Aus der Klinik für Chirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch

---

# *Inhibition der Cyclooxygenase-2 - Expression mit Antisense Oligonukleotiden*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

**Carl Haasper**

aus Holzminden

Lübeck 2004

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Rainer Broll

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.10.2005

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# *Inhaltsverzeichnis*

Seite


**1. Abbildungsverzeichnis 6**

**2. Einleitung 7**

2.1 Antisense Nukleinsäuren 7

2.1.1 Molekulare Grundlagen 7

2.1.2 Therapeutische Ansätze 8

2.2 Cyclooxygenasen 9

2.2.1 Molekulare Grundlagen 9

2.2.2 Pharmakologie 11

2.2.3 Onkologische Relevanz 12

2.3 Ziele 15

**3. Material und Methoden 16**

3.1 Verbrauchsmaterialien 16

3.2 Zelllinien 16

3.3 Zellkultur 16

3.4 Oligonukleotide 17

3.4.1 Antisense Oligonukleotide 17

3.4.2 Primer 20

3.5 Gelektrophorese 21

3.5.1 Acrylamid-Gelelektrophorese 21

3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese 21

3.6 PCR Standards 22

3.6.1 Einleitung 22

3.6.2 Verfahren 23

3.6.2.1 Klonierung 23

3.6.2.2 Transformation 23

3.6.2.3 Miniprep 24

3.6.2.4 Maxiprep 24

3.6.2.5 Restriktionsverdau 25

3.6.2.6 Sequenzierung 26

3.7 Transfektion 26
3.7.1 Einleitung 26
3.7.2 Verfahren 27
3.7.3 Effizienz der Transfektion 27
3.8 Durchflußzytometrie (FACScan) 28
3.8.1 Einleitung 28
3.8.2 Verfahren 29
3.8.3 Auswertung 30
3.9 Immuncytochemie 31
3.9.1 Einleitung 31
3.9.2 Verfahren 31
3.9.3 Auswertung 32
3.10 Extraktion der RNA 32
3.10.1 Einleitung 32
3.10.2 Verfahren 32
3.11 cDNA Herstellung 33
3.11.1 Einleitung 33
3.11.2 Verfahren 33
3.12 Qualitative PCR 35
3.12.1 Einleitung 35
3.12.2 Verfahren 35
3.12.3 Auswertung 36
3.13 Quantitative PCR 36
3.13.1 Einleitung 36
3.13.2 Verfahren 36
3.13.3 Auswertung 37
3.14 Zell-Proliferations-Assay 38
3.14.1 Einleitung 38
3.14.2 Verfahren 38
3.14.3 Auswertung 38

**4. Ergebnisse 39**
4.1 COX-2 - Expression in Zellkultur 39
4.2 Qualitätskontrolle der asOligonukleotide 39
4.3 Effizienz der Transfektion 40

4.4 Durchflußzytometrie (FACScan) 41
4.5 Immuncytochemie 43
4.6 RNA Extraktion 44
4.7 Qualitative PCR 45
4.8 Quantitative PCR 45
4.9 Vergleich der Ergebnisse FACS/PCR 48
4.10 Zell-Proliferations-Assay 49

**5. Diskussion 51**
5.1 Rahmenbedingungen 51
5.2 Eigene Ergebnisse 55
5.3 Schlussfolgerungen 60

**6. Zusammenfassung 62**

**7. Literaturverzeichnis 64**

**8. Anhang 77**
8.1 Abkürzungen & Akronyme 77
8.2 Chemikalien, Kits und Proteine 80
8.3 Lösungen 83
8.4 Geräte & Verbrauchsmaterialien 85
8.5 Sequenzen Oligonukleotide/Primer 87

**9. Danksagung 88**

**10. Lebenslauf 89**

# *1. Abbildungsverzeichnis*

Seite


| | | |
|---|---|---|
| Abb. 1: | Wirkmechanismus von Antisense Oligonukleotiden | 8 |
| Abb. 2: | Aufbau von Antisense Oligonukleotiden | 8 |
| Abb. 3: | Stoffwechsel der Eicosanoide | 10 |
| Abb. 4: | Kritische Faktoren bei der Gen Blokade | 18 |
| Abb. 5: | Übersicht der mRNA von COX-2 | 18 |
| Abb. 6: | COX-2 - mRNA-Sekundärstruktur (nt 3701 – nt 4700) | 19 |
| Abb. 7: | COX-2 - mRNA-Primärstruktur (nt 3802 – nt 3861) | 19 |
| Abb. 8: | FACS Gate | 30 |
| Abb. 9: | Beispiel FACS Messung | 31 |
| Abb. 10: | Denaturierendes Acrylamid-Gel | 39 |
| Abb. 11: | Effizienz der Transfektion im FACS | 40 |
| Abb. 12: | A-549 Einzelzellen | 41 |
| Abb. 13: | Ergebnis der FACS Analyse | 42 |
| Abb. 14: | Native A-549 versus nach Transfektion mit 3823c | 43 |
| Abb. 15: | Agarose-Gel nach RNA Präparation | 44 |
| Abb. 16: | Agarose-Gel nach quantitativer PCR | 45 |
| Abb. 17: | Ergebnis der PCR | 47 |
| Abb. 18: | Schmelzkurven bei der quantitativen PCR | 47 |
| Abb. 19: | Agarosegel nach qualitativer PCR | 48 |
| Abb. 20: | Ergebnisse des Zell-Prolierations-Assay | 50 |


Die folgenden Abbildungen sind mir freundlicherweise überlassen worden:

Abb. 4, 6 und 7 erstellt durch Frau Dr. R. Kretschmer Kazemi-Far, Institut für Molekulare Medizin, Universität Lübeck.

Abb. 5 erstellt durch Frau Dr. U. Windhövel, Klinik für Chirurgie, Universität zu Lübeck.

# 2. Einleitung

## 2.1 Antisense Nukleinsäuren

### 2.1.1 Molekulare Grundlagen

Antisense Nukleinsäuren sind in den letzten Jahren zunehmend in das therapeutische Interesse gerückt [88, 91]. Es handelt sich dabei um einzelsträngige, oligomere DNA- oder RNA-Ketten. Diese hybridisieren als komplementäres Gegenstück durch Watson-Crick-Basenpaarung an die Messenger RNA (mRNA) des Zielgenes. Das Ablesen (Translation) der mRNA an den Ribosomen wird unmöglich gemacht und die entsprechenden Proteine können nicht synthetisiert werden (s. Abb. 1). So wird hoch spezifisch die Biosynthese des Zielgen-Produktes und damit dessen biologische Funktion unterbunden. Wie genau die Translation blockiert wird, ist letztendlich noch nicht restlos geklärt. Zu einem kleinen Teil ist der Effekt auf eine sterische Behinderung des ribosomalen Translationskomplexes und der posttranskriptionalen Modifikationsprozesse, wie 5'-Capping, 3'-Polyadenylierung oder Splicing zurückzuführen [7]. Bedeutsamer ist jedoch der Mechanismus des Verdaus von DNA/RNA-Hybriden (Heteroduplex) durch die endogene RNase H. Dieses ubiquitär vorkommende Enzym degradiert nur den RNA-Anteil. Bei Verwendung eines DNA-Antisense Oligodesoxynukleotides (asODN) ist so eine erhöhte Effizienz des Inhibitionsmechanismus zu erwarten, da ein Molekül mit Unterstützung der RNase H zahlreiche RNA-Moleküle zerstören kann [101]. Die asODN können synthetisch in großen Mengen hergestellt und so modifiziert werden, dass eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen gewährleistet ist. Eine dieser Modifikationen ist der Einbau von Phosphothioat (s. Abb. 2) [15]. Dabei wird ein Sauerstoffatom am Phosphat durch ein Schwefelatom ersetzt. Die Phosphothioat-Modifikation ist die am häufigsten verwendete Variante in bisherigen Untersuchungen.

Des weiteren ist die Sekundärstruktur der mRNA *in vivo* (bzw. die vorhergesagte) für die Auswahl eines geeigneten Angriffspunktes von großer Bedeutung [50, 79, 87].

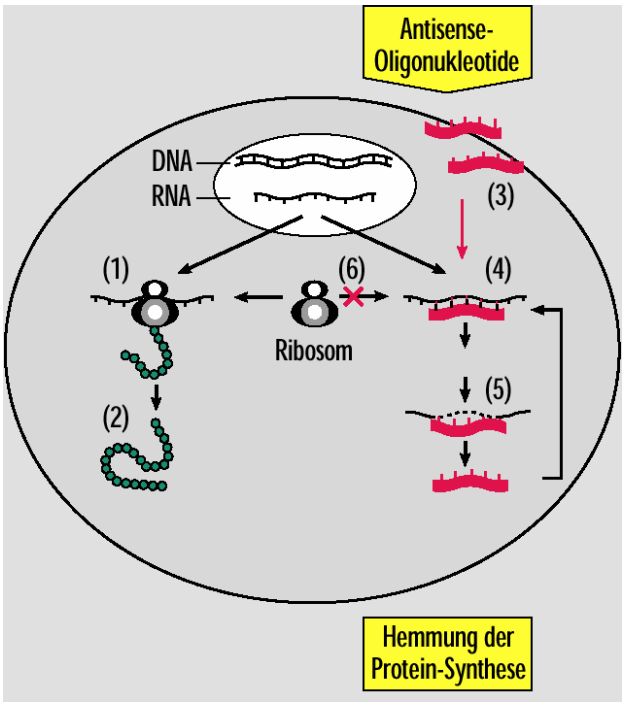



*Abb. 1: Wirkmechanismus von Antisense Oligonukleotiden. Unter physiologischen Bedingungen (linke Seite) binden Ribosomen an eine mRNA (1) und vermitteln die Bildung einer Polypeptidkette (2). Antisense Oligonukleotide (rechte Seite) hemmen die Bildung eines einzelnen Zielproteins. Oligonukleotide gelangen in die Zelle (3) und binden sequenzspezifisch an die komplementäre Ziel-RNA. Es entsteht ein Doppelstrang aus Oligonukleotid und der RNA (Heteroduplex) (4). Das zelleigene Enzym RNase H erkennt diese Heteroduplex und spaltet den RNA-Anteil (5). Das Oligonukleotid wird dadurch frei, um an eine weitere Ziel-RNA zu binden. Zusätzlich führt die Heteroduplex zu einer sterischen Hemmung des ribosomalen Translationskomplexes (6). Aus [27]*

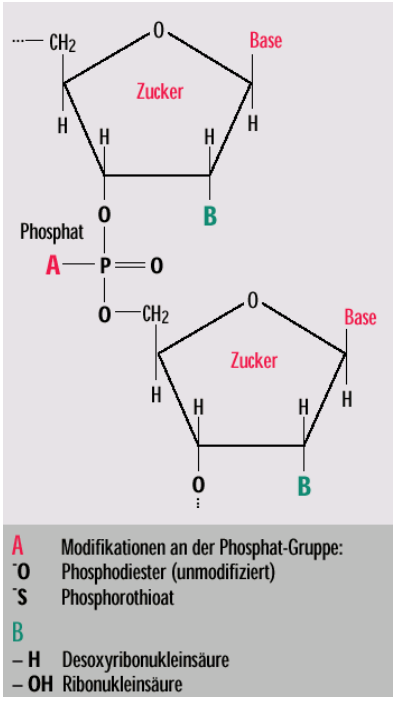



*Abb. 2: Aufbau von Antisense-Oligonukleotiden.*
*Ein Oligonukleotid besteht aus einer Kette von Zuckerringen, die über eine Phosphatgruppe miteinander verbunden sind. An den Zuckerringen hängt jeweils eine Base (Adenin, Thymidin, Guanidin, Cytidin). Die Reihenfolge der Basen bestimmt die Sequenz einer Nukleinsäure, der Zucker die Art der Nukleinsäure (B: Desoxyribose: DNA; Ribose: RNA). Bei einem Phosphothioat-Oligonukleotid ist ein nicht bindendes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt (A). Aus [27]*

### 2.1.2 Therapeutische Ansätze

Die Kenntnis molekularer Ursachen von Krankheiten ermöglicht die Entwicklung neuer Therapieformen auf genetischer Ebene. In den letzten Dekaden wurden zahlreiche Gene gefunden, deren Expression spezifisch für bestimmte onkologische Erkrankungen zu sein scheint und in gesunden Zellen entweder nicht vorkommen oder bspw. konstitutiv supprimiert ist. Wenn es gelingen sollte, diese teilweise pathogenetisch entscheidenden Elemente selektiv in Tumorzellen und idealerweise bereits auf DNA- oder RNA-Ebene zu

blockieren, stünde damit theoretisch eine Therapie mit minimalen Nebenwirkungen zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund entstanden in den letzten Jahrzehnten neue pharmakotherapeutische Modelle wie die Gentherapie oder die Antisense-Therapie als Vertreter des „rational drug designs“. Während bei der „klassischen“ Gentherapie zusätzliche genetische Informationen in die Zelle eingefügt werden, zielt die Anwendung von Antisense Oligonukleotiden, wie unter 2.1.1 erläutert, auf eine spezifische Hemmung der Bildung von Zielproteinen und lässt das Genom unverändert.

Verschiedene Therapieansätze mit asODN sind für einige in der Karzinogenese wichtige Gene, wie *p53*, *bcl-2*, *c-myb* und andere beschrieben [91, 112]. Weit fortgeschritten scheint hierbei die Blockade des *bcl-2* Gens, das für ein anti-apoptotisches Protein kodiert, zur Therapie von Non Hodgkin Lymphomen. Dieser Therapieversuch mit G3139, dem wahrscheinlich am häufigsten untersuchten asODN mit klinischer Relevanz, konnte bereits zweimal einer Phase-Eins-Studie unterzogen werden [40, 46, 104]. Präklinisch zeigt sich auch ein interessanter Ansatz für die Behandlung des fortgeschrittenen Prostata Karzinoms unter Blockade des gleichen Genes [57]. Nach Angaben auf der Internetseite der Firma Genta (Berkeley Heights, NJ, USA; www.genta.com) befindet sich eine Inhibition des *bcl-2* Gens mit asODN bereits in Phase 3 Studien für das maligne Melanom, multiple Myelom und die chronisch-lymphatische Leukämie.

Bisher ist nur Fomivirsen (Vitravene®) als erstes Antisense-Medikament auf dem Markt. AIDS Patienten, die an einer Cytomegalievirus (CMV) assoziierten Retinitis leiden, können hiermit behandelt werden. Die Biosynthese für ein zur Virusvermehrung benötigtes Protein wird verhindert und damit die Virus-Replikation gestoppt [38].

## 2.2 Cyclooxygenasen

### 2.2.1 Molekulare Grundlagen

Bei den beiden Isoformen 1 und 2 der Cyclooxygenase-Enzyme (COX / Prostaglandin G/H Synthase / PGH Synthase) handelt es sich um Homodimere mit einer ähnlichen Struktur und katalytischen Aktivität. Die Sequenzen der Proteine sind zu mehr als 60 % identisch und haben beide ein Molekulargewicht von circa 70 kDa [33]. Die Enzyme sind membranständig an der inneren Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums und an den Kernmembranen [41, 68, 85]. Seit einiger Zeit wird auch die Existenz einer Isoform 3 diskutiert; hierbei soll es sich um eine Variante der COX-1 handeln, die in Herz- und Gehirngewebe eine Rolle spielen könnte [3].

Die Cyclooxygenase und die Lipoxygenase sind zentrale Funktionsträger im Stoffwechsel der Eicosanoide (s. Abb. 3). Sie katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin $H_2$ ($PGH_2$) und Leukotrienen, die neben dem Histamin zu den wichtigsten Zellmediatoren, vor allem bei der Entzündung, zählen [86, 99]. Durch die PGH-Synthase werden zwei aufeinander folgende Reaktionen katalysiert: die der Cyclooxygenase und die der Peroxidase, wobei zwischen beiden die Molekülstruktur des $PGG_2$ entsteht. Die Cyclooxygenase-Reaktion ist jedoch geschwindigkeitsbestimmend. Beide Reaktionen laufen an unterschiedlichen Positionen des gleichen Moleküls ab und sind auch funktionell voneinander abhängig [83].

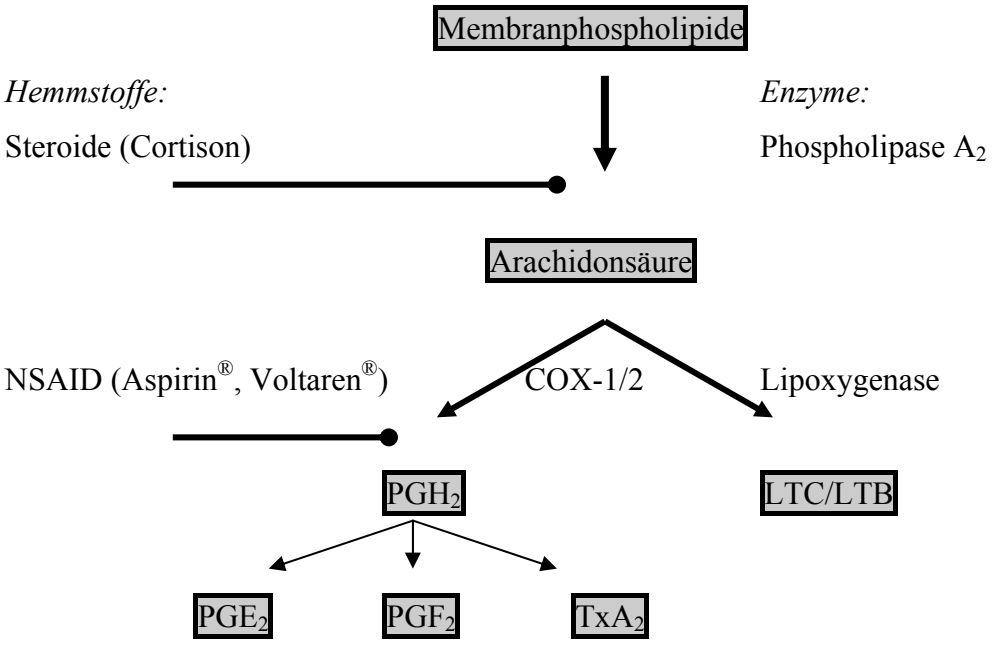



*Abb. 3: Stoffwechsel der Eicosanoide. (NSAID: Nicht steroidale antiinflammatorische Medikamente; PG: Prostaglandin; LT: Leukotrien; Tx:Thromboxan)*

Die Reaktions-Produkte der Cyclooxygenasen haben eine Reihe wichtiger physiologischer Funktionen, zum Beispiel bei der Thrombozytenaggregation, der Nierendurchblutung und dem Schutz der Schleimhäute im Gastro-Intestinal Trakt, vor allem im Magen. Hier steht jedoch die Isoform 1 als „housekeeping enzyme“ im Vordergrund [52, 71]. Die COX-2 ist normalerweise in vielen Geweben nicht nachweisbar, jedoch kann ihre Expression durch extrazelluläre Stimuli, als Reaktion auf ein entzündliches Geschehen, massiv gesteigert werden. Konstitutiv exprimiert und nachweisbar ist sie im Gewebe von Niere, Prostata und Gehirn [84].

Die genetischen Informationen für COX-1 und COX-2 liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Das Gen für die Cyclooxygenase-2 umfasst ca. 8,5 kb und ist auf dem

Chromosom 1q25.2-q25.3 lokalisiert (COX-1 [9q32-q33.3] [84]). Es umfasst 10 Exons und wird zu einer ca. 4,5 kb grossen mRNA (s. Abb. 5 unter 3.3.1) transkribiert, die für 604 Aminosäuren kodiert [33]. Der Promoter des Cyclooxygenase-2 - Gens ist 1,7 kb lang und hat eine „TATA-Box“, die 31 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes liegt. Das Startkodon beginnt an der Position 135 und das Stoppkodon umfasst die Positionen 1947-1949 [83].

Das *COX-2* - Gen gehört zur Klasse der „immediate early or early growth response genes“, die schnell und transient nach einer Stimulation von Zellkulturen durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und viele Tumorpromotoren exprimiert werden [12, 31, 41]. Das molekulare Signal, welches die *COX-2* - Expression induziert, ist bisher nicht eindeutig identifiziert. Viele Studien deuten darauf hin, dass in Tumoren eine Mutation des *APC*-Gens zu einer Induktion des *COX-2* - Gens führt [62, 66]. Diese verursacht aber nicht allein eine gesteigerte Transkription des Cyclooxygenase-2 - Gens, da gezeigt wurde, dass eine gesteigerte Expression auch ohne Mutation vorhanden sein kann [49]. Diese Tatsache zeigt, dass hier weitere Faktoren zum Tragen kommen.
Obwohl spezifische Transkriptions-Aktivatoren unter den verschiedensten Konditionen der Induktion, wie beisp. physiologische Prozesse, Inflammation oder maligne Entartung, noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten, ist bekannt, dass einige Entzündungsfaktoren, wie TNFα, IL-1β, TPA, LPS und Wachstumsfaktoren in einem direkten Zusammenhang mit der *COX-2* - Transkription stehen. Auch NFκB und C/EBP, Komponenten zweier bekannter Signalwege bei Entzündungsprozessen, sowie eine oder alle drei MAPK Kaskaden scheinen einen Einfluss auf die Expression des Enzyms zu haben [83].

### 2.2.2 Pharmakologie

Die Wirkmechanismen der nicht steroidalen antiinflammatorischen Medikamente (NSAIDs), oder nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR), sind nicht gleich. Die meisten blockieren die Cyclooxygenasen irreversibel und unselektiv. Acetylsalicylsäure (ASS) inhibiert als bekanntester Vertreter dieser Gruppe irreversibel, kompetitiv. Im Gegensatz dazu stehen Paracetamol (PCM) mit einem reversiblen, nicht kompetitiven Wirkmechanismus und andere Vertreter wie die Pyrazoline mit zum Teil unbekannter Pharmakodynamik. Die NSAIDs verteilen sich homogen im Organismus und hemmen nur in extrem hoher, nicht mehr therapeutischer Dosierung die Enzyme vollständig. Außerdem gibt es eine Reihe unerwünschter Wirkungen durch die Medikamente, die auf die

blockierten physiologischen Funktionen der COX zurückzuführen sind, wie beispielsweise die Ulkusbildung in der Magenschleimhaut oder die Analgetikanephropathie.

Es gibt auch selektive COX-2 - Hemmer, die seit einiger Zeit auf dem Markt zur Verfügung stehen [65]. Es handelt sich dabei um die Wirkstoffe Rofecoxib™ (Handelsname: Vioxx®) und Celecoxib™ (Celebrex®).

Man hatte die Hoffnung, die unerwünschten Wirkungen zu reduzieren, indem man sich pharmakodynamisch auf die Isoform 2 konzentrierte. Denn diese steht im pathophysiologischen Vordergrund gerade im Bereich des für den Patienten herausragenden Schmerzes [10]. Im Gegensatz zu Rofecoxib™ (VIGOR Studie: Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research), zeigte sich allerdings für Celecoxib™ in der CLASS Studie (Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study) kein Vorteil in Bezug auf die gastro-intestinalen Nebenwirkungen von NSAIDs [1, 2, 82]. Es wird postuliert, dass sich dies nicht nur mit einem unvorteilhaften Studiendesign erklären lässt, sondern eine therapeutische Überlegenheit von Celecoxib™ wahrscheinlich nicht vorhanden ist [43]. In der VIGOR Studie zeigte sich zudem ein relatives Risiko von 2,38, ein thrombotisches oder kardiovaskuläres Ereignis unter der Therapie mit Rofecoxib gegenüber einem unselektiven NSAID zu erleiden [59]. Aktuelle Ergebnisse der APPROVe Studie (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx) zum Beweis einer Rezidivunterbindung von kolorektalen Polypen zeigten ein relatives Risiko von 1,96 für ein kardiovaskuläres Ereignis gegenüber dem Placebo [95]. Dies führte zum Aus für Vioxx® und der Hersteller nahm das Präparat weltweit vom Markt.

### 2.2.3 Onkologische Relevanz

Das Enzym COX-2 ist zunehmend in das onkologische Interesse getreten, da seine Expression eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zu spielen scheint [4, 65].

Epidemiologische Studien haben demonstriert, dass die Einnahme von NSAIDs eine verminderte Inzidenz von bestimmten Krebsformen, vor allem gastro-intestinalen, zur Folge hat [25, 30, 37]. Retrospektive Studien zeigten, dass speziell das relative Risiko Darmpolypen oder ein Kolonkarzinom zu entwickeln, bei einer Einnahme eines unselektiven COX-Inhibitors über einen Zeitraum von zehn Jahren und mehr um bis zu 50 % sinkt [37, 53, 54, 75, 93]. Bei Patienten mit familiärer Polyposis coli führen NSAIDs zu einem deutlichen Rückgang von Polypengröße und –zahl [4, 24]. Acht von neun prospektiven Studien demonstrierten einen präventiven Effekt von Aspirin®, gezeigt durch eine Reduktion von Inzidenz und Mortalität durch das kolorektale Karzinom [37].

