

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

**c-Raf kontrollierte Signalwege  
zum Schutz der Tumorzelle vor Apoptose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Thomas Stübig**

aus Marburg

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
29.03.2007 gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. Müller

Correferent: PD. Dr. G. Jaques

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Einführung</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Tumorzellen</b> .....  | <b>3</b>  |
| 1.2.1      | Allgemeine Charakterisierung maligner Neoplasien.....                 | 3         |
| 1.2.2      | Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung .....                       | 4         |
| <b>1.3</b> | <b>Zelltod</b> .....  | <b>5</b>  |
| 1.3.1      | Unterschied Apoptose und Nekrose .....                                | 5         |
| 1.3.2      | Mechanismen der Apoptose.....   | 7         |
| <b>1.4</b> | <b>Raf-Signaltransduktion</b> .....                                   | <b>12</b> |
| 1.4.1      | C-Raf-Signaltransduktion und Zellzyklus.....                          | 12        |
| 1.4.2      | C-Raf-Signaltransduktion und Apoptose .....                           | 13        |
| <b>1.5</b> | <b>Antisense Oligodesoxynukleotide</b> .....                          | <b>15</b> |
| <b>1.6</b> | <b>RNA Interferenz (RNAi) und Small interfering RNA (siRNA)</b> ..... | <b>17</b> |
| <b>1.7</b> | <b>Ziel dieser Arbeit</b> .....                                       | <b>19</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden</b> .....                                    | <b>20</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Ständig verwendete Geräte, Materialien und Lösungen</b> .....      | <b>20</b> |
| 2.1.1      | Geräte .....  | 20        |
| 2.1.2      | Materialien .....   | 22        |
| 2.1.3      | Häufig verwendete Lösungen .....                                      | 22        |
| <b>2.2</b> | <b>Zellkultur</b> .....   | <b>23</b> |
| 2.2.1      | Verwendete Zelllinien .....   | 23        |
| 2.2.2      | Zellkulturmedien und Lösungen .....                                   | 23        |
| 2.2.3      | Kultivierung von Zellen .....   | 24        |
| 2.2.4      | Einfrieren und Auftauen von Zellen .....                              | 24        |
| 2.2.5      | Transfektion von Zellen.....  | 25        |
| 2.2.6      | Inhibitoren .....   | 28        |
| <b>2.3</b> | <b>Nukleinsäuren</b> .....  | <b>28</b> |
| 2.3.1      | Isolierung von RNA .....  | 28        |
| 2.3.2      | Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung von Nukleinsäuren.....       | 29        |
| 2.3.3      | RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion) .....       | 29        |
| 2.3.4      | Verwendete PCR Oligonukleotidprimer.....                              | 31        |
| 2.3.5      | cDNA Arrays (Makroarrays) .....                                       | 32        |
| 2.3.6      | Verwendete Phosphorothioat Oligonukleotide.....                       | 33        |
| 2.3.7      | Verwendete siRNA.....   | 33        |
| <b>2.4</b> | <b>Proteine</b> .....   | <b>34</b> |
| 2.4.1      | Proteinextraktion.....  | 34        |
| 2.4.2      | Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte .....                    | 35        |
| 2.4.3      | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....                       | 36        |
| 2.4.4      | Immuno-Blot.....  | 37        |
| <b>2.5</b> | <b>Apoptose Nachweis</b> .....  | <b>38</b> |
| 2.5.1      | Hoechst 33342/ Propidiumiodid- Färbung.....                           | 38        |
| 2.5.2      | Zellzahl und Toxizitäts Assay (Kristallviolett-Assay).....            | 39        |
| 2.5.3      | Caspase Assay .....   | 40        |
| <b>2.6</b> | <b>Fixierung von Zellen</b> .....                                     | <b>41</b> |
| 2.6.1      | Paraformaldehyd Fixierung.....  | 41        |
| <b>2.7</b> | <b>Mikroskopische Auswertung</b> .....                                | <b>41</b> |
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>42</b> |

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.1   | Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antisens Oligo-<br>desoxynukleotide (AS-ODN) und der small interfering RNA<br>(siRNA)..... | 42 |
| 3.2   | Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit AS-ODn bzw. siRNA<br>gegen c-Raf.....  | 47 |
| 3.3   | Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit dem c-Raf Inhibitor<br>BAY 43-9006 .....   | 49 |
|       | Ermittlung der IC 50 Werte für die verschiedenen Zelllinien .....   | 49 |
| 3.4   | Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit dem c-Raf Inhibitor<br>BAY 43-9006 .....   | 50 |
| 3.5   | Verhalten verschiedener EGF-Rezeptor Liganden durch die<br>unterschiedlichen Behandlungsmethoden.....                                 | 52 |
| 3.5.1 | Bei Behandlung mit AS-ODN.....  | 52 |
| 3.5.2 | Bei Behandlung mit siRNA.....   | 53 |
| 3.5.3 | Bei Behandlung mit dem Inhibitor BAY 43-9006.....   | 54 |
| 3.6   | Blockade des EGF-Rezeptors mittels Inhibitor AG 1478 .....  | 56 |
| 3.7   | Überprüfung einer differentiellen Genexpression mittels cDNA<br>Array.....  | 58 |
| 3.8   | Untersuchung des Expressionsmusters für den TNF-Rezeptor 1<br>(CD 120a) und survivin in den Tumorzelllinien.....                      | 59 |
| 4     | Diskussion .....  | 61 |
| 4.1   | Einführung .....  | 61 |
| 4.2   | Reduktion von c-Raf durch AS-ODN und siRNA.....   | 62 |
| 4.3   | Apoptoseinduktion durch die Reduktion von c-Raf.....  | 62 |
| 4.4   | C-Raf Kontrolle eines autokrinen Wachstumsfaktoren Loop.....  | 63 |
| 4.5   | Vergleich der siRNA, AS-ODS und Inhibitor-Daten mit dem EGF-<br>Rezeptor-Blocker AG1478.....  | 65 |
| 4.6   | cDNA Array Suche nach weiteren c-Raf regulierten Genen.....   | 66 |
| 4.7   | Zielgerichtete Therapie gegen c-Raf in der klinischen Anwendung<br>.....  | 66 |
| 4.8   | Ausblick.....   | 68 |
| 5     | Literaturverzeichnis .....  | 69 |
| 6     | Anhang.....   | 78 |
| 6.1   | Stichwörter .....   | 78 |
| 6.2   | Keywords .....  | 78 |
| 6.3   | Abkürzungsverzeichnis .....   | 79 |
| 6.4   | Zusammenfassung .....   | 81 |
| 6.5   | Summary .....   | 81 |
| 6.6   | Aus der vorliegenden Arbeit entstandener Artikel .....  | 82 |
| 7     | Meine akademischen Lehrer .....   | 82 |
| 8     | Lebenslauf.....   | 83 |
| 9     | Ehrenwörtliche Erklärung .....  | 85 |
| 10    | Danksagung .....  | 86 |

## **1 Einleitung**

### **1.1 Einführung**

Durch die Erkenntnisse der letzten Jahre hat sich das Wissen um die molekularen Prozesse in der Zelle ständig erweitert.

Dabei stellen die Vorgänge, die zum physiologischen Zelltod (Apoptose) führen, einen der spannendsten Bereiche der modernen Biologie dar.

Die Hoffnung dieser bio-medizinischen Forschung ist es, durch dieses Wissen in Zukunft molekulare Therapieansätze und Möglichkeiten gegen die in den Industriestaaten führenden Krankheiten wie Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs zu entwickeln.

Damit dies auch gelingt, müssen die Grundlagen, die z.B. eine Tumorzelle auszeichnen, verstanden sein. Nur wenn die Signalwege verstanden sind, die es einer Tumorzelle ermöglichen, sich vor dem Zelltod zu schützen, wird es auch möglich sein, diese so zu manipulieren, dass es wieder möglich ist, sie in die Apoptose zu treiben.

Viele Methoden, die wichtige Signalmoleküle in Tumorzellen ausschalten, wurden in den letzten Jahren vorgestellt. So bieten Antisense Oligodesoxynukleotide und „small interfering“ RNA gute Möglichkeiten, Zielgene und deren Funktion für die Vorgänge in der Zelle zu studieren. Somit können dann Signalwege besser verstanden und charakterisiert werden.

### **1.2 Tumorzellen**

Mit dem Begriff Tumor wird eigentlich nur die „örtliche Zunahme des Gewebevolumens“ beschrieben (s. Pschyrembel, Aufl. 258). Allerdings hat sich dieser Begriff ebenso für maligne Neoplasien etabliert.

Im Weiteren wird der Begriff Tumor und maligne Neoplasie jedoch synonym gebraucht, auch wenn dies streng genommen nicht korrekt ist.

#### **1.2.1 Allgemeine Charakterisierung maligner Neoplasien**

Die morphologischen Veränderungen von Tumorzellen werden beschrieben als verstärkte Basophilie des Zytoplasmas, Zunahme der Anzahl und der Größe der Nukleolen, einer Zunahme des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses, einer Retraktion des Zytoplasmas und einer erhöhten Bereitschaft der Zellen, sich in Haufen oder Strängen neu anzuordnen (Oberholzer, 2001).

Neben diesen Merkmalen kann man die Unterschiede von Tumorzellen zu Normalgewebe auch mit vier Überbegriffen zusammenfassen: 1. Differenzierung und Anaplasie, 2. Erhöhte Wachstumsrate, 3. Lokale Inversion und 4. Metastasierung (Cotran RS, 1999b).

Unter Anaplasie versteht man den Übergang höher differenzierten Gewebes in ein Gewebe mit niedrigerem Differenzierungsgrad (Pschyrembel, 1998). Dabei gehen klassische Merkmale eines Gewebes bei diesen Zellen verloren.

Im gleichen Zug erhöht sich die Wachstumsrate: Zum einen ist die Zahl mitotischer Zellen gesteigert, zum anderen ist die Rate der sterbenden Zellen verringert.

Lokale Invasion ist dadurch gekennzeichnet, dass sich Tumorzellen nicht an Gewebegrenzen halten, sondern über sie hinaus wachsen. Dieses Merkmal findet besondere Beachtung in der TNM-Klassifikation (Cancer, 1997).

Das letzte Kriterium der Metastasierung findet ebenso große Beachtung in der TNM-Klassifikation (Cancer, 1997). Die Frage, ob ein Tumor eine oder gar mehrere Metastasen abgesetzt hat, ist nicht nur für die Therapiewahl extrem entscheidend, sondern bestimmt maßgeblich die Prognose der Erkrankung.

Im Folgenden sollen die molekularen Grundlagen für die erhöhte Wachstumsrate und Ausprägung des malignen Phenotyps skizziert werden.

### **1.2.2 Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung**

Verschiedene Stoffe können beim Menschen als Karzinogene wirken. Chemische Verbindungen wie aromatisierte Kohlenwasserstoffe, aber auch Strahlung wie  $\gamma$ -Strahlung können in einer Zelle zu genetischen Veränderungen führen. Andere Ursachen stellen Viren oder genetische Dispositionen dar.

Bekommt eine Zelle dadurch einen Überlebensvorteil, fängt sie an zu wachsen und beginnt, sich zu teilen. Dabei werden die Mutationen an die Tochterzellen weitergegeben. Dies wurde von Nowell in der „Theorie der klonalen Evolution von Tumoren“ begründet (Nowell, 1976).

Genetische Veränderungen in Tumoren treffen vor allem zwei Gruppen von Genen: Zum einen die (Proto)-Onkogene und zum anderen die Tumorsuppressorgene.

Proto-Onkogene sind reguläre zelluläre Gene, die vor allem bei der Proliferation, aber auch bei Differenzierung und Mobilität eine wichtige Rolle spielen.

Man kann Onkogene grob in drei verschiedene Gruppen einteilen:

1. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie der EGF-Rezeptor (Lui and Grandis, 2002).
2. Intrazelluläre Signalvermittler wie z.B. Ras (Evan and Vousden, 2001), aber auch die an der Zellzyklusregulation beteiligten Cycline und die CDKs (Sherr, 2000).
3. Nukleäre Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc (Sherr, 2000; Nasi et al., 2001).

Diese Proto-Onkogene können auf verschiedenen Wegen zu Onkogenen aktiviert werden. Amplifikation, chromosomale Translokation oder Punktmutation stellen dabei häufige Mechanismen dar.

Unter Amplifikation versteht man eine Vervielfältigung des Gens. Bei der chromosomalen Translokation werden Bruchstücke eines Chromosoms an ein anderes Chromosom umgelagert,

dadurch kann es zur Zusammenlegung vorher getrennter Genregionen kommen. Bei der Punktmutation ändert sich eine Base im Basentriplet, was zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen kann und damit ein Proto-Onkogen zu einem konstitutiv aktivierten Onkogen verändern kann.

Die zweite große Gruppe, bei denen sich Mutationen in Tumoren nachweisen lassen, sind die Tumorsuppressorgene.

Bei den Tumorsuppressorgenen handelt es sich um normale zelluläre Gene, die hemmend auf das Zellwachstum wirken. Dabei führt der Verlust ihrer Funktion zu einer Deregulierung des Wachstums.

Auch die Tumorsuppressorgene kann man in drei Gruppen einteilen:

1. Moleküle, die die Transkription und den Zellzyklus regulieren wie Rb (Harbour and Dean, 2000) oder p53 (Robles et al., 2002).
2. Moleküle, die die Signalweiterleitung regulieren wie z.B. APC (Gumbiner, 1997).
3. Oberflächenrezeptoren wie der TGF beta Rezeptor (Derynck, 1994).

Zum anderen haben viele der Tumorsuppressorgene Verbindungen zu Signalwegen, die für die Auslösung der Apoptose verantwortlich sind. So kontrolliert das Rb-Gen nicht nur den Übergang von G<sub>1</sub> zur S-Phase, sondern ist über die Regulation von E2F mit ARF und damit mit der Apoptose verbunden (Harbour and Dean, 2000).

Eine Tumorzelle wird nur dann maligne transformieren, wenn sie neben der Aktivierung von Onkogenen es zum anderen auch schafft, Tumorsuppressorgene zu inaktivieren. Diese „Mehrschritt Theorie“ (Two Hit Hypothese) wurde von Fearon und Vogelstein für die kolorektale Karzinogenese formuliert (Fearon and Vogelstein, 1990).

## **1.3 Zelltod**

In diesem Teil sollen die unterschiedlichen Formen des Zelltodes Nekrose und Apoptose beschrieben sowie ein Einblick in die komplexen Mechanismen der Apoptose gegeben werden.

### **1.3.1 Unterschied Apoptose und Nekrose**

Eine Form des Zelltodes ist die Nekrose. Morphologisch handelt es sich dabei um die enzymatische Zerstörung der Zelle und die Denaturierung der zellulären Proteine (Cotran RS, 1999a).

Mit dem Begriff der Nekrose werden des Weiteren auch die vorangegangenen Veränderungen in der Zelle beschrieben. Dies müsste streng genommen als Onkose bezeichnet werden (Majno and Joris, 1995).

Wenn es aufgrund anhaltender (meist exogener) Noxen wie z.B. Ischämie zur Mangelversorgung der Zelle kommt, stellt sich ein Mangel an ATP ein.

ATP wird von der Zelle unter anderem für die zellulären Ionenpumpen gebraucht. Diese ermöglichen die Aufrechterhaltung des Ionenkonzentrationsgefälles von Intra- zu Extrazellulär. Fehlt der Zelle ATP, versagen damit auch die Ionenpumpen. Als Folge kommt es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in die Zelle, Wasser folgt den Ionen aus osmotischen Gründen nach.

Durch die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen werden Signalwege der Zelle beeinflusst und durch das vermehrte Volumen schwellen Zellorganellen wie endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien an (Trump et al., 1997). Das Anschwellen der Organellen führt zu ihrem Funktionsverlust, was im Fall der Mitochondrien zu einem weiteren Mangel an ATP führt. Je mehr ATP fehlt, desto mehr Ionenpumpen versagen und desto mehr nimmt das Anschwellen der Zellorganellen und der Zelle selbst zu.

Schlussendlich platzen die Membranen der Organellen und der Zelle. So werden aus den zellulären Lysosomen die Enzyme freigesetzt, die zur Denaturierung der zellulären Proteine führen (Cotran RS, 1999a).

Das Gewebe reagiert auf die Nekrose mit der Ausbildung einer Entzündung, um die Zelltrümmer abzuräumen und eine Wiederherstellung (*Restitutio ad integrum*) bzw. eine Defektreparatur (*Reperatio*) zu ermöglichen.

Der Begriff der Apoptose wurde 1972 für die morphologischen Veränderungen bei dieser Zelltodform geprägt (Kerr et al., 1972). Apoptose bedeutet im Griechischen so viel wie „herunter fallen“.

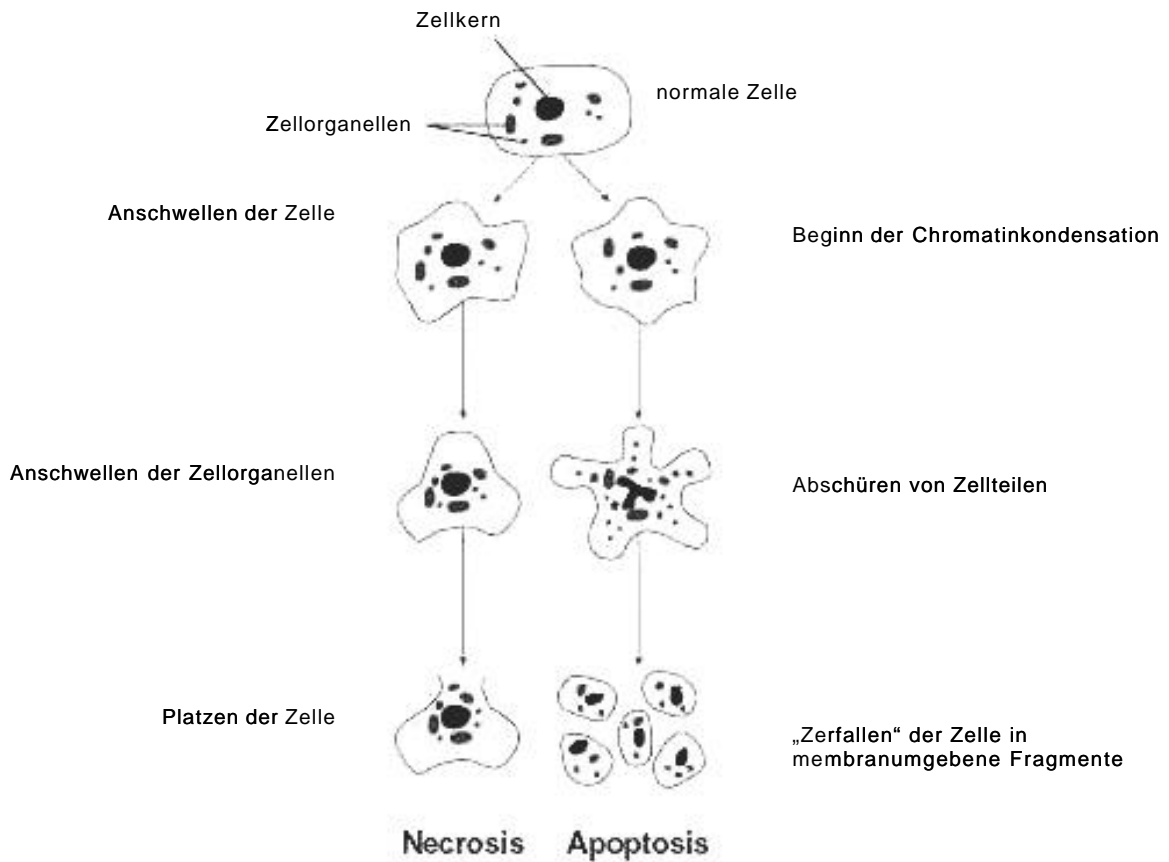
Bei der Apoptose handelt es sich um ein genau reguliertes Todesprogramm der Zelle. Dieses verläuft energieabhängig und schrittweise ab. Morphologisch ist es durch folgende Merkmale (Cotran RS, 1999a) gekennzeichnet:

1. Das Zellvolumen ist verkleinert, die Zellorganellen aber normal groß.
2. Chromatinkondensation: das Chromatin liegt eng gepackt an der Kernmembran an, später bricht es in mehrere Fragmenten auseinander.
3. Blasige Veränderungen der Zellmembran („Blebbing“): es werden immer wieder kleine membranumgebende Fragmente von der Zelle abgeschnürt.
4. Aufnahme der Zellkörperchen durch Phagozyten bzw. durch die Parenchymzellen, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt.

Durch die Apoptose ist es dem Körper möglich, gezielt Zellen zu eliminieren. Dabei werden Zellen ohne Funktion, wie die Zellen des Müller'schen Ganges beim männlichen Embryo, überschüssige Zellen, wie z.B. Blutzellen, fehlentwickelte Zellen, wie Neurone der Retina mit gestörtem Kontakt zu anderen Nervenzellen, Zellen, deren Aufgabe erfüllt ist, wie die des Kryptenepithels im Darm, oder Zellen mit malignem oder schädigendem Potenzial, so z.B. autoreaktive T-Zellen, oder Zellen, die genetische Schäden erfahren haben (Wagener, 1999), eliminiert.



Die Unterschiede in den beiden vorgestellten Zelltodesformen soll die untere Abbildung noch einmal verdeutlichen:



**Abb. 1.1 Morphologischer Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose**

(modifiziert nach Goodlett und Horn)

### 1.3.2 Mechanismen der Apoptose

Man kann die Apoptose in vier verschiedene Abschnitte unterteilen, die helfen diesen hochkomplexen Vorgang zu gliedern.

1. Ursachen und Signalwege der Apoptoseinduktion.
2. Positive und negative Kontrollmechanismen der Apoptose.
3. Phase des Zelltodes.
4. Phagozytose der „apoptotic bodies“.

### **Ursachen und Signalwege der Apoptoseinduktion**

Ursachen die zur Entstehung der Apoptose führen, können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen die positiven apoptotischen Signale und zum anderen der Verlust oder Entzug von Überlebenssignalen.

Als Beispiele für die positiven apoptotischen Signale werden hier die sog. Todes-Rezeptoren (Death-Receptors) und DNA-Schäden angeführt.

Die bekanntesten Todes-Rezeptoren sind Fas (CD 95) und der TNF-Rezeptor 1 (CD 120a). Sie gehören in die TNF-Rezeptor Superfamilie, die Typ I Membranrezeptoren sind. Charakteristisch für sie ist, dass sie eine Cysteinreiche Extrazellulärdomäne und eine sog. „Death-Domain“ intrazellulär besitzen (Nagata, 1997). Um ein apoptotisches Signal zu erzeugen, müssen sie trimerisieren. So aktiviert, assoziiert kurz darauf der „death-inducing signalling complex (DISC)“ zu diesem Rezeptor. Zuerst bindet FADD (Fas associated death domain) an den aktivierten Rezeptor Fas (Krammer, 2000). FADD enthält eine als „death effector domain (DED)“ bezeichnete Region, mit der es an die DED-Region der Pro-Caspase 8 binden und sie so zu sich rekrutieren (Krammer, 2000) kann.

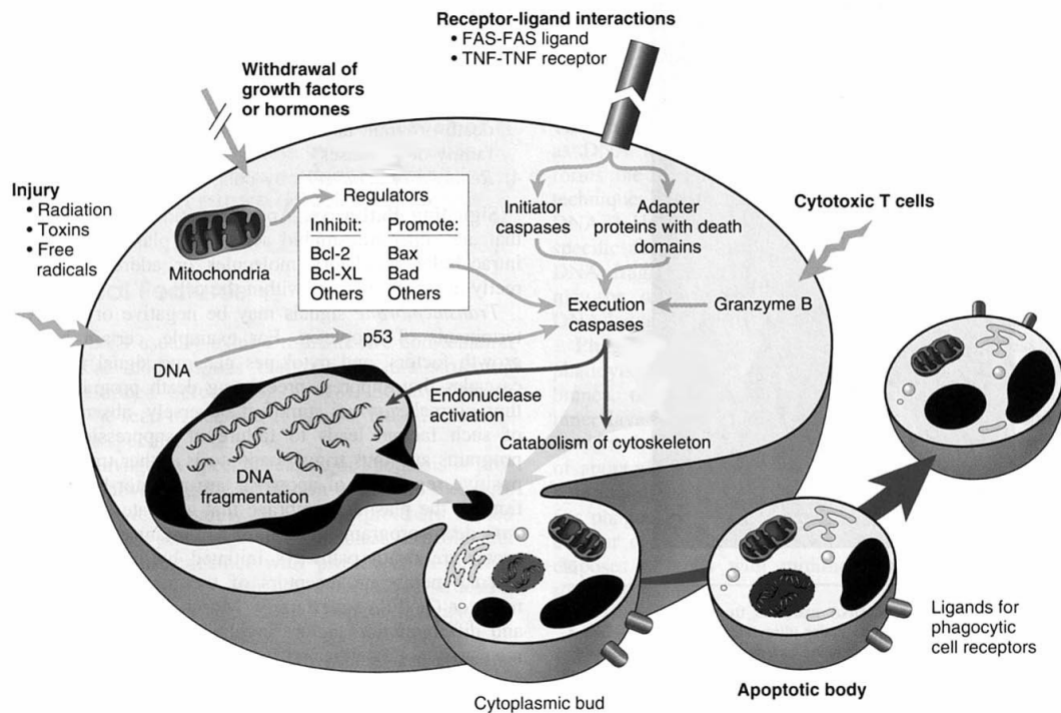
Bei der Signalvermittlung über den TNF-Rezeptor 1 ist zwischen FADD ein weiteres Adapterprotein TRADD („TNF-Receptor associated death domain“) zwischengeschaltet.

Durch die Assoziation mit FADD wird die Pro-Caspase 8 in die aktivierte Caspase 8 gespalten (Budihardjo et al., 1999). Caspase 8 kann dann die Pro-Caspase 3 zur aktiven Caspase 3 spalten (Krammer, 2000). Die Caspase 3 stellt eine der Effektor-Caspasen dar, die für den apoptotischen Zelltod verantwortlich sind (Hengartner, 2000).

