Aus der Abteilung Pädiatrie I mit Schwerpunkt pädiatrische Hämatologie
und Onkologie (Komm. Leiter: Prof. Dr. med. M. Lakomek)
im Zentrum Kinderheilkunde- und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Göttingen

**Etablierung und Validierung der RNA-Interferenz-Methode am
Beispiel Apoptose-relevanter Gene**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Franziska Köhler

aus

Rodewisch

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Lakomek

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Ursachen von Hirntumoren bei Kindern und Jugendlichen.....	1
1.2 Konventionelle Therapie hochmaligner Hirntumoren.....	3
1.3 Alternative Therapieansätze zur Behandlung von Hirntumoren bei Kindern	4
1.3.1 Genterapie.....	5
1.3.2 Immuntherapie.....	6
1.3.3 Hemmung der Angiogenese	7
1.3.4 Hemmung der Signaltransduktion	8
1.3.5 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	10
1.3.6 Alkylphosphocholine (APC)	11
1.3.6.1 Erucylphosphocholin (ErPC), Prototyp einer neuen APC-Klasse	11
1.3.6.2 ErPC-induzierte Apoptose.....	12
1.3.7 Möglichkeiten zum spezifischen Ausschalten von Genen	14
1.3.7.1 Antisense-RNA und -DNA.....	14
1.3.7.2 „Knock out“ Mäuse	14
1.3.7.3 RNA-Interferenz.....	15
1.4 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Zelllinien.....	19
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.3 Weitere Materialien	20
2.1.4 Pufferlösungen.....	21
2.1.4.1 Präparation von Gesamtzellextrakten.....	21
2.1.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.1.4.3 Western-Blot-Analyse	23
2.1.5 Zellkulturmedien	24

2.1.6 Geräte	24
2.1.7 Antikörper.....	25
2.1.7.1 Primär-Antikörper	25
2.1.7.2 Sekundär-Antikörper	25
2.1.8 siRNAs	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Kultivierung von Zellen	27
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.3 WST-1-Test	27
2.2.4 Cell Proliferation ELISA BrdU	28
2.2.5 Apoptose-ELISA	29
2.2.6 Präparation von Gesamtzellextrakten	30
2.2.7 Proteinbestimmung.....	30
2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli	31
2.2.9 Western-Blot-Analyse	31
2.2.10 RNA-Interferenz (RNAi).....	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Etablierung der RNA-Interferenzmethode in humanen Glioblastomzelllinien	34
3.1.1 RNA-Interferenz ist in Glioblastomzellen möglich.....	34
3.1.2 Optimierung der RNA-Interferenztechnik am Beispiel von Lamin	35
3.1.2.1 Optimierung der Zellzahl	35
3.1.2.2 Optimierung der siRNA-Konzentration	37
3.1.2.3 Optimierung der Konzentration an Oligofectamin.....	38
3.1.2.4 Optimierte Versuchsbedingungen der RNA-Interferenztechnik	38
3.1.2.5 Nachweis der Spezifität des beobachteten Lamin „knock down“	39
3.2 Validierung der RNA-Interferenztechnik am Beispiel wichtiger Apoptoseproteine	40
3.2.1 Effekte eines „knock down“ von Apaf-1, Caspase-2 und Caspase-3 auf Morphologie, Vitalität und Proliferation	40
3.2.2 Einfluss auf die Proteinexpression	43
3.2.2.1 Einfluss einer Apaf-1-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression.....	43
3.2.2.2 Einfluss einer Caspase-3-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression	45
3.2.2.3 Einfluss einer Caspase-2-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression	46
3.2.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.2	47

3.2.3 ErPC-induzierte Apoptose in Abwesenheit essentieller Apoptose-Gene.....	47
3.2.3.1 Bedeutung der Caspase-3 für die ErPC-induzierte Apoptose	47
3.2.3.2 Bedeutung von Apaf-1 für die ErPC-induzierte Apoptose.....	48
3.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.3	50
4 Diskussion	51
4.1 Induktion von RNA-Interferenz (RNAi)	51
4.2. Bedeutung essentieller Moleküle des mitochondrialen Signalwegs für die ErPC- induzierte Apoptose.....	52
4.3 <i>Off-target</i> -Effekte und wie man sie vermeiden kann	54
4.4 Validierung der Spezifität eines RNAi-Ergebnisses	57
4.5 Schlussfolgerungen.....	58
5 Zusammenfassung	59
6 Literaturverzeichnis.....	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturformel von ErPC	12
Abbildung 2: Todesrezeptor-/Todesliganden- und Mitochondrien-abhängiger Apoptoseweg	13
Abbildung 3: Spaltung der dsRNA in siRNAs	16
Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz.....	17
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A172- bzw. U373MG-Zellen, unbehandelt und nach Transfektion mit Eg5-spezifischer siRNA	34/35
Abbildung 6: Western Blot: A172-, U373MG- und U118MG-Zellen mit Lamin-spezifischer siRNA transfiziert	36/37
Abbildung 7: Western Blot: A172-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Lamin-siRNA transfiziert.....	37
Abbildung 8: Western Blot: A172-Zellen mit Lamin-spezifischer siRNA und unterschiedlichen OFA-Mengen transfiziert.....	39
Abbildung 9: Western Blot: A172- und U373MG-Zellen mit Lamin-siRNA und Luciferase-siRNA transfiziert	39/40
Abbildung 10: Phasenkontrastaufnahme unbehandelter und mit spezifischer siRNA transfizierter A172- Zellen	41
Abbildung 11: WST-1: unbehandelte und transfizierte A172-Zellen.....	42
Abbildung 12: "Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric assay": DNA-Syntheserate in A172-Zellen	43
Abbildung 13: Western Blot: Apaf-1-Proteinexpression in A172- und U373MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA	44
Abbildung 14: Western Blot: Caspase-3-Proteinexpression in A172- und U373MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA	45
Abbildung 15: Western Blot: Caspase-2-Proteinexpression in A172- und U118MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA	46
Abbildung 16: Apoptose-ELISA: A172-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Caspase-3-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert wurden	48
Abbildung 17: Apoptose-ELISA: A172-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Apaf-1-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert wurden	49
Abbildung 18: Apoptose-ELISA: U118MG-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Apaf-1-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert wurden	49

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Malignität und Häufigkeit typischer Hirntumoren im Kindesalter	1
Tabelle 2: Häufigkeit kindlicher WHO-Grad-III/IV-Tumoren glialen Ursprungs.....	2
Tabelle 3: Potentielle neue Therapeutika zur Behandlung von pädiatrischen HGG	5
Tabelle 4: Fehlsteuerung von Wachstumssignalen bei malignen Zellen	9
Tabelle 5: Zusammensetzung unterschiedlicher Sammel- und Trenngele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper	25
Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper.....	25
Tabelle 8: Verwendete siRNAs, Lokalisation der Zielsequenz und entsprechende Zielsequenz sowie die Literaturreferenz	26
Tabelle 9: Optimierte Transfektionsbedingungen für die RNA-Interferenztechnik in den Zelllinien A172, U373MG und U118MG	39

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazoline-sulfonat]
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
EMEM	Minimal essential medium mit Earle's Salzen
FCS	Fetal calf serum
mRNA	messenger-RNA
miRNA	micro-RNA
primiRNA	primäre miRNA
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-buffered saline
TNF	Tumor necrosis factor
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ursachen von Hirntumoren bei Kindern und Jugendlichen

Hirntumore stellen die häufigsten soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter dar. Nach den Leukämien sind sie die zweitgrößte Gruppe maligner Erkrankungen dieser Altersgruppe. Im deutschen Kinderkrebsregister machen sie ca. 20% der gemeldeten Fälle aus. In der Altersgruppe der 0 bis 15-Jährigen zeigt sich eine jährliche Inzidenz von 3,1/100.000. Das bedeutet, dass jährlich etwa 380 Kinder und Jugendliche unter 16 Jahren an einem Hirntumor erkranken (Rutkowski et al. 2008).

Im Gegensatz zum Erwachsenenalter treten bei Kindern häufig hirneigene Tumoren im Sinne von eigenständigen Neubildungen des Hirngewebes auf.

Eine Übersicht über die häufigsten Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter ist in Tabelle 1 dargestellt. Bei Kindern zählen Hirntumoren aller WHO-Grade zu den Malignomen, auch histologisch „benigne“, da sie einen klinisch bösartigen Verlauf nehmen und zum Tod führen können (Rutkowski et al. 2008).

Histologie	WHO-Grad	Häufigkeit (circa) in Prozent
Astrozytom		50 %
pilozytisch	I	60%
diffus	II	25%
anaplastisch	III	10%
Glioblastoma multiforme	IV	5%
Medulloblastom	IV	20%
Sonstige Primitive neuroektodermale Tumoren (PNET)	IV	3%
Ependymom	II	10%
anaplastisch	III	
myxopapillär	I	
Kraniopharyngeom	I	8%

Tabelle 1: Malignität und Häufigkeit typischer Hirntumoren im Kindesalter (Speer und Gahr 2001, S.744)

Die größte Gruppe der intrakraniellen Tumore stellen die niedriggradigen Gliome (WHO-Grad-I oder -II) mit ca. 30 bis 40%. Das Geschlechterverhältnis ist mit 1,1-1,2:1 (Jungen:Mädchen) leicht knabenwendig, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 6 bis 11 Jahren (Thieme und Gnekow 2008).

Die häufigsten malignen Hirntumore im Kindes- und Jugendalter sind Medulloblastome, primitive neuroektodermale Tumoren (PNET) und Ependymome mit einer Inzidenz von 1/100.000 (Rutkowski und Fleischhack 2008).

Jedoch erkranken jedes Jahr in Deutschland 60 – 80 Kinder an einem hochmalignen Gliom, das sind etwa 15% der pädiatrischen Hirntumor-Neuerkrankungen. Zu den hochmalignen Gliomen (Synonym: hochgradige Gliome, HGG) gehören ZNS-Tumore, die entweder dem WHO-Grad III oder IV entsprechen oder durch einen ungünstigen klinischen Verlauf charakterisiert sind (Kramm et al. 2008). Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Erkrankung liegt bei ca. 10 Jahren. Es zeigt sich ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts (57% : 43%). Die Anamnese ist sehr kurz, beträgt etwa 4 Wochen. Die Fünfjahres-Überlebensrate ist mit 25% weiterhin schlecht (Eiden 2008).

Von den WHO-Grad-IV-Tumoren, die etwa die Hälfte der hochmalignen Gliome im Kindes- und Jugendalter ausmachen, stellt das Glioblastoma multiforme den größten Anteil (Tabelle 2), durch seine hohe Malignität ist die Heilungsrate sehr klein und die Prognose schlecht, die Überlebensrate liegt etwa zwischen 6 und 12 Monaten (Poeck und Hacke 2001).

Häufigkeit von kindlichen WHO-Grad-III / IV-Tumoren glialen Ursprungs		
WHO-Grad-IV-Gliome	Glioblastome multiforme	46 %
	Riesenzellglioblastom	4 %
	Gliosarkom	1 %
WHO-Grad-III-Gliome	Anaplastisches Astrozytom	40 %
	Anaplastisches pilozytisches Astrozytom	4 %
	Anaplastisches Oligoastrozytom/ anaplastisches Oligodendrogliom	2 %
	Anaplastisches pleomorphes Xanthoastrozytom	<1 %
	Anaplastisches Gangliogliom	2 %

Tabelle 2: Häufigkeit kindlicher WHO-Grad-III/IV-Tumoren glialen Ursprungs (Eiden 2008, S. 14)

Mechanismen, die zur Entstehung eines Hirntumors beitragen, sind größtenteils ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Durch Studien konnten bisher nur wenige Ursachen geklärt werden. Prädisponierende Faktoren für ein HGG sind eine vorherige Schädelbestrahlung, seltener eine Chemotherapie mit Antimetaboliten. Die Inzidenzrate für das Auftreten eines sekundären HGG nach onkologischer Erkrankung liegt bei 4,3%. Ca. 2,5% dieser Patienten waren früher an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt (Kramm et al. 2008).

Den meisten malignen Tumoren liegen genetische Veränderungen zu Grunde, welche zu einer Amplifikation von Onkogenen und Mutationen beziehungsweise einem Verlust von Tumorsuppressorgen führen. Eine genetische Veränderung, die wahrscheinlich mit der Entwicklung niedriggradiger Gliome assoziiert ist, ist die Duplikation und Mutation des BRAF-Onkogens. Weiterhin bestehen Assoziationen mit der Neurofibromatose von Recklinghausen und tuberöser Sklerose sowie dem Li-Fraumeni-Syndrom und Turcot-Syndrom (Thieme und Gnekow 2008, Louis und von Deimling 1995). 50% der Glioblastome zeigen einen Verlust des gesamten Chromosoms 10, einen Verlust des kurzen oder langen Armes dieses Chromosoms zeigen 70 bis 80% der Glioblastome (Shapiro und Shapiro 1998). Das Gen für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) wird überexprimiert und häufig liegt auch eine Mutation im Tumorsuppressorgen PTEN („phosphatase and tensin homolog deleted from Chromosom 10“) vor (Kleihues et al. 2002).

1.2 Konventionelle Therapie hochmaligner Hirntumoren

Die Therapie der Wahl bei hochmalignen Gliomen ist eine möglichst komplette operative Resektion des Tumors. Die Resektabilität wird durch die Tumorlokalisation und Wachstumscharakteristika (z.B. diffus vs. fokal) bestimmt (Thieme und Gnekow 2008).

Ein therapeutischer Effekt der Strahlentherapie ist ebenfalls nachgewiesen, die prognostische Bedeutung jedoch geringer. Die Strahlentherapie ist nichtchirurgische Therapie der Wahl für „ältere Kinder“ ohne Neurofibromatose Typ 1, bei jüngeren Kindern (<5-10 Jahre) besteht die Gefahr einer Schädigung des sich entwickelnden Gehirns (Thieme und Gnekow 2008).