Die COX-2 - Expression ist in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu normaler Kolonmukosa deutlich erhöht. Die Cyclooxygenase-1 hingegen wird ohne signifikanten Unterschied auf niedrigem Niveau im Karzinom- und Normalgewebe exprimiert [49, 76]. Bei kolorektalen Karzinomen korreliert das Niveau der COX-2 - Expression mit der Überlebenszeit [80].

In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Arachidonat die Apoptose fördert, was für den protektiven Effekt durch die Pharmakodynamik der NSAIDs in Bezug auf maligne Zellen spricht [108]. Geht der metabolische Weg ohne COX-Blockade weiter und es entsteht $PGE_2$, wird die Apoptose durch eine gesteigerte Expression des Bcl-2 Proteins unterdrückt, das wiederum in direktem Zusammenspiel mit p53 steht [81]. Die genauen Mechanismen dieser Interaktion konnten bisher jedoch nicht erklärt werden.

Die konstitutive Expression von COX-2 in Kolonkarzinomzellen fördert deren Invasions- und Metastasierungspotential [97]. Es ist auch lange bekannt, dass die durch Cyclooxygenasen produzierten Prostaglandine eine wichtige Rolle bei der Proliferation vieler Krebszellen spielen. Versuche in Zellkulturen aus Adenomen und Karzinomen des Kolons zeigten, dass dieser Effekt der PG und eine Überexpression der COX-2 ein frühes Ereignis der Karzinogenese sind [53, 69]. Anhand von Operationspräparaten konnte gezeigt werden, dass die Expression mit der Tumorgröße und –invasion korreliert [21, 110].

Außerdem scheint das Enzym einen regulatorischen Einfluss auf die Angiogenese zu haben, da der VEGF- (Vascular Endothelial Growth Faktor) Spiegel in direktem Zusammenhang mit der Expression von COX-2 steht [98].

Das Fördern der Proliferation und Angiogenese durch das Enzym in Zellverbänden zeichnet Eigenschaften aus, die aggressiven Tumoren zugesprochen werden.

Auch von Lungentumoren ist eine erhöhte Cyclooxygenase-2 - Expression bekannt [35]. So wurde eine deutlich erhöhte COX-2 - Expression immunhistochemisch und mittels Northern Blot auf Protein- und mRNA-Ebene in verschiedenen Lungentumoren gezeigt [106].

Gerade für die nicht kleinzelligen Tumoren, die einer Chemotherapie nur schlecht zugänglich sind, findet sich hier ein interessanter Therapieansatz [36]. Aspirin® zeigte in einer Fall-Kontroll Studie einen protektiven Charakter bei der Ausbildung von Lungentumoren [58]. In einer anderen Studie wurde an nicht kleinzelligen Lungentumoren demonstriert, dass COX-Inhibitoren die Apoptose-Rate verringern [74]. Dies wirft neue

Fragen auf die nicht genau geklärten Mechanismen und die Schlüsselrolle des Enzyms Cyclooxygenase-2 in der Karzinogenese.

Durch Transfektion eines Antisense Oligonukleotides in Zellen eines Plattenepithel Tumors des Zungengrundes konnte eine Hemmung der COX-2 - Expression erreicht werden, die zu einer Inhibierung der Proliferation führte [89]. In Melanomzellen führte eine solche Hemmung ebenfalls zu einem deutlichen negativen Einfluss auf das Wachstum [32].

An menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnur konnte durch COX-2 - Inhibition mit selektiven und unselektiven NSAR eine Unterdrückung der Adhäsion, Ausbreitung und Migration gezeigt werden [11].

Die Wachstumsgeschwindigkeit von verschiedenen Tumoren (beisp. des Kolons) sinkt unter dem Einfluss von selektiven COX-2 - Hemmern wie Rofecoxib™ und Celecoxib™ (s. 2.2.2) [65].

Obwohl die COX-2 - Studien mittlerweile auch auf andere Tumorarten ausgeweitet werden, ist die prognostische Relevanz der Daten für das Stadium der Erkrankung und die Entwicklung von Rezidiven außer für das kolorektale Karzinome noch nicht ausreichend geklärt [94].

Die Cyclooxygenase-2 ist ein viel versprechendes Ziel für die onkologische Chemotherapie [8, 39], speziell im Hinblick auf kolorektale Karzinome [26].

Bis heute ist keine Evidenz für Mutationen im *COX-2* - Gen in Neoplasien vorhanden. Drei wichtige Beobachtungen sind zu nennen, die eine Schlüsselrolle bei der Überexpression des Enzyms in der Entwicklung von Tumoren unterstreichen [19]:

- Gentechnisch induzierte COX-2 - Überexpression führt zu malignen Phenotypen. Einige Krebsvarianten tragen eine Trisomie 1q25, dem Genlokus der COX-2;
- Eine artifizielle COX-1 - Überexpression kann die gleichen Effekte zeigen wie die der Isoform 2;
- Ein Ausschalten des *COX-2* - Gen unterdrückt eine experimentelle Karzinogenese.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2 auch unter onkologischen Gesichtspunkten der unselektiven vorzuziehen ist. Diese reduziert anscheinend die Zellproliferation, induziert die Apoptose and läßt die Isoform 1 vermittelte Zellprotektion im Gastrointestinaltrakt und andere physiologische Aufgaben unberührt.

## 2.3 Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, einige Antisense Oligonukleotide gegen die Cyclooxygenase-2 *in vitro* auf ihre Wirksamkeit zu testen. Es wurden anhand der Zielsequenz zehn theoretisch effektive Oligomere entwickelt, die komplementär zur COX-2 - mRNA sind. Bei diesen handelt es sich um einzelsträngige, Phosphothioat modifizierte DNA-Ketten mit 18 bis 22 bp. Statistische Berechnungen zeigen, dass eine 15-17mer Nukleotidsequenz nur einmal im Genom vorkommt [50]. Bei Sequenzen dieser Länge ist daher mit einer hohen Spezifität zu rechnen. Mit diesen asODN sollte eine selektive und spezifische Hemmung der Proteinbiosynthese der COX-2 erreicht werden. Um die Effektivität der Inhibition zu messen, mussten geeignete Systeme etabliert werden.

Zunächst wurde ein Zellkulturmodell ausgewählt, das eine starke Expression von COX-2 zeigt. Dann wurde eine geeignete Methode zur Transfektion gesucht, mit dem die asODN in die Zellen gelangen konnten. Darauf wurden Messmethoden entwickelt und verglichen, um die Effizienz der Inhibition auf Protein- und RNA-Ebene zu bestimmen. Mittels Durchflußzytometrie (FACScan) wurde die Enzym-Expression bestimmt. Die dort gemessenen Effekte wurden für die mRNA mit einer quantitativen RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) überprüft.

# *3. Material und Methoden*

## 3.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Puffer, „Kits“ (8.2), Lösungen (8.3), Geräte und Verbrauchsmaterialien (8.4) sind im Anhang aufgelistet.

## 3.2 Zelllinien

Im Labor standen drei Zelllinien zur Verfügung: DLD-1, HT-29 und A-549. Sie wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen.
Die ersten beiden stammen aus Kolonkarzinomen, während letztere aus einem Alveolar Zell Karzinom der Lunge stammt.
Bei Vorversuchen zur Überprüfung der COX-2 - Expression mittels der quantitativen RT-PCR (3.13) zeigte sich die höchste mRNA-Kopienzahl bei der Zelllinie A-549, so dass nur mit diesen Zellen in den nachfolgenden Experimenten gearbeitet worden ist.

## 3.3 Zellkultur

Die A-549 Zellen wurden entsprechend den Hinweisen der DSMZ in Zellkultur gelagert und herangezogen. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.
Nach dem Auftauen der 1 ml Aliquots enthaltenden Gefäße, in denen circa $5 * 10^6$ Zellen waren, sind diese in 20 ml normales Medium überführt und bei 300 g für 10 min abzentrifugiert worden. Dies geschah, um das Gefriermittel DMSO den Zellen zu entziehen. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in Medium suspendiert und in eine T-80 Kulturflasche ausgesät.
Die Anzucht erfolgte bei 37°C unter Begasung mit 5 % $CO_2$ in einem Brutschrank. Das Medium (8.3.6), bestehend aus 90 % Dulbeccos´s MEM und 10 % fetalem Kälberserum (FKS (Biochem, Berlin)) ist zusätzlich mit Antibiotika (10000 E Penicillin G und 10 mg

Streptomycinsulfat/ml; Invitrogen, Eggenstein) versetzt worden. Bei einer 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen der normalen Umsetzroutine zugeführt. Ungefähr alle vier Tage sind die Zellen mit Trypsin (ohne EDTA, Invitrogen) abgelöst und 2 * $10^6$ Zellen in T 150 Flaschen mit neuem Medium ausgesät worden. Frühestens 14 Tage nach dem Auftauen wurden sie für eine Transfektion (3.7) verwendet. Mindestens eine Umsetzroutine erfolgte ohne Antibiotika-Zusatz, bevor die Zellen in 12-Loch-Platten für die Transfektion ausgesät werden konnten. Dies geschah im Medium, ebenfalls ohne Antibiotika, in einer Konzentration von circa 40.000 Zellen pro ml pro Loch.

Zum Einfrieren sind die Zellen bei einer 80 %igen Konfluenz mit Trypsin (ohne EDTA) abgelöst und bei 300 g für 10 min abzentrifugiert worden. Die Zellen wurden in 90 % FKS und 10 % DMSO bei einer Konzentration, wie oben beschrieben, zu 1 ml aliquotiert und für 24 h bei -80°C gelagert. Anschließend konnten sie dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

## 3.4 Oligonukleotide

### 3.4.1 Antisense Oligonukleotide

Die verwendeten Antisense Oligonukleotide wurden im Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck von Frau Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far und Prof. Dr. G. Sczakiel entworfen, basierend auf ihren publizierten Überlegungen [47, 78].

Wichtige Faktoren für die Wirksamkeit der Oligonukleotide sind ihre zelluläre Aufnahme, die effektive und lokale Konzentration, die Duplexbildung mit der mRNA und der Inhibitionsmechanismus (s. Abb. 4). Hier wurden für die Duplexbildung die lokalen Sekundärstrukturen der Target-mRNA in den Vordergrund gestellt, bei der die Zugänglichkeit der lokalen Targetstrukturmotive das Selektionskriterium waren [64]. Man sucht in der Struktur der mRNA nach theoretisch offenen Schleifen, an denen die Antisense Oligonukleotide möglichst gute Hybridisierungsmöglichkeiten haben. Weiterhin von Bedeutung sind physiko-chemische Eigenschaften der beteiligten Nukleinsäuren im Sinne intramolekularer Faltung und spezifischer Nukleotidmotive, sowie die Hybridisierungskinetik und die Stabilität des Duplex. Für die asODN sind dabei auch die Länge, der GC-Gehalt und die Schmelztemperatur ($T_m$) relevant.

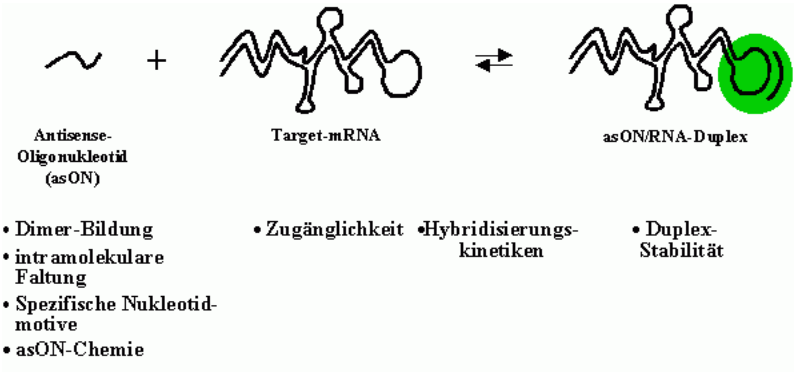



*Abb. 4: Kritische Faktoren bei der Gen Blockade. Die beteiligten Strukturen und Einfluss-Faktoren. aus* [47]

Mittels eines computergestützten Verfahrens wurden vier Ziele auf der mRNA der COX-2 (s. Abb. 5) zur Vorhersage von lokalen Sekundärstrukturen (s. Abb. 6) der Ziel-mRNA [51, 63, 79] ausgewählt. Für diese vier Targets, unter Berücksichtigung der in Abb. 4 dargestellten Faktoren, sind an den Positionen 523, 1487, 2817 und 3823 (s. Abb. 5 und 7) zehn Antisense Oligonukleotide entworfen und getestet worden. An den Positionen 1487 und 3823 waren dies vier verschieden konfigurierte Ansätze und an den Positionen 523 und 2817 jeweils eine. Nur die Positionen 523 und 2817 liegen im für das Protein kodierenden Bereich, während 2817 und 3823 in der 3'-UTR-Region sind.

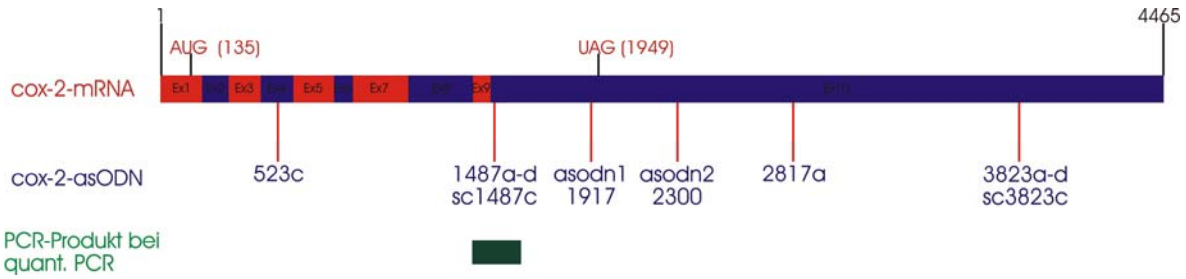



*Abb. 5: Übersicht der mRNA von COX-2. Der kodierender Bereich reicht von nt 135 bis nt 1949. Darunter die verwendeten Oligonukleotide an den komplementären Positionen und ganz unten das COX-2 - PCR-Produkt (s. 4.8) der Exon 8 bis 10 umfassenden Position zugeordnet. [freundlicherweise überlassen von Frau Dr. U. Windhövel]*

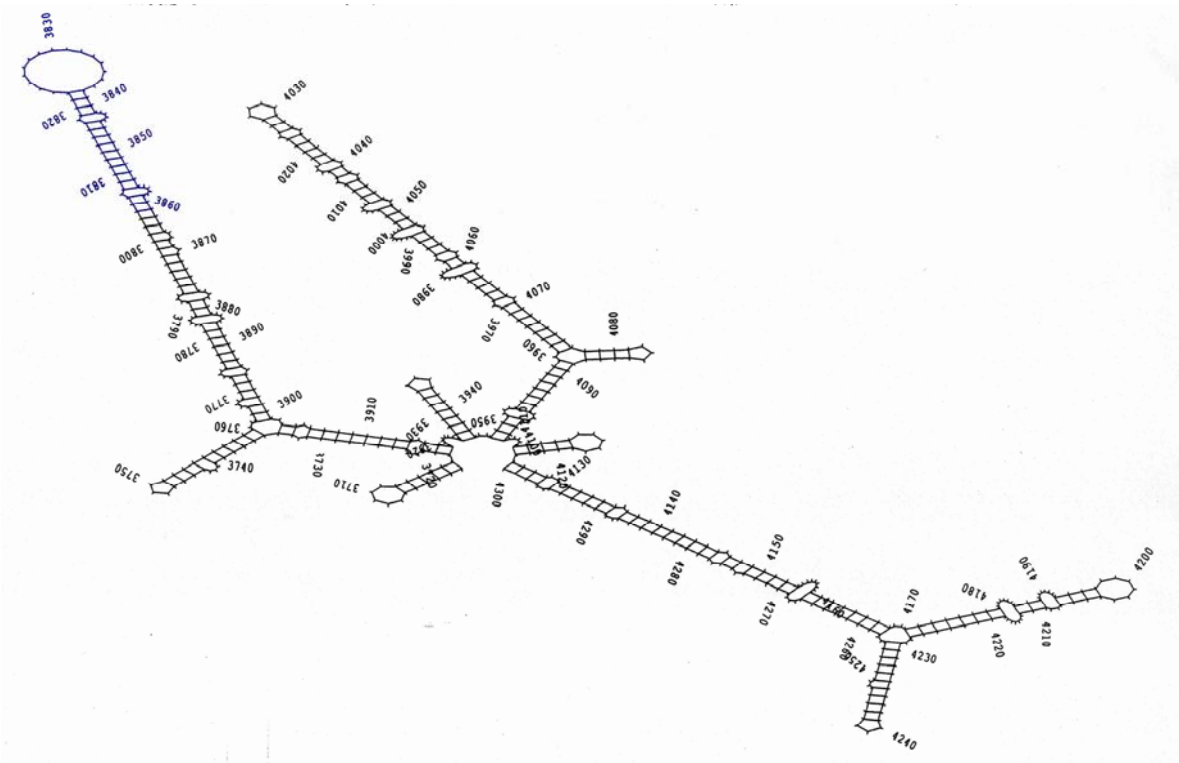


*Abb. 6: COX-2 - mRNA-Sekundärstruktur (nt 3701 – nt 4700). Wahrscheinliches Motiv aus dem computergestützten Verfahren. Blau: Targetbereich der 3823 asODNs. [freundlicherweise überlassen von Frau Dr. R. Kretschmer]*

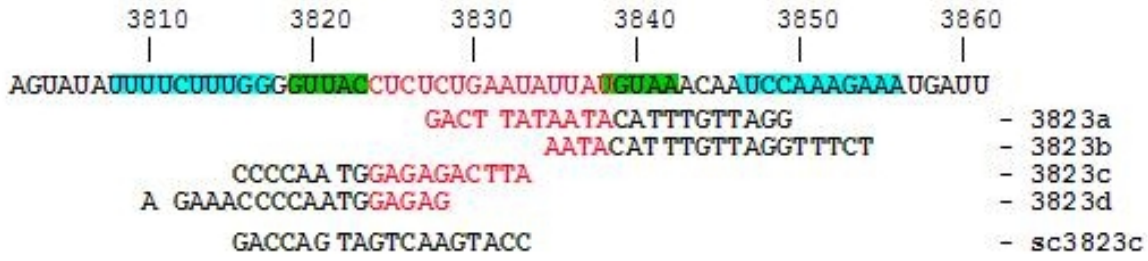



*Abb. 7: COX-2-mRNA-Primärstruktur (nt 3802–nt 3861). Konstruktion der komplementären Sequenzen im Targetbereich der 3823 asODNs als Beispiel. [freundlicherweise überlassen von Frau Dr. R. Kretschmer]*

Üblicherweise versucht man als ersten Ansatz das Start-Kodon zu blockieren. Jedoch hat die COX-2 - mRNA stromabwärts der AUG Sequenz eine hohe Homologie zur mRNA der Delta-Untereinheit der ATP-Synthase, so dass dies hier nicht sinnvoll war.

Neben diesen zehn neuen, potenziell wirksamen asODN wurden zwei weitere in der Literatur beschriebene Oligonukleotide gegen COX-2 [32, 36, 98] der Versuchsreihe zugeführt (asodn1 und asodn2, s. Abb. 5). Die Sequenzen der 15-30mere sind im Anhang (8.5.2) aufgeführt. Die Wirkspezifität eines Antisense Oligonukleotids wird durch Vergleich mit geeigneten Negativkontrollen empirisch bestimmt. Hierzu wurden zwei weitere ODN verwendet, die zwar dieselben Basen enthalten wie eines der Antisense

Moleküle (hier: 1487c und 3823c), jedoch die Basenabfolge randomisiert umverteilt ist (s. Abb. 7: sc3823c). Man spricht von „scrambled controls“ (sc) [87].

Hergestellt wurden die 14 Oligonukleotide von der Firma Thermo Hybaid, Ulm. Bei allen verwendeten Antisense Nukleinsäuren handelte es sich um Phosphothioat modifizierte Oligonukleotide, da diese, wie in der Einleitung (2.1) beschrieben, über eine hohe Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen verfügen.
Die Moleküle wurden mittels einer HPLC chromatografisch gereinigt, so dass Effekte durch etwaige Nebenprodukte, wie beispielsweise Abbruchketten, aus der Herstellung ausgeschlossen werden konnten.
Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in 1x TE-Puffer (8.3.2) so gelöst, dass eine 1 mM Lösung entstand. Diese Stammlösungen sind anschließend auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren worden. Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm ($A_{260}$) kontrolliert und das für die Transfektion eingesetzte Volumen entsprechend korrigiert. Dafür wurde zunächst der Extinktionskoeffizient für jedes asODN nach folgender Formel berechnet:

$$\varepsilon \text{ (Extinktionskoeffizient } [mM^{-1}]) = A(15{,}2)+C(7{,}05)+G(12{,}01)+T(8{,}4) \text{ bei pH } 8{,}0.$$

A, C, G und T stehen für die Zahl der entsprechenden Basen (dNTPs) im Molekül des Oligonukleotids [20, 45].

Die Konzentration (c) wurde dann mit Hilfe der $A_{260}$ errechnet:

$$c \text{ (Konzentration } [mM]) = \frac{A_{260} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\varepsilon}.$$

Die Oligonukleotide wurden außerdem durch eine denaturierende Acrylamid-Gelelektrophorese überprüft (3.5.1).

### 3.4.2 PCR-Primer

Für die Polymerase Ketten Reaktion (PCR, Verfahren unter 3.12 beschrieben) wurde mit verschiedenen Primerpaaren, die komplementär zu den mRNA von COX-2, Beta-2 Mikroglobulin (ß2-Mikroglobulin) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) waren, gearbeitet. Die Sequenzen und Quellen für das Primerdesign sind

im Anhang (8.5) aufgeführt. ß2-Mikroglobulin ist ein ubiquitäres „house keeping gene“, das für die physiologische Stabilität einer Zelle eine zentrale Rolle spielt. Ein solches ist auch die GAPDH, die als cytosolisches Enzym eine Schlüsselrolle in der Glykolyse und Energieproduktion spielt.

Für COX-2 wurden Sequenzen (s. Abb. 5) im mittleren Teil der m-RNA (Exon 8-10 überspannend) gewählt (sense: Start 5’ Ende des Primers nt 1388; antisense: nt 1605).

Im Falle von ß2-Mikroglobulin ist eine Exon 1 bis 3 überspannende Sequenz zugrundegelegt worden (Start sense: nt 67; antisense: nt 363).

Für die GAPDH wurden Positionen weiter in Richtung 3’ Ende der Sequenz gewählt (Start sense: nt: 934; antisense: nt 1191).

## 3.5 Gelelektrophoresen

### 3.5.1 Acrylamid-Gelektrophorese

Die Qualität der verwendeten Oligonukleotide (3.4.1) wurde durch eine denaturierende Acrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Für 30 ml dieses Gels sind folgende Komponenten verwendet worden: 12,6 g Harnstoff; 3 ml 10x TBE Puffer (8.3.3); 15 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); aufgefüllt mit $H_2O$ auf 30 ml. Dann wurden 20 µl TEMED und 150 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat) dazugegeben und das Gel in die vertikale Kammer (Mini-Protean 3, Biorad, München; 60*90*1 mm³) gegossen. Vor dem Auftragen der Oligonukleotide (2 µl einer 10 µM Lösung wurden mit 18 µl $H_2O$ verdünnt [1:10]) sind diese eins zu eins mit 5 µl Ladepuffer (8 M Harnstoff; 20 mM EDTA; 5 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,5 % (w/v) Bromphenolblau und 0,5 % Xylencyanol) gemischt, 5 min auf 90°C erhitzt und kurz auf Eis wieder abgekühlt worden. Dann wurde dieses Gemisch bei einer Spannung von 40 V so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolblaubande kurz vor dem Gel-Ende stand.

### 3.5.2 Agarose-Gelektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung wurde DNA oder RNA in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetragen, das Ethidiumbromid als Interkalator enthielt. Für das Gel wurde 1 g Agarose (0,5 g bei 1 %igem Gel etc.) in 50 ml 1x TE-Puffer (8.3.2) gegeben und kurz in einem Mikrowellengerät gekocht, um die Agarose zu schmelzen. Nach dem Abkühlen unter ständigem Rühren auf circa 50°C sind 5 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) dazugegeben und das Gemisch in eine Gel-Kammer (85 * 78 *8 mm³) gegossen worden. Nach dem Erstarren

konnte das Gel in eine Lauf-Kammer mit 1x TAE-Puffer (8.3.1) gesetzt und die Proben in die Taschen pippetiert werden. Zusätzlich lief der 12 Fragmente (154-2176 bp) enthaltende DNA-Molekulargewichtsmarker VI (Roche, Mannheim) zur Größenorientierung mit. Nach einer Stunde Laufzeit bei 80 V Spannung wurde das Gel auf einem UV-Transluminator bei der Wellenlänge von 312 nm betrachtet und fotografiert.

