

Aus der Klinik für Urologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham

**Inhibition des proliferationsassoziierten Faktors Ki-67 *in vitro* durch
Nukleinsäurekonstrukte (Antisense-Oligonukleotide und siRNA) als
Monotherapie und als Kombinationsansatz mit Chemotherapeutika**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Nina Ewerdwalbesloh
aus Frankfurt am Main

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

2. Berichterstatter Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Oliver Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2008

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 03.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Das Ki-67 Protein	3
1.1.1	Lokalisation des Ki-67-Proteins	4
1.1.2	Funktion des Ki-67-Proteins.....	4
1.2	Tumorthherapie.....	6
1.3	Antisense Oligonukleotide.....	9
1.3.1	Chemische Modifikationen.....	10
1.3.2	Wirkungsmechanismus	12
1.3.3	Antisense <i>in vitro</i> Pharmakologie.....	13
1.3.4	Therapeutische Anwendung	13
1.4	Kombination von Chemotherapeutika und Antisense-Oligonukleotiden	14
1.5	RNA-Interferenz.....	15
1.6	siRNA	16
1.7	Transfektionsmedien	20
1.7.1	Liposomale Transfektionssysteme	20
1.8	Multizelluläre Sphäroide.....	22
1.9	Aufgabenstellung	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Zellkultur	25
2.1.1	Zellzahlbestimmung.....	25
2.1.2	Zellaussaat und Zellkultursysteme.....	26
2.1.3	Sphäroide.....	26
2.1.4	Herstellung von Cytospins.....	27
2.2	Immunzytochemische Methoden	27
2.2.1	Fixierung.....	27
2.2.2	MIB-1-Färbung für humane Gefrierschnitte	28
2.3	Zellvitalitäts-Assays.....	28
2.3.1	MTT-Assay.....	28
2.3.2	Kristallviolett-Assay	30
2.4	Molekularbiochemische Methoden.....	31
2.4.1	RNA-Isolierung.....	31
2.4.2	DNA-Verdau.....	32
2.4.3	Reverse Transkription (RT-PCR)	32
2.4.4	PCR (Polymerase Kettenreaktion).....	33
2.4.5	Quantitative Realtime-PCR	34
2.5	Transfektionsversuche.....	36
2.5.1	Oligonukleotide.....	36
2.5.2	siRNA.....	36
2.5.3	Transfektion.....	37
2.6	Kombinations-Behandlung mit Antisense-ON und Chemotherapeutika.....	38
2.7	Statistische Auswertung	40

3	Ergebnisse	41
3.1	Monolayer	41
3.1.1	Ki-67 Antisense-Oligonukleotid-Titration	41
3.1.2	Zellviabilitäts-Assay bei Oligonukleotid-Behandlung.....	44
3.1.3	Kombinationsbehandlung mit Oligonukleotiden und Chemotherapeutika	49
3.2	Sphäroide	54
3.2.1	RT4-Sphäroide.....	55
3.2.2	J82-Sphäroide	58
3.2.3	Antisense-Behandlung von RT4-Sphäroiden	60
3.3	Etablierung siRNA-Behandlung gegen das Ki-67-Protein	61
4	Diskussion	63
4.1	Etablierung der Antisense-Behandlung	64
4.2	Kombinationstherapie mit Ki-67-AS-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika	67
4.3	Sphäroide	73
4.4	RNA-Interferenz am Ki-67-Protein	75
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	80
7	Abkürzungsverzeichnis	97
8	Anhang	100
9	Danksagung	103
10	Lebenslauf	104

1 Einleitung

1.1 Das Ki-67 Protein

Das Ki-67-Protein (pKi-67) wurde erstmals 1983 von Gerdes et al. beschrieben. Damals wurde es bei der Immunisierung von Mäusen in Kernen von Hodgkin-Lymphom-Zellen entdeckt. Da die Struktur zu diesem Zeitpunkt noch nicht charakterisiert werden konnte, erhielt es die Bezeichnung Ki-67-Antigen. Die Identifizierung des Proteins gelang Gerdes et al. 1991. Schlüter et al. veröffentlichten 1993 zwei komplette cDNA-Sequenzen (9768 bzw. 8688 Basenpaare lang), wobei an der kürzeren Form das Exon 7 fehlt. Lange Zeit bestand die Ansicht, dass dieses Protein sich dadurch auszeichnet, dass es in allen Zellzyklusphasen (G₁, S, G₂, Mitose) proliferierender Zellen anwesend, in ruhenden Zellen (G₀) dagegen abwesend ist. Neueste Erkenntnisse zeigen allerdings, dass pKi-67, wenn gleich sehr stark herunterreguliert, auch in ruhenden Zellen zu finden ist (Bullwinkel et al., 2006).

Das Protein hat eine sehr große Molekularmasse (320 bzw. 359 kD) und besteht aus zwei Isoformen, welche durch alternatives Spleißen gebildet werden. Beide Isoformen haben eine große zentrale Region mit 16 sich wiederholenden Elementen (*Ki-67 repeats*). Innerhalb dieser *Ki-67 repeats* befindet sich eine stark geschützte (*conserved*) Region, welche die Bezeichnung *Ki-67 motif* trägt. Diese Region beinhaltet das Epitop, welches durch den Ki-67-Antikörper MIB-1 erkannt wird (Schlüter et al., 1993).

pKi-67 kommt in allen proliferierenden Zellen vor. Es gilt daher als ausgezeichneter Marker, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation bestimmen zu können. Dabei ist zu beachten, dass die Wachstumsfraktion, welche durch den Ki-67-Index (Anteil Ki-67-positiver Zellen im Verhältnis zu der Zellgesamtzahl) bestimmt wird, nur Informationen über die Teilungsfähigkeit gibt. Über die tatsächliche Proliferationsrate kann hingegen keine Aussage gemacht werden (Scholzen und Gerdes, 2000).

Der Ki-67-Index hat inzwischen einen wichtigen prognostischen Stellenwert in der Tumordiagnostik eingenommen, da die Proliferationsrate bei vielen Tumoren den klinischen Verlauf bestimmt. Am detailliertesten sind zu diesem Thema die Prognosen von Mamma- (Weikel et al., 1995; Molino et al., 1997) und Prostatakarzinomen (Aaltomaa et al., 1997; Borre et al., 1998) untersucht worden. Der Ki-67-Index oder MIB-I-Score wird heute bei verschiedenen Tumoren zur Planung der optimalen Therapie

herangezogen. Mit der vor Therapiebeginn ermittelten Ki-67-Expression im Tumorgewebe ist eine Aussage zur Tumoraggressivität möglich.

1.1.1 Lokalisation des Ki-67-Proteins

Während des gesamten Zellzyklus ist pKi-67 im Zellkern lokalisiert. Während der Interphase (G₁-, S-, G₂-Phase) ist das Protein vor allem im Kortex und in der dichten fibrillären Zone der Nukleoli lokalisiert (Verheijen, 1989a). Der Nukleolus besteht aus drei Komponenten, der dichten fibrillären Zone (*dense fibrillar component, DFC*), dem granulierten Nukleolus-Kortex (*granular component, GC*) und dem fibrillären Center (*fibrillar center, FC*) (Scheer und Hock, 1999). Diese Komponenten besitzen verschiedene Arten von Kern-Proteinen und scheinen für verschiedene Aspekte der Ribosom-Genese wichtig zu sein. Während der Mitose wird pKi-67 umverteilt. In der Prophase lagert es sich als feines Maschwerk dem sich verdichtetem Chromatin an (Verheijen et al., 1989b), in der Meta- und Anaphase ist es auf den Chromosomen verteilt. Dabei kommt es aber zu keiner Assoziation zwischen Protein und Chromatin. Nach Auflösung der Kernmembran kann ein Anteil von pKi-67 auch diffus im Zytoplasma verteilt sein (Braun et al., 1988).

Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass der Ki-67-Gehalt am Ende der Mitose absinkt und zu Beginn der G₁-Phase wieder ansteigt (Braun et al., 1988). Die Halbwertszeit von pKi-67 wurde mit im Zellzyklus arretierten Zellen auf 60 Minuten festgelegt (Bruno und Darzynkiewicz, 1992).

1.1.2 Funktion des Ki-67-Proteins

Obwohl bis jetzt schon viel über Struktur, Regulation und Lokalisation des Ki-67-Proteins bekannt ist, erscheint es umso erstaunlicher, dass über die Funktion noch Unklarheit herrscht. Dies kommt vor allem daher, dass bis jetzt, ausgenommen der Ki-67-Äquivalente bei anderen Säugetierzellen, keine Strukturähnlichkeiten mit anderen Proteinen gefunden wurden. Außerdem ist die Untersuchung dieses Proteins dadurch erschwert, dass es in keinem Organismus bekannt ist, welcher für etablierte Experiment-Modelle (wie z.B. *Drosophila melanogaster* oder Hefen) in der Forschung verwendet wird.

Als gesichert gilt die essentielle Rolle des Proteins für die Zellproliferation. Dies konnte mit der Inhibierung von Zellproliferation und Zellwachstum durch die Behandlung mit

Antisense-Oligonukleotiden gegen pKi-67 gezeigt werden (Schlüter et al. 1993, Kausch et al., 2003).

Es wird vermutet, dass das Protein in der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt. Hofmann und Bucher (1995) lokalisierten eine so genannte *forkhead-associated (FHA) domain* am aminoterminalen Ende des Proteins. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Art von Motiv auch in anderen Proteinen, welche in die Zellzyklus-Regulation eingreifen, vorhanden ist. Aber auch die Funktion von FHA ist bis jetzt noch unklar.

Des Weiteren könnte pKi-67 Aufgaben in der DNA- und Chromatin-Organisation wahrnehmen. Bridger et al. (1998) stellten fest, dass das Protein in der frühen G₁-Phase an extranukleolären Stellen lokalisiert ist, an denen auch Zentromer- und Satelliten-DNA vorhanden sind. Außerdem wurde gezeigt, dass pKi-67 zur Familie der MPM-2-Antigene gehört, und dass die Phosphorylierung des Proteins während der Mitose mit der Kondensation von Chromosomen und Separation der Schwester-Chromatide assoziiert ist (Endl und Gerdes, 2000). Weiterhin ist eine C-terminale Domäne von pKi-67 (Kon21) fähig, an alle drei Mitglieder von *mammalian heterochromatin protein 1 (HP1)* *in vitro* und *in vivo* zu binden. Dies könnte auf eine Kontrollfunktion für übergeordnete Chromatinstrukturen hinweisen (Scholzen et al., 2002). Weiter nimmt man an, dass pKi-67 eine Rolle in der Proteinbiosynthese spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Rate der Ki-67-Expression mit der Proteinbiosynthese korreliert (Plaat et al., 1999). MacCallum und Hall (2000) vermuten eine strukturelle Rolle innerhalb des Nukleolus, da das Protein in einem komplexen Weg mit anderen Proteinen interagiert und sowohl an RNA als auch an DNA binden kann. Durch die Lokalisation an der DFC, welche mit der späten ribosomalen RNA-Prozessierung assoziiert ist, wird angenommen, dass das pKi-67 für die Synthese von Ribosomen während der Zellteilung essentiell ist (Mac Callum und Hall, 2000).

Erstaunlicherweise existiert zur Funktion des Ki-67-Protein kaum aktuelle Literatur, obwohl es reichlich neue Daten zur Prognose und Korrelation bei Tumorerkrankungen gibt.

1.2 Tumorthherapie

Die effektive Tumorthherapie ist nach wie vor eine der größten medizinischen Herausforderungen, da immer noch ca. 25 % aller Todesfälle in Deutschland auf bösartige Tumoren zurückzuführen sind (Statistisches Bundesamt, 2006).

Die drei wichtigsten Säulen der Tumorthherapie sind Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie. Darüber hinaus gibt es weitere, zum Teil neuere Therapieoptionen wie Hormontherapie, Immuntherapie, monoklonale Antikörper, Hyperthermie uvm., welche vor allem in Kombination mit den drei Standardtherapien angewendet werden.

Bei lokalisierten Tumoren stehen die chirurgische Entfernung und die Strahlentherapie im Vordergrund. Sobald es sich allerdings um disseminierte Tumoren, Metastasen oder ausgedehnte Rezidive handelt, spielt die Tumorchemotherapie eine wichtige Rolle.

Limitierende Faktoren der Chemotherapie sind u.a. geringe Toleranz gegenüber tolerablen, effektiven Dosen bzw. schwere Nebenwirkungen und Resistenzbildungen der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika. Deshalb müssen neue Therapieansätze gefunden werden, die nicht toxisch bzw. unspezifisch auf alle Zellen wirken, sondern nur direkt auf klar definierte, molekulare Ziele, welche eine wesentliche Rolle bei der Karzinogenese spielen. Die Identifizierung vieler humaner Gene, besonders derer, die für das Tumorwachstum essentiell sind, ist der Ansatzpunkt für neue zielgesteuerte Therapieoptionen. Schon seit längerer Zeit sind mit Antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen (Breaker, 2004) zwei Konzepte der gezielten Inhibition der Gene bzw. der Proteinbiosynthese bekannt. Ein neuer und sehr vielversprechender Ansatz auf diesem Gebiet ist die RNA-Interferenz (RNAi) anhand von small interfering RNA-Konstrukten (siRNA). Da aufgrund der multifaktoriellen Genese von Karzinomen die Stilllegung eines einzelnen Gens bisher oft als unzureichend wirksam angesehen wurde, bietet die Kombination verschiedener Therapieprinzipien einen wichtigen Ansatzpunkt der heutigen Tumorthherapie.

Die erste erfolgreiche Pharmakochemotherapie wurde 1941 bei der Behandlung eines Prostatakarzinoms durchgeführt. Die Tumorchemotherapie der meisten soliden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium führt immer noch relativ selten zur Heilung oder zu einer deutlich verlängerten Überlebenszeit (kurative Chemotherapie). Oft wird nur eine Teilremission, eine Linderung tumorbedingter Symptome oder eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erreicht (palliative Chemotherapie). Eine Ausnahme bilden

hierbei z.B. Hoden- oder Ovarialtumoren. Große Bedeutung hat die Chemotherapie allerdings nach einer erfolgreichen Operation bzw. Bestrahlung, um restliche Tumorzellen zu eliminieren (adjuvante Chemotherapie). Außerdem kann es sinnvoll sein, vor einer Operation eine Chemotherapie einzusetzen, um den Tumor zu verkleinern und damit operabel zu machen (neoadjuvante Chemotherapie).

Grundlage der Chemotherapie bildet heutzutage fast immer eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Zytostatika, um asynchrone Tumorzellen in unterschiedlichen Zyklusphasen abzutöten und um Resistenzentwicklungen entgegenzuwirken.

Bei den Tumorzellen gibt es, vereinfacht gesagt, drei unterschiedliche Populationen an Zellen. Die erste ist die Wachstumsfraktion, die aus proliferierenden Stammzellen besteht. Die zweite Population besteht aus ruhenden, aber zeitweise noch proliferierenden Zellen. Bei der dritten Population handelt es sich um differenzierte Zellen, die dauerhaft die Fähigkeit verloren haben, sich zu teilen. Da die Chemotherapie mit ihren verschiedenen Mechanismen nur auf sich teilende Zellen wirkt, setzt diese Therapie bei den ersten beiden Populationen an. Chemotherapeutika wirken daher besonders gut auf Zellen mit einer kurzen Verdopplungszeit bzw. auf Tumoren, die eine große Wachstumsfraktion haben.

Es gibt zwei Gruppen von Zytostatika: phasenspezifische und phasenunspezifische. Zu den phasenspezifischen Zytostatika gehören Antimetabolite und Mitosehemmstoffe. Antimetabolite hemmen die Synthese von DNA-Bausteinen und wirken somit in der S-Phase des Zellzyklus. Mitosehemmstoffe dagegen wirken vor allem in der späten G₂-Phase und in der M-Phase. Phasenunspezifische Chemotherapeutika wirken vor allem auf proliferierende Zellen. Beispiele hierfür sind Alkylantien und Cis-Platin, welche auch als „zyklusspezifische Substanzen“ bezeichnet werden.

Da phasenspezifische Zytostatika nur in bestimmten Zellzyklusphasen wirken, gilt bei diesen eher die Dauer der Therapie, weniger dagegen ihre Konzentration als wichtig. Darum werden phasenspezifische Zytostatika zwar niedrig dosiert, doch über einen längeren Zeitraum verabreicht. Im Gegensatz dazu erweist sich bei den phasenunspezifischen Zytostatika die Konzentration als entscheidender Faktor. Diese werden im Therapieverlauf intermittierend höher dosiert verabreicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass viele Zytostatika, obwohl sie unterschiedliche Wirkformen bzw. Angriffspunkte haben, zu einer Induktion der

Apoptose (programmierter Zelltod) führen. Außerdem sind viele Chemotherapeutika von der Zellproliferation abhängig und wirken daher nicht auf ruhende Zellen. Diese können daher zu einem späteren Zeitpunkt ein erneutes Tumorwachstum hervorrufen (Drewinko et al., 1981).

1.3 Antisense Oligonukleotide

Antisense Oligonukleotide sind kurze DNA-Einzelstränge, die synthetisch hergestellt werden und chemisch modifiziert sind. Sie können spezifisch mit komplementären mRNA-Sequenzen hybridisieren und dadurch über verschiedene Mechanismen die zugehörige Proteinproduktion inhibieren. Das Konzept, Oligonukleotide als Inhibitoren der Genexpression zu verwenden, wurde erstmals von Zamecnik und Stephenson (1978) beschrieben. Damals war die Produktion von Oligonukleotiden sehr teuer und aufwendig, da noch keine DNA-Synthesizer vorhanden waren. Auch über Wirkungsmechanismen und Pharmakologie war damals nur wenig bekannt. Seit dieser Zeit wurden durch intensive Forschung und Weiterentwicklung der Synthesetechniken große Fortschritte erzielt. Die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden (AS-ON) gilt inzwischen als ein wichtiges Werkzeug bei der Erforschung und Identifizierung der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von Zielgenen. Gleichzeitig bilden sie aber auch einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz, zum Beispiel in der Onkologie.

Für die Anwendung von AS-ON ist einzig die mRNA-Sequenz des zu blockierenden Gens erforderlich. Funktion, Struktur oder Lokalisation des Proteins gelten im Gegensatz dazu als nicht relevant. Der Vorteil der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden besteht prinzipiell in der technisch einfachen Anwendung.

Abhängig von der Basenkomposition und der chemischen Modifikation zeigen 15-20mer-Oligonukleotide optimale, spezifische Hybridisierungseigenschaften (Kurreck, 2003). Bei einer Verlängerung des Stranges erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass er an die Zielsequenz bindet. Gleichzeitig vermindert sich aber die Spezifität, da der Strang mehr komplementäre Teilstücke zu anderen Abschnitten enthält (Herschlag, 1991). Diese können dann zu Mismatch-Komplexen führen, welche die RNase H aktivieren (s.u.). Des Weiteren tendieren längere Oligonukleotide zu intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, welche die zelluläre Aufnahme vermindern (Khatsenko et al., 2000).

Ein wichtiges Beispiel für einen unspezifischen ON-Effekt wurde anhand von CpG-Motiven beschrieben (Krieg et al., 1995). CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, flankiert von zwei 5'-Pyrimidin- und zwei 3'-Purinbasen, welche eine nicht-antisense-bedingte immunstimulatorische Wirkung initiieren. CpG-Motive sind charakteristisch für mikrobielle DNA (Bakterien und Viren). Bestimmte Immunzellen von Wirbeltieren exprimieren Rezeptorproteine für die Erkennung dieser CpG-Motive in der DNA (z.B. Toll-like receptor 9, TLR9), wobei durch die Induzierung einer Zytokin-Ausschüttung eine antivirale, antibakterielle und antitumorale Aktivität

vermittelt wird. Ein Unterschied der CpG-Motive ist zum einem, dass die so initiierte Antisense-Wirkung der Oligonukleotide durch eine Protein-DNA-Wechselwirkung und nicht durch eine Watson-Crick-Basenpaarung zustande kommt. Des Weiteren ist für die Wirksamkeit keine Aufnahme ins Zytoplasma der Zelle notwendig, da TLR9 auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Durch Methylierung von CpG-Sequenzen kann diese unspezifische immunaktivierende Wirkung vermieden werden. Allerdings werden CpG-Motive auch therapeutisch, z.B. als Adjuvanz bei Vakzinierungen oder in der Tumorthherapie eingesetzt (Klinman, 1998).

1.3.1 Chemische Modifikationen

Probleme bei der Verwendung von unmodifizierten Antisense-Oligonukleotiden ergeben sich aus der Empfindlichkeit gegenüber Nukleasen, niedriger Aufnahme in die Zelle und aus der schlechten intrazellulären Verteilung. Chemische Modifikationen (s.u.) und Transfektionsreagenzien (s.u.) haben viele dieser Nachteile reduziert.

Da unmodifizierte Phosphodiester-Oligonukleotide in den meisten biologischen Systemen sehr schnell durch Exonukleasen abgebaut bzw. zerstört werden, können sie in dieser Form schlecht *in vitro* und *in vivo* benutzt werden. Um die Resistenz gegenüber dem Abbau zu erhöhen, wurden Oligonukleotide an verschiedenen Bereichen chemisch modifiziert. Jede dieser Modifikationen hat vorteilhafte und nachteilige Eigenschaften. Daher muss individuell entschieden werden, welche Modifikation für das jeweilige Anwendungsgebiet die nützlichste ist. Unter anderem kann durch Thiolierung, Modifikationen am Zucker, Konjugate (z.B. Cholesterol, C18), Substitutionen am Rückgrat und Modifikationen an den Purin- und Pyrimidinringen die Stabilität der Oligonukleotide erhöht werden (Cooper et al., 1999).

Die wohl am häufigsten verwendete Modifikation ist die Thiolierung des Phosphates (P=S). Dabei wird im DNA-Rückgrat der negativ geladene Sauerstoff am Phosphatrest durch Schwefel ersetzt. Dies führt zu einer 100-300fachen Erhöhung der Resistenz gegen den Abbau durch Nukleasen, verglichen mit unmodifizierten Phosphodiester-Oligonukleotiden (Cummins et al., 1995). Damit wird die Plasmahalbwertszeit *in vitro* von ca. 5 Minuten bei Phosphodiester-ON auf 18 Stunden bei thiolierten Oligonukleotiden erheblich verlängert (Shaw et al., 1991). *In vivo* erfolgt eine biphasische Eliminierung (50 Minuten und 40 Stunden), die Halbwertszeit beträgt 40 bis

60 Stunden. Im Plasma werden thiolierte Oligonukleotide an viele Proteine, u.a. auch an Albumin, gebunden, was eine rasche Ausscheidung über die Niere verhindert (Crooke et al., 1996). Die thiolierten Antisense-Oligonukleotide akkumulieren v.a. in Leber und Nieren gefolgt von Milz und Knochenmark (Schlingensiepen et al., 1996). Die Metabolisierung der Oligonukleotide erfolgt v.a. durch 3'-Exonukleasen. Eine Degradierung vom 5'-Ende aus konnte aber auch gezeigt werden (Temsamani et al., 1997). Nachteile der thiolierten Oligonukleotide sind die unspezifischen und toxischen Nebeneffekte (Levin, 1999).

Obwohl thiolierte Antisense-Oligonukleotide *in vivo* insgesamt gut verträglich sind, gibt es doch einige, meist spontan reversible, Nebenwirkungen. Zum einen kann es akut zu einer Komplement-Aktivierung kommen, welche bei Menschen v.a. durch hohe Dosen (> 18 mg/k/d) ausgelöst wird. Bei hohen Dosen kann es auch zu einer Zytokin-Ausschüttung (IL-6, TNF- α) mit grippeähnlichen Symptomen kommen. Des Weiteren können eine Erhöhung der aktivierten partiellen Thromboplastin-Zeit (aPTT) ohne erhöhte Blutungsneigung und eine transiente Thrombozytopenie ausgelöst werden (Nemunaitis et al., 1999; Yuen et al., 1999; Dorr et al., 2001). Die Auslösung von mutagenen Effekten wurde bis jetzt nur unzureichend untersucht, ist aber sehr unwahrscheinlich, da thiolierte Oligonukleotide schlechte Substrate für Enzyme wie DNA-Polymerasen, Gyrasen und Topoisomerasen sind. Auch werden keine karzinogenen Metabolite bei dem Abbau von thiolierten Oligonukleotiden produziert. Allerdings könnte sich hierbei das Risiko für modifizierte Oligonukleotide erhöhen (Crooke, 2004).

Mit der Entwicklung von 2.-Generation-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden, wie z.B. 2'-O-Methyl-modifizierte thiolierte Oligonukleotide, konnte eine Reduktion der unspezifischen Effekte und eine erhöhte Bindungsstabilität erreicht werden. So ist z.B. die Bindungsaffinität von Oligonukleotiden mit 2'-O-Methoxyethyl-Chimären (2'-O-MOE) als Modifikation im Vergleich zu thiolierten Antisense-Oligonukleotiden bis zu zehnfach erhöht. Auch ist die Halbwertszeit mit 25-30 Tagen *in vivo* deutlich verlängert (Crooke et al., 2004), was eventuell eine monatliche Verabreichung möglich machen könnte. Zusätzlich konnte die Reduktion von entzündungsfördernden Effekten gezeigt werden (Henry et al., 2000). Zur Zeit werden diese 2.-Generation-Antisense-Oligonukleotide, wie z.B. GEM231 gegen Proteinkinase A R1alpha (Yoo et al., 2004;

Goel et al. 2006) oder ISIS 104838 gegen TNF- α (Sewell et al., 2002) in ersten klinischen Studien eingesetzt.

1.3.2 Wirkungsmechanismus

Nachdem Antisense-Oligonukleotide durch Wasserstoffbrückenbindungen (Watson-Crick-Basenpaarung) an ihre komplementäre mRNA gebunden haben, gibt es verschiedene Mechanismen, durch welche die Proteinsynthese gehemmt wird. Die Mechanismen hängen von der Art der chemischen Modifikation der Oligonukleotide und von dem Abschnitt innerhalb der mRNA, an dem die Oligonukleotide binden, ab.

1.3.2.1 RNase H

RNase H ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches zu der Familie der Endonukleasen gehört. In eukaryotischen Zellen kommt sie im Nukleus und im Zytoplasma vor. Der Wirkungsmechanismus besteht in der Spaltung von RNA-Strängen, welche mit komplementärer DNA Komplexe gebildet haben. Dadurch wird der Abbau durch Exonukleasen induziert und auf diese Weise die Proteinbiosynthese gestoppt. Da der AS-Oligonukleotid-Strang dabei nicht zerstört wird, kann er erneut an mRNA-Stränge binden. Ein einziger AS-Strang kann somit die Spaltung von vielen mRNA-Kopien bewirken (Cooper et al., 1999). Durch Rückgrat-Modifikationen der Oligonukleotide kann die Aktivierung von RNase H beeinflusst werden. So aktivieren z.B. Methylphosphate die RNase nicht (Maher, 1989), wohingegen thiolierte Oligonukleotide exzellente Substrate abgeben (Stein und Cheng, 1993).

1.3.2.2 Translations-Stopp

Zu dem Translations-Stopp werden folgende zwei Theorien diskutiert:

1. Die Translation wird dadurch blockiert, dass die Ribosomenuntereinheiten sich nicht aneinander lagern können (Chiang et al., 1991; Baker et al., 1997).
2. Das Weiterrücken des Ribosoms wird verhindert und führt damit zu einer Blockierung der Translation. Deshalb wird oft eine Sequenz für die AS-ON verwendet, die in der Startregion der Translation liegt.

Gerade die zweite Theorie gilt bis jetzt als fraglich. Daher wird auch hier eine RNase H-aktivierte Degradierung des mRNA-Stranges mitdiskutiert.

1.3.3 Antisense *in vitro* Pharmakologie

Bei Verwendung von thiolierten Oligonukleotiden wird die Ziel-mRNA am häufigsten durch Spaltung mittels RNase H reduziert. Für die Inhibition der Genexpression durch diesen Mechanismus ist die Pharmakologie sehr typisch und reproduzierbar.

Falls das Ziel-Gen konstant vorhanden ist, kann man eine Reduktion von mehr als 80% durch thiolierte Oligonukleotide bei einer Konzentration von 0,2 bis 1 μM erwarten (Dean et al., 1994). Diese Inhibition dauert etwa 24 bis 48 Stunden an. Daher muss darauf geachtet werden, dass bei Proteinen mit einer längeren Halbwertszeit die Behandlung der Zellen wiederholt wird.