Leider haben Kinder mit Hirntumoren oft unter den Spätfolgen einer solchen Bestrahlung zu leiden, da das kindliche Gehirn sehr strahlenempfindlich ist. Aufgrund vaskulärer Läsionen und Störungen der Myelinisierung, treten gehäuft Intelligenzdefekte und Entwicklungsverzögerungen auf (Suc et al. 1990). Weiterhin haben Operation, perioperative

Komplikationen und die Chemotherapie einen Einfluss. Nach Zerstörung entsprechender Hirnabschnitte können neurologische Ausfallserscheinungen bestehen, häufig treten Beeinträchtigungen des Konzentrationsvermögens, des Kurzzeitgedächtnisses, des Lernvermögens und der visuellen Wahrnehmung auf. Bei zum Bestrahlungszeitpunkt jüngeren Kindern sind neurokognitive Entwicklungsverzögerungen meist ausgeprägter (Rutkowski und Fleischhack 2008).

Den dritten Grundpfeiler der Therapie maligner Hirntumoren stellt die Chemotherapie dar. So konnte nach postoperativer Bestrahlung von Kindern mit Glioblastom durch die Chemotherapie mit CCNU und Vincristin die rezidivfreie Überlebensrate mehr als verdoppelt werden (Speer und Gahr 2001). Die Bedeutung der Chemotherapie ist vor allen Dingen in der adjuvanten Behandlung maligner Tumore zu sehen, so können die Heilungschancen verbessert und die Lebensqualität durch Reduktion der Strahlendosis auf das Gehirn erhöht und einer Metastasierung des Tumors in Lunge oder Skelett vorgebeugt werden. Hier ist das Medulloblastom zu nennen, welches dazu neigt, sehr früh und aggressiv in die liquorhaltigen Räume des Gehirns einzubrechen. Bei Kindern bis zum dritten Lebensjahr, welche besonders unter den oben genannten Spätfolgen einer Bestrahlung zu leiden haben, stellt die Chemotherapie eine Alternative zur Bestrahlung dar. Obwohl in zahlreichen Studien neue Medikamente, ihre Dosierung sowie die Art der Applikation untersucht werden, treten oft schwerwiegende Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Immunsuppression sowie Myelo- und Neurotoxizität auf. Diese gravierenden Nebenwirkungen und die Tatsache, dass in den letzten 10 – 20 Jahren noch kein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der Therapie maligner Hirntumore erzielt werden konnte, geben Anlass zur Suche nach neuen, effektiveren Verfahren der Tumorthherapie.

1.3 Alternative Therapieansätze zur Behandlung von Hirntumoren bei Kindern

Da die Gesamtprognose von pädiatrischen HGG durch Operation, Bestrahlung und Chemotherapie nur unzureichend verbessert wird, ist die Entwicklung neuer Therapiekonzepte dringend notwendig. Potentielle neue Therapiestrategien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Oberbegriff	Wirkmechanismus	Wirkstoffklassen	Potentielle Therapie-Targets in pädiatrischen HGG
Anti-Angiogenese	Hemmung der Tumorgefäßneubildung, damit Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung	Monoklonale Antikörper „small molecule drugs“ Zytokine Protrahierte niedrig-dosierte Chemotherapie Neuentwicklungen	VEGFR PDGFR Proliferation des Tumorgefäßendothels Hemmung von pro-angiogenen Zytokinen
Hemmung von tumorspezifischen Signalwegen	Hemmung von intrazellulären Signalen, die am Tumorwachstum, der zunehmenden malignen Transformation und Metastasierung beteiligt sind	Monoklonale Antikörper „small molecule drugs“ Neuentwicklungen	EGFR PDGFR mTOR
Induktion der Tumorzelldifferenzierung	Durch Differenzierung verlangsames Tumorwachstum sowie Umwandlung in einen weniger malignen Tumorphänotyp	Retinsäure Histondeacetylaseinhibitoren „small molecule drugs“	Tumorzellen
Immuntherapie	Überwindung der immunsuppressiven Wirkung von HGG Induktion / Aktivierung einer tumorspezifischen Immunantwort	Dendritische Tumorzellvakzinierung Tumor-spezifische T-Zellen, NK-T-Zellen, NK-Zellen Zytokine Monoklonale Antikörper Immunmodulierende Neuentwicklungen Immunmodulation durch Chemotherapeutika	Tumormikromilieu Tumorzellen Tumor infiltrierende T-Zellen Regulatorische T-Zellen Dendritische Zellen Zytokine
EGFR „epidermal growth factor receptor“, HGG hochgradiges Gliom, mTOR „mammalian target of rapamycin“, NK „natural killer“, PDGFR „platelet-derived growth factor receptor“, VEGFR „vascular endothelial growth factor receptor“			

Tabelle 3: Potentielle neue Therapeutika zur Behandlung von pädiatrischen HGG (Kramm et al. 2008, S. 1206)

1.3.1 Gentherapie

In den letzten Jahren ist die Gentherapie stark in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Bei diesem Verfahren wird ein therapeutisches Gen in ein Virus eingebaut und in vektorproduzierenden Zellen vermehrt. Nach Implantation dieser Zellen in die Tumorkhöhle wird das Genprodukt kontinuierlich freigesetzt, hierdurch werden die Tumorzellen der Chemotherapie zugänglich gemacht (Weber et al. 2000). So kann zum Beispiel das Gen für das Enzym

Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus Typ I in die DNA von Tumorzellen integriert und die Zellen so empfindlich für die Therapie mit Ganciclovir gemacht werden (Weber et al. 2000). Retroviren gehören zu den ersten Vektoren, die in der Tumorthherapie eingesetzt wurden. Sie sind zur Behandlung von Hirntumoren besonders geeignet, da sie eine hohe Selektivität für mitotische Zellen aufweisen. Im Gehirn sind dies fast ausschließlich die Zellen des schnell wachsenden Tumors, die proliferierenden Endothelzellen der neoplastischen Kapillaren und einige reaktive Astrozyten. Die gesunden Nervenzellen des Gehirns sind mitotisch inaktiv und auch Gliazellen, Gewebsmakrophagen und Gefäßendothelien zeigen nur eine sehr geringe Teilungsaktivität.

Eines der Probleme dieser Methode besteht darin, dass nur niedrige Titer (1×10^5 - 10^7 infektiöse Retroviruspartikel / ml) erreicht werden (Rainov und Ren 2003). Ferner wird das Gen nur für kurze Zeit exprimiert, da es nicht zu einer permanenten Integration in die DNA kommt (Selkirk 2004).

Eine Weiterentwicklung dieser Methode besteht im Einsatz von Retroviren produzierenden Zelllinien. Diese produzieren infektiöse Retrovirus-Partikel in relativ hohen Titern und zeigten sich effektiver als die direkte Injektion von Retroviren. Werden diese vektorproduzierenden Zellen in das Gehirn implantiert, so produzieren sie kontinuierlich Retroviren und setzen diese *in situ* frei. Vektorproduzierende Zellen wandern jedoch nicht weiter von der Implantationsstelle in das Tumorgewebe ein und überleben nur relativ kurze Zeit (bis zu 14 Tagen). Weiterhin kann jedes rekombinante Viruspartikel nur eine Zelle infizieren, so dass trotz der kontinuierlichen Vektorproduktion die Transduktionseffizienz limitiert ist (Rainov und Ren 2003).

Retroviren zeigen sich somit als Werkzeuge zur gezielten, selektiven Destruktion von Tumorzellen und scheinen gut toleriert zu werden, jedoch konnte durch ihren Einsatz in klinischen Studien noch keine signifikante Erhöhung der Überlebensrate von Patienten erreicht werden. Die biologischen Effekte der Therapie hängen stark von der Auswahl des Transgen- / Prodrug-Systems und von der Art der Vektoreinbringung in die Zelle ab (Rainov und Ren 2003).

1.3.2 Immuntherapie

Tumorzellen exprimieren bestimmte Proteine, die zwar von T-Zellen erkannt werden, aber nicht zu einer effektiven Immunantwort führen. Ursache hierfür ist, dass tumorassoziierte

Antigene in geringer Anzahl auch im gesunden Gewebe zu finden sind und ihnen gegenüber deshalb eine gewisse Toleranz besteht. Es gibt verschiedene Strategien, diese immunologische Toleranzschwelle zu durchbrechen, allen gemeinsam ist die gezielte Aktivierung des Immunsystems zur Zerstörung maligner Zellen (Renner et al. 2002). Neben dem Einsatz monoklonaler Antikörper und der tumorspezifischen Vakzinierung umfassen sie die Verwendung von dendritischen Zellen (Packer 1999). Dendritische Zellen finden sich in nahezu allen Geweben des Körpers, sie können extrazelluläre Proteine durch Phagozytose aufnehmen, sie intrazellulär in Peptide zerlegen, um sie dann auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und so für T-Lymphozyten erkennbar zu machen. Diese Eigenschaft kommt bei der Behandlung maligner Tumoren zum Einsatz.

Hier werden dendritische Zellen des Patienten in der Zellkultur mit lysiertem autologem Tumormaterial beladen und anschließend als Tumorstoffe intrakutan in den Oberarm des Patienten gespritzt. Im drainierenden axillären Lymphknoten werden die Tumorstoffe den T-Zellen präsentiert. Es kommt zu einer tumorspezifischen T-Zellantwort, welche eine Antitumorstoffwirkung bedingt. Erste Erfolge zeigen sich v.a. bei jüngeren Patienten (Schnurr et al. 2002, Rutkowski et al. 2004, Kramm et al. 2008, Van Gool et al. 2009).

1.3.3 Hemmung der Angiogenese

Glioblastome sind stark vaskularisiert und ihr Wachstum ist von ihrer Angiogenese abhängig. Angiogenese ist die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen. Sie ist durch ein System von angiogenen und antiangiogenen Faktoren geregelt. Ein Ungleichgewicht in diesem System führt zu einer gesteigerten oder verminderten Gefäßneubildung. Tumorzellen sezernieren verschiedene Zytokine, welche die Bildung neuer Gefäße anregen, insbesondere „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), Angiogenin, „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und den Tumornekrose-Faktor (TNF). Indirekt führen Tumorzellen zu einer gesteigerten Gefäßneubildung durch Sezernierung von Proteasen, welche die extrazelluläre Matrix zerstören und dadurch eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Inflammatorische Zellen, auch Makrophagen, sind in der Lage angiogene Zytokine frei zu setzen. Glioblastomzellen bilden überwiegend eine große Menge des „basic fibroblast growth factor“. Die Höhe des ausgeschütteten bFGF korreliert mit der Vaskularisation des Tumors und dem Tumorgrad (Packer 1999). Eine Hemmung der Gefäßneubildung ist somit eine vielversprechende Methode in der Therapie von Tumorleiden. Hier gibt es verschiedene

Ansätze: die Hemmung der pro-angiogenen Faktoren und Rezeptoren, die Inaktivierung von Endothelzellen und die Hemmung von zellulären Adhäsionsmolekülen. Dies kann durch endogene Inhibitoren (z.B. Angiostatin, Thrombospondin, Alpha-Interferon) und durch natürliche oder synthetische Inhibitoren (z.B. Thalidomid, Antikörper gegen den angiogenen Wachstumsfaktor, Inhibitoren des Tyrosinkinase-Rezeptors Tie-2) erreicht werden (de Bouard und Guillo 2005).

1.3.4 Hemmung der Signaltransduktion

Die Steuerung von Wachstum und Proliferation normaler sowie maligner Zellen erfolgt besonders durch externe und interne Signalmoleküle. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen stimulierenden und hemmenden Signalen. Bei der malignen Entartung verändert sich das Gleichgewicht zugunsten der Wachstums-stimulierenden Faktoren gegenüber den Wachstums-hemmenden Faktoren. Die malignen Zellen entziehen sich der physiologischen Wachstumskontrolle und verselbstständigen sich.

Die zelluläre Signaltransduktion umfasst drei verschiedene regulatorische Ebenen: membranständige Rezeptoren (z.B. Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren), intrazytoplasmatische Signalvermittler oder Enzymkaskaden (z.B. MAP-Kinasen-Kaskade) sowie nukleäre Proteine, welche die Aktivierung von Genen steuern (Transkriptionsfaktoren). Sowohl die neoplastische Entartung als auch die therapeutischen Ansätze können auf allen drei Ebenen Einfluss nehmen (Tabelle 4).

Zelluläre Ebene	Mechanismus der Deregulation	Beispiel
Membranständige Rezeptoren	Überexpression von Wachstumsfaktoren und c-Kit	Stammzellfaktor, Rezeptoren beim kleinzelligen Bronchialkarzinom
	Konstitutive Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren	c-Kit bei GIST
Intra-zytoplasmatische Signalmoleküle	Überexpression von Signalmolekülen	PKC α bei Astrozytom
	Konstitutive Aktivierung von Signalmolekülen durch Mutation	RAS bei myelodysplastischem Syndrom
	Konstitutive Aktivierung durch Rearrangement mit Bildung von Fusionsgenen	BCR-ABL bei CML/AML
Nukleäre Proteine	Durch chromosomale Translokation bedingte Bildung von Fusionsgenen	AML-1/ETO bei AML

Tabelle 4: Fehlsteuerung von Wachstumssignalen bei malignen Zellen. (c-Kit Rezeptor des Stammzellfaktor; PKC Proteinkinase-C; GIST „gastrointestinal stromal tumor“; CML chronische myeloische Leukämie; ALL akute lymphatische Leukämie; AML-1/ETO akute myeloische Leukämie, AML-1/ETO-Fusionsprotein) (Fischer und Huber 2001, S. 2346))

Ein Beispiel für die Anwendung dieser Art von Therapie ist die Hemmung der Signaltransduktion beim EGF-Rezeptor. Zwei mögliche Therapieansätze stehen derzeit zur Verfügung: Erstens kann ein spezifischer Antikörper (Mab C225, Cetuximab) gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors eingesetzt werden, zweitens kann ein Tyrosinkinase-Inhibitor verwendet werden. So sind CP-358.774 und ZD 1839 oral aktive, hochselektive Inhibitoren der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Domäne und erreichen eine spezifische Blockade mit einer Hemmkonzentration im nanomolaren Bereich (Fischer und Huber 2001). Bei beiden Ansätzen wird die Proliferation EGF-Rezeptor überexprimierender humaner Zelllinien gehemmt. Die EGF-Rezeptor-Blocker weisen eine geringe Toxizität auf, häufige dosisabhängige Nebenwirkungen sind reversible Exantheme und Diarrhoe.