DNA-Schäden führen häufig zur Aktivierung von p53. p53 kontrolliert eine Reihe von Genen, die den Zellzyklus kontrollieren, so z.B. p21, GADD45 und Mitglieder der 14-3-3 Familie. Daneben kontrolliert p53 aber auch Proteine, die in apoptotische Signalwege involviert sind, wie Fas selbst (Rich et al., 2000). Entscheidend ist aber, dass p53 vom Zellkern zu den Mitochondrien gelangt und dort über den mitochondrialen Weg die Apoptose auslöst (Marchenko et al., 2000).

Im Zwischenraum der Mitochondrienmembranen befindet sich Cytochrom c. Kann Cytochrom c aus den Mitochondrien gelangen, assoziiert es mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 zum sog. Apoptosom. Pro-Caspase 9 wird aktiviert und aktiviert dann wiederum Caspase 3 (Hengartner, 2000).

Eine so klare Trennung existiert zwischen den beiden Wegen der Apoptoseinduktion jedoch nicht. So ist der Weg über die Todes-Rezeptoren über die Caspase 8, die das Bid-Protein spaltet, welches dann die Freisetzung von Cytochrom c fördert, auch mit dem mitochondrialen Weg verbunden (Hengartner, 2000).



**Abb. 1.2: Darstellung der apoptotischen Signalwege**

(Darstellung aus „Robbins : Pathologic Basis of Disease“, 2000 Saunders)

### Positive und negative Kontrollmechanismen der Apoptose

Die Signalwege, die zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen, sind verschiedenen Kontrollmechanismen unterworfen, um einen spontanen Tod der Zelle zu verhindern.

Für die Signalwege über die „Death-Rezeptoren“ können drei verschiedene Kontrollsysteme unterschieden werden:

Erstens: Veränderte Todes-Rezeptoren. Goldstein beschrieb 1997 Schein-Rezeptoren, die den Todes-Rezeptoren DR 4 und DR 5 strukturell ähnlich sind und deren Liganden TRAIL binden, aber kein apoptotisches Signal weiterleiten (Golstein, 1997). Später konnte ein solcher Schein-Rezeptor auch für den Fas-Liganden gezeigt werden (Pitti et al., 1998).

Zweitens: Verhinderung der Aktivierung der Pro-Caspase 8 zu Caspase 8. Wie oben beschrieben, rekrutiert FADD die Pro-Caspase 8 zu den Todes-Rezeptoren und aktiviert sie zu Caspase 8. Verschiedene Arbeitsgruppen entdeckten zum viralen FLIP-Protein homologe Proteine wie FLAME-1 (Srinivasula et al., 1997), das mit FADD interagieren kann. Durch diese Interaktion an der „death effector domain“ von FADD, die für die Aktivierung der Pro-Caspase 8 verantwortlich ist, wird deren Aktivierung geblockt (Irmeler et al., 1997).

Die dritte Möglichkeit die Apoptoseinduktion durch die Todes-Rezeptoren zu verhindern, besteht in der Blockade der Caspasen. So wurden crmA als ein Protein beschrieben, welches die Aktivierung

verhindern kann (Komiyama et al., 1994). Daneben wird dadurch aber auch die oben beschriebene Querverbindung über Bid blockiert (Budihardjo et al., 1999).

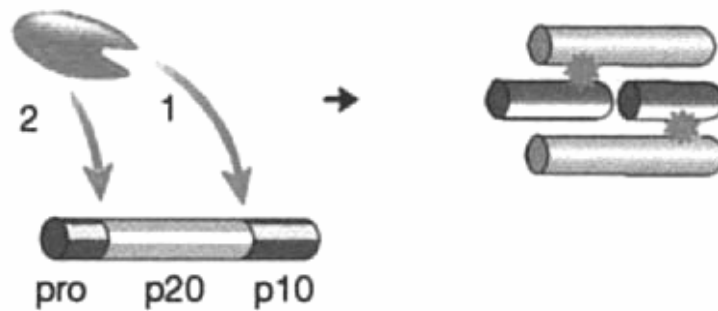
Auch der mitochondriale Weg ist durch Kontrollmechanismen gesichert. Die Bcl-2 Familie stellt die wichtigsten Kontrollproteine in diesem Signalweg. Sie umfasst neben den anti-apoptotischen Mitgliedern wie Bcl-2 und Bcl-xL auch pro-apoptotische Mitglieder wie Bid und BAD (Korsmeyer, 1999). Die anti-apoptotischen Bcl-2 Mitglieder verhindern das Austreten von Cytochrom c aus den Mitochondrien, während die pro-apoptotischen dies ermöglichen. Die Mitglieder der Bcl-2 Familie interagieren untereinander, sodass letztlich das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Mitgliedern über die Freisetzung von Cytochrom c entscheidet. Für den Mechanismus der Freisetzung gibt es verschiedene Theorien. Zum einen, dass sie Kanäle formen, die dann zur Freisetzung von Cytochrom c führen (Reed, 1997). Zum anderen, dass Mitglieder der Bcl-2 Familie zum Platzen der äußeren Membran der Mitochondrien führen und so Cytochrom c ins Zytoplasma gelangt (Hengartner, 2000). Ist Cytochrom c erst im Zytoplasma, bildet es mit Apaf-1 und Caspase 9 einen Komplex, der dann weitere Caspasen aktiviert (Li et al., 1997). So stellt die Kontrolle über die Freisetzung von Cytochrom c einen Schlüsselmechanismus dar, da es während der Apoptose fast immer zur Freisetzung von Cytochrom c kommt (Hengartner, 2000).

Zum Schluss der Regulationsmechanismen sei noch erwähnt, dass es neben den angesprochenen Systemen noch wesentlich mehr Akteure bei der Kontrolle der Apoptose gibt. So existiert die Gruppe der „inhibitor of apoptosis (IAP)“, die auf verschiedene Art und Weise die Apoptose verhindern. Ihnen gegenüber stehen „IAP-Inhibitors“ wie Smac und DIABLO, die an IAP-Vertreter binden und sie dadurch neutralisieren (Hengartner, 2000).

### **Phase des Zelltodes**

Die prägendsten Proteine in der Phase des Zelltodes sind die Caspasen. Caspasen sind mit dem in *C. elegans* beschriebenen Genprodukt CED-3 verwandt. CED-3 ist im Wurm für den Ablauf des Zelltodesprogrammes verantwortlich. Caspasen werden alle als Proenzym synthetisiert und bestehen aus drei Teilen: Einem NH<sub>2</sub>-Schlussterminus, einer großen p20-(~ 20 kD) Untereinheit und einer kleinen p10-(~10 kD) Untereinheit. Wenn sie aktiviert werden, werden die Untereinheiten voneinander gespalten, lagern sich dann aber erneut zusammen (Thornberry and Lazebnik, 1998). Die sich bildenden Heterodimere bestehen aus je zwei p20- und zwei p10-Einheiten. In diesem Zustand sind sie in der Lage, ihre Zielproteine hinter der Aminosäure Aspartat zu spalten (Hengartner, 2000).

Man unterscheidet Initiator-Caspasen wie die Caspasen 8, 10 und 9, diese werden von Kontrollmechanismen aktiviert. Wenn die Initiator-Caspasen aktiviert sind, stellt die zweite Klasse von Caspasen, die Pro-Effektor-Caspasen, ihr Zielprotein dar. Die Caspase 3, 6 und 7 wird so von den Initiator-Caspasen aktiviert. Die Effektor-Caspasen ihrerseits spalten dann ihre Zielproteine. Darunter befinden sich z.B. DNA-Nuklease-Inhibitoren (ICAD „inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease“) oder Proteine des Zytoskelletes (Thornberry and Lazebnik, 1998).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Caspasen-Aktivierung**

Die Pro-Caspase wird von einem Enzym gespalten, für die aktive Caspase lagern sich dann zwei p20- und zwei p10-Untereinheiten neu zusammen. (Darstellung aus Hengartner, M „The biochemistry of apoptosis“ 2000 Nature)

### Phagozytose der „apoptotic bodies“

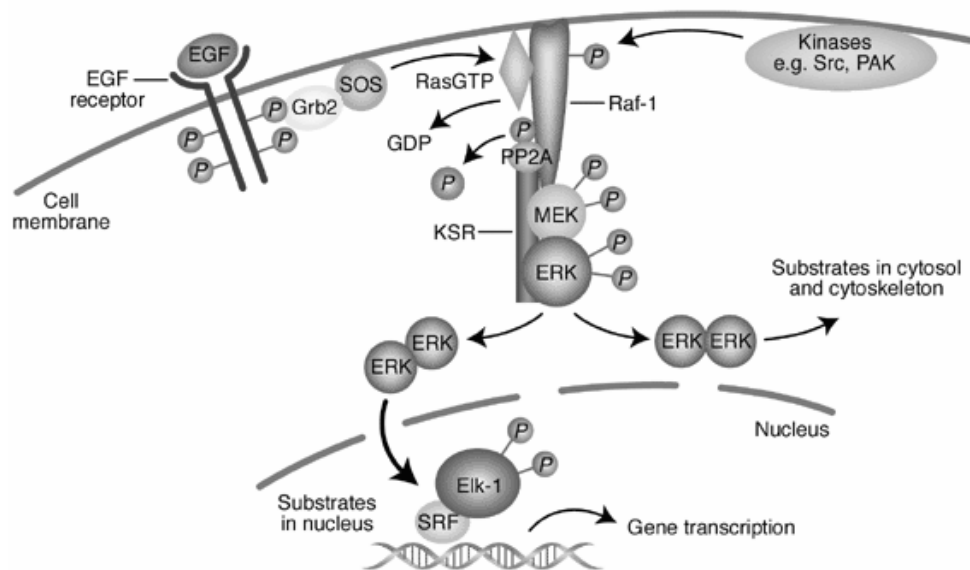
Der letzte Punkt im Prozess der Apoptose ist die Phagozytose der Apoptosekörperchen. Damit die apoptotischen Zellteile aufgenommen werden, gibt es eine Reihe von sog. Fress-Signalen („eat-me signal“). Dazu gehören Phosphatidylserin (PtdSer) und z.B. das „intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)“ (Savill and Fadok, 2000). Phosphatidylserine kommt bei vitalen Zellen nur in der Innenseite der Membran vor. Bei der Apoptose werden solche Phosphatidylserine auch an der Außenseite der Zellmembran gezeigt, was dann zum Erkennen der apoptotischen Zelle durch Phagozyten führt.

Ein weiterer, interessanter Aspekt bei der Phagozytose apoptotischer Zellen ist, dass diese keine Entzündung hervorrufen. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Makrophagen die apoptotischen Zellen über CD 36 erkennen. Neben der Erkennung der apoptotischen Zellen läuft über CD 36 auch die Signaltransduktion, die dann zur Produktion des anti-inflammatorischen Zytokin TGF Beta 1 führt (Savill and Fadok, 2000).

## 1.4 Raf-Signaltransduktion

Man unterscheidet drei Isoformen des Raf-Proteins: c-Raf (Raf-1), das ubiquitär exprimiert wird, A-Raf, welches im Urogenitaktakt vorkommt und B-Raf, welches im Nervensystem und Hoden exprimiert wird.

Allen gemeinsam ist, dass sie in der gleichen Signalkaskade vorkommen.



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Raf-Signalweges**

(Abbildung aus Kolch, W: „The role of Raf kinase in malignant transformation“ in Expertreviews in mol. Medicin, 2002 Cambridge University Press)

Dabei sind sie unterschiedlich starke Aktivatoren der Kaskade. A-Raf stellt den schwächsten Aktivator dar, während B-Raf der Stärkste ist (Kolch W, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von c-Raf untersucht, weshalb die beiden anderen Isoformen nicht weiter vorgestellt werden.

Die von c-Raf ausgehende Signaltransduktion soll hier in zwei Teile untergliedert werden. Zu Beginn wird die Signalweiterleitung zum Zellzyklus beleuchtet. Im zweiten Teil werden Signalwege vorgestellt, über die c-Raf die Apoptose beeinflusst.

### 1.4.1 C-Raf-Signaltransduktion und Zellzyklus

Der in Abbildung 1.4 skizzierte Signalweg zeigt, dass es durch die Aktivierung (Phosphorylierung) von c-Raf zur Phosphorylierung der „Mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated

kinase (MEK)“ kommt. MEK wird seinerseits aktiviert über Phosphorylierung die „Extracellular-signal-regulated kinase (Erk)“. Erk stellt mit über 50 Substraten den funktionellen Endpunkt der Kaskade dar (Kolch W, 2002). Aktiviert gelangt Erk in den Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren der Ets- Familie wie z.B. Elk-1.

Über diese Transkriptionsfaktoren wird die Transkription verschiedener Gene gesteuert.

1. c-Fos: c-Fos gehört in die Gruppe der „intermediate early Gens“ die für die Proliferation nach Wachstumsstimuli verantwortlich ist (Kolch W, 2002).
2. c-Myc: c-Myc gehört zu den Proto-Onkogenen. Es induziert z.B. die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2), die für ein Fortschreiten im Zellzyklus benötigt wird (Bouchard et al., 1999; Sears et al., 2000).
3. Der Cyclin D1 Promotor stellt eines der Ziele für die Kaskade dar. Cyclin D1 reguliert mit dem Übergang von der G1-Phase zur S-Phase (Lavoie et al., 1996).

Daneben gibt es aber auch noch andere Mechanismen wie die Raf-MEK-Erk Kaskade, auf die Proliferation Einfluss nimmt. So berichtete Wang 1998, dass cRaf direkt mit dem Rb-Protein interagiert und so Einfluss auf die Freisetzung von E2F nimmt (Wang et al., 1998). Aber auch die „cyclin dependent kinases inhibitors (CKI)“ werden von dem Raf-MEK-Erk Signalweg beeinflusst. So stellt CKI p21, das den Cyclin ECDK 2-Komplex inhibiert, ein Ziel der Kaskade dar (Marshall, 1999).

Es wird deutlich, dass der Raf-MEK-Erk-Signalweg viele verschiedene Auswirkungen auf das Kontrollsystem der Zellzykluskontrolle hat. Und so wundert es nicht, dass Mutationen in diesen Signalwegen in über 30% der malignen Tumoren gefunden wurden (Hoshino et al., 1999).

#### **1.4.2 C-Raf-Signaltransduktion und Apoptose**

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren über den Einfluss von c-Raf auf die Apoptose berichtet. So kann c-Raf myeloide Progenitorzellen bei Interleukin 3 (IL3) Entzug vor der Apoptose schützen (Cleveland et al., 1994), Epithelzellen bei Verlust des Extrazellulär-Matrix-Kontaktes (Schulze et al., 2001) aber c-Raf beeinflusst auch die durch Fas (CD 95) vermittelte Apoptose (Holmstrom et al., 2000) oder die Apoptose durch Behandlung mit Chemotherapeutika (Stadheim et al., 2001).

Im Folgenden sollen vier unterschiedliche Mechanismen vorgestellt werden, wie c-Raf Zellen vor der Apoptose schützt:

1. Einfluss auf die Apoptose über den Raf-MEK-Erk-Signalweg.
2. MEK-Erk-Signalweg-unabhängige Mechanismen.
3. C-Raf-Interaktion mit Bcl-2.
4. C-Raf-Interaktion mit dem „Death inducing signaling complex (DISC)“.

### **Einfluss auf die Apoptose über den Raf-MEK-Erk Signalweg**

Die Signalkaskade Ras-Raf-MEK-Erk führt neben den in 1.4.1 beschriebenen Mechanismen auch zu einer Phosphorylierung von Rsk. Dies hat zur Folge, dass Rsk das proapoptotische Mitglied der Bcl-2 Familie BAD phosphoryliert (Shimamura et al., 2000). BAD hemmt die Funktion antiapoptotischer Bcl-2 Mitglieder, wie z.B. Bcl-xl (Kelekar et al., 1997). Diese Hemmung findet aber nur statt, wenn BAD unphosphoryliert ist. Bei Phosphorylierung wird BAD durch das Protein 14-3-3 im Zytosol zurückgehalten (Zha et al., 1996). Somit entsteht ein Übergewicht der antiapoptotischen Faktoren an der Mitochondrienmembran und die Cytochrom c -Freisetzung wird verhindert.

Zum Anderen führt die Aktivierung von Rsk zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element-binding protein). Im phosphorylierten Zustand fördert CREB die Transkription von Genen, die das Überleben der Zelle sichern (Bonni et al., 1999).

### **MEK-Erk-Signalweg-unabhängige Mechanismen**

Die besondere Rolle von Raf in der Kontrolle der Apoptose wurde durch Studien an Raf „Knock-out“ Tieren deutlich (Huser et al., 2001; Wojnowski et al., 1997; Murakami and Morrison, 2001).

Auffällig war dabei, dass bei den „Knock-out“ Tieren die Level von aktivierten Erk normal waren, während das embryonale Gewebe der Tiere massiv apoptotisch war (Huser et al., 2001).

Eine Erklärung für dieses Phänomen war, dass c-Raf mit der „apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)“ interagiert und so diesen Mediator apoptotischer Signale blockiert (Chen et al., 2001). ASK1 ist in die von den sog. „Todesrezeptoren“ ausgehende Signaltransduktion involviert (Ichijo et al., 1997; Chang et al., 1998; Gotoh and Cooper, 1998). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass ASK1 in die Apoptoseinduktion nach Cisplatin-Behandlung involviert ist (Chen et al., 1999).

C-Raf verhindert die Apoptose anscheinend auch noch über andere Wege, die von dem MEK-Erk-Signalweg abweichen. Ein weiterer Weg, die Apoptose zu blockieren, ist die Aktivierung des „nuclear factor kappa B (NFκB)“ (Baumann et al., 2000; Hindley and Kolch, 2002). Dass NFκB bei verschiedenen Tumoren eine Rolle spielt, ist bekannt (Bours et al., 2000). Dabei scheint Raf eher indirekt über MEKK, an der Regulation des NFκB-Inhibitors IKK beteiligt zu sein (Baumann et al., 2000). Die so regulierte Aktivierung von NFκB führt dann zur Transkription von Genen, die für das Überleben der Zelle wichtig sind.

### **C-Raf- Interaktion mit Bcl-2**

Ein anderer Ansatz, der eine Erklärung für die c-Raf-Kontrolle der Apoptose bietet, zielt auf die Beeinflussung des Verhältnisses pro- zu antiapoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder ab. Zuerst fand Wang 1994 eine Interaktion von c-Raf mit Bcl-2 (Wang et al., 1994), später wurde dann gezeigt, dass c-Raf an die BH4-Domäne von Bcl-2 bindet. So wird c-Raf zur Mitochondrienmembran rekrutiert, um dann dort z.B. das proapoptotische Bcl-2 Mitglied BAD zu phosphorylieren (Wang et al., 1996). Eine solche Phosphorylierung führt, wie bereits oben erwähnt, zu einer Inaktivierung von BAD.



### **C-Raf- Interaktion mit dem „Death inducing signaling complex (DISC)“**

Neben den Berichten, dass c-Raf in die Kontrolle von ASK1 verwickelt ist, gibt es noch weitere Hinweise darauf, dass c-Raf den Signalweg der „Todesrezeptoren“ mitkontrolliert. So berichteten Holmström und Kollegen, dass eine Apoptoseinduktion über den Fas-Rezeptor (CD 95) mit einer Aktivierung des MAPK-Signalweges blockierbar ist (Holmstrom et al., 2000). Dabei stellten sie fest, dass bei gleichzeitiger Aktivierung des Fas-Rezeptors und der MAP-Kinase der eigentliche DISC sich zwar regelrecht formiert, es aber nicht zur Aktivierung der Caspase 8 kommt. Ebenso stellten sie fest, dass es bei Inhibition des MAPK Signalweges leichter ist, T-Zellen mittels Fas/FasL in die Apoptose zu treiben (Holmstrom et al., 2000).

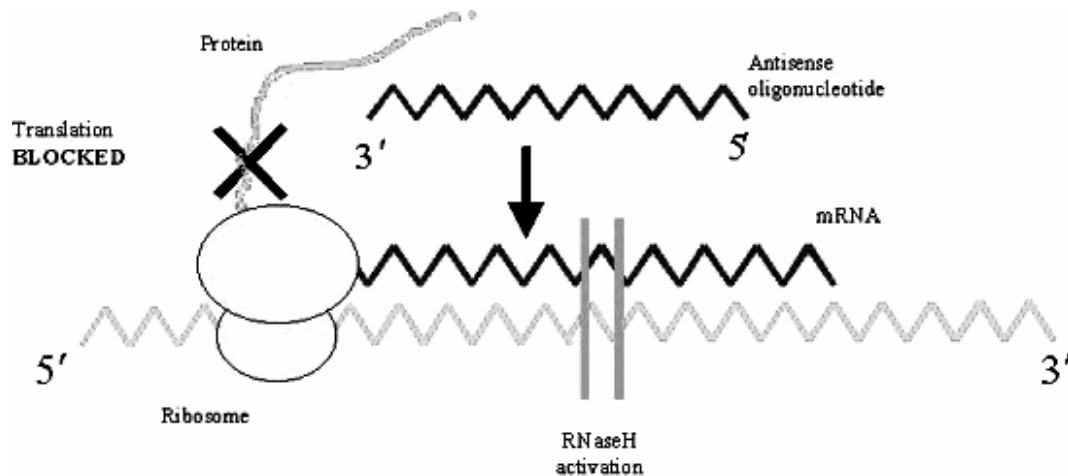
Aus den angeführten Beispielen wird deutlich, wie vielfältig und wie unterschiedlich die Apoptosekontrolle von c-Raf aussieht. Diese Vielfalt macht c-Raf zu einem hoch interessanten Ziel der Tumorthherapie und so überrascht es nicht, dass sich eine Vielzahl von Inhibitoren des Raf-MEK-Erk-Signalweges in verschiedenen Phasen der klinischen Studien befinden (Herrera and Sebolt-Leopold, 2002).

## **1.5 Antisense Oligodesoxynukleotide**

Antisense Oligodesoxynukleotide sind als Werkzeug zur Genregulation schon länger bekannt. Durch ihren Einsatz lässt sich die Expression von Proteinen gezielt hemmen (Wagner, 1994). Das Prinzip der AS-ODN-Wirkung wurde ebenso bei Bakterien nachgewiesen (Merino et al., 1994).

Ihre Wirkung beruht darauf, dass sich kurze, synthetische, 15-20 Basen lange Nukleotidketten komplementär an die Ziel-mRNA anlagern. Durch die Anlagerung entsteht ein Heteroduplex aus mRNA und Oligodesoxynukleotiden. Dieser RNA/DNA- Doppelstrang wird von der zellulären RNase H erkannt und die RNA abgebaut. Die Oligodesoxynukleotidkette steht dann wieder zur Verfügung, um sich erneut an eine mRNA anzulagern.

Gleichzeitig wird durch die Anlagerung der Oligodesoxynukleotiden an die mRNA eine Translation der mRNA verhindert, da die Ribosomenfunktion gehemmt wird (Kulozik AE, 2000; Hartmann G, 1998).



**Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Antisense Wirkungsmechanismus**

(Abbildung nach Robbins, E. 2003)

Antisense Nukleotide haben die Entwicklung vom reinen Wissenschaftswerkzeug zur klinischen Erprobung hinter sich. So wurden für verschiedene Onko-Gene z.B. Bcl-2, c-Raf, c-myc und H-ras Antisense Nukleotide in klinischen Studien getestet (Wang et al., 2001). Es zeigte sich, dass neben der spezifischen Wirkung der AS-ODN besonders die unspezifischen Wirkungen der AS-ODN die Wirkung einschränkten, aber dass sie eine gute Ergänzung zu bereits etablierten Methoden sind (Flaherty et al., 2001).

Um die Stabilität der Antisense Desoxynukleotide zu erhöhen aber auch eine bessere Bindung an die mRNA zu erreichen, wurden verschiedene Modifikationen untersucht (Schlingensiepen R, 1997):

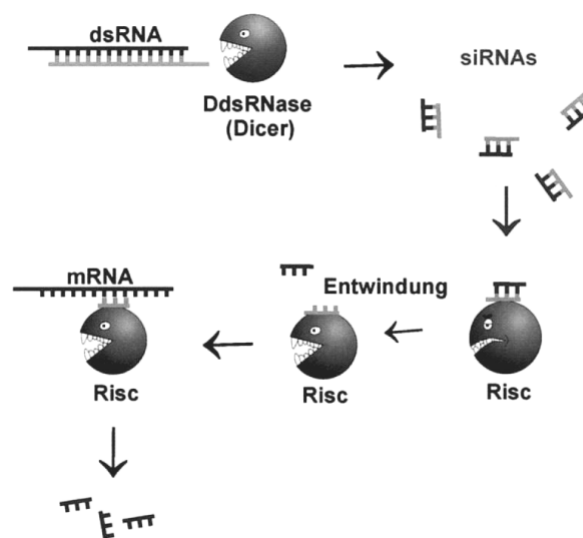
1. Phosphorothioat-Modifikation: Ein Sauerstoffatom im Phosphat wird durch ein Schwefelatom ersetzt. Dies erhöht die Halbwertszeit in reinem Kälberserum von fünf Minuten auf 18 Stunden.
2. Methylphosphonat-Modifikation: Das negativ geladene Sauerstoffatom der Phosphodiesterbrücke wird durch eine neutrale Methylgruppe ersetzt.
3. Es besteht die Möglichkeit der Modifikation des Zuckers bzw. der heterozyklischen Basen.
4. Eine radikale Strukturänderung findet man in den Peptidnukleinsäuren (PNA), in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine auf 2-Aminoethylglycin basierende Polyamidstruktur ersetzt ist.

## 1.6 RNA Interferenz (RNAi) und Small interfering RNA (siRNA)

Das Interesse an der RNA-vermittelten Genregulation wurde 1998 geweckt. Fire und Kollegen berichteten von der spezifischen Genregulation in *C. elegans* durch doppelsträngige RNA (dsRNA). Sie prägten dafür den Ausdruck der „RNA Interferenz (RNAi)“ (Fire et al., 1998).

Es zeigte sich, dass die Regulation der Gene über kleine 19-22-Basenpaar große RNA Stücke vermittelt wird. Dies wurde zuerst in *Drosophila* beschrieben und von den Autoren als „small interfering RNA (siRNA)“ bezeichnet (Elbashir et al., 2001b). Später ließ sich diese Regulation auch bei Säugerzellen zeigen (Elbashir et al., 2001a).