1.3.4 Therapeutische Anwendung

Theoretisch kann jedes Gen mit bekannter Sequenz stillgelegt werden, was besonders einen vielversprechenden Ansatzpunkt bei Erkrankungen darstellt, welche auf einer Dysregulation einzelner Gene basieren. Mittlerweile wurde in vielen Tiermodellen die pharmakologische Aktivität bezüglich einer Vielzahl humaner Krankheiten, insbesondere Krebs, gezeigt. Auch wurden mittlerweile verschiedene klinische Studien durchgeführt. Dabei wurden Antisense-Oligonukleotide für die Behandlung von viralen Infektionen (z.B. Zytomegalievirus, HIV), Autoimmunkrankheiten (z.B. Morbus Crohn, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis) und Krebs eingesetzt. Vitravene[®] (Formivirsin) erhielt als erstes Medikament die Zulassung durch die amerikanische Food and Drug Administration zur Behandlung der CMV-Retinitis (Marwick, 1998). Weitere Antisense-Therapeutika werden zur Zeit in fortgeschrittenen Phase-III-Studien in Kombination mit Chemotherapeutika untersucht (s.u.)

1.4 Kombination von Chemotherapeutika und Antisense-Oligonukleotiden

Die präklinische Entwicklung verschiedener Antisense-Oligonukleotide, welche gegen krebs-relevante Gene gerichtet sind, ist in den letzten Jahren sehr schnell vorangeschritten. Aufgrund der multigenetischen Entstehung von Tumoren haben präklinische und klinische Studien gezeigt, dass eine Monotherapie mit Antisense-Oligonukleotiden oft unzureichend wirksam ist. Demzufolge ist es ein vielversprechender Ansatz, Kombinationstherapien zu entwickeln, die in verschiedene molekulare Signalwege, welche z.B. die Zellproliferation oder Apoptose regulieren, eingreifen und damit eine Chemoresistenz bzw. die Aktivierung alternativer „Pathways“ überwinden. Besondere Angriffspunkte bei der Kombinationstherapie bilden hierbei Proteine, die in Signalwege der Zellproliferation (Onkogene wie *ras* oder PKA) oder Apoptose (z.B. Bcl-2, Bcl-xl, Survivin) eingreifen.

Verschiedene Zellkultur- und Tiermodelle haben gezeigt, dass die Kombination von Antisense-Oligonukleotiden und konventionellen Chemotherapeutika einen vielversprechenden Ansatz darstellt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Suppression verschiedener Signalwege die Zytotoxizität für Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* erhöht. Damit kann eine Resistenzverminderung der Zellen gegenüber den Chemotherapeutika erreicht werden (Miayake et al., 2000; Tortora et al., 2000 und 2001; Biroccio et al., 2001b; Liu und Gazitt, 2003). Weiter ergaben klinische Studien, dass die Antisense-Behandlung gut toleriert wird, ohne dabei die Toxizität der Chemotherapeutika zu erhöhen (Biroccio et al., 2003).

Ein positives Beispiel hierfür ist das Antisense-Oligonukleotid Genasense[®], welches gegen Bcl-2 gerichtet ist. Zur Zeit laufen mit diesem Oligonukleotid fortgeschrittene Phase-III-Studien bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und malignen Melanomen, welche positive Ergebnisse zeigen (O'Brian et al., 2007; Tarhini und Kirkwood, 2007).

Obwohl in vielen Studien gezeigt wurde, dass die Kombination von Antisense-Oligonukleotiden mit konventionellen Therapien eine verbesserte Ansprechrate hatte, konnte bis jetzt in den meisten Studien keine signifikant erhöhte Überlebensrate nachgewiesen werden (Biroccio et al., 2003).

1.5 RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) tritt in den meisten Eukaryonten auf. Es wurde erstmals von Fire et al. 1998 an *Caenorhabditis elegans* beschrieben, später auch an verschiedenen anderen Organismen, wie z.B. *Drosophila melanogaster*, Trypanosomen, Pilzen und Pflanzen (Ngo et al., 1998; Waterhouse et al., 1998; Cogoni und Macino, 1999; Sharp, 1999), aber auch an Säugetierzellen (Elbashir et al., 2001). Die RNA-Interferenz beschreibt eine sequenz-spezifische posttranskriptionale Gen-Stillegung, die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) hervorgerufen wird. Sie stellt einen Prozess zur Protektion des Genoms gegenüber Invasion fremder Gene dar. Dieser Prozess ist mit der normalen Abwehr gegen Viren und der Mobilisation von Transposons zu vergleichen (Tijstermann et al., 2002). Hierbei wird doppelsträngige RNA, welche durch sich replizierende Viren, Transposons oder regulatorisch nicht-codierende microRNA (miRNA) (Bartel, 2004) produziert wird, in kurze RNA-Stücke gespalten. Dies geschieht durch eine cytoplasmatische Ribonuclease III, einem sogenannten Dicer. Dieses Schlüssel-Enzym für die Spaltung der RNA wurde in Extrakten von Insektenzellen, *Caenorhabditis elegans*-Embryonen, Mauszellen und Mastzellen charakterisiert (Bernstein et al., 2001; Billy et al. 2001; Yin und Stuart, 2006). Bei der Spaltung entsteht sogenannte small interfering RNA (siRNA), welche 21 bis 23 Nukleotide lang ist (Tuschl, 2001; Hannon, 2002; Xia et al., 2002; McManus und Sharp, 2002). Diese kurzen RNA-Stränge werden auch als *guide RNAs* bezeichnet (Hannon, 2002). In einem zweiten Schritt bindet diese *guide RNA* an einen *RNA-induced silencing complex* (RISC). Es wird vermutet, dass dieser Komplex eine Helikase-Aktivität, eine Endonuklease-Aktivität und eine Homologie-Such-Aktivität (*homology searching activity*) besitzt (Hammond et al., 2001).

Proteine der Familie Argonaute sind Kernkomponenten des RISC. Sie sind erforderlich für die Abspaltung des Sense-Stranges der siRNA, damit der Antisense-Strang sich mit dem aktiven RISC-Komplex verbinden kann (Matranga et al, 2005; Rand et al., 2005). In Menschen und Mäusen ist Ago2, welches zu den Proteinen der Argonaute-Familie gehört, für die Spaltung der RNA-Stränge verantwortlich (Liu et al., 2004).

Das Ausmaß der Komplementarität des siRNA-mRNA-Komplexes bestimmt, ob die mRNA gespalten wird oder ob es nur zu einem Translations-Stopp kommt (Caudy et al., 2003; Doench et al., 2003). Das Resultat der RNA-Interferenz ist, dass die mRNA des Zielgens herunterreguliert und infolgedessen post-transkriptional die Gene „stillgelegt“ werden (Hammond et al., 2000).

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die RNA-Interferenz nur im Zytoplasma stattfindet. Neuere Studien haben aber gezeigt, dass die RNA-Interferenz auch im Nukleus nachweisbar ist. Berezhna et al. (2006) haben ermittelt, dass die Lokalisation von RISC und siRNA von der Lokalisation der Ziel-RNA abhängig ist. So haben sie nachgewiesen, dass bei Lokalisation der Ziel-mRNA im Nukleus zunächst die komplette siRNA in den Nukleus eingeschleust wird. Erst dort geschieht die Abspaltung des Sense-Stranges zur Formation des aktiven RISC-Komplexes mit dem AS-Strang der siRNA.

Die RNA-Interferenz ist ein Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen und DNA-Transpositionen (Buchon und Vaury, 2006). Eine weitere Aufgabe könnte sein, die Genexpression zu regulieren (Montgomery und Fire, 1998). Außerdem nimmt die RNA-Interferenz vor allem bei der Analysierung von Genfunktionen sowie als neue zielgesteuerte Therapieoption in der Forschung einen hohen Stellenwert ein.

1.6 siRNA

Das Prinzip der RNA-Interferenz mit dsRNA, welche länger als 30 Basenpaare lang ist, konnte bisher nicht in Säugetierzellen nachgewiesen werden (Caplen et al., 2000; Ui-Tei et al., 2000). In diesen Zellen rufen lange doppelsträngige RNA-Stränge durch Aktivierung des *Interferon-Response-Pathway* eine systemische und unspezifische Inhibierung der Translation hervor (Dallas und Vlassow, 2006). Dennoch ist aus dem Prinzip der RNA-Interferenz ein neuer Ansatz entstanden, nämlich die Genexpression von Säugetierzellen durch eingeschleuste siRNA spezifisch zu inhibieren (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Diese Methode ist sehr effektiv und sehr gut für Säugerzellen geeignet, da es bei der Verwendung der siRNA zu keiner unspezifischen Aktivierung von doppelsträngigen RNA-abhängigen Proteinkinasen kommt, wie es bei längerer dsRNA der Fall ist (Stark et al., 1998; Vickers et al., 2003).

SiRNA besteht aus kurzen doppelsträngigen RNA-Molekülen, die 21-23 Basen lang sind und ein überhängendes 3'-Ende haben, welches zwei Nukleotide lang ist. Diese siRNA kann durch chemische Synthese (Elbashir et al., 2001), enzymatische Spaltung (Kittler et al., 2004) oder *expression systems* (Zheng et al., 2004) hergestellt werden. Die Basensequenz der doppelsträngigen RNA ist homolog zu der Sequenz des stillzulegenden Gens zu wählen. Die Zielsequenz sollte 50 bis 100 Basenpaare hinter dem Startcodon liegen (Tuschl, 2001). Diese kurzen RNA-Moleküle imitieren die Dicer-

Produkte der RNA-Interferenz und setzten damit die Kaskade der RNAi in Gang. Es sollte beachtet werden, dass gegen Intron-Regionen gerichtete siRNA offenbar nicht wirksam ist (Zeng und Cullen, 2002).

Obwohl RNA im biologischen Milieu sehr schnell zerfällt, ist die doppelsträngige siRNA sehr resistent gegenüber Biodegradation in fetalem Kälberserum (FCS) und im humanen Plasma (Bertrand et al., 2002). Zur Transfektion, also zum Einschleusen der siRNA in die Zelle, werden meistens Transfektionslösungen auf Lipidbasis (Brazas und Hagstrom, 2005) oder Elektroporation (Gresch et al., 2004) eingesetzt.

Die Aktivität der siRNA hält in proliferierenden Zellen 3-5 Tage an (McManus und Sharp, 2002), in ausdifferenzierten Zellen, wie z.B. Neuronen, sogar bis zu 3 Wochen (Omi et al., 2004). Dabei hängt die Aktivität von der Menge der transfizierten siRNA ab, da Säugetierzellen im Gegensatz zu anderen Eukaryonten keine RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen (Grishok und Mello, 2002). Da die Aktivität von der Teilungsrate der Zellen abhängig ist, kann man annehmen, dass die Wirksamkeit der siRNA eher durch Verdünnungseffekte als durch siRNA-Abbau bestimmt wird (McManus und Sharp, 2002).

In Säugetierzellen wird siRNA verwendet, um die Funktion einzelner Gene, vor allem von Krankheit-assoziierten, zu untersuchen (Dykxhoorn et al., 2003; Dillon et al., 2005). Außerdem können zelluläre Signalwege auseinander genommen und durch Ausschaltung von Genen viele zelluläre Prozesse untersucht werden.

Unspezifische Wirkungen von siRNA sind in wirksamen Dosen gering. Es kann, wie bei längerer dsRNA, zur Aktivierung des *Interferon-Response-Pathway* kommen, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Diese Aktivierung führt zu einer unspezifischen Hemmung der Proteinbiosynthese und zu einer allgemeinen RNA-Degradation (Sledz et al., 2003). Außerdem wurde über unspezifische, sequenzabhängige Expression-Inhibition von unbeteiligten Genen berichtet. So können schon sieben zusammenhängende komplementäre Basenpaare RNAi-vermittelte Gen-Stillegung auslösen (Jackson und Linsley, 2004; Scacheri et al., 2004).

Eine der größten Herausforderungen besteht darin, die wirksamste Inhibierung mit einer möglichst niedrigen Dosis zu finden. Faktoren, welche die Effektivität beeinflussen, sind die Primärstruktur und Erreichbarkeit des Zielbereiches, welche durch die Sekundär- und Tertiärstruktur des „Ziel-RNA“-Abschnitts der siRNA beeinflusst wird. So haben

Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel (2003) zum Beispiel gezeigt, dass die biologische Aktivität mit sehr aktiven (IC_{50} ca. 0,2-0,5 nM) und inaktiven ($IC_{50} > 1 \mu M$) siRNA-Konstrukten um das tausendfache variiert.

Obwohl diese Faktoren zu Beginn häufig nicht vorhersehbar sind, ist statistisch gesehen eine von fünf siRNA-Sequenzen effektiv (Dallas und Vlassow, 2006). Eine Hilfe für die Auswahl der Sequenzen sind Algorithmen, die viele Faktoren oder Charakterzüge, welche experimentell erarbeitet wurden, berücksichtigen. So wird durch diese Analysierung eine Liste von siRNA-Sequenzen erstellt, welche am wahrscheinlichsten effektiv sind. Beispiel für solch eine Such-Software ist unter www.jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/ (Whitehead Institute, August 2007) zu finden. Um zu verhindern, dass diese Sequenzen Homologien zu anderen Genen haben, sollte mit diesen ausgewählten siRNA-Sequenzen ein „BLAST search“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, August 2007) durchgeführt werden. Es wurde allerdings von Seyhan et al. (2005) gezeigt, dass einige effektive Sequenzen von keinem der verfügbaren Algorithmen gefunden wurden.

Erste Vergleiche der Wirksamkeit von siRNA und Antisense-Oligonukleotiden zeigen, dass die Geninhibierung durch siRNA deutlich wirksamer ist als durch Antisense-Oligonukleotide (Bertrand et al. 2002). Hierbei liegen die IC_{50} -Werte für siRNA bis zu 100-1000 fach niedriger als bei thiolierten AS-Oligonukleotiden (Kretschmar-Kazemi Far und Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003).

Dass siRNA nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* ein vielversprechender Ansatz ist, haben mittlerweile viele Experimente gezeigt. So konnte z.B. durch siRNA, welche das Onkogen H-Ras stilllegt, *in vivo* das Tumorwachstum von Ovarial-Karzinomen in Mäusen inhibiert werden (Yang et al., 2003).

Bei relativ problemloser Produktion zeigen erste Daten, dass siRNA eine günstige Pharmakokinetik auszeichnet und von vielen Organen aufgenommen werden kann (Braasch et al., 2004). Mittlerweile wurde siRNA gegen verschiedene Krankheiten, wie z.B. altersabhängige Makuladegeneration, Hepatitis B und C, Chorea Huntington oder Morbus Parkinson und Respiratoral-syncytial-Virus entwickelt (Howard, 2003; Dallas und Vlassov, 2006). Des Weiteren wurde *in vivo* siRNA gegen Tumoren wie z.B. kleinzelliges Lungen-Karzinom und Glioblastom untersucht (Lakka et al., 2004; Sumimoto et al., 2005). Auch erste Phase-I-Studien haben mittlerweile begonnen. So wurde eine Phase-I-Studie mit siRNA gegen VEGF (Cand 5) bei altersabhängiger Makuladegeneration abgeschlossen, welche positive Resultate brachte

(www.acuitypharma.com, März 2007). Eine weitere Studie wird zur Zeit mit siRNA als Medikament bei Respiratory-syncytial-Virus-Infektionen untersucht (www.alnylam.com, März 2007).

1.7 Transfektionsmedien

In vitro ist die Aufnahme von Oligonukleotiden und siRNA in die Zelle über die Lipidhaltige Zellmembran sehr schlecht. Um wirksame Konzentrationen intrazellulär zu erzielen, sind relativ hohe ON-Konzentrationen ($>5 \mu\text{M}$) nötig. Daher müssen Substanzen benutzt werden, welche die Moleküle unbeschadet in die Zelle schleusen (Transfektion) und somit die Aufnahme erhöhen. Als Transfektionsmedien eignen sich diverse Substanzen, wie z.B. kationische Lipide oder Liposome. Peptide, Polykationen, Konjugation mit Cholesterol, Aggregation mit Liganden der Zelloberfläche und Elektroporation sind weitere Techniken zur Transfektion.

Durch Verbesserung der Aufnahme in die Zelle kann die Konzentration der Oligonukleotide erheblich vermindert und damit die unspezifische Toxizität auf die Zelle herabgesetzt werden.

Es wird angenommen, dass die negativ geladenen Phosphodiester- und Phosphorothiol-Oligonukleotide nicht passiv, sondern durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (Loke et al., 1989). Dieser aktive Prozess ist energieabhängig, somit auch abhängig von Calcium und Temperatur (Loke et al., 1989; Yakubov et al., 1989). Intrazellulär sind die Oligonukleotide vor allem membrangebunden an intrazellulären Vesikeln lokalisiert (Thierry und Dritschilo, 1992). Andere Parameter, welche die Aufnahme beeinflussen, sind Zelltyp, Medium sowie Art und Länge der Oligonukleotide.

1.7.1 Liposomale Transfektionssysteme

Oligonukleotide können durch Lipide in Liposomen einkapselt werden, an die Oberfläche von Lipiden binden oder mit kationischen Lipiden einen elektrostatischen Komplex bilden. Vorteile liposomaler Systeme bestehen darin, dass ein höherer Anteil der Oligonukleotide von der Zelle aufgenommen wird und dass diese gegen Abbau geschützt werden.

Ein Nachteil von Standardliposomen (neutral und anionisch) zeigte sich darin, dass sie die Oligonukleotide schlechter einkapseln als kationische Lipide. Dies hängt mit dem relativ hohen Molekulargewicht und der negativen Ladung der Oligonukleotide zusammen.

1.7.1.1 Kationische Lipide

Goldstandard für die *in vitro*-Transfektion von Oligonukleotiden ist die Anwendung von kationischen Lipiden. Die Verwendung wurde zuerst von Felgner et al. (1987)

beschrieben. Kationische Lipide erhöhen nicht nur die Akkumulation der Oligonukleotide in der Zelle, sondern beeinflussen auch die intrazelluläre Verteilung (Bennett et al., 1992). Die negativ geladenen Oligonukleotide binden sich an die kationischen Lipide. Dieser Komplex bindet wiederum an die negativ geladene Zellmembran und wird vermutlich durch Phagozytose oder Membranfusion in die Zelle aufgenommen und in den Kern transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass 24 h nach der Transfektion die Oligonukleotide homogen im Zytoplasma und im Nukleus verteilt sind (Thierry und Dritschilo, 1992). Wichtig ist dabei, dass die Oligonukleotide durch kationische Lipide in den Nukleus eingeschleust werden, wobei das Transfektionsmedium im Zytoplasma verbleibt. Dies könnte eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von AS-Oligonukleotiden sein (Bennett et al., 1992; Marcusson et al., 1998). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Oligonukleotide, welche mit einem Transfektionsreagenz in die Zelle eingeschleust wurden, einen zweifach niedrigeren Efflux aus den Zellen haben als Oligonukleotide, welche ohne Reagenz transfiziert wurden (Thierry und Dritschilo, 1992).

Zusätzlich zu den kationischen Lipiden wird oft noch ein zweites „Helferlipid“ zugefügt. Meistens wird das Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) verwendet. Dieses Lipid unterstützt die Freisetzung der Oligonukleotide aus dem Endosomkompartiment in der Zelle.

Es stehen eine ganze Reihe von käuflichen kationischen Lipiden zur Verfügung, wobei jede Zelllinie individuell in Bezug auf Effektivität und Toxizität auf die einzelnen Lipide reagiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch kationische Lipide die wirksame Konzentration von Oligonukleotiden in den nanomolaren Bereich gesenkt werden kann und somit diese eine verminderte Toxizität besitzen.

1.8 Multizelluläre Sphäroide

Sphäroide sind ein dreidimensionales, vielzelliges *in vitro*-Kultursystem, an dem sehr gut die Tumorbiologie studiert werden kann. Es wurde erstmals 1970 von Sutherland et al. beschrieben und hat seitdem fundamentale Wichtigkeit in der experimentellen Krebsforschung gewonnen. Heutzutage werden an Sphäroiden vor allem Therapieansätze untersucht (Mueller-Klieser, 1987; Sutherland, 1988; Knuechel und Sutherland, 1990; Carlsson, 1992; Carlsson und Nedermann, 1992; Freyer, 1992). Es werden aber auch Grundlagen der Biologie und Pathophysiologie erforscht, z.B. interzelluläre Kommunikation, Zellinvasion und Angiogenese (Bracke et al., 1992; Engebraaten, 1992; Neeman et al., 1997).

Im Gegensatz zum Monolayer bewahren die Zellen in diesem dreidimensionalen Kultursystem den gleichen biochemischen und morphologischen Charakter, wie sie ihn auch in *in vivo*-Gewebe haben. Sphäroide bleiben über mehrere Wochen differenziert und funktionsfähig. Vorteile dieses Kultursystems liegen darin, dass Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung in einem reproduzierbaren Format studiert werden können (Kunz-Schughart et al., 1998). Dabei kann eine große Anzahl von Sphäroiden auf einer 96-well-Platte kultiviert werden, wobei im Prinzip jedes Sphäroid bezüglich Morphologie und Physiologie identisch ist.

Sphäroide, die eine kritische Größe über 500 μm überschreiten, entwickeln meist einen nekrotischen Kern, der von einem Ring (Durchmesser 100-300 μm) aus lebenden Zellen umgeben ist. Dieser Ring besteht in der Peripherie aus proliferierenden und im Inneren aus ruhenden, aber noch intakten Zellen. Diese konzentrische Anordnung imitiert deutlich das initiale avaskuläre Stadium solider Tumoren, noch nicht vaskularisierte Metastasen oder vaskularisierte Tumorregionen. Bei letzteren präsentieren die proliferierenden Zellen kapillarnaher Gebiete, die ruhenden Zellen den Übergang und nekrotische Abschnitte minderversorgter Tumorgebiete, die zu weit von der Blutversorgung entfernt sind (Mueller-Klieser, 1987; Sutherland, 1988). Der nekrotische Bereich entsteht wahrscheinlich durch Sauerstoffmangel. Vermutlich sind weitere limitierende Faktoren Mangel an Nährstoffen, Ansammlung von Abbauprodukten und ein niedriger pH-Wert (Acker et al., 1987a+b; Carlsson and Acker, 1988).

Die ersten Versuche, Sphäroide für die experimentelle Krebstherapie zu verwenden, wurden in den frühen siebziger Jahren gemacht. Damals wurden die Folgen von Bestrahlung der Sphäroide untersucht. Mittlerweile werden aber auch Effekte von

Chemotherapeutika, Hyperthermie und weiteren neuen Therapieansätzen erforscht. Dabei werden die Veränderungen hauptsächlich durch Wachstumsverzögerung (Bestimmung des Sphäroidvolumens), die Anregung der Klonbildung und/oder *Outgrowth tests* untersucht. Mit dem *Outgrowth test* wird überprüft, ob Zellen noch die Fähigkeit haben, in den Monolayer migrieren zu können.

1.9 Aufgabenstellung

Die Antisense-Therapie ist v.a. in Kombination mit der klassischen Chemotherapie ein vielversprechender neuer Ansatz der Krebstherapie. Es wurden bereits in einigen klinischen Studien signifikante Effekte verschiedener Kombinationstherapien in Bezug auf Tumorreduktion und Erhöhung der Überlebensrate gezeigt.

Ein Zielprotein der Antisense-Therapie ist das für die Zellproliferation essentielle Ki-67-Protein. Für dieses konnten bereits in Monolayer-Zellkulturen eine Reduktion des mRNA- und Proteinlevels, eine Zellproliferations-Hemmung und Apoptose-Einleitung gezeigt werden. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Größe und Verlust der dreidimensionalen Struktur von Sphäroiden demonstriert. Bei *in-vivo*-Versuchen konnte eine Tumorreduktion an subkutanen Prostata-, Harnblasen- und Nierenzelltumoren gezeigt werden. Eine erste abgeschlossene klinische Phase-I-Studie hat die Verträglichkeit der Ki-67-Antisense-Therapie bei intravesikaler Applikation zur Therapie von Harnblasen-Karzinomen gezeigt.

Anknüpfend an diese Ergebnisse war der erste Schwerpunkt dieser Arbeit, erstmalig den Effekt einer Kombination von Antisense-Oligonukleotiden gegen das Ki-67-Protein und verschiedenen Chemotherapeutika (Gemcitabin, Cis-Platin und Taxol) auf die Zellproliferation zu untersuchen. Untersucht werden sollten die Auswirkungen am Monolayer und auf Sphäroide:

- auf mRNA-Ebene mittels PCR
- auf die Zellproliferation mittels zweier Zellproliferations-Assays
- auf die Ki-67-Expression mittels MIB-1-Färbung

Zweiter Schwerpunkt der Arbeit war die Etablierung der Ki-67-RNA-Interferenz mittels siRNA, welche eine neue und innovative Methode der Genstilllegung ist. Dazu sollten mittels quantitativer PCR die Effekte auf mRNA-Ebene des Ki-67-Proteins untersucht und mit den Ergebnissen der bereits etablierten Antisense-Oligonukleotid-Therapie verglichen werden.

2 Material und Methoden

Falls in den folgenden Ausführungen nicht detailliert beschrieben, sind die genauen Rezepturen der Nährmedien, Lösungen und Reagenzien, die Bezugsquellen der Chemikalien sowie die genauen Angaben zu den Geräten dem Anhang zu entnehmen.

2.1 Zellkultur

Für die Versuche wurde mit den Zelllinien J82, RT4, MCF7 und NIH-3T3 gearbeitet.

J82 (ATCC: HTB-1) leitet sich von einem humanen Transitionalzellkarzinom der Harnblase ab. Bei der Passagierung wurden 1 Millionen Zellen eingesetzt.

RT4 (ATCC: HTB-2) leitet sich von einem humanen Papillom der Harnblase ab. Eingesetzt wurden 2 Millionen Zellen.

MCF7 (ATCC: HTB-22) leitet sich von einem humanen Adenokarzinom der Mamma ab. Hier wurden 1,5 Millionen Zellen bei der Passierung eingesetzt.

NIH-3T3 (ATCC: CRL-1658) leitet sich von murinen Fibroblastenzellen ab. Bei der Passagierung wurden 1,5 Millionen Zellen eingesetzt.

Um die adhärennten Zellen von der Kulturflasche abzutrennen, wurde das alte Medium mit einer abgeflamnten Pasteurpipette abgesaugt und 5 ml Trypsin-EDTA zum Ablösen zugesetzt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Beklopfen von der Kulturflasche abgelöst, mit einer Pipette in 1 ml FCS überführt und für 7 Minuten bei 1500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml RPMI resuspendiert.

Nach der Zellzahlbestimmung wurde die benötigte Zellzahl in eine neue Kulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm²; NUNC, Wiesbaden) mit 10 ml supplementiertem RPMI-Medium (s. Anhang) überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dieses Verfahren wurde für alle Zelllinien angewandt.

Im Regelfall wurden die Zellen montags und freitags passagiert, mittwochs wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.1.1 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mittels einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim) ausgezählt. Blaue Zellen galten dabei als tot. Unter Berücksichtigung der Verdünnung (1:20) wurde die Zellzahl bestimmt und damit das einzusetzende Volumen berechnet.

2.1.2 Zellaussaat und Zellkultursysteme

Für Transfektionsversuche wurden $0,5 \times 10^6$ bzw. $1,0 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Medium in einer Kulturflasche mit 25 cm² Wachstumsoberfläche (NUNC) gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit waren die Zellen zu 70-80% konfluent.

Für die Zellviabilitäts-Assays wurde aus J82-, RT4- oder MCF7-Zellen eine Zellsuspension mit $0,5 \times 10^6$ Zellen/ μ l bzw. $1,0 \times 10^6$ Zellen/ μ l Medium hergestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 μ l in ein *well* einer 96-*well*-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert, woraus eine Zellzahl von 5000 Zellen/*well* resultierte. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 500 RPM auf dem Boden der Platte zentrifugiert und anschließend für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit die Zellen vor der ON-Behandlung adhärieren konnten.