Die Hemmung der Signaltransduktion sollte während der frühen Krankheitsphase eingesetzt werden, da sonst die Gefahr besteht, daß sich durch die genetische Instabilität des Tumors zusätzliche genetische Veränderungen entwickeln, welche die klinische Effektivität der Methode herabsetzen können (Fischer und Huber 2001).

Auch die Kombination von Signalhemmern mit konventionellen Therapiemethoden wird derzeit in verschiedenen Studien geprüft.

1.3.5 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Ein großes Problem der zytostatischen Chemotherapie von malignen Hirntumoren stellt die Blut-Hirn-Schranke dar. Sie ist eine physiologische Barriere, die das Gehirn vor toxischen Stoffen, aber auch vor den meisten Chemotherapeutika schützt. Die Blut-Hirn-Schranke baut sich aus einer Schicht spezialisierter Endothelzellen der Hirnkapillaren, einer Basalmembran sowie den ihr aufsitzenden Astrozytenfortsätzen auf. Durch sogenannte „tight junctions“ sind die Endothelzellen miteinander verbunden. Aufgrund der fehlenden Fenestration des Endothels kann der Stoffaustausch nur stark eingeschränkt, durch das Zytoplasma der Endothelzellen, erfolgen. Eine Verbindung der Astrozyten durch „gap junctions“ sorgt für ein konstantes Ionenmilieu.

In der Vergangenheit wurden nur einige wenige Methoden zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke beschrieben. Dabei lag das Augenmerk besonders auf einer osmotischen Beeinflussung der Permeabilität. So konnte durch die Infusion einer hypertonen Arabinose- oder Mannitollösung in die Arteria carotis die Blut-Hirn-Schranke bei Tieren (Blasberg et al. 1990) und Menschen (Rapoport 2001) geöffnet werden. Die Öffnung erfolgt durch eine Erweiterung der „tight junctions“ zwischen den Endothelzellen und beruht auf der Schrumpfung der Endothelzellen und einer Kontraktion des endothelialen Zytoskeletts durch Erhöhung des intrazellulären Calciums (Rapoport 2001). Klinische Studien zeigen, dass die gleichzeitige intraarterielle Gabe von Chemotherapeutika die Überlebensraten von Patienten mit malignen Hirntumoren verbessern können. Dennoch hat diese Methode noch keine weitverbreitete Akzeptanz in der Klinik gefunden. Dies beruht auf den Nebenwirkungen und der erzielten schwächeren Wirkung auf das Tumorgewebe als auf gesundes Hirngewebe.

Eine Verbesserung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Chemotherapeutika konnte bei der Gabe von Bradykinin oder dessen Analogon RMP-7 (Lobradimil) beobachtet werden. Jedoch ist die erreichbare Konzentration des Chemotherapeutikums im Tumorgewebe sehr begrenzt (Erdlenbruch et al. 2003).

Eine neue und sehr effektive Methode zeigt sich in der intraarteriellen Gabe kurzkettiger Alkylglycerine. Werden diese zusammen mit verschiedenen Chemotherapeutika in die Arteria carotis von Ratten injiziert, so zeigt sich eine konzentrationsabhängige Anreicherung des

Chemotherapeutikums in der gleichseitigen Hirnhemisphäre (Erdlenbruch et al. 2003). Besonders Pentyl- und Hexylderivate zeigten sich als sehr effektiv, so konnte durch die Gabe von 1-O-Pentylglycerol die Aufnahme von Methotrexat (MTX) in das Tumorgewebe stark erhöht werden (Erdlenbruch et al. 2000). Auch die Aufnahme von Gentamycin und Vancomycin in das Hirngewebe steigt bei gleichzeitiger Gabe von Alkylglycerinen an (Erdlenbruch et al. 2000). *In vitro* und *in vivo* konnten keine toxischen Nebenwirkungen oder neuropathologische Veränderungen festgestellt werden (Erdlenbruch et al. 2003).

1.3.6 Alkylphosphocholine (APC)

1.3.6.1 Erucylphosphocholin (ErPC), Prototyp einer neuen APC-Klasse

Bisher gibt es nur sehr wenige Chemotherapeutika, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Zu ihnen gehören die Nitrosoharnstoffderivate und Vincristin. In den 90er Jahren jedoch synthetisierten Eibl und seine Mitarbeiter Erucylphosphocholin (ErPC) (Berger et al. 1998). Im Gegensatz zu anderen Alkylphosphocholinen (APC) kann dieses intravenös appliziert werden, ohne eine Hämolyse auszulösen. Es hat dosisabhängige zytostatische und zytotoxische Wirkungen (Erdlenbruch et al. 1998). Durch seine Lipidstruktur überwindet es leicht die Blut-Hirn-Schranke und reichert sich in therapeutischen Dosen im Gehirn an. Klinisch besonders interessant ist der Befund, dass ErPC Apoptose auch in den Glioblastom-Zelllinien induziert, die gegenüber der Behandlung mit Standard-Chemotherapeutika wie Cisplatin und Etoposid Resistenzen aufweisen, da es andere Signalwege auslöst als herkömmliche Zytostatika (Jendrossek et al. 2001). *In vitro* wurde herausgefunden, dass ErPC sowohl zytostatisch als auch zytotoxisch auf Hirntumorzelllinien wirkt. Es zeigt sich somit als eine vielversprechende Substanz in der Therapie maligner Hirntumore.

Abbildung 1: Strukturformel von ErPC

1.3.6.2 ErPC-induzierte Apoptose

Zentrale Mediatoren der Apoptose sind Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen), die verschiedene Struktur-, Reparatur- und Regulatorproteine spalten (Lüthi und Martin 2007), und von denen bis heute bei Säugern 15 unterschiedliche identifiziert wurden (Chowdhury et al. 2008). Die an der Apoptose beteiligten Caspasen können in Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und in Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) eingeteilt werden (Bratton et al. 2000).

Die Aktivierung der Caspasen kann über verschiedene Wege erfolgen, zwei davon sind am besten charakterisiert. Am Rezeptor-abhängigen Weg sind sogenannte Todesrezeptoren beteiligt, es sind Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie, z.B. CD95/Fas/Apo1, TNFR1, DR4/TRAIL-R1 („TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1“) (Ashkenazi 2008). Nach Bindung extrazellulärer Todesliganden (z.B. CD95, TNF, TRAIL) an ihren spezifischen Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Aktivierung von Procaspase-8. Caspase-8 führt dann zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7, welche die Apoptose einleiten (Kaufmann und Earnshaw 2000).

Der zweite Weg hat seinen Anfangspunkt am Mitochondrium. So kommt es zum Beispiel bei der Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen durch UV-Strahlung, Stimuli wie Hypoxie, zellulären Stress oder verschiedene Chemikalien zur Freisetzung von Zytocrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol. Dieser Vorgang geht außerdem oft mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) und der Bildung von Superoxidanionen einher (Kroemer et al. 2007). Zytocrom *c* interagiert mit Apaf-1 („apoptotic protease activating factor-1“) und Procaspase-9 zum sogenannten „Apoptosom“, dabei wird Procaspase-9 aktiviert (Bao und Shi 2007). Caspase-9 bewirkt eine Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 (Kaufmann und Earnshaw 2000, Bratton et al. 2000, Abbildung

2). Beide Wege können durch das Bcl-2-Protein Bid miteinander verbunden sein. Die Aktivierung von Caspase-8 kann zur Spaltung von Bid in *truncated* (t)Bid und dessen Translokation an die Mitochondrien führen, wo es wiederum die Freisetzung von Zytocrom *c* induziert (Deshager et al. 1999), wodurch es zu einer Verstärkung des extrinsischen Signalwegs über diese mitochondriale Feedback-Schleife kommt. Reguliert wird die Apoptose u. a. durch Proteine der Bcl-2-Familie, wobei z.B. Bax und Bad pro-apoptotisch, Bcl-2 und Bcl-X_L dagegen anti-apoptotisch wirken (Cory und Adams 2002).

ErPC induziert in den Zellen Apoptose, die unabhängig von p53 und dem Todesrezeptor-/Todesligandenweg abläuft. ErPC führt zur Veränderung des Membranpotentials der Mitochondrien und damit zur Freisetzung von Zytocrom *c* (Jendrossek et al. 2001). Western-Blot-Analysen zeigten, dass es hierdurch zur zeitabhängigen Spaltung der Caspase-3, -7, -8 und -9 in ihre aktiven Untereinheiten und schließlich zur Apoptose kommt (Kugler et al. 2002).

Abbildung 2: Todesrezeptor-/Todesliganden- und Mitochondrien-abhängiger Apoptoseweg (modifiziert nach Wang und Lenardo 2000, S. 755)

1.3.7 Möglichkeiten zum spezifischen Ausschalten von Genen

Die Therapie maligner Tumoren befindet sich zurzeit in einem fundamentalen Wandel. Bestand bisher das Bestreben neue Substanzen mit zytostatischer bzw. zytotoxischer Wirkung zu finden, so rückt die Suche nach Strategien, die gezielt auf molekularer Ebene das Wachstum von Tumoren beeinflussen, zunehmend in den Vordergrund. Von großer Bedeutung ist hier die spezifische Inhibition der Genexpression.

1.3.7.1 Antisense-RNA und –DNA

Antisense-RNA ist eine vielseitig einsetzbare Variante zur gezielten Ausschaltung der Funktion eines bestimmten Gens. Dabei wird eine RNA oder ein einzelsträngiges DNA-Molekül in eine Zelle eingeschleust, das komplementär zur „messenger“-RNA (mRNA) des Zielgens ist. Die Antisense-RNA (asRNA) oder –DNA (asDNA) bildet mit der Ziel-mRNA einen Doppelstrang, und verhindert so ihre Translation in das entsprechende Protein. Der Nukleotiddoppelstrang wird anschließend von spezifischen Enzymen abgebaut (Watson et al. 1993). Eindrucksvolle Ergebnisse wurden bei der Ausschaltung von Onkogenen erzielt. (Watson et al. 1993).

1.3.7.2 „Knock out“-Mäuse

Die Bedeutung der „Knock out“-Mäuse liegt vor allem in der Aufklärung molekularer Mechanismen über zelluläre, physiologische und pathologische Vorgänge im Organismus und bietet Modellsysteme zur Evaluation neuer Behandlungsstrategien. „Knock out“-Mäuse sind Tiere, bei denen ein ganz bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet wurde, um dessen Wirkungen zu analysieren. Um eine „Knock out“-Maus zu erzeugen, werden im ersten Schritt einer Maus Stammzellen entnommen. Mit Hilfe eines Vektors wird ein mutiertes Gen in diese Zellen eingeführt. Nach Selektion und Wachstum dieser Zellen in Zellkultur werden sie in einen Mausembryo eingepflanzt. Ist eine heterozygote Maus für dieses Gen entstanden, kreuzt man sie mit anderen heterozygoten Mäusen, um eine homozygote Maus zu erhalten. Statistisch müssten 25% der gezüchteten Nachkommen homozygot sein. Insgesamt ist dieses Verfahren recht unbefriedigend, vor allem weil ein hoher Zeitaufwand erforderlich ist. Weiterhin sterben viele der Tiere bereits *in utero*, so dass kein Effekt beobachtet werden kann. In einigen Fällen

steht der beobachtete Effekt in keinem Zusammenhang mit der bekannten Funktion des Gens (Mülhardt 2000).

1.3.7.3 RNA-Interferenz

1998 konnten Fire und seine Mitarbeiter bei Experimenten mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass durch den Einsatz langer, doppelsträngiger RNA (dsRNA) die Expression bestimmter Zielgene verhindert werden konnte. Sie prägten dafür den Begriff der „RNA-Interferenz“ (Fire et al. 1998). Bald erkannte man, daß dieses Phänomen auch im Pflanzenreich als sogenannte Cosuppression zu beobachten ist, wo in Pflanzen eingeschleuste Transgene nicht nur zur Stillegung des Transgens, sondern auch von homologen endogenen Genen führen. Zahlreiche Beobachtungen zeigten, dass ein gemeinsamer Mechanismus für Cosuppression und RNA-Interferenz verantwortlich ist. Anfangs wurden lange doppelsträngige RNAs für diese Ereignisse verantwortlich gemacht, erst später konnte gezeigt werden, dass es sich um kurze RNAs handelt, die aus 20-25 Basenpaaren aufgebaut sind, sogenannte „small interfering RNAs“ (siRNA). Die gängige Hypothese ist, dass die RNA-Interferenz ursprünglich der Virusabwehr der Zelle, nämlich der Zerstörung des Virusgenoms dient. Außerdem scheinen die endogenen siRNAs eine Reihe weiterer Funktionen zu haben, so zum Beispiel Genregulation, Verhinderung von Transpositionen, die epigenetische Regulation der Chromatinkondensation und genomische Änderungen (Banan und Puri 2004).

Grundlage der RNA-Interferenz-Methode ist eine lange doppelsträngige RNA. Mit Hilfe eines Vektors wird die dsRNA in die Zielzelle eingeführt. Es kommt innerhalb der Zelle unter ATP-Verbrauch zu einer Spaltung der dsRNA in kurzkettige siRNAs, daran beteiligt ist unter anderem Dicer, ein Enzym, das zur Ribonuklease-III-Familie gehört. Die siRNAs haben meist eine Länge von 21 bis 23 Basenpaaren (Abbildung 3).

Abbildung 3: Spaltung der dsRNA in siRNAs. Erläuterungen siehe Text (die Abbildung wurde freundlicherweise von der Firma Cell Signaling 2001 zur Verfügung gestellt)

In früheren Experimenten zeigte sich, dass dsRNAs mit einer Länge von mehr als 30 Basenpaaren in Säugetierzellen eine Interferon-Antwort auslösen und zu einer globalen Inhibition der mRNA-Translation führen, die kurzen siRNAs dagegen umgehen diese Interferon-Aktivierung (Banan und Puri 2004). Die siRNAs besitzen einen Überhang von 2-3 Basen am 3'-OH-Ende sowie einen Phosphatrest am 5'-Ende. Diese Konfiguration ist notwendig, um die entstandenen siRNAs in einen Effektor-Komplex, RISC („RNA-Induced Silencing Complex“), zu inkorporieren. RISC besitzt Helicaseaktivität und führt zur ATP-abhängigen Entwindung der siRNA und somit zur Aktivierung von RISC. Dabei kommt es zur Trennung der sense- und antisense-Stränge der siRNA. Der antisense-siRNA-Strang bildet mit der mRNA des Ziels komplementäre Basenpaare. Dadurch kommt es zu einer Spaltung der Ziel-mRNA durch Endonukleasen (Dykxhoorn et al. 2003, Abbildung 4).

Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz. Erläuterungen siehe Text (die Abbildung wurde freundlicherweise von der Firma Cell Signaling 2001 zur Verfügung gestellt)

2001 gelang es Elbashir und Mitarbeitern, siRNA chemisch zu synthetisieren und zu zeigen, dass diese auch in Säugetierzellen wirksam sind. Dadurch konnten sie spezifisch einzelne Gene in Humanzellen abschalten (Elbashir et al. 2001).

Aufgrund der hohen Sequenzspezifität der RNA-Interferenz-Methode ist sie von immer größer werdendem Interesse, speziell in der spezifischen Genfunktionsanalyse. Man kann mit relativ geringem Aufwand die Aktivität einzelner Gene herunterregulieren und dann die entsprechenden Auswirkungen studieren.

1.4 Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Verifizierung der RNA-Interferenz-Technik zum Ausschalten spezifischer Gene in humanen Glioblastomzelllinien.

Die Therapie maligner Hirntumoren befindet sich zurzeit in einem fundamentalen Wandel. Dabei rückt die Suche nach Strategien, die gezielt auf molekularer Ebene das Wachstum dieser Tumoren beeinflussen, zunehmend in den Vordergrund. Eine große Rolle spielt hierbei die spezifische Inhibition der Genexpression. Die Gruppe um Thomas Tuschl konnte zeigen, dass durch die direkte Transfektion sog. *small interfering* RNAs (siRNAs) in Säugetierzellen die Aktivität einzelner Gene effizient herunterreguliert werden kann (Elbashir et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit soll, analog zum Ansatz der Tuschl-Gruppe, durch den Einsatz spezifischer, synthetischer, 21nt-langer siRNAs die Bedeutung einzelner Moleküle für die Erucylphosphocholin (ErPC)-induzierte Apoptose untersucht werden. Als Modellsystem dienen dabei die humanen Glioblastomzelllinien A172, U118MG und U373MG. Das Ausmaß der Proteinexpression wird mit Hilfe der Western-Blot-Analyse bestimmt.

Im Mittelpunkt des Interesses stehen deshalb folgende Untersuchungen:

1. Nachweis, dass die Methode der RNA-Interferenz auch in humanen Glioblastomzellen anwendbar ist
2. Etablierung der RNA-Interferenz-Methode mit Hilfe einer spezifischen siRNA gegen die mRNA von Lamin A/C, einem wichtigen Protein des Zytoskeletts. Optimierte werden dabei die Transfektionsparameter
 - a. Zellzahl
 - b. Konzentration der verwendeten siRNA
 - c. Konzentration des Transfektionsreagenzes (Oligofectamin).

Die Spezifität der Methode wird durch den Einsatz einer Kontroll-siRNA gegen Luciferase bestätigt.

3. Validierung der RNA-Interferenztechnik an den apoptoserelevanten Genen Apaf-1, Caspase-3 und -2, unter optimierten Transfektionsbedingungen
4. Untersuchung der funktionellen Bedeutung des „Knock down“ von Caspase-3 und Apaf-1 auf die ErPC-induzierte Apoptose.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen dazu dienen, die Bedeutung ausgewählter apoptoserelevanter Gene für die ErPC-induzierte Apoptose in Glioblastomzellen nachzuweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

A172	humane Glioblastomzelllinie	ECACC, Salisbury, Großbritannien
U118MG	humane Glioblastomzelllinie	Prof. Dr. G. Bernhardt, Universität Regensburg
U373MG	humane Glioblastomzelllinie	Prof. Dr. G. Bernhardt, Universität Regensburg

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (30%)	Roth, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
BCA Protein Assay Kit	Pierce (über Perbio Science, Bonn)
“Cell Death Detection”-ELISA ^{PLUS}	Roche Applied Science, Mannheim
“Cell Proliferation Reagent” WST-1	Roche Applied Science, Mannheim
“Cell Proliferation” ELISA, BrdU (colorimetric) Kit	Roche Applied Science, Mannheim
DMEM	Biochrom AG, Berlin
ECL, Western-Blot-Nachweisreagenzien	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EMEM	Cambrex Bio Science Verviers, Belgien
Erucylphosphocholin (ErPC)	Synthese durch Prof. H. Eibl, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen

Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Methanol (98,9%ig)	Merck, Darmstadt
Oligofectamin (OFA)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM1-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Cambrex Bio Science Verviers, Belgien
Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ml Pen, 10000µg/ml Strep)	PAA, Cölbe
Phosphataseinhibitorcocktail I	Sigma-Aldrich, München
Phosphataseinhibitorcocktail II	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibitorcocktail	Calbiochem, Bad Soden
Roti-load (4 x Konz.)	Roth, Karlsruhe
RPMI-1640	Cambrex Bio Science Verviers, Belgien
SDS	Sigma, München
TEMED	Merck, Darmstadt
Trypan Blau (0,5% w/v)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin-EDTA-Solution	Cambrex Bio Science Verviers, Belgien

2.1.3 Weitere Materialien

ECL-Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
24-, 96-Well-Flachbodenkulturplatten	Nunc, Wiesbaden

TABLE 18.3 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% acrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% acrylamide mix	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% acrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

TABLE 18.4 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Tables 18.3 and 18.4 are modified from Harlow and Lane (1988).

Tabelle 5: Zusammensetzung unterschiedlicher Sammel- und Trenngele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese. (Sambrook et al. 1989, S. 18.52)

2.1.4.3 Western-Blot-Analyse

Transfer (Blot)-Puffer:

48 mM Tris-Cl
39 mM Glycin
20 % Methanol
(pH nicht einstellen)

TBS-Puffer:

150 mM NaCl
20 mM Tris-Cl pH 7,5

Block-Puffer:

TBS mit
5,0 % “non-fat dry milk”
0,1 % Tween 20

Antikörper-Puffer:

TBS mit
5,0 % BSA
0,1 % Tween 20

Wasch-Puffer:

TBS mit
0,1 % Tween 20

Abschmelzlösung:

62,5 mM Tris-Cl pH 6.8
2,0 % SDS
unmittelbar vor Gebrauch zugeben:
100 mM β -Mercaptoethanol

2.1.5 Zellkulturmedien

A172	RPMI-1640, 10% hitzeinaktiviertes (56°C, 30 Minuten) FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
U118MG	DMEM, 5% FCS, 1% Na-pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
U373MG	EMEM, 5% FCS, 1% Na-pyruvat, 1% NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Einfriermedium: 90% Kulturmedium, 10% DMSO

2.1.6 Geräte

Gelelektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
Glasplattenset für Minigele	Biometra, Göttingen
Hämozytometer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²)	Brand, Wertheim
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Bio-Rad, München
SUNRISE Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Crailsheim
Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Hettich, Bäch, Schweiz Heraeus-Christ, Hanau

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Firma	Wirt	mAb/pAb	Spezifität	Konzentration für Western Blot
Actin	B	Maus	mAb	Vertebraten	1:30.000
Apaf-1 (2E12)	Alexis	Ratte	mAb	Mensch	1:4000
Caspase-2 _L	sc	Kaninchen	pAb	Mensch, Maus, Ratte	1:10.000
Caspase-3 (E8)	sc	Maus	mAb	Mensch	1 :1000
Lamin	cs	Kaninchen	pAB	Mensch, Maus, Ratte, (Rind)	1 :2500

Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper. Aufgeführt sind Name, Firma, Wirt, Spezifität und die in der Western-Blot-Analyse eingesetzte Konzentration. B: Boehringer; sc: Santa Cruz Biotechnology; cs: Cell Signaling; mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper

2.1.7.2 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Firma	Konzentration für Western Blot
Ziege-Anti-Kaninchen-HRP	sc	1:2000
Schaf-Anti-Maus-Ig-HRP	Amersham	1:5000
Ziege-Anti-Ratte-IgG-HRP	sc	1:4000

Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper. Aufgeführt sind Name, Hersteller-Firma sowie eingesetzte Konzentrationen in der Western-Blot-Analyse. HRP: Meerrettichperoxidase

2.1.8 siRNAs

Zielgen	Startposition	Zielsequenz (5'→3')	Referenz
Apaf-1	nt 978	AAU UGG UGC ACU UUU ACG UGA	Lassus et al. (2002)
Caspase-2	nt 94	AAA CAG CUG UUG AGC GAA	Lassus et al. (2002)
Caspase-3	nt 556	AAU GAC AUC UCG GUC UGG UAC	Wurzer et al. (2003)
Eg5	nt 1547	AAC UGG AUC GUA AGA AGG CAG	Weil et al. (2002)
Lamin A/C	nt 608	AAC UGG ACU UCC AGA AGA ACA	Elbashir et al. (2002)
Luciferase	nt 153	AAC GUA CGC GGA AUA CUU CGA	Elbashir et al. (2002)

Tabelle 8: Aufgeführt sind die verwendeten siRNAs gegen ausgewählte Gene, die Lokalisation der Zielsequenz (nt, Nukleotid), die entsprechende Zielsequenz sowie die Literaturreferenz.

Die siRNAs stammen von Dharmacon Research (über MWG Biotech; Service Option A4) und werden als 20 µM Stammlösung nach Angaben des Herstellers angesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C sowie einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Zweimal wöchentlich wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS gespült und zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben. Je nach Zellart erfolgte nach 1-3 minütiger Inkubation bei 37°C durch Zugabe von Medium die Inaktivierung des Trypsins. Zellen, Trypsin und Medium wurden in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Daraus wurde je nach Zellart und Verdünnung die entsprechende Menge in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium pipettiert.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Neubauer-Hämozytometer. Es wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 90 µl Trypan-Blau verdünnt. Trypan-Blau kann nur in Zellen mit stark geschädigter Zellmembran diffundieren, färbt also nur tote Zellen blau an.

Alle lebenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel rechnerisch ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl in } 4 \text{ Großquadranten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3 WST-1-Test

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgte mit Hilfe des WST-1-Tests. Dieser Test basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST-1 zu Formazan durch ein mitochondriales Enzym der Atmungskette, die Succinat-Tetrazolium-Reduktase. Diese Reduktion findet nur in lebenden Zellen statt, so dass die Quantität dieser Reaktion in einem proportionalen Verhältnis zu der Zahl der stoffwechselaktiven Zellen in der Probe steht. Optisch lässt sich ein Farbumschlag des Tetrazoliumsalzes in den Formazan-Farbstoff beobachten. Die Menge des gebildeten Formazans kann photometrisch bestimmt werden.

Durchführung

5×10^3 – 1×10^4 Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, die im Folgenden als 96-Well-Platten bezeichnet sind, ausgesät (100 µl/Vertiefung) und nach 24 Stunden mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden in jedes Well 10 µl WST-1-Reagenz gegeben und 90 Minuten bis 3 Stunden später die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 690 nm) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Als Leerwert [Blank] wurde eine Kontrollprobe mit den gleichen Volumina an Kulturmedium und WST-1-Reagenz jedoch ohne Zellen verwendet.

2.2.4 Cell Proliferation ELISA BrdU

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Zellen wurde der colorimetrische BrdU-Cell-Proliferation-ELISA von Roche eingesetzt. Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, welches spezifisch während der DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird. Durch monoklonale Antikörper gegen BrdU können Zellen identifiziert werden, in deren DNA BrdU eingebaut wurde, und somit die DNA-Syntheserate bestimmt werden.

Durchführung

Die Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und nicht bzw. mit der entsprechenden siRNA transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 µM BrdU (Kit) unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Platten nach Beschreibung des Herstellers mit 200 µl/Well FixDenat (Kit) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, dann mit 100 µl/Well Anti-BrdU-POD (Kit) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte ausgeschlagen und 3x mit 200 µl PBS/Well gewaschen und bis zur gewünschten Farbentwicklung mit 100 µl/Well Substratlösung (Tetramethylbenzidin, Kit) inkubiert. Danach wurde der Farbumschlag in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405nm gegen eine Referenzlänge von 490nm gemessen. Für jeden Wert wurden mindestens 3 Versuchsansätze zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden.

2.2.5 Apoptose-ELISA

Wird in einer Zelle die Apoptose eingeleitet, so wird die DNA durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen gespalten. Diese Fragmentierung beginnt an den Linker-Regionen zwischen den Nucleosomen, also dem Teil der Doppelstrang-DNA, der nicht mit Histonen komplexiert ist. Die DNA-Abschnitte, die mit Core-Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) komplexiert sind, werden hierdurch vor der Spaltung durch Endonukleasen geschützt. Dadurch ist es möglich, dass sich Mono- und Oligonucleosomen im Zytoplasma von apoptotischen Zellen anreichern.

Mit dem „Cell Death Detection“-ELISA^{PLUS}, einem Sandwich-Enzym-Immunoassay, lassen sich die einzelnen Fragmente nachweisen:

Ein Anti-Histon-Biotin-Antikörper bindet sich an die Histon-Komponente der vorhandenen Nucleosomen, gleichzeitig wird der Immunkomplex über Biotin an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte fixiert. Zusätzlich bindet sich ein Peroxidase-gekoppelter Anti-DNA-Antikörper an die DNA-Komponente der Nucleosomen. Mit der Zugabe von ABTS als Substrat kann der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase photometrisch bestimmt werden.

Durchführung

Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Mikrotiterplatte mit den entsprechend ausgesäten und behandelten Zellen wurde für 10 Minuten bei 1250 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nach Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer pro Well wurde die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 15 Minuten bei 1250 x g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und in ein Eppendorf-Cup transferiert.