Als wichtige Komponenten der RNA Interferenz wurden vor allem zwei Proteinkomplexe identifiziert. Zum einen der sog. „Dicer“, der dsRNA in die kleinen 19-22-Basenpaar langen Stücke schneidet (Bernstein et al., 2001) und zum anderen „RISC (RNA induced silencing complex)“. RISC ist ein Proteinkomplex, der eine ca. 21 bp große RNA Komponente enthält und sich dadurch an eine komplementäre mRNA Sequenz anlagern kann. Zum Anderen enthält RISC eine RNase-Aktivität. Wenn sich der Komplex an seine Zielsequenz angelangert hat, wird die dazugehörige mRNA abgebaut (Hammond et al., 2000).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der RNA Interferenz**

(Abbildung nach Martens, Biospektrum 2002)

Inzwischen konnte für verschiedene Gene und bei unterschiedlichen Zelllinien mit siRNA eine spezifische Reduktion erreicht werden (McManus and Sharp, 2002). Doch neben der Möglichkeit, gezielt Gene bei Versuchen herunterzuregulieren, ergibt sich für die siRNA noch ein weiterer Ansatz. Bei Pflanzen konnte gezeigt werden, dass sie sich gegen Viren durch „posttranscriptional gene silencing (PTGS)“ schützen, welches über einen verwandten

Mechanismus läuft (Hamilton and Baulcombe, 1999). Dies legt die Aussicht nah, dass durch die Nutzung der siRNA auch beim Menschen Viren so bekämpft werden können. Erste Ansätze zur Nutzung wurden für das Respiratory Syncytial Virus (RSV) (Bitko and Barik, 2001) und das Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Martinez et al., 2002) gemacht.

## **1.7 Ziel dieser Arbeit**

In vielen verschiedenen Tumoren spielt c-Raf eine zentrale Rolle in der malignen Transformation und in der Kontrolle apoptotischer Prozesse.

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, nähere Einblicke in diese Regulationsmechanismen zu erhalten, um so die maligne Transformation durch c-Raf besser erklären zu können.

Mittels Antisense-Oligodesoxynukleotide und durch den Einsatz der RNA-Interferenz soll die Expression von c-Raf reduziert und die dadurch auftretenden Auswirkungen auf die Genregulation untersucht werden. Besonderes Interesse lag dabei auf Genen die pro-proliferativ bzw. anti-apoptotisch sind und für zwei Haupteigenschaften eines malignen Tumors kennzeichnend sind.

Ebenso war es von Interesse, mit der neu etablierten Technologie der RNA-Interferenz Erfahrungen im Vergleich zu der Antisense Technologie zu sammeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ständig verwendete Geräte, Materialien und Lösungen

#### 2.1.1 Geräte

|                 |   |
|-----------------|---|
| Zentrifugen:    | <p>Tischzentrifuge Typ Biofuge pico für 1.5ml und 2ml Reaktionsgefäße (Fa. Heraeus/Hanau)</p> <p>Kühlzentrifuge 5402 für 2ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf/Hamburg)</p> <p>Kühlzentrifuge Modell Varifuge 3.2. RS für PP Rörhchen (Fa. Heraeus/Hanau)</p> <p>Zentrifuge Modell GP für PP Rörhchen/Zellkultur (Fa. Beckmann/München)</p> <p>Kühlzentrifuge Modell J2-21 M/E mit Rotor JS 13-1 (Fa. Beckmann/München)</p> <p>Kühlzentrifuge Modell J6 M/E mit Rotor JA 10 (Fa. Beckmann/München)</p> |
| Inkubatoren:    | <p>Zellkultur: CO<sub>2</sub>-begasbarer Brutschrank, 37 °C, Modell BBD 6220 (Fa. Heraeus/Hanau)</p> <p>Bakterienkultur: Brutschrank 37°C, nicht begasbar (Fa. Heraeus/Hanau)</p> <p>Schüttelinkubator: Modell Multitron (Fa. Infors AG/Bottmingen, Schweiz)</p> <p>Inkubator: Brutschrank 37 °C, nicht begasbar (Fa. Heraeus/Hanau)</p>  |
| Heizblöcke:     | <p>Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf/Hamburg)</p> <p>Dri- Block DB- 3 (Fa. Techne/Dexford-Cambridge, England)</p>  |
| Netzgeräte:     | <p>Power-Supply Modell 200/2.0 (Fa. BioRad/München)</p> <p>ST 504 (Fa. GibcoBRL/Eggenstein)</p> <p>ECPS 3000/150 (Pharmacia/Freiburg)</p>   |
| Elektrophorese: | <p>Minisubcell für Agarosegele (Fa. BioRad/München)</p> <p>Gelkammer und -schlitten Modell MPH (Fa. Kodak/New Haven)</p> <p>Minigelapparatur für PAGE: 8.6cm x 7.7cm (Fa. Biometra/Göttingen)</p>   |
| Mikroskope:     | <p>Leitz Labovert (Fa. Leitz/Wetzlar)</p> <p>Leitz Aristoplan Fluoreszenzmikroskop, Filter: N2.1, A und I3 (Fa. Leitz/Wetzlar)</p> <p>Fotoeinrichtung Orthomat (Fa. Leitz/Wetzlar)</p> <p>INTAS Spot Modell Sp 401-220 (Fa. INTAS/Kassel)</p>   |

Sonstiges:

Autoklave

PHC-2 Thermocycler (Fa. Techne/Dexford-Cambridge, England)

UV- Schirm Modell Transluminator mit Videokamera, Bildschirm und Videoprinter (Fa. UVP Inc./San Gabriel, USA)

Speed Vac Univapo 150 H (Fa. Kraupa/Martinsried)

DNA Fluorometer Modell Ultospec 3000 (Fa. Pharmacia/Freiburg)

Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa. Messer-Griesheim/Düsseldorf)

Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa. Heraeus/Hanau)

Milli-Q Water System (Fa. Millipore/Eschborn)

Magnetrührer Modell IKA- Combimag RCH (Fa. IKA Labortechnik/Staufen)

Mikrowelle Privileg 7533P (Fa. Quelle/Fürth)

Waage Modell 1219 MP und Feinwaage Modell H10T (Fa. Satorius/Göttingen)

Pipetten (Fa. Abimed/Düsseldorf und Fa. Eppendorf/Hamburg)

ELISA Photo Reader Victor 2 ( Fa. Perkin Elmer Wallac/Freiburg)

Photoreader (Fa. MWG Biotech/Ebersberg)

Phospho-Imager FLA 3000 (Fa. FujiFilm/Düsseldorf)

GMS 418 Array Scanner (Fa. BioDiscovery/Marina Del Rey, USA)

### 2.1.2 Materialien

Die verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen Merck/Darmstadt, Messer-Griesheim/Düsseldorf (CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>), Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg und Sigma/Deisendorfen.

### 2.1.3 Häufig verwendete Lösungen

H<sub>2</sub>O MilliQ gereinigt und autoklaviert

PAA (Polyacrylamid): 30% Acrylamid/1% Bisacrylamid

APS (Ammoniumpersulfat): 10% in H<sub>2</sub>O

PBS (phosphate buffered saline): 6,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5mM KCl  
140mM NaCl pH 7,25 autoklaviert

TBS (Tris buffered saline): 250mM Tris pH 7,4  
137mM NaCl  
50mM KCl  
7mM CaCl<sub>2</sub>  
5mM MgCl<sub>2</sub>

3x SDS Probenpuffer : 190mM Tris/HCl pH 6,8  
5% (v/v) Mercaptoethanol  
9% (w/v) SDS  
40% (w/v) Glycerin  
1%(w/v) Bromphenolblau

6x Probenpuffer (DNA/RNA): 50% (w/v) Glycerin  
1mM EDTA  
0,4% (w/v) Bromphenolblau  
0,4% (w/v) Xylencyanol



|                           |   |
|---------------------------|---|
| TE (Tris EDTA):           | 10mM Tris-Base, 1mM EDTA pH 8,0   |
| TAE (Tris- Acetat- EDTA): | 50x 242g Tris Base<br>57,1ml Eisessig<br>37,2g Na <sub>2</sub> EDTAxH <sub>2</sub> O<br>ad 1l H <sub>2</sub> O pH 8,5 |
| 1x TAE:                   | 40mM Tris- Base, 2mM EDTA   |
| Mowiol:                   | 2,4g Mowiol (Fa. Calbiochem/ Bad Soden i.Ts.)<br>6g Glycerol, 6ml a. bidest,<br>12ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5            |

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Verwendete Zelllinien

| Zellen              | Art  | Herkunft  | Medium   | Passagier-verhältnis |
|---------------------|--|---|--|----------------------|
| <b>HT29</b>         | Humane Adenokarzinom Zelllinie des Colons  | ATCC  | DMEM mit 10% FCS                                     | 1:4                  |
| <b>Rat-1 Myc-ER</b> | Ratten Fibroblasten Zelllinie              | Freundlicherweise überlassenvon Prof. M. Eilers | DM w/o Phenol Red mit 10% FCS sowie 200mM Hygromycin | 1:4                  |
| <b>A549</b>         | Humane Adenokarzinom Zelllinie der Lunge   | ATCC  | DMEM mit 10% FCS                                     | 1:6                  |
| <b>CaCo2</b>        | Humane Adenokarzinom Zelllinie des Colons  | ATCC  | DMEM mit 10% FCS                                     | 1:3                  |
| <b>SW620</b>        | Humane Adenokarzinom/ Metastasen Zelllinie | ATCC  | DMEM mit 10% FCS                                     | 1:3                  |

### 2.2.2 Zellkulturmedien und Lösungen

|                    |  |
|--------------------|--|
| DMEM:              | Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) (Fa. Boehringer/Ingelheim) |
| DM w/o Phenol Red: | Dulbecco´s Medium ohne Phenol Rot (Fa. GibcoBRL/Eggenstein)          |
| OptiMEM ®:         | serumreduziertes Medium (Fa. GibcoBRL/Eggenstein)                    |
| FCS:               | Fetal calf serum (Fa. PAA Laboratories GMBH/Linz, Österreich)        |
| L-Glutamine:       | Glutamine (Fa. Bio Whittaker Europa)                                 |

|               |   |
|---------------|---|
| Pen/Strep:    | Penicillin/Streptomycin 10000 U Penicillin, 10000 g/ml (Fa. Bio Whittaker Europa) |
| Trypsin-EDTA: | 0,02% Trypsin, 0,05% EDTA (Fa. Bio Whittaker Europa)                              |
| PBS:          | s.o.  |
| Hygromycin:   | Hygromycin (Fa. Sigma-Aldrich/Taufkriechen)                                       |
| DMSO:         | Dimethylsulfoxid mit höchstem Reinheitsgrad (Fa. Merck/Darmstadt)                 |

### 2.2.3 Kultivierung von Zellen

Sämtliche Zellen wurden jeden Tag auf Auffälligkeiten (z.B. Kontaminationen) mit dem Mikroskop Leitz Labovert (Fa. Leitz/Wetzlar) überprüft und zur Testung auf Mycoplasmen jeden Monat ein Mycoplasmentest mittels PCR durchgeführt.

Alle oben aufgeführten Zellarten wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert: bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und ~90% Luftfeuchtigkeit (Bedingungen entsprechend BBD 6220 Brutschränken). Alle erhielten das in der Tabelle angegebene Wachstumsmedium, dem FCS (10% v/v), Penicillin/Streptomycin (1% v/v) und Glutamin (1% v/v) zugesetzt wurde. Ausnahme davon bildeten die Transfektionsversuche, bei denen das serumreduzierte Medium verwendet wurde.

Die Zellen wurden routinemäßig alle drei Tage gesplittet, dabei wurden sie mit PBS gewaschen, dann mit Trypsin-EDTA angelöst. Wenn sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie in ein Falcon Röhrchen überführt, in dem Medium zur Trypsin-Inaktivierung vorgelegt worden war. Sie wurden dann bei 1000 UpM für 8 min. herunterzentrifugiert. Nach Abzentrifugation und Absaugen des alten Mediums, wurden die Zellpellets in 5ml neuem Medium gelöst und wie in der Tabelle angegeben mit neuem Medium versetzt und auf 10cm Kulturschalen (Fa. Nunc/Wiesbaden) neu ausplattiert.

Zwischen den Passagierungstagen wurde - wenn nötig - ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde neues Wachstumsmedium hinzugeführt und die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt.

Bei sämtlichen Arbeiten an den Zellen wurde darauf geachtet, dass sie nicht antrockneten oder zu lange außerhalb des Brutschrankes waren.

### 2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um überzählige Zellen nicht zu häufig einer Trypsin-EDTA Behandlung auszusetzen, aber auch um sie vor genetischer Veränderung bei zu hoher Passagezahl zu schützen, wurden sie eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Die Zellen wurden hierzu mit Trypsin-EDTA von den Kulturschalen gelöst, in Falcon Röhrchen überführt und 5 min. bei 1000 UpM abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 750 µl FCS (steril filtriert), 225 µl DMSO (steril filtriert) und 2025 µl Wachstumsmedium resuspendiert und anschließend wurden 1 ml Volumina in Einfrierröhrchen (Fa. Nunc/Wiesbaden) überführt. Die Röhrchen wurden dann für eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, dann über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff zur längerfristigen Lagerung überführt.

In einigen Fällen wurden Zellen neu in Kultur genommen. Dazu wurden sie vom flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) schnell im Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) erwärmt. Sobald sich die Suspension verflüssigt hatte, wurde sie komplett auf eine mit dem entsprechenden Wachstumsmedium vorbereitete 10 cm Kulturschale (Fa. Nunc/Wiesbaden) ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

Nach ca. einer Woche wurden dann die neu aufgetauten Zellen in die Versuche mit einbezogen.

## **2.2.5 Transfektion von Zellen**

### **2.2.5.1 Vorbereitungen zur Transfektion**

Um die möglichst gleichen Transfektionsbedingungen für alle Versuche zu haben, wurden immer gleich viele Zellen zur Transfektion ausgesät. Für eine 6-Loch Platte (6 „Well“) wurden  $2.5 - 3.0 \times 10^4$  Zellen ausplattiert, für eine 6cm Schale  $5.0 - 8.0 \times 10^4$  und bei einer 10cm Schale  $1.5 - 2.0 \times 10^6$  Zellen. Die Zahl der Zellen wurde über eine Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden ca. 15 µl der Zellsuspension aufgetragen. Unter dem Mikroskop kann dann die Anzahl der Zellen in verschiedenen Quadraten ausgezählt werden. Es wurden zwei sich gegenüber liegende große Quadrate gezählt, diese beinhalten vier kleine Quadrate. Es wurde der Mittelwert genommen, der noch mit  $10^4$  multipliziert werden musste. So erhielt man eine Angabe über die Menge an Zellen pro ml Suspension.

Generell wurden die Zellen, bevor sie transfiziert wurden, einmal mit OptiMEM gewaschen, um sicher zu stellen, dass sich kaum noch altes Medium auf ihnen befand, das durch Serumanteile die Transfektionseffizienz verschlechtert hätte.

### **2.2.5.2 Überprüfung des Transfektionserfolges**

Um den Wirkort der verschiedenen Transfektionsreagenzien zu überprüfen, wurden die Zellen der Zelllinien mit Cy3 (Cyanin Fluorochrom 3) transfiziert. Es wurde als Transfektionsreagenzien Lipofektin (Invitrogen/Karlsruhe) und Oligofectamine (Invitrogen/Karlsruhe) benutzt.

Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ausplattiert und wurden entsprechend den Protokollen für Antisens Nukleotide bzw. siRNA transfiziert, nur dass anstelle von AS-ODN und siRNA Cy3 markierte Kontroll-Phosphorothioatoligonukleotid benutzt wurde.

Nach folgendem Ablauf wurde transfiziert:

Kontroll-Zellen

125 nM ODN- Cy3 ohne Carrier

125 nM ODN- Cy3 mit Lipofectin, nach Lipofectin Transfektion für Antisens Versuche

125 nM ODN- Cy3 mit Oligofectamine, nach Oligofectamine Transfektion für siRNA Versuche.

Die Zellen wurden einen Tag weiter kultiviert, dann das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Paraformaldehyd (s. 2.2.7.1) fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen noch mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf Objektträger gebracht und bis zu ihrer Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz/Wetzlar) im Kühlschrank im Dunkeln gelagert.

Sequenz des Oligonukleotids: 5´- TCCCGCGCACTTGATGCATT -3´

Diese Sequenz entspricht der c-Raf MM-ODN Sequenz, die hier Cy3-gerecht ist.

### **2.2.5.3 Transfektion mit Lipofectin<sup>®</sup>**

Lipofectin<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen/Karlsruhe) Transfektion:

Diese Methode wurde gewählt um Antisens Nukleotide in Zellen zu bringen. Die Basisangaben wurden vom Hersteller übernommen und optimiert. So wurde ein Loch einer 6-Loch Platte wie folgt transfiziert:

- I. 10 µl Lipofektin + 100 µl OptiMEM für 45 min. bei RT inkubieren.
  - II. 300 nMol (Endkonzentration) Antisens Nukleotid + 100 µl OptiMEM.
- Ansatz I. und II. mischen und für 15 min. bei RT inkubieren.  
Zugabe von 800 µl OptiMEM.

Die Zellen wurden vor der Transfektion mit OptiMEM gewaschen. Dann wurde das Lipofektin/ Nukleotid Gemisch auf die Zellen gegeben und diese wurden für 6 Stunden damit unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch wieder abgesaugt und die Zellen erhielten neues Wachstumsmedium.

Am nächsten Tag wurde die Transfektion auf die gleiche Weise wiederholt. Die Zellen wurden am folgenden Tag geerntet.

#### 2.2.5.4 Transfektion mit Oligofectamine<sup>®</sup>

Oligofectamine<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen/Karlsruhe) Transfektion:

Diese Methode wurde gewählt, um die siRNA in die Zellen zu transfizieren. Auch hier wurden Basisangaben des Herstellers übernommen und modifiziert. Ein Ansatz zur Transfektion eines Loches einer 6-Loch Platte sah hier wie folgt aus:

- I. 200 nMol (Endkonzentration) siRNA + 500 µl OptiMEM.
  - II. 30 µl Oligofectamine + 120 µl OptiMEM für 15 min. bei RT inkubieren.
- Ansatz I. und II. miteinander mischen und weitere 20 min. bei RT inkubieren.  
Zugabe von 340 µl OptiMEM.

Die Zellen wurden vor ihrer Transfektion mit OptiMEM gewaschen. Das Oligofectamine/siRNA-Gemisch wurde auf die Zellen gegeben, diese so für 4 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Dann wurde dem Gemisch Wachstumsmedium mit einem 20% Anteil FCS dazugegeben. Die so transfizierten Zellen wurden dann für 24, 48 und 72 Stunden weiter gezogen, bevor sie geerntet wurden.

#### 2.2.5.5 Transfektion mit Superfect<sup>®</sup>

Superfect<sup>®</sup> (Fa. Qiagen/Hilden) Transfektion:

Dieses Verfahren wurde gewählt, um DNA in Zellen zu transfizieren. Es wurden wieder die Basisangaben des Herstellers übernommen, die modifiziert wurden. Eine Transfektion für die gleichen Bedingungen sah so aus:

- I. 5 µg der DNA mit 10 µl Superfect und 100 µl OptiMEM mischen für 15 min. bei RT inkubieren.
- II. 900 µl DMEM 10% FCS dazugeben.

Die Zellen so für 3 Stunden im Brutschrank kultivieren. Danach das Mediumgemisch durch Kulturmedium ersetzen.

Die so transfizierten Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden unter normalen Bedingungen weiter in Kultur gehalten. Es schloss sich dann eine Transfektion mit AS-ODN an.

## **2.2.6 Inhibitoren**

### **2.2.6.1 c-Raf Inhibitor BAY 43-9006**

Der Inhibitor wurde verwendet, um c-Raf spezifisch zu blockieren. Er wurde in DMSO gelöst und in Volumen von 30 µl mit einer Konzentration von 1 mM aliquotiert. Die Aufbewahrung erfolgte in dunklen Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf/ Hamburg) bei -80 °C.

Bei den Versuchen wurde der Inhibitor in der entsprechenden Konzentration in das Wachstumsmedium gegeben. Das Medium wurde nicht gewechselt, um keine neuen Wachstumshormone zuzuführen.

### **2.2.6.2 EGF-Rezeptor Inhibitor AG 1478 (Fa. Calbiochem/Schwallbach)**

Auch der EGF-Rezeptor Inhibitor wurde in DMSO gelöst und in Volumen von 30 µl und der Konzentration von 1 mM aliquotiert. Die Aufbewahrung erfolgte in dunklen Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf/ Hamburg) bei -80°C.

Bei den Versuchen wurde der Inhibitor in der entsprechenden Konzentration in das Wachstumsmedium gegeben. Für die Versuche, die über 48 Stunden dauerten, wurde der Inhibitor nach 24 Stunden erneuert. Das Medium wurde nicht gewechselt, um keine neuen Wachstumshormone zuzuführen.

## **2.3 Nukleinsäuren**

### **2.3.1 Isolierung von RNA**

Um einen Abbau der RNA zu vermeiden, wurde prinzipiell so sauber wie möglich gearbeitet und nur RNase-freie Materialien benutzt. Des Weiteren wurde während der Arbeit mit der RNA die gesamte Zeit Handschuhe getragen, diese wurden während des Arbeitens mehrfach gewechselt.

Die Isolierung der zellulären RNA erfolgte mittels RNeasy™ Kit (Fa. Qiagen/ Hilden). Dabei wurden die Empfehlungen des Herstellers übernommen und nur leicht modifiziert. Um eine Lagerung der RNA auch über längere Zeit zu ermöglichen und aus Prophylaxe wurde in die Sammelgefäße für die RNA 1µl RNasin (Fa. Promega/Madison, USA) vorgelegt.

Die RNA wurde dann bei -80°C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde, vor ihrer jeweiligen Benutzung, wie unten beschrieben bestimmt und die Qualität mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

## 2.3.2 Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung von Nukleinsäuren

### 2.3.2.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationserfassung fand mittels UV-Spektrophotometer statt. Dabei wurde die Konzentration aus der Absorption bei der spezifischen Wellenlänge  $\lambda$  (für RNA, Oligonukleotide und DNA 260 nm) berechnet.

$A = d \times \epsilon \times c$  ( A Absorption; d Schichtdicke;  $\epsilon$  Stoffkonstante; c Konzentration)

Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei einer Konzentration von:

|                                    |
|------------------------------------|
| 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA            |
| 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA            |
| 30 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid |

Gemessen wurde in Quarzküvetten, die zwischen den Messungen gründlich mit autoklaviertem Wasser gewaschen wurden.

### 2.3.2.2 Qualitätsüberprüfung mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Plasmid DNA, restriktionsverdauter Plasmid DNA, PCR Produkten und RNA wurden 1- bis 2-prozentige TAE-Agarosegele mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE Puffer (s. 2.1.3) durchgeführt. Die Proben und 1  $\mu\text{g}$  Größenmarker („100 Base-pair Ladder“ Fa. Pharmacia/Freiburg und „1kb-DNA Ladder“ Fa. GibcoBRL/Eggenstein) wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (s. 2.1.3) versetzt und bei 10 V/cm aufgetrennt. Über den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnte die DNA bzw. RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden. Bei der Elektrophorese von RNA wurde zur Vermeidung von Degeneration zunächst sowohl die Kammer, als auch der Kamm mit Ethanol gereinigt und der Laufpuffer mit autoklaviertem DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  frisch angesetzt.

## 2.3.3 RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion)

### 2.3.3.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  der RNA eingesetzt, die mit autoklaviertem RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 8  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurde. Zu diesem Gemisch wurde dann jeweils ein Master Mix gegeben, sodass das Endvolumen 20  $\mu\text{l}$  betrug.

Der Master Mix wurde gewählt, um für die verschiedenen RNAs dieselben Bedingungen zu schaffen. Ein Master Mix bestand pro Probe aus:

- 2 µl 10 mMol dNTPs (Fa. Pharmacia/ Freiburg)
- 1 µl RNAsin (Fa. Promega/ Madsion, USA)
- 2 µl 10 mMol DTT (Fa. GibcoBRL/ Eggenstein)
- 2 µl (Oligo)-dT Primer (Fa. Boeringer/ Mannheim)
- 5 µl 5x RT- Puffer (Fa. GibcoBRL/ Eggenstein)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Fa. GibcoBRL/ Eggenstein)

Nach der Zugabe des Master Mixes wurde die RNA 10 min. bei RT inkubiert, dann für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C. Die Proben wurden zum Schluss für 5 min. bei 95 °C denaturiert. Dann wurden sie entweder für 5 min. auf Eis gelagert, um sie weiter zu benutzen, oder bei -20 °C eingefroren, um sie zu lagern.

### 2.3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR Methode („polymerase-chain-reaction“) wurde benutzt, um die gesuchten cDNA Fragmente zu amplifizieren. Auch hier wurde wieder mit einem Master Mix gearbeitet, um für die Proben möglichst die gleichen Bedingungen zu schaffen. Für ein 47 µl Ansatz wurde verwendet:

- 39,50µl Wasser
- 1 µl Gelatine (Fa. Boeringer/Mannheim)
- 5 µl 10x Taq PCR Puffer (Fa. Pharmacia/Freiburg)
- 0,25 µl Taq- Polymerase (Fa. Pharmacia/Freiburg)
- 0,5 µl 3`Primer/Stock 100 pmol (entsprechend dem gesuchten Fragment)
- 0,5 µl 5`Primer/ Stock 100 pmol (entsprechend dem gesuchten Fragment)

Zu diesem Ansatz wurde 3 µl der cDNA gegeben, sodass das Endvolumen 50 µl betrug.