Im Falle von RNA wurde eine Stammlösung für den Lade-Puffer, von dem 2 µl auf 10 µl eingesetzt wurden, wie folgt angesetzt: 0,2 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0); 9,5 ml deionisiertes Formamid; 10 mg Bromphenolblau mit $H_2O$ auf 10 ml.

## 3.6 PCR Standards

### 3.6.1 Einleitung

Zur Bestimmung der cDNA-Kopienzahl in der Probe setzt man in der quantitativen PCR (3.13) auch Standards mit bekannter Konzentration ein. Es handelt sich bei diesen Standards um einen in ein Plasmid-Vektor klonierten Abschnitt, dessen Sequenz identisch zum entsprechenden amplifizierten Bereich der COX-2 oder GAPDH in der Probe ist. Dieses DNA-Fragment wird aus cDNA (3.11) mittels PCR (3.12) mit dem Primerpaar amplifiziert und dann kloniert (3.6.2.1). Hier wurde mit dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen™ (Paisley, Schottland) gearbeitet.

In einem Ein-Schritt-Verfahren werden blunt-end-PCR-Produkte, die durch eine „proofreading“ Polymerase (z.B. *Pwo*) erzeugt werden, in ein Plasmid inseriert. Der im verwendeten Klonierungs-Kit enthaltene linearisierte Plasmidvektor (pCR®-Blunt II-TOPO®) hat an den 3’-Phosphatgruppen jedes DNA Stranges Topoisomerase I aus dem Vaccina Virus kovalent gebunden. Diese Topoisomerase bindet ds-DNA an einer spezifischen Stelle und spaltet das Phosphodiester Rückgrat nach einer 5’-CCCTT-Sequenz in einem Strang. Die Energie der Phosphodiesterbindung wird in der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der 3’-Phosphatgruppe des gespaltenen Stranges und einem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Die Phospho-Tyrosyl Bindung zwischen DNA und Enzym kann später von der 5’-Hydroxylgruppe des gespaltenen Stranges angegriffen werden, somit die Reaktion rückgängig gemacht und die Topoisomerase abgelöst werden. Die Reaktion wird bei der TOPO® Klonierung ausgenutzt, um sehr effizient PCR Produkte zu klonieren.

In dem Vektor pCR®-Blunt II-TOPO® ist das Gen *ccdB*, welches für einen Gyrase Hemmer kodiert und so das Wachstum der meisten *Eschericha coli* Stämme verhindert, an

den C-Terminus des *lacZα*-Fragmentes fusioniert. Die Insertion eines PCR Produktes unterbricht die Expression der *lacZα-ccdB*-Fusion. Dies erlaubt einen direkten Ausschluss der Zellen durch Abtöten nach einer Transformation, welche Vektoren ohne Insertion enthalten. Auf die Anwesenheit des Vektors in den Zellen kann, bei Einsatz des entsprechenden Antibiotikums, aufgrund der in ihm enthaltenen Information zur Resistenz gegen Zeocin oder Kanamycin selektiert werden. Für die Transformation der TOPO® Klonierungs-Produkte wurden chemisch kompetente Zellen des Bakterienstammes *E. coli* TOP10 One Shot® der Firma Invitrogen™ verwendet.

### 3.6.2 Verfahren

3.6.2.1 Klonierung:

In einem Eppendorf Gefäß wurden 4 µl des blunt end PCR-Produktes, sowie 1 µl der im Klonierungskit enthaltenen Salzlösung und 1 µl TOPO® Vektor zusammenpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur konnte der Reaktionsansatz auf Eis gegeben und für die nachfolgende Transfektion eingesetzt werden. Das Insert war 218 bp lang im 3737 bp großen Plasmid für den mittleren COX-2 Bereich (s. Abb. 5: Exon 8-10 überspannend; GAPDH: 258/3777).

3.6.2.2 Transformation:

Nach der Klonierung musste das Plasmid in die *E. coli* Zellen transformiert werden: LB Platten (8.3.5 + 15 g/l Agar, autoklaviert [121°C, 20 min] und dann gegossen) waren mit Kanamycinsulfat (50 µg/ml) 30 min auf 37°C vorgewärmt. Pro Klonierungsansatz wurde eine Einheit chemisch kompetenter One Shot® Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2 µl des Klonierungsansatzes hinzugegeben und vermischt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes auf Eis für 5 min. Daran schloss sich ein Hitzeschock der Zellen im Wasserbad für 30 s bei 42°C an. Im Anschluss folgte ein direkter Transfer auf Eis. Die nächsten Schritte waren die Zugabe von 250 µl des SOC-Medium bei Raumtemperatur und nachfolgendes horizontales Schütteln bei 200 U/min und 37°C für 1 h. Von jedem Transformationsansatz wurden 100 µl auf eine vorgewärmte LB+Kanamycin Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Sechs der nach der Transformation auf dem Selektivmedium gewachsenen Kolonien wurden zur weiteren Aufreinigung auf LB+Kanamycin Platten ausgestrichen. Auf diesen Platten gewachsene Einzelkolonien wurden in einer Plasmidisolierung kleinen Maßstabes (Miniprep [3.6.2.3]) überprüft. Ergab dies die Anwesenheit des Plasmides mit

gewünschtem Insert, so wurde das Zell-Material einer Einzelkolonie einer Plasmidisolierung grossen Maßstabes (Maxiprep [3.6.2.4]) zugeführt. Die DNA ist dann linearisiert, sequenziert und als Standard verdünnt worden (3.6.2.5 und 3.6.2.6).

3.6.2.3 Miniprep:

Zur Isolierung analytisch verwendbarer Mengen an Plasmid-DNA wurde der Nucleo Spin® Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet, der alle hier verwendeten Lösungen enthielt. Diese Methode basiert auf der Bindung von DNA an eine Silica-Membran. Eine aus den Sektorenausstrichen entnommene Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium (8.3.5) mit 50 µg Kanamycin/ml in 15 ml Greiner Röhrchen überführt und maximal 16 h bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 11.000 g und 4°C für 30 s zur Pelletierung der Zellen. Nachdem der Überstand dekantiert war, konnten die Zellen in 250 µl Puffer A1 resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt werden. Nach Zugabe von 250 µl Puffer A2 wurden die Gefäße sechs- bis achtmal umgedreht. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur sind 300 µl Puffer A3 zugeführt, erneut ist sechs- bis achtmal umgedreht und dann 10 min bei 4°C und 11.000 g zentrifugiert worden. Im Anschluss konnte der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand auf die vorbereiteten Nucleo Spin® Säulen, welche auf 2 ml Eppendorf Gefäße aufgesetzt worden waren, aufgetragen werden. Diese wurden dann bei 11.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats ist die Säule mit 600 µl Puffer A4 gewaschen und erneut zu den vorherigen Bedingungen zentrifugiert worden. Weitere 2 min Zentrifugation dienten der Trocknung. Die Säulen konnten auf 1,5 ml Eppendorf Gefäße gesetzt und die DNA mit 50 µl Puffer AE herausgespült werden. Nach 1 min Inkubation schloss sich eine erneute Zentrifugation zu den genannten Bedingungen an. Die DNA enthaltende Lösung wurde dann einem Restriktionsverdau (3.6.2.5) zur Darstellung des Inserts in einem Gel zugeführt.

3.6.2.4 Maxiprep:

Hier wurde der Qiagen® Plasmid Maxi Kit 100 eingesetzt, der die verwendeten Lösungen bis zum Schritt der Eluierung enthielt. Die dabei eingesetzten Säulen sind Anionentauscher, von denen die Plasmid DNA durch einen Hochsalzpuffer eluiert wird.

Dazu wurde wie bei der Miniprep zunächst das Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und 5-6 h stark geschüttelt. Je 5 ml dieser Vorkulturen wurde in 100 ml LB-Medium (8.3.5) mit 50 µg Kanamycin/ml für ca. 16 weitere Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert. 1,7 ml wurden dann entnommen und mit 300 µl sterilem Glycerin gemischt und

als Stammkultur bei -80°C eingefroren. Der Hauptteil der Kultur ist in 50 ml Greiner Röhrchen überführt und 15 min lang bei 3.400 g zentrifugiert worden. Nachdem der Überstand dekantiert war, konnte das Zell Pellet in 4 ml P1-Puffer pro Gefäß resuspendiert werden. Dann wurde jeder Ansatz mit 4 ml P2-Puffer versetzt. Nach sechsmaligem Umdrehen des Gefäßes schloss sich eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Darauf folgte die Zugabe von 10 ml 4°C kalter P3-Puffer und es wurde erneut mehrmals umgedreht und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss ist eine Zentrifugation für 15 min bei 3.400 g und 4°C durchgeführt worden. Währenddessen wurden die DNA-Säulen Qiagen-tip 500 des Kits mit 10 ml QBT Puffer equilibriert. Dann wurde der Plasmid-Überstand auf die Säule aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml QC-Puffer ist die Säule auf ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert worden. Zur Präzipitation der DNA wurde diese Lösung mit 0,7 Volumenanteilen (10,5 ml) Isopropyl Alkohol versehen und anschließend 45 min bei 3.000 g und 4°C pelletiert. Die DNA konnte nach Dekantieren des Überstandes mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen werden. Dann wurde für 30 min bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert, danach der Überstand dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Dieses ist in 100 µl 1x TE-Puffer (8.3.2) resuspendiert worden. Nach Inkubation über Nacht wurde die DNA-Konzentration in der Lösung mit der Warburg-Christian Methode [103] im Photometer bestimmt. Die Absorption bei 260 und 280 nm der 1:20 Verdünnung wurde gemessen und um den Hintergrund bei 320 nm korrigiert.
Dabei wurde folgende Formel verwendet:

DNA oder RNA [µg/µl] = (-36*A280)+(62,9*A260).

Das eingesetzte Photometer verfügte über ein Programm zur automatischen Berechnung. Außerdem wurde der Reinheitsgrad durch das $A_{260}/A_{280}$ - Verhältnis überprüft.

3.6.2.5 Restriktionsverdau:

Das Plasmid wurde in einem Restriktionsverdau mit einem im Polylinker des Vektors schneidenden Enzym linearisiert. Dies geschah mit *Bam*HI für die Linearisierung der Standards nach Maxiprep (3.6.2.4) oder mit *Eco*RI, um die erfolgreiche Klonierung des Inserts als zweite Bande im Gel nach Miniprep (3.6.2.3) darzustellen.
Die DNA wurde so verdünnt, dass circa 0,5 µg/µl im Restriktionsansatz (insgesamt 100 µl) vorhanden war. Unter Zugabe des entsprechenden Puffers wurden 0,75 U/µl (gesamt 75 U) des Enzymes hinzupipettiert (*Bam*HI und Puffer K; *Eco*RI und Puffer H: hier

Ansatzvolumen auf 1/10 reduziert) und bei 37°C inkubiert. Nach 2 h sind 2 µl Ansatz entnommen, 1:10 verdünnt und in einem 1 % Agarose Gel aufgetragen worden (3.5.2). Beim *Eco*RI Verdau wurde eine zweite Bande, das Insert, bei erfolgreicher Klonierung sichtbar.

Im Falle der vollständigen Linearisierung nach *Bam*HI Verdau ist das Restriktionsgemisch einer Phenol/Chloroform-Extraktion zugeführt worden. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen reinem Ethanol präzipitiert. Nach Inkubation bei –20°C über Nacht ist bei 12.000 g für 15 min und 4°C zentrifugiert worden. Das Pellet wurde nach Dekantieren des Überstandes mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde dann in 100 µl TE Puffer (8.3.2) gelöst und ihre Konzentration in der Lösung photometrisch bestimmt (s. 3.6.2.4). Dann wurde so verdünnt, dass $5* 10^6$ Kopien/µl im TE-Puffer gelöst waren. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe, jeweils um den Faktor 10 sinkend bis $5* 10^2$ Kopien/µl, angelegt, als Konzentrations-Standards aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.6.2.6 Sequenzierung:

Zur Überprüfung der Basenabfolge der Standards wurden diese automatisiert sequenziert. Dies geschah mit der Cycle-Sequenzierungs-Methode, einer Abwandlung der ursprünglich von Frederick Sanger 1977 beschriebenen Didesoxynukleotid Kettenabbruch Sequenzierungsmethode, unter Verwendung eines IR-Farbstoffes am 5'-Ende der Primer. Es ist das Sequenzierungskit mit Thermo Sequenase und 7-Desaza-dGTP der Firma Amersham (Little Chalfont, GB), sowie der zum pCR®-Blunt II-TOPO® Vektor komplementäre Primer M-13-rev verwendet worden. Die Sequenzierung erfolgte im DNA-Sequencer LiCor4000L der Firma MWG, Ebersberg.

## 3.7 Transfektion

### 3.7.1 Einleitung

Bei der Transfektion wurden die Oligonukleotide mittels eines fetthaltigen Gemisches ins Innere der Zelle transportiert. Für diese Arbeit wurde Oligofectamine™ der Firma Invitrogen™ (Paisley, Schottland) benutzt, das eine Weiterentwicklung von Lipofectin™ und speziell für kurze Nukleotid-Ketten gedacht ist. Es bildet sich bei diesem Verfahren spontan ein Lipid/DNA- Komplex, der in die Zellen gelangen kann.

### 3.7.2 Verfahren

Circa 25 h nach dem Aussäen in 12-Loch-Platten (3.3) waren die Zellen zu 40 % konfluent und die Transfektion konnte mit 200 nM der Oligonukleotide durchgeführt werden. Für die Effektmessungen wurde bei drei Ansätzen (1-3) kein Oligonukleotid hinzugefügt. Die mit diesen Zellen erzielten Ergebnisse dienten als Referenzwerte für die behandelten Zellen.

Für die Transfektion wurde auf zwei 12-Loch-Platten mit dreifachen Ansätzen gearbeitet. 40 ml OPTI-MEM® (Invitrogen), einem für die Transfektion optimierten Medium ohne Serum, wurde in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Dann sind 70 µl Oligofectamine™ in 280 µl OPTI-MEM® verdünnt worden. In sieben von acht (ein Referenz Ansatz ohne asODN) Eppendorfgefäßen wurde je 4 µl der verschiedenen 100 µM Oligonukleotid-Stammlösungen gegeben und alle mit OPTI-MEM® auf 360 µl aufgefüllt. Danach sind je 40 µl des Oligofectamine™/OPTI-MEM® Gemisches dazugegeben und für 15 min inkubiert worden. Währendessen konnten die Zellen mit 1 ml der vorgewärmten OPTI-MEM® Lösung gewaschen werden. Dann wurde das Medium wieder abgesaugt und pro Loch 400 µl vorgewärmtes OPTI-MEM® und 100 µl des Oligonukleotid/ Oligofectamine™/OPTI-MEM® Gemisches dazugegeben. Die 12-Loch-Platten konnten leicht geschüttelt und für vier Stunden im Brutschrank bei 37° C mit 5 % $CO_2$ inkubiert werden.

Danach ist pro Loch 250 µl des antibiotikafreien Mediums mit dreifacher Konzentration FKS hinzugegeben worden. Anschließend wurde für weitere 21 h im Brutschrank bis zur Auswertung inkubiert. Die Zellen waren dann 25 h nach der Transfektion nahezu vollständig konfluent.

### 3.7.3 Effizienz der Transfektion

Die Effizienz der Transfektion wurde mittels eines Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Oligonukleotides (FITC-ODN, 18mer) verifiziert. Die Sequenz entsprach dem des asODN 3823c (8.5.2).

Nach Abschluss der Transfektion (3.7.2) wurde das Medium vollständig aus der Lochplatte abgesaugt und jedes Loch zum Lösen der Zellen vom Boden mit 1 ml 1x Trypsin mit EDTA versehen. Die Platten sind dann für 5 bis 10 min bei 37°C inkubiert worden. Nach Überführung der Zellsuspension aus den 12-Loch-Platten ist noch je 1 ml Waschpuffer (8.3.7) hinzugegeben worden. Die Röhrchen konnten dann für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand steril abgesaugt und 1 ml gekühlte saure Salzlösung (8.3.8) hinzugegeben, um an der Zellmembran haftende asODN zu lösen [48]. Nach 10 min Inkubation bei 4°C wurde 1 ml Waschpuffer (8.3.7) hinzugegeben, erneut

zentrifugiert und anschließend der Überstand steril abgesaugt. Es wurde nochmals 1 ml Waschpuffer hinzugegeben und resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und anschließendem Absaugen des Überstandes sind die Röhrchen mit 1 ml frischen, gekühlten 1 % Paraformaldehyd in Dulbecco's PBS (8.3.9) versehen, resuspensiert und für 10 min auf Eis inkubiert worden. Anschließend konnte unter den oben genannten Bedingungen abermals zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand abgesaugt und jedes Röhrchen mit 1 ml Waschpuffer versehen und in 500 µl FACS Lösung (diluid [azid free], BD) resuspendiert.

Die Fluoreszenz der Zellen wurde wie bei 3.8.3 beschrieben mit dem FACS gemessen.

Außerdem sind die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet worden. Hier wurden neun Gesichtsfelder bei 400x Vergrößerung auf drei verschiedenen Objektträgern fluoreszenzmikrospisch auf Dias abgelichtet. Jedes Gesichtsfeld ist auch im Phasenkontrast fotografiert worden. Anschließend wurde ausgezählt und ein Quotient aus den fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zu den im Phasenkontrast erkennbaren gebildet.

## 3.8 Durchflußzytometrie (FACScan)

### 3.8.1 Einleitung

Beim Fluoreszenzaktivierten Zellanalysegerät (FACScan) oder Durchflußzytometer wird ein Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt und Änderungsparameter des Lichtes gemessen. Durch Vibration wird dieser Zellen enthaltende Strom in feine Tröpfchen geteilt, die unmittelbar vor dem Abriss aufgeladen werden und im Idealfalle nur eine Zelle enthalten. Die vorher mit einem fluoreszierenden Antikörper markierten Zellen emittieren Licht der Wellenlänge des Fluorochroms und streuen sowie absorbieren Licht, was bei empfindlichen Detektoren Aufschluss über Zellgröße und -granularität gibt. Auf diese Weise können zytomorphologische und proteinchemische Merkmale bestimmt werden. Die gewonnenen Daten lassen sich in verschiedenen Formen darstellen. Es können so zum Beispiel prozentuale Anteile von Subpopulationen bestimmt werden, aus denen Schlussfolgerungen getroffen werden können. Es wurde ein FITC-markierter Antikörper eingesetzt, der bei Bestrahlung mit dem verwendeten Argonlaser (488 nm) grünes, monochromatisches Licht mit einem Maximum bei 515 nm (Bandpassfilter 585 ± 42 nm) emittiert.

Mit Hilfe dieser Methode kann die relative Expression eines bestimmten Proteins ermittelt werden, so wie in der vorliegenden Arbeit die der Cyclooxygenase-2.

### 3.8.2 Verfahren

Das Transfektionsmedium (3.7) wurde vollständig aus der Lochplatte abgesaugt und zum Ablösen der Zellen jedes Loch mit 1 ml 1x Trypsin mit EDTA (PAA; Linz, Österreich) versehen. Die Platten sind dann für 5 bis 10 min bei 37°C inkubiert worden. Nach Überführung der Zellsuspension aus den 12-Loch-Platten in Faclon Röhrchen (BD; Heidelberg, D) ist noch je 1 ml Waschpuffer (8.3.7) hinzugegeben worden. Die Röhrchen konnten dann für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand steril abgesaugt und die Zellen in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und anschließendem Absaugen des Überstandes, sind die Röhrchen zur Zell-Resuspension mit 1 ml frischen, gekühlten 1 % Paraformaldehyd in Dulbecco's PBS (8.3.9) versehen und für 10 min auf Eis inkubiert worden. Anschließend konnte unter den oben genannten Bedingungen abermals zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand abgesaugt und jedes Röhrchen mit 1 ml Waschpuffer versehen und abermals resuspendiert. Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes ist 1 ml IC Perm (1x, Biosource, Camarillo, USA) hinzugegeben worden. Die Röhrchen wurden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Daraufhin sind in jedes Röhrchen 2 Tropfen DakoCytomation Protein Block (Glostrup, Denmark) gegeben worden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu unterbinden. Es wurden wiederum alle Röhrchen zentrifugiert und der Überstand sorgsam abgesaugt. Anschließend sind die Zellen mit jeweils 100 µl des vorher präparierten Primärantikörperlösung versehen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert worden.

Primärantikörperlösung: Proben 4-24: monoklonales, anti-humanes anti-COX-2 IgG1 aus einer Maus (Klon CX229; Alexis, Ann Abor, MI, USA), 1:100 verdünnt (absolut: 0,5 mg/l) in DakoCytomation's „Antibody diluent with background reducing components"; Leerproben 1-3: 1:100 IgG1 (DakoCytomation; absolut: 1 mg/l) aus einer nicht immunisierten Maus.

Anschließend wurde 1 ml Waschpuffer hinzugegeben, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgte eine erneute Zugabe der Protein-Block-Lösung mit anschließender Zentrifugation wie oben beschrieben. Die Zellen wurden dann mit 100 µl einer Lösung des FITC-markierten Sekundärantikörpers (mit „Antibody diluent with background reducing components"-1:500 verdünntes FITC-anti-Maus-IgG1 aus dem Kaninchen [DakoCytomation; Klon DAK-FITC4]; absolut: 0,4 mg/l), versehen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer wurden die Zellen erneut pelletiert und anschließend ein letztes Mal wie oben beschrieben mit 1 ml Waschpuffer

gewaschen. Die Zellen wurden dann in 500 µl FACS Lösung (diluid [azid free], BD) resuspendiert und ihre Fluoreszens etwa 10 min später im FASCScan gemessen.

### 3.8.3 Auswertung

Zur Durchflußzytometrie wurde ein FACScan der Firma BD (Heidelberg) verwendet, der über einen G3 Macintosh (Apple Computer) gesteuert worden ist. Als Analysesoftware diente das Programm Cell Quest 3.2.1 (BD). In diesem Programm wurde ein Fenster (Gate; s. Abb. 8) orientierend nach Größe und Granularität durch die Lichtstreuung (FSC: forward scatter und SSC: sideward) der Zellen festgelegt, in dem sich diese dann abbildeten. So konnten Zelldebris, Vesikel, Verunreinigungen etc. ausgeblendet werden. Wenn in diesem Fenster 10.000 Ereignisse (Events) stattgefunden haben, ist die Messung beendet worden und die Daten wurden der Auswertung zugeführt.

Die fluoreszierende Intensität wurde dann im ersten Kanal (FL1-H) gemessen und numerisch bestimmt. Bei den drei Kontrollen (1-3), in denen IgG1 aus nicht-immunisierten Mäusen eingesetzt worden ist, ist die fluoreszierende Intensität gemittelt und als unspezifische Hintergrundfluoreszenz betrachtet worden. Aus drei weiteren Proben ohne transfiziertes Oligonukleotid, jedoch mit einem COX-2 Antikörper versehen, wurde ebenfalls der Mittelwert der fluoreszierende Intensität gebildet, um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert und gleich 100 % relative Expression gesetzt. Dann sind die ebenfalls korrigierten Messergebnisse der mit asODN transfizierten Zellen desselben Versuchstages ins Verhältnis zu diesen Werten (s. Abb. 9) gesetzt worden, um eine Aussage über die Hemmung in Form einer relativen Expression zu erhalten (s. unten stehende Formel). Es wurde solange gemessen, bis von jedem Oligonukleotid mindestens ein Messwert an drei verschiedenen Tagen vorhanden war und die biologische Doppelbestimmung gesichert war.

$$\text{relative Expression [\%]} = \frac{\text{Test asODN FL1-H} - \text{Mittelwert FL1-H}_{\text{Hintergrund}}}{\text{Mittelwert FL1-H}_{100\%} - \text{Mittelwert FL1-H}_{\text{Hintergrund}}} * 100$$

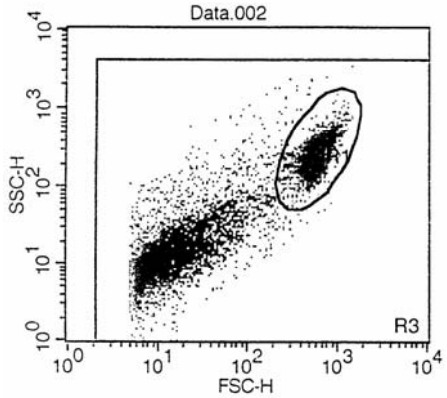



*Abb. 8: FACS Gate.*
*Dot-Plot der Lichtstreuung und Definition des Fensters (Gate), das die Zellen repräsentiert.*
*FSC-H: Partikel-/Zellvolumen*
*SSC-H: Granularität*

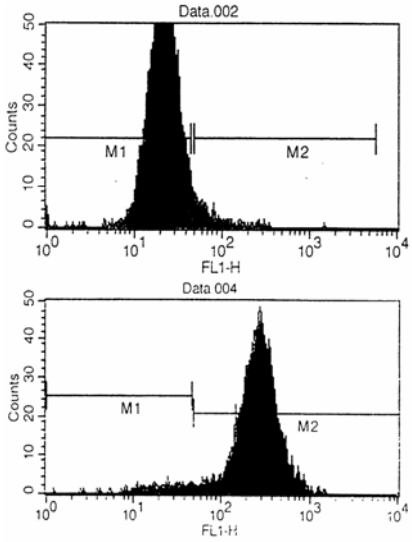



*Abb. 9: Beispiel FACS Messung.*
*Oben 0 %- und unten 100 %- Referenzmessung: Ergebnisdarstellung aus dem definierten Fenster, wobei die Ereignismenge auf der Abszisse dargestellt ist und die fluoreszierende Intensität auf der Ordinate (FL1-H). M1 definiert den Bereich der unspezifischen Hintergrundsfluoreszenz und M2 den der COX-2 vermittelten Leuchtintensität.*

## 3.9 Immuncytochemie

### 3.9.1 Einleitung

Bei der Immuncytochemie werden immunologisch reaktive Strukturen auf oder in Zellen mit bestimmten Verfahren dargestellt, die zum Beispiel durch Bindung von Antikörper-Farbkomplexen zu einer Anfärbbarkeit der entsprechenden antigentragenden Strukturen (hier COX-2) im Präparat führen.