20 µl dieses Zelllysats wurden in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und mit 80 µl des unmittelbar vor Gebrauch angesetzten Immunreagenz versetzt (18/20 Vol. Inkubationspuffer, 1/20 Vol. Anti-Histon-Biotin-Antikörper, 1/20 Vol. Anti-DNA-POD) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung abgesaugt und jedes Well der Mikrotiterplatte dreimal mit je 200 µl Inkubationspuffer gewaschen, um ungebundene Komponenten zu entfernen. In jeden Ansatz

wurden 100 µl der ABTS-Lösung pipettiert und nach 10 minütiger Inkubation die Absorption bei 405 nm (Referenzfilter 490 nm) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism®.

2.2.6 Präparation von Gesamtzellextrakten

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis.

Nach Überführung des Zellmediums aus der Gewebekulturflasche in ein Falcon-Röhrchen, wurden die adhärennten Zellen mittels eines Zellschabers und einer entsprechenden Menge PBS vom Boden der Kulturflasche gelöst und zusammen mit dem bereits entfernten Medium 10 Minuten bei 650 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut 10 Minuten bei 650 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Zelllysispuffer resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde in einer Tischzentrifuge 30 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die Lysate wurden abgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.7 Proteinbestimmung

Mit Hilfe des BCA (Bicinchoninic Acid)-Protein-Assays, der auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in alkalischem Medium und der anschließenden Detektion durch ein BCA enthaltendes Reagenz basiert, wurde der Proteingehalt von Zelllysaten in einem Dreifachansatz bestimmt. Es bildete sich ein farbiger Komplex, der aus einem Cu^+ und zwei Molekülen BCA bestand und ein Absorptionsmaximum bei 526 nm aufwies. Die Intensität der Färbung stieg proportional zur Proteinkonzentration der Probe in einem Bereich von 20 bis 2000 µg/ml Protein an. Aus der gemessenen Absorption lässt sich der Proteingehalt der Probe durch Vergleich der Absorptionswerte mit einer Standardkurve ermitteln.

Durchführung

Nach Verdünnung der Zelllysate mit Lysispuffer im Verhältnis 1:20 wurden zu 100 µl jeder Probe je 2 ml BCA-Arbeitslösung gegeben. Die Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch aus Reagenz A und Reagenz B (Bestandteile des BCA Protein Assay Kit) in einem

Verhältnis von 1:50 hergestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37°C, danach die Messung der Absorption bei 562 nm. Referenzproben mit Rinderserumalbumin (125 bis 1500 µg/ml) für die Ermittlung der Standardkurve wurden parallel zu den Proben angesetzt und wie diese behandelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 3.0.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine wurden je nach deren Größe 8%ige bis 15%ige Trenngele verwendet, die wie in Tabelle 1 angegeben, hergestellt wurden.

Zur Polymerisation wurde die Gellösung zwischen zwei Glasplatten, die vorher gründlich mit Ethanol gereinigt und mit einer Gummidichtung und Klammern zusammengesetzt wurden, gegossen. Anschließend wurde mit Aqua dest. überschichtet, welches nach Abschluss des Polymerisationsvorgangs wieder entfernt wurde. Im weiteren Verlauf erfolgte das Gießen des 5%igen Kammgels, das wie in Tabelle 1 beschrieben, hergestellt wurde. Nachdem das Trenngel mit dieser Kammgellösung überschichtet wurde, erfolgte das Einsetzen eines Probenkamms für die Bildung der Geltaschen. Nach der Polymerisation wurden die Gele, nach Entfernen der Gummidichtung, in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt. Unter Puffer wurde der Probenkamm herausgezogen und die so entstandenen Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Gleiche Proteinmengen wurden auf gleiches Volumen gebracht, mit ¼ Vol. Ladepuffer (4x Roti-load) versetzt, für 5 Minuten bei 100°C gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Nun wurde die jeweils erforderliche Menge der Proben in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Diese erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 60 V, danach bei 130 V bis die Bromphenolblaufront das Gel durchlaufen hatte.

2.2.9 Western-Blot-Analyse

Mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot-Apparatur wurden die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert.

Vorbereitend wurden die Membran sowie das Filterpapier auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 2 Sekunden in Methanol, anschließend für 2 Minuten in Aqua dest. getaucht und danach für 15 Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Das

Polyacrylamid-Gel sowie das Filterpapier wurden ebenfalls für 15 Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Auf der Anodenplatte der Transfer-Apparatur wurden drei Lagen Filterpapier, die PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und erneut drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte, erfolgte der Transfer bei 0.8 mA pro cm² Gel für 60 Minuten. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in Blockpuffer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, womit die unspezifischen Bindungsstellen blockiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörper-Puffer über Nacht bei 4°C. Durch dreimaliges Spülen mit Waschpuffer für jeweils 7 Minuten wurden ungebundene Antikörper entfernt und die Membran anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Es folgten drei weitere Waschgänge mit Waschpuffer für je 15 Minuten. Danach wurde die Membran für 1 Minute in ECL-Reagenz (0.125 µl / cm²) getaucht, welches nach Angaben des Herstellers aus den ECL-Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 kurz vor Gebrauch angesetzt wurde.

Die Menge der gebundenen Antikörper ließ sich nun auf einem Röntgenfilm detektieren.

Um den Einsatz gleicher Proteinmengen sicherzustellen, wurde die Membran nach dem Transfer mit Ponceau S gefärbt oder zur Quantifizierung nach der Chemilumineszenz-Reaktion für 10 Minuten bei 60°C mit 10 ml Abschmelzlösung behandelt, zweimal für 10 Minuten mit Waschpuffer gespült und mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

2.2.10 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Methode wurde mit siRNAs gegen Eg5, Lamin A/C und Luciferase (siehe 4.1) etabliert und ist Gegenstand dieser Arbeit.

In 24-Well-Mikrotiterplatten wurde eine definierte Zahl an Gliomzellen in 500 µl Medium mit FCS, aber ohne Antibiotika, ausgesät. 24 Stunden später, bei 30-40% Konfluenz der Zellen, wurden sie mit unterschiedlichen Mengen chemisch synthetisierter siRNA und Oligofectamin (siehe Ergebnisse) in serumreduziertem Medium (Opti-MEM1) transfiziert. Nach 6 Stunden wurde die Transfektionslösung entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gespült und mit 500 µl Vollmedium inkubiert. 72 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Zugabe von 50 µl 95°C heißem SDS-Probenpuffer lysiert.

Das Ausmaß der Herunterregulation wurde in einer Western-Blot-Analyse bestimmt (hierzu wurden jeweils 20 µl der oben erhaltenen Extrakte eingesetzt).

Die Western-Blot-Analysen wurden mindestens zweimal mit zwei unabhängig voneinander präparierten Proteinextrakten durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Interferenzmethode in humanen Glioblastomzelllinien

3.1.1 RNA-Interferenz ist in Glioblastomzellen möglich

Um zu zeigen, dass humane Glioblastomzellen zu RNA-Interferenz in der Lage sind, wurden die Zelllinien A172 und U373MG mit einer Eg5-spezifischen siRNA transfiziert. Diese siRNA zielt auf die mRNA des Kinesins Eg5. Eine erfolgreiche Transfektion und Herunterregulation des Gens („knock down“) zeigt sich darin, dass die Zellen die Apoptose einleiten (Weil et al. 2002). Optisch lässt sich dieser Prozess sehr leicht durch das Ablösen der transfizierten Zellen vom Boden der Mikrotiter-Platte (MTP) erkennen.

Dazu wurden A172-Zellen und U373MG-Zellen mit Eg5-siRNA nach Angaben des Herstellers transfiziert (siehe Material und Methoden). Bereits 24 Stunden später zeigte sich der erfolgreiche Transfer und die Herunterregulation der Eg5-mRNA darin, dass sich die transfizierten Zellen, im Gegensatz zu den nicht transfizierten, vom Untergrund der MTP ablösten und ein typisch apoptotisches Erscheinungsbild (Zellen werden kugelförmig, Bläschenbildung, Abschnürung kleiner Vesikel) aufwiesen. Die Abbildungen 5a und b zeigen das mikroskopische Bild dieses Prozesses.

A172

Abbildung 5a

U373MG

Abbildung 5b

Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) von (a) A172- bzw. (b) U373MG-Zellen, unbehandelt und nach Transfektion mit Eg5-spezifischer siRNA.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Methode der RNA-Interferenz auch in humanen Glioblastomzellen anwenden lässt.

3.1.2 Optimierung der RNA-Interferenztechnik am Beispiel von Lamin

Die Etablierung der RNA-Interferenz-Methode erfolgte mit Hilfe einer siRNA gegen die mRNA von Lamin, einem wichtigen Protein des Zytoskeletts. Folgende Parameter mussten optimiert werden: Zellzahl, Konzentration der verwendeten siRNA sowie die Konzentration des verwendeten Transfektionsreagenzes, Oligofectamin (OFA). Als Modellsystem dienten A172-, U118MG- und U373MG-Glioblastomzellen.

3.1.2.1 Optimierung der Zellzahl

Für eine erfolgreiche Transfektion mit Oligofectamin (OFA) sollen die Zellen, nach Herstellerangaben, 30 – 50% konfluent sein. Zur Optimierung der Zellzahl wurden deshalb $1 - 5 \times 10^4$ A172-, U373MG- und U118MG-Zellen in eine 24-well-Platte in 500 μ l Medium ohne Antibiotika ausgesät und nach 24 Stunden transfiziert. Nach 6 Stunden wurde der Transfektionsansatz entfernt und nach Waschen der Zellen mit PBS durch Vollmedium ersetzt.

72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, lysiert und in einer Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Abbildungen 6a - c

zeigen, dass der stärkste „knock down“ bei einer Zellzahl von 2×10^4 A172-Zellen („knock down“ auf 44,5%) (Abb. 6a), 1×10^4 U373MG-Zellen („knock down“ auf 9%) (Abb. 6b) und 3×10^4 U118MG-Zellen („knock down“ auf 37%) (Abb. 6c) erreicht wurde. Diese optimierten Zellzahlen wurden dann in den folgenden Untersuchungen eingesetzt.

Abbildung 6a

Abbildung 6b

Abbildung 6c

Abbildung 6: $1 - 5 \times 10^4$ A172- (a), U373MG- (b) und U118MG-Zellen (c) wurden mit einer Lamin-spezifischen siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und in einer Western-Blot-Analyse mit einem Lamin-spezifischen Antikörper untersucht. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

3.1.2.2 Optimierung der siRNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Lamin-siRNA-Konzentration, bei der das Ausmaß des „knock down“ am größten ist, wurden A172-Zellen mit der optimierten Zellzahl in einer 24-well-Platte in 500 μ l Medium ohne Antibiotika ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat, erfolgte die Transfektion mit 62,5 nM, 125 nM und 250 nM siRNA und 3 μ l OFA. Die Analyse des „knock down“ erfolgte wie oben beschrieben mittels Western-Blot-Analyse (Abb. 7).

Abbildung 7: 2×10^4 A172-Zellen wurden mit 62,5 nM, 125 nM und 250 nM Lamin-siRNA transfiziert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-). 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Lamin-spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

Abbildung 7 zeigt, dass die effektivste Herunterregulation von Lamin bei einer Konzentration von 125 nM Lamin-siRNA erreicht wird („knock down“ auf 28,8% bei A172-Zellen).

3.1.2.3 Optimierung der Konzentration an Oligofectamin

Um die Konzentration an Oligofectamin (OFA) zu bestimmen, bei der die besten „knock down“-Ergebnisse erreicht werden, wurden 2×10^4 A172-Zellen mit 125 nM Lamin-siRNA und 1,5 μ l, 3 μ l und 4,5 μ l OFA transfiziert. Die Ergebnisse des erreichten „knock down“ sind in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: 2×10^4 A172-Zellen wurden mit je 125 nM Lamin-spezifischer siRNA und 1,5 μ l, 3 μ l und 4,5 μ l OFA transfiziert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen (-). 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Lamin-spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert. Gezeigt ist die Analyse für zwei verschiedene Transfektionsansätze.

Abbildung 8 zeigt, dass in A172-Zellen die effektivste Herunterregulation von Lamin bei einer Oligofectamin-Konzentration von 3 μ l erreicht wird („knock down“ auf 4,2 - 27,8%).

3.1.2.4 Optimierte Versuchsbedingungen der RNA-Interferenztechnik

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zur Optimierung der RNA-Interferenztechnik in Glioblastomzelllinien (Abb. 6-8) zeigten, dass der effektivste „knock down“ unter folgenden Versuchsbedingungen erzielt werden konnte (Tabelle 9).

Zelllinie	A172	U373MG	U118MG
Zellzahl	2×10^4	1×10^4	3×10^4
siRNA-Konzentration [nM]	125	125	125
Oligofectamin [µl]	3	3	3

Tabelle 9: Optimierte Transfektionsbedingungen für die RNA-Interferenztechnik in den Zelllinien A172, U373MG und U118MG.

Unter diesen optimierten Versuchsbedingungen wurden die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt.

3.1.2.5 Nachweis der Spezifität des beobachteten Lamin „knock down“

Zum Beweis, dass die in den Western-Blot-Analysen beobachtete Herunterregulation von Lamin (Abb. 6-8) ein spezifischer Effekt der entsprechenden Lamin-siRNA ist, wurden, neben unbehandelten Zellen, als weitere Negativkontrolle auch Zellen untersucht, die mit einer siRNA gegen Luciferase transfiziert worden waren. Luciferase ist ein Enzym, welches sich nur im Glühwürmchen findet, eine Luciferase-siRNA sollte bei humanen Glioblastomzellen somit keine spezifischen Veränderungen hervorrufen.

A172-Zellen bzw. U373MG-Zellen wurden unter optimierten Bedingungen (s. Tabelle 9) mit einer spezifischen siRNA gegen Lamin bzw. Luciferase transfiziert und das Ausmaß der Herunterregulation der Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse bestimmt. In den Abbildungen 9a und b zeigt sich, dass die Herunterregulation von Lamin ein spezifischer Effekt der Lamin-siRNA ist, da das Laminsignal nicht durch eine unspezifische siRNA, hier gegen Luciferase, beeinflusst wurde. Lamin konnte in A172-Zellen auf 5-10%, in U373MG-Zellen auf 40% herunterreguliert werden.