Die PCR wurde dann im Thermocycler PH-2 (Fa. Techne/Dexford-Cambridge, England) durchgeführt. Dabei wurden folgende Programme benutzt:

Für alle Primer außer Amphiregulin:

| Schritt | Anzahl der Zyklen | Temperatur           | Zeit                    |
|---------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| 1       | 1                 | 94°C                 | 3min.                   |
| 2       | 25                | 94°C<br>58°C<br>72°C | 1min.<br>1min.<br>1min. |
| 3       | 1                 | 72°C                 | 10min.                  |



Für Amphiregulin:

| Schritt | Anzahl der Zyklen | Temperatur           | Zeit                    |
|---------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| 1       | 1                 | 94°C                 | 3min.                   |
| 2       | 35                | 94°C<br>58°C<br>72°C | 1min.<br>1min.<br>1min. |
| 3       | 1                 | 72°C                 | 10min.                  |

Nach der PCR wurden die Proben entweder mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet (s. 2.4.3.2), bei 4°C kurzfristig gelagert oder bei -20°C längerfristig gelagert.

### 2.3.4 Verwendete PCR Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG Biotech / Ebersberg bezogen.

|               |         |                                   |
|---------------|---------|-----------------------------------|
| c-Raf:        | forward | 5`-ATGCCTGTTAGTTCTTCAG-3`         |
|               | reverse | 5`-GGTAAATGGCACGGAGATGT-3`        |
| βAktin:       | forward | 5`-GATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC-3` |
|               | reverse | 5`-GTGCCTCAGGGCAGCGGAACCGCTCA-3`  |
| GAPDH:        | forward | 5`-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3`        |
|               | reverse | 5`-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3`        |
| HB-EGF:       | forward | 5`-AAAAGAAAGAAGAAAGGCAA-3`        |
|               | reverse | 5`-CTCCTATGGTACCTAACAT-3`         |
| TGFα:         | forward | 5`-CGCCCTGTTCGCTCTGGGTAT-3`       |
|               | reverse | 5`-AGGAGGTCCGCATGCTCACAG-3`       |
| Amphiregulin: | forward | 5`-AGTCAGAGTTGAACAGGTAGTTAAG-3`   |
|               | reverse | 5`-ACTGTAATAACAGCAACAGCTGTGA-3`   |
| c-Fos:        | forward | 5`-ACGCAGACTACGAGGCGTCA-3`        |
|               | reverse | 5`-TTCACAACGCCAGCCCTGGA-3`        |

### 2.3.5 cDNA Arrays (Makroarrays)

Die Methode der cDNA Arrays wurde gewählt, um Gene zu identifizieren, die durch die siRNA Raf beeinflusst werden.

Für diese Untersuchung wurden Gen Arrays der Fa. Biomol/Hamburg gewählt.

Der erste Array „Human Apoptosis-1 GEArray™“ testet 23 Zielgene, 2 interne Kontrollen und die evtl. Verunreinigung mit bakterieller DNA. Die Zielgene, die in diesem Array getestet werden, gehören zu der Bcl-2-Familie, Fas, TRAIL, p53 und NF κB.

Der zweite durchgeführte Array „Human Apoptosis-5/TNF& Fas Network GEArray™“ testet ebenso 23 Zielgene, 2 interne Kontrollen und evtl. Verunreinigung mit bakterieller DNA.

Beide Array Arten wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurden 5 bis 10 µg total RNA eingesetzt. Diese wurde mit Hilfe der M-MLV-RT (Fa. GibcoBRL/Eggenstein) und des im Kits enthaltenen Reverse-Transkriptions-Puffer in cDNA umgeschrieben. Während des Umschreibens wurde die cDNA gleichzeitig durch die zugegebenen radioaktiven L dCTP radioaktiv markiert. Dadurch ist es möglich, am Schluss das Signal zu detektieren.

Die Array Membran wurde mit dem im Kit enthaltenen Hybridisierung Puffer 2 Stunden bei 68 °C vorbereitet. Anschließend wurde die radioaktiv markierte cDNA mit 5 ml Hybridisierungspuffer aufgefüllt und über die Membran gegeben. Diese wurden so über Nacht bei 68 °C und unter ständiger Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten Waschschriffe zuerst zweimal mit 50 bis 100 ml 2x SSC/1% SDS für 20 min. bei 68°C dann zweimal mit 50 bis 100 ml 0,1x SSC/0,5% SDS für 20 min. bei 68°C.

Die Membran wurde dann auf eine Phosphorimager Kassette (Fa. FujiFilm/Düsseldorf) aufgebracht und mit Hilfe der Image Reader Software (Fa. FujiFilm/Düsseldorf) eingescannt und ausgewertet.

|                      |  |
|----------------------|--|
| Verwendete Lösungen: | Array Puffer: GEArray KIT (Fa. Biomol/Hamburg) |
|                      | GEAprimer Mix, Puffer A                        |
|                      | GEAlabeling Puffer, 5x, Puffer B               |
|                      | RNAse freies Wasser                            |
|                      | 10x Stopp Lösung, Puffer C                     |
|                      | 10x Denaturierungs Lösung, Puffer D            |
|                      | 2x Neutralisierungs Lösung, Puffer E           |
|                      | GEAhyb Hybridization Lösung                    |

|           |                           |
|-----------|---------------------------|
| Puffer B: | (DTT und dNTP T sensitiv) |
|           | 50 µl RT Puffer (Kit)     |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| Nicht im Kit enthaltene Materialien: | 4 µl M-MLV-RT (Fa. GibcoBRL/Eggenstein)  |
|                                      | 1 µl 1 M DTT (Fa. GibcoBRL/Eggenstein)   |
|                                      | 50 µl 10x dNTP (5 mM dATP, 5mMdGTP, 5 mM dTTP, 5 µM dCTP) (Fa. Pharmacia/Freiburg) |
|                                      | Sheared salmon sperm DNA (2mg/ml)  |
|                                      | 20x SSC  |
|                                      | 20% SDS  |

### 2.3.6 Verwendete Phosphorothioat Oligonukleotide

Synthese: Die verwendeten Phosphorothioat Oligonukleotide wurden in der Abteilung Mikrochemie des IMT hergestellt. Die Synthese erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode. Zur anschließenden Aufreinigung wurden Nucleo-Pac 100 Säulen (Fa. Dionex) verwendet, wobei die S-Oligonukleotide mit einem LiCl<sub>4</sub> Gradienten eluiert wurden. Nach einer Fällung mit 4 VT Isopropanol folgten drei Dialyseschritte, wobei zweimalig gegen 0,1 M Tris pH 8 und einmal gegen H<sub>2</sub>O dialysiert wurde. Nach der Dialyse konnten die S-Oligonukleotide direkt für die Transfektion (wie bei 2.2.5.3 beschrieben) eingesetzt werden.

#### 2.3.6.1 Sequenz der synthetisierten Oligonukleotide

Antisense Oligonukleotid c-Raf: 5´- TCCCGCCTGTGACATGCATT –3´

Kontroll-Oligonukleotid „Mismatch“: 5´- TCCCGCGCACTTGATGCATT–3´

### 2.3.7 Verwendete siRNA

Zu einem Großteil wurde eine siRNA der Firma Dharmacon/Lafayette, Co verwendet. Sie hatte eine Konzentration von 20 µM.

Zum anderen wurde siRNA der gleichen Sequenz in der Abteilung für Mikrochemie des IMT hergestellt.

Synthese: Die 21 nukleotid RNA wurde chemisch synthetisiert und anschließend mittels HPLC aufgereinigt. Nach der Isolation des Produktes und anschließender Entsalzung wurde die Konzentration durch Ermittlung der OD bestimmt.

Für die Anlagerungsprozedur wurden 40 µM Einzelstrang der siRNA in Anlagerungs-Puffer (100 mM Kalium-Acetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7 und 4,2 mM Magnesium Acetat) für 1 min. bei 90°C

erhitzt und anschließend in einer Stunde auf 37°C abgekühlt (zur Methode der siRNA Herstellung s.a. (Elbashir et al., 2001a)).

Auf die gleiche Art erfolgte die Synthese der Kontroll-RNA („mismatch siRNA“).

### 2.3.7.1 Sequenz der verwendeten siRNA

siRNA c-Raf: UAGUUGAGCAGUUUGGCUA dT.dT

Kontroll RNA „Mismatch siRNA“: AUCGGUUUGACGAGUUGAU dTdT

## 2.4 Proteine

### 2.4.1 Proteinextraktion

Zur Proteingewinnung wurden die Medienüberstände abgenommen und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt, die Zellen mit PBS gewaschen und auch dies in dem Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden dann normal mit EDTA-Trypsin gelöst und ebenfalls in das Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen für 10 min. bei 1000 UpM abzentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde noch einmal mit PBS gewaschen. Danach konnten die Proteine auf verschiedene Weise extrahiert werden.

#### 2.4.1.1 „Freeze & Thaw“ Methode nach Troels Syffart

Für diese Methode wurde das Zellpellet je nach Größe in bis zu 60 µl des Mikroextraktions-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden gut resuspendiert und homogenisiert, um eine gute Durchmischung zu erreichen.

Diese Zellsuspension wurde anschließend dreimal hintereinander mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Diese Prozedur führte zum Platzen der Zelle. Die Proteine wurden durch anschließende 15 min. Zentrifugation bei 4°C und 14.000 upm von den membranumgebenden, restlichen zellulären Bestandteilen getrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei – 80 °C.

Mikroextraktions-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,8  
450 mM NaCl  
0,2 mM EDTA  
25% Glycerol (v/v)

vor dem Gebrauch wurden 1 ml Puffer:

- 1  $\mu$ l Aprotinin (Stock: 0,4 mg/ml)
- 1  $\mu$ l Leupeptin (Stock: 0,5 mg/ml)
- 1  $\mu$ l Pepstatin (Stock: 1 mg/ml)
- 2  $\mu$ l PMSF (Stock: 0,1M)
- 20  $\mu$ l DTT (Stock: 0,5M)

zugegeben.

#### 2.4.1.2 "NP-40" Methode nach King

Das Zellpellet wurde wieder je nach Größe in bis zu 60  $\mu$ l des Puffers gut resuspendiert und homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min. auf Eis gestellt und erst dann 15 min. bei 4°C und 14000 upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls bei -80°C.

Lysis-Puffer:

- 20 mM Tris /HCl pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 10% Glycerol
- 1% Nonidet P 40

vor dem Gebrauch wurden 1 ml Puffer:

- 10  $\mu$ l NaF (Stock: 1 M)
- 10  $\mu$ l NaVO<sub>4</sub> (Stock: 0,1 M)
- 10  $\mu$ l Na<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> (Stock: 0,1 M)
- 10  $\mu$ l PMSF (Stock: 0,1 M)
- 5  $\mu$ l Aprotinin (Stock: 0,4 mg/ml)
- 4  $\mu$ l Leupeptin (Stock: 0,5 mg/ml)

dazugegeben.

#### 2.4.2 Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte

Die Konzentration der Proteine wurde anhand der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurden 2  $\mu$ l des Proteinextraktes mit 800  $\mu$ l sterilem Wasser und 200  $\mu$ l BioRad-Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Fa. BioRad/München) versetzt. Die Messung der Extinktion erfolgte in Plastikküvetten bei 595 nm.

Um die Proteinkonzentration berechnen zu können, wurde eine Standarteichkurve mit BSA (2 mg/ml) hergestellt und gemessen. Für die Standarteichkurve wurde eine Geradengleichung ermittelt und über diese die Konzentration der Proben bestimmt.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Um Proteine nach der Molekularmasse mittels Gelelektrophorese auftrennen zu können, muss zuerst das Protein mit SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert werden und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. So erreicht man, dass über das SDS negative Ladungen an hydrophobe Regionen gebracht werden und die Eigenladung des Proteins überdeckt wird. Die Mobilität des Proteins hängt dann bei der Auftrennung im Acrylamidgel nicht mehr vom isoelektrischen Punkt ab, sondern von der Größe des Proteins.

Das Proteingel besteht aus zwei unterschiedlichen Einheiten. Ein Sammelgel, welches dazu dient die Proteine zu sammeln und so zu erreichen, dass sie alle gleichzeitig das Trenngel erreichen. Das anschließende Trenngel sorgt für die Auftrennung der Proteine nach Größe.

Die beiden Gele wurden wie folgt angesetzt:

|                | Steriles Wasser | Acrylamid Mix | Tris HCl             | SDS (10%)   | APS (10%)   | TEMED     |
|----------------|-----------------|---------------|----------------------|-------------|-------------|-----------|
| Trenngel (10%) | 7,9 ml          | 6,7 ml        | 5ml (pH 8,8)         | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 8 $\mu$ l |
| Sammelgel      | 4,1 ml          | 1 ml          | 750 $\mu$ l (pH 6,8) | 60 $\mu$ l  | 60 $\mu$ l  | 6 $\mu$ l |

Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Dieses wurde mit 100% Isopropanol überschichtet, um eine saubere, gerade Trennlinie zu erreichen. Wenn das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol entfernt, mit sterilem Wasser nachgewaschen und das Sammelgel darüber gegossen. Es wurde ein Probenkamm eingesetzt, und nach der Polymerisation des Gels, in der Mini Gelapparatur (Fa. Biometra/Göttingen) festgeklemmt.

Die Proteinproben wurden vor ihrem Auftragen mit 50% ihres Volumens mit 3x SDS Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95°C für 5 min. denaturiert. Sie wurden zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen, BENCH MARK™ (Fa. GibcoBRL/Eggenstein). Die Elektrophorese erfolgte für das Sammelgel bei 50 V und für das Trenngel bei 100 V, dabei wurde ein 1x SDS Laufpuffer verwendet.

3x SDS Probenpuffer:            190 mM Tris/HCl pH 6,8  
     5% (v/v) Mercaptoethanol  
     9% (w/v) SDS  
     40% (w/v) Glycerin  
     1%(w/v) Bromphenolblau

10x SDS Laufpuffer:            0,25 M Tris- Base  
     1,92 M Glycin  
     1% SDS

## 2.4.4 Immuno-Blot

### 2.4.4.1 Protein Transfer (Western Blot)

Die erst durch SDS Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran ( $\varnothing$  0.45  $\mu\text{m}$ , Fa. Schleicher & Schuell/Dassel) transferiert. Für diesen Transfer (Blot) wurde eine „Semi-dry“-Blotapparatur (Fa. BioRad/München) benutzt.

Es handelte sich um ein „semi-dry“ Verfahren, da nur die verwendeten Whatmann-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran mit dem Transferpuffer befeuchtet wurden.

Ein Blot hatte folgenden Aufbau: Auf dem Boden der Blotapparatur wurden drei Whatmann-Filterpapiere gelegt, die zuerst in Anoden Puffer (Fa. Roth/Karlsruhe) getränkt wurden. Dann folgte die Nitrocellulosemembran, sie wurde durch die darunter liegenden Whatmann-Papiere mit der Anodenflüssigkeit befeuchtet. Es folgte das Gel. Dieses bedeckten zwei Whatmann-Filterpapiere, die mit Kathodenflüssigkeit (Fa. Roth/Karlsruhe) befeuchtet waren. Um sicherzustellen, dass alle Lagen unmittelbar aneinander grenzten, und dass sich keine Luftblase dazwischen befand, wurde der „Blotstapel“ mehrere Male mit einer Pasteurpipette überrollt.

Der Protein Transfer wurde mit 5 V für 5 min begonnen und dann mit 10 V für 45 min. fortgesetzt. Die Übertragung des farblichen Proteinmarkers stellte sicher, dass der Transfer der Proteine stattgefunden hat.

### 2.4.4.2 Immunologischer Nachweis

Ist der Transfer erfolgt, kann man verschiedene Proteine immunologisch nachweisen, dabei nutzt man das spezifische Erkennen von Antigenen durch Antikörper. Der erste Antikörper ist gegen das gesuchte Protein gerichtet, der Zweite gegen den ersten Antikörper, dieser Zweite ist enzymgekoppelt und ermöglicht nach Substratzugabe die Detektion.

Die Membran wurde zuerst mit einer Magermilch (5% Magermilchpulver auf 50 ml PBS bzw. TBS) für eine Stunde bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert. Diese dient dazu, unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der erste Antikörper wurde ebenfalls in dieser Milch verdünnt. Er wurde entweder für zwei Stunden bei RT auf der Membran belassen, oder aber bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran 40 min. mit PBS bzw. TBS gewaschen, wobei alle 5 min. das PBS/TBS gewechselt wurde. Dann wurde der zweite Antikörper dazugegeben. Er ist gegen den Ersten gerichtet und Enzym-markiert (HRP; „horseradish peroxidase“). Die Membran wurde zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgten wieder 40 min. waschen, um alle Antikörper die nicht gebunden hatten, zu entfernen.

| Antikörper   | Verdünnung | Firma              |
|--|------------|--------------------|
| Primärantikörper<br>c-Raf<br>Maus anti Human               | 1:1000     | Transduktion       |
| Sekundärantikörper<br>HRP markiert;<br>Kaninchen anti Maus | 1:2000     | Amersham/Pharmacia |
| Primärantikörper<br>Aktin<br>Maus anti Human               | 1:1000     | Chemicon           |
| Sekundärantikörper<br>HRP markiert<br>Kaninchen anti Maus  | 1:2000     | Amersham/Pharmacia |

### 2.4.4.3 Detektion mit dem ECL-Verfahren

Die mittels Auftrennung und Blottingverfahren gewonnen Proteinbanden wurden mit Hilfe des „ECL-detektion Kit“ (Fa. Amersham/Braunschweig) sichtbar gemacht.

Das Verfahren beruht auf folgendem Prinzip: Durch das Enzym HRP („horseradish peroxidase“), welches an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, wird das in der ECL vorhandene Substrat Luminol umgesetzt. Dabei entsteht Lumineszenz. Das emittierte Licht kann dann einen Röntgenfilm an der durch die Antikörper markierten Stellen schwärzen.

Das Verfahren wurde, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. Die Exponierung des Films (Fa. Kodak/New Haven) hing von der Intensität des Signals ab und betrug zwischen Minuten und Stunden.

## 2.5 Apoptose Nachweis

### 2.5.1 Hoechst 33342/ Propidiumiodid- Färbung

#### Live Dead Staining:

Diese Methode dient dazu, die Morphologie der verschiedenen Zelltodesformen voneinander abgrenzen zu können. Dabei wird mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet, hier Hoechst 33342 und Propidiumiodid (PrI).

Der Farbstoff Hoechst 33342 färbt lebende und früh apoptotische Zellen, bei diesen ist die Zellmembran noch intakt und der lipophile Farbstoff kann diese durchdringen. Bei Zellen, die nekrotisch bzw. spätapoptotisch sind, und deren Zellmembran nicht mehr oder nur teilweise intakt ist, kommt bei der Live Dead Staining Färbung die zusätzliche Färbung durch PrI hinzu.

Für das Live Dead Staining wurden Zellen wie beschrieben mit siRNA, Raf Inhibitor (BAY 43-9006) oder TNF $\alpha$  behandelt (siehe jeweilige Versuchsbeschreibung). Das Medium wurde abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen gegeben, die Zellen mit PBS gewaschen, diese ebenfalls in das



Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in das Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min. bei 1000 upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS einmal gewaschen, wieder zentrifugiert. Und je nach Größe des Pellets in 40 bis 100 µl der Färbelösung aufgenommen.

Live Dead Staining Färbelösung:      995 µl PBS  
  6,5 µl PrI ( Stock: 10 mM)  
  0,75 µl Hoechst 33342 (Stock: 13.3 mM)

Ca. 15 µl des Gemisches wurden auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es wurden pro Ansatz drei Mal 100 Zellen aus zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern gezählt.

### 2.5.2 Zellzahl und Toxizitäts Assay (Kristallviolett-Assay)

Bei dieser Methode handelt es sich um einen Test, bei dem die Überlebensrate bzw. die Zellzahl in Anwesenheit des Raf Inhibitors (BAY 43-9006) gemessen werden kann.

Für den Toxizitätsassay wurden in einer 96 Loch Platte 20000 Zellen pro Loch ausgesät und über Nacht unter normalen Wachstumsbedingungen gehalten. Einen Tag später wurden die Zellen für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen des Raf Inhibitors behandelt (von 5 nM bis 100 µM). Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit der Kristallviolett Lösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol in H<sub>2</sub>O steril filtriert) für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann einmal mit Leitungswasser und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fotoreaders (Fa. MWG Biotech/Ebersberg) bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

Zellen, die durch die Behandlung mit dem Inhibitor sterben, lösen sich von der Platte ab, während Zellen, die noch leben, sich mit dem Kristallviolett anfärben lassen. Im Photometer kann dann die Menge an Kristallviolett gemessen werden. Es werden Kurven erstellt, in denen die Menge an Kristallviolett in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors aufgetragen wird. Mit Hilfe der Kurve kann dann der IC 50 Wert ermittelt werden. Als IC 50 Wert bezeichnet man die Konzentration des Inhibitors, bei der die halbmaximale Kristallviolettkonzentration gemessen werden kann. Das heißt, die maximale Menge an Kristallviolett wird von unbehandelten Kontrollzellen angenommen und der IC 50 Wert wird bei der Hälfte dieses Wertes als Konzentration des Inhibitors abgelesen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Assay auf dieselbe Weise durchgeführt, nur dass er im Anschluss an einen Caspase Assay durchgeführt wurde.

### 2.5.3 Caspase Assay

Als ein zentraler Bestandteil der Apoptose gilt die Aktivierung von intrazellulären Caspasen. Deren Aktivität kann durch eine Reihe von Tests nachgewiesen werden. Eine einfache und spezifische Methode ist der Einsatz von Fluorochromen, die durch die Spaltung an einer speziellen Stelle durch die entsprechende Caspase aktiviert werden.

#### 2.5.3.1 Caspase 3 Assay

Es wurde das Caspase 3 Fluorochrom „Caspase-3 Substrate II, Fluorogenic“ (Fa. Calbiochem/Schwalbach) genutzt.

Für den Caspase 3 Assay wurden 20000 Zellen pro Loch einer 96 Lochplatte mit weißem Boden in 150 µl Wachstumsmedium ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Morgen mit dem Raf Inhibitor (BAY 43-9006) für 24 Stunden mit einer Konzentration von 20 µM behandelt.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch das Caspase 3 Fluorochrom (Fa. Calbiochem/Schwalbach) in der Konzentration 2,5 ng/µl gelöst in PBS ersetzt.

Die Lochplatte wurde mit dem Fluorochrom bei regulären Wachstumsbedingungen für 3 Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurde die Intensität des Fluorochroms mit Hilfe des ELISA Reader Victor<sup>2</sup> (Fa. Perkin Elmer Wallac/Freiburg) mit 355 nm angeregt und die Emission bei 485 nm gemessen.

#### 2.5.3.2 Caspase 3/7 Assay

Bei diesem Assay wird neben der Caspase 3 auch die Aktivität der Caspase 7 gemessen. Dafür wurde der Apo-1 Kit (Fa. Promega/Medison, USA) benutzt. Auch hierbei wurden 20000 Zellen pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät, über Nacht unter normalen Wachstumsbedingungen gehalten, am nächsten Morgen mit dem Raf Inhibitor (BAY 43-9006) für 24 Stunden mit 20 µM behandelt, sodass das Endvolumen 100 µl betrug.

Am darauffolgenden Tag wurde den Zellen, entsprechend der Herstellerempfehlung, das Reaktionssubstrat im gleichen Verhältnis zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei RT wurde die erste Messung mit Hilfe des ELISA Reader Victor<sup>2</sup> (Fa. Perkin Elmer Wallac/Freiburg) bei 485 nm Extinktion und 530 nm Emission, durchgeführt. Es folgten Messungen im 30-minütigen Abstand bis zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden.

## 2.6 Fixierung von Zellen

### 2.6.1 Paraformaldehyd Fixierung

Wenn Zellen nach einem Versuch länger gelagert werden sollten, wurden sie mit Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt, die Zellen wie üblich mit EDTA-Trypsin von der Kulturschale gelöst und ebenso in das Röhrchen gegeben. Das Gemisch wurde bei 1000 UpM für 5 min. abzentrifugiert und das Zellpellet mit PBS gewaschen, wieder herunterzentrifugiert und erneut mit PBS resuspendiert. Anschließend wurde 8% Paraformaldehyd zu gleichen Teilen zugesetzt. Das Gemisch wurde für 15 min. bei RT inkubiert, anschließend bei 10000 UpM abzentrifugiert und das entstandene Zellpellet wieder in PBS gelöst. Die Zellen wurden dann bis zu ihrer weiteren Benutzung im Kühlschrank im Dunkeln gelagert.

## 2.7 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte mit Hilfe des Leitz Aristoplan Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz/Wetzlar)

| Filterblock | Anregungsbereich | Fluoreszenzfarbstoff |
|-------------|------------------|----------------------|
| A           | Ultraviolett     | Hoechst              |
| I3          | Blau             | FITC                 |
| N 2.1       | Grün             | Cy 3, Pri            |

Für Fotos wurden die Fotoeinrichtungen Orthomat E (Fa. Leitz/Wetzlar) und INTAS Spot (Fa. INTAS) verwendet. Die digitale Bearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software Adobe Photoshop 6.0.

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, nähere Einblicke in die von c-Raf regulierten Signalwege zu erhalten. Speziell sollte es dabei um die Kontrolle von apoptoseregulierenden Wegen gehen.

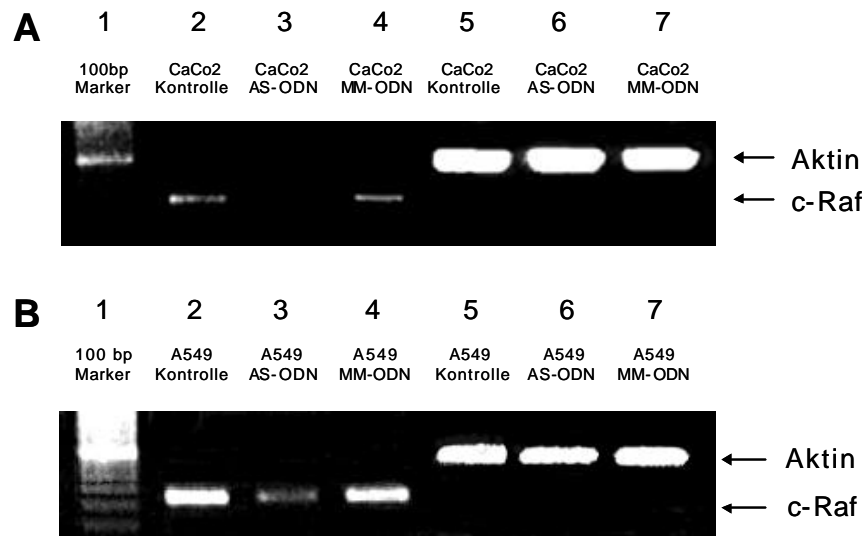
Dazu wurde durch die Verwendung von Antisens Oligodesoxynukleotiden bzw. von siRNA eine Reduktion von c-Raf ausgelöst und dann nach Apoptoseinduktion sowie deren Ursache gesucht. Als Vergleichsmöglichkeit diente der c-Raf Inhibitor BAY 43-9006.