2.1.3 Sphäroide

Die Zellen wurden wie unter 2.1.1 beschrieben abgelöst. Es wurde eine Konzentration von 5000 Zellen/*well* in 200 μ l/*well* Medium auf eine mit Agarose beschichtete 96-*well* Platte (Sarstedt) gegeben und für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei wurde strengstens darauf geachtet, dass die Zellen keiner Erschütterung ausgesetzt wurden.

Für den Mediumwechsel wurden circa 100 μ l des Mediums vorsichtig abgesaugt und 100 μ l neues Medium dazu pipettiert.

2.1.3.1 Beschichtung der 96-*well*-Platten mit Agarose Gel

1,5 g Agarose (1,5%) (Sigma, Deisenhofen) wurden in 100 ml RPMI gegeben und 10 Minuten auf einem Magnetkocher unter ständigem Umrühren mit einem Rührfisch gekocht. Von dieser Mischung wurden 100 μ l in ein *well* pipettiert, danach wurde die Platte für 1 Stunde unter der Working-Bench zum Auskühlen offen stehengelassen. Anschließend wurden die Platten im Kühlschrank gelagert.

2.1.3.2 Größenbestimmung

Zur Bestimmung der Sphäroid-Größe wurden 10 definierte Sphäroide alle 2 Tage im Auflichtmikroskop gemessen. Da ein Sphäroid idealerweise eine kugelige Form hat, wurden pro Sphäroid zwei Querdurchmesser bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert gebildet. Aus den so ermittelten 10 Werten wurde dann wiederum ein Mittelwert gebildet.

2.1.4 Herstellung von Cytospins

4×10^4 Zellen wurden in einen Cytospineinsatz gegeben, der einem eingespannten Objektträger aufsitzt. Die Zellen wurden bei 500 RPM für 5 Minuten in einer Cytospin-Zentrifuge auf den Objektträger zentrifugiert. Danach wurden die Objektträger der Halterung entnommen und sofort mit Kaiser's Glycerin Gelatine (Merck, New Jersey, USA) eingedeckelt. Gelagert wurden die Objektträger im Dunkeln bei -20°C . Für die Auswertung wurden mindestens 200 Zellen in 3 verschiedenen Regionen ausgezählt.

2.2 Immunzytochemische Methoden

2.2.1 Fixierung

2.2.1.1 4,0 % Formaldehyd

Für die Zytozentrifugenpräparate, die nur fixiert werden mussten (z.B. Fluoreszenzmarkierte ON-Transfektion), wurden die Zellen auf in 2.1.1 beschriebene Weise abgelöst, in 1 ml PBS (s. Anhang) (1fach) gewaschen und für 2 Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 4,0 % Formaldehyd (PAA, Cölbe) resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen, wurden die Zellen anschließend nochmals dreimal mit PBS gewaschen und dazwischen bei 13000 RPM je für 2 Minuten zentrifugiert.

2.2.1.2 Aceton / Chloroform

Vor dem Färben wurden die aufgetauten und für 30 Minuten getrockneten Zytozentrifugenpräparate bzw. Sphäroide für die MIB1-Färbung erst 10 Minuten in Aceton (Krankenhaus-Apotheke) und danach 10 Minuten in Chloroform (Krankenhaus-Apotheke) fixiert und permeabilisiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Objektträger für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, um das Chloroform verdampfen zu lassen.

2.2.1.3 PBS (RNA-Isolierung)

Zellen für RNA-Isolierung wurden nach dem Ablösen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend jeweils für 5 Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2.1.4 Tissue Freezing Medium

Die Sphäroide wurden für die Gefrierschnitte mit möglichst wenig Medium in Jung Tissue Freezing Medium (Leica Instruments, Nussloch) pipettiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2 MIB-1-Färbung für humane Gefrierschnitte

MIB-1 (DAKO Cytomation, Hamburg) (1 µg/ml) wurde mit TBS / 10% FCS 1:75 verdünnt. Die wie unter Absatz 2.2.1.2 (Aceton / Chloroform) fixierten Zellen wurden mit 100 µl 1:75 verdünntem MIB-1-Primärantikörper eingedeckt und für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 3-5 Minuten mit 1:10 verdünnten TBS wurde 100 µl Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus-PO-IgG (Dianova, Hamburg) als erster Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser Antikörper wurde vorher mit TBS/10% FCS 1:50 verdünnt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Objektträger wiederum mit 1:10 verdünntem TBS dreimal gewaschen. Als zweiter Sekundärantikörper wurde Peroxidase-konjugierte Hase-anti-Ziege-IgG (DAKO) verwendet, der vorher auf gleiche Weise 1:50 verdünnt wurde. Nach 30 Minuten in der feuchten Kammer wurde der Objektträger nochmals mit 1:10 verdünntem TBS gewaschen (3x). Nach diesen Arbeitsschritten wurden die Sphäroid-Schnitte mit 2-3 Tropfen AEC (Vector Laboratories, USA) entwickelt. Nach 10 Minuten wurden diese wieder mit 1:10 verdünntem TBS (3x) und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Die Zellkerne wurden für 10 Minuten mit Hämalaun (Merck-EuroLab, Darmstadt) gegengefärbt und darauf für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach nochmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Kaiser's Glycerin Gelatine eingedeckelt.

2.3 Zellvitalitäts-Assays

2.3.1 MTT-Assay

2.3.1.1 Mit Oligonukleotiden behandelte Zellen im Monolayer

Mit dem MTT-Assay kann die Anzahl lebender, proliferierenden Zellen bzw. ihr Aktivitätsniveau gemessen werden (Mosmann, 1983).

Bei MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma, Deisenhofen) handelt es sich um ein gelbes Tetrazolium Salz, das von mitochondrialen Dehydrogenasen in lebenden Zellen zu blauem Formazan reduziert wird. Da Formazan nicht vollständig löslich ist, muss es durch DMSO (Dimethylsulfoxid) (Roth, Karlsruhe)

gelöst werden. Die Extinktion von Formazan kann bei $\lambda=550$ nm in einem Mikroplattenspektrometer bestimmt werden. Dabei wird der Anteil der Zellen bestimmt, der nach dieser Behandlung den normalen Stoffwechsel weiterhin aufrechterhalten hat. Da die optische Dichte zu der Anzahl lebender Zellen direkt proportional ist, besteht eine hohe Sensitivität. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (= 100%). Tote Zellen werden von diesem Assay nicht miterfasst (Mosmann, 1983).

Für die Messung wurden die 96-*well*-Platten über dem Waschbecken ausgeklopft und auf einem Papiertuch abgetrocknet. Anschließend wurde die Platte im PBS-Bad gewaschen, verpackt und für 5 Minuten bei 500 RPM auf dem Kopf zentrifugiert, um die Ablösung der nicht-adhärenenten Zellen zu erreichen. Als nächstes wurde die Platte wiederum über dem Waschbecken ausgeschüttelt, abgetrocknet und mit 100 $\mu\text{l/well}$ MTT behandelt, danach wurden die Zellen für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das MTT wurde vorher mit Rxx10+-Medium 1:20 verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte wiederum über dem Waschbecken ausgeklopft und abgetrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit 100 $\mu\text{l/well}$ DMSO behandelt und 10 Minuten auf einem Minishaker geschüttelt, um das Formazan zu lösen.

Die Extinktion der Zellen wurde mit dem Mikropplattenphotometer bei $\lambda=550$ nm gemessen.

2.3.1.2 Mit Chemotherapeutika behandelte Zellen im Monolayer

Bei diesen Zellen läuft das Assay in ähnlicher Weise ab. Der einzige Unterschied besteht darin, dass hier der Waschschriff mit PBS und die Zentrifugation entfallen, die Zellen also direkt mit MTT behandelt werden.

2.3.1.3 MTT-Test im Sphäroid-Modell

Als erstes wurden die Sphäroide einzeln mit einer Pasteurpipette abgepickt und auf eine neue 96-*well*-Platte gesetzt, welche mit Agarose beschichtet und mit je 100 μl Rxx10+/*well* gefüllt wurde.

Danach wurden die Sphäroide mit 10 $\mu\text{l/well}$ MTT (unverdünnt) behandelt und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Sphäroide abgepickt und einzeln, ohne Medium, auf eine neue unbeschichtete 96-*well*-Platte gesetzt. Die Sphäroide wurden mit 100 $\mu\text{l/well}$ DMSO lysiert und für 10 Minuten auf einem Minishaker geschüttelt. Anschließend wurden die Sphäroide bei $\lambda=550$ nm im Photometer gemessen.

2.3.2 Kristallviolett-Assay

Der Farbstoff Kristallviolett färbt Proteine an und kann damit nur die Quantität eines Proteins anzeigen, nicht aber zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden. Da die toten Zellen nicht adhären sind, werden diese bei dem Waschgang in PBS abgelöst und dadurch von dem Assay nicht mehr miterfasst. Die Extinktion wird bei $\lambda=570$ nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug $\lambda=630$ nm. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (= 100%).

Bei diesem Assay wurden die 96-*well*-Platten über dem Waschbecken ausgeklopft und auf einem Papiertuch abgetrocknet. Daraufhin wurden sie im PBS-Bad gewaschen, verpackt und 5 Minuten bei 500 RPM auf dem Kopf zentrifugiert, damit sich tote Zellen lösen konnten. Danach wurden die Zellen wiederum ausgeklopft und abgetrocknet. In jedes *well* wurde 100 μ l Kristallviolett-Lösung gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Platten ausgeklopft, senkrecht unter fließendes Leitungswasser gehalten, vorsichtig ausgewaschen, auf einem Papiertuch gut getrocknet und in einem Minishaker geschüttelt.

2.4 Molekularbiochemische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Düsseldorf) (siehe Anhang) durchgeführt.

Zuerst wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer (versetzt mit β-ME) lysiert, in einen QIAshredder[®] (Qiagen) gegeben und 2 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei 13000 RPM zentrifugiert. Dem Filtrat wurde 350 µl Ethanol zugesetzt, das Gemisch wurde auf eine RNeasy[®]-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 9200 RPM zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, die Säule mit 500 µl RW1-Puffer gewaschen und wiederum für 15 Sekunden bei 9200 RPM zentrifugiert. Nachdem auch dieses Filtrat verworfen wurde, wurde die Säule mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 15 Sekunden bei 9200 RPM zentrifugiert, danach wurde das Filtrat wiederum verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, jetzt wurde aber die Säule für 2 Minuten bei 11700 RPM zentrifugiert, das Filtrat wieder verworfen und nochmals für 1 Minute die Säule bei 11700 RPM trocken zentrifugiert.

Nachfolgend wurde die Säule in ein 1,5 ml Auffanggefäß überführt und zweimal mit 50 µl 80°C warmem, RNase-freiem Wasser eluiert. Nach dieser Eluation wurde jeweils die Säule für 1 Minute bei 9200 RPM zentrifugiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben auf Eis gelagert.

Zur Quantifizierung wurden die Proben 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt (10 µl Probe + 90 µl DEPC-Wasser; Dreifachansatz)

2.4.1.1 Quantifizierung

Alle Proben wurden im Spektralphotometer bei der Absorption von 260 nm, $1,0 = 40\mu\text{g/ml}$ gemessen. Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass der Quotient A_{260}/A_{280} (RNA/DNA) größer als 1,5 war (optimal ist 2,0) und die Extinktion zwischen 0,2 und 1,2 lag.

Jede RNA-Probe wurde dreifach 1:10 verdünnt gemessen. Daraus wurde der Mittelwert der Konzentration bestimmt. Zum Null-Abgleich wurde Wasser benutzt.

Zur weiteren Verarbeitung wurde eine RNA-Konzentration von 700 ng / 7 µl erstellt, als Volumen wurden 40 µl eingesetzt. Daraus ergibt sich eine Konzentration von 4000 ng / 40µl. Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 40 µl aufgefüllt.

2.4.2 DNA-Verdau

Zuerst wurde ein Master-Mix, bestehend aus 1 μ l DNase (Invitrogen, Karlsruhe), 1 μ l Puffer (Invitrogen) und 1 μ l Merck-Wasser pro Probe, hergestellt. Nun wurden 7 μ l RNA-Probe (700 ng / 7 μ l) und 3 μ l Master-Mix in ein PCR-Strip (Sarstedt) gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. DNase verdaut die störende DNA der Probe. Nach 15 Minuten wurde die DNase mit je 1 μ l EDTA (25 nM) (Invitrogen) abgestoppt und für 10 Minuten bei 65 °C im Cyclyer (i-Cyclyer, Bio-rad, München) inkubiert.

2.4.3 Reverse Transkription (RT-PCR)

Master-Mix 1: 1 μ l Random-Primer (Invitrogen)

4 μ l dNTP-Mix (Invitrogen) (je 10 nM dATP, dGTP, dCTP, dTTP → da
1 :4 verdünnt Endkonzentration 2,5 nM)

→ pro Probe

Master-Mix 2: 4 μ l First Strand Puffer (Invitrogen)

2 μ l 0,1 M DTT (Invitrogen)

1 μ l RNase Out (Invitrogen)

→ pro Probe

7 μ l der RNA-Verdau-Probe wurden in den Deckel eines PCR-Strips und 5 μ l des Master-Mix in das zugehörige Gefäß pipettiert. Die Probe wurde für 1 Minute bei 1000 RPM und 4 °C herunterzentrifugiert und für 5 Minuten bei 65 °C im Cyclyer inkubiert.

Danach wurden 7 μ l des Master-Mix 2 in den Deckel des Strips pipettiert und nochmals für 1 Minute bei 4 °C herunterzentrifugiert. Die Proben wurden nun für 10 Minuten bei 25 °C (Streckung der Random-Primer) und für 2 Minuten bei 42 °C (Hybridisierung der Primer) inkubiert. Nach diesem Schritt wurde ein 1 μ l Superscript II (Invitrogen) in den Deckel pipettiert, 1 Minute bei 1000 RPM und 4°C herunterzentrifugiert, für 50 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

2.4.4 PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Das Ziel der PCR ist die Vervielfältigung geringer DNA-Mengen einer gewünschten Sequenz. Hierbei wird der DNA-Doppelstrang hitze-induziert aufgespalten und Primer, die komplementär zur Anfangs- und Endsequenz des zu amplifizierenden Abschnittes sind, angelagert. Durch eine hitzestabile Taq-Polymerase werden die jeweiligen komplementären Nukleotide (ATP, CTP, GTP und TTP) verknüpft und damit ein neuer Strang in 5' → 3'-Richtung synthetisiert. Als Resultat entsteht aus jedem Einzelstrang ein neuer DNA-Doppelstrang. Theoretisch verdoppelt sich also nach jedem Zyklus die DNA-Menge.

Master-Mix: 5 µl PCR-Puffer
 (Invitrogen) 1,5 µl MgCl₂ (50 mM)
 4 µl dNTP (je 2,5 mM)
 0,5 µl Primer forward (100 µM) (Ki-67 3'-Primer forward)
 0,5 µl Primer reverse (100 µM) (Ki-67 3'-Primer reverse)
 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 mit Merck-Wasser auf 48 µl auffüllen

→ pro Probe

Je 2 µl der RT-Proben wurden in ein Gefäß des PCR-Strip und 48 µl des Master-Mix in den Deckel pipettiert. Die Proben wurden durch Herunterschütteln oder Herunterzentrifugieren (1 Minute, 1000 RPM, 4°C) mit dem Master-Mix vermischt.

Die Primer wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Sequenzen: Ki-67-3'-forward: 5'-CTT CGC GTC TGG AGC GCA GG-3'

Ki-67-3'-reverse: 5'-AAG AGG CTG CGC TGC ATG CC-3'

PCR-Protokoll für Ki-67 3'-Primer:

1 x bei 94°C für 2 Minuten (Denaturierung der Doppelstränge in Einzelstränge)

35 x → Schritt 1: für 15 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung der Doppelstränge in Einzelstränge)

Schritt 2: für 45 Sekunden bei 60 °C (Hybridisierung / Annealing der Primer)

Schritt 3: für 60 Sekunden bei 72 °C (Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase
 → DNA-Synthese)

1 x bei 72°C für 3 Minuten

2.4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung

Zur Überprüfung, ob die PCR erfolgreich war, wurden stichprobenartig einige Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 10 µl der amplifizierten Probe mit 2 µl Probenpuffer (s. Anhang) vermischt und in eine Tasche des Gels gegeben. Um die Wanderstrecke zu überprüfen, wurde 1 µl DNA-Leiter mit 9 µl Wasser und 2 µl Probenpuffer vermischt und auch auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden 10 µl Wasser + 2 µl Probenpuffer verwendet. Die Proben liefen für 30 Minuten bei 80 V (bzw. 400 mA).

Ausgewertet wurde das Gel mit dem Gerät BioDoc Analyze (Biometra, Göttingen)

2.4.5 Quantitative Realtime-PCR

Um die Herunterregulation der RNA mengenmäßig bestimmen zu können, wurde eine quantitative PCR mit der zuvor hergestellten cDNA durchgeführt. Hierbei wurde ein hochspezifischer fluoreszierender DNA-Interkalator (SYBR-Green) verwendet, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz, der vom Gerät gemessen werden kann und mit Standardreihen bekannter Molekülzahlen (10^3 - $10^7/\mu\text{l}$) verglichen wird. Durch diese Methode kann selbst eine kleine DNA- bzw. indirekt auch RNA-Menge einer einzelnen Probe bestimmt werden. Jede Probe wurde dreifach bestimmt, um Pipettier- oder Amplifikationsfehler zu minimieren.

Bei der Auswertung wurde die Menge der Kopien der Ki-67-mRNA mit der von Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verglichen. GAPDH ist ein sogenanntes *Housekeeping*-Enzym, welches zur Normalisierung der Ki-67-mRNA verwendet wird. Die Anzahl der Kopien der Ki-67-mRNA wurde also zu der GAPDH-mRNA in Relation gesetzt und somit die Herunterregulation bestimmt.

Master-Mix: 5 μ l 10x PCR-Puffer (KCL, Tris-HCl) (Konzentration 1fach im Mix)
2 μ l dNTP-Mix (200 μ M)
3 μ l MgCl₂ (3 mM)
0,25 Hot GoldStar (PCR-Enzym, 0,025 U/ μ l)
1,5 μ l Primer forward (300 nM) (Ki-67 3'-Primer bzw. GAPDH)
1,5 μ l Primer reverse (300 nM)(Ki-67 3'-Primer bzw. GAPDH)
1,5 μ l SybrGreen 1/2000 in DMSO gelöst (1 in 66000)
mit Merck-Wasser auf 48 μ l auffüllen

alle Reagenzien von Eurogentec (Seraing, Belgien)

→ pro Probe (zusätzlich für 1 x Wasser und 5 x für Standards (10^7 - 10^3); für alle Proben Dreifach-Ansatz)

Es wurden je 48 μ l des Master-Mix und 2 μ l der RT-PCR-Probe bzw. des Standards (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 Amplicons) oder des Wassers in einen *tube* einer 96-*tube*-Platte (Sarstedt) gegeben. Zum Schluss wurden die Luftblasen hochgeklopft, und die Platte wurde mit Capstrips verschlossen.

Sequenzen: Ki-67 3'-Primer siehe PCR

GAPDH forward: 5'-AAC AGC GAC ACC CAC TCC TC-3'

GAPDH reverse: 5'-GGA GGG GAG ATT CAG TGT CCT-3'

Protokoll für Quantitative PCR:

1 x bei 95°C für 10 Minuten (Enzymaktivierung)

50 x → bei 95°C für 15 Sekunden (Denaturierung der Doppelstränge in Einzelstränge)

→ bei 60°C für 60 Sekunden (Annealing der Primer)

Cycler von Gene Amp 5700 Sequence Detection System, Applied BioSystems, Foster City, USA

2.5 Transfektionsversuche

2.5.1 Oligonukleotide

Für unsere Versuche wurden thiolierte Oligonukleotide verwendet, die von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) und von Metabion (Martinsried) durch High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) aufgereinigt wurden. Die Antisense-ON waren gegen das Start-Codon des Ki-67-Proteins gerichtet, damit wurden beide Isoformen des Proteins erreicht. Diese Sequenz hatte sich im Vergleich von 13 neu entworfenen AS-ON als eine der beiden effektivsten erwiesen (Kausch et al., 2003). Zur Kontrolle wurde Nonsense(NS)-Oligonukleotide verwendet. Die gelieferten Oligonukleotide wurden mit Merck-Wasser gelöst, wobei die hergestellte Konzentration 500 nM betrug. Danach wurden die ON bei -20°C gelagert. Homologien zu anderen Genen wurden durch *Blast search software*, welche Sequenzen mit mehr als sieben korrespondierenden Basen sucht, evaluiert.

Oligonukleotid	Sequenz
AS	5'-ACC AGG CGT CTC GTG GGC CAC AT-3'
NS	5'-AGT ACT CAG TAA CGC CTA CGG TAA G-3'
NS-FITC	FITC-5'-AGT ACT CAG TAA CGC CTA CGG TAA G-3'

2.5.2 siRNA

Die siRNA wurde von IBA (Göttingen) synthetisiert. Zur Kontrollmessung wurden beide Einzelstränge (Sense und Antisense) der doppelsträngigen siRNA verwendet. Die gelieferte siRNA wurde in DEPC-Wasser gelöst. Es wurde die Konzentration 100 μM erstellt. Gelagert wurde die RNA bei -20°C .

RNA	Sequenz
AS	5'-GGC GUC UCG UGG GCC ACA UTT-3'
S	5'-AUG UGG CCC ACG AGA CGC CTT-5'
siRNA	AS- und S-Strang aneinandergelagert
Cy3-siRNA	5'-markierte siRNA

2.5.3 Transfektion

2.5.3.1 Oligonukleotide und siRNA am Monolayer mit Tfx-20

Für die Transfektion wurden folgende Zellen und Reagenzien benötigt: $0,5 \times 10^6$ Zellen/Kulturflasche (25 cm^2 Wachstumsoberfläche) in 5 ml Medium bzw. 5000 Zellen/well in 100 μl Medium auf einer 96-well-Platte. Nach der Aussaat der Zellen wurden diese für 24 Stunden bei 5% CO_2 inkubiert, damit die Zellen adhäreren konnten.

Die Oligonukleotide, die siRNA und das Tfx-20 (Promega, Mannheim) wurden mit RPMI (Oligonukleotide) oder DEPC-Wasser (siRNA) entsprechend der benötigten Konzentrationen vorverdünnt. Aus den vorverdünnten Proben wurde die Mischung aus Oligonukleotiden oder siRNA mit Tfx-20 hergestellt. Die Ratio von ON zu Tfx-20 betrug 1 mol : 4 mol bzw. siRNA zu Tfx-20 1 mol : 2 mol. Das Volumen wurde mit RPMI aufgefüllt. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zeitspanne diente dazu, dass sich das Tfx-20 um die Oligonukleotide legen konnte.

Als nächstes wurden die Zellen behandelt. Dabei wurden als Volumen 2,5 ml für eine Kulturflasche und 50 μl /well für eine 96-well-Platte eingesetzt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 5 % CO_2 und 37°C inkubiert. Anschließend wurden 7,5 ml bzw. 150 μl Medium zugesetzt, und die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 5 % CO_2 und 37°C inkubiert.

Um eine erfolgreiche Transfektion zu erreichen, musste beachtet werden, dass ca. 80 % der Zellen konfluent sind, da für optimale Ergebnisse die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase sein müssen.

2.5.3.2 Oligonukleotide und siRNA am Monolayer mit Metafectene

Zu Beginn wurde genauso wie bei der Transfektion mit Tfx-20 vorgegangen. Als erstes wurden wiederum die Oligonukleotide oder die siRNA mit RPMI bzw. DEPC-Wasser vorverdünnt. Dazu mussten zwei Lösungen hergestellt werden, eine mit Oligonukleotiden bzw. siRNA in 50 μl RPMI bzw. DEPC-Wasser und eine mit Metafectene (Biontex, München) in 50 μl RPMI bzw. DEPC-Wasser. Beide Lösungen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei ergab sich ein Lipid : DNA-Verhältnis von 2 μl : 1 μg . Um die Zellen zu behandeln, wurde diese Mischung in 2 ml RPMI zu den Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 2 Stunden wurde 8 ml Rxx10+ dazugegeben und ebenfalls bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.6 Kombinations-Behandlung mit Antisense-ON und Chemotherapeutika

Bei unseren Kombinations-Versuchen wurden drei verschiedene Chemotherapeutika verwendet: die Platinverbindung Cisplatin, der Antimetabolit Gemcitabin und das Taxan Paclitaxel. Die Chemotherapeutika greifen an verschiedenen Punkten in den Mechanismus der Zellteilung ein und zeigen daher ein unterschiedliches Wirkungsspektrum.

Platinverbindungen (Cis-Platin):

Cisplatin stellt einen planaren Komplex dar, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden und zwei NH₃-Gruppen gebunden hat (Summenformel: H₆Cl₂N₂Pt). Diese Verbindung wird intrazellulär aktiviert, wobei die Chloridliganden durch Wasser ersetzt werden (Aquiliganden).

Cisplatin wirkt durch Vernetzung von DNA-Strängen. Dabei reagiert es bevorzugt mit dem N-7 von Guanin und Adenin. So entstehen Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzungen) und zwischen zwei benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzungen).

Die Wirkung von Cisplatin ist phasenunspezifisch und wirkt daher besonders auf schnell proliferierende Zellen.

Hauptanwendungsgebiete des Cisplatins sind Tumoren des Urogenitaltraktes (besonders Hoden- und Ovarialtumoren), Bronchialkarzinome und Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.

Für die Versuche wurde „Platinex-Lösung“ (Cis-Platin, 0,5 mg/ml) von Bristol-Myers Squibb (München) eingesetzt.

Antimetabolite (Gemcitabin):

Der Antimetabolit Gemcitabin (Difluordesoxycytidin, Summenformel: C₉H₁₁F₂N₃O₄), welches ein Pyrimidinanalogon darstellt, greift in die Pyrimidinsynthese ein. Somit hemmt es die DNA- und RNA-Synthese. Es unterscheidet sich durch zwei Fluoratome in der Desoxyribose von Desoxycytidin und wird dadurch nach Bildung des Triphosphates als „falsche“ Base in die DNA eingebaut. Dies führt zum Abbruch der DNA-Synthese.

Antimetabolite sind phasenspezifische Zytostatika, die vor allem in der S-Phase des Zellzyklus wirken.

Gemcitabin wird klinisch u.a. bei Pankreaskarzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Harnblasenkarzinomen als Zytostatikum verwendet.

In den Versuchsreihen wurde das Gemcitabinhydrochlorid „Gemzar 1000“ (Summenformel: $C_9H_{12}ClF_2N_3O_4$; 40 mg/ml) von Lilly (Bad Homburg) eingesetzt.

Paclitaxel:

Taxane gehören zu einer Gruppe relativ neuer Zytostatika. Paclitaxel (Summenformel $C_{47}H_{51}NO_{14}$) ist ein Alkaloid aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*). Mittlerweile wird Paclitaxel aber aus verwandten Alkaloiden schnell wachsender Eiben oder aus Pilzkulturen partialsynthetisch hergestellt.

Paclitaxel greift am Tubulin an und bewirkt hier eine Stabilisierung der Mikrotubuli und verhindert damit eine Depolymerisation. Dadurch wirkt es als Mitosegift, da der für die Mitose wichtige dynamische Umbau des mikrotubulären Apparates blockiert wird. Damit ist Paclitaxel ein phasenspezifisches Zytostatikum, welches in der Mitose-Phase des Zellzyklus angreift. Des Weiteren wird ein proapoptotischer Effekt von Paclitaxel, welcher durch eine Phosphorylierung von Bcl-2 hervorgerufen wird, diskutiert (Haldar et al., 1996).

Dieses Zytostatikum wird bei Ovarial-, Mamma- und nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinomen eingesetzt.

Für die Versuche wurde das Zytostatikum „Taxol“ (6 mg/ml) von Bristol-Myers Squibb (München) verwendet.