Abbildung 9a

Abbildung 9b

Abbildung 9: (a) A172 und (b) U373MG-Zellen, wurden mit Lamin-siRNA und Luciferase-siRNA (Luci) transfiziert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-). 72 h nach der Transfektion wurden Proteinextrakte hergestellt und die Expression des Lamins mittels spezifischem Antikörper durch Western-Blot-Analyse untersucht. Der eingesetzte Antikörper erkennt die Varianten Lamin A und C. Zum Nachweis, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wurde die Membran abgeschmolzen und mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

3.2 Validierung der RNA-Interferenztechnik am Beispiel wichtiger Apoptoseproteine

Erste Versuche unserer Arbeitsgruppe zum Mechanismus der ErPC-induzierten Apoptose deuteten darauf hin, dass die ErPC-Wirkung über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird (Kugler et al. 2002). Durch den Einsatz spezifischer siRNA-Moleküle gegen wichtige Moleküle dieses Signalweges sollte deren Bedeutung für die ErPC-induzierte Apoptose untermauert werden.

3.2.1 Effekte eines „knock down“ von Apaf-1, Caspase-2 und Caspase-3 auf Morphologie, Vitalität und Proliferation

Zunächst wurde der Einfluss der spezifischen siRNAs auf die Morphologie, Vitalität und Proliferation der Glioblastomzellen untersucht.

Bei Zellen, die mit siRNA transfiziert wurden, konnte eine Änderung des Phänotyps beobachtet werden. So zeigte sich bei A172-Zellen, die mit Caspase-3-spezifischer siRNA transfiziert worden waren, ein Stillstand in der Proliferation, einige Zellen lösten sich vom Untergrund der Mikrotiterplatte ab. Sie hatten ein meist spindelförmiges Aussehen und

zeigten kleinere Ausläufer im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Weitaus schwächer war dieser Effekt nach Transfektion mit einer spezifischen siRNA gegen Apaf-1 und Caspase-2 (Abbildungen 10a-d) zu beobachten.

Diese Beobachtungen deuteten auf einen möglichen, wenn auch unterschiedlich ausgeprägten, toxischen Effekt der verwendeten siRNAs auf die untersuchten Zellen hin.

Abbildung 10a) unbehandelt

b) + Caspase-3 siRNA

c) + Apaf-1 siRNA

d) + Caspase-2 siRNA

Abbildung 10: Phasenkontrastaufnahme unbehandelter (a) und mit spezifischer siRNA gegen Caspase-3 (b), Apaf-1 (c) und Caspase-2 (d) transfizierter A172-Zellen. Die Aufnahmen wurden 24 h nach Transfektion der Zellen mit 250 nM spezifischer siRNA gemacht.

(Entsprechende Vorversuche haben gezeigt, dass bei Transfektion von A172-Zellen mit spezifischer siRNA gegen Caspase-3 die optimale Menge bei 250 nM liegt. Um vergleichen zu können, wurden gleiche Mengen aller drei siRNAs eingesetzt.)

Die Analyse der Vitalität erfolgte mit Hilfe des WST-1-Tests. Untersucht wurden unbehandelte A172-Zellen und Zellen, die mit spezifischer siRNA gegen Caspase-2, Caspase-3 und Apaf-1 transfiziert worden waren.

Abbildung 11: Vitalitätsbestimmung unbehandelter A172-Zellen und mit siRNA gegen Apaf-1, Caspase-2 und Caspase-3 transfizierter Zellen mit Hilfe des WST-1-Tests. Dieser wurde 72 h nach Transfektion mit der jeweiligen siRNA (250 nM) durchgeführt. Die Messung wurde in mindestens drei unabhängigen Versuchen jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD.

Abbildung 11 zeigt, dass Zellen, die mit Caspase-3 siRNA transfiziert worden waren, eine auf 45% reduzierte Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen aufwiesen. Dagegen waren nach Transfektion mit einer siRNA gegen Caspase-2 83% der A172-Zellen vital und 78% nach Transfektion mit einer siRNA gegen Apaf-1.

Um zwischen zytotoxischen und zytostatischen Effekten des Fehlens von Caspase-3-Protein zu unterscheiden, wurde in A172-Zellen die DNA-Syntheserate mit Hilfe eines kolorimetrischen Kits bestimmt. Dabei ist die Absorption bei 450 nm (A_{450nm}) ein Maß für die DNA-Synthese-abhängige Einbaurate von BrdU, d.h. für die Proliferation. Verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen, zeigten A172-Zellen, in denen Caspase-3 herunterreguliert war, eine DNA-Syntheserate von 44%. Einen geringeren Einfluss auf den BrdU-Einbau ließ sich bei Zellen nachweisen, die mit siRNA gegen Apaf-1 (71%) und Caspase-2 (80%) transfiziert worden waren (Abbildung 12).

Abbildung 12: Messung der DNA-Syntheserate in A172-Zellen, die mit spezifischer siRNA gegen Apaf-1, Caspase-2 und Caspase-3 transfiziert wurden, mit Hilfe des "Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric assay". Die Messung wurde in drei unabhängigen Versuchen jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD.

Anhand der Phasenkontrastaufnahmen und des WST-1-Tests zeigte sich, dass die Vitalität der untersuchten Zellen durch das Verfahren der RNA-Interferenztechnik vermindert wurde. Weiterhin konnte eine verminderte Zellproliferation beobachtet werden. Das Ausmaß der jeweiligen Reduktion ist abhängig von der eingesetzten siRNA.

3.2.2 Einfluss auf die Proteinexpression

3.2.2.1 Einfluss einer Apaf-1-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression

A172-Zellen und U373MG-Zellen wurden mit der optimalen Zellzahl ausgesät (s. Tabelle 9) und 24 Stunden später mit einer Apaf-1-spezifischen siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Apaf-1-spezifischen Antikörpers. Das Ergebnis des erreichten „knock down“ ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13a

Abbildung 13 b

Abbildung 13: Herrunterregulation der Apaf-1-Proteinexpression. A172- (a) und U373MG-Zellen (b) wurden mit 125 nM und 250 nM Apaf-1-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-) und Zellen, die mit 125 nM Luciferase-spezifischer siRNA (Luci) transfiziert wurden. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Apaf-1-spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert. In U373MG-Zellen ist die Analyse für zwei verschiedene Transfektionsansätze gezeigt.

Bei einer Konzentration der Apaf-1-spezifischen siRNA von 125 nM zeigte sich die maximale Herunterregulation der Apaf-1-Proteinexpression in beiden Zelllinien (auf 8 bis 24%). Mit 250 nM siRNA konnte die Apaf-1-Expression auf 26 bis 32% herunterreguliert werden.

3.2.2.2 Einfluss einer Caspase-3-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression

A172-Zellen sowie U373MG-Zellen wurden entsprechend ihrer optimalen Zellzahl ausgesät (s. Tabelle 9) und nach 24 Stunden mit Caspase-3-spezifischer siRNA transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zellernte. Das Ausmaß der Herunterregulation wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse bestimmt und ist in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14a

Abbildung 14b

Abbildung 14: A172- (a) und U373MG-Zellen (b) wurden mit 250 nM Caspase-3-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-) und Zellen, die mit 250 nM Luciferase siRNA (Luci) transfiziert wurden. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Caspase-3-spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

Es konnte eine Herunterregulation der Caspase-3-Expression auf ca. 30% bei A172-Zellen und auf ca. 50% bei U373MG-Zellen beobachtet werden.

3.2.2.3 Einfluss einer Caspase-2-spezifischen siRNA auf die Proteinexpression

A172-Zellen und U118MG-Zellen wurden entsprechend der optimalen Zellzahl ausgesät (s. Tabelle 9). 24 Stunden nach der Aussaat erfolgte die Transfektion mit einer Caspase-2-spezifischen siRNA. 72 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zellernte. Das Ausmaß der Herunterregulation wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 15).

Abbildung 15a

Abbildung 15b

Abbildung 15: A172- (a) und U118MG-Zellen (b) wurden mit 62,5 nM, 125 nM und 250 nM Caspase-2-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-) und Zellen, die mit 125 nM Luciferase-spezifischer siRNA (Luci) transfiziert wurden. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines Caspase-2-spezifischen Antikörpers. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen Aktin rehybridisiert.

Bei einer Konzentration der Caspase-2-siRNA von 250 nM zeigten sich die besten Ergebnisse in Bezug auf die Herunterregulation. Die Proteinexpression von Caspase-2 wurde auf ca. 20% in A172-Zellen und auf ca. 30% in U118-Zellen herunterreguliert.

3.2.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.2

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz spezifischer siRNAs in verschiedenen Glioblastomzelllinien zu einer Herunterregulation der entsprechenden Proteinexpression führt. So konnte die Proteinexpression von Apaf-1 auf 8-33%, von Caspase-3 auf 30-50% und von Caspase-2 auf 20-30% in den untersuchten Zelllinien herunterreguliert werden.

3.2.3 ErPC-induzierte Apoptose in Abwesenheit essentieller Apoptose-Gene

Um die funktionelle Bedeutung des „knock down“ von Caspase-3 und Apaf-1 auf die ErPC-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden im folgenden A172-Zellen mit spezifischen siRNAs gegen Caspase-3 und Apaf-1 transfiziert, anschließend mit ErPC behandelt und im Weiteren das Ausmaß der Apoptose untersucht.

3.2.3.1 Bedeutung der Caspase-3 für die ErPC-induzierte Apoptose

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Caspase-3-Proteins durch die entsprechende siRNA herunterreguliert werden kann (siehe Abbildung 14). Wenn Caspase-3 in einer Zelle fehlt, so müsste durch den Verlust dieser Effektorcaspase der Ablauf der Apoptose gestört sein. Zur Überprüfung, welchen Effekt dies auf die ErPC-induzierte Apoptose hat, wurden A172-Zellen mit Caspase-3-siRNA transfiziert und nach 72 Stunden mit ErPC behandelt. 24 Stunden nach ErPC-Zugabe wurde das Ausmaß der Apoptose, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Hilfe eines Apoptose-ELISAs bestimmt (Abbildung 16).

Abbildung 16: Apoptose-ELISA mit A172-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Caspase-3-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert und anschließend für 24 h mit ErPC behandelt worden waren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

In A172-Zellen, die mit Caspase-3-siRNA transfiziert worden waren, wurde das Ausmaß der durch ErPC ausgelösten Apoptose auf 38-50% im Vergleich zu den nicht transfizierten, nur mit ErPC behandelten Zellen reduziert. Dieser Effekt ist nicht auf unspezifische Effekte, z.B. den Transfektionsvorgang, zurückzuführen, da bei Zellen, die mit Luciferase-siRNA transfiziert worden waren, weder ein Einfluß auf die Expression von Caspase-3 (Abbildung 14) noch auf die Apoptose beobachtet wurde (Abbildung 16). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Caspase-3 eine wesentliche Rolle im Ablauf der ErPC-vermittelten Apoptose spielt.

3.2.3.2 Bedeutung von Apaf-1 für die ErPC-induzierte Apoptose

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression des Apaf-1-Proteins durch die entsprechende siRNA herunterreguliert werden kann (Abbildung 13). Fehlt Apaf-1 in einer Zelle, so müsste auch hier der Ablauf der Apoptose, genauer, die Aktivierung von Caspasen über den mitochondrialen Weg, gestört sein. Um zu überprüfen, welchen Effekt dies auf die ErPC-induzierte Apoptose hat, wurden A172-Zellen mit Apaf-1-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 Stunden mit ErPC behandelt. 24 Stunden nach ErPC-Zugabe wurde das Ausmaß der Apoptose mit Hilfe des Apoptose-ELISAs bestimmt (Abbildung 17).

Abbildung 17: Apoptose-ELISA mit A172-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Apaf-1-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert und anschließend für 24 h mit ErPC behandelt worden waren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

In A172-Zellen, die mit Apaf-1 siRNA transfiziert worden waren, wurde das Ausmaß der durch ErPC ausgelösten Apoptose auf 17 - 33% im Vergleich zu den nicht transfizierten, nur mit ErPC behandelten Zellen reduziert. Ähnliche Ergebnisse wurden für U118MG-Zellen beobachtet (Abbildung 18).

Abbildung 18: Apoptose-ELISA mit U118MG-Zellen, die nicht bzw. für 72 h mit Apaf-1-siRNA oder Luciferase-siRNA transfiziert und anschließend für 24 h mit ErPC behandelt worden waren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

3.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.3

In den untersuchten Glioblastomzelllinien konnte die Proteinexpression von Caspase-3 bzw. Apaf-1 durch entsprechende spezifische siRNAs herunterreguliert werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von ErPC, um die Apoptose zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Apoptose in Zellen, in denen Caspase-3 herunterreguliert wurde, nur 38-50% im Vergleich zu nicht transfizierten, nur mit ErPC behandelten Zellen betrug. Für Apaf-1 betrug dieser Wert 17-33%. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Caspase-3 und Apaf-1 eine wesentliche Rolle im Ablauf der ErPC-induzierten Apoptose spielen.

4. Diskussion

4.1. Induktion von RNA-Interferenz (RNAi)

Der Begriff RNAi wurde 1998 von den späteren Nobelpreisträgern für Medizin 2006, Andrew Fire und Craig Mello, geprägt (Fire et al. 1998). Im Grunde handelt es sich bei der Methode der RNA-Interferenz um einen natürlich vorkommenden, evolutionär konservierten, hoch effizienten und spezifischen Signalweg, bei dem kurze doppelsträngige (ds) RNAs die Genexpression inhibieren (Kim und Rossi 2007). Diese dsRNAs werden typischerweise im Zellkern als lange primäre miRNAs oder pri-miRNAs exprimiert, die dann in kürzere, sogenannte pre-miRNAs gespalten werden. Mit Hilfe von Exportin-5 werden die pre-miRNAs dann ins Zytoplasma exportiert, wo sie vom Enzym Dicer in ~22nt-lange miRNAs mit charakteristischen, 2nt-langen Überhängen am 3'-Ende gespalten werden. Der antisense-Strang der miRNA wird daraufhin in einen Enzymkomplex, RISC (*RNA-induced silencing complex*), eingebaut, wodurch er in die Lage versetzt wird, sich an seine Ziel-mRNA zu binden. Dadurch kommt es zu einer Spaltung der Ziel-mRNA durch Endonukleasen. Ergebnis ist ein sogenanntes *post-transcriptional gene silencing* der Expression des betroffenen Gens. Allerdings ist diese Zielbindung ziemlich unspezifisch, wodurch sich jede miRNA an eine Vielzahl von Genen binden kann.