### 3.9.2 Verfahren

Transfizierte Zellen wurden, wie unter 3.8.2 beschrieben, mit Trypsin/EDTA (PAA; Linz, A) vom Boden der 12-Loch-Platten gelöst. Dann sind sie in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert worden. Der Überstand wurde bis auf das Zellpellet abgesaugt und im FACS Waschpuffer suspendiert. Dann ist die Suspension in einer Cytospin 2 Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh, USA) bei 360 U/min für 5 min auf Objektträger (Cytospin slides) gezogen worden, so dass circa 100.000 Zellen auf die Oberfläche gelangten. Die Objektträger sind für 30 min an der Luft getrocknet und dann Rücken an Rücken in Alufolie eingewickelt worden, um anschließend bei -80°C gelagert zu werden.

Vor der Färbung wurden die Präparate für 10 min verpackt aufgetaut, anschließend in Aceton fixiert, kurz im TBS Puffer (8.3.4) gespült und 1 Tropfen Protein Block (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) für 10 min aufgetragen. Nach Dekantieren des Tropfens wurde dann der anti-human COX-2 Primärantikörper aus der Maus (s. 3.8.2)

aufgetragen. Dieser Antikörper war 1:50 (absolut: 1 mg/l) in DakoCytomation's „Antibody diluent with background reducing components" Lösung verdünnt. Als Negativkontrolle wurde IgG1 (DakoCytomation; absolut: 2 mg/l) aus einer nicht immunisierten Maus verwendet. Nach 60 min ist dreimal für 5 min im TBS Puffer gespült worden. Es wurde erneut geblockt und dann die Sekundärantikörperlösung auf alle Präparate aufgetragen. Dafür ist ein Cy®2-Esel-anti-Maus IgG-Antikörper 1:200 (Jackson IR, West Grove, USA; absolut: 0,75 mg/l) in DakoCytomation's „Antibody diluent with background reducing components" verdünnt worden. Nach dreimaligem erneutem Spülen mit TBS Puffer wurde kurz mit Wasser gespült und dann mit Ultramount (DakoCytomation) eingedeckt und über Nacht lichtgeschützt getrocknet.

### 3.9.3 Auswertung

Die Präparate sind unter einem Fluoreszenz Mikroskop betrachtet und fotografiert worden.

## 3.10 Extraktion der RNA

### 3.10.1 Einleitung

Um Aussagen über die Inhibitions-Effekte der asODN auf mRNA-Ebene treffen zu können, wurde die quantitative RT-PCR (3.13) eingesetzt. Hierzu musste zunächst die RNA aus den Zellen präpariert werden. Dazu wurde TRIzole® der Firma Invitrogen™ (Paisley, Schottland) verwendet. Es handelt sich dabei um ein einphasisches Gemisch aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat. Die Integrität der RNA wird bei der Zellzerstörung aufrechterhalten und später unter Zugabe von Chloroform in eine wässrige Phase überführt, aus der sie ausgefällt wird.

### 3.10.2 Verfahren

25 h nach der Transfektion (3.7.2) wurde das Medium abpipettiert, dann ist zügig 1 ml TRIzole® aufgetragen worden. Unter mehrfachem Abspülen des Bodens, damit möglichst alle Zellen gelöst wurden, ist der Inhalt eines jeden Loches in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt worden. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten 200 µl Chloroform hinzugegeben und jedes Gefäß 15 s geschüttelt werden. Dann wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase ist in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und 500 µl

Isopropyl Alkohol hinzugegeben worden. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde wieder bei 12.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand konnte dekantiert und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen werden. Dann wurde bei 7500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte dekantiert, das Pellet steril getrocknet und anschließend in 20 µl $H_2O$ resuspendiert werden.

Anschließend ist die Konzentration der RNA nach 1:20 Verdünnung im Photometer (s. 3.6.2.4) bestimmt worden. Ein Aliquot der RNA wurde in einem 2 %igen Agarose Gel überprüft (3.5.2).

Die Aliquots mit der übrig gebliebenen RNA-Lösung sind bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren worden.

## 3.11 cDNA Herstellung

### 3.11.1 Einleitung

Bei der Herstellung der cDNA wird mittels einer Reversen Transkriptase und randomisierten DNA-Hexameren aus der RNA wieder DNA-Information. Diese kann dann in einer PCR (3.12) amplifiziert werden. Die Spezifität bei dieser Methode wird durch die PCR Primer (3.4.2) gesichert. Zur Optimierung des Ergebnisses wird vor der reversen Transkription die DNA verdaut, da die Möglichkeit besteht, dass noch geringe Spuren dieser vorhanden sein könnten. Nach der cDNA Herstellung wird dann auch die RNA mittels Verdauungsenzym zerstört, um in der anschließenden PCR die Sensitivität zu erhöhen.

### 3.11.2 Verfahren

Hier wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR der Firma Invitrogen™ (Paisley, Schottland) eingesetzt. Alle in diesem Verfahren verwendeten Komponenten, bis auf die DNase, waren in diesem Kit vorhanden.

Pro Ansatz wurden in ein Eppendorfgefäß 3 µl des Gemisches A und 2 µg RNA gegeben und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl aufgefüllt.

Gemisch A für n Ansätze (n=Zahl der Ansätze, *=Multiplikator):

| | | |
|---|---|---|
| (n+1)* | 1 µl | 10x RT Puffer |
| | 1 µl | DNase I, RNase frei (10 U/µl) |
| | 1 µl | RNase Inhibitor (40 U/µl) |

Diese Ansätze sind dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert worden, um eine mögliche DNA Kontamination zu verdauen.

Nach der Inkubation wurde jeweils 1 µl EDTA (25mM; pH 8,0) dazugegeben, um die Aktivität der DNase zu stoppen. Alles ist für 15 min im PCR Gerät vom Typ DNA Thermal Cycler TC1 der Firma Perkin Elmer (Überlingen) auf 65°C erhitzt worden, um das Enzym zu denaturieren. Dann konnten die Ansätze für mindestens eine Minute auf Eis abgekühlt werden.

Pro Ansatz kam dann in jedes Eppendorf Gefäß folgendes dazu: 1 µl randomisierte Hexamere und 1 µl dNTP Gemisch (aus dem Kit). Alles wurde wieder für 5 min in der PCR Maschine bei 65°C erhitzt und mindestens eine Minute auf Eis abgekühlt. Dann sind je 9 µl des Gemisches B:

| | | |
|---|---|---|
| (n+1)* | 2 µl | 10x RT Puffer |
| | 4 µl | $MgCl_2$ (25 mM) |
| | 2 µl | DTT (100 mM) |
| | 1 µl | RNase Inhibitor (40 U/µl) |

dazugeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Darauf wurde 1 µl (50 U/µl) der SuperScript II RT dazugegeben und gemischt. Alle Ansätze sind im PCR Gerät bei 22°C für 10 min, 42°C für 50 min und dann 70°C für 15 min mit anschließender Abkühlung auf 2°C inkubiert worden.

Die auf Eis gelagerten Ansätze konnten anschließend mit 1 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) versehen und 20 min bei 37°C inkubiert werden, um die RNA zu zerstören. Dann wurden sie weiterbearbeitet oder bei –20°C eingefroren.

# 3.12 Qualitative PCR

### 3.12.1 Einleitung

Die Qualität der cDNA-Herstellung (3.11) wurde vor der quantitativen Auswertung (3.13) zunächst mit einer konventionellen PCR überprüft. Dies ist eine exponentielle DNA Synthese, bei der bereits synthetisierte Abschnitte als Matrizen dienen. Dafür wird die DNA zunächst denaturiert, damit die Primer an die Einzelstränge hybridisieren können. Anschließend findet ein Elongationsschritt durch eine DNA Polymerase statt. Im nächsten Zyklus wird wieder denaturiert, hybridisiert und elongiert.

### 3.12.2 Verfahren

Hier ist eine PCR mit einem Primerpaar für die Sequenz der mRNA von ß2-Mikroglobulin (3.4.2 u. 8.5.3) durchgeführt worden. Dazu ist der *Taq*-DNA Polymerase Kit der Firma Invitrogen™ (Paisley, Schottland) verwendet worden. Dieser enthielt alle hier verwendeten Komponenten bis auf die Primer.
Für 20 Ansätze wurde der Mastermix folgendermaßen pipettiert:

| | |
|---|---|
| 100 µl | 10 x Puffer |
| 10 µl | dNTP (20 mM) |
| 30 µl | $MgCl_2$ (50 mM) |
| 20 µl | Primer Mix (sense 25 µM, antisense 25 µM) |
| 795 µl | $H_2O$ |
| 5 µl | *Taq* Polymerase (2,5 U/µl) |

Dann sind 48 µl des Mastermix mit 2 µl der cDNA (3.11) in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und in einem PCR Gerät vom Typ Primus 96 plus der Firma MWG Biotech (Ebersberg) inkubiert worden.

Amplifikationsprogramm:

| | | |
|---|---|---|
| 1x | 95°C | 2’ |
| 35x | 95°C | 45’’ |
| | 58°C | 45’’ |
| | 72°C | 1’30 |
| 1x | 72°C | 7’ |
| Stopp | 4°C | |

### 3.12.3 Auswertung

Die Produkte wurden in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (3.5.2).

## 3.13 Quantitative PCR

### 3.13.1 Einleitung

Die quantitative PCR läuft ähnlich der qualitativen (3.12) ab. Hier wird nur die Menge an synthetisiertem Produkt nach jedem Zyklus gemessen. Dafür enthält der Mastermix einen Interkalator, hier wurde Sybr™ Green verwendet, dessen fluoreszierende Aktivität mit Zunahme des Produktes ansteigt. Unter Vergleich zu Standards mit bekannter Kopienzahl (3.6) können absolute Werte gemessen werden.

### 3.13.2 Verfahren

Das verwendete qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I war von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) und die PCR wurde in einem Perkin Elmer Gene Amp 5700 (Überlingen) durchgeführt. Dieses Kit enthielt alle hier verwendeten Komponenten bis auf die Primer.

Für eine komplette 96-Loch-Mikrotiter-Platte sind 2 Mastermixe mit COX-2 -, bzw. GAPDH – Primerpaaren als Referenz (3.4.2 u. 8.5.3) für jeweils 50 Ansätze wie folgt pipettiert worden:

| | |
|---|---|
| 250 µl | 10x Reaction Buffer |
| 200 µl | dNTP solution (2,5 mM) |
| 300 µl | $MgCl_2$ (25 mM) |
| 12,5 µl | Hot GoldStar enzyme (0,025 U/µl) |
| 75 µl | antisense Primer (10 µM) |
| 75 µl | sense Primer (10 µM) |
| 75 µl | Sybr Green (1:2000 verdünnt) |
| 1412,5 µl | $H_2O$ |

Die 96-Loch-Platte wurde je zur Hälfte für die COX-2 und GAPDH Amplifikation bestückt. Dafür sind in die Ansatzlöcher je 2 µl der gleichen cDNA-Proben in Dreifachbestimmung den beiden Primerpaaren zugegeben worden. Desweiteren sind, ebenfalls dreifach, eine Negativkontrolle („non template control“: steriles Wasser, ohne ein

nachzuweisendes Produkt/Template) und Standards mit $10^7$ bis $10^3$ Kopien der den COX-2 - und GAPDH - Primerpaaren entsprechenden Matrizen aufgebracht worden. Dann konnte jeder Ansatz mit 48 µl Mastermix versetzt werden.

Amplifikationsprogramm:

| | | |
|---|---|---|
| 1x | 95°C | 10’ |
| 40x | 95°C | 15’’ |
| | 60°C | 1’ |
| Stopp | 25°C | |

### 3.13.3 Auswertung

Das PCR Gerät Gen Amp 5700 wurde über einen PC gesteuert.

Zur qualitativen Kontrolle der gemessen Produkte wurden Schmelzkurven der entstehenden Hybride bestimmt und die Ansätze in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetragen (3.5.2). So konnten etwaige Nebenprodukte manuell ausgeschlossen werden.

Jede Probe wurde in der PCR dreifach bestimmt. Dann ist aus jeder Dreifachbestimmung das Mittel berechnet worden. Für die Quantifizierung des Inhibitionseffektes wurde ein Quotient aus der COX-2/GAPDH - mRNA-Kopienzahl gebildet. Dieser Quotient (Probe) wurde relativiert zu einer am selben Tag mitgelaufenen Probe (Referenz), auf die kein Oligonukleotid transfiziert worden war. Der so gewonnene, relative Wert der Expression wurde in Prozent ausgedrückt (s. untenstehende Formel). Die biologische Doppelbestimmung wurde gesichert.

$$\text{relative Expression } [\%] = \frac{\left(\frac{\text{Kopienzahl COX - 2}}{\text{Kopienzahl GAPDH}}\right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{\text{Kopienzahl COX - 2}}{\text{Kopienzahl GAPDH}}\right)_{\text{Referenz}}} * 100$$

## 3.14 Zell-Proliferations-Assay

### 3.14.1 Einleitung

Um das Wachstumsverhalten zu untersuchen bieten sich Farbstoffe verschiedener Proliferationstests, wie MTT, XTT oder Neutrales Rot an. Hier kam das wasserlösliche Alamar Blue (Biosource International Inc., Camarillo, USA) zum Einsatz. Diese Farbstoffe werden reduziert bei der Proliferation von Zellen. Ein solcher Effekt kann im Photometer gemessen werden und erlaubt Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten.

### 3.14.2 Verfahren

Die A-549 Zellen wurden 24 und 48 h nach Transfektion auf ihre Proliferationsrate untersucht. Zu diesen Zeitpunkten ist das Medium abpipettiert und durch neues Wachstumsmedium, welches 10 % Alamar Blue Lösung enthielt, ersetzt worden. Nach weiteren 6 h Inkubation unter Wachstumsbedingungen im Brutschrank wurde die Extinktion von 100 µl Aliquots bei 570 und 600 nm bestimmt.

### 3.14.3 Auswertung

Der prozentuale Unterschied der Farbstoff Reduktion wurde zwischen den transfizierten und unbehandelten Zellen nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt und berechnet. Diese Messungen erfolgten dreifach an zwei unterschiedlichen Versuchstagen.

# *4. Ergebnisse*

## 4.1 COX-2 - Expression in der Zellkultur

Die Vorversuche ergaben in der quantitativen PCR (3.13) die höchste COX-2 - Expression bei den A-549 Zellen, so dass nur diese für die folgenden Experimente eingesetzt wurden. Es zeigte sich ein Unterschied in der cDNA-Kopienzahl jeweils um den Faktor zehn in der Reihenfolge: DLD-1 < HT-29 < A-549. Bei der letzten Zelllinie waren das circa 40.000 Kopien pro Ansatz aus der cDNA (3.11). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass auch für die FACS-Analyse keine ausreichende COX-2 - Expression bei den beiden schwächer exprimierenden, DLD-1 und HT-29, zu erwarten war. Dies wurde ebenfalls bestätigt.

## 4.2 Qualitätskontrolle der asOligonukleotide

Zur Qualitätskontrolle der Oligonukleotide (3.4.1) und zum Ausschluss von Nebenprodukten wurden die Nukleinsäuren in einem Acrylamid-Gel (3.5.1) elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 10). Dabei sortieren sich die Moleküle in einem elektrischen Gradienten nach der Größe gegen den Widerstand des Gels. Einzelne, scharfe Banden deuten auf eine Reinheit des aufgetragenen Materials hin.

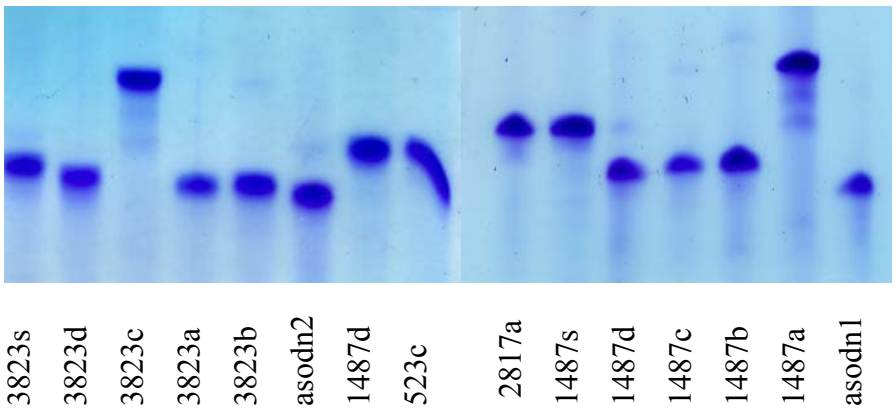



*Abb. 10: Denaturierendes Acrylamid-Gel mit 2 µmol ODN.*

## 4.3 Effizienz der Transfektion

Zur Überprüfung der Transfektions-Effizienz wurden die Zellen mit einem FITC-markierten asODN 3823c (3.7.3) transfiziert. Die Transfektion in die Zelle wurde mit Hilfe eines Lipides, das Komplexe mit den asODN bildet durchgeführt. Durch ein saures Waschen [48] sind dann an der Oberfläche haftende FITC-ODN gelöst worden. Nach dieser Transfektion zeigte sich im FACScan ein starkes Aufnahme-Signal (s. Abb. 11). Das fluoreszierende Signal der transfizierten Zellen war circa 200fach gegenüber dem der Kontrolle erhöht. Die Kurvenform der fluoreszierenden Intensität deutete auf eine homogene Aufnahme hin. Außerdem sind die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und abgelichtet worden (s. Abb. 12). Die anschließende Auswertung der fotografierten Gesichtsfelder ergab, dass mehr als 88 % der Zellen mit dem Oligonukleotid transfiziert waren. Als Negativkontrolle erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem FITC-ODN, jedoch ohne Zugabe des Transfektionsreagenz Oligofektamine™. Hier unterschied sich das Signal im FACS gegenüber der Kontrolle ohne FITC-ODN nicht. Im Fluoreszenzmikroskop waren diese Zellen nach dem sauren Waschen nicht zu erkennen.

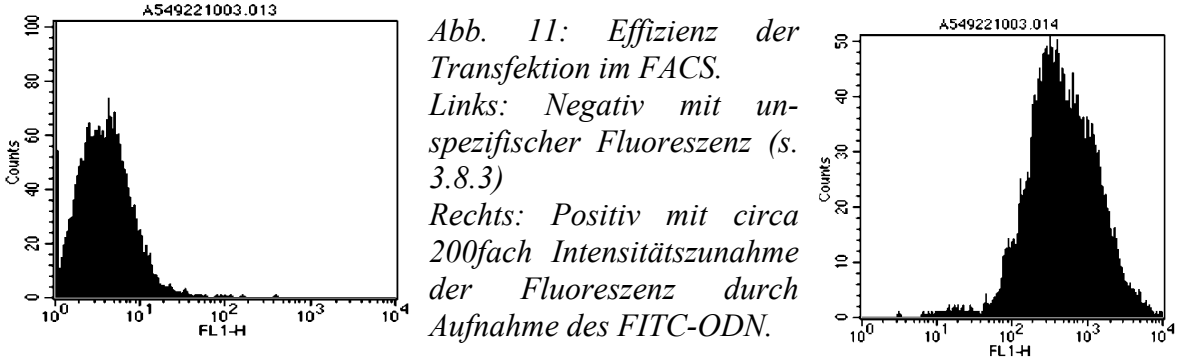



*Abb. 11: Effizienz der Transfektion im FACS.*
*Links: Negativ mit unspezifischer Fluoreszenz (s. 3.8.3)*
*Rechts: Positiv mit circa 200fach Intensitätszunahme der Fluoreszenz durch Aufnahme des FITC-ODN.*

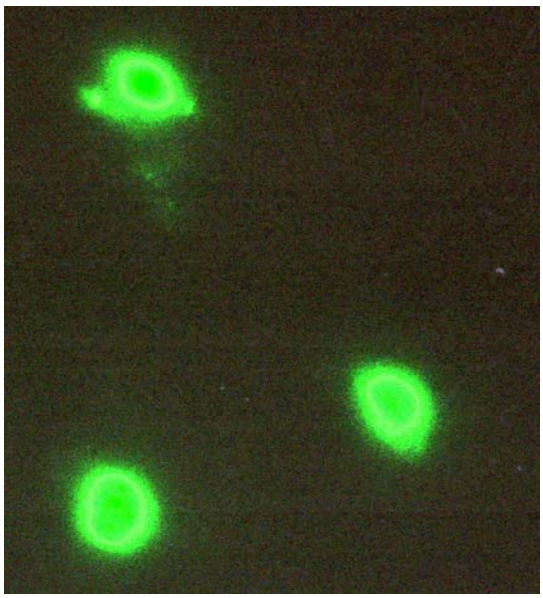


*Abb. 12: FITC-asODN transfizierte A-549 Einzelzellen unter dem Fluoreszenz-mikroskop 400x vergrößert und digital nachvergrößert.*

## 4.4 Durchflusszytometrie

Vor der Durchflußzytometrie wurde die COX-2 in den Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Anschließend ist die Intensität des emittierten Lichtes des Antikörpers an einzelnen Zellen gemessen und in Vergleich zu unbehandelten Zellen gesetzt worden. Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie sind wie unter 3.8.3 beschrieben als relative Expression bezogen auf die nicht-transfizierte Kontrolle aufbereitet und tabellarisch (s. Tab. 1), sowie grafisch (s. Abb. 13) dargestellt worden.

Die niedrigste relative Expression (MW: 75 %) wurde nach Transfektion mit dem asODN 3823c erzielt. Diese hätte noch niedriger sein können, wenn der vierte Einzelwert (107 %) nicht vorhanden gewesen wäre. Eine solche Effizienz der Inhibition auf unter 80 % relative Expression konnte nur von asodn1 erreicht werden. Das nächstbeste asODN 2817a lag mit einem Mittelwert von 81,4 % knapp darüber. Hier war jedoch zu beachten, dass dies den zweitbesten Median nach 3823c einstellen konnte. 523c zeigte ebenfalls eine Repression der relativen Expression auf unter 85 % im Mittel und lag damit noch vor dem zweiten als wirksam publizierten asODN asodn2. Die restlichen asODNs mussten unter Betrachtung der Standardabweichungen aus dem Bereich derer mit Wirksamkeit auf die COX-2 - Expression ausgeschlossen werden.

