma treated with yttrium 90 ibritumomab tiuxetan. *Cancer* 109: 1804-1810 (2007)

179. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556 (1980)
180. Yin DX, Zhu L und Schimke RT: Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* 235: 195-201 (1996)
181. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA und Korsmeyer SJ: Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400: 886-891 (1999)
182. Young SL, Krawczyk SH, Matteucci MD und Toole JJ: Triple helix formation inhibits transcription elongation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10023-10026 (1991)
183. Yunis JJ: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-236 (1983)
184. Zamecnik PC und Stephenson ML: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 280-284 (1978)
185. Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, Simoes-Wust AP, Gautschi O, Luedke GH, Natt F, Haner R, Martin P, Hall J, Nalin CM und Stahel RA: A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 6: 2547-2555 (2000)
186. Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B und Andrews DW: Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Embo J* 15: 4130-4141 (1996)
187. Ziegler A, Luedke GH, Fabbro D, Altmann KH, Stahel RA und Zangemeister-Wittke U: Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst* 89: 1027-1036 (1997)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mir die Durchführung der Dissertation ermöglicht und mich bis zu dessen Fertigstellung unterstützt haben. Allen voran Danke ich hierbei Herrn Professor Dr. Reske, der als Direktor der Klinik für Nuklearmedizin die gesamte Projektgruppe tatkräftig unterstützt und gefördert hat.

Mein besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Andreas Buck, der mich in all den Jahren seit meiner Annahme als Doktorand auf eine wundervolle Weise betreut hat und mich immer wieder an der wissenschaftlichen Arbeit begeistern konnte.

Des Weiteren möchte ich natürlich allen Kollegen aus unserer Projektgruppe danken, die mich ausgezeichnet in die wissenschaftliche Arbeitsweise im Labor eingeführt haben. Hier sind vor allem Herr Dr. Shen, Herr PD Dr. Mehrke sowie unsere technischen AssistentInnen Frau Schemmel, Frau Störzer und Herr Maier zu nennen.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Freundin Frau Sonja Maisch, die mich vor allem in der Zeit bis zum Verfassen der Dissertation beständig unterstützt und motiviert haben.