Der Gruppe um Thomas Tuschl gelang es zu zeigen, dass durch die direkte Transfektion kurzer synthetischer, ~21 nt-langer dsRNAs, sog. *small interfering RNAs* (siRNAs), in Säugerzellen eine effiziente Herunterregulation der Genexpression erzielt werden kann (Elbashir et al. 2001). Diese siRNAs entsprechen den Spaltprodukten der Dicer-Reaktion. Im Gegensatz zu den pri-miRNAs weisen die siRNAs, da synthetisch, eine 100%ige Sequenzkomplementarität zur Ziel-mRNA auf. Solche synthetisch hergestellten siRNAs sind zwar meist einfach zu transfizieren und sehr effektiv, allerdings wird die RNA-Interferenz meist nur vorübergehend ausgelöst.

Wenig später konnten dann verschiedenen Gruppen zeigen, dass siRNAs nicht nur exogen appliziert, sondern auch intrazellulär von Genexpressionskassetten, die sich auf viralen Vektoren oder Plasmiden befinden, exprimiert werden können (Brummelkamp et al. 2002; Rossi 2008). Diese shRNA-Plasmide exprimieren eine kurze doppelsträngige *short hairpin-RNA* (shRNA), die frühere Zwischenstufen der zellulären miRNAs imitieren. Als solche

werden sie von Dicer gespalten und es entstehen siRNA-Duplexe. Durch diesen Ansatz ist es möglich, die siRNA-Spiegel länger und stabiler aufrecht zu erhalten und darüber hinaus durch die Wahl geeigneter Promotoren eine zusätzliche Regulationsebene einzuführen.

4.2.1 Bedeutung essentieller Moleküle des mitochondrialen Signalwegs für die ErPC-induzierte Apoptose

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Einsatz spezifischer, synthetischer, 21nt-langer siRNAs, analog zum Ansatz der Tuschl-Gruppe (Elbashir et al. 2001), die Bedeutung einzelner Moleküle des mitochondrialen Signalwegs für die ErPC-induzierte Apoptose in humanen Glioblastomzelllinien untersucht. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, dass die ErPC-induzierte Apoptose über diesen Signalweg vermittelt wird (Kugler et al. 2002).

In einem ersten Schritt konnte nach dem Einsatz einer spezifischen siRNA gegen das Kinesin Eg5 (Weil et al. 2002) mit Hilfe eines einfachen morphologischen Tests gezeigt werden, dass die Methode der RNA-Interferenz auch in humanen Glioblastomzellen anwendbar ist (siehe Abb. 5). Die anschließende Etablierung der RNA-Interferenz-Methode am Modell humaner Glioblastomzellen erfolgte mit Hilfe einer spezifischen siRNA gegen die mRNA von Lamin A/C, einem wichtigen Protein des Zytoskeletts. Dabei wurden die Zellzahl, Konzentration der verwendeten siRNA sowie die Konzentration des verwendeten Transfektionsreagenzes, hier Oligofectamin, für eine erfolgreiche Transfektion in den Zelllinien A172, U373MG und U118MG optimiert (siehe Abb. 6-8; Tabelle 9). Die Spezifität der eingesetzten siRNA wurde in einem Parallelansatz durch Transfektion der entsprechenden Glioblastomzellen mit einer Kontroll-siRNA gegen Luciferase und anschließender Messung der Laminexpression mittels Western-Blot-Analyse bestätigt (siehe Abb. 9). Damit gelang es, den an HeLa-Zellen gezeigten „knock down“ der Lamin-A/C-Expression (Elbashir et al. 2001) durch den Einsatz einer spezifischen siRNA auch für Glioblastomzellen nachzuweisen.

Die so optimierten Versuchsbedingungen wurden dann in einem zweiten Schritt zur Validierung der RNA-Interferenztechnik an apoptoserelevanten Genen eingesetzt. Ausgewählt wurden essentielle Gene / Proteine des mitochondrialen Signalwegs, Apaf-1, Caspase-3 und -2.

Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) ist ein wichtiges Effektormolekül des mitochondrialen Apoptoseweges. Es bildet zusammen mit Zytochrom *c*, deoxyATP und Pro-

Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, eine Reaktionsplattform für die Zytochrom *c*-abhängige autokatalytische Aktivierung von Pro-Caspase-9 (Riedl und Salvesen 2007). Aktive Caspase-9 wiederum aktiviert die Effektorcaspase 3, daneben auch Caspase-6 und -7, welche die Apoptose einleiten. Zellen, denen Apaf-1 fehlt, können diesen Weg des programmierten Zelltods nicht vollziehen (Soengas et al. 2001).

Caspase-3 ist die zentrale Effektorcaspase schlechthin. Sie kann über den Todesrezeptor/-Todesligandenweg (Initiatorcaspase-8), aber auch über den mitochondrialen Signalweg (Initiatorcaspase-9) aktiviert werden. Sie selbst kann wiederum zur Aktivierung der Caspase-2 und -6 führen (Slee et al. 1999).

Caspase-2, obwohl evolutionär von allen Caspasen am stärksten konserviert, kann sowohl als Initiator- als auch als Effektorcaspase fungieren. Ihre genaue Stellung bzw. Rolle innerhalb apoptotischer Signalwege wird aber nach wie vor kontrovers diskutiert (Troy and Shelanski 2003). Dazu kommen Funktionen bei nicht-apoptotischen Prozessen wie der Zellzyklusregulation (Kumar 2009).

Durch den Einsatz spezifischer siRNAs gegen Apaf-1, Caspase-3 und Caspase-2 konnte in dieser Arbeit eine Herunterregulation der entsprechenden Proteinexpression in Glioblastomzellen gezeigt werden (Abb. 13-15). Wurde die Expression von Apaf-1 und Caspase-3 mittels siRNA herunterreguliert, so zeigte sich nach Zugabe von ErPC auch eine verminderte Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 16-18). Der „knock down“ führte somit auch zu funktionellen Konsequenzen. Somit konnte die wesentliche Rolle von Apaf-1 und Caspase-3 für den Ablauf der ErPC-induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Analoge Experimente mit Apaf-1-negativen Zellen (embryonale Fibroblasten der Maus; SKMel Melanomzellen) untermauerten die siRNA-Versuche in Glioblastomzellen (Daten hier nicht gezeigt). Ferner gelang es, die Ergebnisse mit der Caspase-3 spezifischen siRNA in Caspase-3-defizienten und -rekonstituierten MCF7-Brustkrebszelllinien zu bestätigen (Kugler et al. 2005).

Allerdings wurde nach Transfektion der spezifischen siRNAs, vor allem gegen Caspase-3, anhand der Phasenkontrastaufnahmen eine Veränderung des Phänotyps der Glioblastomzellen beobachtet (siehe Abb. 10). Dies könnte auf einen unterschiedlich stark ausgeprägten toxischen Effekt der verwendeten siRNA hindeuten. Weiterhin zeigte sich im WST-1-Test, dass sowohl die Vitalität als auch die Proliferation der untersuchten Zellen vermindert war (siehe Abb. 11 und 12), wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Neben einem möglichen toxischen Effekt der verwendeten siRNA hat vermutlich gerade Caspase-3 noch eine /

mehrere essentielle Rolle(n) außerhalb der Apoptose, die beim „knock down“ dann zur Reduktion der Vitalität und der Proliferation führen (D'Amelio et al. 2010).

4.3 *Off-target*-Effekte und wie man sie vermeiden kann

Obwohl die Technik der RNA-Interferenz auf große Resonanz stieß und ein großes Potential birgt, stellte man relativ schnell fest, dass diese Methode bei weitem nicht so zielspezifisch ist wie ursprünglich angenommen. Es gibt eine Reihe unspezifischer Effekte, sogenannte *off-target effects*, d.h. unspezifische Veränderungen der Genexpression, die auf die Applikation einer siRNA zurückzuführen sind, jedoch nicht spezifisch mit der zu supprimierenden Zielstruktur zusammenhängen (Sontheimer 2005). Vermeiden bzw. zumindest drastisch reduzieren lassen sich solche *off target*-Effekte durch Verbesserung der siRNA-Design-Algorithmen. Einer der neuesten Ansätze mit vielversprechenden Ergebnissen ist der Einsatz sog. *asymmetric interfering RNAs*, d.h. die Einführung einer Asymmetrie in den Duplexstrang und damit einer unterschiedlichen Thermostabilität und einer nur partiellen Komplementarität, z.B. einem 19nt-Strang mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende sowie einem 16 bp-Strang (Sano et al. 2008). Diese und andere Ergebnisse haben gezeigt, dass es an der Zeit ist, das Konzept, dass der siRNA-Duplex symmetrisch, perfekt komplementär und mindestens 19 bp lang sein muss, um einen effektiven knockdown zu erzielen, neu zu bewerten (Bramsen et al. 2007).

Zu der Erkenntnis der verminderten Spezifität der siRNAs kam deren z.T. substantielle Immunogenität. Zunächst ging man davon aus, daß siRNAs aufgrund ihrer Länge kein Ziel für die zelleigenen Sensoren langer dsRNA, z.B. Proteinkinase R (PKR), darstellen und somit keine Interferonantwort auslösen können (Elbashir et al. 2001, Caplen et al. 2001). Inzwischen gibt es jedoch Veröffentlichungen, die eine Aktivierung des Interferon-Systems beschreiben. Sledz und Mitarbeiter konnten zeigen, dass transfizierte siRNAs eine interferonvermittelte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges hervorrufen können (Sledz et al. 2003). Diese siRNAs wurden enzymatisch mit einem T7-RNA-Polymerase-System und RNase III-Verdau hergestellt. Zum Vergleich eingesetzte chemisch synthetisierte siRNAs zeigten ein entsprechendes Ergebnis. Eine Induktion der Interferonantwort konnte ebenfalls bei der Applikation von siRNAs beobachtet werden, die mit Hilfe lentiviraler Vektoren und Plasmiden endogen transkribiert worden waren (Persengiev et al. 2004). Interessanterweise wurde eine Induktion von Interferon-Zielgenen auch durch die Vektorkontrolle allein

ausgelöst (Bridge et al. 2003). In diesem Versuchsansatz lösten chemisch synthetisierte siRNAs keine unspezifische siRNA-Induktion aus. Inzwischen weiß man, dass sich eine Immunantwort durch eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Veränderungen oder Konjugate, z.B. der Einführung sog. *locked nucleic acids* (LNAs) oder 2' O-methyl ribonucleoside verhindern lässt (Behlke 2008).

Demgegenüber widerlegen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen eine Auslösung der Interferonantwort durch siRNAs (Scacheri et al. 2004). Rossi und Mitarbeiter zeigten, dass T7-RNA-Polymerase-abhängige siRNAs in verschiedenen Zellsystemen IFN α und IFN β induzieren können. Die für Transkripte aus T7-Systemen und Pol III-Promotoren typischen 5'-Triphosphate sind hiernach verantwortlich für die Interferonantwort. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die von Sledz und Mitarbeitern beobachtete Interferonantwort sein (Kim et al 2004), erklärt jedoch nicht das Ergebnis, das für chemisch synthetisierte siRNAs erhalten wurde.

Ein wichtiger Ansatz zur Vermeidung der Aktivierung des Interferonsystems ist ein entsprechendes Design der siRNA-Duplexe. Es wird berichtet, daß shRNAs mit den miRNAs intensiv um essentielle zelluläre Komponenten konkurrieren können (Grimm et al. 2006), wodurch es zur Übersättigung lebenswichtiger Kernexportmechanismen kommt. Bei Versuchstieren (Mäusen) führte dies sogar zu Todesfällen. Exogen applizierte siRNAs greifen erst später in den Mechanismus der (natürlichen) RNA-Interferenz ein, jedoch kann auch hier eine Interferenz mit der Prozessierung und Wirkung zellulärer RNAs nicht ausgeschlossen werden. Die Ansätze zur Vermeidung solcher Effekte reichen von der Verbesserung des genspezifischen inhibitorischen Potentials der siRNAs bis hin zur Vermeidung von vornehmlich von miRNAs rekrutierten Regulationswege. Neben der Interferonantwort spielt auch die Erkennung durch die sog. *toll-like-receptors*, TLR-3, -7 und -8, und die damit verbundene Aktivierung des antigen-spezifischen erworbenen Immunsystems eine Rolle (Schlee et al. 2007). Im Bezug auf das Auslösen einer Immunantwort ging man zum Zeitpunkt als die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde davon aus, dass kurze, d.h. ~21-23 nt lange siRNA-Duplexe eine solche Reaktion nicht hervorrufen.

Wie wichtig es ist, generell die Kapazität einer siRNA eine Immunantwort auslösen zu können mit in Betracht zu ziehen, zeigten zwei Publikationen äußerst eindrucksvoll. Kleinman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die antiangiogene Wirkung von siRNAs gegen VEGF(R) mehr allgemeinerer Natur war und letztendlich von TLR-3 ausgelöst wurde (Kleinman et al. 2008), während Robbins und Mitarbeiter nachwiesen, dass eine bestimmte GFP-Kontroll-siRNA immunstimulatorische Aktivität besitzt (Robbins et al. 2008). Ferner gelang durch den

Einsatz 2'-O-methyl ribonucleoside-modifizierter siRNAs der Nachweis, dass der antivirale Effekt der ursprünglichen, nicht modifizierten siRNAs auf deren immunstimulatorischer Wirkung beruhte, also primär das Ergebnis einer Immunantwort war.