Die Mittelwerte der „scrambled controls“ sc1487c und sc3823c zeigten erwartungsgemäß keine Effekte auf die relative Expression.

| *Name* | *Einzelwerte* | | | | | | | | | *MW* | *SA* | *Median* | *n* | *d* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **523c** | 68 | 71 | 105 | 101 | 86 | 65 | 83 | 85 | 89 | **83,7** | 14,7 | 85 | 9 | 3 |
| **1487a** | 92 | 114 | 84 | 79 | 129 | | | | | **99,6** | 21,2 | 92 | 5 | 3 |
| **1487b** | 81 | 154 | 159 | 116 | 111 | 76 | | | | **116,2** | 35,1 | 114 | 6 | 3 |
| **1487c** | 132 | 95 | 83 | 185 | 95 | 145 | 105 | 104 | 116 | **117,8** | 31,8 | 105 | 9 | 3 |
| **1487d** | 90 | 85 | 106 | 98 | 100 | 81 | 89 | 97 | | **93,3** | 8,4 | 94 | 9 | 3 |
| **sc1487c** | 83 | 85 | 101 | 101 | 121 | 124 | 98 | 103 | | **102,0** | 14,7 | 101 | 8 | 3 |
| **2817a** | 77 | 111 | 75 | 60 | 101 | 73 | 73 | | | **81,4** | 17,9 | 75 | 7 | 3 |
| **3823a** | 77 | 110 | 70 | 121 | 132 | 119 | | | | **104,8** | 25,4 | 115 | 6 | 3 |
| **3823b** | 126 | 124 | 127 | 108 | 71 | 87 | 73 | 68 | | **98,0** | 26,1 | 98 | 8 | 3 |
| **3823c** | 58 | 72 | 75 | 107 | 78 | 60 | | | | **75,0** | 17,6 | 74 | 6 | 3 |
| **3823d** | 137 | 147 | 112 | 102 | 85 | 91 | 95 | | | **109,9** | 23,7 | 102 | 7 | 3 |
| **sc3823c** | 78 | 82 | 89 | 118 | 97 | 105 | 93 | 98 | | **95,0** | 12,8 | 95 | 8 | 3 |
| **asodn1** | 90 | 75 | 74 | 74 | 82 | 76 | 85 | | | **79,4** | 6,3 | 76 | 7 | 3 |
| **asodn2** | 105 | 116 | 51 | 92 | 76 | | | | | **88,0** | 25,5 | 92 | 5 | 3 |
| Kontrolle | | | | | | | | | | 100 | | | | |

*Tab. 1: Relative COX-2 – Protein-Expression [%] bestimmt durch FACS Analyse (Einzelwerte; MW (Mittelwert); SA (Standardabweichung); Median; n (Zahl der Einzelmessungen); d (Zahl der unterschiedlichen Versuchstage)). Die Kontrolle stellt die Expression der COX-2 in den nicht transfizierten Zellen des gleichen Versuchstages als Bezug dar. Alle Angaben sind in Prozent, außer n und d.*

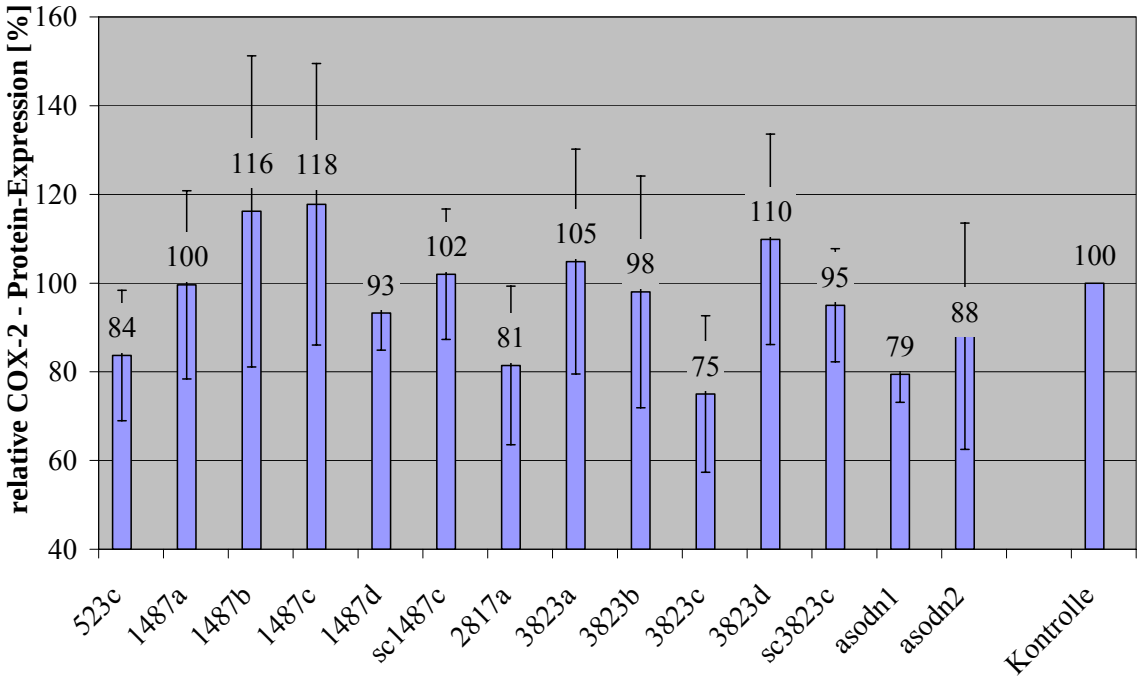



*Abb. 13: Ergebnisse der FACS Analyse: Relative COX-2 – Protein-Expression als Mittelwerte (□) mit Standardabweichungen ( I ) Die Kontrolle stellt die Expression der COX-2 in den nicht transfizierten Zellen des gleichen Versuchstages als Bezug dar.*

## 4.5 Immuncytochemie

Desweiteren wurden die A-549-Zellen nach der Transfektion zwecks optischer Darstellung der Inhibition auf Protein-Ebene auf Objekträger gezogen und immuncytochemisch mit anti-COX-2 - Antikörpern gefärbt (s. 3.9). Das Verfahren glich dem der Durchflußzytometrie mit fluoreszierenden Antikörpern.

In Abb. 14 sind diese nach Durchführung des Versuchsablaufs 3.9 im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Dabei sind native mit Zellen nach Transfektion mit asODN 3823c verglichen worden. Es handelt sich bei beiden Ablichtungen um die gleiche Färbung, gleiche Originalvergrößerung (ca. 200x) und gleiche Belichtungszeit und Blende, so dass eine relativ objektive Vergleichsmöglichkeit dargeboten wird.

Die Intensität der Färbung bei den nicht transfizierten Zellen erlaubt keinen Rückschluß auf zytomorphologische Merkmale wie den Zellkern. Unter Suppression der COX-2 - Expression ist jedoch auf den Kern zurückzuschließen bei einem grossen Teil der Zellen. Dies deutet auf niedrigere Überlagerung und damit erfolgreiche Inhibition der Cyclooxygenase-Expression hin.

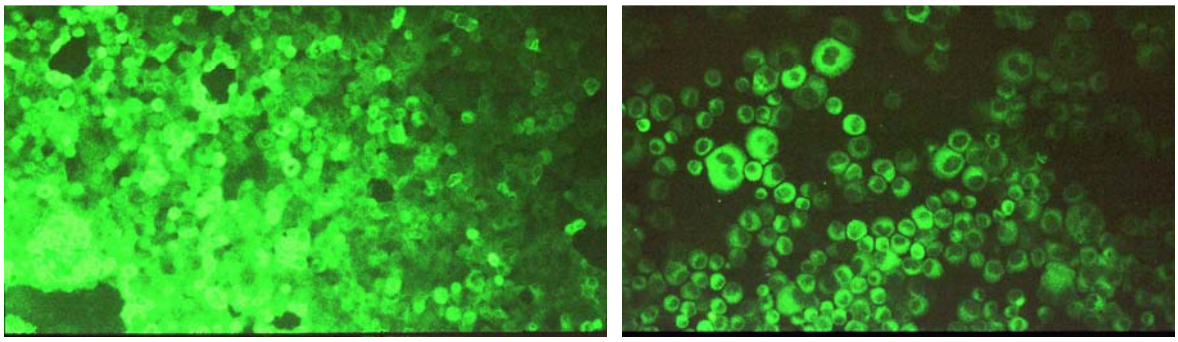
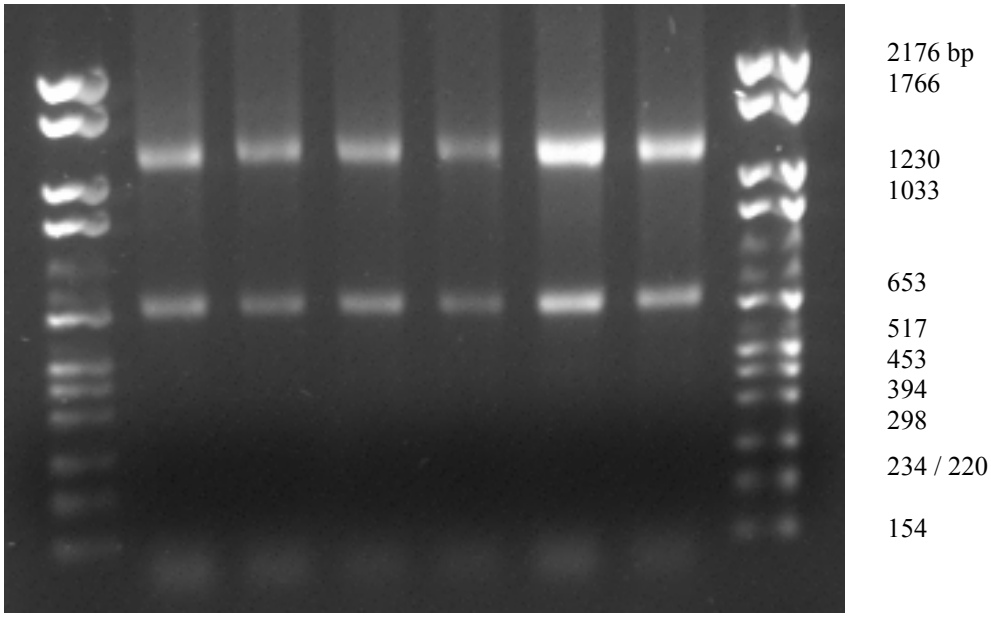


*Abb. 14: Immuncytochemische Färbung von A-549-Zellen mit dem COX-2 - Antikörper und einem fluoreszens-markierten (Cy®-2-) Sekundärantikörper zur Darstellung der COX-2 - Suppression durch das asODN 3823c.*
Links*: nicht-transfizierte Kontrollen,* rechts*: mit asODN 3823c transfizierte Zellen*

## 4.6 RNA Extraktion

Um Aussagen über die Menge der RNA nach Inhibition dieser durch asODN muss diese aus den Zellen isoliert werden. Dazu wurde ein Verfahren verwandt bei dem die Zellintegrität durch eine Lösung zerstört wird und die einzelnen Molekülgruppen in einem mehrphasischen Gemisch separiert wurden. Die Qualität der extrahierten RNA (3.10) ist dann in einem Agarose-Gel (3.5.2) überprüft worden (s. Abb. 16). Dabei sortieren sich die Moleküle in einem elektrischen Gradienten nach der Größe gegen den Widerstand des Gels. Es wurden theoretisch 1,5 µg RNA aufgetragenen. Bei den zu sehenden Banden handelt es sich um nicht degradierte, ribosomale RNA. Daraus kann man schließen, dass weitgehend intakte RNA isoliert wurde. Zur Größenorientierung ist der DNA-Molekulargewichtsmarker VI beidseitig aufgetragen. Die obersten beiden Banden der Proben-RNA entsprechen den 28S- (4,7 kb) und 18S- Untereinheiten (1,9 kb) ribosomaler RNA, die untere Bande entspricht 4S bis 5S (0,1-0,15 kb) RNA und ist genau genommen ein Gemisch aus tRNA und 5S ribosomaler RNA.




Marker VI A-549 RNA Marker VI

*Abb. 15: 1,5 %iges Agarose-Gel mit 1,5 µg RNA aus A-549 Zellen.*

## 4.7 Qualitative PCR

Die Qualität der cDNA (3.11) nach Präparation der RNA aus den transfizierten Zellen wurde mit einer PCR (3.12) unter Verwendung von Primern für das ß2-Mikroglobulin - Gen (3.4.2) überprüft. Dabei wird ein durch den Primer festgelegter Abschnitt der DNA exponentiell vervielfältigt. Die Amplifikation eines 298 bp-Produktes beweist eine erfolgreiche reverse Transkription der RNA in cDNA. In Abb. 16 ist ein Ausschnitt aus einem solchem Agarose-Gel zu sehen, in dem die PCR-Ansätze aufgetragen worden waren: jeweils eine eindeutige und scharfe Bande in jeder Spur zeigt das amplifizierte Produkt in den entsprechenden Proben. Der Molekulargewichtsmarker VI (8.2) ist zur Größenorientierung ebenfalls dargestellt.

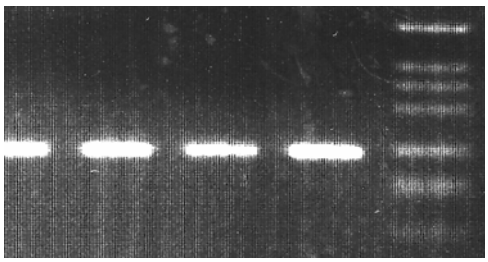



*Abb. 16: Beispiel eines 2%iges Agarose-Gel mit Produkten der ß2-Mikroglobulin - PCR.*

## 4.8 Quantitative PCR

Die quantitative PCR vermehrt wie die konventionelle PCR exponentiell einen definierten Abschnitt der DNA. Besonders ist hier, dass unter zu Hilfenahme eines Farbstoffes nach jedem Zyklus die Menge anhand der Leuchtintensität des Ansatzes bestimmt werden kann und mit unbehandelten, sowie definierten Mengen verglichen werden kann. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden wie unter 3.13.3 beschrieben als Höhe der relativen COX-2 - Expression nach Transfektion aufbereitet und tabellarisch (s. Tab. 2), sowie grafisch (s. Abb. 17) dargestellt. Außerdem wurde während der PCR automatisch eine Schmelzkurve bestimmt, bei der mehrere Spitzen auf unerwünschte Nebenprodukte deuten würden (s. Abb. 18). Diese Ansätze, die Hinweise auf Nebenprodukte zeigten, wurden mittels der benutzten Software detektiert und dann manuell ausgeschlossen.

Ein gutes Ergebnis mit einem Mittelwert von 66,4 % relative mRNA-Expression zeigte das asODN 3823c. Dies bestätigt den im FACScan (4.4) gezeigten Suppressionseffekt. Jedoch konnte hier 3823a einen gleichwertigen Effekt aufweisen. Dieses niedrige Niveau der relativen Expression durch Inhibition auf unter 70 % wurde von asodn1 ebenfalls erreicht. Bei den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ist jedoch zu beachten, dass eine relative raue Standardabweichung gerade im Bereich der asODN gegen das mRNA-Ziel 1487 vorhanden war. Trotzdem sind alle, die die relative Expression unter 80 % supprimieren konnten, als potenziell wirksam zu betrachten. Fünf weitere asODNs (s. Tab. 2) erreichten hier einen Mittelwert nach Inhibition der relativen Expression auf unter 80 %. Unter diesen waren 523c, 2817a und asodn2, die beim FACS (4.4) ebenfalls auffielen. Besonders 523c zeigte hier mit 55 % einen niedrigen Einzelwert. Eine genaue Schlussfolgerung kann nur ein Vergleich der beiden Versuchsreihen und ihrer Ergebnisse im FACS und der PCR unter 4.9 erlauben.

Die Ergebnisse der „scrambled controls“ sc1487c und sc3823c zeigten wiederum keine Effekte dieser asODN auf die relative Expression.

| ***Name*** | ***Einzelwerte*** | | | | | ***MW*** | ***SA*** | ***Median*** | ***n*** | ***d*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **523c** | 55 | 92 | 59 | 78 | | **71,0** | 17,2 | 69 | 4 | 4 |
| **1487a** | 48 | 80 | 73 | 93 | | **73,5** | 18,9 | 77 | 4 | 3 |
| **1487b** | 79 | 42 | 85 | 74 | 79 | **71,8** | 17,1 | 79 | 5 | 4 |
| **1487c** | 61 | 61 | 91 | 91 | 181 | **97,0** | 49,3 | 91 | 5 | 3 |
| **1487d** | 79 | 156 | 163 | 50 | 125 | **114,6** | 49,0 | 125 | 5 | 4 |
| **sc1487c** | 41 | 167 | 61 | 97 | | **91,5** | 55,4 | 79 | 4 | 4 |
| **2817a** | 62 | 84 | 93 | 71 | | **77,5** | 13,7 | 78 | 4 | 3 |
| **3823a** | 54 | 92 | 54 | | | **66,7** | 21,9 | 54 | 3 | 3 |
| **3823b** | 96 | 85 | 138 | 41 | 82 | **88,4** | 34,7 | 85 | 5 | 4 |
| **3823c** | 104 | 64 | 56 | 83 | 25 | **66,4** | 29,7 | 64 | 5 | 4 |
| **3823d** | 90 | 147 | 98 | 90 | | **106,3** | 27,4 | 94 | 4 | 3 |
| **sc3823c** | 90 | 124 | 63 | 87 | | **91,0** | 25,1 | 89 | 4 | 3 |
| **asodn1** | 98 | 56 | 54 | | | **69,3** | 24,8 | 56 | 3 | 2 |
| **asodn2** | 74 | 98 | 55 | | | **75,7** | 21,5 | 74 | 3 | 3 |
| Kontrolle | | | | | | 100 | | | | |

*Tab. 2: Relative COX-2 mRNA - Expression [%] bestimmt durch quantitative PCR (Einzelwerte; MW (Mittelwert); SA (Standardabweichung); Median; n (Zahl der Einzelmessungen); d (Zahl der unterschiedlichen Versuchstage)). Die Kontrolle stellt die Expression der COX-2 in den nicht transfizierten Zellen des gleichen Versuchstages als Bezug dar. Alle Angaben sind in Prozent, außer n und d.*

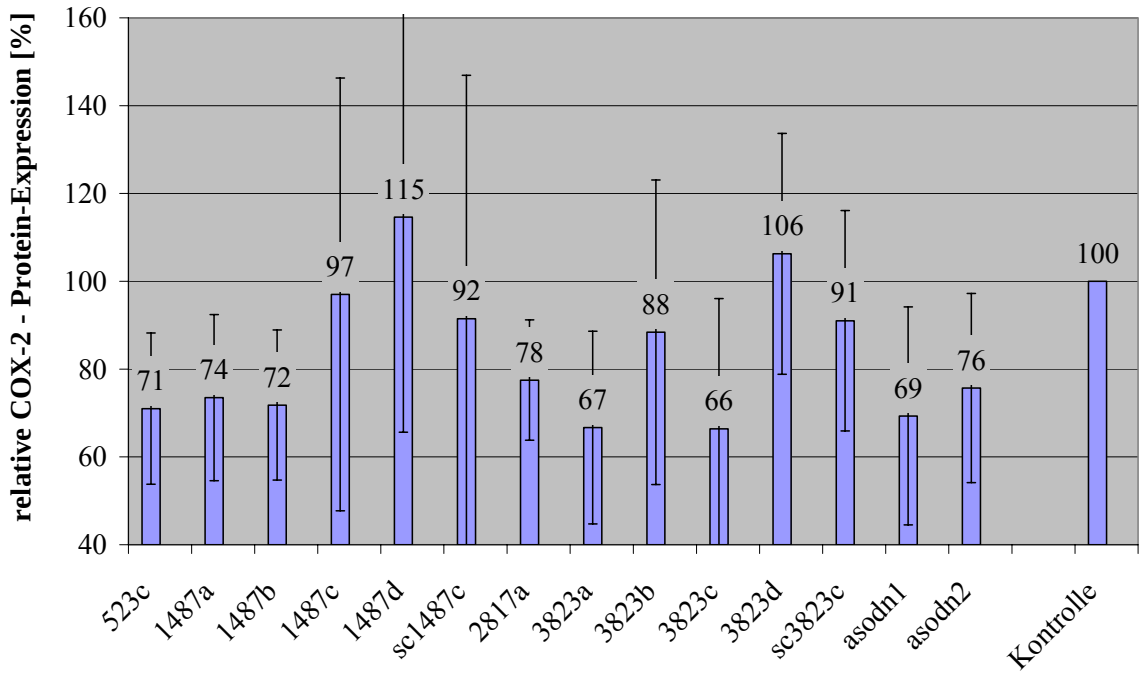



*Abb. 17: Ergebnisse der quantitativen PCR: Relative COX-2 - Expression als Mittelwerte (□) mit Standardabweichungen ( I ). Die Kontrolle stellt die Expression der COX-2 in den nicht transfizierten Zellen des gleichen Versuchstages als Bezug dar.*

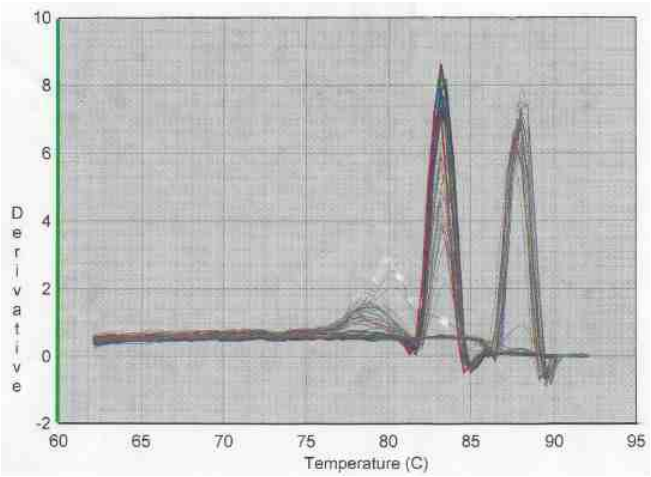
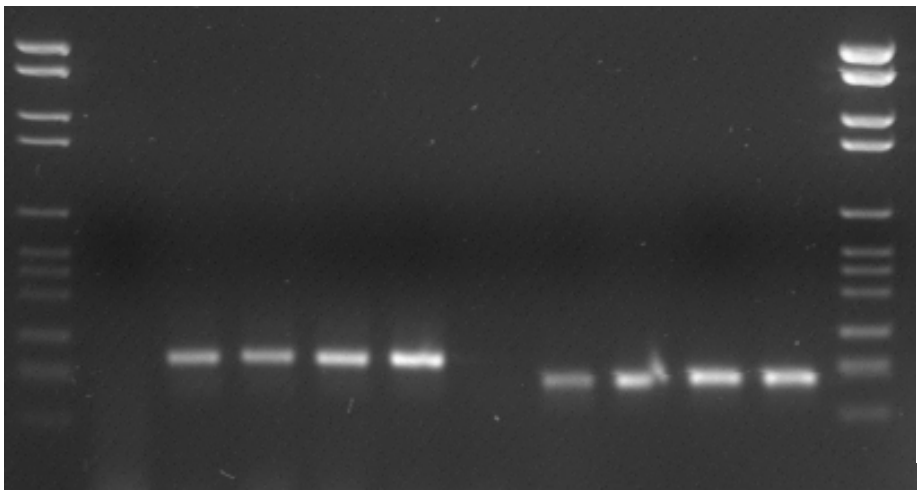



*Abb. 18: Schmelzkurven bei der quantitativen PCR. Rechter Peak COX-2, linker GAPDH. Nebenpeaks deuten auf eine Verunreinigung der Proben hin.*

Nach Abschluss der PCR wurden Aliquots der Ansätze aus den 96-Loch-Platten in einem Agarose-Gel (3.5.2) aufgetragen. Hiermit konnten etwaige Nebenprodukte ausgeschlossen werden. Die Banden waren eindeutig einzeln und scharf (s. Abb. 19). Sie entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen bei COX-2 von 218 bp und GAPDH von 258 bp.




Marker VI PCR Produkte GAPDH COX-2 Marker VI

*Abb. 19: 2%iges Agarose-Gel mit Produkten der quantitativen PCR.*

## 4.9 Vergleich der Ergebnisse FACS/PCR

Versucht man nun die Ergebnisse des FACS (4.4) und die der PCR (4.8) in Relation zu setzen, so bot sich hier nur eine Rangskalierung an. Streng genommen handelt es sich bei dieser auch um eine Kardinalskala, da quantitative Merkmale gemessen wurden. Diese Darstellung in Tab. 3 orientiert sich an der Effizienz in Bezug auf die Inhibition der relativen Expression der COX-2. Die Positionierung bezieht sich auf den niedrigsten Mittelwert bei den Ergebnissen der beiden Messverfahren (FACS und PCR).

| **Rang** | **Protein (4.4)** | **mRNA (4.8)** |
|---|---|---|
| 1 | 3823c (75,0 %) | 3823c (66,4 %) |
| 2 | asodn1 (79,4 %) | 3823a (66,7 %) |
| 3 | 2817a (81,4 %) | asodn1 (69,3 %) |
| 4 | 523c (83,7 %) | 523c (71,0 %) |
| 5 | asodn2 (88,0 %) | 1487b (71,8 %) |

*Tab. 3: Rangskalierung der Ergebnisse aus 4.4 und 4.8 im direkten Vergleich. Benannt sind jeweils das asODN und die relative COX-2 – Expression in den Zellen nach Transfektion.*

Das eindeutig effizienteste asODN war 3823c, das in beiden Verfahren den niedrigsten Mittelwert der COX-2 - Expression erreichte. Bei den für die vorliegende Arbeit entwickelten Testsystemen konnte keines der anderen getesteten asODN eine stärkere

Suppression der relativen COX-2 - Expression erreichen. Das asODN asodn1 ist mit einem 2. und 3. Rang in den beiden Verfahren als das nächst effizienteste zu bezeichnen. Mit einem deutlichen Abstand in der Rang Platzierung und den erreichten Werten beim FACS und der PCR taucht asODN 523c auf. Die nähere Betrachtung dieser Ergebnisse wird in der Diskussion erfolgen (5.2).