#### 3.1 Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antisens Oligodesoxynukleotide (AS-ODN) und der small interfering RNA (siRNA)

Die Untersuchung der von c-Raf kontrollierten Signalwege, die zur Apoptose führen, legt die Reduktion von c-Raf zu Grunde. Um dies zu erreichen, wurde mit AS-ODN gearbeitet. Von AS-ODN ist bekannt, dass sie zur Reduktion von Genprodukten eingesetzt werden (Lau et al., 2002; Calogero et al., 1997). Um die Spezifität der eingesetzten AS-ODN zu überprüfen, wurden verschiedene Zellen mit diesen behandelt.

Dazu wurden Zellen, wie unter 2.2.5.3 beschrieben, mit den in 2.4.8.1 angegebenen AS-ODN transfiziert, am Tag 2 wiederholte sich die Transfektion und am Tag 3 wurden die Zellen zur RNA Präparation geerntet. Um die Spezifität der AS-ODN zu bestätigen, wurde ein Ansatz mit 300 nM „Mismatch“-ODN (MM-ODN) behandelt. Diese binden nicht an der Zielsequenz und führen deswegen nicht zu einer Reduktion von c-Raf. Die Transfektionsmethode war sonst dem Ansatz mit AS-ODN gleich.

Mittels RT-PCR wurde festgestellt, ob es durch die Transfektion mit den AS-ODN zu einer c-Raf Reduktion kam. Als Beispiele für die Reduktion werden hier zwei unterschiedliche Zelllinien angeführt, die während der gesamten Versuchsdauer in Kultur waren.



**Abb. 3.1: Nachweis der mRNA Level von c-Raf und Aktin in CaCo2 und A549 Zellen nach AS-ODN Behandlung**

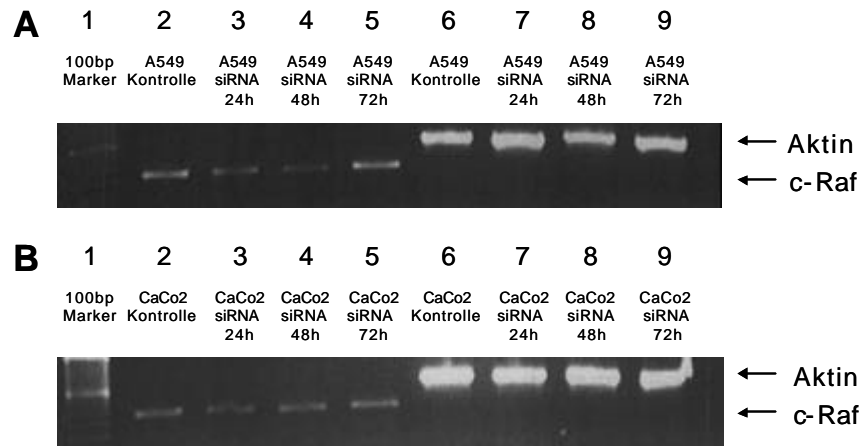
CaCo2 Zellen (gezeigt in A) und A549 Zellen (gezeigt in B) wurden entweder ohne AS-ODN (2), mit 300nM AS-ODN gegen c-Raf (3) oder mit 300 nM MM-ODN (4) für 72 Stunden behandelt. Als Kontrolle wurde Aktin überprüft (5 bis 7).

Das Bild zeigt deutlich, dass durch die Transfektion mit AS-ODN eine spezifische Reduktion der mRNA Level an c-Raf, in beiden gezeigten Zelllinien zu erreichen ist.

Durch die Verwendung der Missmatch-Proben wurde sichergestellt, dass es sich um einen, durch die verwendeten AS-ODN vermittelte, spezifische Reduktion von c-Raf mRNA handelt.

siRNA wurde in den letzten Jahren als ein Werkzeug des „Gen Knock Down“ vorgestellt. Was zuerst bei Drosophila untersucht wurde (Elbashir et al., 2001c), ist inzwischen eine verbreitete Methode (McManus and Sharp, 2002). Dieses spezifische „Gensilencing“ ist für die behandelte Fragestellung von großem Interesse. Deswegen wurde eine Vielzahl von Experimenten unter Verwendung von siRNA durchgeführt. Auch hier wurde zu Beginn der Arbeiten überprüft, ob die verwendete siRNA spezifisch eine Reduktion der mRNA Level von c-Raf erreicht.

Um einen ersten Anhaltspunkt für die größtmögliche Reduktion zu bekommen, wurde eine Kinetik über ein bis drei Tage begonnen. Dafür wurden die Zelllinien A549 und CaCo2 verwendet. Beide wurden wie unter 2.2.5.4 beschrieben transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden für die RNA Präparation geerntet. Es wurde eine RT-PCR angeschlossen, um den Zeitpunkt der stärksten Reduktion zu ermitteln.

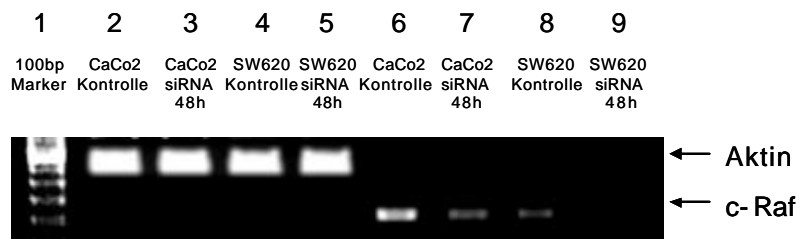


**Abb. 3.2: Nachweis der mRNA Level c-Raf in A549 Zellen und CaCo2 Zellen nach siRNA Behandlung**

A549 und CaCo2 Zellen wurden entweder ohne siRNA gegen c-Raf (2), für 24 Stunden mit 200 nM siRNA (3), für 48 Stunden mit 200 nM siRNA (4) oder für 72 Stunden mit 200 nM mit siRNA gegen cRaf behandelt (5) . Als interner Marker wurde Aktin detektiert (Spur 6 bis 9).

Bei Bild 3.2 zeigt sich, dass es zu einer Reduktion der mRNA Level kommt. Für die CaCo2 Zellen scheint der Effekt bei 24 Stunden besser zu sein, aber aufgrund des Ergebnisses bei den A549 Zellen, bei denen Spur 4 im Gegensatz zu Spur 2 deutlicher reduziert ist, wurden die Zellen anschließend für 48 Stunden mit siRNA behandelt.

Eine andere Zelllinie SW620 wurde ebenso auf eine Reduktion von c-Raf durch die siRNA Behandlung nach 48 Stunden überprüft.

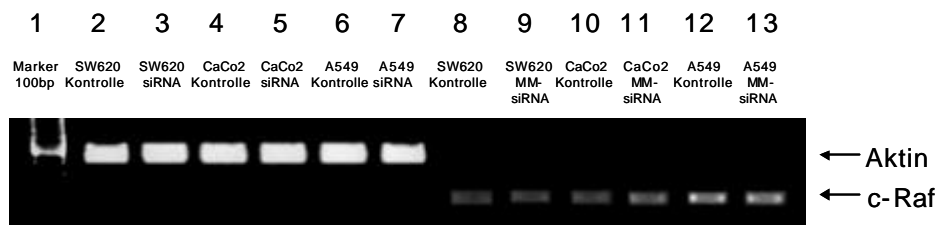


**Abb. 3.3: Nachweis der mRNA Level von Aktin und c-Raf in SW620 und CaCo2 Zellen nach siRNA Behandlung**

CaCo2 Zellen entweder ohne siRNA gegen c-Raf (6) oder für 48 Stunden mit 200 nM siRNA (7) behandelt. SW620 Zellen wurden entweder ohne siRNA gegen c-Raf (8) oder mit 200 nM siRNA für 48 Stunden (9) behandelt. Als interne Kontrolle wurde Aktin kontrolliert (Spur 1 bis 5)

Für alle drei Zelllinien konnte gezeigt werden, dass es mit der Behandlung der siRNA zu einer deutlichen Reduktion der Level von c-Raf bei den unterschiedlichen Zelllinien kommt. Für alle weiteren Experimente wurde der Zeitpunkt 48 Stunden gewählt, weil dort bei allen drei verwendeten Zelllinien eine gut sichtbare Reduktion erreicht wurde.

Um zu zeigen, dass die Reduktion nur auf der Transfektion mit der spezifischen siRNA beruht, wurden verschiedene Zelllinien mit einer „Mismatch siRNA“ wie unter 2.2.5.4 beschrieben transfiziert. Diese bindet wie die MM-ODN nicht an der Zielsequenz, sodass es nicht zur Reduktion des Zielgens kommen soll. Die RNA der Zelllinien wurde nach 48 Stunden präpariert und mittels RT-PCR auf die Stabilität der c-Raf mRNA Level untersucht.



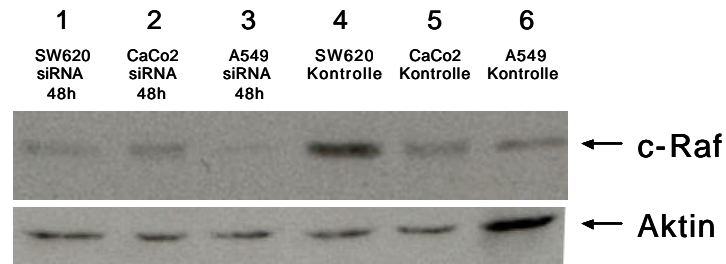
**Abb. 3.4: Nachweis der c-Raf und Aktin mRNA Level mittels RT-PCR**

SW620 Zellen wurden ohne MM-siRNA (8) oder mit 200 nM MM-siRNA für 48 Stunden behandelt (9). CaCo2 Zellen wurden ohne MM-siRNA (10) oder mit 200 nM MM-siRNA für 48 Stunden behandelt (11). A549 Zellen wurden ohne MM-siRNA (12) oder mit 200 nM MM-siRNA für 48 Stunden behandelt (13). Als Kontrolle wurde für alle Proben Aktin detektiert (2 bis 7).

Wie man bei Bild 3.4 erkennt, schwanken zwar die Level von c-Raf zwischen den Zelllinien, aber im Vergleich der Kontrolle zu „Mismatch siRNA“ findet sich innerhalb der Zelllinien kein Unterschied. Dies zeigt, dass die Transfektion an sich, wie die Transfektion mit „Mismatch siRNA“, keinen Einfluss auf den mRNA Level besitzt. Nur wenn die spezifisch bindende siRNA in die Zellen transfiziert wird, kommt es aufgrund der oben geschilderten Mechanismen zu einer Reduktion der mRNA Level von c-Raf.

Um auch sicherzustellen, dass die Ergebnisse, die als weiteres Modell dienen sollen, nicht alleine auf der Methode der RT-PCR beruhen, wurden die Proteinlevel an c-Raf in Zellen mit und ohne siRNA Behandlung ermittelt.

Dazu wurden die Zellen A549, CaCo2 und SW620 wie unter 2.2.5.4 transfiziert und nach 48 Stunden zur Proteinextraktion geerntet. Die Proteinextraktion und weitere Bearbeitung für den Immuno-Blot ist unter 2.5 beschrieben.



**Abb. 3.5: Nachweis des c-Raf Proteins bei Behandlung mit siRNA mittels Immunoblot**

SW620 Zellen wurden ohne siRNA (4) oder mit 200 nM siRNA für 48 Stunden behandelt (1). CaCo2 Zellen wurden ohne siRNA (5) oder mit 200 nM siRNA für 48 Stunden behandelt (2). A549 Zellen wurden ohne siRNA (6) oder mit 200 nM siRNA für 48 Stunden behandelt (3). Als interne Kontrolle wurde Aktin detektiert.

Abbildung 3.5 zeigt bei allen verwendeten Zelllinien eine Reduktion auf Proteinebene, diese schwankt zwar von Zelllinie zu Zelllinie, ist aber bei allen dreien nachweisbar.

Nachdem auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte, dass die siRNA eine Reduktion von c-Raf erreicht, wurde dieses Modell weiter verwendet, um die ursprüngliche Fragestellung zu untersuchen.



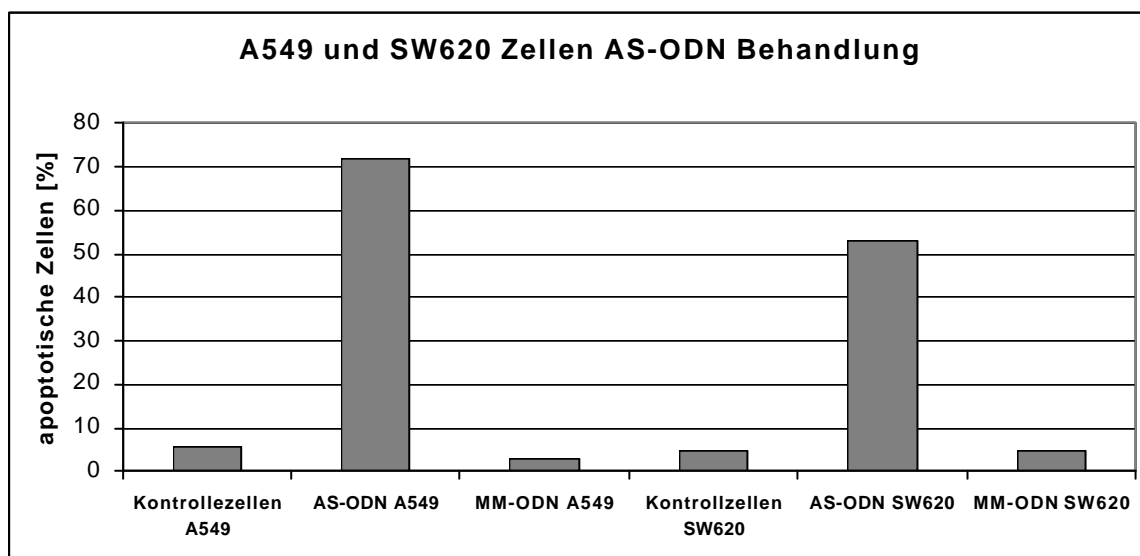
### 3.2 Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit AS-ODn bzw. siRNA gegen c-Raf

Eine einfache Möglichkeit die Apoptoseinduktion zu beurteilen, ergibt sich bei der Hoechst Propidiumiodid Färbung (Live Dead Staining). Die Durchführung ist unter 2.5.1 beschrieben.

Maßgeblich für die Verwendung spricht, dass die Chromatinkondensation ein Bestandteil des apoptotischen Phenotyps ist und dementsprechend die Rate der apoptotischen Zellen ermittelt werden kann (Lassus et al., 2002).

Um den Anteil der apoptotischen Zellen nach der AS-ODN Behandlung zu ermitteln, wurden A549 und SW620 Zellen mit 300 nM AS-ODN bzw. MM-ODN am Tag 1 transfiziert. Diese Transfektion wiederholte sich am Tag 2. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und mit Hoechst Propidiumiodid gefärbt. Es wurden die Zellen als apoptotisch gewertet, die eine Chromatinkondensation zeigten. Dabei wurden, in zufälligen Gesichtsfeldern, drei Mal je 100 Zellen ausgezählt

Es ergab sich Folgendes:



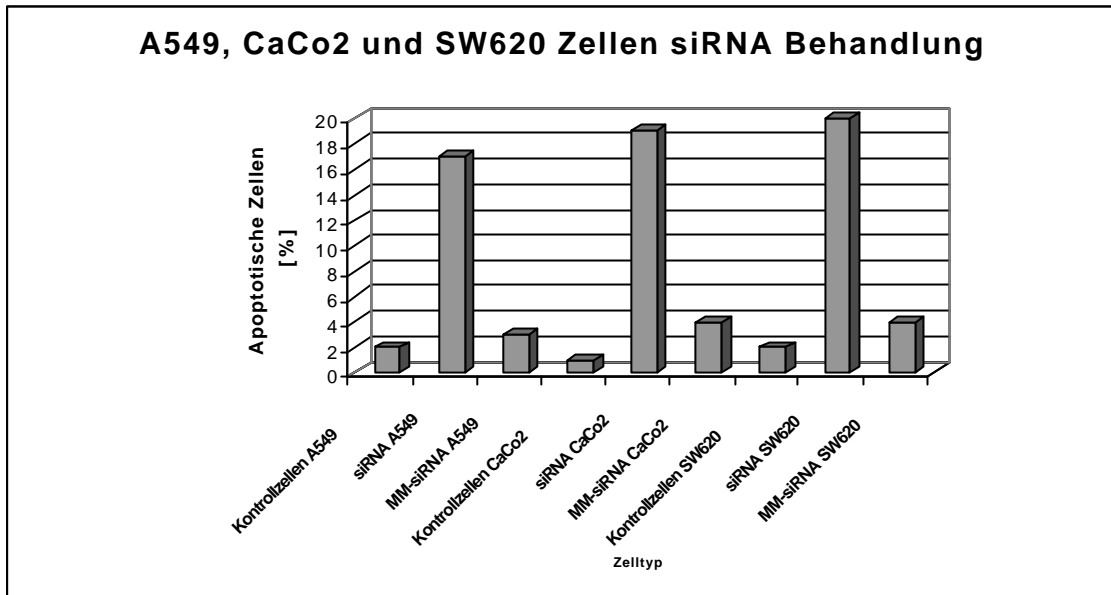
**Abb. 3.6: Bestimmung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen nach AS-ODN Behandlung**

A549 und SW620 Zellen wurden nicht, mit 300 nM AS-ODN bzw. mit 300 nM MM-ODN für 72 Stunden behandelt. Anschließend wurden sie mit Hoechst PrI gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt.

Man kann bei beiden verwendeten Zelllinien eine sehr deutliche Steigerung der apoptotischen Zellen nachweisen.

Anschließend wurde der Versuch für die Zellen nach Behandlung mit der gegen c-Raf gerichteten siRNA durchgeführt. Für die Ermittlung des Anteils an apoptotischen Zellen bei der siRNA Behandlung wurden die Zellen entweder mit 200 nM siRNA oder mit 200 nM MM-siRNA wie

beschrieben transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Nach der Färbung mittels Hoechst und Pri wurden drei Mal je 100 Zellen in zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt.



**Abb. 3.7: Bestimmung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen nach siRNA Behandlung**

A549, CaCo2 und SW620 Zellen wurden nicht bzw. mit 200 nM siRNA oder 200 nM MM-siRNA für 48 Stunden behandelt. Anschließend wurden sie mit Hoechst Pri gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt.

Sowohl für die AS-ODN als auch für die Behandlung mit der siRNA kann gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme der Apoptose kommt. Aufgrund dessen, dass bei diesen Experimenten cRaf spezifisch reduziert wurde (s. Ergebnisse der RT-PCR und des Proteinlevels), darf man davon ausgehen, dass das Fehlen von c-Raf dafür verantwortlich ist.

Die nächste Frage war, ob diese Induktion von Apoptose auch durch die Verwendung des c-Raf Inhibitors BAY 43-9006 reproduziert werden kann.

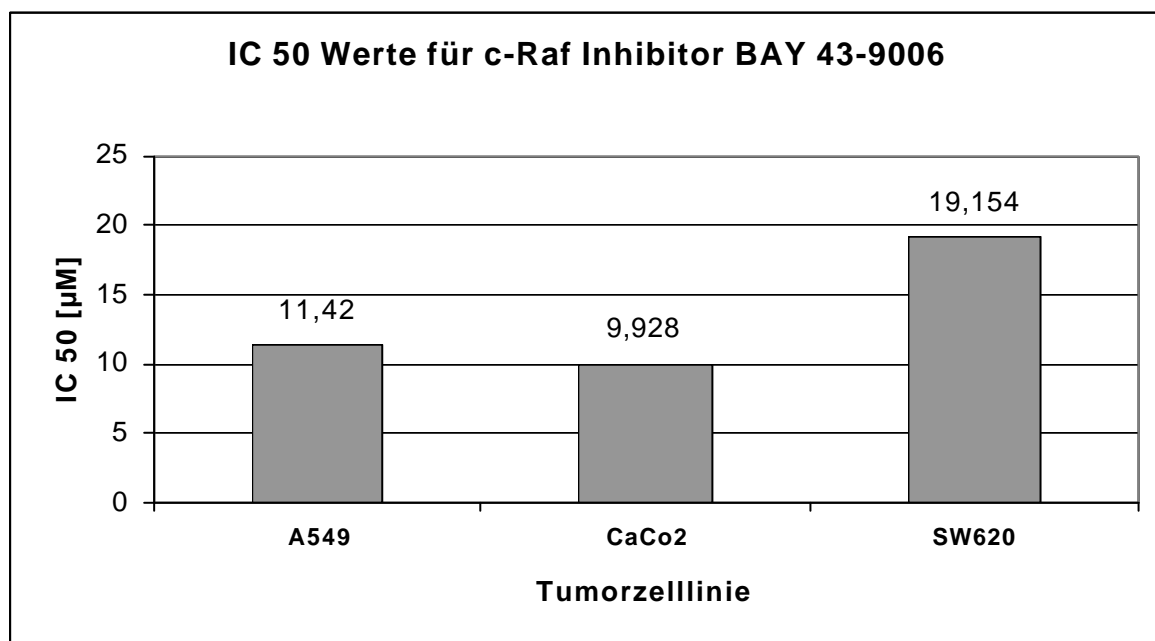
### 3.3 Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit dem c-Raf Inhibitor BAY 43-9006

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mittels AS-ODN und siRNA eine Reduktion von cRaf möglich ist, und dass diese Reduktion zu einer Steigerung der apoptotischen Rate um das Vierfache führt, sollte dies durch den Einsatz eines chemischen Inhibitors überprüft werden.

Als Inhibitor wurde der c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 gewählt. Er wird in der Literatur als wirkungsvoll und spezifisch beschrieben (Lowinger et al., 2002; Lyons et al., 2001).

#### Ermittlung der IC 50 Werte für die verschiedenen Zelllinien

Als IC 50 bezeichnet man die Konzentration bei der 50% der Zellen durch den Inhibitor getroffen werden. Um den IC 50 Wert zu bestimmen, wurde ein Kristall Violet Assay (Toxizitäts Assay; Bonnekoh et al., 1989) durchgeführt. Zur Durchführung siehe 2.6.3. Für den Assay wurden die Zelllinien A549, CaCo2 und SW620 verwendet.



**Abb. 3.8: Ermittlung des IC 50 Wertes für den c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 in den Zelllinien A549, CaCo2 und SW620**

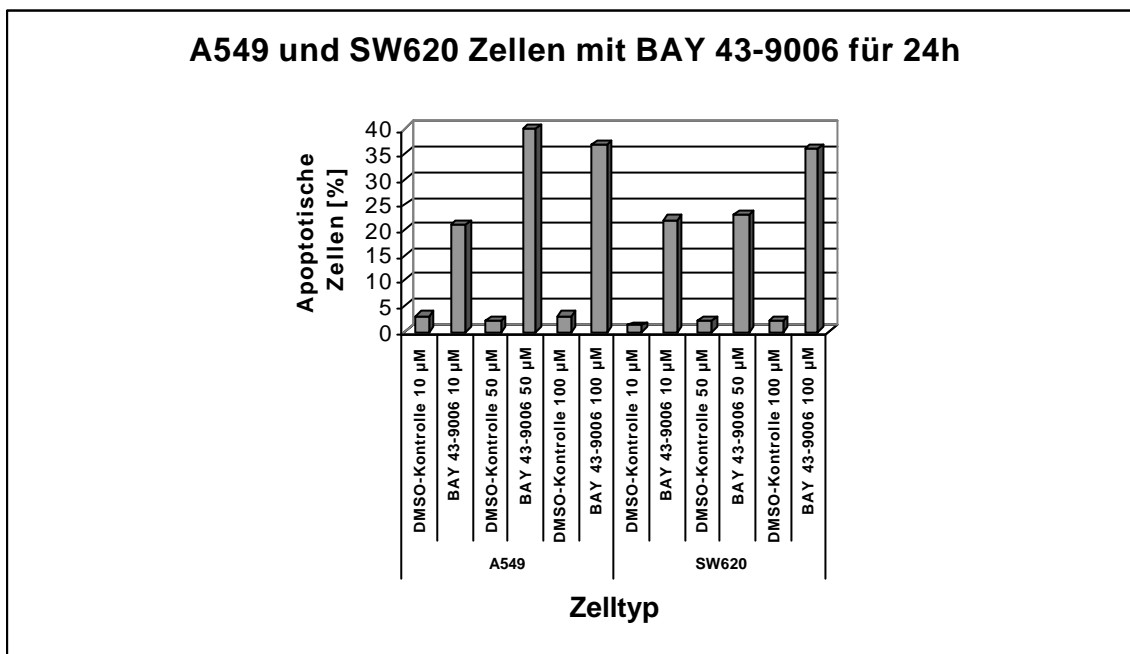
Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer Konzentrationskinetik von 5 nM bis 100 µM mit dem c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 behandelt, nach 24 Stunden mit Kristall Violet gefärbt und mit dem Photoreader ausgewertet.

Bei den Zelllinien A549 und CaCo2 liegen die IC 50 Werte noch nah beieinander, allerdings ist der SW620 IC 50 Wert sehr weit davon entfernt.

### 3.4 Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit dem c-Raf Inhibitor BAY 43-9006

Um den IC 50 Wert besser mit einer Apoptoseinduktion in Verbindung bringen zu können, wurde für den Inhibitor zum Zeitpunkt 24 Stunden eine Konzentrationskinetik erstellt.

Es wurden Zellen der Zelllinien A549 und SW620 für 24 Stunden mit 10, 50 und 100µM des Inhibitors BAY 43-9006 behandelt. Anschließend wurden sie geerntet und mit Hoechst und Pri gefärbt, der Anteil apoptotischer Zellen wurde dann per Mikroskop ermittelt.