Kombinationsbehandlung

Bei der Kombination der AS-Behandlung mit Chemotherapeutika wurden 5000 Zellen / well in je 100 µl Medium auf eine 96-well-Platte ausgesät und wie bei der Chemotherapeutika-Behandlung inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit AS- (370 nM) bzw. NS-Oligonukleotiden behandelt und für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde wiederum das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Zytostatika behandelt und für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Ausgewertet wurde die Zellviabilität mittels des MTT-Assay (s.o.).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zellviabilitäts-Assays erfolgte mittels des Mann-Whitney-*U*-Tests für zwei unabhängige Stichproben. Für die Auswertung wurde das Programm SPSS[®] für Windows[®] benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Monolayer

3.1.1 Ki-67 Antisense-Oligonukleotid-Titration

Vorab wurde eine Titration von AS-Oligonukleotiden, Kontrollen sowie dem Transfektionsmedium Tfx an MCF7- und J82-Zellen durchgeführt, um die Sensibilität dieser Zellen auf diese Behandlung darzustellen. Für die Zelllinie RT4 lag diese Titration schon vor (Kausch et al., 2003). Bei unseren Versuchen wurden die Zellen mit den AS-Oligonukleotiden bzw. den Kontrollen für 24 Stunden behandelt und danach die Herunterregulation der mRNA des Ki-67-Proteins mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

3.1.1.1 MCF7

In *Abbildung 1* ist zu erkennen, dass durch die Behandlung der MCF7-Zellen mit AS-Oligonukleotiden die mRNA des Ki-67-Proteins im Vergleich zu unbehandelten Zellen (=100%) bei den Konzentrationen 120 und 370 nM deutlich herunterreguliert wurde, wobei die Herunterregulation bei der Konzentration 120 nM mit ca. 55% am stärksten war. Bei der Konzentration von 40 nM sah man eine leichte Herunterregulation um ca. 20%, allerdings zeigte sich ein ähnlicher Effekt bei allen Kontrollen.

Betrachtet man die NS-Kontrolle, dann war bei der Konzentration 120 nM keine Abnahme, sondern sogar eine Zunahme der Ki-67-mRNA um ca. 15% zu beobachten. Bei 370 nM kam es zu einer Herunterregulation um ca. 20%. Die Tfx-Kontrolle zeigte bei 120 nM eine Herunterregulation um ca. 20% und bei 370 nM eine Zunahme der mRNA um ca. 20% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

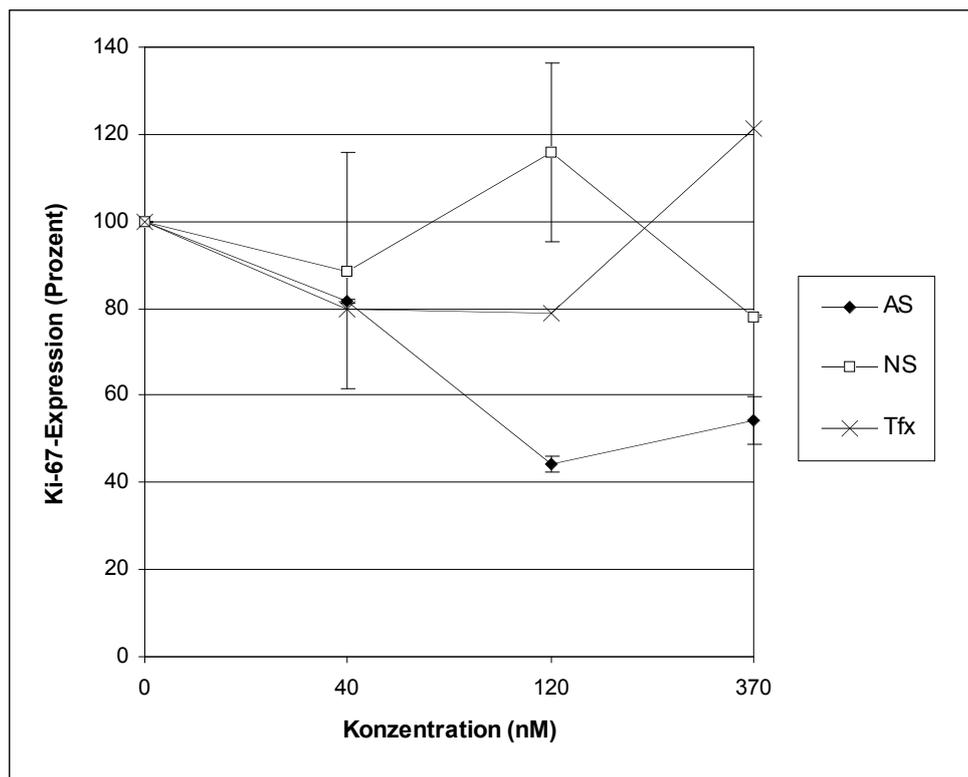


Abbildung 1 Titration von verschiedenen Konzentrationen Ki-67-AS-Oligonukleotiden und den Kontrollen Nonsense und Tfx-20 an MCF7-Zellen. Als Referenzwert dient eine unbehandelte Probe. Alle Werte wurden 3-fach bestimmt.

3.1.1.2 J 82

Der gleiche Transfektionsversuch wurde auch an J82-Zellen durchgeführt. Hier wurde für die Auswertung die mRNA-Expression des Zielgens Ki-67 zu der eines Referenzgens (Housekeeping-Gen), welches in allen Zellen konstant gebildet wird, in Relation gesetzt. Wie in *Abbildung 2* dargestellt, war bei der Behandlung mit verschiedenen AS-Oligonukleotiden eine dosisabhängige Herunterregulation der Ki-67-mRNA, welche bei 370 nM am stärksten war, zu erkennen. Bei der Konzentration von 1000 nM kam es wieder zu einer Zunahme der mRNA-Expression (Daten nicht dargestellt). Gleichzeitig konnte aber auch bei der Kontrollbehandlung mit NS-Oligonukleotiden eine, wenn auch nicht so starke, dosisabhängige Abnahme des mRNA-Levels festgestellt werden.

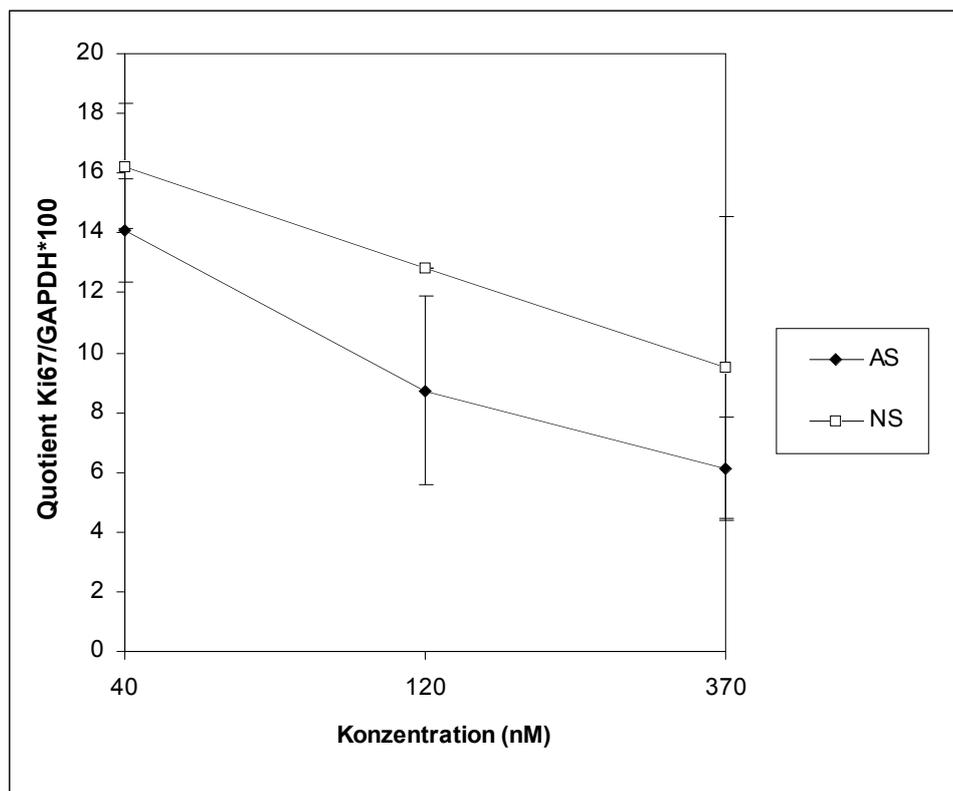


Abbildung 2 Titration verschiedener Konzentrationen Ki-67-AS- und NS-Oligonukleotiden an J82-Zellen. Aufgetragen wurde der Quotient der Ki-67-Expression und die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH.

3.1.2 Zellviabilitäts-Assay bei Oligonukleotid-Behandlung

Zellviabilitäts-Assays sind eine einfache Methode, um den Effekt der diversen Behandlungen (AS-Behandlung, siRNA und Kombinationsbehandlung) auf die Zellproliferation auszuwerten. Bei unseren Versuchen wurden zwei unterschiedliche Assays verwendet, die vom Versuchsablauf sehr ähnlich sind: das MTT- und das Kristallviolett-Assay. In unserem Labor musste das Kristallviolett-Assay im Gegensatz zu dem MTT-Assay erst neu eingeführt werden. Zur Etablierung wurden Zellen mit AS-Oligonukleotiden, NS-Oligonukleotiden als Kontrolle und Gemcitabin behandelt und mit dem im Labor standardmäßig genutztem MTT-Assay verglichen.

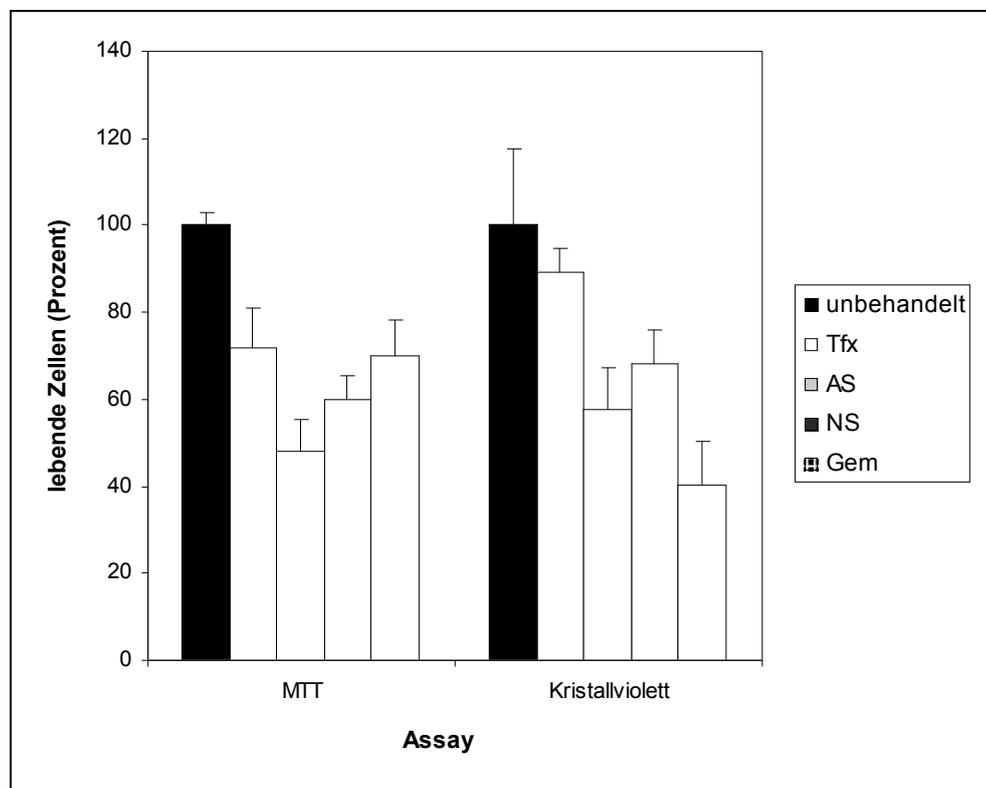


Abbildung 3 Vergleich MTT- und Kristallviolett-Assay an mit Oligonukleotiden behandelten MCF7-Monolayer. Gemessen wurde 48h nach der Behandlung. Verglichen wurde die Behandlung mit AS-ON (370 nM) und den Kontrollen Tfx-20 (740 nM), NS -ON (370 nM) und Gemcitabin (40 µg/ml). Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

Abbildung 3 zeigt, dass die Ergebnisse für beide Assays tendenziell ähnlich sind. Lediglich bei der Behandlung mit Gemcitabin kann eine stärkere Abnahme von lebenden Zellen beobachtet werden. Allerdings wurden bei dem statistischen Vergleich beider Assays signifikant unterschiedliche Werte ermittelt ($p \leq 0,001$). Es konnte weiterhin eine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität von den mit AS-behandelten Zellen im Vergleich mit unbehandelten und mit Tfx behandelten Zellen dargestellt werden

($p \leq 0,001$). Gleichzeitig wurde aber auch eine deutliche Reduktion der mit NS-behandelten Zellen beobachtet. Im Vergleich von den AS- und NS-behandelten Zellen liegt jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p \leq 0,001$).

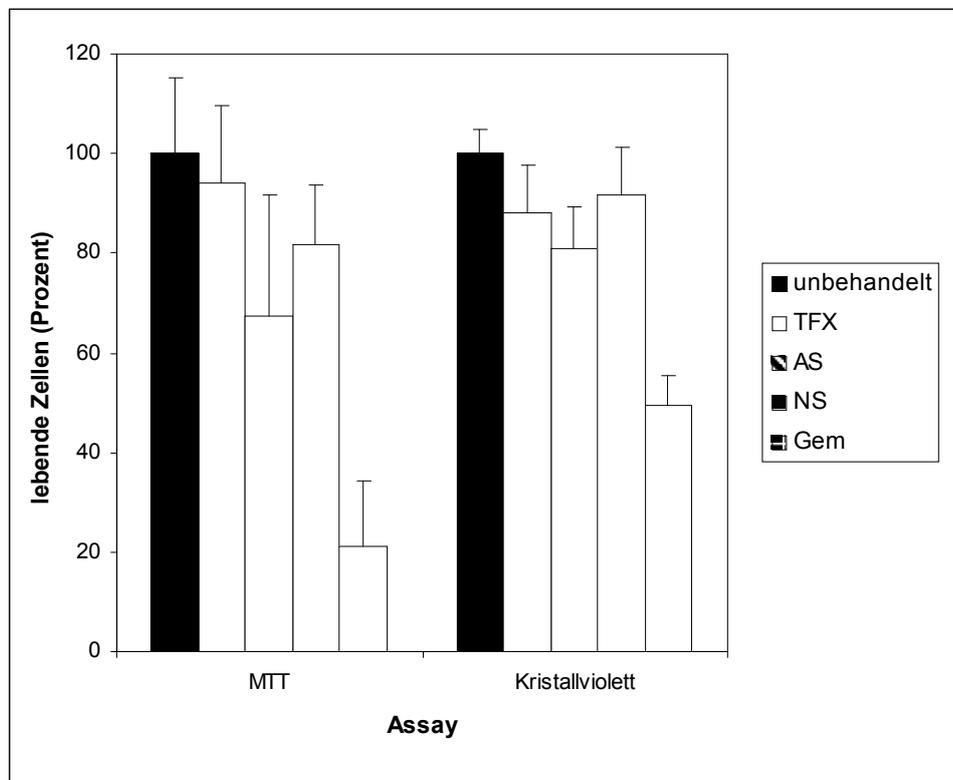


Abbildung 4 Vergleich MTT- und Kristallviolett-Assay an mit Oligonukleotiden behandelten J82-Monolayer. Gemessen wurde 48h nach der Behandlung. Verglichen wurde die Behandlung mit AS-ON (370 nM) und den Kontrollen Tfx-20 (740 nM), NS -ON (370 nM) und Gemcitabin (40 µg/ml). Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

Auch bei der Zelllinie J82 war nach 48 Stunden bei beiden Assays eine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität der mit Antisense-ON behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($p \leq 0,001$), bei nur geringer Reduktion in der NS-Kontrolle, zu beobachten (*Abbildung 4*). Bei dem Vergleich von den Zellen, welche mit AS- und NS-Oligonukleotiden behandelt wurden, zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$ Kristallviolett-Assay, $p \leq 0,008$ MTT). Die Gemcitabin-Kontrolle ergab eine deutliche Reduktion um 80%.

Beim Kristallviolett-Assay war insgesamt eine geringere Reduktion der mit AS behandelten Zellen im Vergleich zum MTT-Assay zu beobachten. Auch die ON-Kontrollen und die Gemcitabin-Kontrolle zeigten keinen so deutlichen Rückgang. Auch hier war bei den mit AS-, NS- und Gemcitabin-behandelten Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied bei beiden Assays zu sehen (p zwischen 0,002 und $\leq 0,001$).

Auffallend war eine durchgehend größere Streuung der Werte mit maximal 24,51% bei dem MTT-Assay im Vergleich zum Kristallviolett-Assay (maximal 9,33%).

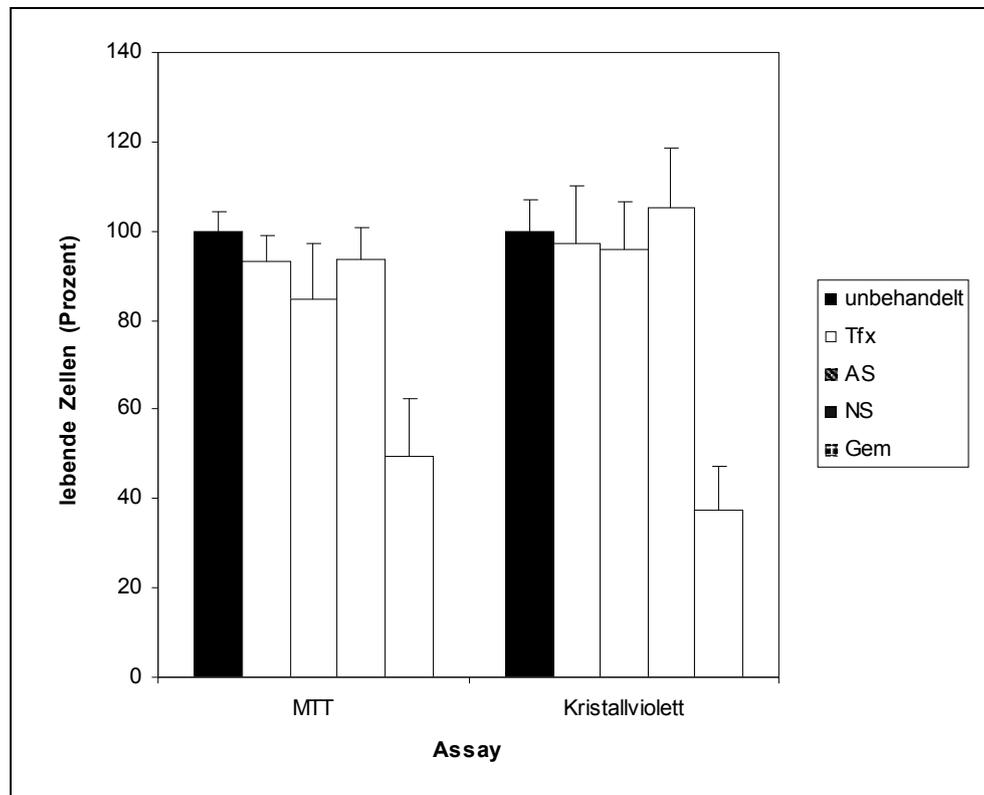


Abbildung 5 Vergleich MTT- und Kristallviolett-Assay an mit Oligonukleotiden behandelten RT4-Monolayer. Gemessen wurde 48h nach der Behandlung. Verglichen wurde die Behandlung mit AS-ON (370 nM) und den Kontrollen Tfx-20 (740 nM), NS -ON (370 nM) und Gemcitabin (40 µg/ml). Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

Bei der Antisense-Behandlung der RT4-Zellen war keine signifikante Reduktion der Zellviabilität zu beobachten (*Abbildung 5*). Dahingegen zeigte sich bei der Gemcitabin-Kontrolle (40 µg/ml) auch bei dieser Zelllinie eine deutliche Reduktion der Zellviabilität. Im Vergleich beider Assays konnte wiederum bei den mit Gemcitabin behandelten Zellen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p \leq 0,001$).

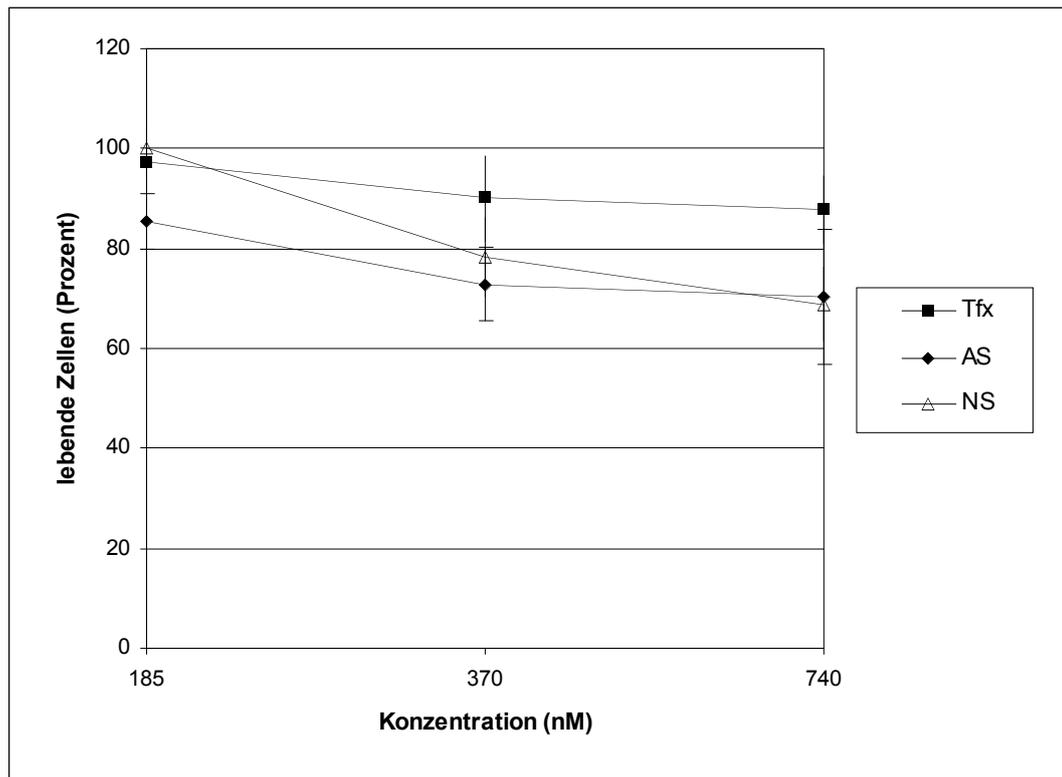


Abbildung 6 MCF7: Vergleich von Behandlungen mit verschiedenen ON- und Tfx-20-Konzentrationen (doppelte ON-Konzentration). MTT-Assay nach 48h. Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

Die standardisierte, etablierte Konzentration, die normalerweise bei der ON-Behandlung benutzt wurde, beträgt 370 nM. Orientiert an dieser Konzentration wurde die halbe (185 nM) und die doppelte Konzentration (740 nM) mit der Standardkonzentration verglichen (Abbildung 6). Hierbei war zu beobachten, dass es bei 185 nM im Vergleich zu 370 nM zu keiner deutlichen Abnahme der Zellviabilität kam. Bei der doppelten Konzentration (740 nM) war bei der NS-Behandlung eine minimal stärkere Reduktion im Vergleich zur AS-Behandlung zu beobachten.

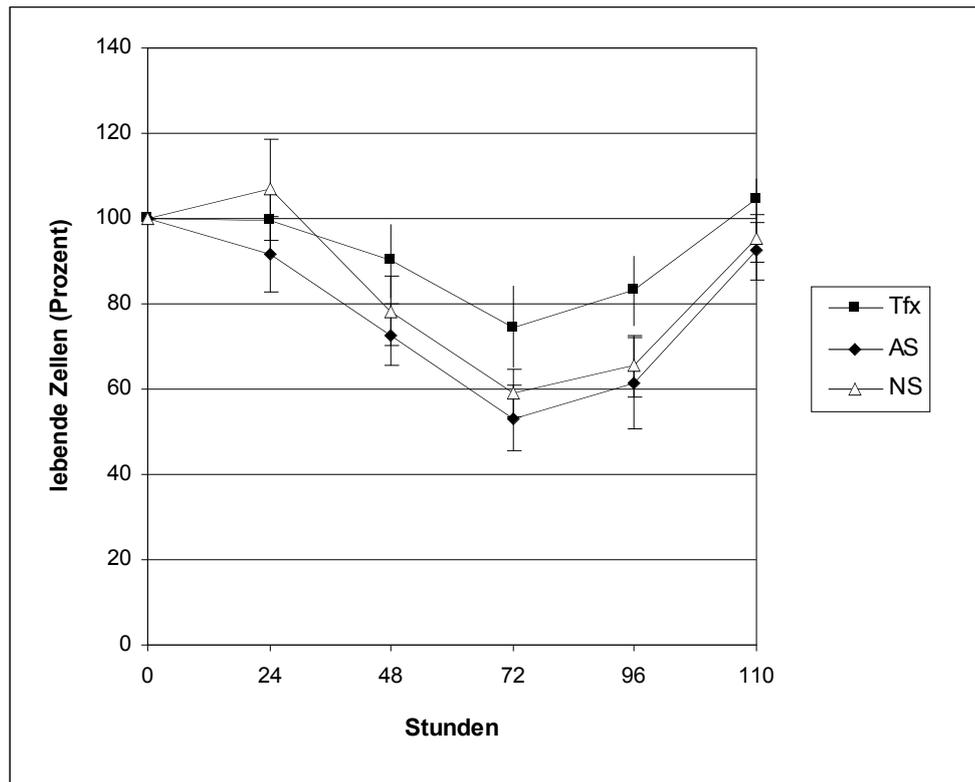


Abbildung 7 MCF7: MTT-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h, 96h und 110h) nach Behandlung. ON-Konzentration 370 nM, Tfx-20-Konzentration 740 nM. Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

Des Weiteren wurde die Zellviabilität zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung untersucht (siehe *Abbildung 7*). Nach 24 Stunden kam es zu keiner deutlichen Herunterregulation der mit AS behandelten Zellen. Nach 72 Stunden zeigte sich parallel bei allen Zellreihen die stärkste Reduktion. Nach 96 Stunden nahm die Zellviabilität wieder zu. Auffällig war, dass auch die NS-Kontrolle ab Tag 2 (48h) eine deutliche Herunterregulation aufwies.

3.1.3 Kombinationsbehandlung mit Oligonukleotiden und Chemotherapeutika

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Kombination von Antisense-Behandlung gegen das Ki-67-Protein mit verschiedenen Chemotherapeutika (Cis-Platin, Gemcitabin und Taxol) untersucht. Mit MCF 7 wurde eine Zelllinie eingesetzt, die in Vorversuchen eine hohe mRNA- bzw. Proteinexpression von Ki-67 aufwies (Kausch et al., 2003). In Vorversuchen (Daten nicht dargestellt) wurden die optimalsten Chemotherapeutikadosen in der Monotherapie an allen verwendeten Zelllinien austitriert. An diesen Daten erfolgte die Orientierung bei der Kombinationstherapie.

3.1.3.1 Kombinationsbehandlung von MCF7 mit Gemcitabin

Wie in *Abbildung 8* dargestellt, wurden bei den Zellen, welche zuerst für 48 Stunden mit AS-Oligonukleotiden und darauf für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Gemcitabin behandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität ersichtlich. Lediglich bei der Gemcitabin-Konzentration 5 mg/ml zeigte sich, dass es bei der Kombinationsbehandlung zu einer Reduktion der Zellviabilität kommt (statistisch jedoch nicht signifikant).