Wichtig ist hier die Anmerkung, dass der im FACS gemessene Funktionsträger, das Protein, unterdrückt werden muss, um eine biologische Auswirkung erwarten zu können. Der spezifische Effekt des Inhibitionsmechanismus kann jedoch nur mit der quantitativen RT-PCR bestimmt werden (s. 2.1.1).

## 4.10 Zell-Proliferations-Assay

Bei den Versuchen zum Proliferationsverhalten der A-549 Zellen nach Transfektion der asODN wurde ein Zusammenhang zwischen der COX-2 - Suppression und dem Wachstumsverhalten postuliert. 24 und 48 h nach Transfektion erfolgten die Messungen unter Verwendung des Farbstoffes Alamar Blue. Dieser wird bei einer erhöhten Zellsynthesleistung reduziert und erlaubt anhand der Änderung der Extinktion bei 570 und 600 nm Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten. Dabei wurden nur die getestet, die zuvor den stärksten Effekt auf die COX-2 - Expression auf mRNA und Protein-Ebene zeigten (523c, 3823b, 3823c und asodn1) und zusätzlich die scrambled control (sc3823c). Die Ergebnisse wurden in Beziehung zu denen von unbehandelten Kontrollen gesetzt, deren Proliferationsrate als 100 % betrachtet wurde. 24 h nach Transfektion wurde kein Unterschied zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen beobachtet. 48 h nach Transfektion war die Proliferationrate nach Transfektion von asODN 523c um 14 % niedriger als in den Kontrollansätzen (s. Abb.20). Dies zeigte auch bei der FACS- und RT-PCR – Analyse Inhibitionseffekte (s 4.9).

3823b zeigte nach Transfektion bei sechs Messungen eine relative Zellproliferation von 96 %, 3823c von 102 % und asodn1 von 98 %. Die scrambeld control lag bei 97 %. Diese fünf zeigten somit keinen Effekt, was von der Transfektion-Kontrolle (sc3823c) nicht anders erwartet wurde.

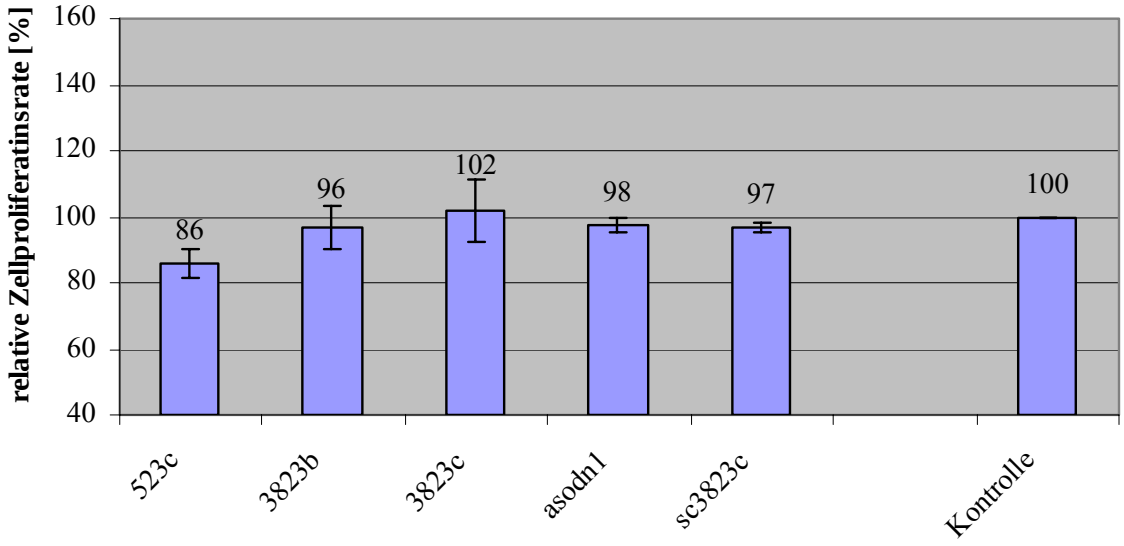



*Abb. 20: Ergebnisse des Zell-Proliferations-Assay 48 h nach Transfektion: Mittelwerte (□) mit Standardabweichungen (* I *) von 3 Messungen an 2 Versuchstagen. Die Kontrolle stellt die Proliferationsrate in den nicht transfizierten Zellen dar.*

# 5. Diskussion

## 5.1 Rahmenbedingungen

Der Angriff auf bestimmte Proteine in der medikamentösen Therapie von Krankheiten ist nicht ersetzbar. Die Techniken der modernen Molekularbiologie ermöglichen dafür nicht nur die Herstellung solcher Medikamente *in vitro*. Ihre Möglichkeiten kommen auch zum Einsatz, um körpereigene Zellen und Gewebe zu veranlassen, die gewünschten Funktionsträger in Form von Proteinen selbst herzustellen. Die Korrektur eines molekularen Defektes auf DNA- oder RNA-Ebene ist die Domäne der Gentherapie. Durch diese Therapieform kann man die Produktion unerwünschter Genprodukte, wie Entzündungsmediatoren oder Tumorproteine, gentherapeutisch unterdrücken oder therapeutisch erwünschte Gene, beispielsweise Tumorsuppressorgene, vermehrt zur Expression bringen.

Grundsätzlich werden zwei Strategien der somatischen Gentherapie unterschieden: die *ex vivo* oder *in vitro* und die *in vivo* Behandlung. Bis heute wurde der Gentransfer in den meisten Fällen *in vitro* durchgeführt. Bei dieser Behandlung werden die Zielzellen, beispielsweise Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen aus dem Organismus isoliert, in Zellkultur mit dem gewünschten Gen transduziert und anschließend in den Organismus reimplantiert (s. 2.1). Die Anwendbarkeit ist so aber auf Zellen beschränkt, die relativ leicht aus dem Körper isoliert und in genügenden Mengen gezüchtet werden können. Zudem gelingt die Reimplantation der *in vitro* transfizierten Zellen in den Körper oft nur unvollständig, und/oder die Expression/Suppression des Transgens geht *in vivo* relativ rasch wieder verloren [46]. Auf der anderen Seite sind *in vitro* Gentransfermethoden aber generell effizienter als die bis heute zur Verfügung stehenden *in vivo* Methoden.

Bei der *in vivo* Behandlung wird das gesunde Gen direkt in die von der Krankheit betroffenen Körperzellen, beispielsweise Karzinomzellen in der Lunge oder des Kolons, dirigiert. Der *in vitro* und der *in vivo* Gentransfer ist im Prinzip eine Fortentwicklung der Herstellung eines rekombinanten Proteins und beruht auf dem Einsatz ähnlicher molekularbiologischer Verfahren. In naher Zukunft ist der weitere Fortschritt der

somatischen Gentherapie vor allem abhängig von der Entwicklung sicherer und leicht anwendbarer *in vivo* Gentransfermethoden. Diese erlauben eine effiziente und stabile Genexpression/-suppression in bestimmten Zielorganen. Um genetisches Material in Zellen einzuschleusen, muss es in ein Vehikel (Vektor) verpackt werden. Bei menschlichen Zellen sind die Vektoren häufig Viren, seltener nichtvirale Vektoren. Diese Ansätze bedürfen einer genaueren Betrachtung der Möglichkeiten:

- Im Rahmen der klassischen Gentherapie werden Viren mit molekularbiologischen Mitteln verändert, indem man typischerweise Virusgene ausschaltet, die zur Vermehrung des Virus benötigt werden. In diese vermehrungsunfähigen Viren bringt man dann das zu übertragende Gen ein. Es entsteht ein rekombinantes Virus, das man nun zur Gentherapie einsetzen kann.
- Transiente Genexpression/-suppression kann auch mit einer Reihe nichtviraler Transfermethoden erreicht werden, wie zum Beispiel durch Injektion nackter DNA in das Gewebe oder mit Hilfe von Liposomen. Bei diesen handelt es sich um feine Fetttröpfchen, in die die DNA verpackt wird. Diese Methode fand Anwendung in der vorliegenden Arbeit. Man kann auch winzige Metallteilchen aus Wolfram oder Gold mit Erbgut beschichten und dann in das Zielgewebe mittels der sogenannten „gene gun“ hineinschießen. Diese Technik ist heute vor allem bei der Gen-Impfung im Einsatz.

Auch wenn weltweit an mehr als 600 bekannten Studien [18, 91] zur Gentherapie gearbeitet wird, muss man aus klinischer Sicht sagen, dass sie sich noch in den Anfängen befindet.

Die Antisense Strategie zielt als Variante der molekularen Therapie auf die Unterdrückung bestimmter Gen-Expressionen durch spezifische Hemmung der Bildung von Zielproteinen ab, wie unter 2.1 erläutert. Speziell solche Moleküle, die sehr klein sind oder für die keine geeigneten Antikörper Therapien zur Verfügung stehen kommen in Frage. Der Einsatz von Antisense Nukleinsäuren kann bisher auf nur ein marktreifes Medikament zur Behandlung der CMV-Retinitis blicken [38].

Ähnlich der Antisense Strategie mit Oligonukleotiden (s. 2.1.1), die bereits 1978 erstmals erfolgreich verwendet werden konnte [113], nutzt die siRNA (small interfering RNA oder RNAi) komplementäre Sequenzen, um Ziel-mRNA zu zerstören. Dieser Mechanismus wurde 20 Jahre später erstmals beschrieben [16]. Es handelt sich dabei um kurze, doppelsträngige RNA Moleküle, die sequenzspezifisch mit Hilfe bestimmter Proteine zur

Degradierung homologer Einzelstrang-RNA führt [114]. Dieser Mechanismus kommt im Gegensatz zu Antisense Oligonukleotiden in der Natur vor, um eine Genexpression zu unterdrücken, und spielt beispielsweise eine Rolle im Wirtszellschutz von Viren gegenüber dem Organismus. Aus praktischer Sicht kann damit auch die siRNA zum therapeutischen Angriff auf die Expression genutzt werden und ist auch schon erfolgreich beim Grippevirus verwendet worden [22]. Studien zum Einsatz gegen HPV, HCV, Polio-Viren und einige onkologisch wichtige Gene laufen [102].

Für die Gentherapie von Krebspatienten stehen vier Wege im Vordergrund [18]:

- die Immunpotenzierung oder Tumorvakzinierung,
- die molekulare Chemotherapie mittels gentechnischer Sensibilisierung von Tumorzellen gegen tumorizide Pharmaka oder Einführung von Selbstmordgenen,
- die Einführung von tumorrevertierenden und Zelltod auslösenden Genen oder
- die Inaktivierung von Onkogenprodukten und anderen Genprodukten (z. B. durch Einführung von Antisense Nukleinsäuren).

Mit den verschiedenen Ansätzen sind bei einzelnen Patienten Erfolge erzielt worden, ein wirklicher therapeutischer Durchbruch blieb aber bisher aus. Beispielweise wurde mittels Einführung des Apoptose auslösenden Genes *p53* [61] ein *in vitro* Versuch durchgeführt, um das Tumorwachstum zu hemmen. Trotz unterschiedlicher Ursachen und genetischer Abnormalitäten von Tumoren kann die Ausstattung entarteter Zellen mit einem funktionellen Tumorsuppressorgen zu therapeutischen Erfolgen führen. Die Suppression von Tumorzellen mit *p53* wirkt auch synergistisch mit Chemotherapeutika, wie Cisplatin [60]. Diese Methode hat sich als effektiv genug erwiesen, um in einer Reihe klinischer Studien weiter erprobt zu werden [72, 73], leider mit mäßigem Erfolg, gerade im Hinblick auf Lungenkarzinome. Auch mit anderen Tumorsuppressorgenen wie *BRCA1sv* sind erste Studien unternommen worden [90].

Aggressive Tumoren zeichnen sich durch eine erhöhte Proliferation und die Fähigkeit zur Angioneogenese aus. Das Ki-67 - Antigen spielt eine Hauptrolle bei der Proliferation beispielsweise von kolorektalen Karzinomen [13]. Es wird ausschließlich in den Teilungsphasen (G1-, S-, G2- und M-Phase) der Tumorzellen exprimiert, in nicht teilungsaktiven Zellen (G0-Phase) dagegen nicht [23]. Eine Studie an der Universität zu Lübeck mit Antisense Oligonukleotiden zeigte für Ki-67 viel versprechende Ergebnisse. Es wurde mit drei Krebszelllinien von Menschen, sowie der Maus als Tiermodell gearbeitet.

Ein anti-proliferativer Effekt konnte mit einer 50 %igen Inhibitionskonzentration von 150 nM asODN gezeigt werden [44].

Von VEGF ist bekannt, bei kolorektalen Karzinomen ein wesentlicher Faktor der Angiogenese zu sein [105]. Als spezifischer Wachstumsfaktor stimuliert es die Proliferation und Migration von Gefäßendothelzellen und induziert somit die Ausbildung eines dichten Gefäßnetzes zur Versorgung des Tumorgewebes [14]. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von asODN gegen VEGF auf Protein- und mRNA-Ebene in U937 Schaum Zellen (humane Monozyten) und lieferte ebenfalls interessante Ergebnisse [109]: Die VEGF Konzentration wurde mittels ELISA, die Protein Expression wurde immunhistochemisch und die mRNA mittels Northern Blot bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass die VEGF Konzentration nach Anwendung des asODN im Medium um 45 %, die relative Expression des Proteins in der Zelle um 65 % und die der mRNA um 47 % verringert wurde.

Diese Ansätze, gerichtet gegen VEGF und Ki-67, sind unter onkologischen Gesichtspunkten aussichtsreich und verfolgungswürdig.

Auch die Cyclooxygenase-2 spielt eine Schlüsselrolle im Szenario der Entwicklung von aggressiven Tumoren, wie unter 2.2.3 ausgeführt. Die selektive Inhibierung der COX-2 ist unter therapeutischen Gesichtspunkten der unselektiven vorzuziehen. Der selektive Inhibitionsansatz reduziert die Zellproliferation, induziert die Apoptose und lässt die COX-1 vermittelte Zellprotektion im Gastrointestinaltrakt und andere physiologische Funktionen unberührt [19]. Es gibt jedoch Arbeiten, die zeigen, dass zwar die Nebenwirkungen reduziert sind bei Angriff auf die COX-2 - mRNA mit siRNA, jedoch die Proliferation der verwendeten Zelllinie durch diese nicht beeinflusst wird [9]. Dies wird unter 5.2 genauer im Rahmen der eigenen Ergebnisse betrachtet.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein geeignetes Transfektionssystem zur Einschleusung der Antisense Oligonukleotide in die Zellen ausgewählt.

Dann sind geeignete Systeme zur Bestimmung des Inhibitionseffekts bei der Cyclooxygenase-2 ausgewählt und erfolgreich verwendet worden. Während die Ermittlung der mRNA-Kopienzahl mit handelsüblichen Verfahren erfolgte, wurde bei der Durchflusszytometrie ein System entwickelt, das aus eigenen Erfahrungen mit publizierten Protokollen und im Labor bekannten Methoden der Immuncytochemie entstand. Dabei konnte erstmals mittels der Durchflusszytometrie ein Verfahren entwickelt werden, das schneller und mit wenigeren Arbeitsschritten durchzuführen ist und wahrscheinlich weniger Störfaktoren im Vergleich zur quantitativen PCR unterliegt. Letztere sollte im

Rahmen eines Auswahlverfahrens für geeignete Antisense Oligonukleotide gegen die COX-2 durchgeführt werden, um einen spezifischen Effekt an der mRNA zu untermauern.

## 5.2 Eigene Ergebnisse

Geringe Mengen von Antisense Oligonukleotiden werden durch Zellen spontan aufgenommen. Dazu bedarf es jedoch für therapeutische Effekte sehr hoher Dosen, die mindestens 1000fach im Überschuss zur Menge an Ziel-RNA sind [5]. Derzeit werden meist kationische Lipide zur Transfektion verwendet, die mit den anionischen Phosphotioat-ODN elektrostatische Wechselwirkungen eingehen, indem sich spontan ein Lipid/DNA Komplex bildet. Diese scheinen eine ideale intrazelluläre Verteilung der Oligonukleotide zu begünstigen [28]. In der vorliegenden Arbeit wurde das kationische Lipid Oligofektamin der Firma Invitrogen zur Einschleusung der asODN verwendet. Die erfolgreiche Transfektion eines FITC-markierten asODN wurde sowohl durchflusszytometrisch als auch durch fluoreszensmikroskopische Visualisierung der Zellen belegt (s. 4.3.). Zur weiteren Technikvalidierung wurden bei allen Experimenten dieser Arbeit Kontrolltests durchgeführt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie konnten auch nach immuncytochemischer Anfärbung unter dem Mikroskop bestätigt werden. Während der Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden wiederholt Gelelektrophoresen zur Qualitätskontrolle durchgeführt. Außerdem war es möglich mittels der benutzten Software bei der quantitativen PCR Schmelzkurven aufzuzeichnen, um bei möglicherweise amplifizierten Nebenprodukten diese Ansätze auszuschließen.

Insgesamt wurden zwölf asODN gegen sechs unterschiedliche Regionen in der COX-2 mRNA zur Enzym Suppression in A-549 Zellen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Cyclooxygenase-2 - Expression durch Antisense Oligonukleotide unterdrückt werden kann. Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein neues, effizientes asODN, angreifend an der Position 3823, gefunden, das bessere Ergebnisse als bisher bekannte im Vergleich auf Protein- und mRNA-Ebene in der verwendeten Zelllinie ohne Induktion der Cyclooxygenase-Expression, beisp. durch ein Zytokin, erzielen konnte (s. 4.9). Es ist jedoch zu beachten, dass der Testumfang der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend ist, um die Ergebnisse als statistisch unanfechtbar darzustellen. Es lassen sich vielmehr nur Tendenzen erkennen.

Die zuerst erfolgte Durchflusszytometrie ergab bei zwei Oligonukleotiden aussichtsreiche Inhibitionseffekte auf Proteinebene. Von den für diese Arbeit neu konzipierten hatte das asODN 3823c die besten Ergebnisse mit einer Suppression der relativen Expression von COX-2 auf 75 % (s. Abb. 13), gefolgt von asodn1 aus einer publizierten Studie [36]. Bei Betrachtung der Einzelwerte im FACScan sind einige Ausreißer zu erkennen, die sich mit einer erfolglosen oder ineffizienten Transfektion erklären ließen. Auch sind von Antisense Nukleinsäuren stimulierende Effekte bekannt [100]. Diese Erkenntnis könnte die Ergebnisse der asODN 1487a-d erklären. Bei den „scrambled controls“ sc1487c und sc3823c handelt es sich um nicht homologe Kontrollen, die theoretisch keine Inhibitionseffekte zeigen dürften (s. 3.4.1). Die leichte Suppression der relativen COX-2 - Expression durch das asODN sc3823c ist von Antisense Nukleinsäuren bekannt [56, 107], nach Transfektion von sc1487c sogar nicht vorhanden.

Zur Effektbestimmung auf mRNA-Ebene und damit zum Nachweis eines spezifischen Wirkmechanismus wurde die quantitative RT-PCR (s. 4.8) durchgeführt. Dies ist wichtig, da anzunehmen ist, dass die Effekte hier früher und deutlicher eintreten.

Die wirksamste Antisense Nukleinsäure 3823c, bestimmt bei der Durchflusszytometrie, lässt sich mit einer relativen Expression von 66 % in der PCR bestätigen (s. Abb. 17). Die Ergebnisse unterlagen insgesamt einer relativ hohen Schwankung. Das Ergebnis von asODN 3823a (relative Expression 67 %) zeigt, dass dieser Zielbereich die größte Effizienz verspricht.

Die Oligonukleotide asodn1 und asodn2, die aus Publikationen anderer Arbeitsgruppen hinzugezogen wurden, bedürfen einer genaueren Betrachtung und Einordnung.

Das 30mer asodn1 [36] ist gegen die Region 1917 bis 1946 (bezogen auf die Sequenz NM_00963), welche kurz vor dem Stoppkodon auf der COX-2 - mRNA liegt, gerichtet. In den in [36] beschriebenen Experimenten wurden IL-1ß-stimulierte A-549 Zellen mit 5 µM asODN transfiziert. Die Durchführung eines ELISAs zur Ermittlung der Konzentration des COX-2 - Enzymproduktes $PGE_2$ ergab, dass 24 h nach der Transfektion die $PGE_2$-Synthese in den Zellen vollständig unterdrückt war. Ein solch drastischer Effekt konnte hier nicht demonstriert werden. Dies lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Ebenen auf denen die Inhibition überprüft wurde erklären. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des COX-2 - Proteins mittels FACS gemessen und nicht die Konzentration des Enzymproduktes $PGE_2$. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz in den gemessenen Effizienzen könnte in den unterschiedlichen Konzentrationen an asODN liegen, welche für die Hemm-Experimente verwendet worden waren. Im Vergleich zu den

in der vorliegenden Arbeit eingesetzten 200 nM wurde in den in [36] beschriebenen Untersuchungen mit 5 µM eine 25fach höhere Konzentration des asODN transfiziert. Diese ungewöhnlich hohe Dosis könnte auch zu unspezifischen Inhibitionsmechanismen geführt haben. Eine endgültige Beurteilung darüber läßt sich nicht treffen, da in [36] keine Aussagen zur COX-2 - mRNA - oder der Protein-Expression gemacht wurden.

Im direkten Vergleich der Effizienz von asodn1 mit der unseres Antisense Oligonukleotids 3823c im hier verwendeten Testsystem erzielten beide auf Proteinebene annähernd gleiche Inhibitionseffekte, wobei die Effizienz von 3823c mit einer Suppression der relativen Expression auf 75 % leicht über der von asodn1 (relative Expression: 79 %) lag. Dieser Befund bestätigte sich mit einer relativen COX-2 - Expression nach Transfektion von asodn1 von 69 % bzw. von 3823c von 66 % auch auf mRNA-Ebene.

Asodn2 ist bereits in zwei Studien verwendet worden [32, 98]. Das 14mer asodn2 ist komplementär zu den in der 3'-UTR (nicht translatierte Region) gelegenen Positionen 2300 bis 2314 der COX-2 - mRNA (bezogen auf NM_00963) [32, 98]. Bei der Erstbeschreibung [98] wurden Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen (HUVEC) zur Suppression der COX-2 - Expression mit 500 nM Antisense Oligonukleotid transfiziert. Der zur Überprüfung des COX-2 - Levels in den transfizierten Zellen durchgeführte Western Blot zeigte, dass keine vollständige Suppression erreicht worden war. In einer weiteren Studie, in denen asodn2 eingesetzt worden war, wurden die aus Hauttumoren stammenden Zelllinien EcCa und HSC-5 verwendet, von denen die erstere einen deutlich höheren Cyclooxygenase-2 - Spiegel aufweist als die zweite [32]. 24 h nach Transfektion von 200 nM asodn2 konnte für die EcCa-Zellen mittels Western Blotting eine Verminderung des COX-2 - Protein-Levels auf 60 % gezeigt werden. Über die Wirksamkeit von asodn2 in der HSC-5 Zelllinie lässt sich nur schwer eine Aussage machen, da die COX-2 - Expression schon in den nicht behandelten Zellen auf einem relativ niedrigen Level demonstriert wurde. Eine Beurteilung über die Inhibition mittels Western-Blot ist zudem recht ungenau. Zur Bestimmung der $PGE_2$-Konzentration wurde ein Radioimmunoassay durchgeführt, bei dem für beide Zelllinien eine Verminderung bis auf circa 60 % des Syntheselevels der unbehandelten Zellen zu sehen war. Es wurde auch ein um circa 25 % vermindertes Wachstum der Zellen in einem Proliferations-Assay demonstriert. Die beschriebenen Ergebnisse stimmen unter Berücksichtigung der verschiedenen Testsysteme tendenziell mit dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekt von asodn2 überein, welches die relative COX-2 - Protein-Expression in A-549 Zellen auf 88 % und die der mRNA auf 75 % supprimierte. Der Suppressioneffekt von asodn2 war damit etwas geringer ausgeprägt als der des asODN 3823c.