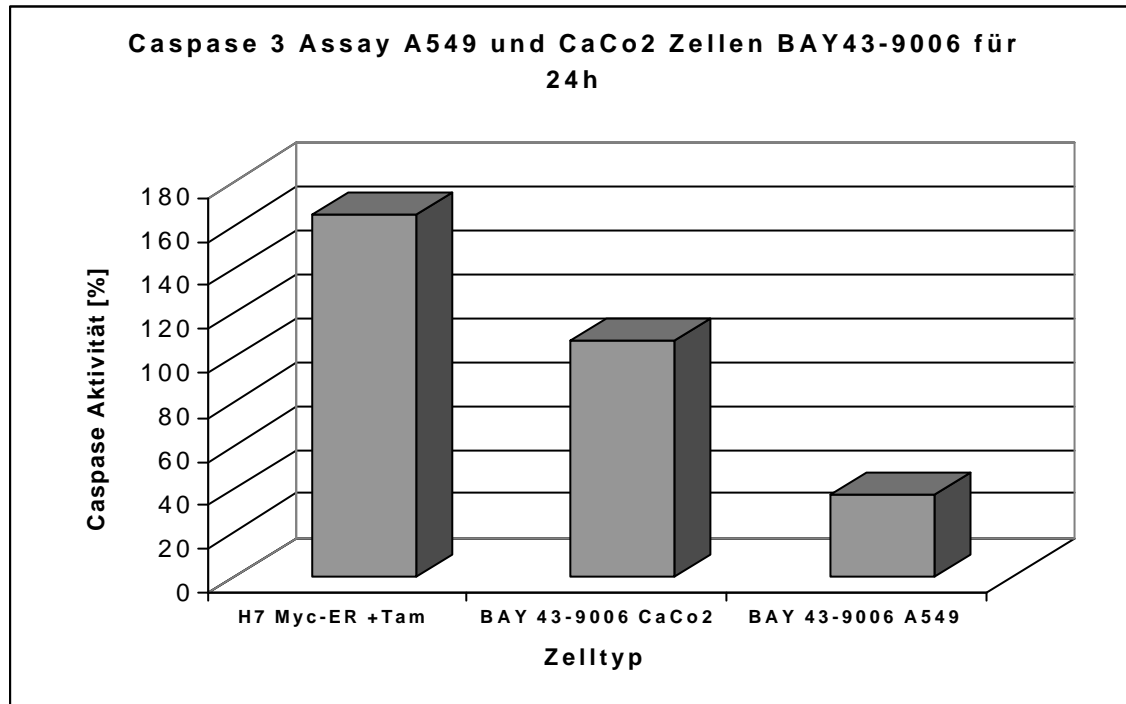
**Abb. 3.9: Bestimmung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen bei Behandlung mit c-Raf Inhibitor BAY 43-9006**

A549 Zellen und SW620 Zellen wurden für 24 mit dem c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 in Konzentrationen von 10 µM, 50 µM und 100µM behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst und Pri gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen unter dem Mikroskop ermittelt.

Sowohl A549 als auch bei den SW620 Zellen ist die Steigerung der apoptotischen Zellen gut zu erkennen. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Resultate der Kristall Violet Assays wurde die Behandlungskonzentration von 20 µM gewählt. Ausschlaggebend hierfür war, dass bei der Behandlung mit höheren Konzentrationen gleichzeitig der Anteil nekrotischer Zellen unverhältnismäßig anstieg und bei der Konzentration von 20 µM sichergestellt wird, dass mehr als 50% der Zellen inhibiert werden.

Um auch die CaCo2 Zellen in ihrem Verhalten auf den Inhibitor beurteilen zu können, wurden auch sie für 24 Stunden mit diesem behandelt. Um die Steigerung des apoptotischen Anteils zu ermitteln, wurde bei ihnen ein Caspase 3 Assay durchgeführt (zur Durchführung siehe 2.5.3).

Um eine Positivkontrolle zu haben, wurden Rat-1 Myc-ER Zellen verwendet. Bei ihnen steht das Onkogen Myc unter der Kontrolle des Östrogenrezeptors. Wenn 4OHT zu den Zellen gegeben wird, wird das Myc Gen damit aktiv. Eine überschüssige Aktivität des Onkogens treibt die Zellen in die Apoptose.



**Abb. 3.10: Nachweis der Caspase 3 Aktivität nach BAY 43-9006 Behandlung in den Zelllinien**

Als Positivkontrolle wurden Rat-1 Myc-ER Zellen mit 200 nM Tamoxifen behandelt. CaCo2 und A549 Zellen wurden mit 20  $\mu$ M Bay 43-9006 für 24 Stunden behandelt. Den Zellen wurde dann ein Caspase 3 Fluorochrom zugesetzt und die Intensität des Fluorochroms mit dem ELISA Wallac Reader gemessen.

Zwar ist der Anstieg der Caspaseaktivität bei den gezeigten Zelllinien nicht so stark wie bei der Positivkontrolle, aber für die CaCo2 Zellen lässt sich eine Steigerung um 100% errechnen. Für die A549 Zellen ergibt sich eine Zunahme der Caspase 3 Aktivität um über 33%.

Durch dieses Ergebnis sind die Ergebnisse der Hoechst PrI Färbung bestätigt und man kann bei allen drei Zelllinien eine Apoptoseinduktion durch die Blockade von c-Raf erkennen. Damit ist auch der Nachweis für die Wirksamkeit erbracht.

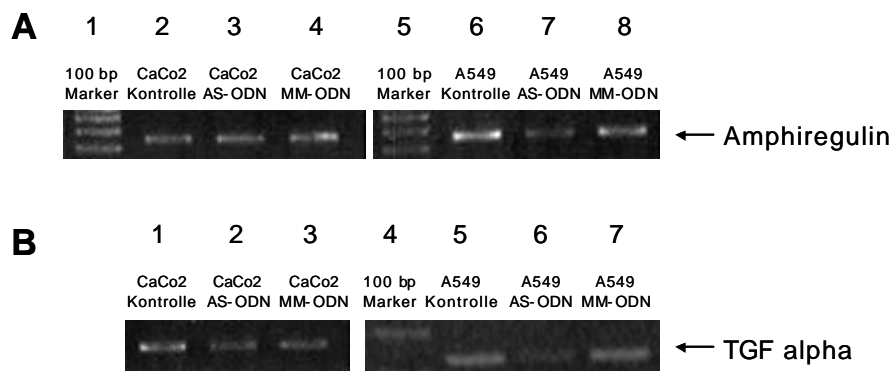
Zusammenfassend lässt sich mit allen drei Methoden (AS-ODN, siRNA und dem Inhibitor) die Expression reduzieren bzw. die Aktivität von c-Raf blockieren. Dies führt wie gezeigt zu einer Zunahme apoptotischer Zellen bei allen drei Tumorzelllinien.

### 3.5 Verhalten verschiedener EGF-Rezeptor Liganden durch die unterschiedlichen Behandlungsmethoden

Ausgehend von der Beobachtung, dass Transkriptionsereignisse, die durch den MEK-ERK Pathway kontrolliert werden, eine Schlüsselrolle in der von c-Raf kontrollierten Blockade der Apoptose spielen, und dass es einigen Wachstumsfaktoren möglich scheint, Zellen vor dem Zelltod zu retten (Schulze et al., 2001), wurden Wachstumsfaktoren untersucht, die an den EGF-Rezeptor binden. Die Frage war, ob c-Raf die Transkription von Genen kontrolliert, die über einen autokrinen Loop ein Überlebenssignal geben.

#### 3.5.1 Bei Behandlung mit AS-ODN

Um dies zu untersuchen, wurden Zellen der verschiedenen Zelllinien mit 300 nM AS-ODN behandelt und am Tag 3 zur RNA Präparation geerntet. Es folgte eine Untersuchung mittels RT-PCR auf die Wachstumshormone Amphiregulin, TGF alpha und HB-EGF.



**Abb. 3.11: Nachweis des Amphiregulin (A) und TGF alpha (B) mRNA Levels in A549 und CaCo2 Zellen bei AS-ODN Behandlung**

A: Marker (1), CaCo2 Kontrollzellen (2), CaCo2 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM AS-ODN (3) und CaCo2 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM MM-ODN (4). Marker (5) A549 Kontrollzellen (6), A549 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM AS-ODN (7)

und A549 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM MM-ODN (8).

B: CaCo2 Kontrollzellen (1), CaCo2 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM AS-ODN (2) und CaCo2 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM MM-ODN (3). Marker (4), A549 Kontrollzellen (5), A549 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM AS-ODN (6)

und A549 Zellen behandelt für 72 Stunden mit 300 nM MM-ODN (7).

In Abbildung 3.11 A zeigt sich besonders deutlich eine Reduktion von Amphiregulin bei den CaCo2 Zellen (Spur 2 zu Spur 3). Diese Reduktion ist nicht so deutlich bei den A549 Zellen (Spuren 6 bis 8).

In Abbildung 3.11 B sieht man eine deutliche Reduktion von TGF alpha bei den A549 Zellen (Spur 5 zu Spur 6), diese ist auch in den CaCo2 Zellen gut sichtbar (vgl. Spur 1 mit Spur 2). Für HB-EGF

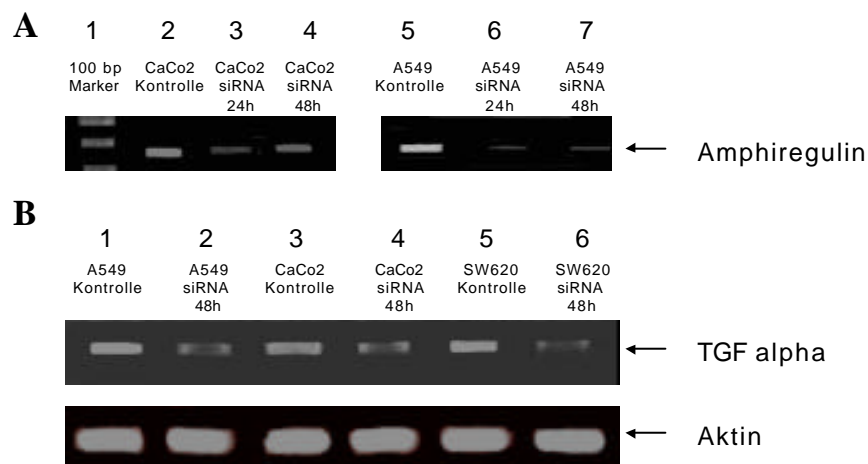
ließ sich bei der Verwendung von AS-ODN keine Reduktion erreichen, sodass in den nachfolgenden Versuchen nicht mehr die Reduktion des HB-EGF mRNA Levels überprüft wurde.

Einige der Ergebnisse in Abbildung 3.11 sind leider nicht so gut erkennbar wie auf den Originalgelen.

Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse nur ein Effekt der AS-ODN sind, wurden mit den gleichen Zelllinien Versuche unternommen, bei denen mit siRNA statt AS-ODN verwendet wurde.

### 3.5.2 Bei Behandlung mit siRNA

Zur Untersuchung, ob das Ergebnis durch die AS-ODN nur auf die Behandlung der Zellen mit den AS-ODN zurückzuführen ist, wurde das obige Experiment wiederholt. Diesmal allerdings wurden die verschiedenen Tumorzelllinien mit siRNA gegen c-Raf behandelt und die RNA nach 48 Stunden geerntet. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels semiquantitativer RT-PCR.



**Abb. 3.12: Nachweis des mRNA Levels für Amphiregulin nach siRNA Behandlung**

A: Marker (1) CaCo2 Zellen Kontrollzellen (2), CaCo2 Zellen behandelt für 24 Stunden mit 200 nM siRNA (3) und CaCo2 Zellen behandelt für 48 Stunden mit 300 nM siRNA (4). A549 Kontrollzellen (5), A549 Zellen behandelt für 42 Stunden mit 200 nM siRNA (6)

und A549 Zellen behandelt für 48 Stunden mit 200 nM siRNA (7).

B: A549 Kontrollzellen (1), A549 Zellen nach 200 nM siRNA Behandlung (2). CaCo2 Kontrollzellen (3), CaCo2 Zellen nach 200 nM siRNA Behandlung (4). SW620 Kontrollzellen (5), SW620 Zellen nach 200 nM siRNA Behandlung (6). Als interne Kontrolle wurde Aktin detektiert (siehe untere Linie).

Für Amphiregulin zeigt sich bei der Behandlung mit der siRNA in Abbildung 3.12 A für beide gezeigten Zelllinien eine deutliche Reduktion. Diese ist bei den A549 Zellen (Spur 5 bis 7 Abb. 3.12) besser sichtbar als die Reduktion unter AS-ODN Behandlung (Abb. 3.11 Spur 6 bis 8).

Es fällt auf, dass in Abbildung 3.12 B unterschiedlich starke Reduktionen des mRNA Levels von TGF alpha nach der siRNA Behandlung erreicht werden. So ist die Reduktion für die A549 und CaCo2 Zellen besonders deutlich, schwächer dagegen bei den SW620 Zellen.

Die unterschiedlich starke Reduktion der Banden kann evtl. dadurch begründet sein, dass nicht alle Wachstumsfaktoren für die verschiedenen Tumorzelllinien dieselbe Bedeutung haben. Die A549 Zellen als Lungenadenokarzinomzelllinie und die CaCo2 als Colonadenokarzinomzelllinien scheinen besser als die Metastasenzelllinie SW620 anzusprechen. Deutlich wird aber, dass es zu einer Reduktion kommt. Interessanterweise sind, wie oben erwähnt, beide Wachstumsfaktoren Liganden des EGF-Rezeptors.

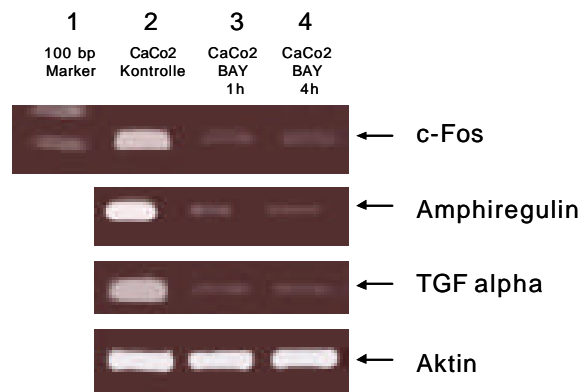
### 3.5.3 Bei Behandlung mit dem Inhibitor BAY 43-9006

Ausgehend davon, dass bei den Versuchen mit den AS-ODN und der siRNA vor allem die Runterregulation von autokrinen Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen scheint, wurde dies auch bei dem Einsatz des Inhibitors untersucht.

Dazu wurden Zellen der Zelllinien CaCo2 und A549 mit dem Raf Inhibitor BAY 43-9006 behandelt. Anders aber als bei der morphologischen Überprüfung der Apoptose wurden wesentlich kürzere Zeitpunkte gewählt, da eine Genregulation schneller hätte erfolgen müssen.

Als Marker für eine c-Raf Blockade wurde eine Reduktion von c-Fos mRNA gewertet.

Gezeigt werden als Beispiel die Daten der CaCo2 Zelllinien (Abb. 3. 13) zur Auswertung siehe Tabelle 3.1.4



**Abb. 3.13: Nachweis des mRNA Levels für c-Fos, Amphiregulin und TGF alpha in BAY 43-9006 behandelten CaCo2 Zellen.**

CaCo2 Kontrollzellen wurden nicht behandelt (6) bzw. mit 20  $\mu$ M BAY 43-9006 für 1 Stunde (7) oder mit 20  $\mu$ M für 4 Stunden (8). Der Nachweis der mRNA Level erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurde Aktin detektiert.



|              | A549<br>Kontrolle | A549<br>BAY 1h | A549<br>BAY 4h | CaCo2<br>Kontrolle | CaCo2<br>BAY 1h | CaCo2<br>BAY 4h |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| c-Fos        | ++                | (+)            | -              | ++                 | -               | -               |
| Aktin        | +++               | +++            | +++            | +++                | +++             | +++             |
| Amphiregulin | +++               | ++             | +++            | ++                 | -               | (+)             |
| TGF alpha    | +++               | (+)            | +              | +++                | (+)             | (+)             |

**Tab. 3.1: Nachweis des mRNA Levels für c-Fos, Amphiregulin und TGF alpha in BAY 43-9006 behandelten A549 und CaCo2 Zellen**

A549 Kontrollzellen wurden nicht behandelt bzw. mit 20 µM BAY 43-9006 für 1 Stunde oder mit 20 µM für 4 Stunden. Der Nachweis der mRNA Level erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurde Aktin detektiert. Die Stärke der Expression wurde mit „+++“ für sehr stark, mit „++“ für stark, mit „+“ für mässig, „(+)-“ für schwach und mit „-“ für nicht bewertet.

CaCo2 Kontrollzellen wurden nicht behandelt bzw. mit 20 µM BAY 43-9006 für 1 Stunde oder mit 20 µM für 4 Stunden. Der Nachweis der mRNA Level erfolgte mittels RT-PCR. Als Kontrolle wurde Aktin detektiert. Zur Bewertung siehe oben.

Bei den CaCo2 Zellen, ließ sich sowohl für eine als auch vier Stunden eine Reduktion von c-Fos zeigen, sodass das Verhalten der autokrinen Wachstumsfaktoren Amphiregulin und TGF alpha überprüft wurde (siehe Balken darunter).

Für TGF alpha wurde nach der Wiederkehr des Amphiregulin Signals nach 4 Stunden nur der 1-Stundenwert auf eine Reduktion getestet. Dabei kann gezeigt werden, dass bei den CaCo2 Zellen die autokrinen Wachstumsfaktoren innerhalb von einer Stunde runterreguliert werden, bei Einsatz des Inhibitors.

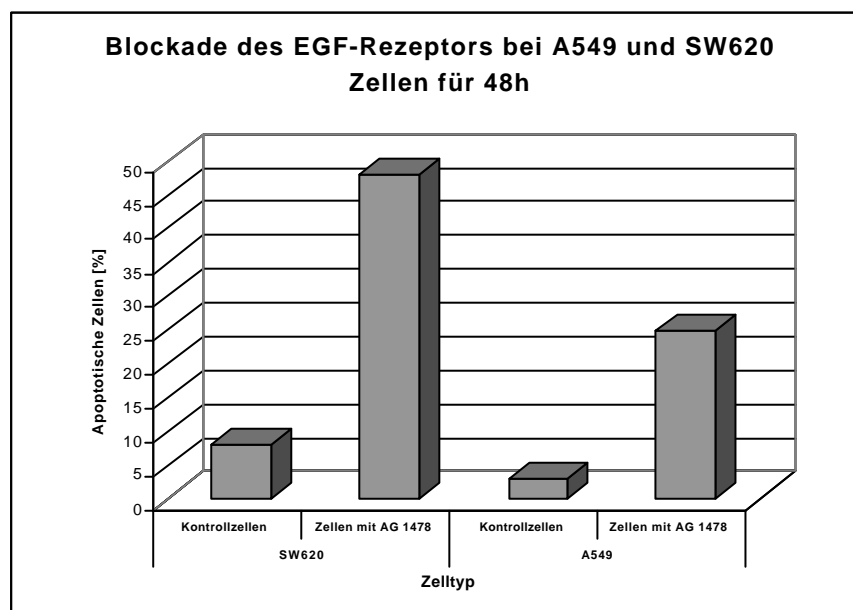
Für die A549 Zellen ließ sich keine Reduktion durch den Einsatz des c-Raf Inhibitors BAY 43-9006 erreichen.

### 3.6 Blockade des EGF-Rezeptors mittels Inhibitor AG 1478

Anhand der Ergebnisse der RT-PCR und aufgrund der Beobachtungen, dass EGF-Rezeptor Liganden Zellen vor der Apoptose schützen (Schulze et al., 2001), wurde der Versuch unternommen, mittels eines chemischen Rezeptorblockers den EGF-Rezeptor zu blockieren und dann die Auswirkungen mit den Resultaten der AS-ODN, der siRNA und der c-Raf Inhibitor Experimente zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde der EGF-Rezeptor Blocker AG 1478 (Fa. Calbiochem/Schwallbach) benutzt.

Zellen der Zelllinien A549 und SW620 wurden, wie unter 2.2.7.2 beschrieben, zuerst für 24 Stunden mit dem Blocker behandelt und dann zum Zeitpunkt von 48 Stunden geerntet.

Als bewährte Methode für den Nachweis eines Anstiegs der apoptotischen Zellen wurde die Hoechst Propidiumiodid Färbung gewählt (Live Dead Staining s. 2.6.1). Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung sind in der Abbildung 3.14 dargestellt.



**Abb. 3.14: Bestimmung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen bei Blockierung des EGF-Rezeptors**

A549 Zellen wurden für 48 Stunden mit dem EGF-Rezeptor Blocker AG 1478 (24  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst PrI gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen unter dem Mikroskop ermittelt.

Bei den A549 Zellen sieht man in Abbildung 3.14, dass nach 48 Stunden eine Erhöhung des Anteils der apoptotischen Zellen um das Dreifache vorliegt. Die Anzahl der lebenden Zellen sinkt zu diesem Zeitpunkt um über 30% ab.

Bei den SW620 Zellen war schon zum Zeitpunkt von 24 Stunden ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen zu sehen (Daten nicht im Diagramm dargestellt). Verglichen mit der Kontrolle fand sich zum Zeitpunkt von 48 Stunden eine Erhöhung der apoptotischen Zellen um das

Neunfache. Auffällig ist, dass beide Zelllinien trotz vergleichbarer Apoptose-Raten bei der Behandlung mit siRNA unterschiedlich stark auf die Blockade mit dem EGF-Rezeptor Blocker reagierten.

Möglich wäre, dass die verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich stark an das Funktionieren des EGF-Rezeptors gebunden sind.

Trotzdem überrascht der Unterschied angesichts der Daten, die bei der Behandlung mit den AS-ODN und der siRNA entstanden sind. Es stellt sich die Frage, ob noch andere Signalwege in die Apoptosekontrolle von c-Raf involviert sind. Eine Möglichkeit wäre eine differentielle Genexpression, welche durch den Einsatz von cDNA Arrays dargestellt werden kann.

### 3.7 Überprüfung einer differentiellen Genexpression mittels cDNA Array

Um eine mögliche differentielle Genexpression bei den Tumorzelllinien zu testen, wurden zuerst cDNA Arrays durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen erneut für 48 Stunden mit siRNA behandelt. Es folgte die RNA Präparation. Von der RNA wurden 5 bis 10 µg in cDNA umgeschrieben. Während des Umschreibens wurde die cDNA gleichzeitig radioaktiv markiert. Die so gelabelte cDNA wurde, wie unter 2.4.7 beschrieben, mit der Array Membran inkubiert.

Bei der Auswertung des zuerst durchgeführten Arrays „Human Apoptosis-1 GEMArray“ (Fa. Biomol/Hamburg) ergab sich für die A549 Zellen keine differentielle Expression.

Der Array konnte die Frage nach einer differentiellen Genexpression nur für die getesteten Gene beantworten. Um weitere Kandidatengene (Schulze et al., 2001) zu überprüfen, wurde der Array „Human Apoptosis-5/ TNF & Fas Network GEMArray“ (Fa. Biomol/ Hamburg) durchgeführt.

Es wurden erneut Zellen mit siRNA behandelt und nach 48 Stunden zur RNA Isolation geerntet. Wie oben beschrieben, erfolgte die Umschreibung und Radioaktivmarkierung der RNA (s. auch 2.4.7).

|                       | A549 Zellen | CaCo2 Zellen | SW620 Zellen |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>Survivin</b>       | +           | -            | -            |
| <b>TNF-Rezeptor 1</b> | ++          | +            | -            |
| <b>Fas-Rezeptor</b>   | -           | -            | -            |
| <b>B-Actin</b>        | -           | -            | -            |

**Tab. 3.2: cDNA Array „Human Apoptosis-5“ für A549, CaCo2 und SW620 Zellen nach siRNA Behandlung**

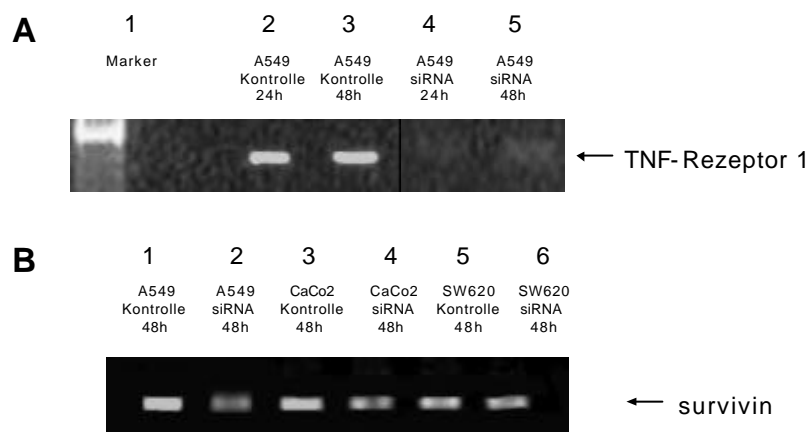
Dargestellt sind die schematischen Veränderungen in der Expression, Veränderung von 4 ausgewählten Genen bei der Behandlung mit siRNA. Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA gegen c-Raf für 48 Stunden behandelt. Die RNA wurde isoliert, radioaktiv markiert und für die Hybridisierung mit der Array Membran verwendet. Ein „+“ markiert, dass auf dem jeweiligen Array eine Änderung der Expression zu sehen war, die „-“ Markierung, dass keine Änderung eintrat.

Man erkennt, dass bei den A549 Zellen eine Reduktion der mRNA Level für den TNF-Rezeptor 1 sowie survivin nach der siRNA Behandlung erzielt wird. Bei den CaCo2 Zellen scheint nur die Expression der mRNA für den TNF-Rezeptor 1 nach siRNA Behandlung verringert zu sein.

Bei den SW620 Zellen ergab sich keine Änderung, allerdings hatte die Array Membran auch eine schlechte Signalqualität.

### 3.8 Untersuchung des Expressionsmusters für den TNF-Rezeptor 1 (CD 120a) und survivin in den Tumorzelllinien

Nachdem über die cDNA Arrays der Hinweis auf eine Regulation des TNF-Rezeptor 1 und survivin vorlag, war die nächste Fragestellung ob sich diese Hinweise durch eine RT-PCR bestätigen ließen. Dafür wurden A549, CaCo2 und SW620 Zellen, wie üblich, mit siRNA behandelt und nach 24 und 48 Stunden weiter kultiviert. Es schloss sich eine RNA Isolation und RT-PCR an.