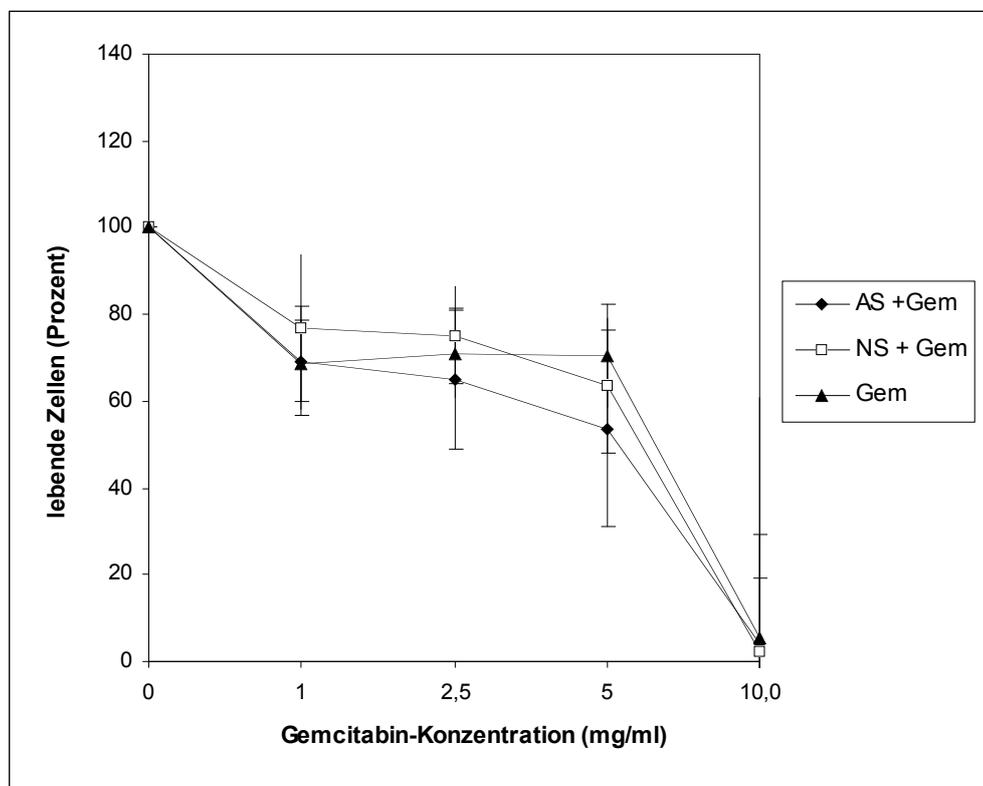


Abbildung 8 Kombinationsbehandlung mit AS-, NS-ON (370 nM, 48h Behandlung) und Gemcitabin (24h Behandlung) von MCF7. Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

3.1.3.2 Kombinationsbehandlung von MCF7 mit Taxol

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der Kombination von AS-, NS-Oligonukleotiden und Taxol ist in *Abbildung 9* dargestellt, dass die mit AS-behandelten Zellen bei Taxol-Konzentrationen von 5, 10 und 25 $\mu\text{g/ml}$ durchgehend keine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität zeigten. Teilweise war sogar eine Zunahme der Zellviabilität zu beobachten. Im Gegensatz zu mit AS-ON behandelten Zellen zeigten beide Kontrollen, NS-ON und Taxol allein, eine Reduktion der Zellviabilität.

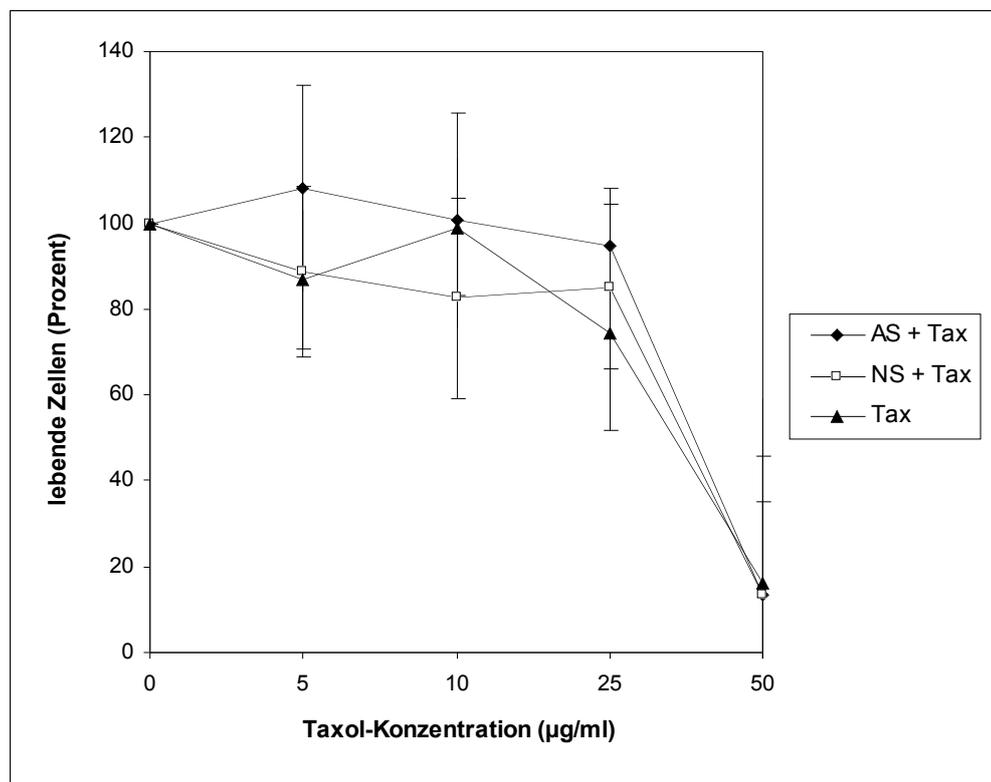


Abbildung 9 Kombinationsbehandlung mit AS-, NS-ON (370 nM, 48h Behandlung) und Taxol (24h Behandlung) von MCF7. Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

3.1.3.3 Kombinationsbehandlung von MCF7 mit Cis-Platin

Bei der Kombinationsbehandlung mit Cis-Platin zeigte sich bei Cis-Platin-Konzentrationen von 0,5, 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ durchgehend die stärkste Reduktion (statistisch signifikant, $p \leq 0,001$) der Zellviabilität bei den mit AS-behandelten Zellen. Im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Cis-Platin kam es sogar zu einer 10-25 % stärkeren Reduktion. Allerdings war auch eine durchgehende Abnahme (um 8-14%) der lebenden Zellen bei der Behandlung mit NS-Oligonukleotiden im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cis-Platin-Behandlung zu beobachten.

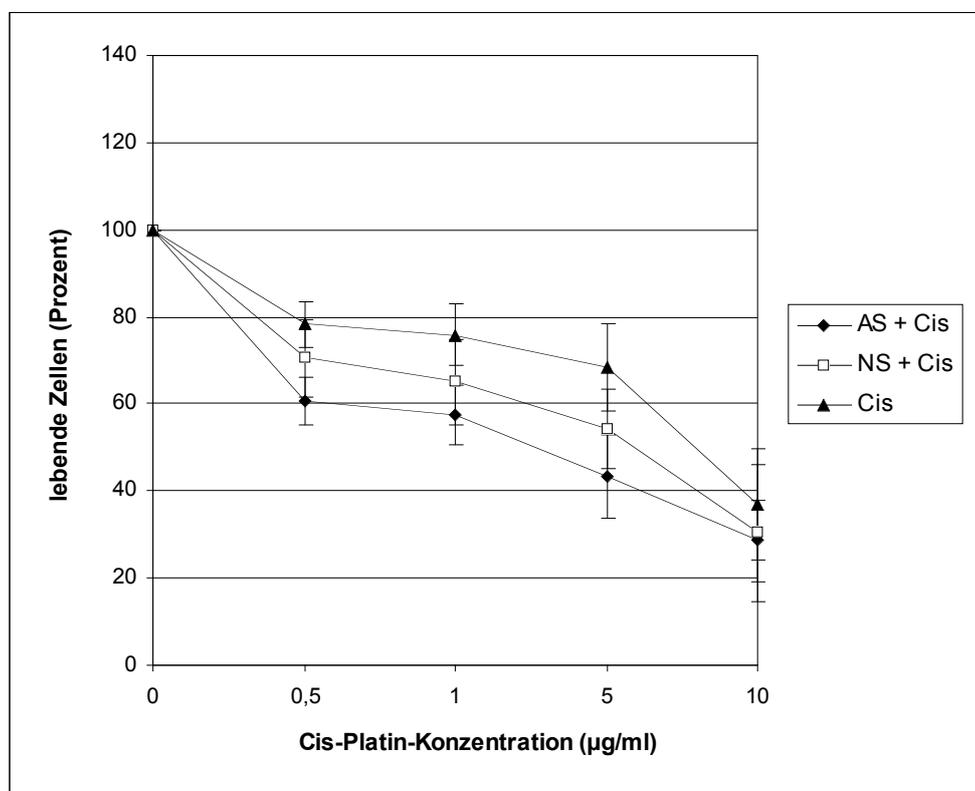


Abbildung 10 Kombinationsbehandlung mit AS-, NS-ON (370 nM, 24h Behandlung) und Cis-Platin (48h Behandlung) von MCF. Als Referenzwert diente eine unbehandelte Kontrolle.

3.1.3.4 Hungermediumversuch

Zur Ursachensuche für einen fehlenden Synergismus der Kombinationsbehandlung wurde ein etablierter Versuch (Endl et al., 2001) durchgeführt, der die Abhängigkeit des Chemotherapeutika-Effektes von der Ki-67-Expression zeigt.

Hierzu wurde zunächst eine Kinetik des Ki-67-Indexes für NIH-3T3-Fibroblasten erstellt, die sowohl in vollsupplementiertem Medium mit 10 % FCS als auch in einem „Hungermedium“ mit 1 % FCS kultiviert wurden (siehe *Abbildung 11*). Zu beobachten war, dass Zellen mit dem höchsten Ki-67-Index von etwas über 60 % an Tag 2 im vollsupplementiertem Medium zu finden waren. Ein niedriger Ki-67-Index von unter 20% zeigte sich dagegen an Tag 8 bei den Zellen mit Hungermedium, welches nur 1 % FCS enthielt.

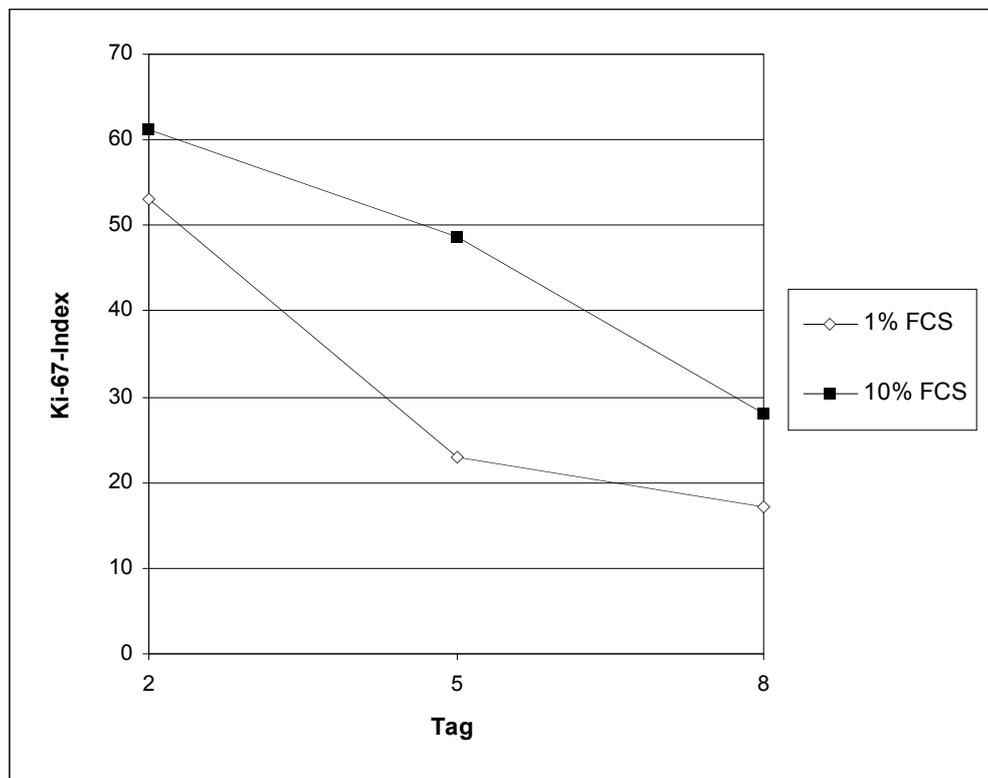


Abbildung 11 Ki-67-Index bei NIH-3T3-Fibroblasten, welche mit vollsupplementiertem Medium (10 % FCS) oder mit „Hungermedium“ (1 % FCS) behandelt wurden. Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und Tag 5.

In einem weiteren Versuch wurden NIH-3T3-Fibroblasten mit hoher und niedriger Ki-67-Expression mit verschiedenen Konzentrationen von Cis-Platin behandelt. Als geeigneter Behandlungszeitpunkt wurde im vollsupplementiertem Medium Tag 2 (Ki-67-Index ca. 60 %) und im „Hungermedium“ Tag 8 (Ki-67-Index ca. 20%) festgelegt.

Anhand von *Abbildung 12* kann die Aussage gemacht werden, dass die Zellen mit einem hohem Ki-67-Index bei der Behandlung mit Cis-Platin eine um 25-50 % stärkere Reduktion viabler Zellen im Vergleich zu den Zellen mit einer niedrigen Ki-67-Expression zeigten.

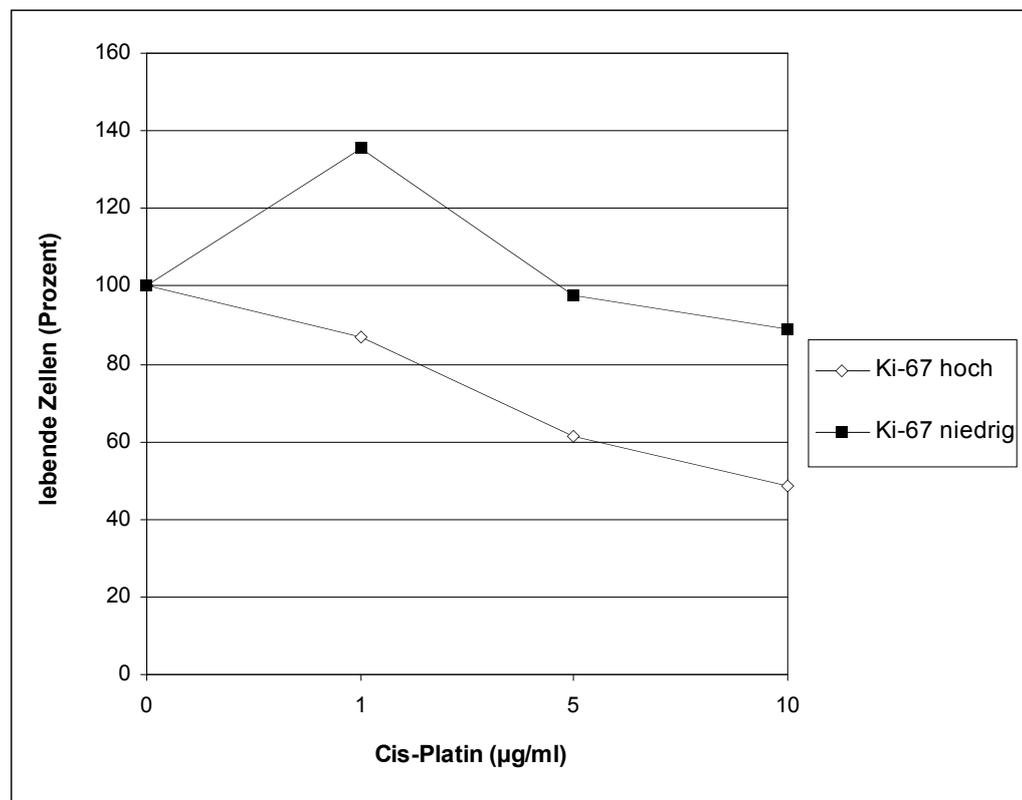


Abbildung 12 NIH-3T3: MTT-Test nach Chemotherapeutika-Gabe bei Zellen mit hohem (ca. 60 %) und niedrigem Ki-67-Index (ca. 20 %).

3.2 Sphäroide

In den bisherigen Versuchen wurden die therapeutischen Effekte am Kultursystem des Monolayers bestimmt. Dies hat den Nachteil, dass der biochemische und morphologische Charakter von Tumorgewebe außer Acht gelassen wurde. Daher wurden unsere Versuche auf das Zellmodell der multizellulären Sphäroide (s.o.) erweitert, um unter realeren Verhältnissen die Therapieeffekte zu bestimmen. Dabei wurden Wachstumskurven der Sphäroide, die Ki-67-Expression und die Zellviabilität an den Zelllinien RT4 und J82 untersucht und verglichen.

Um Auswirkungen der Antisense-Therapie an Sphäroiden bestimmen zu können, musste das Wachstumsverhalten von unbehandelten Sphäroiden untersucht werden. Dabei wurden Sphäroide mit und ohne Mediumwechsel verglichen. Ab Tag 4 wurde alle 2 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, gleichzeitig erfolgte eine Größenmessung. Die Ki-67-Expression, und damit der Anteil von proliferierenden Zellen, wurden anhand von Gefrierschnitten der Sphäroide bestimmt, welche mit dem Primärantikörper MIB-1 gefärbt wurden. Danach wurde am Mikroskop der Anteil Ki-67-positiver Zellen ausgezählt.

Diese Versuche dienten als Vorversuche für eine Kombinationsbehandlung von Ki-67-Antisense-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika. Die Kombinationsuntersuchungen im Sphäroidmodell hätten den Umfang dieser Arbeit gesprengt, so dass diese Thematik einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben soll.

3.2.1 RT4-Sphäroide

Wie in *Abbildung 13* zu erkennen ist, verlaufen die Wachstumskurven der RT4-Sphäroide mit und ohne Mediumwechsel annähernd gleich. Zwischen Tag 10 und Tag 14 war das Wachstum der Sphäroide ohne Mediumwechsel etwas geringer.

Allgemein kann als Ergebnis gesehen werden, dass das Wachstum zwischen Tag 4 und Tag 10 annähernd linear verläuft, ab Tag 10 sich jedoch verlangsamt. Die Sphäroide waren an Tag 20 sowohl noch differenziert als auch noch nicht desintegriert.

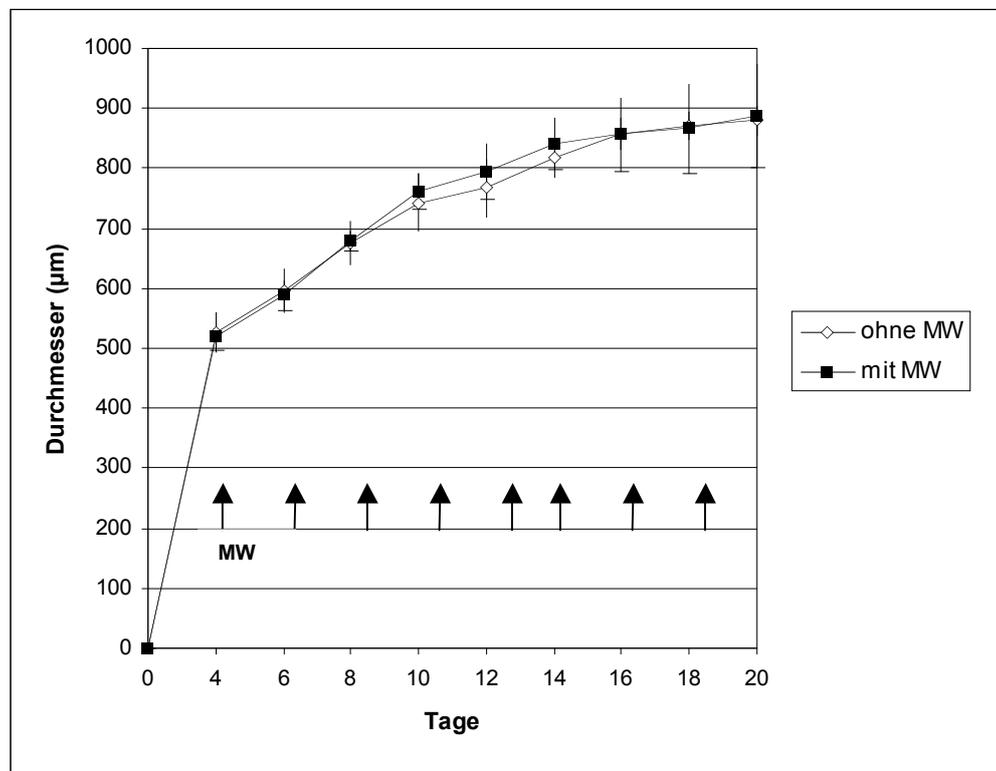


Abbildung 13 Wachstumskurve RT4-Sphäroide – Vergleich mit und ohne Mediumwechsel; Mediumwechsel (MW) alle 2 Tage ab Tag 4 (durch Pfeile markiert)

An den MIB-1-gefärbten Schnitten der RT4-Sphäroide wurde der Anteil der Ki-67-positiven Zellen bzw. deren Verteilung sowie die Morphologie der Sphäroide zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Abbildung 14 zeigt deutlich den Unterschied der Morphologie bei verschiedenem Alter der Sphäroide. Der „junge“, vier Tage alte Sphäroid hat eine runde Gestalt und besteht homogen aus Zellen. Bei dem 20 Tage alten Sphäroid dagegen zeigt sich, dass sich die Form ins längliche verändert hat und außerdem ein nekrotisches Zentrum (zellfreie Mitte) entstanden ist. Dies ist typisch für Sphäroide, welche zu groß werden.

Bei der Betrachtung der Verteilung von proliferierenden Zellen ist zu erkennen, dass diese Ki-67-positiven Zellen an Tag 4 und Tag 20 vor allem an der Peripherie zu finden sind. Dies zeigt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum. Diese Zellverteilung ist ein typisches Merkmal für Sphäroide.

Abbildung 14 Mib1-Färbung: links: RT4-Sphäroid an Tag 4 (Vergrößerung 500fach). Rote Zellen sind Ki-67-positiv; rechts RT4-Sphäroid an Tag 20 (Vergrößerung 125fach).

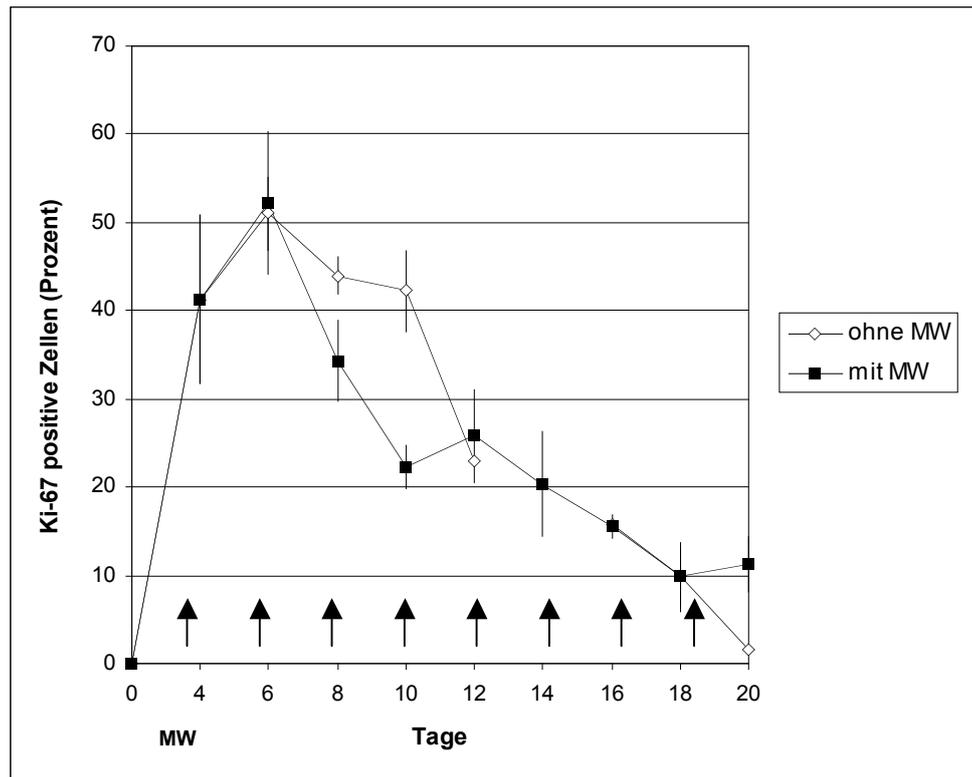


Abbildung 15 Ki-67-Index bei RT4-Sphäroiden im Vergleich bei Sphäroiden mit und ohne Mediumwechsel. Mediumwechsel (MW) alle 2 Tage ab Tag 4 (durch Pfeile markiert).

Zwischen Tag 4 und 6 nimmt der Ki-67-Index, also der Anteil proliferierender Zellen, zu. Ab Tag 6 reduziert er sich stetig.

Obwohl das Wachstum bei den Sphäroiden mit und ohne Mediumwechsel annähernd gleich ist (s.o.), zeigt *Abbildung 15*, dass bei den Zellen ohne Mediumwechsel zwischen Tag 8 und 10 deutlich mehr proliferierende Zellen zu erkennen sind. Der Vergleich mit der Wachstumskurve zeigt, dass dies sich zeitlich nicht komplett mit den Tagen überschneidet, an denen die Sphäroide ohne Mediumwechsel besser wachsen. An Tag 12, 16 und 18 ergibt sich kein Unterschied zwischen den Sphäroiden mit und ohne Mediumwechsel. Erst am Tag 20 geht der Ki-67-Index bei den Sphäroiden ohne Mediumwechsel gegen 0 und zeigt damit einen stärkeren Rückgang im Vergleich zu den Sphäroiden mit Mediumwechsel.

3.2.2 J82-Sphäroide

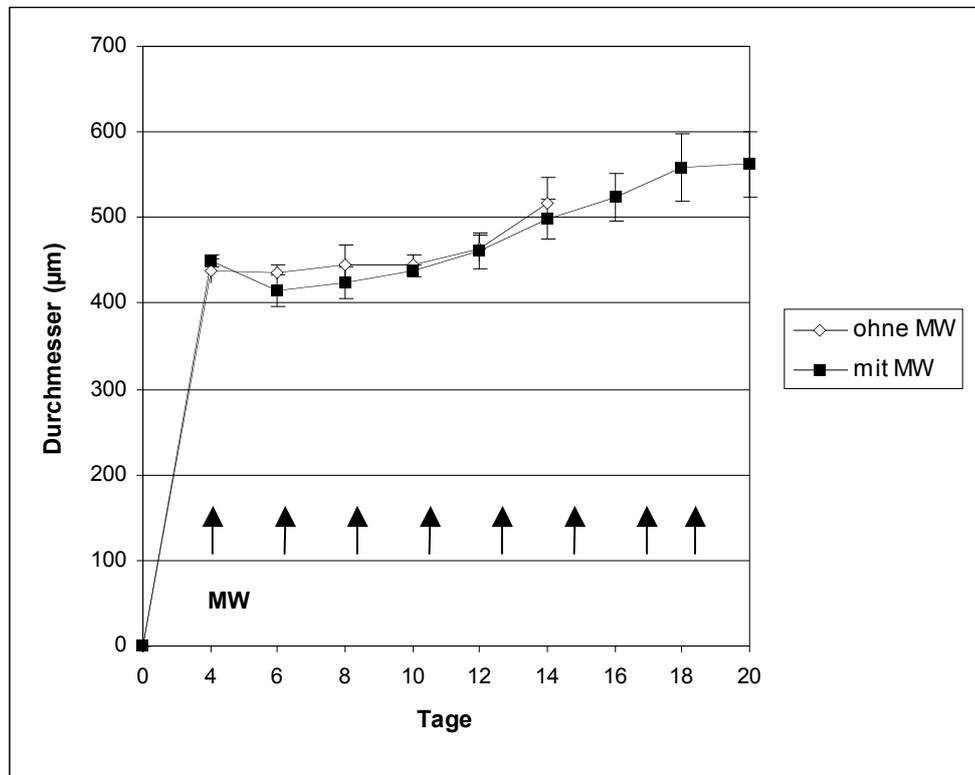


Abbildung 16 Wachstumskurve J82-Sphäroide – Vergleich mit und ohne Mediumwechsel; Mediumwechsel (MW) alle 2 Tage ab Tag 4 (durch Pfeile markiert).

Der Kurvenverlauf zeigt, dass auch bei den J82-Sphäroiden das Wachstum annähernd parallel verläuft, wobei die Sphäroide, bei welchen kein Mediumwechsel durchgeführt wurde, ein wenig besser wuchsen. Ab Tag 16 desintegrierten diese Sphäroide, das heißt, sie verloren ihre dreidimensionale Form. Diese Sphäroide zeigten eine nierenförmige Gestalt (nicht dargestellt) und wuchsen eher langsam. Am Anfang verloren sie zunächst sogar an Größe, und die Ausgangsgröße wurde erst ab Tag 12 wieder erreicht.