Von einer signifikanten Inhibition lässt sich erst ab mehr als 50 % Abfall der Zielgen-Expression sprechen [77]. Dies wurde unter anderen Konditionen für asodn1 demonstriert [36]. Bei folgenden Arbeiten könnte ein solches Ergebnis im hier verwendeten Testsystem durchaus mit höheren Dosierungen erreicht werden. Beim Vergleich der Ergebnisse aus den beiden Testverfahren (s. 4.9) zeigt sich deutlich, dass in den Versuchen der vorliegenden Arbeit 3823c die besten Hemmeffekte zeigte. Als zweitbestes aus allen ermittelten Daten geht asodn1 hervor. Dies hat aufgrund der Länge einige Nachteile in Bezug auf die Wirkspezifität.

Die Spezifität der Antisense Oligonukleotide ist begrenzt. Sie hybridisieren nicht nur mit dem komplementären Abschnitt der Ziel-RNA, sondern binden auch an andere RNA-Transkripte und sogar Proteine. Die falsche Bindung eines asODN an eine beliebige RNA auf Grund einer partiellen Komplementarität von nur fünf sequentiellen Basenpaaren kann bereits die RNase H aktivieren und zur Spaltung des betroffenen RNA-Transkriptes führen [107]. Dieses Phänomen nennt man „irrelevant cleavage“. Je länger ein verwendetes Oligonukleotid ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit solcher partieller Komplementaritäten und entsprechend geringer wird die Spezifität des Antisense Oligonukleotids. Dies ist entscheidend, wenn man betrachtet, dass asodn1 ein 30mer ist und üblicherweise mit wesentlich kürzeren asODN gearbeitet wird. Statistische Berechnungen zeigen, dass ein 15mer Oligonukleotid mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 1 zu $10^9$ eine komplett komplementäre Sequenz findet. Genügt jedoch eine partielle Komplementarität von acht konsekutiven Basenpaaren, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf 1 zu 8192, das heißt, das ODN findet alle 8192 Basen eine hinreichend komplementäre Sequenz zur Aktivierung der RNase H. Eine Komplementarität von fünf Basen ist demnach noch um ein Vielfaches wahrscheinlicher. Allerdings scheint nicht nur die bloße Länge des ODN, sondern auch die chemische Modifikation und die dreidimensionale Struktur eine Rolle zu spielen [50].

Um die Auswirkung der beobachteten Suppression der COX-2 - Expression auf das Wachstum zu überprüfen, ist die Proliferationsrate nach Transfektion mit den asODN gemessen worden. Hierbei wurde 24 h nach Transfektion kein Unterschied zwischen transfizierten und unbehandelten Zellen beobachtet. Jedoch 48 h nach Transfektion war die Proliferation 14 % niedriger beim asODN 523c als bei den nicht transfizierten Vergleichsansätzen. Dieses asODN zeigte nach Transfektion eine Suppression der COX-2 - mRNA auf 71 % und einen Protein-Spiegel von 81% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die asODN 3823b, 3823c und asodn1 zeigten keinen Effekt. Interessanterweise

waren dies gerade die mit den stärkeren Effekten auf die COX-2 - Expression. Hier muss noch geklärt werden, wie die Cyclooxygenase-2 - Expression im Zusammenhang mit der Proliferation steht, da in der Literatur dazu sehr widersprüchliche Ergebnisse beschrieben sind, wie im folgenden Absatz ausgeführt wird.

Der experimentelle COX-2 - Inhibitor NS398 wurde zum Vergleich bei den Studien von asodn1 [36] und asodn2 [32] mit getestet. Nur asodn1 konnte ähnliche Ergebnisse bei der Suppression erzielen. In Versuchen mit Lungentumoren im Mausmodell wurde gezeigt, dass der selektive COX-2 - Hemmer NS398 das Wachstum um ein Drittel verlangsamt [70]. Bei Verwendung von Meloxicam™, ebenfalls ein selektiver COX-2 - Inhibitor, in A-549 Zellen zeigte sich, dass dosisabhängig eine Reduktion der Proliferation um bis zu 80 %, bzw. 50 % zu beobachten war [96]. Dies lässt sich jedoch nur bei COX-2 positiven Zellen demonstrieren, was auf einen Zusammenhang zwischen COX-2 und Proliferation deuten könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden mit den beiden Zelllinien aus Hauttumoren, die mit asodn2 behandelt wurden, gemacht [32]: Nur die COX-2 exprimierenden EcCa Zellen konnten bereits 48 h nach Transfektion um 21 % im Wachstum verlangsamt werden, während die HSC-5 Zelllinie auch nach 96 h keine nennenswerte Unterschiede zu den unbehandelten Ansätzen zeigte.

Dagegen steht ein Ansatz mit siRNA gegen die mRNA, der bei kompletter Suppression von COX-2 in einer menschlichen Ovarialkarzinom-Zelllinie keinen Effekt auf die Proliferation zeigt [9]. Bei diesem wurde die $PGE_2$–Konzentration im ELISA bestimmt und wirksam durch spezifische siRNA herabgesetzt. In einem Proliferations-Assay mit einem Farbstoff zeigte sich keine Veränderung des Wachstumsverhaltens unter Suppression der COX-2. Diese und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Proliferation deuten auf einen Nebeneffekt der COX-2 - Suppression hin, bei der Wachstum und Expression in keinem direkten Zusammenhang stehen. Diese Aussage über einen nicht vorhandenen direkten Zusammenhang von COX-2 - Expression und Proliferation würde dann auch auf die zuvor ausgeführten Arbeiten anzuwenden sein, die einen Zusammenhang der COX-2 - Inhibition und der Verminderung des Zellwachstums postulieren [32, 89, 96]. Des weiteren steht dies in Einklang mit den Vermutungen anderer Veröffentlichungen zu NSAIDs, die den Wirkmechanismus nicht allein durch Inhibition der COX-2 erklären [9, 92, 111].

Zusammenfassend läst sich sagen, dass die gemessene Suppression der COX-2 anscheinend vom Zellkulturmodell und der Ursprungshöhe der Expression abhängt. Der Effekt auf die Proliferation ist bisher nicht eindeutig geklärt.

## 5.3 Schlussfolgerungen

Die klinischen Studien zu den selektiven Cycloxygenase-2 - Hemmern sind vor allem aufgrund ihrer finanziellen Abhängigkeit zu den Herstellern umstritten [42, 43]. Die Kosten zur Entwicklung eines Medikaments werden auf 250 bis 500 Millionen Euro beziffert. Versuche der Pharmakonzerne, ein Medikament in klinischen Studien zu testen, kosten circa 125 Millionen Euro [55]. Bevor solche Anstrengungen unternommen werden, muss ein neuer Wirkstoff in seiner Effizienz mindestens das Niveau der bereits existenten selektiven COX-2 - Inhibitoren Celecoxib™ und Rofecoxib™ einstellen. Dies ist nicht nur unter einer ökonomischen Betrachtungsweise von entscheidender Bedeutung. Die aktuelle Diskussion und das Aus für den Verkauf von Rofecoxib™ sind dabei besonders zu beachten. Die APPROVe Studie zeigte nach eineinhalb Studienjahren für Vioxx® im Vergleich zum Placebo eine eindeutig erhöhte Rate an kardiovaskulären Ereignissen [6, 17, 95]. Die Diskussion verdeutlicht den komplexen Stellenwert der Cyclooxygenase-2 in der Pathophysiologie unterschiedlichster Erkrankungen der onkologischen und musculo-skeletalen Medizin und dass die Zusammenhänge zu anderen Funktionskaskaden, wie bei der Apoptose und der Thrombozytenaggregation nicht eindeutig geklärt sind. Diese unerwünschten Wirkungen könnten durch ein anderes Wirkstoffmolekül vermindert sein, hier sind asODN und siRNA zu nennen. Soweit bekannt ist bisher der Ansatz mit asODN gegen COX-2 noch nicht ins Interesse der Pharmaindustrie gerückt.

Die COX-2 ist ein Schlüsselenzym in der Entstehung von Krebs und damit sind die marktreifen Medikamente von großer Bedeutung [29]. Die Relevanz der Überexpression der Cyclooxygenase-2 bei kolorektalen Karzinomen wurde unter 2.2.3 ausführlich dargestellt. Es lässt sich daraus schließen, dass das Enzym wichtig für das Überleben von malignen Zellen im immunologischen Kampf mit dem Organismus ist. Die erhöhte Cyclooxygenase-2 - Expression ist auch von einigen Lungentumoren bekannt [106]. Die Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms mit einem selektiven Inhibitor wie Rofecoxib™ zu inhibieren [67] und dabei die Apoptoserate zu erhöhen, machen das Enzym zu einem aussichtsreichen therapeutischen Angriffsziel. Der Ansatz mit asODN die COX-2 zu inhibieren, lässt sich auch auf andere Krebsarten, wie etwa Karzinome der Mamma ausweiten [34], auch wenn hier sicher endokrine Regelmechanismen mehr im Vordergrund stehen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass die Antisense-Strategie gegen die COX-2 - mRNA einen viel versprechenden Ansatz mit Potenzial in der onkologischen Therapie liefert. Es muss sich jedoch noch genau zeigen, welche Auswirkungen die COX-2

- Inhibition mit asODN auf z.B. Proliferation, Angiogenese oder Apoptose hat. Dies ist unter einer onkologischen Betrachtung von großer Bedeutung.

Weitere Arbeiten mit dem asODN 3823c müssen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt werden, um eine Dosis/Wirkungs-Kurve zu erstellen. Es sind unterschiedliche Inkubationszeiten zu testen, da vielleicht eine stärkere Wirkung verzögert einsetzt. Außerdem ist ein $PGE_2$-ELISA durchzuführen, um die Wirkweise auch auf der Ebene des Enzymproduktes zu belegen. Zudem müssen die Effekte auch in anderen Zelllinien gezeigt werden. Es muss sich im Tiermodell auch zeigen, wie die asODN vermittelte Suppression der COX-2 durch gesundes umliegendes Gewebe in der *in vivo* Testung beeinflusst wird. Andere Moleküle, die an den gleichen Angriffszielen der mRNA ansetzen, sind in Erwägung zu ziehen. Vor allem muss der siRNA Beachtung geschenkt werden. Dieser molekularbiologische Therapieansatz könnte noch effizienter sein und im Zielbereich an der Position 3823 wirksam werden.

Ein verhaltener Optimismus erscheint angezeigt, auch wenn bislang nur sehr wenige Patienten mit Gentherapie dauerhaft von ihrem Leiden befreit worden sind. Antisense Strategien werden unter onkologischen Gesichtspunkten gegen viele Ziele verfolgt. Dieser therapeutische Ansatz deckt ein definiertes Segment ab, ein Allheilmittel wird auch die Behandlung mit Genen nicht sein. Denn trotz des erheblichen wissenschaftlichen Aufwands und eines massiven Erkenntniszugewinns in den letzten 20 Jahren, steckt die Gentherapie immer noch in den Kinderschuhen. Die therapeutischen Oligonukleotide versprechen im Gegensatz zur „klassischen“ Gentherapie weniger Nebenwirkungen, da sie nicht in das Genom sondern nur in die Genexpression eingreifen. Dies verschafft ihnen Vorteile unter therapeutischen Gesichtspunkten gegenüber den marktreifen Medikamenten. Die langfristig geplante Einmündung in die therapeutische Wirkstoffentwicklung mit geeigneten Antisense Oligonukleotiden gegen die Cyclooxygenase-2 ist einen Schritt näher gekommen. Systeme zur Auswahl und Testung der Wirkweise auf verschiedenen Ebenen wurden erfolgreich verwendet, um Aussagen über die Expression machen zu können.

# 6. Zusammenfassung

Antisense Nukleinsäuren sind einzelsträngige, oligomere DNA- oder RNA-Ketten, die die Proteinbiosynthese auf mRNA-Ebene unterbrechen können. Dies wird durch Hybrid-Bildung zur Blockade der Translation und RNasen-Verdau ermöglicht. Das Verfahren ist in den letzten Jahren zunehmend ins therapeutische Interesse gerückt. Die Cyclooxygenasen-1 und 2 (COX) katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen und Leukotrienen. Während die Isoform 1 eine physiologisch wichtige Funktion hat, steht COX-2 im Zusammenhang mit entzündlichen Geschehen und spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Die Überexpression konnte in verschiedenen Tumorentitäten demonstriert werden. Epidemiologische Studien mit Applikation von Cyclooxygenase-Inhibitoren zeigen eine verminderte Inzidenz von bestimmten Krebsformen. Die Cyclooxygenase-2 ist daher ein aussichtsreiches therapeutische Ziel in der onkologischen Chemotherapie, wie *in vitro* Studien belegen konnten.

Zehn mittels eines computergestützten Ansatzes neu entwickelte Phosphothioat-Oligonukleotide, angreifend an vier, potenziellen Zielpunkten (mRNA-Positionen 523, 1487, 1817 und 3823) und zwei in der Literatur bereits beschriebene wurden getestet. Als Zellkulturmodell sind die aus einem Alveolarzell Karzinom der Lunge stammenden A-549 Zellen ausgewählt worden. Die Supressionseffekte von je 200 nM Antisense Oligonukleotiden (asODN) wurden 25 h nach Transfektion evaluiert. Auf Proteinebene konnte erstmals mit der Durchflußzytometrie gearbeitet und auf RNA-Ebene Effekte mit der quantitativen RT-PCR dargestellt werden. Das neue im Exon 10 angreifende asODN 3823c zeigte die besten Ergebnisse mit einer Reduktion der relativen Expression des Proteins um knapp ein Drittel. In der quantitativen PCR konnte dies bestätigt werden. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene war 3823c den zuvor publizierten asODNs überlegen. Die COX-2 - Expression kann in Tumorzelllinien erfolgreich unterdrückt werden. Des Weiteren erfolgte ein Proliferation-Assay mit Alamar Blue, bei dem 48 h nach Transfektion des asODN 523c das Wachstum 14 % niedriger war im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Die anderen getesteten asODN zeigten keinen Effekt auf die Proliferation. Interessanterweise waren darunter auch die asODN mit einem starken Effekt auf die COX-2 - Expression, wie 3823c und asodn1. Mit dieser Arbeit sind Systeme zur Testung der Effektivität von asODN gegen COX-2 *in vitro* etabliert worden.

Weitere Arbeiten müssen folgen, um eine Optimierung dieser Effekte zu erreichen, auch mit anderen Dosierungen und Zelllinien, bevor im Zuge der therapeutischen Wirkstoffentwicklung mit einem Tiermodell gearbeitet werden kann. Auch ist darüber nachzudenken, mit siRNA im Zielbereich des asODN 3823c anzugreifen. Es handelt sich hier um einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz mit voraussichtlich weniger Nebenwirkungen, der jedoch auch den bekannten, marktreifen und selektiven COX-2 - Inhibitoren standhalten muss. Die asODN müssen auch einen Effekt auf die Proliferation und/oder Apoptose zeigen, um unter onkologischen Gesichtspunkten ein interessanter Therapieansatz zu sein.

# *7. Literaturverzeichnis*

1. Bennett A und Tavares IA: COX-2 inhibitors compared and contrasted. Expert Opin Pharmacother 2, 1859-1876 (2001)

2. Bombardier C: An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. Am J Cardiol 89, 3D-9D (2002)

3. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, EltonTS, Simmons DL: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. Proc Natl Acad Sci USA 99, 13926-13931 (2002)

4. Chau I und Cunningham D: Cyclooxygenase inhibition in cancer - a blind aley or a new therapeutic reality? N Engl J Med 346, 1085-1087 (2002)

5. Cotter FE: Antisense therapy of hematologic malignancies. Semin Hematol 36, 9-14 (1999)

6. Couzin J: Withdrawel of Vioxx casts a shadow over COX-2 inhibitors. Science 306, 384-385 (2004)

7. Crooke ST: Molecular mechanisms of action of antisense drugs. Biochim Biophys Acta 10, 31-44 (1999)

8. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? J Cancer Res Oncol 127, 411-417 (2001)

9. Denkert C, Fürstenberg A, Daniel PT, Koch I, Köbel M, Weichert W, Siegert A, Hauptmann S: Induction of G0/G1 cell cycle arrest in ovarian carcinoma cells by the ant-inflammatory drug NS-398, but not by COX-2-specific RNA interference. Oncogene 22, 8653-8661 (2003)

10. DeWitt DL: Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. Mol Pharmacol 4, 625-631 (1999)

11. Dormond O, Foletti A, Paroz C, Rüegg C: NSAIDs inhibits aVß3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. Nat Med 7, 1041-1047 (2001)

12. DuBois RN, Tsuji M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A: Cloning and characterization of growth factor inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. Am J Physiol 266, G822-G827 (1994)

13. Duchrow M, Häsemeyer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U: Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative RT-PCR. Cancer Invest 19, 588-596 (2001)

14. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermiability, and angiogenesis. Am J Pathol 146, 1029-1039 (1995)

15. Eckstein F: Nucleoside phosphorothioates. Ann Rev Biochem 54, 367-402 (1985)

16. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391, 806-811 (1998)

17. FitzGerald GA: Coxibs and cardiovascular disease. N Engl J Med 351, 1709-1711 (2004)

18. Förstermann U: Gentherapie: Erste Erfolge-viele noch unerfüllte Hoffnungen. Dtsch Arztebl 100, A 314-318 (2003)

19. Fosslien E: Molecular Pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. Ann Clin Lab Sci 30, 3-21 (2000)

20. Fox D: Effect of base composition on the quantitation of oligonucleotides. FOCUS Invitrogen 20, 84-85 (1998)

21. Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K: Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. Cancer Res 58, 4823-4826 (1998)

22. Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J: RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. Proc Natl Acad Sci USA 100, 2718-2723 (2003)

23. Gerdes J, Li J, Schlüter C, Duchrow M, Wohlberg C, Gerlach C, Stahner I, Kloth S, Brandt E, Flad HD: Immunobiochemical and molecularbiologic characterisation of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol 138, 867-873 (1991)

24. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ: Treatment of colonic and rectal adenoma with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 328, 1313-1316 (1993)

25. Greenberg ER, Baron JA, Freeman DH Jr, Mandel JS, Haile R: Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. J Nat Cancer Inst 85, 912-916 (1993)

26. Gupta RA und DuBois RN: Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygense-2. Nat Rev Cancer 1, 11-21 (2001)

27. Hartmann G, Bidlingmaier M, Eigler A, Haecker U, Endres S: Antisense-Oligonukleotide. Dtsch Arztebl 95, 1524-1530 (1998)

28. Hartmann G, Krug A, Bidligmaier M, Hacker U, Eigler A, Albrecht R, Strasburger CJ, Endres S: Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. J Pharmacol Exp Ther 285, 920-928 (1998)

29. Hawk ET, Viner JL, Dannenberg A, DuBois RN: COX-2 in cancer-a player that's defining the rules. J Nat Cancer Inst 94, 545-546 (2002)

30. Heath CW Jr, Thun MJ, Greenberg ER, Levin B, Marnett LJ: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and human cancer. Report of an interdisciplinary research workshop. Cancer 74, 2885-2888 (1994)

31. Herschman HR: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. Ann Rev Biochem 60, 281-319 (1991)

32. Higashi Y, Kanekura T, Kanazki T: Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. Int J Cancer 86, 667-671 (2000)

33. Hla T und Neilson K: Human cyclooxygenase-2 cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 7384-7388 (1992)

34. Howe LW, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. Endocrine-Related Cancer 8, 97-114 (2001)

35. Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM: Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin $E^2$ enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. J Immunol 157, 5512-5520 (1996)

36. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman HR, Dubinett SM: Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. Cancer Res 58, 1208-1216 (1998)

37. Husain SS, Szabo IL, Tarnawski AS: NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of actions. Am J Gastro 97, 542-553 (2002)

38. Jabs DA und Griffiths PD: Fomivirsen for the treatment of cytomegalovitus retinitis. Am J Ophtalmol 133, 552-556 (2002)

39. Jain RK: Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy. A new paradigm for combination therapy. Nature Med 7, 987-989 (2001)

40. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehammberger H: Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. Lancet 356, 1728-1733 (2000)

41. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmermann GA, Prescott SM: Molecular cloning of human endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. J Nat Cancer Inst 268, 9049-9054 (1993)

42. Jones R: Efficacy and safety of COX 2 inhibitors. BMJ 325, 607-608 (2002)

43. Jüni P, Rutjes AWS, Dieppe PA: Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? BMJ 324, 1287-1288 (2002)

44. Kausch I, Lingau A, Endl E, Sellmann K, Deinert I, Ratliff TL, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J, Böhle A: Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. Int J Cancer 105, 710-716 (2003)

45. Kimmel AR und Berger SL: Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. Meth Enzymol 152, 307-316 (1987)

46. Klasa RJ, List AF, Cheson BD: Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers. Hematology 1, 443-62 (2001)

47. Kretschmer-Kazemi Far R, Nedbal W, Sczakiel G: Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonukleotides. Bioinformatics 11, 1-4 (2001)

48. Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, Sczakiel G, Haas R: Oligodeoxyribonucleotide Uptake in Primary Human Hematopoietic Cells Is Enhanced by Cationic Lipids and Depends on the Hematopoietic Cell Subset. Blood 91, 852-862 (1998)

49. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmermann GA, White RL, Prescott SM: Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. Proc Natl Acad Sci USA 93, 4816-4820 (1996)

50. Lebedeva I und Stein CA: Antisense oligonucleotides: promise and reality. Ann Rev Pharmacol Toxicol 41, 403-419 (2001)

51. Lehmann MJ, Patzel V, Sczakiel G: Theoretical design of antisense genes with statistically increased efficacy. Nucleic Acids Res 28, 2597-2604 (2000)

52. Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. Arthritis Rheum 38, 5-18 (1995)

53. Marnett LJ: Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. Cancer Res 52, 5575-5589 (1992)

54. Marnett LJ: Aspirin and related nonsteroidal anti-inflammatory drugs as chemopreventive agents against colon cancer. Prev Med 24, 103-106 (1995)

55. Marquardt S: People are Individuals. brandeins, Hamburg 5 (2000)

56. Marx J: Interfering with gene expression. Science 288, 1370-1372 (2000)

57. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME: Novel therapeutic strategy for advanced prostate cancer using antisense oligodeoxnucleotides targeting anti-apoptotic genes upregulated after androgen withdrawal to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity. Int J Uro 8, 337-349 (2001)

58. Moysich KB, Menezes RJ, Ronsani A, Swede H, Reid ME, Cummings KM, Falkner KL, Loewen GM, Bepler G: Regular aspirin use and lung cancer risk. BMC Cancer 2, 31-38 (2002)

59. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ: Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. JAMA 286, 954-959 (2001)

60. Niedener H, Christen R, Lin X, Kondo A, Howell SB: Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin. Mol Pharmacol 60, 1153-1160 (2001)

61. Ogawa N, Fujiwara T, Kagawa S, Nishizaki M, Morimoto Y, Tanida T, Hizuta A, Yasuda T, Roth JA, Tanaka N: Novel combination therapy for human colon cancer with adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer and DNA-damaging chemotherapeutic agent. Int J Cancer 73, 367-370 (1997)

62. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM: Suppression of intestinal polyposis in APC 716 knock-out mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). Cell 87, 803-809 (1996)

63. Patzel V und Sczakiel G: Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells. Nature Biotech 16, 64-68 (1998)

64. Patzel V, Steidl U, Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G: A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxribonucleotides at statistical probability. Nucleic Acids Res 27, 4328-34 (1999)

65. Prescott SM und Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. Biochim Biophys Acta 1470, M69-M78 (2000)

66. Prescott SM und White RL: Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. Cell 87, 783-786 (1996)

67. Qadri SSA, Wang JH, Redmond KC, O'Donnell AF, Aheren T, Redmond HP: The role of COX-2 inhibitors in lung cancer. Ann Thorac Surg 74, 1648-1652 (2002)

68. Regier MK, Otto JC, DeWitt DL, Smith WL: Localization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope is independent of its C-terminal tetrapeptide-PTEL. Arch Biochem Biophys 317, 457-463 (1995)

69. Rigas B, Goldman IS, Levine L: Altered eicosanoid levels in human colon cancer. J Lab Clin Med 122, 518-523 (1993)

70. Rioux N und Castonguay A: Prevention of NNK-induced lung tumorgenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. Cancer Res 24, 605-615 (1998)

71. Robert A: Cytoprotection of the gastrointestinal mucosa. Adv Intern Med 28, 325-327 (1983)

72. Roth JA, Grammer SF, Swisher SG, Komaki R, Nemunaitis J, Merritt J, Fujiwara T, Meyn RE Jr: Gene therapy approaches for the managment of non-small cell lung cancer. Semin Oncol 28, 50-56 (2001)