**Abb. 3.15: Nachweis der mRNA Level für TNF-Rezeptor 1 und Survivin**

A: A549 Zellen wurden nicht behandelt (Kontrollen 24 und 48 Stunden Spur 2 und 3) bzw. mit 300 nm siRNA gegen c-Raf. Anschließend wurden die mRNA Level für den TNF-Rezeptor 1 mittels RT-PCR ermittelt.

B: A549 Zellen wurden nicht (Kontrolle Spur 1) bzw. mit 200 nM siRNA (Spur 2) gegen c-Raf für 48 Stunden behandelt. Die RNA wurde isoliert und für eine RT-PCR zur Ermittlung der survivin mRNA Level verwendet. Spur 3 zeigt das Level für CaCo2 Kontrollzellen, Spur 4 CaCo2 Zellen mit siRNA behandelt, Spur 5 für SW620 Kontrollzellen und Spur 6 für SW620 Zellen mit siRNA gegen c-Raf behandelt.

Abbildung 3.15 zeigt, dass sich bei den A549 Zellen sowohl für die Level des TNF-Rezeptors als auch für die Level an survivin (Abb. 3.15 A und B) eine Reduktion nach der Behandlung mit der siRNA einstellt. Für die restlichen Zelllinien zeigte sich bei den CaCo2 Zellen nur eine sehr leichte Reduktion durch die Behandlung mit der siRNA und bei den SW620 keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Untersuchung über die survivin Level in den verschiedenen Tumorzelllinien zeigte sich wieder bei den A549 Zellen eine Reduktion (siehe Spur 1 und 2 in Abb. 3.15 B.). Für die CaCo2 Zellen ergab sich allenfalls eine geringe Änderung und bei den SW620 Zellen konnte keine Änderung in der Expression nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Änderungen in der Genexpression durch die Behandlung mit AS-ODN, siRNA bzw. Inhibitor BAY 43-9006 untersucht. Es zeigte sich bei allen Zelllinien eine

Beeinflussung der EGF-Rezeptorliganden Amphiregulin und TGF alpha, die Rolle dieser Liganden konnte durch die Versuche zur Blockade des EGF-Rezeptors vertieft werden.

Der Versuch, weitere Gene zu finden, die von c-Raf kontrolliert werden und in die Regulation der Apoptose eingreifen, erbrachte den TNF-Rezeptor 1 und survivin als ein Mitglied der IAP-Familie. Beide Gene konnten nur bei der A549 Zelllinie als reguliert nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einführung

Maligne Tumore gehören in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. Durch intensive Forschung wurden inzwischen deutliche Fortschritte in der Aufklärung der molekularen Pathomechanismen gemacht. Dies hat auch zu offensichtlichen Fortschritten in der Therapie von Tumorerkrankungen geführt. Stellte eine Leukämieerkrankung für ein Kind vor 25 Jahren ein sicheres Todesurteil dar, liegt heute die Heilungschance in diesem Fall bei über 75%.

Dennoch stellen Krebserkrankungen ein großes Problem in der Therapie dar. Gründe für die Schwierigkeiten in der Behandlung sind die vielen Besonderheiten einer Tumorerkrankung. Durch eine konventionelle Chemotherapie lassen sich meist anfängliche Erfolge erzielen, allerdings stellen sich im Laufe der Behandlung leider häufig auch Resistenzen gegen das Medikament bzw. die Medikamente ein. Der Mechanismus hierfür liegt in der unspezifischen Wirkungsweise der Chemotherapeutika. Bei ihrem Einsatz erhalten resistente Zellen einen Überlebensvorteil, der dann an die Tochterzellen weitergegeben wird. Das Resultat ist ein Tumor, der nur noch aus resistenten Zellen besteht.

Dies macht deutlich, wie wichtig eine spezifische Therapie bei diesen Erkrankungen ist. Allerdings können neuere und spezifischere Therapieansätze nur dann entwickelt werden, wenn die Ursachen und die Mechanismen, die zur Tumorentstehung führen, vollständig aufgeklärt sind.

Tumorzellen zeichnen sich durch verschiedene genetische Veränderungen aus, durch die sie ungehemmt proliferieren können. Gleichzeitig werden die Mechanismen, die für die Apoptose zuständig sind, stark gehemmt oder ausgeschaltet (Cotran RS, 1999b).

C-Raf stellt ein Proto-Onkogen dar, welches an beiden Phänomenen der Tumorenstehung beteiligt ist. Es reguliert zum einen über den Einfluss der Raf-Mek-Erk-Kaskade die Proliferation (Kolch W, 2002), zum Anderen konnten viele Arbeiten den Einfluss von c-Raf auf die Apoptose belegen (Schulze et al., 2001; Holmstrom et al., 2000; Cleveland et al., 1994; Lau et al., 1998). Dies macht die bedeutende Rolle von c-Raf für die maligne Transformation deutlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle, von c-Raf bei der Kontrolle der Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht. Dazu wurde c-Raf mittels RNAi-Technologie und mittels AS-ODN herunterreguliert. Zum Vergleich und zur Validierung der Ergebnisse, wurde der c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 eingesetzt.

## 4.2 Reduktion von c-Raf durch AS-ODN und siRNA

In der Literatur werden Antisense Nukleotide (AS-ODN) und „small interfering RNA“ (siRNA) als spezifische Werkzeuge zur Genregulation beschrieben (Elbashir et al., 2001a; Wagner, 1994; Hartmann G, 1998).

Um diese Methoden für die nachfolgende Fragestellung nutzen zu können, wurden verschiedene Zelllinien mit AS-ODN bzw. mit siRNA gegen c-Raf transfiziert. Anschließend wurden die mRNA Expressionsstärken von c-Raf mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt.

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen eine deutliche Reduktion von c-Raf bei der Behandlung mit AS-ODN. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt spezifisch für die verwendete Sequenz ist, wurden parallel nicht bindende Oligodesoxynukleotide (MM-ODN) transfiziert. Wie in Abbildung 3.1 und 3.2 zu sehen ist, ergeben sich bei der Transfektion mit den MM-ODN kaum Effekte. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Lau, der dies für die verwendete AS-ODN Sequenz schon berichtete (Lau et al., 1998).

In den Abbildungen 3.3 bis 3.6 sind die Ergebnisse für die Behandlung mit der siRNA dargestellt. Diese zeigen bei allen getesteten Zelllinien, dass sich durch die Behandlung mit der siRNA die mRNA für c-Raf reduzieren lässt. Im Vergleich dazu zeigen sich bei der Verwendung der MM-siRNA keine Unterschiede zwischen der jeweiligen Kontrolle und den mit MM-siRNA behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen die Spezifität der verwendeten Methoden. Die im Weiteren gezeigten Effekte können so auf die Reduktion der c-Raf Spiegel zurückgeführt werden.

Dass bei der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien auch die Zeitpunkte der stärksten Reduktion unterschiedlich sind, ist bei dieser Methode bekannt (McManus and Sharp, 2002; Tuschl, 2002). Mit 48 Stunden wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem für die meisten Zelllinien die stärkste Reduktion erfolgte. Durch die Wahl dieses Zeitpunktes lassen sich auch die deutlichsten Effekte erwarten.

## 4.3 Apoptoseinduktion durch die Reduktion von c-Raf

Eine Vielzahl von Autoren schreiben c-Raf eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Apoptose zu (Schulze et al., 2001; Stadheim et al., 2001; Cleveland et al., 1994; Lau et al., 1998). Die Regulation der Apoptose durch c-Raf stellt den zentralen Untersuchungspunkt dieser Arbeit dar. Die erste Frage, die die Experimente beantworten sollten, war, ob es nach der Reduktion bzw. bei der Inhibition von c-Raf zu einer erhöhten Anzahl der apoptotischen Zellen kommt. Dazu wurden die verschiedenen Zellen mit AS-ODN, siRNA und dem c-Raf Inhibitor BAY 43-9006 behandelt.

Wie sich durch Abbildung 3.6 zeigen lässt, steigt der Anteil apoptotischer Zellen bei der Behandlung mit den AS-ODN sehr stark an. Auch bei der siRNA gegen c-Raf lässt sich eine deutliche Apoptoseinduktion um das Acht- bis Zehnfache durch die Behandlung erreichen (s. Abbildung 3.7).



Die durch die Reduktion von c-Raf erreichte Steigerung der apoptotischen Zellen lässt sich durch die Behandlung mit BAY 43-9006 reproduzieren (Abbildung 3.9 und 3.10).

Der Effekt ist demnach nicht von den Methoden abhängig, sondern ist durch den Ausfall von c-Raf erklärbar.

Die sich an diese Befunde anschließende Frage ist, über welche Mechanismen c-Raf Tumorzellen vor Apoptose schützt und wie diese auf die Reduktion von c-Raf reagieren.

#### **4.4 C-Raf Kontrolle eines autokrinen Wachstumsfaktoren Loop**

Die vom „epidermal growth factor (EGF)“-Rezeptor ausgehende Signaltransduktion ist in vielen malignen Tumoren verändert. Beim Mammakarzinom korreliert ein hoher EGF-Rezeptorstatus mit einem aggressiven klinischen Verlauf (Mendelsohn and Baselga, 2000). Für das Kolorektalekarzinom ist schon länger bekannt, dass sich der Tumor durch Amplifikation des EGF-Rezeptors oder der EGF-Rezeptor-Liganden einen Wachstumsvorteil verschaffen (Normanno et al., 1998).

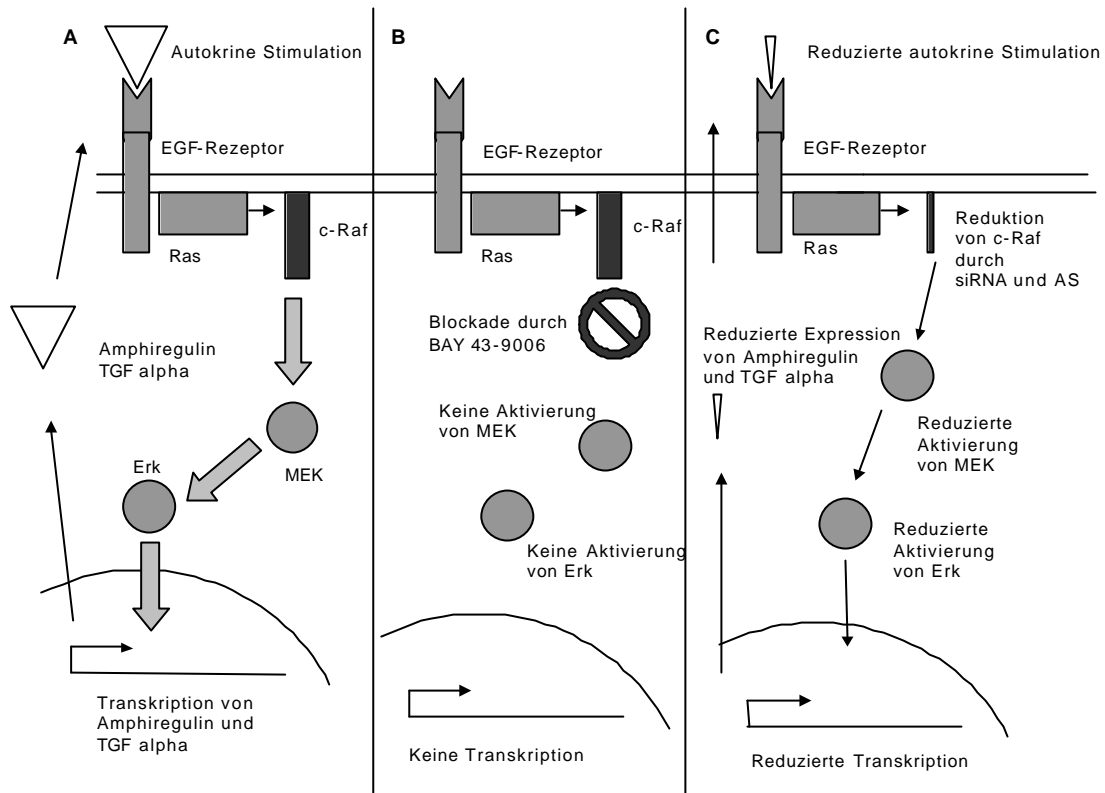
Dass EGF-Rezeptor-Liganden Epithelzellen vor der Apoptose schützen, wurde von Schulze et al. gezeigt. Dies zeigte sich vor allem bei den Liganden Amphiregulin, TGF alpha und HB-EGF (Schulze et al., 2001).

Eine Überlegung, die aus diesen Beobachtungen folgt, ist, dass c-Raf in einen autokrinen Regelkreis dieser EGF-Rezeptor-Liganden involviert ist und ihn kontrolliert.

Um diese These zu überprüfen, wurden die verschiedenen Zelllinien mit AS-ODN, siRNA und BAY 43-9006 behandelt. Durch RT-PCR wurden die mRNA-Spiegel der Wachstumsfaktoren Amphiregulin und TGF alpha ermittelt. Für Amphiregulin und TGF alpha zeigen die Abbildungen 3.11 bis 3.12 sowohl bei der Verwendung von AS-ODN als auch bei der Verwendung der siRNA eine deutliche Reduktion.

Diese Reduktion und damit die Regulation der beiden Wachstumsfaktoren ließ sich zumindest für zwei der Zelllinien auch durch den c-RAF Inhibitor BAY 43-9006 bestätigen (s. Abbildung 3.13 und Tab. 3.1).

Diese Ergebnisse lassen sich durch folgendes Modell zusammenfassen:



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung des c-Raf kontrollierten autokrinen Regelkreises**

Abb. 4.1 A zeigt den Regelkreis bei den Kontrollzellen, c-Raf wird über den EGF-Rezeptor stimuliert und aktiviert dann über den MEK/Erk-Signalweg die Transkription von Amphiregulin und TGF alpha.

Abb. 4.1 B demonstriert die Auswirkung bei Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor BAY 43-9006, MEK und Erk werden nicht bzw. kaum aktiviert, was die Transkription von Amphiregulin und TGF alpha verhindert.

Abb. 4.1 C verdeutlicht den Einfluss von siRNA und AS-ODN auf c-Raf. Durch die reduzierte Expression von c-Raf werden MEK und Erk schwächer aktiviert, was zu einer starken Reduktion der mRNA Level von Amphiregulin und TGF alpha führt.

Dass die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors über die klassische Ras-Raf-MEK-Erk-Kaskade eine besondere Bedeutung beim Schutz vor Apoptose hat, legen nicht nur die Daten von Schulze et al. (Schulze et al., 2001) nahe. Der Anstieg apoptotischer Zellen nach der Behandlung mit der siRNA bzw. den AS-ODN gegen c-Raf, lässt sich auch durch den EGF-Rezeptor-Blocker AG 1478 reproduzieren. Wie in Abbildung 3.14 und 3.15 zu sehen ist, steigt der Anteil apoptotischer Zellen um das Zwanzig- bzw. Sechsfache.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Signale, die vom EGF-Rezeptor ausgehen, einen effektiven Schutz vor Apoptose darstellen. Weiter zeigen sie, dass c-Raf durch die Kontrolle der EGF-Rezeptor-Liganden TGF alpha und Amphiregulin genau diesen Schutz mit initialisieren.

Im Gegensatz dazu fand Zuber et al. keine EGF-Liganden, die durch den Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg reguliert werden (Zuber et al., 2000). Jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden

Arbeit, dass die mRNA Expressionsstärke der EGF-Liganden Amphiregulin und TGF alpha unter der Kontrolle dieses Signalweges stehen. Auch die Beobachtung, dass eine Blockade von MEK zu einer starken Zunahme der apoptotischen Zellen führt (Slater et al., 2003), verdeutlicht die Rolle dieses Signalweges bei dem Schutz vor Apoptose.

Durch Beobachtungen, die von c-Raf defizienten Mäusen stammen, gibt es auch Hinweise auf MEK-unabhängige Mechanismen (Huser et al., 2001). In den letzten Jahren wurden besonders diese Kinase-unabhängigen Eigenschaften von c-Raf näher beleuchtet. Dabei wurden mit ASK-1 und MST2 zwei Proteine identifiziert, die beide proapoptotische Funktion besitzen und beide durch c-Raf reguliert werden. Vor allem die Regulation von MST2 die Kinase-unabhängig verläuft, stellt einen interessanten neuen Aspekt von c-Raf dar (Baccarini, 2005). Die Relevanz dieser Beobachtungen müsste, in Bezug auf die autokrine Wachstumsstimulation, in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

#### **4.5 Vergleich der siRNA, AS-ODS und Inhibitor-Daten mit dem EGF-Rezeptor-Blocker AG1478**

Alle drei benutzten Methoden waren in der Lage, entweder durch die Inhibierung von c-Raf bzw. durch die Hemmung der Transkription von c-Raf, die mRNA Spiegel für die EGF-Rezeptor-Liganden zu reduzieren. Im Vergleich zu den durch die Blockade des EGF-Rezeptors gewonnenen Daten bestätigt sich die Bedeutung dieser Liganden als „Überlebens-Stimuli“, da die Rate an apoptotischen Zellen sich gleicht (Vergl. Abb. 3.6, 3.7 und 3.9 mit 3.15). Auffällig ist, dass die SW620 Zellen besonders stark auf die Blockade mit dem EGF-Rezeptor-Blocker ansprechen. Eine mögliche Erklärung ist, dass in den Tumorzellen eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert sind, die das Genexpressionsmuster beeinflussen. Die Regulation einzelner Gene ist sicher nicht alleine einem Signalweg zuzuschreiben und kann durch Alternative ersetzt werden. Dennoch ist der EGF-Rezeptor-Signalweg sicher der Bedeutendste für die gezeigten Gene.

Eine andere Erklärung könnten die oben beschriebenen Kinase-unabhängigen Funktionen von c-Raf bieten. Um den Einfluss dieser verschiedenen Möglichkeiten besser bewerten zu können, wären Folgeexperimente notwendig, z.B. könnte mit einer Kinase-defizienten c-Raf Mutante die Kinase-unabhängigen Funktionen untersucht werden. Sollten die Kinasefunktionen hier nicht essentiell sein, müsste die Kinase-defiziente c-Raf Mutante den oben gezeigten Signalweg auch unterhalten können.

Ob eine seltene EGF-Rezeptor-Mutation, die zu einer Daueraktivierung führt, eine Rolle in dem Verhalten spielt, ließe sich über eine Sequenzierung des EGF-Rezeptors bei den verwendeten Zellen klären.

#### 4.6 cDNA Array Suche nach weiteren c-Raf regulierten Genen

Die Regulation der Wachstumsfaktoren stellt nur einen Teil der c-Raf Kontrolle der Apoptose dar. Um weitere Einblicke in die Genregulation von c-Raf zu erhalten, wurden die verschiedenen Zelllinien mit siRNA gegen c-Raf behandelt, nach der RNA-Präparation wurde diese beim Umschreiben in cDNA radioaktiv markiert und anschließend mit einer „Gen-Membran“ inkubiert. Die durch die Bindung entstandenen radioaktiven Signale wurden dann detektiert.

Wie in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.15 dargestellt, fällt vor allem bei den A549 Zellen auf, dass durch die Reduktion von c-Raf gleichzeitig der „Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1 (TNF-Rezeptor 1; CD 120a)“ herunterreguliert wird. Bei den beiden anderen Zelllinien erschien dies in dem Array erst nicht so deutlich nachweisbar, bei der Ermittlung der mRNA-Spiegel nach siRNA-Behandlung mittels RT-PCR ließ sich auch bei den CaCo2 Zellen eine Reduktion für survivin zeigen (s. Tabelle 3.1 und 3.15).

Der TNF-Rezeptor 1 ist ein 55 kDa großes Protein, welches für seine Rezeptorfunktion homotrimerisieren muss. Wenn der Rezeptor aktiviert wird, gehen von ihm verschiedene Signale aus. Zum einen über TRADD und FADD die Aktivierung der Caspase 8, über TRADD und TRAF2 die Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren wie cIAP-1. Der bekannteste Weg führt aber zur Freisetzung von NF $\kappa$ B durch Phosphorylierung des „inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)“ (Chen and Goeddel, 2002).

Die durch den Array aufgeworfene Möglichkeit der Regulation des TNF-Rezeptors 1 durch c-Raf ließ sich in der RT-PCR bestätigen. Damit kann man die Regulation des Rezeptors neben der von NF $\kappa$ B (Baldwin, Jr., 1996) auch c-Raf zuschreiben.

Ein denkbare Modell für eine Erklärung dieser Ergebnisse wäre ein „Cross-talk“ zwischen den beiden Signalwegen, die in der transkriptionellen Kontrolle des TNF-Rezeptors mündet. Dass die Raf-MEK-Erk-Kaskade und der NF $\kappa$ B Signalweg miteinander verwoben sind, konnten mehrere Arbeiten zeigen (Hildt and Oess, 1999; Navas et al., 1999) (Ivanov et al., 2003) besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Berichte, die zeigen, dass durch das Binden des Adapterproteins c-Flip, eine Rekrutierung und Aktivierung von c-Raf stattfindet mit nachfolgender Aktivierung von Erk (Kataoka T, 2000; Gilbert S, 2004) .

Um diese Überlegung zu untermauern, wären weitere Experimente nötig, wie z.B. der Nachweis einer NF $\kappa$ B-Aktivierung nach c-Raf Stimulation und umgekehrt das durch einen „knock down“ von c-Flip die Aktivierung und Rekrutierung von c-Raf verhindert wird.

#### 4.7 Zielgerichtete Therapie gegen c-Raf in der klinischen Anwendung

Eine zielgerichtete Therapie hat bei verschiedenen Tumoren längst den Schritt in verschiedene klinische Studien bzw. in die etablierte Therapie geschafft. Die Liste der modernen Therapeutika ist lang und reicht von Antikörpern über Proteasominhibitoren bis hin zu den

Thyrosinkinaseinhibitoren. Hier sollen vor allem die vorliegenden Ergebnisse des c-Raf Inhibitors Bay 43-9006 mit den Namen Sorafenib vorgestellt werden.

Die ersten Daten des oralen Inhibitors, der von Onyx und Bayer zusammen entwickelt wurde, wurden auf dem Jahrestreffen der „American Association for Cancer Research“ (AACR) gezeigt. Dabei handelte es sich um die Ergebnisse einer Phase I Studie. Dort wurde gezeigt, dass es bei Dosen von 50-400mg/d zu keiner gravierenden Nebenwirkung oder Toxizität kam (Strumberg D., 2002). Gleichzeitig lagen schon damals frühe Daten vor, die darauf hindeuteten dass es unter dieser Therapie, zumindest zeitweise, nicht zur weiteren Progression kommt ([www.onyx-pharm.com/wt; 11.05](http://www.onyx-pharm.com/wt;11.05)).

Auf dem Jahrestreffen der „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO) 2005 wurden die Daten einer Phase III Studie von Sorafenib beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom vorgestellt. Bei 88% der Patienten konnte eine Symptomkontrolle erreicht werden und bei 79% der Patienten wurde sogar eine dreimonatige progressfreie Zeit erreicht (Escudier B, 2005; Strumberg, 2005). Somit konnten die frühen Daten, die auf eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens hindeuteten, bestätigt werden. Besonders bemerkenswert ist, dass das Nierenzellkarzinom nicht auf Radio- oder Chemotherapie anspricht und daher therapeutisch extrem schwierig ist.

Schon 2002 wurden, ebenfalls auf dem ASCO-Meeting, frühe Daten für Sorafenib in Kombination mit anderen Therapeutika bei verschiedenen soliden Tumoren gezeigt. Einige dieser Phase I Studien sind nun ausgewertet. Hauptziel war die Frage, ob Sorafenib auch in der Kombination mit z.B. Gemcitabine oder Platinderivaten verträglich ist. Für die 400mg/d Dosis kam es zu keiner Zunahme der Nebenwirkungen (Richly H, 2003; Heim M, 2003; Siu LL, 2006).

Kritisch anzumerken ist, dass der Inhibitor allerdings nicht spezifisch für c-Raf ist. So werden auch der „platelet derived growth factor receptor (PDGF-Receptor)“ und der „vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-Receptor)“ durch BAY 43-9006 inhibiert (R. Müller persönliche Kommunikation). Die gesehenen Effekte beruhen daher nicht alleine auf der Inhibition von c-Raf sondern sind das Ergebnis der Inhibition einer Reihe von Signalwegen.

Die Folgestudien, die zur Wirksamkeit von Sorafenib angelaufen bzw. geplant sind, sollen nun vor allem zwei Fragen klären:

1. Inwieweit ist eine Monotherapie wirksam?
2. Kann durch die Kombination aus klassischer Chemotherapie und Sorafenib ein Vorteil im Gesamtüberleben erreicht werden?

## 4.8 Ausblick

Die gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Rolle von c-Raf, sowohl für die Proliferation als auch als Apoptoseinhibitor. Um die von c-Raf kontrollierten Mechanismen, die für diese Prozesse verantwortlich sind, noch besser verstehen zu können, wären folgende Fragen zu stellen:

1. Ist der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Signalweg EGF-Rezeptor-Raf-Erk-EGF-Rezeptor-Ligand auch für die anderen Raf Isoformen nachweisbar?

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von b-Raf beim malignen Melanom und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom intensiv untersucht (Brose et al., 2002; Davies et al., 2002; Pollock et al., 2003). Die Beantwortung der Frage, inwieweit die Verwendung einer b-Raf spezifischen siRNA die EGF- Wachstumsfaktoren in diesen beiden Tumoren beeinflusst wäre, interessant.

2. Für zwei EGF-Rezeptor-Liganden wurde die Regulation durch c-Raf gezeigt. Nicht geklärt ist, inwieweit andere Liganden durch c-Raf reguliert werden. Ein denkbare Folgeexperiment wäre, das Genexpressionsprofil von siRNA behandelten Zellen mit dem von unbehandelten zu vergleichen. Die Möglichkeiten, die mit den cDNA Micro-Arrays gegeben sind, bieten hier ein hilfreiches Werkzeug, um genau diesen Ansatz zu studieren.