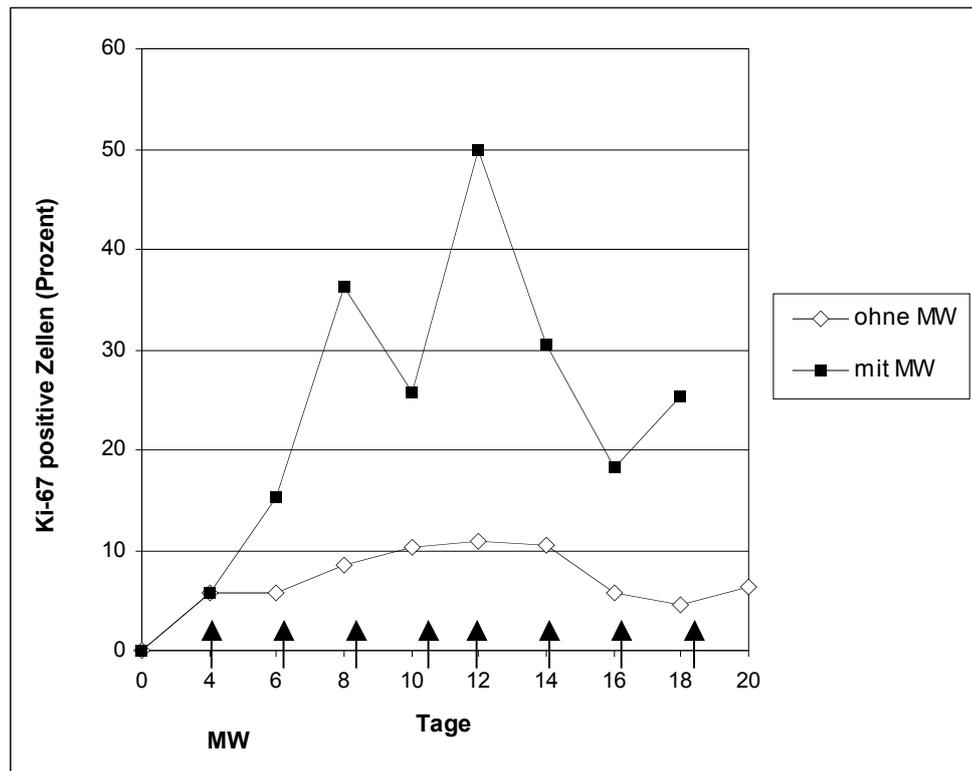


Abbildung 17 Ki-67-Index bei J82-Sphäroiden - Vergleich mit und ohne Mediumwechsel; Mediumwechsel (MW) alle 2 Tage ab Tag 4 (durch Pfeile markiert).

Bei den J82-Sphäroiden war deutlich ein starker Unterschied im Proliferationsverhalten bei beiden Behandlungsmethoden zu erkennen. Zellen, die alle 2 Tagen neues Medium erhielten, zeigten eine deutlich höhere Ki-67-Expression im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden. Der Ki-67-Index ist am Tag 12 mit ca. 50 % am höchsten. Bei beiden Zellreihen fanden sich am Tag 18 noch proliferierende Zellen.

3.2.3 Antisense-Behandlung von RT4-Sphäroiden

In einer Studie von Kausch et al. (2003) konnte bereits gezeigt werden, dass RT4-Sphäroide, welche mit 120 μM Ki-67-AS-ON behandelt wurden, an Größe, besonders ab Tag 6, abnahmen und ab Tag 12 desintegrierten. In unseren Versuchen zeigte eine Wachstumskinetik von Tag 4 und Tag 8 dagegen, dass es bei allen AS-Konzentrationen zu keiner Reduktion der Sphäroidgröße im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden kam. Sphäroide, welche mit kleineren Konzentrationen behandelt wurden, zeigten sogar eine deutliche Größenzunahme (Daten nicht dargestellt). An diese Daten anknüpfend wurden Sphäroide mit verschiedenen Konzentrationen von Ki-67-AS-ONs behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Assay untersucht.

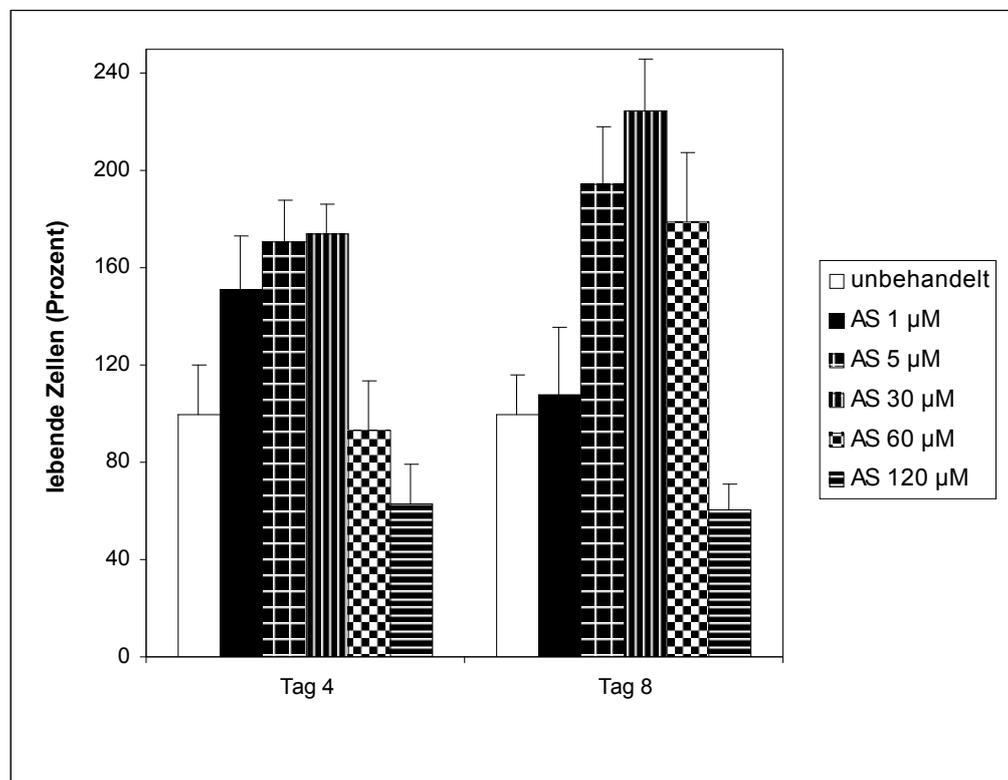


Abbildung 18 MTT-Assay an mit verschiedenen Konzentrationen AS-ON behandelten RT4-Sphäroiden. Das MTT-Assay wurde an Tag 4 und 8 nach der AS-Behandlung durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt, dass es nur bei der Konzentration von 120 μM zu einer Abnahme von lebenden Zellen kam. Bei allen anderen Konzentrationen nahm dagegen die Anzahl viabler Zellen zu. Besonders deutlich zeigte sich dies an beiden Messtagen bei den mit 5 und 30 μM behandelten Sphäroiden. An Tag 8 war der stärkste Anstieg der viablen Zellen mit mehr als einer Verdopplung gegenüber den unbehandelten Sphäroiden zu beobachten.

3.3 Etablierung siRNA-Behandlung gegen das Ki-67-Protein

Da in unserer Forschungsgruppe die Methode der RNA-Interferenz mittels siRNA an dem Ki-67-Protein neu eingeführt wurde, erfolgten zunächst grundlegende Schritte, wie die Suche nach einem geeigneten Transfektionsmedium und die Austitration der optimalen Behandlungsdosis.

Hierzu wurden bei der Suche nach einem geeigneten Transfektionsmedium MCF7-Zellen mit den beiden liposomalen Transfektionsreagenzien Tfx-20 und Metafectene behandelt. Tfx-20 wurde bisher bei der Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden standardmäßig verwendet. Metafectene hingegen wurde als neues Transfektionsmedium für diese Versuche eingeführt. Die Zellen wurden mit fluoreszierender Cy3-markierter siRNA behandelt. Nach 24 Stunden wurde die intrazelluläre Fluoreszenz überprüft. Hier zeigte sich, dass die mit Metafectene transfizierte siRNA, im Gegensatz zu Tfx-20, in die Zellen aufgenommen wurde. Als ideale Konzentration erwies sich das Lipid:DNA-Verhältnis von 2 μ l : 1 μ g.

In fast allen Zellen war eine deutliche Fluoreszenz zu finden, wobei die Fluoreszenz-Intensität von Zelle zu Zelle stark schwankte.

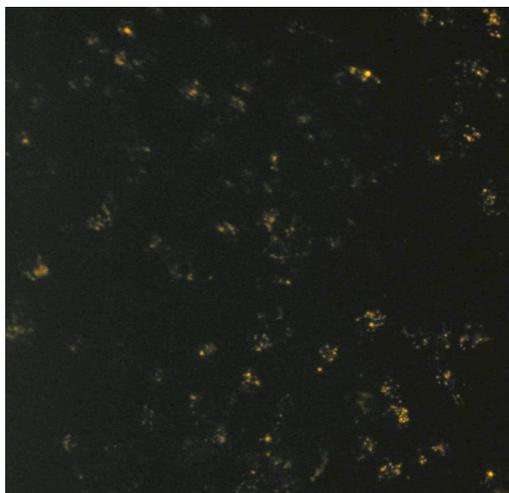


Abbildung 19 *Cy*-markierte siRNA transfiziert mit Metafectene

3.3.1.1 siRNA-Titration

In einem nächsten Schritt wurden MCF-7-Zellen mit 1, 10 und 100 nM siRNA sowie mit den Kontrollen inkubiert. Nach einer Zeitspanne von 24 Stunden wurde zum einen der Einfluss auf die mRNA-Produktion mittels quantitativer PCR untersucht. Zum anderen wurden MIB-1-gefärbte Zellen ausgezählt und somit die Ki-67-Expression bestimmt.

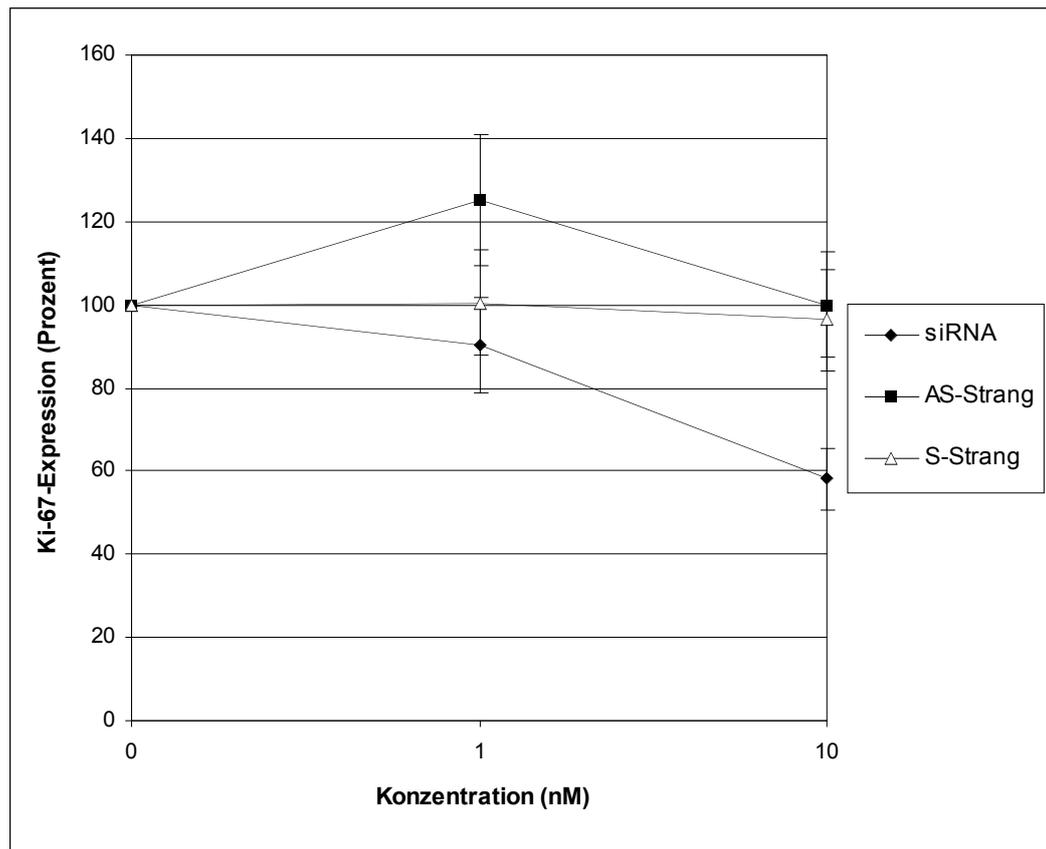


Abbildung 20 Titration verschiedener Konzentrationen von siRNA an MCF7. Die Zellen wurden mit siRNA für 24h behandelt. Als Kontrollen wurden der AS- und S-Einzelstrang der siRNA eingesetzt. Es wurde anhand quantitativer PCR die Herunterregulation der mRNA des Ki-67-Proteins ausgewertet.

In *Abbildung 20* zeigt sich, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Herunterregulation bei den mit siRNA behandelten Zellen kam. Als optimal stellte sich die Konzentration von 10 nM heraus. Bei dieser Konzentration kam es zur Verminderung des mRNA-Levels von ca. 40 %. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 100 nM ergab keine Zunahme des Effektes (Daten nicht dargestellt). Dagegen führte die Behandlung mit den beiden Kontroll-Einzelsträngen S und AS zu keiner Reduktion der mRNA. Wurde die Behandlung nur mit dem Transfektionsmedium Metafectene durchgeführt, kam es bei der äquivalenten Konzentration von 10 nM siRNA zu einer Abnahme der mRNA um circa 25% (Daten nicht dargestellt).

4 Diskussion

Das in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Ki-67-Protein ist ein essentielles Protein für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus, wobei die genaue Funktion nach wie vor unbekannt ist. Mittlerweile gilt es in der histopathologischen Routinediagnostik als ein fest etablierter unabhängiger prognostischer Marker für Tumorerkrankungen. Zusätzlich gilt das Ki-67-Protein als ein vielversprechender Angriffspunkt der Tumorthherapie. Kausch et al. (2003) haben gezeigt, dass die Behandlung mit Ki-67-AS-Oligonukleotiden in verschiedenen Zelllinien zu einer Herunterregulation des mRNA- und Proteinlevels führt sowie Apoptose einleitet. Zusätzlich konnte eine signifikante Inhibierung der Zellproliferation durch Antisense-Behandlung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Studien haben gezeigt, dass Antisense-Monotherapien vor allem *in vivo* aufgrund der häufigen multigenetischen Genese von Tumoren oft ungenügend wirksam sind.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist daher die Untersuchung über Auswirkungen der Kombination von Ki-67-Antisense Therapie mit verschiedenen Chemotherapeutika. Zur genauen Interpretation der Ergebnisse waren im Vorfeld weitere Untersuchungen der Ki-67-Antisense Monotherapie erforderlich. Hierbei wurden Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese, auf die Ki-67-Expression und auf die Zellproliferation untersucht. Für die Untersuchungen wurden zwei *in vitro*-Kultursysteme verwandt – Monolayer und multizelluläre Sphäroide. Im Gegensatz zum Monolayer zeigen Sphäroide histomorphologisch, physiologisch und funktionell Analogien zu *in vivo*-Tumoren (Kunz-Schughart et al., 1998) und sind daher gut geeignet, Therapieeffekte darzustellen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit untersucht die relativ neue Technik der RNA-Interferenz mittels siRNA und vergleicht diese Technik mit der Antisense-Behandlung.

4.1 Etablierung der Antisense-Behandlung

Wir haben in unseren Versuchen den Antisense-Effekt auf verschiedenen Ebenen untersucht, da aus den Effekten auf mRNA-Ebene nicht auf Auswirkungen bezüglich der Zellviabilität Rückschlüsse gezogen werden können. Hierfür wurde in einem ersten Teil mittels quantitativer PCR das mRNA-Produkt nach Behandlung betrachtet, in einem zweiten Teil wurden die Effekte auf die Zellviabilität untersucht.

PCR

Wir haben an den beiden Zelllinien MCF7 und J82, welche beide einen hohen Ki-67-Index aufweisen, eine quantitative RT-PCR durchgeführt, um so die mRNA-Reduktion durch Antisense-Oligonukleotide gegen das Ki-67-Protein zu untersuchen.

Bei den MCF7-Zellen konnte die stärkste Reduktion des mRNA-Levels, nämlich um circa 55%, bei einer AS-Konzentration von 120 nM beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen kam es zu keiner weiteren Reduktion. Allerdings fiel auf, dass es auch bei der Oligonukleotid- und Tfx-Kontrolle teilweise zu einer Abnahme von mRNA kam.

Bei den J82-Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion zwischen 40 und 370 nM. Auch hier war eine Herunterregulation bei der Behandlung mit NS-Oligonukleotiden zu beobachten, die sich als konzentrationsabhängig darstellte.

Es ist unklar, ob bei den Kontrollen unspezifische bzw. toxische Effekte auf das Ki-67-Protein wirken, was besonders beim Tfx anzunehmen wäre, oder ob die Oligonukleotid-Kontrollen selbst durch teilweise übereinstimmende Sequenzen mit der Ziel-mRNA doch eine Antisense-Wirkung besitzen. Für beide Zelllinien trifft aber die Aussage zu, dass es zu einer spezifischen Herunterregulation durch die Behandlung kommt.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass neben RT4 (Kausch et al., 2003) auch die beiden Zelllinien MCF7 und J82 sensibel auf die Ki-67-Antisense Behandlung reagieren. Daher wurden diese beiden Zelllinien in den folgenden Versuchen weiter eingesetzt.

Zellviabilitätsmessung bei Oligonukleotid-Behandlung

Kausch et al. (2003) haben durch Zellzählung an RT4-Zellen gezeigt, dass für diese die IC_{50} ca. 150 nM beträgt. Da bei *in vitro* Versuchen eine etwas größer als 2-fache IC_{50} -Konzentration empfohlen wurde (Schumacher, 2000), wurde standardmäßig mit einer Oligonukleotid-Konzentration von 370 nM gearbeitet.

Bei unseren Versuchen wurden zwei Zellviabilitäts-Assays an den drei Zelllinien MCF7, J82 und RT4 verwandt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das in unserem Labor bereits etablierte MTT-Assay wurde mit dem neu angewandten Kristallviolett-Assay verglichen. Beim Kristallviolett-Assay werden durch den Farbstoff Kristallviolett Proteine angefärbt, es ist daher nicht vom Zellstoffwechsel abhängig. Bei diesem Assay würden theoretisch, im Gegensatz zu dem MTT-Assay, auch tote Zellen miterfasst. Diese nicht mehr adhären Zellen wurden aber durch einen Waschgang vor der Messung eliminiert.

Bei dem Vergleich beider Zellviabilitäts-Assays zeigte sich die Tendenz, dass bei allen drei Zelllinien (MCF7, RT4 und J82) vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Zellviabilität vorlagen. Teilweise statistisch signifikante Abweichungen konnten zwar bei dem Vergleich beider Assays beobachtet werden, eine tendenziell systematische Richtung dieser Abweichungen war allerdings nicht festzustellen. Auffällig stellte sich dar, dass die Streuung der Werte, abhängig von der Zelllinie, teils beim MTT-, teils beim Kristallviolett-Assay größer war. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse beider Assays müssten diese Beobachtungen in nachfolgenden Untersuchungen im Vergleich mit anderen Zellviabilität-Assays verifiziert werden.

Des Weiteren haben wir die Auswirkungen der Behandlung mit verschiedenen Oligonukleotid-Konzentrationen und unterschiedlicher Behandlungsdauer untersucht. Hierfür wurde die Zelllinie MCF7 benutzt, da diese einen nachgewiesenen hohen Ki-67-Index hat und in den durchgeführten Versuchen gute Behandlungseffekte zeigte.

Orientiert an der von zuvor ermittelten Standardkonzentration von 370 nM (Kausch et al., 2003) wurde eine Titration mit verschiedenen Konzentrationen an MCF7 durchgeführt. Hierbei stellte sich die Konzentration von 370 nM auch an dieser Zelllinie als effektivste heraus. Bei der hohen Konzentration von 740 nM zeigte sich eine starke

Reduktion der mit NS-Oligonukleotiden behandelten Zellen. Diese unspezifische Herunterregulation war auch schon bei der Konzentration von 370 nM zu erkennen.

Bei dem Vergleich des Antisense-Effektes auf molekularer Ebene und der Zellviabilität stellte sich heraus, dass, obwohl es bei der AS-Konzentration von 120 nM zu einer starken Abnahme der mRNA-Konzentration kam, dies sich nicht auf Ebene der Zellviabilität widerspiegelte. Bei einer vergleichbar niedrigen Konzentration von 185 nM zeigte sich nur eine geringfügige Reduktion der Zellviabilität. Auch bei der Konzentration von 370 nM war der Unterschied zwischen der Herunterregulation der mRNA (ca. 45 %) und Abnahme der Zellviabilität (ca. 30 %) zu erkennen. Dies könnte zeigen, dass eine Reduktion des Ki-67-Proteins nicht zwangsweise bei allen Zellen Apoptose induziert, sondern sich nur die Zellproliferationsrate vermindert.

Die Tfx-Kontrolle zeigte keinen wesentlichen Effekt. Dies spricht für eine geringe Toxizität dieses Transfektionsmediums.

Zur Bestimmung der optimalen Behandlungsdauer wurden MCF7-Zellen 24-110 Stunden behandelt. Hier konnte die stärkste Herunterregulation der Zellproliferation nach 72 Stunden beobachtet werden. Nach 24 Stunden war noch kein deutlicher Effekt nachweisbar, nach längerer Behandlungsdauer (92, 110 Stunden) kam es wieder zu einer Zunahme der Zellproliferation. Dies ist am ehesten damit zu erklären, dass die Inhibition durch Antisense-Oligonukleotide nur 24-48 Stunden anhält (Dean et al., 1994).

Interessanterweise sah man einen deutlichen zellulären Effekt erst nach 48 Stunden, obwohl eine mRNA-Herunterregulation schon nach 24 Stunden nachweisbar war. Ein Erklärungsansatz hierfür wären die Daten von Kausch et al., 2003, welche zeigten, dass erst nach längerer Behandlungsdauer Apoptose induziert, vorher dagegen nur die Zellproliferationsrate vermindert wird.

4.2 Kombinationstherapie mit Ki-67-AS-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika

Aufgrund der multifaktoriellen Genese vieler Tumoren hat sich gezeigt, dass eine Antisense-Monotherapie besonders *in vivo* unzureichend ist. Bei der multigenetischen Tumorgenese sind oft antiapoptotische oder proliferationsfördernde Gene hochreguliert, welche die Zelle vor dem Zelltod schützen und damit eine Chemoresistenz fördern. Beispiele hierfür sind die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-xl) (Reed, 1995; Reeve et al., 1996), Clusterin (Redondo et al., 2000; Xie et al., 2005) und Survivin (Jaattela, 1999) oder proliferationsfördernde Gene wie Proteinkinase A I (Chochung et al., 1995) und c-Myb (Alitalo et al., 1984; Griffin und Baylin, 1985).

Das Konzept der Einleitung von Apoptose durch Antisense-Behandlung in Kombination mit Chemotherapeutika hat schon viele positive Ergebnisse gezeigt. Als Beispiel gilt die Herunterregulation von Bcl-2 und Bcl-xl, zwei Proteinen, welche die Apoptose-auslösende Schwelle erhöhen. Eine erhöhte Expression dieser Proteine führt zur Entstehung oder Progression von diversen Tumoren, welche Lymphome, Melanome und Lungen-, Colorektal- und Brustkrebs beinhalten. (Reed et al., 1995). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von Bcl-2 Apoptose inhibiert, welche durch Chemotherapeutika und Bestrahlung induziert wird (Reed, 1994; Chao und Korsmeyer, 1998). In präklinischen Studien konnte dargestellt werden, dass die Kombination von AS-Oligonukleotiden gegen Bcl-2 oder Bcl-xl mit Chemotherapeutika an verschiedenen Zellen einen synergistischen Effekt aufweist und somit die Chemosensitivität dieser Zellen erhöht (Jansen et al., 1998; Klasa et al., 2000; Miyake et al., 2000; Kausch et al., 2005a). Dass Bcl-2 ein bedeutsames Angriffsziel der Antitumor-Therapie ist, konnten auch schon erste klinische Studien zeigen. So konnten Jansen et al. (2000) Ergebnisse einer klinischen Phase I/II-Studie präsentieren, wo gezeigt wurde, dass die Kombination von Bcl-2-Antisense-ON (G3139, Genasense[®]) mit einer Standardchemotherapie bei fortgeschrittenen Melanomen bei 14 Patienten die mittlere Überlebensrate auf 12 Monate verlängerte. Weitere klinische Phase I/II-Studien konnten Antitumor-Aktivität bei verschiedenen Tumoren, welche Non-Hodgkin Lymphome (NHL), kleinzellige Lungen-Karzinome, Melanome, chronisch lymphatische Leukämien, Mamma-Karzinome und Prostata-Karzinome beinhalten, demonstrieren (Jansen et al., 2000; Waters et al., 2000; Chi et al., 2001; Rudin et al., 2002; Marshall et al., 2004; Tolcher et al., 2004; Tolcher et al., 2005; Mita et al., 2006). Basierend auf diesen

Ergebnissen wurde eine randomisierte multizentrische Phase III-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen durchgeführt. Diese erbrachte ein verbessertes Outcome bei Patienten, welche mit einer Kombination von Genasense[®] und Dacarbazine behandelt wurden (Bedikian et al., 2006). Eine weitere Phase-III-Studie, bei welcher eine Kombination mit Fludarabin und Cyclophosphamid an Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie durchgeführt wurde, zeigte auch eine Erhöhung der Überlebensrate bei Fludarabin-sensitiven Patienten (O'Brien et al., 2007).

Ein weiteres Konzept ist die Kombination mit der Antisense-Behandlung von proliferations-assoziierten Genen, wie zum Beispiel Proteinkinase A (Isoform Typ I). Dieses Enzym ist Voraussetzung für die Überleitung von der G₁- zur S-Phase während des Zellzyklus und für die Signalübertragung während der Mitose. PKAI ist in vielen malignen Tumoren erhöht und korreliert mit einer schlechten Prognose und verminderter Überlebensrate (Ciardiello und Tortora, 1998). Antisense-Oligonukleotide gegen PKAI haben eine Wachstumsverminderung von verschiedenen Tumorzelllinien und antitumorale Aktivität in humanen Tumor-Xenografts gezeigt (Yokozaki et al., 1993; Cho-Chung, 1997). Die Kombination von diesen Antisense-Oligonukleotiden und oraler Gabe von Taxol bzw. einer Dreifachkombination zusätzlich mit EGFR haben signifikant das Überleben von Mäusen mit **Colon-Karzinom**-Xenografts erhöht (Tortora et al., 2000 und 2001). Eine Phase I-Studie mit der Kombination von GEM231[®] (2.-Generation Antisense-ON gegen PKAI) und Docetaxel wurde mittlerweile durchgeführt (Goel et al., 2006).