73. Roth JA, Grammer SF, Swisher SG, Komaki R, Nemunaitis J, Merritt J, Meyn RE: P53 gene replacement for cancer interactions with DNA damaging agents. Acta Oncol 40, 739-744 (2001)

74. Sanchez-Alcazar JA, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ: Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. Lung Cancer 40, 33-44 (2003)

75. Sandler RS, Galanko JC, Murray SC, Helm JF, Woosley JT: Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas. Gastroenterolgy 114, 441-447 (1998)

76. Sano H, Kawahito RL, Wilder A, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T: Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in human colorectal cancer. Cancer Res 55, 3785-3789 (1995)

77. Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G, Patzel V: RNA accessibility predection: a theoretical approach is consitent with experimental studies in cell extracts. Nucleic Acids Res 28, 2455-2461 (2000)

78. Sczakiel G: Theoretical and experimental approaches to design effective antisense oligonucleotides. Front Biosci 5, 194-201 (2000)

79. Sczakiel G und Kretschmer-Kazemi Far R: The role of target accessibility for antisense inhibition. Curr Opin Mol Ther 4, 149-153 (2002)

80. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweet T, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murry FE: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA 283, 1254-1257 (1999)

81. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN: Modulation of apoptosis and bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res 58, 362-366 (1998)

82. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R; Eisen G; Agrawal NM; Stenson WF; Burr AM; Zhao WW; Lefkowith JB; Verburg KM; Geis GS: Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomised controlled trial. JAMA 284, 1247-1255 (2000)

83. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. Ann Rev Biochem 69, 145-182 (2000)

84. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. J Biol Chem 271, 33157-33160 (1996)

85. Smith WL und Marnett LJ: Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. Biochim Biophys Acta 1083, 1-17 (1991)

86. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL: Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. Ann NY Acad Sci 744, 50-57 (1994)

87. Stein CA: How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 8, 129-132 (1998)

88. Stein CA und Chang YC: Antisense oligonucleotides as therapeutic agents: Is the bullet really magical? Science 261, 1004-1012 (1993)

89. Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M: Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2. J Oral Pathol Med 30, 41-47 (2001)

90. Tait DL, Obermiller PS, Redlin-Frazier S, Jensen RA, Welcsh P, Dann J, King MC, Johnson DH, Holt JT: A phase I trial of retroviral brca1sv gene therapy in ovarian cancer. Curr Opin Mol Ther 3, 1959-1968 (1997)

91. Tamm I, Dorken B, Hartmann G: Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? Lancet 489-497 (2001)

92. Thompson HJ, Briggs S, Paranka NS, Piazza GA, Brendel K, Gross PH, Sperl GJ, Pamukcu R, Ahnen DJ: Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by sulfone metabolite of sulindac. J Natl Cancer Inst 1995, 1259-1260 (1995)

93. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med 325, 1593-1596 (1991)

94. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hantano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H: Cyclooxygenase-2-overexpression correlates with tumor recurrence, especially hematogenous metastasis of colorectal cancer. Br J Cancer 83, 324-328 (2000)

95. Topol EJ: Failing the Public Health - Rofecoxib, Merck, and the FDA. N Engl J Med 351, 1707-1709 (2004)

96. Tsubouchi Y, Mukai S, Kawahito Y, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Sano H: Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. Anticancer Res 20, 2867-2872 (2000)

97. Tsuji M, Kawano S, DuBois RN: Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 94, 3336-3340 (1997)

98. Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 93, 705-716 (1998)

99. Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. Nature 231, 232-235 (1971)

100. Vickers TA, Wyatt JR, Freier SM: Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. Nucleic Acids Res 28, 1340-1347 (2000)

101. Walder RY und Walder JA: Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 5011-5015 (1988)

102. Wang QC, Nie QH, Feng ZH: RNA interference: Antiviral weapon and beyond. World J Gastroenterol 9, 1657-61 (2003)

103. Warburg O und Christian W: Isolierung und Kristallisation des Gaerungsfermentes Enolase. Biochem 310, 384-421 (1942)

104. Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F, Cotter FE: Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lym-phoma. J Clin Oncol 18, 1812-1823 (2000)

105. Windhövel U, Broll R, Erdmann H, Duchrow M, Strik M, Schimmelpenning H, Schiedeck T, Bruch HP: VEGF concentrations in serum and tumor tissue of patients with a colorectal carcinome. J Cancer Res Oncol 124 (Suppl), R25- (1998)

106. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A: Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinome. Cancer Res 58, 4997-5001 (1998)

107. Woolf TM, Melton DA, Jennings CG: Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 89, 7305-7309 (1992)

108. Yang C, Pearman AT, Zimmermann GA, McIntyre TM, Prescott SM: Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 97, 11280-11285 (2000)

109. Yang PY, Rui YC, Jin YX, Li TJ, Qiu Y, Zhang L, Wang JS: Antisense oligodeoxynucleotide inhibits vascular endothelial growth factor expression in U937 foam cells. Acta Pharmacol Sin 24, 610-614 (2003)

110. Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, Spannhake EW, Hubbard WC, Hylind LM, Robinson CR, Giardiello FM: Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. Cancer Res 58, 1750-1753 (1998)

111. Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ: Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. Carcinogenesis 21, 139-146 (2000)

112. Yuen AR und Sikic BI: Clinical studies of antisense therapy in cancer. Front Biosci 5, 588-593 (2000)

113. Zamecnik PC, 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)

114. Zamore PD: Ancient pathways programmed by small RNAs. Science 296, 1265-1269 (2002)

# 8.1 Abkürzungen & Akronyme

*In alphabetischer Reihenfolge*

| | *Bedeutung* |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| Acc. No. | Accession number |
| APPROVe | Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx study |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| asODN | Antisense Oligodesoxynukleotid |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| ß2 | Beta-2 |
| bp | Basenpaar |
| cDNA | copy/complementary DNA |
| C/EBP | CCAAT/enhancer-binding protein |
| CLASS | Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CMV | Cytomegalie Virus |
| COX | Cyclooxygenase |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxy Nukleosid-Triphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| FACS | Fluoreszenzaktiviertes Zellanalysegerät (Cell Sorting) |
| FSC | Forward Scatter |

| | *Bedeutung* |
|---|---|
| FITC | Fluoreszein Isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälber Serum |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| HPV | Humanes Papilloma Virus |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeits Chromatographie |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cell |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| kb | Kilo Basen |
| kDa | Kilo Dalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Leukotrien |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MEM | Modified Eagle Medium |
| mRNA | messenger RNA |
| NFκB | Nuclear factor kappa-B |
| NSAID | Non steroidal antiinflammatoric drugs |
| NSAR | Nicht steoridales Antirheumatikum |
| nt | Nukleotid |
| NTP | Nukleosid Triphosphat |
| ODN | Oligonukleotid |
| PBS | Phosphat buffered Saline |
| PC | Personal Computer |
| PCM | Paracetamol |
| PCR | Polymerase Ketten Reaktion |
| PG | Prostaglandin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RNI | RNAse Inhibitor |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |

| | *Bedeutung* |
|---|---|
| sc | scrambled control |
| siRNA | small interfering RNA |
| SSC | Sideward Scatter |
| Tab | Tabelle |
| TAE | Tris Acetat EDTA |
| TBE | Tris Borat EDTA |
| TBS | Tris buffered saline |
| TE | Tris EDTA |
| TEMED | N, N, N`,N`-Tetramethylethylendiamin |
| TM | Trade mark |
| $T_m$ | Schmelztemperatur (melting temperature) [°C=2(A+T)+4(G+C)] |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TPA | 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate |
| Tx | Thromboxan |
| UTR | untranslatiert |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VIGOR | Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research |

## 8.2 Chemikalien, Kits und Proteine

*In alphabetischer Reihenfolge*

| | *Hersteller* | *Ort* | *Land* |
|---|---|---|---|
| Aceton | Merck | Darmstadt | D |
| Acrylamid/Bis | BioRad | München | D |
| Agarose | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| Alamar Blue | Biosource | Nivelles | B |
| Ammoniumpersulfat | Sigma | Steinheim | D |
| anti-COX2 IgG1 (Maus; Klon CX229) | Alexis | Ann Arbor, MI | USA |
| APS (Alk. Phosphatase) | Sigma | Steinheim | D |
| Antibody diluent with background reducing components | DakoCytomation. | Glostrup | DK |
| Bacto™ Tryptone | Becton Dickinson | Erembodegem-Aalst | B |
| *Bam*HI | Invitrogen | Groningen | NL |
| Bifeg Agar | Difco | Detroit, MI | USA |
| Bromphenolblau | Roth | Karlsruhe | D |
| Chloroform | Merck | Darmstadt | D |
| Cy®2 Esel Anti-Maus IgG Antikörper | Jackson IR | West Grove, PA | USA |
| FACS Lösung (diluid azid free) | Becton Dickinson | Erembodegem-Aalst | B |
| DMSO | Merck | Darmstadt | D |
| DNAse I, RNAse free | Roche | Mannheim | D |
| Dulbecco's MEM | PAA Lab | Linz | A |
| Dulbecco's PBS | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |

| *Produkt* | *Hersteller* | *Ort* | *Land* |
|---|---|---|---|
| *Eco*RI | Invitrogen | Groningen | NL |
| EDTA | Merck | Darmstadt | D |
| Eissessig | Merck | Darmstadt | D |
| *Escherichia coli* - | | | |
| TOP10 One Shot® | Invitrogen | Carlsbad, CA | USA |
| Ethanol | Merck | Darmstadt | D |
| Ethidiumbromid 1% | Carl Roth | Karlsruhe | D |
| FITC Anti-Maus IgG1 | | | |
| (Kanninchen) | BD-Pharmingen | Heidelberg | D |
| FKS | Biochem | Berlin | D |
| Formamid | | | |
| Glycerin | Merck | Darmstadt | D |
| Harnstoff | USB | Miles Road, Cleveland | USA |
| Hefe Extrakt | Difco | Detroit, MI | USA |
| IC Perm | Biosource | Camarillo, CA | USA |
| IgG1 Negativ Kontrolle (Maus) | DakoCytomation. | Glostrup | DK |
| Isopropyl Alkohol | Merck | Darmstadt | D |
| Kanamycin Monosulfate | Sigma | Deisenhofen | D |
| Molekulargewichts Marker VI | | | |
| (DNA-) | Roche | Mannheim | D |
| NaCl | Merck | Darmstadt | D |
| Nucleo Spin® Kit | Macherey-Nagel | Düren | D |
| | *(enthielt: Puffer A1 – 4 + AE und Säulen)* | | |
| Oligofectamine | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| OPTI-MEM® | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| Paraformaldehyd | Merck | Darmstadt | D |
| pCR®-Blunt II-TOPO® | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| Penicillin/Streptomycin | Invitrogen | Eggenstein | D |
| Protein Block | DakoCytomation. | Glostrup | DK |
| Puffer H / K | Invitrogen | Groningen | NL |
| Qiagen® Plasmid Maxi Kit | Qiagen | Hilden | D |
| | *(enthielt: Puffer P1 – 3 + Qx und Säulen)* | | |

| *Produkt* | *Hersteller* | *Ort* | *Land* |
|---|---|---|---|
| SOC Medium | Gibco BRL | Eggenstein | D |
| SuperScript II | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| | *(enthielt: Enzym, DTT, RT-Puffer, Hexamere ,$MgCl_2$, dNTP mix ,DEPC Wasser, RNase H, RNase Inhibitor)* | | |
| Sybr Green I Reaction System | Eurogentec | Seraing | B |
| | *(enthielt: Enzym, Sybr Green I, Puffer, MgCl2, dNTPmix)* | | |
| *Taq* DNA Polymerase | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| | *(enthielt:Enzym,dNTP mix, Puffer, $MgCl_2$)* | | |
| TEMED | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| Thermo Sequenase | Amersham | Little Chalfont | GB |
| Tris Base | Sigma | Steinheim | D |
| Tris HCl | Sigma | Steinheim | D |
| TRIzole | Invitrogen | Paisley, Schottland | GB |
| Trypsin 1:250 (1x) w/o $Ca^{2+}$ $Mg^{2+}$ | PAA Lab | Linz | A |
| Trypsin/EDTA | PAA Lab | Linz | A |
| Ultramount | DakoCytomation | Glostrup | DK |
| Xylencyanol | Roche | Heidelberg | D |
| Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit | Invitrogen | Groningen | NL |

***Alle Chemikalien haben die höchst möglichen Reinheitsgrade.***

## 8.3 Lösungen

**8.3.1 1x TAE Puffer**

| | |
|---|---|
| 40 mM | Tris Base |
| 20 mM | Eisessig |
| 10 mM | EDTA |
| | pH 8,3 ~8,5 |

**8.3.2 1x TE Puffer**

| | |
|---|---|
| 10 mM | Tris/HCl |
| 1 mM | EDTA |
| | pH 8,0 |

**8.3.3 1x TBE Puffer**

| | |
|---|---|
| 134 mM | Tris Base |
| 45 mM | Borsäure |
| 2,5 mM | EDTA |
| | pH 8,3 ~8,7 |

**8.3.4 1x TBS Puffer**

| | |
|---|---|
| 7,43 mM | Tris Base |
| 43,6 mM | Tris HCl |
| 150 mM | NaCl |
| | pH 7,4 ~7,6 |

***Die pH-Werte der Puffer wurden mit 2 M NaOH oder 1 M HCl Lösungen eingestellt.***

***Die Stammlösungen waren zehnfach höher konzentriert, bei 8.3.1 50x.***

### 8.3.5 LB-Medium (*E. coli* Anzucht 3.4.1)

| | |
|---|---|
| 10 g/l | Bacto™ Tryptone |
| 10 g/l | NaCl |
| 5 g/l | Hefe Extrakt |
| (15 g/l | Bifeg Agar für Kulturplatten) |

### 8.3.6 DMEM (A-549 Anzucht 3.3)

| | |
|---|---|
| 500 ml | Dulbecco´s MEM |
| 50 ml | fetales Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert) |
| 5 ml | Penicillin/Streptomycin |
| | (10000 E Penicillin G und 10 mg Streptomycin/ml) |

### 8.3.7 Waschpuffer (FACS 3.8)

| | |
|---|---|
| 500 ml | Dulbecco´s PBS |
| 50 ml | fetales Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert) |

### 8.3.8 Saure Salz-Lösung (Transfektionseffizienz 3.7.3)

| | |
|---|---|
| 0,5 M | NaCl |
| 0,2 M | Eisessig |
| | pH 2,5 |

### 8.3.9 2% Paraformaldehyd (FACS 3.8)

| | |
|---|---|
| 10 g | Paraformaldehyd |
| 500 ml | Dulbecco’s PBS |

## 8.4 Geräte & Verbrauchsmaterialien

*In alphabetischer Reihenfolge*

| | *Hersteller* | *Ort* | *Land* |
|---|---|---|---|
| Bakterienkulturplatten | Greiner | Frickenhausen | D |
| Biofuge 22R (Zentrifuge) | Heraeus | Hanau | D |
| $CO_2$-Auto-Zero | | | |
| Brutschrank | Heraeus | Hanau | D |
| Cytospin 2 | Shandon | Pittsburgh, PA | USA |
| Cytospin slides | Shandon | Pittsburgh, PA | USA |
| DNA-Sequencer | | | |
| LiCor4000L | MWG Biotech | Ebersberg | D |
| DNA Thermal Cycler - | | | |
| TC1 | Perkin Elmer | Überlingen | D |
| Elektrophorese | | | |
| Powerpack 300 | Bio-Rad | Hercules, CA | USA |
| Eppendorf Gefäße | Eppendorf | Hamburg | D |
| FACS | Becton Dickinson | Heidelberg | D |
| Falcon Röhrchen | Becton Dickinson | Heidelberg | D |
| Gene Amp 5700 | Applied BioSystems | Foster City, CA | USA |
| Megafuge 1.0R | | | |
| (Zentrifuge) | Heraeus | Hanau | D |
| Mikroskop Axioplan | Zeiss | Jena | D |
| Mikrowelle | Siemens | Berlin | D |
| Minigelkammer | cti | Idstein | D |
| Mini-Protean 3 | | | |
| (Gelkammer) | Bio-Rad | München | D |
| Photometer DU 640 | Beckmann | Unterschleißheim | D |
| Primus 96 plus (PCR) | MWG Biotech | Ebersberg | D |

| | *Hersteller* | *Ort* | *Land* |
|---|---|---|---|
| Power Pac 300 | | | |
| (Spannungsgeber Gele) | Bio-Rad | Hercules, CA | USA |
| Transilluminator | Infas | Greven | D |
| T 150 Flaschen | Nunc Intermed | Wiesbaden | D |
| T 80 Flaschen | Nunc Intermed | Wiesbaden | D |
| 12 Loch (well) Platten | Greiner | Frickenhausen | D |
| 15 ml Röhrchen | Greiner | Frickenhausen | D |
| 50 ml Röhrchen | Greiner | Frickenhausen | D |
| 96 Loch (well) Platte | Eurogentec | Seraing | B |

# 8.5 Sequenzen der Oligonukleotide

### 8.5.1 Für das Design der verwendeten asODN und Primer zugrunde gelegte Sequenzen aus GenBank (USA)

| | *Acc. No.* |
|---|---|
| COX-2 mRNA | NM_000963 |
| GAPDH mRNA | NM_002046 |
| ß-2 Mikroglobulin mRNA | XM_007650 |

### 8.5.2 Antisense Oligonukleotide

| *Name* | *Sequenz* | *Tm [°C]* |
|---|---|---|
| 523c | 5‘ –GAGAGGTTAGAGAAGGCTTC-3’ | 60 |
| 1487a | 5‘ –GCATAAAGCGTTTGCGGT-3’ | 54 |
| 1487b | 5‘ –TTCAGCATAAAGCGTTTGCG-3’ | 58 |
| 1487c | 5‘ –GCGGTACTCATTAAAAGAC-3’ | 54 |
| 1487d | 5‘ –GGTACTCATTAAAAGACTGG-3’ | 56 |
| sc1487c | 5‘ –AGTCACAGATCAGTACATG-3’ | 54 |
| 2817a | 5‘ –CCCTTTTGCTGATATAGATTTT-3’ | 58 |
| 3823a | 5‘ –GGATTGTTTACATAATATTCAG-3’ | 56 |
| 3823b | 5‘ –TCTTTGGATTGTTTACATAATA-3’ | 54 |
| 3823c | 5‘ –ATTCAGAGAGGTAACCCC-3’ | 54 |
| 3823d | 5‘ –GAGAGGTAACCCCAAAGA-3’ | 52 |
| sc3823c | 5‘ –CCATGAACTGATGACCAG-3’ | 54 |
| asodn1 | 5‘ –CAGTTCAGTCGAACGTTCTTTTAGTAGTAC-3’ | 84 |
| asodn2 | 5‘ –GGAAACATCGACAGT-3’ | 44 |
| FITC-ODN | 5‘ –ATTCAGAGAGGTAACCCC-3’ | 54 |

### 8.5.3 PCR- Primer

| *Name* | *Sequenz* | *Tm [°C]* |
|---|---|---|
| COX-2 antisense | 5‘ –GATACAGCTCCACAGCATCGATG-3’ | 62 |
| COX-2 sense | 5‘ –CAGGGTTGCTGGTGGTAGGAAT-3’ | 62 |
| ß2 Mikroglobulin antisense | 5‘ –CATGTCTCGATCCCACTTAACTAT-3’ | 68 |
| ß2 Mikroglobulin sense | 5‘ –ATCCAGCGTACTCCAAAGATT-3’ | 60 |
| GAPDH-antisense | 5‘ –AACAGCGACACCCACTCCTC-3’ | 64 |
| GAPDH-sense | 5‘ –GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT-3’ | 66 |

# *9. Danksagung*

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. med. R. Broll für die Überlassung dieses Themas und die Bereitstellung der Laboratorien. Er ermöglichte durch seine Förderung und stetige Unterstützung die Verwirklichung der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. U. Windhövel danke ich besonders für die unermüdliche Betreuung. Als hilfsbereite und stets diskussionsfreudige Ansprechpartnerin zu allen Tageszeiten hat sie zum Gelingen dieses Projektes beigetragen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Sczakiel gilt mein Dank für seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit der Realisierung dieses Projektes im Rahmen einer Kooperation mit seinem Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck.

Besonders danken möchte ich für die Entwicklung der Oligonukleotide und die stete Unterstützung meiner Arbeit Frau Dr. rer. nat. R. Kretschmer Kazemi-Far aus dem Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck.

Auch Herrn Dr. rer. nat. M. Duchrow gilt mein Dank für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Riesig danken möchte ich Frau Elke Gheribi für ihren unermüdlichen Arbeitseinsatz, sowie Annemarie Aumüller, Vera Grobleben, Regina Kaatz und Gisela Grosser-Pape für ihre vielfältige, vor allem moralische Unterstützung. Winfried Wünsche gilt mein Dank für die geduldige und umfassende Einweisung in die apparativen Möglichkeiten des Institutes für Molekulare Medizin.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium überhaupt ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

# *10. Curriculum Vitae*

## Carl Haasper

geboren am 21. April 1977 in Holzminden

**Werdegang:**

| | |
|---|---|
| 1983 - 1987 | Grundschule Stadtoldendorf |
| 1987 - 1996 | Landschulheim am Solling bei Holzminden, staatlich anerkanntes Gymnasium |
| 1993/94 | "High Seas High School" auf dem SSS Fridtjof Nansen (Deutschland-Ekuador-Deutschland) |
| 5/1996 | Abitur |
| 1996/97 | Wehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr |
| 1997 - 1999 | Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen |
| 1999 - 2003 | Klinisches Studium an der Medizinischen Universität zu Lübeck<br>Praktisches Jahr: Royal Brompton Hospital, Imperial College, London; Medical University of South Carolina, Charleston und Universitätsklinik Lübeck (Wahlfach: Orthopädie) |
| 5/2003 | Abschluss der Ärztlichen Prüfung |
| 1/2004 - | Arzt im Praktikum bei Prof. Dr. C. Krettek an der Klinik für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover |
| Seit 10/2004 | Assistenzarzt der Klinik für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover |

**Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

| | | |
|---|---|---|
| I. | 1999 - 2001 | „Untersuchungen zur angiogenen und proliferativen Potenz disseminierter kolorektaler Tumorzellen im Knochenmark“ |
| II. | 2001 - 2003 | „Inhibition der Cyclooxygenase-2 - Expression mit Antisense-Oligonukleotiden“ |

Bei Prof. Dr. R. Broll, Forschungslabor der Klinik für Chirurgie (Prof. Dr. H-P Bruch), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

**Publikationen:**

zu I. Abstrakta: Windhövel U, Bücker N, **Haasper C**, Duchrow M, Bruch HP, Broll R: Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and proliferation- associated Ki-67 antigen in disseminated tumour cells of the bone marrow from patients with colorectal carcinoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 128 (Suppl 1), 629 (2002)
*25. Deutscher Krebskongress Berlin 2002*

Broll R, Bücker N, **Haasper C**, Duchrow M, Schiedeck THK, Bruch HP, Windhövel U: Angiogene Potenz und proliferative Aktivität disseminierter kolorektaler Tumorzellen im Knochenmark. Abstractband S. 117 des
*44. Österreichischen Chirurgenkongresses 2003*

Publikation: Bücker N, **Haasper C**, Windhövel U, Bruch HP, Broll R: Untersuchungen zur angiogenen Potenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. FOCUS MUL 20, 108-110 (2003)

zu II. Vorträge: Windhövel U, **Haasper C**, Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G, Bruch HP, Broll R: Inhibition der Cyclooxygenase-2-Expression durch Antisense Oligonucleotide. Abstractband S. 35 der
*Chirurgischen Forschungstage Berlin 2003*

Windhövel U, **Haasper C**, Duchrow M, Broll R: Supression der Cyclooxygenase-2-Expression in A-549 Lungenkarzinomzellen durch Antisense Oligonukleotide
*28. Seminar der Österreichischen Gesellschaft für chirurgische Forschung Gosau 2004*

Abstrakt: Windhövel U, **Haasper C**, Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G, Bruch HP, Broll R: Inhibition of cyclooxygenase-2-expression by antisense oligonucleotides. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology Supplement to Volume 130 (2004); Scientific Proceedings (Abstracts) S. 163
*26. Deutscher Krebskongress Berlin 2004*

Publikation: Windhövel U, **Haasper C**, Duchrow M, Bruch HP, Broll R: Effect of Cyclooxygenase-2 Antisense Oligodeoxy-ribonucleotides in A-549 lung cancer cells. Anticancer Res 24, 3789-3794 (2004)

Kasuistik: **Haasper C**, Tecklenburg FW, Cochran JB, Habib DM, Smith CD: A pain in the neck can lead to pain in the belly: Lemierre`s Syndrome. Int Pediatr 19 (3), 16-19 (2004)