3. Die Regulation des TNF-Rezeptors 1 durch c-Raf stellt einen interessanten Befund dieser Arbeit dar. Um diese Regulation und die Bedeutung dieser Interaktion besser verstehen zu können, wäre es hilfreich, mehr über die vom TNF-Rezeptor ausgehenden Signale zu c-Raf zu wissen. Lässt sich hier eine weitere autokrine Schleife beschreiben? G-Flip wäre ein gutes Bindeglied der beiden Signalwege. Allerdings müsste dazu der Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion erbracht werden. Weiter müsste ein Signal des TNF-Rezeptor bei Einsatz einer siRNA gegen c-Flip dann nicht zur Aktivierung von c-Raf führen und auch zu einer Verminderung des Rezeptors.

## 5 Literaturverzeichnis

- Baccarini, M. (2005). Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett.* *579*, 3271-3277.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 649-683.
- Baumann, B., Weber, C.K., Troppmair, J., Whiteside, S., Israel, A., Rapp, U.R., and Wirth, T. (2000). Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4615-20.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-6.
- Bitko, V. and Barik, S. (2001). Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* *1*, 34.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* *286*, 1358-62.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* *18*, 5321-33.
- Bours, V., Bentires-Alj, M., Hellin, A.C., Viatour, P., Robe, P., Delhalle, S., Benoit, V., and Merville, M.P. (2000). Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* *60*, 1085-9.
- Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J.A., Albelda, S.M., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P.A., Wooster, R., Stratton, M.R., and Weber, B.L. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* *62*, 6997-7000.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 269-90.
- Calogero, A., Hospers, G.A., and Mulder, N.H. (1997). Synthetic oligonucleotides: useful molecules? A review. *Pharm World Sci* *19*, 264-8.

- Cancer,U.I.U.A. (1997). TNM-Klassifikation maligner Tumoren. (Berlin, Heidelberg: Springer).
- Chang,H.Y., Nishitoh,H., Yang,X., Ichijo,H., and Baltimore,D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-3.
- Chen,G. and Goeddel,D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-5.
- Chen,J., Fujii,K., Zhang,L., Roberts,T., and Fu,H. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal- regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7783-8.
- Chen,Z., Seimiya,H., Naito,M., Mashima,T., Kizaki,A., Dan,S., Imaizumi,M., Ichijo,H., Miyazono,K., and Tsuruo,T. (1999). ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18, 173-80.
- Cleveland,J.L., Troppmair,J., Packham,G., Askew,D.S., Lloyd,P., Gonzalez-Garcia,M., Nunez,G., Ihle,J.N., and Rapp,U.R. (1994). v-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3- dependent myeloid cells. *Oncogene* 9, 2217-26.
- Cotran RS,K.V.C.T. (1999a). Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death. In Robbins Pathologic Basis of Disease, K.V.C.T.Cotran RS, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 1-32.
- Cotran RS,K.V.C.T. (1999b). Neoplasia. In Robbins Pathologic Basis of Disease, K.V.C.T.Cotran RS, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Company), pp. 260-327.
- Davies,H., Bignell,G.R., Cox,C., Stephens,P., Edkins,S., Clegg,S., Teague,J., Woffendin,H., Garnett,M.J., Bottomley,W., Davis,N., Dicks,E., Ewing,R., Floyd,Y., Gray,K., Hall,S., Hawes,R., Hughes,J., Kosmidou,V., Menzies,A., Mould,C., Parker,A., Stevens,C., Watt,S., Hooper,S., Wilson,R., Jayatilake,H., Gusterson,B.A., Cooper,C., Shipley,J., Hargrave,D., Pritchard-Jones,K., Maitland,N., Chenevix-Trench,G., Riggins,G.J., Bigner,D.D., Palmieri,G., Cossu,A., Flanagan,A., Nicholson,A., Ho,J.W., Leung,S.Y., Yuen,S.T., Weber,B.L., Seigler,H.F., Darrow,T.L., Paterson,H., Marais,R., Marshall,C.J., Wooster,R., Stratton,M.R., and Futreal,P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- Derynck,R. (1994). TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 19, 548-53.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.



Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-88.

Escudier B, Szcylitrampelchen C. Randomized phase II trial of the Raf kinase and VEGF inhibitor sorafenib (BAY43-9006) in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). 2005.  
Ref Type: Conference Proceeding

Evan,G.I. and Vousden,K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-8.

Fearon,E.R. and Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67.

Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.

Flaherty,K.T., Stevenson,J.P., and O'Dwyer,P.J. (2001). Antisense therapeutics: lessons from early clinical trials. *Curr Opin Oncol* 13, 499-505.

Gilbert S,L.A.M.N. (2004). Keratins modulate c-Flip/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 antiapoptotic signaling in simple epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 16, 7072-81.

Golstein,P. (1997). Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 7, 750-3.

Gotoh,Y. and Cooper,J.A. (1998). Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor- $\alpha$  signal transduction. *J Biol Chem* 273, 17477-82.

Gumbiner,B.M. (1997). Carcinogenesis: a balance between beta-catenin and APC. *Curr Biol* 7, 443-6.

Hamilton,A.J. and Baulcombe,D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-2.

Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-6.

Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 65-7.

Hartmann G,B.M.T.K.E.A.H.U.a.E.S. (1998). Antisense-Oligonukleotide: Nukleinsäuren zur gezielten Synthesehemmung krankheitsfördernder Proteine. *Deutsches Ärzteblatt* 95, 1524-1530.

Heim M,S.M.H.R.S.M.S.S.S.D. (2003). Antitumor effect and potentiation or reduction in cytotoxic drug activity in human colon carcinoma cells by the Raf kinase inhibitor (RKI) BAY 43-9006. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41, 616-7.

Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.

Herrera,R. and Sebolt-Leopold,J.S. (2002). Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med* 8, 27-31.

Hildt,E. and Oess,S. (1999). Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *J Exp Med* 189, 1707-14.

Hindley,A. and Kolch,W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115, 1575-81.

Holmstrom,T.H., Schmitz,I., Soderstrom,T.S., Poukkula,M., Johnson,V.L., Chow,S.C., Krammer,P.H., and Eriksson,J.E. (2000). MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *Embo J* 19, 5418-28.

Hoshino,R., Chatani,Y., Yamori,T., Tsuruo,T., Oka,H., Yoshida,O., Shimada,Y., Ari-i,S., Wada,H., Fujimoto,J., and Kohno,M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-22.

Huser,M., Lockett,J., Chiloehes,A., Mercer,K., Iwobi,M., Giblett,S., Sun,X.M., Brown,J., Marais,R., and Pritchard,C. (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 20, 1940-51.

Ichijo,H., Nishida,E., Irie,K., ten Dijke,P., Saitoh,M., Moriguchi,T., Takagi,M., Matsumoto,K., Miyazono,K., and Gotoh,Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-4.

Irmler,M., Thome,M., Hahne,M., Schneider,P., Hofmann,K., Steiner,V., Bodmer,J.L., Schroter,M., Burns,K., Mattmann,C., Rimoldi,D., French,L.E., and Tschopp,J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-5.

Ivanov,V.N., Bhoumik,A., and Ronai,Z. (2003). Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22, 3152-3161.

Kataoka T,B.R.H.N.T.M.M.F.I.M.B.K.H.M.K.N.K.M.T.J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol.* 11, 640-8.

Kelekar,A., Chang,B.S., Harlan,J.E., Fesik,S.W., and Thompson,C.B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 17, 7040-6.

Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.

Kolch W,K.A.V.K.a.J.P. (2002). The role of Raf kinases in malignant transformation. *Exp. Rev. Mol. Med.* 1-18.

Komiyama,T., Ray,C.A., Pickup,D.J., Howard,A.D., Thornberry,N.A., Peterson,E.P., and Salvesen,G. (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem* 269, 19331-7.

Korsmeyer,S.J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59, 1693s-1700s.

Krammer,P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.

Kulozik AE,H.M.H.C.B.C. (2000). *Molekulare Medizin.* (Berlin, New York: Walter de Gruyter).

Lassus,P., Opitz-Araya,X., and Lazebnik,Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-4.

Lau,Q.C., Achenbach,T.V., Borchers,O., Muller,R., and Slater,E.P. (2002). In vivo pro-apoptotic and antitumor efficacy of a c-Raf antisense phosphorothioate oligonucleotide: relationship to tumor size. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 11-20.

Lau,Q.C., Brusselbach,S., and Muller,R. (1998). Abrogation of c-Raf expression induces apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 16, 1899-902.

Lavoie,J.N., L'Allemain,G., Brunet,A., Muller,R., and Pouyssegur,J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-16.

Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.

Lowinger,T.B., Riedl,B., Dumas,J., and Smith,R.A. (2002). Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Curr Pharm Des* 8, 2269-78.

Lui,V.W. and Grandis,J.R. (2002). EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 22, 1-11.

- Lyons, J.F., Wilhelm, S., Hibner, B., and Bollag, G. (2001). Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 8, 219-25.
- Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275, 16202-12.
- Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11, 732-6.
- Martinez, M.A., Clotet, B., and Este, J.A. (2002). RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol* 23, 559-61.
- McManus, M.T. and Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-47.
- Mendelsohn, J. and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-65.
- Merino, E., Balbas, P., Puente, J.L., and Bolivar, F. (1994). Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans. *Nucleic Acids Res* 22, 1903-8.
- Murakami, M.S. and Morrison, D.K. (2001). Raf-1 without MEK? *Sci STKE* 2001, E30.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
- Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J., and Soucek, L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Lett* 490, 153-62.
- Navas, T.A., Baldwin, D.T., and Stewart, T.A. (1999). RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 274, 33684-90.
- Normanno, N., De Luca, A., Salomon, D.S., and Ciardiello, F. (1998). Epidermal growth factor-related peptides as targets for experimental therapy of human colon carcinoma. *Cancer Detect Prev* 22, 62-7.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-8.
- Oberholzer, M. (2001). Tumoren. In *Pathologie verstehen*, O.M.J, ed. (Stuttgart, New York: Thieme), pp. 245-273.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D., and Ashkenazi, A.

(1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.

Pollock,P.M., Harper,U.L., Hansen,K.S., Yudt,L.M., Stark,M., Robbins,C.M., Moses,T.Y., Hostetter,G., Wagner,U., Kakareka,J., Salem,G., Pohida,T., Heenan,P., Duray,P., Kallioniemi,O., Hayward,N.K., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19-20.

Pschyrembel (1998). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* (Berlin: de Gruyter).

Reed,J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-6.

Rich,T., Allen,R.L., and Wyllie,A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-83.

Richly H,K.P.P.K.G.M.H.R.K.S.V.D.S.M.S.S.S.D. (2003). A phase I clinical and pharmacokinetic study of the Raf kinase inhibitor (RKI) BAY 43-9006 administered in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41, 620-1.

Robles,A.I., Linke,S.P., and Harris,C.C. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 21, 6898-907.

Savill,J. and Fadok,V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-8.

Schlingensiepen R,B.W. (1997). *Antisense from technologie to therapy.* Blackwell science).

Schulze,A., Lehmann,K., Jefferies,H.B., McMahon,M., and Downward,J. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15, 981-94.

Sears,R., Nuckolls,F., Haura,E., Taya,Y., Tamai,K., and Nevins,J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-14.

Sherr,C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-95.

Shimamura,A., Ballif,B.A., Richards,S.A., and Blenis,J. (2000). Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 10, 127-35.

Siu LL,A.A.T.C.P.M.S.B.G.T.L.C.P.O.M.M. (2006). Phase I trial of sorafenib and gemcitabine in advanced solid tumors with an expanded cohort in advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 12, 144-51.

Slater,E.P., Stubig,T., Lau,Q.C., Achenbach,T.V., Rapp,U.R., and Muller,R. (2003). C-Raf controlled pathways in the protection of tumor cells from apoptosis. *Int J Cancer* 104, 425-32.

Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Otilie,S., Bullrich,F., Banks,S., Wang,Y., Fernandes-Alnemri,T., Croce,C.M., Litwack,G., Tomaselli,K.J., Armstrong,R.C., and Alnemri,E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18542-5.

Stadheim,T.A., Xiao,H., and Eastman,A. (2001). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK) mediates cell cycle phase independent apoptosis in vinblastine-treated ML-1 cells. *Cancer Res* 61, 1533-40.

Strumberg D. (2002). Results of phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in patients with solid tumors. *Int. Journal of Clinical Pharmacol. Therapy* 580-581.

Strumberg,D. (2005). Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)*. 41, 773-84.

Thornberry,N.A. and Lazebnik,Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Trump,B.F., Berezesky,I.K., Chang,S.H., and Phelps,P.C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 25, 82-8.

Tuschl, T. Elbashir S. M. Harborth J. Weber C. K. siRNA user guide. 2002.  
Ref Type: Electronic Citation

Wagener,C. (1999). *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Wagner,R.W. (1994). Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372, 333-5.

Wang,H., Prasad,G., Buolamwini,J.K., and Zhang,R. (2001). Antisense anticancer oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 1, 177-96.

Wang,H.G., Miyashita,T., Takayama,S., Sato,T., Torigoe,T., Krajewski,S., Tanaka,S., Hovey,L.3., Troppmair,J., Rapp,U.R., and et al. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9, 2751-6.

Wang,H.G., Rapp,U.R., and Reed,J.C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87, 629-38.

Wang,S., Ghosh,R.N., and Chellappan,S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18, 7487-98.

Wojnowski,L., Zimmer,A.M., Beck,T.W., Hahn,H., Bernal,R., Rapp,U.R., and Zimmer,A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 16, 293-7.

Zha,J., Harada,H., Yang,E., Jockel,J., and Korsmeyer,S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-28.

Zuber,J., Tchernitsa,O.I., Hinzmann,B., Schmitz,A.C., Grips,M., Hellriegel,M., Sers,C., Rosenthal,A., and Schafer,R. (2000). A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24, 144-52.

## **6 Anhang**

### **6.1 Stichwörter**

c-Raf  
Apoptose  
Signaltransduktion  
EGF-Rezeptor  
TNF-Rezeptor  
Antisense  
siRNA  
BAY 43-9006  
Caspasen

### **6.2 Keywords**

c-raf  
apoptosis  
signaltransduction  
EGF-Receptor  
TNF-Receptor  
antisense  
siRNA  
BAY 43-9006  
caspases



### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Englische Bezeichnung: " „

|              |  |
|--------------|--|
| Abb.         | Abbildung  |
| AK           | Antikörper   |
| APS          | Ammoniumpersulfat  |
| AS           | Antisense  |
| bp           | Basenpaare   |
| BSA          | bovines Serumalbumin   |
| bzw.         | beziehungsweise  |
| CD           | „cluster of differenciation“   |
| cdk          | „cyclin dependent kinase“, cyclin abhängige Kinase   |
| cDNA         | „complementary DNA“, komplementäre DNA   |
| C. elegans   | Caenorhaditis elegans  |
| CHX          | Cyclohexamid   |
| cpm          | „counts per minute“ ( <i>Anzahl pro Minute</i> )   |
| Cy3          | Cyanine fluorochrom 3  |
| Cy5          | Cyanine fluorochrom 5  |
| d.h.         | das heißt  |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid   |
| DNA/DNS      | „desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP         | „desoxyribonucleotid triphosphat“  |
| DTT          | Dithiothreitol   |
| E.coli       | Escherichia coli   |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat   |
| EGF          | „epidermal growth factor“, Epidermaler Wachstumsfaktor   |
| FCS          | „fetal calf serum“, Fötales Kälberserum  |
| h            | Stunde   |
| h            | Human  |
| HB-EGF       | „heparin-binding-epidermal growth factor“, ( <i>Heperin bindeder epidermaler Wachstumsfaktor</i> ) |
| I $\kappa$ B | „Inhibitor of kappa B“   |
| IL           | Interleukin  |
| kg           | Kilogramm  |
| kb           | Kilo Basen (1000 bp)   |
| L            | Liter  |
| M            | Mol  |

---

|                |  |
|----------------|--|
| m              | milli ( $10^{-3}$ )  |
| $\mu$          | mikro ( $10^{-6}$ )  |
| min            | Minute   |
| mRNA           | „messenger“RNA   |
| n              | nano ( $10^{-9}$ )   |
| NF $\kappa$ B  | „nuclear factor kappa B“   |
| NP-40          | Nonidet P 40%  |
| OD             | optische Dichte  |
| ODN            | Oligodesoxynukleotide  |
| PAA            | Polyacrylamid  |
| PBS            | „phosphate buffered saline“  |
| PCR            | „polymerase chain reaction“, Polymerase-Ketten-Reaktion                                |
| Pen/Strep      | Penicillin/Streptavidin  |
| PFA            | Paraformaldehyd  |
| PMA            | Phorbol-myristate-acetate  |
| PNA            | Peptidnukleinsäuren  |
| RNA/RNS        | „ribnucleic acid“, Ribonukleinsäure  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| RT             | Reverse Transkription  |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat   |
| sec            | Sekunde  |
| s.             | siehe  |
| TGF alpha      | „transforming growth factor alpha“, ( <i>transformierender Wachstumsfaktor alpha</i> ) |
| TNF            | „tumor necrosis factor“, ( <i>Tumornekrose Faktor</i> )                                |
| TNF-Rezeptor   | „tumor necrosis factor-receptor“   |
| TEMED          | Tetramethylethylendiamid   |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)aminomethan   |
| usw.           | und so weiter  |
| UV             | Ultraviolett   |
| v/v            | Volumen/Volumen  |
| w/v            | „weight per volume“/Masse pro Volumen  |
| z.B.           | zum Beispiel   |
| z.T.           | zum Teil   |
| Nukleinsäuren: | A: Adenin<br>G: Guanin<br>U: Uracil<br>C: Cytosin<br>T: Thymin                         |

## 6.4 Zusammenfassung

Die Serin-Threonin Kinase c-Raf spielt sowohl in der Kontrolle der Proliferation als auch in der Kontrolle der Apoptose in malignen Tumoren eine Schlüsselrolle.

Ziel dieser Arbeit war es, Signalwege zu identifizieren, die für den Schutz vor Apoptose verantwortlich sind. Dazu wurden verschiedene Tumorzelllinien mit spezifischen Antisense Nucleotiden (AS-ODN) und „small interfering RNA“ (siRNA) transfiziert, um c-Raf zu reduzieren.

Die erhobenen Daten wurden mittels c-Raf Inhibitor BAY43-9006 überprüft und ließen sich reproduzieren. Daher wird davon ausgegangen, dass die Effekte durch die Reduktion von c-Raf bedingt sind.

Neben dem zu erwartenden Anstieg apoptotischer Zellen kam es gleichzeitig zu einer Reduzierung der mRNA Level des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-Rezeptor) Liganden. Dass die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors bedeutend für den Schutz vor Apoptose ist, konnte durch die Blockade des Rezeptors mittels Inhibitor gezeigt werden. Diese Daten zeigen, dass c-Raf eine autokrine Wachstumsfaktorenschleife kontrolliert, die nicht nur zur positiven Auto-regulation von c-Raf führt, sondern auch vor Apoptose schützt.

Um weitere Mechanismen zu finden, die zu diesem Schutz beitragen, wurden von transfizierten Zelllinien cDNA Arrays durchgeführt und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor1 (TNF-R1, CD120a), als ein von c-Raf reguliertes Gen, gefunden. Dies ist ein Hinweis auf eine Querverbindung des klassischen Ras-Raf-MEK-Erk Signalweges mit dem TNF-R1 Signalweg, der für die Tumorzellen eine antiapoptotische Funktion hat.

Durch diese Arbeit kann die Rolle von c-Raf für die Apoptose bestätigt werden und es können mit der Kontrolle der autokrinen Stimulation und der Regulation des TNF-Rezeptor1 zwei wichtige Mechanismen aufgezeigt werden, die diese Rolle erklären.

## 6.5 Summary

The serine / threonine kinase, c-Raf, plays an essential role in the control of proliferation and survival in many human malignant tumors.

The aim of this work was to detect mechanisms by which c-Raf controls the apoptotic pathways. By using specific antisense oligo-nucleotides (AS-ODN) and "small interfering RNA" (siRNA) for gene knockdown experiments, the c-Raf mRNA levels were reduced. These effects were reproduced by using a c-Raf Inhibitor BAY 43-9006.

As suspected, the fraction of apoptotic cells increased and interestingly, simultaneously, the mRNA levels of different epidermal growth factor receptor (EGF-Receptor) ligands decreased. To confirm that stimulation of the EGF-receptor is critical for cell survival, the different cell lines were treated with an EGF-receptor blocker. As expected the fraction of apoptotic cells increased again. These data suggest an autocrine loop of the EGF-receptor ligand controlled by c-Raf.

To identify other signalling pathways which are involved in c-Raf mediated protection of apoptosis, cDNA array experiments were performed. Surprisingly, it could be shown that the tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) is also transcriptionally controlled by c-Raf, suggesting crosstalk between the classical Ras-Raf-MEK-Erk pathway and TNF-receptor signalling in tumour cells to escape apoptosis.

This work supports the significance of c-Raf in the control of apoptosis and suggests two mechanisms as an explanation: an autocrine EGF-receptor ligand loop and regulation of the TNF-receptor.

## 6.6 Aus der vorliegenden Arbeit entstandener Artikel

Emily P. Slater, **Thomas Stübiger**, Quek Choon Lau, Tatjana V. Achenbach, Ulf R. Rapp und Rolf Müller: „**C-Raf controlled pathways in the protection of tumor cells from apoptosis**“  
Int. J. Cancer: 104, 425-432 (2003)

## 7 Meine akademischen Lehrer

In Marburg:

Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Kern, Frau Dr. Feuser, Prof. Dr. Bach, Prof. Dr. Dr. Daut, Frau Prof. Dr. Baum, Prof. Dr. Geus, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Lennartz, HD Dr. Wetsermann, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Voigt, Prof. Dr. Koolmann, Prof. Dr. Eilers  
Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Lohoff, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Schäfer, PD Dr. Hesse, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. Syberth, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Wulf, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Rothmund, PD Dr. Hellinger, Prof. Dr. Hofmann, Prof. Dr. Happel, Prof. Dr. Barth, Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Kann, Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Müller, Prof. Dr. Mutters

In Würzburg:

Prof. Dr. Ertel, Prof. Dr. Scheppach, Prof. Dr. Einsele, Prof. Dr. Wilms, Frau PD. Dr. Kraemer, Prof. Dr. Müller-Hermelink, Prof. Dr. Marx, Prof. Dr. Thiede, PD Dr. Meyer

## 8 Lebenslauf

Thomas Stübig

Steubenstrasse 24  
65189 Wiesbaden

- **Persönliche Angaben**

|                     |                       |
|---------------------|-----------------------|
| geboren am          | 11.01.1977 in Marburg |
| Staatsangehörigkeit | deutsch               |
| Familienstand       | ledig                 |

- **Ausbildung**

|                     |  |
|---------------------|--|
| 1983 - 1996         | Schulbildung in Marburg  |
| Schulabschluss 1996 | Allgemeine Hochschulreife  |
| 1997 - 1999         | Ausbildung an der Krankenpflegeschule der DRK Schwesternschaft Marburg |
| 1999 - 2005         | Studium der Humanmedizin in Marburg und Würzburg                       |
| März 2001           | Ärztliche Vorprüfung   |
| August 2002         | Erstes Staatsexamen  |
| September 2004      | Zweites Staatsexamen   |
| Oktober 2005        | Drittes Staatsexamen   |
| Oktober 2005        | Approbation zum Arzt   |

- **Praktische Tätigkeiten**

|                     |  |
|---------------------|--|
| 09.1996 - 10.1997   | Zivildienst in der Neurologischen Klinik der Philipps-Universität Marburg                          |
| 30.07. - 31.08.2001 | Famulatur in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie<br>Philipps-Universität Marburg |
| 12.09. - 12.10.2001 | Famulatur am Pathologischen Institut Philipps-Universität Marburg                                  |
| 01.09. - 01.10.2003 | Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin Ott-Voigtländer Remscheid                             |
| 23.02. - 26.03.2004 | Famulatur in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie<br>Philipps-Universität Marburg |
| 18.10. - 06.02.2005 | Tertial Innere Medizin: Medizinische Klinik Julius-Maximilians-Universität Würzburg                |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| 07.02. – 29.05.2005       | Wahl-Tertial: Pathologisches Institut Julius-Maximilians- Universität Würzburg                                       |
| 30.05. – 19.09.2005       | Tertial Chirurgie: Chirurgische Klinik Julius-Maximilians-Universität Würzburg                                       |
| 11.2005 – 08.2006         | Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie Philipps Universität Marburg    |
| Seit 09.2006              | Assistenzarzt im Zentrum für Knochenmarks und Stammzelltransplantation der Deutschen Klinik für Diagnostik Wiesbaden |
| Wiesbaden, 12. April 2007 | Thomas Stübig  |

## 9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „C-Raf kontrollierte Signalwege zum Schutz der Tumorzelle vor Apoptose“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter Leitung von Prof. Dr. R. Müller mit Unterstützung durch Dr. E.P. Slater und PD Dr. S. Büsselbach-Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen: „International Journal of Cancer“ veröffentlicht.

Wiesbaden, 12.04.2007

Thomas Stübig

## 10 Danksagung

Ich möchte mich bei Herr Prof. Dr. Müller für das interessante Thema bedanken, sowie bei Emily P. Slater und Sabine Müller-Büsselbach für die wissenschaftliche Betreuung während meiner Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso der gesamten Arbeitsgruppe Müller für die Hilfen und Unterstützung bei der Arbeit.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter aus dem Labor 18 Mikaela Kreutzer, Magitta Alt, Yvonn Wirthken, Yvonn Maywald und Ulrich Wellner für viele hilfreiche Tipps und viele spaßige Unterhaltungen.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Ursula Eilers, Tina Korn und MaryLou Zuzarte bedanken die mir mit viel Hilfe zuseiten standen und von denen ich sehr viel gelernt habe.

Für das unermüdliche Korrekturlesen und viel hilfreiche Kritik und Diskussionen möchte ich mich bei Britta Müller und besonders bei Florian Bender bedanken.

Dr. Michael Krause und seinen Mitarbeitern danke ich für die Synthese der Antisense-Nukleotide, der siRNA sowie für viele Ratschläge bei der Array Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei denen bedanken die mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer wieder unter die Arme gegriffen haben - Meinen Eltern