Als weiterer Ansatz gilt die Kombinationstherapie mit Antisense-ON gegen c-Myb. C-Myb ist ein Onkogen, welches einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor verschlüsselt, welcher in die Kontrolle des Überganges von G₁- in die S-Phase involviert ist. Das c-Myb-Protein hat eine erhöhte Expression in Leukämie-Zellen, **Colon-Karzinomen, kleinzelligen Lungen-Karzinomen**, Teratokarzinomen und Neuroblastomen (Alitalo et al., 1984; Griffin und Baylin, 1985; Janssen et al., 1986; Thiele et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von c-Myb in Colon-Tumor-Zelllinien eine Hochregulation von Bcl-xl verursacht, und damit eine erhöhte kanzerogene Fähigkeit und erniedrigte apoptotische Kapazität hervorgerufen wird (Biroccio et al., 2001a). Leonetti et al. (1999) konnten an humanen metastasierenden Melanom-Zellen zeigen, dass die Kombinationstherapie von Antisense-ON gegen c-Myb und Cis-Platin die c-Myb-Expression erniedrigt, Apoptose induziert und damit die Zellen sensibel für Cis-Platin macht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung

von humanen Tumor-Xenografts in Mäusen mit der Kombination von Antisense-ON gegen Bcl-2 und c-Myb mit dem Chemotherapeutikum Cis-Platin die Überlebensrate erhöht (Zupi et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz der Kombinationstherapie beinhaltet die Antisense-Therapie gegen Gene, die in Proliferations-Signalwegen involviert sind, wie z.B. *c-myc*. *c-myc* ist ein Schlüsselfaktor für die Zellproliferation und in vielen Tumoren, wie z.B. Leukämie-Zellen, Melanomen, Prostata-Karzinomen, Brust- und Colon-Karzinomen, überexprimiert (Dang, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Antisense-Behandlung gegen *c-myc* die Viabilität und Proliferation in humanen Prostata-, Brust und Leber-Karzinom-Zellen *in vitro* hemmt (Kang et al., 1996; Balaji et al., 1997; Ebinuma et al., 2001). Bei der Kombination von *c-myc* Antisense-Oligonukleotiden und Tamoxifen an Mamma-Karzinom-Zellen konnte der Tamoxifen-induzierte Anstieg von *c-myc* mRNA und Protein antagonisiert werden (Kang et al., 1996). Des Weiteren zeigt die Kombination von *c-myc*-AS-ON und Cis-Platin an Melanom-Zellen signifikante antiproliferative Effekte und die Induktion von Apoptose. Dabei wurden die besten Ergebnisse erreicht, wenn die *c-myc*-AS-Oligonukleotide nach der Cis-Platin-Therapie angewandt wurden (Leonetti et al., 1999). Auch *in vivo* zeigten Mäuse, welche mit Cis-Platin und *c-myc*-AS-ON behandelt wurden, eine größere Hemmung des Tumorwachstums und eine verlängerte Lebenserwartung im Vergleich zu Tieren, die mit nur einem der Substrate behandelt wurden (Citro et al., 1998). Eine Dosis-Berechnungs-Phase-Studie von *c-myc*-AS in Kombination mit Cis-Platin an Patienten mit soliden Tumoren und Lymphomen ist abgeschlossen worden (Gelmon et al., 2001).

Die Kombination von *c-myc*-AS-ON und Chemotherapeutika zeigte aber auch entgegengesetzte Ergebnisse. So zeigte die Kombination mit Doxorubicin an p53-mutierten kleinzelligen Lungen-Karzinom-Zellen, dass der apoptotische Effekt von Doxorubicin fast aufgehoben wurde (Supino et al., 2001).

Die Beobachtung, dass Antisense-Oligonukleotide gegen antiapoptotische oder proliferationsfördernde Proteine eine Sensibilisierung gegenüber konventionellen Chemotherapeutika induzieren, hat in unserer Arbeitsgruppe zu dem Forschungsansatz geführt, die Kombinationsbehandlung von Antisense-Oligonukleotiden gegen das Ki-67-Protein zu untersuchen. Molekulare *in vitro*-Analysen zeigten bereits, dass durch Antisense-Oligonukleotide die mRNA- und Proteinexpression spezifisch gehemmt und dadurch Apoptose in diesen Zellen induziert wurde (Kausch et al., 2003). Außerdem

konnte gezeigt werden, dass das Tumorstadium in murinen und humanen Prostata- und Harnblasen-Karzinomen sowie Nierentumoren gehemmt wurde (Kausch et al., 2003, 2004 und 2005b). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von uns die Hypothese aufgestellt, dass die Kombinationsbehandlung von Ki-67-Antisense-Oligonukleotiden und verschiedenen Chemotherapeutika einen Synergismus in Bezug auf die Zellviabilität zeigt.

Bei der Kombinationsbehandlung von MCF7-Zellen mit AS-Oligonukleotiden gegen das Ki-67-Protein und den Chemotherapeutika Cis-Platin, Gemcitabin und Taxol in aufsteigender Konzentration zeigte sich durchgehend eine nur geringfügige Abnahme der Zellviabilität. Bei der Kombinationsbehandlung mit Taxol war sogar eine Zunahme lebender Zellen im Vergleich zu nur mit Chemotherapeutika behandelten Zellen festzustellen. Einen möglichen Erklärungsansatz für den fehlenden Synergismus zeigte ein bereits etabliertes Verfahren (Endl et al., 2001). Bei der Behandlung von NIH-3T3-Fibroblasten mit einerseits einem hohen Ki-67-Index und andererseits einem niedrigen Index nahm die Chemosensibilität mit der Reduktion der Ki-67-Positivität ab. Somit wirkt die durch Ki-67-AS-ON induzierte Gen-Reduktion mutmaßlich eher antagonistisch auf Chemotherapeutika, deren Effektivität von der Zellproliferation abhängt.

Grundsätzlich lässt sich die Aussage machen, dass die Kombination von Antisense-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika bei der häufig multifaktoriellen Genese von Tumoren ein sehr viel versprechendes Konzept darstellt. Doch nicht alle Kombinationen weisen synergistische Effekte auf. Im Gegensatz zu den vielen positiven Ergebnissen (s.o.) haben klinische Studien auch gezeigt, dass es bei einigen Kombinationen keinen Nutzen durch die zusätzliche Verabreichung von Antisense-Oligonukleotiden gibt. So wurde durch eine Phase-III-Studie mit Antisense-Oligonukleotiden gegen Proteinkinase C alpha, welches ein wichtiges Protein für die Signalübertragung in der Zelle ist, gezeigt, dass die Kombination mit Gemcitabin und Carboplatin keine Verbesserung der Überlebensrate der Patienten erbrachte. Eine daraufhin abgebrochene Phase-II-Studie zeigte außerdem die Nebenwirkungen einer schweren Thrombozytopenie (Paz-Ares et al., 2006; Ritch et al., 2006).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Kombinationen sehr kritisch untersucht werden müssen, da die Reduktion von proliferations-assoziierten Proteinen teilweise zu sehr unterschiedlichen und gegensätzlichen Effekten führen kann. Einige Zielproteine

haben eventuell nur eine untergeordnete Wichtigkeit in der Signalübertragungskaskade der Zelle, so dass die Blockierung keine Hemmung der Zellproliferation auslöst. Zusätzlich könnte paradoxerweise durch Veränderungen im Apoptose-Signalweg die Aktivität von anti-apoptotischen Genen erhöht werden. So könnten „Überlebens“-Proteine, welche sowohl Mitglieder der Bcl-2-Familie als auch Clusterin und Survivin beinhalten, durch Induktion von Apoptose hochreguliert werden, was eine erhöhte Chemoresistenz herbeiführen könnte (Jaattela, 1999).

Die Kombinationen müssen daher sehr kritisch begutachtet werden. Wie in unserem Beispiel gezeigt, können auf den ersten Blick vielversprechende Kombinationen zu genau entgegengesetzten Wachstumsreaktionen der Tumoren führen.

Eine Zusammenfassung über klinische Studien ist in Tabelle 1 zu sehen.

Medikament	molekulares Ziel	Kombination mit	Krankheit/Indikation	Entwicklungsstatus	Autor
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Paclitaxel	Chemo-refraktäres kleinzelliges Lungen-Karzinom	Phase I	Rudin et al., 2002
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Docetaxel	Hormon-refraktäres Prostata-Karzinom	Phase I	Tolcher et al., 2004
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Docetaxel	fortgeschrittenes Mamma-Karzinom und andere solide Tumoren	Phase I	Marshall et al., 2004
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Irinotecan	metastasiertes kolorectales Karzinom	Phase I	Mita et al., 2006
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Dacarbazine	fortgeschrittene Melanome	Phase I/II	Jansen et al., 2000
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Docetaxel	Hormon-refraktäres Prostata-Karzinom	Phase II	Tolcher et al., 2005
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Dacarbazine	fortgeschrittene Melanome	Phase III	Bedikian et al., 2006
Genasense® , G3139 (Oblimersen sodium)	Bcl-2	Fludarabin+Cyclophosphamid	Rezidiv oder therapie-refraktäre chronisch lymphatische Leukämie	Phase III	O'Brian et al., 2007
Gem231®	PKAI	Docetaxel	fortgeschrittene solide Tumoren	Phase I	Goel et al., 2006
G4460	c-myb	/	chronisch myelotische Leukämie	Phase I	www.genta.com
c-myc AS- ON	c-myc	/	solide Tumoren und Lymphomen	Dosis-Berechnungs- Studie	Gelmon et al., 2001
Ki-67- Antisense	Ki-67	/	Harnblasen- Karzinom	Phase I	Steiner et al., 2006
Aprinocarsen , ISIS 3521	PKC-alpha	/	Non-Hodgkin's Lymphom	Phase II	Rao et al., 2004
Aprinocarsen , ISIS 3521	PKC-alpha	/	fortgeschrittenes Ovarial-Karzinom	Phase II	Advani et al., 2004
Aprinocarsen , ISIS 3521	PKC-alpha	Gemcitabin, Carboplatin	fortgeschrittenes nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom	Phase II	Ritch et al., 2006
Aprinocarsen , ISIS 3521	PKC-alpha	Gemcitabin, Carboplatin	fortgeschrittenes nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom	Phase III	Paz-Ares et al., 2006
CGP 69846A, ISIS 3521	C-raf-Kinase 1	/	Rezidiv Ovarial- Karzinom	Phase II	Oza et al., 2003

Tabelle 1 Übersicht über klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden und teilweiser Kombinationsbehandlung.

4.3 Sphäroide

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.8 beschrieben, handelt es sich bei Sphäroiden um dreidimensionale Zellkultursysteme, an denen aufgrund ihres biochemischen und morphologischen Charakters sehr gut die Tumorbilogie studiert werden kann. Aus diesem Grund wurde von unserer Arbeitsgruppe die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden neben dem Monolayer auch an diesem Kultursystem untersucht.

Es wurden Sphäroide aus den beiden Blasenkarzinomzelllinien RT4 (hochdifferenziert) und J82 (wenig differenziert) untersucht und verglichen. Schon im Wachstumsverhalten zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien. Die runden RT4-Sphäroide wuchsen schneller als die nierenförmigen J82-Sphäroide, was sich auch in einer deutlich größeren Endgröße der RT4-Sphäroide widerspiegelte.

Bei der Kultivierung zeigte sich, dass RT4-Sphäroide ohne Mediumwechsel ein wenig besser wuchsen. Es kann daher gesagt werden, dass diese Zelllinie im Sphäroidverband über einen langen Zeitraum ohne neue Nährstoffe auskommt, dafür aber sensibler auf mechanische Manipulation des Mediumwechsels reagiert. Erst an Tag 20 machten sich die fehlenden Nährstoffe im Medium bemerkbar. Im Gegensatz hierzu war bei den J82-Sphäroiden ganz eindeutig zu beobachten, und zwar sowohl in der Wachstumskurve als auch bei dem Proliferationsindex, dass diese Sphäroide vom Medium abhängig sind. Sphäroide, welche keinen Mediumwechsel erhielten, desintegrierten am 16. Tag. Interessanterweise wurden bei den desintegrierten Zellen immer noch proliferierende Zellen in den gefärbten Schnitten gefunden. Trotz dieser Unterschiede war bei beiden Sphäroidtypen der allgemeine konzentrische Aufbau mit einer proliferierenden Außenschicht, einer Innenschicht mit ruhenden, aber noch viablen Zellen und später nekrotischem Zentrum erkennbar.

Die Behandlung der Sphäroide mit verschiedenen AS-Oligonukleotid Konzentrationen zeigte, dass es lediglich bei der hohen Konzentration von 120 μM zu einer Abnahme der Zellviabilität kam. Bei niedrigeren Konzentrationen war hingegen ein antagonistischer Effekt erkennbar, der in einer teilweisen deutlichen Zunahme der Zellviabilität resultierte. Außerdem war zu sehen, dass bei der Messung am 4. Tag nach der Behandlung die Zellviabilität selbst bei 120 μM nur gering abnahm. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass neben einer ausreichend langen Behandlungsdauer (mindestens 8 Tage) auch auf eine ausreichend hohe Antisense-Konzentration zu achten ist. Ob dieser paradoxe Effekt

bei zu niedrigen Konzentrationen nicht nur im Sphäroidmodell, sondern auch *in vivo* auftritt, sollte in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

4.4 RNA-Interferenz am Ki-67-Protein

Die RNA-Interferenz mittels genregulatorischer RNA ist einer der neuesten Ansätze in dem weiten Repertoire von Nukleinsäure-Molekülen, wie zum Beispiel Antisense-Oligonukleotiden, welche die Gen-Expression inhibieren. Zwei wichtige Vertreter dieser genregulatorischen RNAs sind die small-interfering RNA (siRNA) und micro RNA (miRNA), welche die Umschreibung von DNA in Proteine meist als Repressoren regulieren. Dabei bindet die siRNA an komplementäre mRNA und wird durch einen Dicer abgebaut. Die miRNA hingegen bindet an den 3'-nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA und führt so zu einem Translations-Stopp (Carrington und Ambros, 2003, Denli und Hannon, 2003).

Bei unseren Versuchen haben wir uns auf die Methode der RNA-Interferenz mittels siRNA konzentriert. Unser Ziel war, die siRNA-Behandlung gegen das Ki-67-Protein zu etablieren und mit der schon lange verwendeten Methode der Antisense-Behandlung bezüglich der Effektivität zu vergleichen.

Hierfür wurde zunächst die Aufnahme der siRNA mittels zweier Transfektionsreagenzien verglichen. Auf molekularer Ebene wurde die Herunterregulation der mRNA untersucht. Mit diesen Ergebnissen konnten wir erste Vergleiche zu der Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden gegen das Ki-67-Protein erzielen.

Transfektion in die Zelle

Die Aufnahme der siRNA anhand der Transfektionsmittel Tfx-20 und Metafectene untersuchten wir anhand fluoreszierender Cy3-markierter siRNA. Hierbei zeigte sich, dass nur Metafectene, im Gegensatz zu Tfx-20, wirksam die siRNA in die Zelle einschleuste. Als optimales Verhältnis erwies sich das Lipid : DNA-Verhältnis von 2 µl : 1 µg.

PCR

Bei der Austitration verschiedener siRNA-Konzentrationen stellte sich 10 nM als optimale Konzentration dar. Die beiden Kontrollstränge zeigten keine Reduktion des mRNA-Levels. Es konnte somit gezeigt werden, dass das von uns getestete siRNA-Konstrukt eine wirksame siRNA-Sequenz darstellt.

Die Tatsache, dass die siRNA bei der Konzentration von 1 nM keine Wirksamkeit zeigte, spricht dafür, dass es sich bei der von uns ausgewählten Sequenz nicht um eine

hochaktive handelt. Eventuell lag dies daran, dass die Sequenz gegen das Start-Codon des Ki-67-Proteins gerichtet war. Allgemeine Empfehlungen in der Literatur besagen, dass die siRNA gegen den Bereich 50-100 Basenpaare hinter dem Start-Codon zu richten ist (Tuschl, 2001). Es ist zu erwarten, dass durch Computer-basierte Selektion potentiell aktiver Sequenzen wesentlich effektivere siRNA-Sequenzen identifiziert werden können. Auch dies muss in einem Folgeprojekt untersucht werden.

Bei dem Vergleich der siRNA und der Antisense-Behandlung gegen die gleiche Zielsequenz fiel auf, dass die siRNA schon bei einer Konzentration von 10 nM im Vergleich zu der Konzentration von 120-370 nM bei den AS-ON effektiv war. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen in anderen Studien überein, die eine bis zu 10- bis 100- fach niedrigere IC_{50} der siRNA zeigten (Bertrand et al., 2002, Kretschmar-Kazemi Far und Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003). Bei den siRNA Kontrollen wurde im Gegensatz zu der NS-Kontrolle der Antisense-Behandlung kein wesentlicher Effekt beobachtet.

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass auch das Ki-67-Protein ein vielversprechendes Target der siRNA-Behandlung darstellt. Als Vorteil gegenüber der Antisense-Behandlung könnten sich die niedrigere therapeutische Konzentration und geringere unspezifische Effekte herausstellen. Diese Ergebnisse müssen allerdings erst in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Allgemein kann gesagt werden, dass siRNA mit ihrer niedrigeren IC_{50} und insgesamt wenigen unspezifischen Effekten im Gegensatz zu Antisense-Oligonukleotiden sehr vielversprechend ist. Ein Vorteil der siRNA könnte die längere Halbwertszeit gegenüber Antisense-Oligonukleotiden sein (Halbwertszeit: siRNA 24 h in purem Kälber-Serum, Oligonukleotide einige Minuten) (Bertrand et al., 2002). Durch verbesserte 2.Generation-Antisense-Oligonukleotide könnte aber der Abstand zwischen der biologischen Aktivität von Antisense-Oligonukleotiden und siRNA verringert werden.

Trotz dieser ersten positiven Ergebnisse gibt es noch viele Nachteile gegenüber der bereits seit Jahren etablierten Antisense-Behandlung. Es wurde z.B. gezeigt, dass schon 11-15 kontinuierliche Nukleotide Gene stilllegen können (Jackson et al, 2003). So ist es teilweise schwer, eine solche „off-target“-Aktivität der siRNA-Moleküle vorherzusehen. Ein weiterer Nachteil ist, dass nicht nur lange doppelsträngige RNA, sondern auch kurze siRNA-Moleküle *in vivo* das Interferon-System aktivieren können. Dadurch wird eine

unspezifische Immunantwort ausgelöst. Die Aktivierung hängt vermutlich von der Sequenz der siRNA-Moleküle ab (Sledz et al., 2003; Judge et al., 2005).

Auch wenn die *in vivo*-Verfügbarkeit prinzipiell belegt ist (Lewis et al., 2002; McCaffrey et al., 2002; Tiscornia et al., 2003), sind der Transport, die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung bis jetzt nur unzureichend untersucht. Die Anforderung an ein optimales *in vivo*-Transfektionsreagenz sind Protektion der siRNA, effizienter Transport, Aufnahme in die Zielzelle und Freisetzung der RNA in der Zelle. Es gibt zwar viele Ansätze für Transfektionsreagenzien, welche erforscht werden (z.B. virale Vektoren, kationische Lipide und DNA-Expression-Plasmide), doch besitzen alle diese Transfektionsreagenzien limitierende Faktoren.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die RNA-Interferenz mittels siRNA ein sehr verheißungsvoller Ansatz der Gen-Stillegung ist. In Zukunft muss aber vor allem die *in vivo*-Verfügbarkeit weiter erforscht werden und effektive Transfektionsreagenzien bzw. *in vivo*-Applikationsarten untersucht werden. Auch müssen die unspezifischen Effekte der siRNA weiterhin untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen kann sicherlich von der bereits großen Erfahrung bei der Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden profitiert werden.

5 Zusammenfassung

Zur Zeit sind bösartige Tumoren immer noch eine der häufigsten Todesursachen, da die Therapiemethoden aufgrund der häufig multifaktoriellen Genese der Tumoren oft nicht ausreichend wirksam sind. Ein neuer Therapieansatz besteht in der Kombination von Chemotherapie und selektiven Stoffen, welche zielgerichtet auf molekularer Ebene wirken und somit spezifisch die Translation bestimmter Proteine, welche in die Kanzerogenese involviert sind, herunterregulieren. Beispiel für diese innovativen Therapiemethoden sind zum einen Antisense-Oligonukleotide und zum anderen die RNA-Interferenz mittels siRNA. Zielprotein unserer Arbeit war das proliferationsassoziierte Ki-67-Protein, welches als prognostischer Marker für viele Tumoren gilt.

Als Grundlage für die Kombinationsversuche wurde zunächst die Auswirkung der Antisense-Behandlung auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR und auf zellulärer Ebene mittels zweier Proliferationsassays bestimmt. Hierbei konnte bei MCF7- (Mamma-Karzinom) und J82-Zellen (Harnblasen-Karzinom) eine Reduktion des mRNA-Levels bzw. der Zellviabilität gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Antisense-Behandlung an Sphäroiden, welche ein dreidimensionales Tumormodell darstellen, untersucht. Hierbei zeigten sich bei niedrigen Konzentrationen und kurzer Behandlungsdauer überraschenderweise paradoxe Effekte auf das Wachstum der Sphäroide.

Anhand dieser Vorversuche wurde als geeignete Zelllinie für eine Kombinationstherapie die Zelllinie MCF7 ausgewählt. Allerdings zeigten sich bei der Kombination von Antisense-Oligonukleotiden und den Chemotherapeutika Cis-Platin und Gemcitabin keine synergistischen Effekte beider Therapiemethoden. Bei der Kombination mit Taxol kam es sogar zu einer erhöhten Zellviabilität. Somit konnte durch diese Versuche die Erkenntnis gewonnen werden, dass diese Kombinationen nicht synergistisch wirksam sind. Weitere Experimente mit Fibroblasten ergaben, dass vermutlich durch die Hemmung der Proliferation die Chemotherapeutika unwirksam werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Kombinationsbehandlung prinzipiell ein vielversprechender Ansatz der Krebstherapie ist. Man muss die Kombinationen vor einer *in vivo*-Gabe aber sehr kritisch *in vitro* untersuchen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die siRNA-Behandlung von Ki-67 in unserem Labor etabliert und auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR untersucht. Hier zeigte sich, dass das Ki-67-Protein einen vielversprechenden Ansatzpunkt der Behandlung

darstellt und im Vergleich mit der Antisense-Behandlung niedrigere Konzentrationen benötigt wurden.

6 Literaturverzeichnis

- Aaltomaa S, Lipponen P, Vesalainen S, Ala-Opas M, Eskelinen M und Syrjänen K. 1997. Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer
Eur Urol 32: 410-415
- Acker H, Carlsson J, Holtermann G, Nederman T und Nylen T. 1987a. Influence of glucose and buffer capacity in the culture medium on growth and pH in spheroids of human thyroid carcinoma and human glioma origin
Cancer Res 47: 3504-3508
- Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W und Sutherland RM. 1987b. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques
Br J Cancer 56: 325-237
- Advani R, Peethambaram P, Lum BL, Fisher GA, Hartmann L, Long HJ, Halsey J, Holmlund JT, Dorr A und Sikic BI. 2004. A Phase II trial of aprinocarsen, an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C alpha, administered as a 21-day infusion to patients with advanced ovarian carcinoma
Cancer 100: 321-6
- Alitalo K, Winqvist R, Lin CC, de la Chapelle A, Schwab M und Bishop JM. 1984. Aberrant expression of an amplified c-myc oncogene in two cell lines from a colon carcinoma
Proc Natl Acad Sci U S A 81: 4534-8
- Baker BF, Lot SS, Condon TP, Chen-Flournoy S, Lesnik EA, Sasmor H und Benett CF. 1997. 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells
J Biol Chem 272: 11994-12000
- Balaji KC, Koul H, Mitra S, Maramag C, Reddy P, Menon M, Malhotra RK und Laxmanan S. 1997. Antiproliferative effects of c-myc antisense oligonucleotide in prostate cancer cells: a novel therapy in prostate cancer
Urology 50: 1007-15
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanisms and function
Cell 116: 281-297
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, DeConti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG; Oblimersen Melanoma Study Group. 2006. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group
J Clin Oncol 24: 4738-45
- Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JEE und Mirabelli CK. 1992. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides
Mol Pharmacol 41: 1023-1033

-
- Berezna SY, Supekova L, Supek F, Schultz PG und Deniz AA. 2006. siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites
Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7682-7
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM und Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference
Nature 409: 363-6
- Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A und Malvy C. 2002. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo
Biochem Biophys Res Commun 296: 1000-1004
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U und Filipowicz W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines
Proc Natl Acad Sci U S A 98: 14428-33
- Biroccio A, Benassi B, D'Agnano I, D'Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, Ricciotti A, Citro G, Cosimelli M, Ramsay RG, Calabretta B und Zupi G. 2001a. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings
Am J Pathol 158: 1289-99
- Biroccio A, Benassi B, Amodei S, Gabellini C, Del Bufalo S und Zupi G. 2001b. c-Myc down-regulation increases susceptibility to cisplatin through reactive oxygen species-mediated apoptosis in M14 human melanoma cells
Mol Pharmacol 60:174-82
- Biroccio A, Leonetti C und Zupi G. 2003. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments
Oncogene 22: 6579-88
- Braasch DA, Paroo Z, Constantinescu A, Ren G, Oz OK, Mason RP und Corey DR. 2004. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA
Bioorg Med Chem Lett 14: 1139-43
- Borre M, Bentzen SM, Nerstrom B und Overgaard J. 1998. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly
J Urol 159: 1609-1614
- Bracke M, Romijn H, Vakaet L, Vyncke B, De Mets M und Mareel M. 1992. The use of spheroids in the study of invasion
Spheroid Culture in Cancer Research Ed. R. Bjerkvig, Boca Raton: CRC Press 73-105
- Braun N, Papadopoulos T und Müller-Hermelink HK. 1988. Cell Cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 56: 25-33

-
- Brazas RM und Hagstrom JE. 2005. Delivery of small interfering RNA to mammalian cells in culture by using cationic lipid/ polymer-based transfection reagents
Methods Enzymol 392: 112-124
- Breaker, RR. 2004. Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology
Nature 432: 838-845
- Bridger JM, Kill IR und Lichter P. 1998. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells
Chromosome Res 6: 13-24
- Bruno S und Darzynkiewicz Z. 1992. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells
Cell Prolif 25: 31-40
- Buchon N und Vaury C. 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements
Heredity 96: 195-202
- Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J und Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells
J Cell Physiol 206: 624-35
- Caplen NJ, Fleenor J, Fire A und Morgan RA. 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference
Gene 252: 95-105
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A und Morgan RA. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems
Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9742-9747
- Carlsson J und Acker H. 1988 Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids
Int J Cancer 15: 715-20
- Carlsson J. 1992. Tumor spheroids in studies of immunotherapy
Spheroid Culture in Cancer Research Ed. R. Bjerkvig, Boca Raton: CRC Press 277-306
- Carlsson J und Nederman T. 1992. Tumor spheroids as a model in studies of drug effects
Spheroid Culture in Cancer Research Ed. R. Bjerkvig, Boca Raton: CRC Press 199-216
- Carrington JC und Ambros V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development
Science 301: 336-8
- Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ und Plasterk RH. 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes

-
- Nature 425: 411-4
- Chao DT und Korsmeyer SJ. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death
Annu Rev Immunol 16: 395-419
- Chi KN, Gleave ME, Klasa R, Murray N, Bryce C, Lopes de Menezes DE, D'Aloisio S und Tolcher AW. 2001. A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer
Clin Cancer Res 7: 3920-7
- Chiang MY, Chan H, Zounes MA, Freier SM, Lima WF und Bennet CF. 1991. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms
J Biol Chem 266: 18162-18171
- Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon A und Nesterova M. 1995. cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth
Crit Rev Oncol Hematol 21: 33-61
- Cho-Chung YS. 1997. Antisense DNA toward type I protein kinase A produces sustained inhibition of tumor growth
Proc Assoc Am Physicians 109: 23-32
- Ciardiello F und Tortora G. 1998. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications
Clin Cancer Res 4: 821-8
- Citro G, D'Agnano I, Leonetti C, Perini R, Bucci B, Zon G, Calabretta B und Zupi G. 1998. c-myc antisense oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of cisplatin in melanoma chemotherapy in vitro and in nude mice
Cancer Res 58: 283-9
- Cogoni C und Macino G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase
Nature 399: 166-169
- Cooper SR, Taylor JK, Miraglia LJ und Dean NM. 1999. Pharmacology of antisense oligonucleotide inhibitors of protein expression
Pharmacol Ther 82: 427-435
- Crooke ST, Graham MJ, Zuckerman JE, Brooks D, Conklin BS, Cummins LL, Greig MJ, Guinasso CJ, Kornbrust D, Manoharan M, Sasmor HM, Schleich T, Tivel KL und Griffey RH. 1996. Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice
J Pharmacol Exp Ther 277: 923-37
- Crooke ST. 2004. Progress in antisense technology
Annu Rev Med 55: 61-95

-
- Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Frier SM, McGee D, Guinosso CJ und Cook PD. 1995. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridisation and nuclease sensitivity
Nucleic Acids Res 23: 2019-2024
- Dallas A und Vlassov AV. 2006. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential
Med Sci Monit 12: RA67-74
- Dang CV. 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism
Mol Cell Biol 19: 1-11
- Dean NM, McKay R, Condon TP und Bennett CF. 1994. Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters
J Biol Chem 269: 16416-16424
- Denli AM, Hannon GJ. 2003. RNAi: an ever-growing puzzle
Trends Biochem Sci 28: 196-201
- Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, Kissler S, Rubinson DA und Van Parijs L. 2005. RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes
Annu Rev Physiol 67: 147-173
- Doench JG, Petersen CP und Sharp PA. 2003. SiRNAs can function as MiRNAs
Genes Dev 17: 438-442
- Donis-Keller H. 1979. Site specific enzymatic cleavage of RNA
Nucleic Acids Res 7: 179-192
- Dorr FA, Glover JM und Kwoh J. 2001. Clinical safety of phosphorothioate oligodeoxynucleotides
Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications. New York: Marcel Dekker
- Drewinko B, Patchen M, Yang L-Y und Barlogie B. 1981. Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells
Cancer Res 41: 2328-2333
- Dykxhoorn DM, Novina CD und Sharp PA. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression
Nat Rev Mol Cell Biol 4: 457-467
- Ebinuma H, Saito H, Kosuga M, Wakabayashi K, Saito Y, Takagi T, Nakamoto N, Okuyama T und Ishii H. 2001. Reduction of c-myc expression by an antisense approach under Cre/loxP switching induces apoptosis in human liver cancer cells
J Cell Physiol 188: 56-66

-
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells
Nature 411: 494-498
- Endl E und Gerdes J. 2000. Posttranslational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis
J Cell Physiol 182: 371-80
- Endl E, Kausch I, Baack M, Knippers R, Gerdes J und Scholzen T. 2001. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells
J Pathol 195: 457-62
- Engebraaten O. 1992. Tumour cell invasion in vitro in syngeneic and heterologous systems
Spheroid Culture in Cancer Research Ed. R. Bjerkvig, Boca Raton: CRC Press 107-132
- Felgner PL, Gadek RR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz J, Northrop JP, Ringold GM und Danielson M. 1987. Lipofection: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure
Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7413
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*
Nature 391: 806-811
- Freyer JP. 1992. Spheroids in radiobiology research
Spheroid Culture in Cancer Research Ed. R. Bjerkvig, Boca Raton: CRC Press 217-275
- Gelmon K, Batist G, Chi K, Sandor V, Webb M, D'Aloisio S, Burge C, Saltman D, Miller W und Goldie J. 2001. Proceedings of AACR-NCI-EORT, Targets and Therapeutics, Miami Beach, 29 October-2 November, Abstract 801
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H und Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation
Int J Cancer 31: 13-20
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E und Flad H-D. 1991. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67
Am J Pathol 138: 867-873
- Gresch O, Engel FB, Nestic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G und Lun K. 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells
Methods 33: 151-63

- Griffin CA und Baylin SB. 1985. Expression of the c-myc oncogene in human small cell lung carcinoma
Cancer Res 45: 272-5
- Grishok A und Mello CC. 2002. RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*)
Adv Genet 46: 339-360
- Goel S, Desai K, Macapinlac M, Wadler S, Goldberg G, Fields A, Einstein M, Volterra F, Wong B, Martin R und Mani S. 2006. A phase I safety and dose escalation trial of docetaxel combined with GEM231, a second generation antisense oligonucleotide targeting protein kinase A R1alpha in patients with advanced solid cancers
Invest New Drugs 24: 125-34
- Haldar S, Chintapalli J und Croce CM. 1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells
Cancer Res 56: 1253-5
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D und Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in drosophila
Nature 404: 293-296
- Hammond SM, Caudy AA und Hannon GJ. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA
Nature Rev Gen 2: 110-119
- Hannon GJ. 2002. RNA interference
Nature 418: 244-257
- Henry S, Stecker K, Brooks D, Monteith D, Conklin B und Bennett CF. 2000. Chemically modified oligonucleotides exhibit decreased immune stimulation in mice
J Pharmacol Exp Ther 292: 468-79
- Herschlag D. 1991. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules in vivo: more isn't always better
Proc Natl Acad Sci U S A 88: 6921-5
- Hofmann K und Bucher P. 1995. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors
Trends Biochem Sci 20: 347-349
- Howard K. 2003. Unlocking the money-making potential of RNAi
Nat Biotechnol 21: 1441-1446
- Jaattela M. 1999. Escaping cell death: survival proteins in cancer
Exp Cell Res 248: 30-43
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G und Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi
Nat Biotechnol 21: 635-7

- Jackson AL und Linsley PS. 2004. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?
Trends Genet 20: 521-4
- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Muller M, Wolff K, Eichler HG und Pehamberger H. 1998. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice
Nat Med 4:232-4
- Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K und Pehamberger H. 2000. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy
Lancet 356: 1728-33
- Janssen JW, Vernole P, de Boer PA, Oosterhuis JW und Collard JG. 1986. Sublocalization of c-myc to 6q21----q23 by in situ hybridization and c-myc expression in a human teratocarcinoma with 6q rearrangements
Cytogenet Cell Genet 41: 129-35
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K und MacLachlan I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA
Nat Biotechnol 23: 457-62
- Kang Y, Cortina R und Perry RR. 1996. Role of c-myc in tamoxifen-induced apoptosis estrogen-independent breast cancer cells
J Natl Cancer Inst 88: 279-84
- Kausch I, Ewerdwalbesloh N, Jiang H, Doehn C, Kruger S und Jocham D. 2005a. Kombinationsbehandlung mit Antisense-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika in vitro
Der Urologe A, 44: 909-14
- Kausch I, Jiang H, Brocks C, Albers A, Krüger C, Sczakiel G und Jocham D. 2005b. Ki-67 Antisense-Therapie in murinen Nierenzellkarzinom-Modellen
Aktuelle Urol 36: 142-8
- Kausch I, Lingnau A, Endl E, Sellmann K, Deinert I, Ratliff TL, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J und Böhle A. 2003. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo
Int J Cancer 105: 710-6
- Khatsenko O, Morgan R, Truong L, York-Defalco C, Sasmor H, Conklin B und Geary RS. 2000. Absorption of antisense oligonucleotides in rat intestine: effect of chemistry and length
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10: 35-44
- Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT und Buchholz F. 2004. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division

Nature 432: 1036-40

Klasa RJ, Bally MB, Ng R, Goldie JH, Gascoyne RD und Wong FM. 2000. Eradication of human non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by BCL-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide
Clin Cancer Res 6: 2492-500

Klinman DM. 1998. Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides
Antisense nucleic acid drug dev 1998 8: 181-184

Knuechel R und Sutherland RM. 1990. Recent developments in research with human tumor spheroids
Cancer J 3: 234-243

Kretschmer-Kazemi Far R und Sczakiel G. 2003. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides
Nucleic Acids Res 31: 1-8

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA und Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation
Nature 374: 546-549

Kunz-Schughart LA, Kreutz M und Knuechel R. 1998. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology
Int J Exp Path 79: 1-23

Kurreck J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications
Eur J Biochem 270: 1628-44

Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M und Rao JS. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis
Oncogene 23: 4681-9

Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, Citro G, Fornari C, Mottolese M, Del Bufalo D und Zupi G. 1999. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin
Clin Cancer Res 5: 2588-95

Levin AA. 1999. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides
Biochim Biophys Acta 1489: 69-84

Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA und Herweijer H. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice
Nat Genet 32: 107-8

-
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L und Hannon GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi
Science 305: 1437-41
- Liu Q und Gazitt Y. 2003. Potentiation of dexamethasone-, paclitaxel-, and Ad-p53-induced apoptosis by Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides in drug-resistant multiple myeloma cells
Blood 101: 4105-14
- Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS und Neckers LM. 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells
Proc Natl Acad Sci U S A 86: 3474-3478
- MacCallum DE und Hall PA. 2000. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle
J Pathol 190: 537-544
- Maher LJ 3rd, Wold B und Dervan PB. 1989. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation
Science 245: 725-30
- Marcusson EG, Bhat B, Manoharan M, Bennett CF und Dean NM. 1998. Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus
Nucleic Acids Res 26: 2016-2023
- Marshall J, Chen H, Yang D, Figueira M, Bouker KB, Ling Y, Lippman M, Frankel SR und Hayes DF. 2004. A phase I trial of a Bcl-2 antisense (G3139) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors
Ann Oncol 15: 1274-83
- Marwick C. 1998. First "antisense" drug will treat CMV retinitis
JAMA 280: 871
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP und Zamore PD. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes
Cell 123: 607-20
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ und Kay MA. 2002. RNA interference in adult mice
Nature 418: 38-9
- McManus MT und Sharp PA. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs
Nat Rev Genet 3: 737-747

- Miayake H, Tocher A und Gleave ME. 2000. Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer with the use of antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides
J Natl Cancer Inst 92: 34-41
- Mita MM, Ochoa L, Rowinsky EK, Kuhn J, Schwartz G, Hammond LA, Patnaik A, Yeh IT, Izbicka E, Berg K und Tolcher AW. 2006. A phase I, pharmacokinetic and biologic correlative study of oblimersen sodium (Genasense, G3139) and irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer
Ann Oncol 17: 313-21
- Miyagishi M, Hayashi M und Taira K. 2003. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same target in mammalian cells
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 13: 1-7
- Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G und Cetto GL. 1997. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis
Int J Cancer 74: 433-437
- Montgomery MK und Fire A. 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression
Trends Genet 14: 225-228
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays
J Immunol Methods 65: 55-63
- Mueller-Klieser W. 1987. Multicellular spheroids. A revision cellular aggregates in cancer research
J Cancer Res Clin Oncol 113: 101-122
- Neeman M, Abramovitch R, Schiffenbauer YS und Tempel C. 1997. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle
Int J Exp Path 78: in press
- Nemunaitis J, Holmlund JT, Kraynak M, Richards D, Bruce J, Ognoskie N, Kwoh TJ, Geary R, Dorr A, Von Hoff D und Eckhardt SG. 1999. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C-alpha, in patients with advanced cancer
J Clin Oncol 17: 3586-95
- Ngo H, Tschudi C, Gull K und Ullu E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*
Proc Natl Acad Sci USA 95: 14687-14692
- O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Bociek RG, Pavletic S und Rai KR. 2007. Randomized phase III trial of

- fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia
J Clin Oncol 25: 1114-20
- Omi K, Tokunaga K und Hohjoh H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons
FEBS Lett 558: 89-95
- Oza AM, Elit L, Swenerton K, Faught W, Ghatage P, Carey M, McIntosh L, Dorr A, Holmlund JT, Eisenhauer E; NCIC Clinical Trials Group Study (NCIC IND.116). 2003. Phase II study of CGP 69846A (ISIS 5132) in recurrent epithelial ovarian cancer: an NCIC clinical trials group study (NCIC IND.116)
Gynecol Oncol 89: 129-33
- Paz-Ares L, Douillard JY, Koralewski P, Manegold C, Smit EF, Reyes JM, Chang GC, John WJ, Peterson PM, Obasaju CK, Lahn M und Gandara DR. 2006. Phase III study of gemcitabine and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer
J Clin Oncol 24: 1428-34
- Plaat B, Kole A, Mastik M, Hoekstra H, Molenaar W und Vaalburg W. 1999. Protein synthesis rate measured with L-[1-11C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody detected proliferation in human soft tissue sarcomas
Eur J Nucl Med 26: 328-332
- Rand TA, Petersen S, Du F und Wang X. 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation
Cell 123: 621-9
- Rao S, Watkins D, Cunningham D, Dunlop D, Johnson P, Selby P, Hancock BW, Fegan C, Culligan D, Schey S, Morris TC, Lissitchkov T, Oliver JW und Holmlund JT. 2004. Phase II study of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C alpha, in patients with previously treated low-grade non-Hodgkin's lymphoma
Ann Oncol 15: 1413-8
- Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M und Petito CK. 2000. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma
Am J Pathol 157: 393-9
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death
J Cell Biol 124: 1-6
- Reed JC. 1995. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer
Toxicol Lett 82-83: 155-8
- Reeve JG, Xiong J, Morgan J und Bleehen NM. 1996. Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance

- Br J Cancer 73: 1193-200
- Ritch P, Rudin CM, Bitran JD, Edelman MJ, Makalinao A, Irwin D, Lilenbaum R, Peterson P und John WJ. 2006. Phase II study of PKC-alpha antisense oligonucleotide aprinocarsen in combination with gemcitabine and carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer
Lung Cancer 52: 173-80
- Rudin CM, Otterson GA, Mauer AM, Villalona-Calero MA, Tomek R, Prange B, George CM, Szeto L und Vokes EE. 2002. A pilot trial of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, and paclitaxel in patients with chemorefractory small-cell lung cancer
Ann Oncol 13: 539-45
- Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M und Collins FS. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells
Proc Natl Acad Sci U S A 101: 1892-7
- Scheer U und Hock R. 1999. Structure and function of the nucleolus
Curr Opin Cell Biol 11: 385-390
- Schlingensiepen R, Brysch W und Schlingensiepen KH. 1996. Antisense – from technology to therapy
Lab manual and testbook. Willston, USA: Blackwell Science Vol. 6
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad H-D und Gerdes J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins
J Cell Biol 123: 513-522
- Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, von der Sar S, Cowell IG, Gerdes J und Singh PB. 2002. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure
J Pathol 196: 135-44
- Scholzen T und Gerdes J. 2000. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown
J Cell Physiol 182: 311-322
- Schumacher C. 2000. Cellular pharmacology of antisense oligodeoxynucleotides
Methods Enzymol 314: 440-54
- Sewell KL, Geary RS, Baker BF, Glover JM, Mant TG, Yu RZ, Tami JA und Dorr FA. 2002. Phase I trial of ISIS 104838, a 2'-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting tumor necrosis factor-alpha
J Pharmacol Exp Ther 303: 1334-43

-
- Seyhan AA, Vlassov AV, Ilves H, Egry L, Kaspar RL, Kazakov SA und Johnston BH. 2005. Complete, gene-specific siRNA libraries: production and expression in mammalian cells
RNA 11: 837-46
- Sharp PA. 1999. RNAi and double-strand RNA
Genes Dev 13: 139-141
- Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J und Froehler B. 1991. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum
Nucleic Acids Res 19: 747-50
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH und Williams BR. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs
Nat Cell Biol 5: 834-839
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH und Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons
Annu Rev Biochem 67: 227-264
- Stein CA und Cheng YC. 1993. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical?
Science 261: 1004-12
- Steiner U, Lingnau A, Kausch I, Jocham D, Kurzdidim H und Miller K. 2006. Phase-I-Dosis-Eskalierungsstudie (akzeleriertes Titrationsschema) zur intravesikalen Rezidiv-Prophylaxe mit dem Antisense-Oligonukleotid FFC15-01 bei Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase
Abstract, DGU-Kongress 2006
- Sumimoto H, Yamagata S, Shimizu A, Miyoshi H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Miyagishi M, Taira K und Kawakami Y. 2005. Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference
Gene Ther 12: 95-100
- Supino R, Perego P, Gatti L, Caserini C, Leonetti C, Colantuono M, Zuco V, Carenini N, Zupi G und Zunino F. 2001. A role for c-myc in DNA damage-induced apoptosis in a human TP53-mutant small-cell lung cancer cell line
Eur J Cancer 37: 2247-56
- Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA und Kruuv J. 1970. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumor model
Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 18: 491-495
- Sutherland RM. 1988. Cell and environment interactions in tumour microregions: the multicell spheroid model
Sci 240: 177-184
- Tarhini AA und Kirkwood JM. 2007. Oblimersen in the treatment of metastatic melanoma
Future Oncol 3: 263-71

-
- Temsamani J, Roskey A, Chaix C und Agrawal S. 1997. In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7: 159-65
- Thiele CJ, McKeon C, Triche TJ, Ross RA, Reynolds CP und Israel MA. 1987. Differential protooncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system
J Clin Invest 80: 804-11
- Thierry AR und Dritschilo A. 1992. Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity
Nucleic Acids Res 20: 5691-8
- Tijsterman M, Ketting RF und Plasterk RH. 2002. The genetics of RNA silencing
Ann Rev Genet 36: 489-519
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M und Verma IM. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA
Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1844-8
- Tolcher AW, Kuhn J, Schwartz G, Patnaik A, Hammond LA, Thompson I, Fingert H, Bushnell D, Malik S, Kreisberg J, Izbicka E, Smetzer L und Rowinsky EK. 2004. A Phase I pharmacokinetic and biological correlative study of oblimersen sodium (genasense, g3139), an antisense oligonucleotide to the bcl-2 mRNA, and of docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer
Clin Cancer Res 10: 5048-57
- Tolcher AW, Chi K, Kuhn J, Gleave M, Patnaik A, Takimoto C, Schwartz G, Thompson I, Berg K, D'Aloisio S, Murray N, Frankel SR, Izbicka E und Rowinsky E. 2005. A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer
Clin Cancer Res 11: 3854-61
- Tortora G, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, De Placido S, Bianco AR und Ciardiello F. 2000. Oral antisense that targets protein kinase A cooperates with taxol and inhibits tumor growth, angiogenesis, and growth factor production
Clin Cancer Res 6: 2506-12
- Tortora G, Caputo R, Damiano V, Fontanini G, Melisi D, Veneziani BM, Zunino F, Bianco AR und Ciardiello F. 2001. Oral administration of a novel taxane, an antisense oligonucleotide targeting protein kinase A, and the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa causes cooperative antitumor and antiangiogenic activity
Clin Cancer Res 7: 4156-63
- Tuschl T. 2001. RNA interference and small interfering RNAs
Chem Biochem 2: 239-245

- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, von Driel R, Brakenhoff GJ und Ramaekers FC. 1989a. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase
J Cell Sci 92: 123-130
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ und Ramaekers FC. 1989b. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes
J Cell Sci 92: 531-40
- Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM und Baker BF. 2003. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis
J Biol Chem 278: 7108-18
- Ui-Tei K, Zenno S, Miyata Y und Saigo K. 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target
FEBS Lett 479: 79-82
- Waterhouse PM, Graham MW und Wang MB. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13959-13964
- Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F und Cotter FE. 2000. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma
J Clin Oncol 18: 1812-23
- Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Beck T und Knapstein PG. 1995. Growth fractions (Ki-67) in primary breast cancers, with particular reference to node-negative tumors
Cancer Detect Prev 19: 446-450
- Xia H, Mao Q, Paulson HL und Davidson BL. 2002. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo
Nat Biotechnol 20: 1006-1010
- Xie D, Sham JS, Zeng WF, Che LH, Zhang M, Wu HX, Lin HL, Wen JM, Lau SH und Hu L. 2005. Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression
World J Gastroenterol 11: 3285-9
- Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV und Vlassov VV. 1989. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors
Proc Natl Acad Sci U S A 86: 6454-6458
- Yang G, Thompson JA, Fang B und Liu J. 2003. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumor growth in a model of human ovarian cancer
Oncogene 22: 5694-5701

-
- Yin D und Stuart CA. 2006. Gene silencing using small interference RNA in mast cells
Methods Mol Biol 315: 333-9
- Yokozaki H, Budillon A, Tortora G, Meissner S, Beaucage SL, Miki K und Cho-Chung YS. 1993. An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells
Cancer Res 53: 868-72
- Yoo BH, Bochkareva E, Bochkarev A, Mou TC und Gray DM. 2004. 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro
Nucleic Acids Res 32: 2008-16
- Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A und Sikic BI. 1999. Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer
Clin Cancer Res 5: 3357-63
- Zamecnik PC und Stephenson ML. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide
Proc Natl Acad Sci U S A 75: 289-292
- Zeng Y und Cullen BR. 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm
RNA 8: 855-60
- Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S und Schultz PG. 2004. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells
Proc Natl Acad Sci U S A 101: 135-40
- Zupi G, Scarsella M, Semple SC, Mottolese M, Natali PG und Leonetti C. 2005. Antitumor efficacy of bcl-2 and c-myc antisense oligonucleotides in combination with cisplatin in human melanoma xenografts: relevance of the administration sequence
Clin Cancer Res 11: 1990-8

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
2'-O-MOE	2'-O-(Methoxyethyl)-thiolierte Oligonucleotide
3'-UTR	3' nichttranslatierter Bereich der mRNA
AEC	3-amino-9-ethylcarbazol
Ago2	Protein der Argonaute-Familie
Ak	Antikörper
aPTT	aktvierte partielle Thromboplastin-Zeit
AS	Antisense
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA, in DNA umgeschriebene mRNA
CMV	Zytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
CTP	Cytosintriphosphat
Cy3	Indocarbocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DFC	dense fibrillar component
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FC	fibrillar center
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FHA	forkhead-associated, Proteinsequenzhomologie einer Gruppe nukleärer Proteine
FITC	Fluorescein isothiocyanate, Fluoreszenzfarbstoff
G ₀ -Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G ₁ -	Gap1-Phase

Phase	
G2-Phase	Gap2-Phase
GAPDH	Glyeraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	granular component
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HP1	heterochromatin protein 1
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IC50	inhibiting concentration, Konzentration des Agonisten, die 50% der maximal möglichen inhibitorischen Wirkung erzielt
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-6	Interleukin-6
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
Kon21	C-terminale Domäne von pKi-67
λ	Lambda, Wellenlänge
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCL2	Magnesiumchlorid
MIB	Molekular Immunology Borstel
MIB-1	Antikörper gegen das pKi-67, der in Borstel entwickelt wurde
min.	Minute
miRNA	micro RNA
miRNA	mikro RNA
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MW	Mediumwechsel
NH3	Ammoniak
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NS	Nonsense
nt	Basenpaare
ON	Oligodesoxynukleotide
P=S	Thiolierung des Phosphates
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	
I/II	Proteinkinase A I/II
PKC-alpha	Proteinkinase C alpha
pKi-67	Ki-67-Protein

PO	Peroxidase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPM	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
siRNA	small inhibiting RNA
S-Phase	Synthese-Phase
TAE	Tris-acetat, Tris-Azetat
TBS	Tris buffered saline, Tris gepufferte Saline
TLR-9	Toll-like receptor 9
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
uvm.	und vieles mehr
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

Zellkultur und Puffer

supplementiertes RPMI 1640 Medium (Rxx10+)

RPMI 1640-Fertigmedium (Gibco), supplementiert mit
10% inaktivem (30 Minuten bei 56°C) FCS (Linaris, Bettingen)
1% 200mM (100x) L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)
1% Penicillin / Streptomycin (Invitrogen) → 500 U/ml Penicillin und 500 mg/ml Streptomycin, als Penicillin G (Natrium-Salz) und Streptomycin-Sulfat in 0,9% NaCl-Lösung
1% Natriumpyruvat (PAA, Cölbe)
gefiltert durch Steritop Filter (Millipore)

Trypsin / EDTA Lösung (1x) (Biochrom, Berlin)

Trypanblau-Lösung 0,4% (Sigma, Deisenhofen)

10x TBS (Tris buffered saline)

24,2 g Tris (PAA)
175,6 g NaCl (PAA)
in 1 l Aqua dest. lösen
pH mit HCl (PAA) auf 7,4-7,6 einstellen

10x PBS (Phosphat buffered saline)

136 nM NaCl (PAA)
2,7 mM KCl (PAA)
10 mM Na₂HPO₄ (PAA)
1 mM KH₂PO₄ (PAA)

Kristallviolett (gelöst)

2,5 g Kristallviolett (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
375 ml Aqua dest.
25 ml Methanol

Natriumdeoxycholat

10 g Natriumdeoxycholat (PAA)

500 ml Aqua dest.

RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland)

Rneasy mini spin columns

Sammelgefäße (1,5 ml)

RLT-Puffer (mit 10 µl β-ME pro 1 ml RLT versetzen)

RW1-Puffer

RPE-Puffer (mit 4fachem am Volumen mit Ethanol verdünnen → hier: 44 ml Ethanol)

RNase-freies Wasser

β-Mercaptoethanol (β-ME) (PAA)**Ethanol (Merck)****TAE-Puffer (50x)**

242 g Tris (PAA)

57 ml Eisessig (PAA)

27,2 g Na₂EDTA·2H₂O (PAA)

ad 1000 ml Aqua dest.

→ ph circa 8,5

DNA-Puffer (6x)

25 mg Bromphenolblau (Merck)

4 g Saccharose (Merck)

ad 10 ml Aqua dest.

Agarose-Gel groß (klein)

1 g (0,5 g) Agarose (Sigma, Deisenhofen)

100 ml (50 ml) TAE-Puffer (1x) (s.o.)

ad 150 ml (100 ml) Aqua dest.

→ 4 Minuten in Mikrowelle bei höchster Leistung kochen, gießen, 4µl Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml) (Roth, Karlsruhe) hinzufügen und abkühlen lassen

Geräte:

Auflichtmikroskop: Leitz-Diavert (Leitz, Wetzlar)

Mikrozentrifuge: Mikro 20 mit 24fach Winkelrotor (Hettich, Tuttlingen)

Cytospin-Zentrifuge: Cytospin3 (Shandon, Pittsburgh, USA)

Mikroplattenspektrometer: Anthos reader 2001 (Anthos labtec, Wals, Österreich)

Spektralphotometer: SmartSpec™ 3000 (Bio-rad, München)

Cycler: i-Cycler (Bio-rad, München)

Cycler für quant. PCR: Gene Amp 5700 Sequence Detection System (Applied BioSystems, Foster City, USA)

9 Danksagung

Im nachfolgenden danke ich ganz herzlich allen Personen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Dabei darf ich ganz besonders erwähnen:

Priv.-Doz. Dr. med. Ingo Kausch von der Klinik für Urologie des UK-SH, Campus Lübeck, für die Bereitstellung des Themas der Arbeit, für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborversuche sowie für Diskussionen zum Manuskript-Aufbau und zu den Ergebnissen

Prof. Dr. med. Georg Sczakiel vom Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck für die Bereitstellung der Laborgeräte

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik für die ausführliche Beratung in statistischen Fragen

Kirsten Bruderek und Beate Thode vom Forschungslabor der Klinik für Urologie des UK-SH, Campus Lübeck, für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Laborversuchen

Elisabeth und Gerd Ewerdwalbesloh, meinen Eltern, für ihre ideelle Unterstützung

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nina Ewerdwalbesloh
Geburtstag und -ort	15. Juli 1980 in Frankfurt am Main
Familienstand	ledig

Schulbildung

1986 - 1990	Albert-Schweitzer-Grundschule (Langen)
1990 - 1999	Dreieich-Gymnasium (Langen)
1996 - 1997	Newberg Highschool (Oregon, USA)

Schulabschluss

1997	Highschool-Abschluss (Newberg, Oregon, USA)
1999	Abitur (Dreieich-Gymnasium, Langen), Note: 1,6

Hochschulausbildung

1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Sept. 2001	Physikum, Note 2,0
Aug. 2002	1. Staatsexamen, Note 2,0
Sept. 2004	2. Staatsexamen, Note 2,0
Mai 2006	3. Staatsexamen, Note 2,0

Praktisches Jahr

Pädiatrie: Universitätsklinikum Lübeck
Chirurgie: 8 Wochen Reykjavik, Island und 8 Wochen Sana Kliniken Lübeck
Innere: Sana Kliniken Lübeck

Beruf

seit Juli 2006 Assistenzärztin in der Kinderklinik des Krankenhauses Mariahilf in Hamburg

Sprachen: Englisch (9 Jahre), Französisch (5 Jahre), Latein (1 Jahr)

Publikationen

Kausch I, Ewerdwalbesloh N, Sczakiel G und Jocham D. 2004. RNA-Interferenz – Übersicht der Grundlagen und beispielhafte Anwendung am Ki-67-Antigen
Onkologie heute 5: 18-22

Kausch I, Ewerdwalbesloh N, Jiang H, Doehn C, Kruger S und Jocham D. 2005.
Kombinationsbehandlung mit Antisense-Oligonukleotiden und Chemotherapeutika
in vitro
Der Urologe A 44: 909-14

Kausch I, Jiang H, Ewerdwalbesloh N, Doehn C, Kruger S, Sczakiel G und Jocham D.
2005. Inhibition of Ki-67 in a renal cell carcinoma severe combined
immunodeficiency disease mouse model is associated with induction of apoptosis
and tumour growth inhibition
BJU Int 95: 16-20