Bereits kurz nach der initialen Publikation von Elbashir et al. 2001 wurde die Spezifität von siRNAs in Frage gestellt. Punktmutationen in untersuchten siRNAs bewirkten keine Veränderung der erreichten Gensuppression (Boutla et al., 2001). SiRNAs mit bis zu fünf Fehlbasenpaarungen am 5'-Ende und bis zu neun am 3'-Ende der siRNA konnten trotzdem die Spaltung der Zielsequenz vermitteln, wenn auch in einem schwächerem Ausmaß. Hat die siRNA oder shRNA eine große Homologie zu nicht-Ziel-mRNAs, so kann hierdurch die Inhibition dieser mRNA verursacht werden. Untersuchungen zeigten, dass siRNA und mRNA nur in elf aufeinanderfolgenden Basen übereinstimmen müssen, um eine Gensuppression auszulösen (Jackson et al., 2003). Um die oben genannten unspezifischen Effekte zu vermeiden, sollte die siRNA ihrer Ziel-mRNA so homolog wie möglich sein, wobei dieser Homologiebereich aber 11 bp nicht überschreiten und dabei Homologien zu anderen mRNAs weitestgehend vermeiden sollte.

Ein weiterer Grund für einen *off-target*-Effekt könnte durch die Inkorporation des *sense*-Stranges in den RISC-Komplex bedingt sein. Hierdurch kann dieser nicht zur Suppression des Zielgens führen, da er nicht die zur Ziel-mRNA komplementäre Basenfolge enthält. Stattdessen können durch Hybridisierung mit anderen Transkripten unerwünschte Nebeneffekte entstehen (Schwarz et al. 2003). Um dies zu vermeiden, ist es wichtig, siRNA-Duplices einzusetzen, bei denen nur der *Antisense*-Strang von RISC inkorporiert werden kann. Eine niedrige thermodynamische Duplexstabilität bezogen auf das 5'-Ende des *Antisense*-Stranges favorisiert dessen Einbau in RISC (Patzel et al. 2005).

Ein dritter wichtiger Parameter, der nachweislich *off-target*-Effekte auslösen kann, ist die Konzentration der eingesetzten siRNA. Mit Hilfe der Microarray-Technologie konnten Persengiev und Mitarbeiter zeigen, dass chemisch synthetisierte siRNAs konzentrationsabhängig unspezifische Expressionsveränderungen bei mehr als 1000 Genen auslösen können. Hierbei kommt es sowohl zur Repression als auch zur Induktion von Genen, welche unter anderem auch in die Interferonantwort eingebunden sind (Persengiev et al. 2004). siRNA-Konzentrationen von mehr als 100 nM verursachen regelmäßig unspezifische *off target*-Effekte, während Konzentrationen von 20-100 nM diese nur gelegentlich auslösen, während bei Konzentrationen unter 20 nM keine unspezifischen Effekte auftreten (Semizarov et al. 2003). Deshalb ist es wichtig, die niedrigste siRNA-Konzentration zu verwenden, bei der eine spezifische, möglichst vollständige Herunterregulation des Zielgens erreicht wird. Allerdings

variiert diese Konzentration mit den untersuchten Zelllinien (Reynolds et al. 2004). Einige Zelllinien sind leicht zu transfizieren und nehmen auch bei niedrigen Konzentrationen große Mengen der siRNA auf, andere erfordern sehr hohe Konzentrationen. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Glioblastomzelllinien lag die benötigte Lamin-siRNA-Konzentration bei 125 nM (siehe Tabelle 9).

4.4 Validierung der Spezifität eines RNAi-Ergebnisses

Während der Durchführung von siRNA-Experimenten ist es nicht nur wichtig, *off target*-Effekte zu vermeiden, sondern es ist ebenso wichtig, die Spezifität des erhaltenen Ergebnisses zu überprüfen, d.h. es muss nachgewiesen werden, dass bei dem beobachteten Effekt der RNA-Interferenz spezifisch die Expression der Ziel-mRNA bzw. des entsprechenden Proteins reduziert wurde, während die Expression einer Kontroll-mRNA / Protein unbeeinträchtigt bleibt.

Dazu sollten wie bei jedem Experiment (mehrere) Negativ-Kontrollen getestet werden. Dabei empfiehlt es sich, eine oder mehrere siRNAs zu verwenden, die gegen ein Gen gerichtet sind, das in den eingesetzten Testzellen nicht exprimiert wird und somit keinen Einfluss auf das untersuchte Zielgen hat, z.B. Luciferase, ein Gen, das auch in der vorgelegten Arbeit ausgewählt wurde (siehe Abb. 9, sowie Abb. 13-15). Als weitere Negativ-Kontrolle wäre die mutierte Form einer siRNA denkbar, die durch Mutation in mehr als drei Basen im Bereich der Kernregion von der untersuchten siRNA abweicht. Diese mutierte siRNA kann nicht mehr an die Ziel-mRNA binden und hat somit keine Auswirkung auf diese. Allerdings könnte eine solche Kontrolle andere komplementäre mRNAs beeinflussen.

Genauso wichtig wie eine Negativkontrolle sollte jedes Experiment auch eine Positivkontrolle beinhalten, d.h. eine siRNA gegen ein Gen, das einen bekannten und leicht zu testenden Effekt hat, z.B. Lamin A/C; auch diese Zielstruktur wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet (siehe Abb. 9; 13-15).

Ferner ist der Einsatz einer weiteren oder mehrerer siRNAs gegen das gleiche Zielgen sinnvoll. Hier sollten ähnliche Veränderungen in der Genexpression zu beobachten sein. Veränderungen, die nur durch eine siRNA, aber nicht durch die anderen verursacht werden, sind vermutlich auf *off target*-Effekte zurückzuführen. Allerdings zeigen siRNAs, die gegen verschiedene Bereiche innerhalb eines Gens gerichtet sind, häufig auch ein unterschiedliches

Ausmaß der Herunterregulation. Kommerziell angeboten werden Sets aus verschiedenen siRNAs, z.B. SMARTpool der Firma Dharmacon.

Eine besonders wichtige Kontrolle für den Beweis der Spezifität ist es, die Folgen des siRNA-vermittelten *silencing* zu unterdrücken bzw. aufzuheben, sog. RNA *rescue*, indem man das Zielgen in einer Form der Zelle wieder zuführt, das aufgrund seiner Sequenz, z.B. einer stillen Mutation im 3' Nukleotid eines Codons in der Mitte der siRNA-Bindungsstelle, dem *silencing* widersteht (Lassus et al. 2002).

4.5 Schlussfolgerungen

Aufbauend aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sowie neueren Daten aus der Literatur (Grimm 2009), lassen sich folgende Empfehlungen für einen erfolgreichen Einsatz der RNA-Interferenz-Technik geben:

- sorgfältige Auswahl der siRNA-Sequenz und Struktur unter Ausnutzung der neuesten siRNA-Design-Algorithmen und chem. Modifikationen, z.B. Einsatz sog. *asymmetric interfering RNAs*.
- Optimierung eines effizienten und zielgerichteten Transfers von siRNAs in Zellen bzw. Organe durch Wahl eines geeigneten Transfektionsreagenzes bzw. viralen Systems, vor allem Lentiviren (Manjunath et al. 2009) und *Adeno-associated virus*, AAV, (Grimm et al. 2005) und einer möglichst geringen Konzentration der siRNA. Eine der neuesten Entwicklungen ist die sog. *self delivering* (sd)-rxRNA™ der Firma Rxi Pharmaceuticals (<http://www.rxipharma.com>), die eine spontane Aufnahme in Zellen ermöglichen soll.
- Nachweis des siRNA-Effektes sowohl auf RNA- (mittels *real-time* PCR) als auch auf Proteinebene (mittels Western-Blot-Analyse)
- Analyse der Expressionslevel zu unterschiedlichen Zeiten, z.B. 48, 72, 96 h nach der Transfektion
- Nachweis der Spezifität der eingesetzten siRNA durch mehrere geeignete Kontrollen, idealerweise auch durch RNA *rescue*
- potentielle *off-target*-Effekte überprüfen und quantifizieren und schließlich
- die Fähigkeit einer siRNA, eine potentielle Immunantwort auslösen zu können, mit in Betracht ziehen.

5. Zusammenfassung

Die spezifische Inhibition der Genexpression spielt bei experimentellen Strategien, die gezielt auf molekularer Ebene das Wachstum von Tumoren beeinflussen, zunehmend eine immer größer werdende Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Einsatz spezifischer, synthetischer, 21nt-langer siRNAs die Bedeutung einzelner Moleküle für die Erucylphosphocholin (ErPC)-induzierte Apoptose untersucht. Als Modellsystem dienten dabei die humanen Glioblastomzelllinien A172, U118MG und U373MG. Das Ausmaß der Proteinexpression wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse bestimmt.

Am *in-vitro*-Modell humaner Hirntumorzelllinien konnte durch einen einfachen morphologischen Test gezeigt werden, dass die Methode der RNA-Interferenz auch in diesen Zellen anwendbar ist.

In einem zweiten Schritt wurde die RNA-Interferenz-Methode mit Hilfe einer spezifischen siRNA gegen die mRNA des Zytoskelettproteins Lamin A/C etabliert. Dazu wurden die Transfektionsparameter Zellzahl, Konzentration der verwendeten siRNA und die Konzentration des Transfektionsreagenzes Oligofectamin für die Modellzelllinien optimiert. Die Spezifität der Methode konnte durch den Einsatz einer Kontroll-siRNA gegen Luciferase untermauert werden.

In einem dritten Schritt wurde die RNA-Interferentechnik, unter den gefundenen optimierten Transfektionsbedingungen, an den für die Apoptose relevanten Genen Apaf-1, Caspase-3 und -2 validiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz spezifischer siRNAs in verschiedenen Glioblastomzelllinien zu einer Herunterregulation der entsprechenden Proteinexpression führt.

Im letzten Teil dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der funktionellen Bedeutung des „Knock down“ von Caspase-3 und Apaf-1 auf die ErPC-induzierte Apoptose. Dabei konnte die Vermutung bestätigt werden, dass beide Proteine eine wesentliche Rolle im Ablauf der ErPC-induzierten Apoptose spielen.

6. Literaturverzeichnis

Ashkenazi A, (2008): Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor Agonists. *Nat Rev Drug Discov* 7, 1001-1012

Banan M, Puri N (2004): The Ins and Outs of RNAi in Mammalian Cells. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 441-450

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

Behlke MA (2008): Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* 18, 305-19

Berger MR, Sobottka S, Konstantinov SM, Eibl H (1998): Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines. *Drugs Today* 34, 73-81

Blasberg RG, Groothuis D, Molnar P: A review of hyperosmotic blood-brain barrier disruption in seven experimental brain tumor models; in: *Pathophysiology of the Blood-Brain Barrier*; Johansson BB, Owman C, Widner H, Elsevier, Amsterdam 1990, 197-220

Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, Tsagris M, Tabler M (2001): Short 5'-Phosphorylated double-stranded RNAs induced RNA-interference in Drosophila. *Curr Biol* 11, 1776-1780

Bramsen JB, Laursen MB, Damgaard CK, Lena SW, Babu BR, Wengel J, Kjems J (2007): Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5886-5897

Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM (2000): Protein Complexes Activate Distinct Caspase Cascades in Death Receptor and Stress-Induced Apoptosis. *Exp Cell Res* 256, 27-33

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003): Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-264

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553

Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9742-9747

Cell Signaling: schriftliche Mitteilung von Firma Cell Signaling, Frankfurt am Main 2001

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008): Caspases - An update. *Comp Biochem Phys B*: 151, 10-27

Cory S, Adams JM (2002): The Bcl2 family: regulators of the life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656

D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010): Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 17, 1104-1114

De Bouard S, Guillamo JS (2005): Angiogenesis and anti-angiogenetic strategies for glioblastoma. *Bull Cancer* 92, 360-372

Deshager S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999): Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-910

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003): Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 457-467

Eiden P (2008): Hochmaligne kindliche Gliome – hochaggressive Tumoren. *Pädiatrix* 3, 13-17

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213

Erdlenbruch B, Jendrossek V, Marx M, Hunold A, Eibl H, Lakomek M (1998): Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 18, 2551-2558

Erdlenbruch B, Jendrossek V, Eibl H, Lakomek M (2000): Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats. *Exp Brain Res* 135, 417-422

Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DEH, Herms J, Eibl H, Lakomek M (2003): Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br J Pharmacol* 139, 685-694

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

Fischer T, Huber C (2001): Spezifische Tumor- und Leukämietherapie mit Signalübertragungshemmern. *Dtsch Arztebl* 37, 2345-2354

Grimm D, Pandey K, Kay MA (2005): Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA expression. *Methods Enzymol* 392, 381-405

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006): Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-541

Grimm D (2009): Small silencing RNAs: state-of-the-art. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 672-703

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637

Jendrossek V, Kugler W, Erdlenbruch B, Eibl H, Lang F, Lakomek M (2001): Erucylphosphocholine-induced apoptosis in chemoresistent glioblastoma cell lines: involvement of caspase activation and mitochondrial alterations. *Anticancer Res* 21, 3389-3396

Kaufmann SH, Earnshaw WC (2000): Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42-49

Kim DH, Rossi JJ (2007): Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8, 173-84

Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ (2004): Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22, 321-325

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Borke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002): The WHO Classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 215-225

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J (2008): Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452, 591-597

Kramm CM, Wagner S, Van Gool S, Schmid H, Sträter R, Gnekow A, Rutkowski S, Wolff JE (2006): Improved survival after gross total resection of malignant gliomas in pediatric patients from the HIT-GBM studies. *Anticancer Res* 26, 3773-3779

Kramm C, Rausche U, Butenhoff S, Kühnöl C, Kunze C, Kortmann R, Wolff J, van Gool S (2008): Hochmaligne Gliome im Kindes- und Jugendalter. *Monatszeitschr Kinderheilkd* 156, 1201-1207

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163

Kugler W, Erdlenbruch B, Jünemann A, Heinemann D, Eibl H, Lakomek M (2002): Erucylphosphocholine-induced apoptosis in glioma cells: involvement of death receptor signaling and caspase activation. *J Neurochem* 82, 1160-1170

Kugler W, Buchholz F, Köhler F, Eibl H, Lakomek M, Erdlenbruch B (2005): Downregulation of Apaf-1 and Caspase-3 by RNA interference in human glioma cells: Consequences for erucylphosphocholine-induced apoptosis. *Apoptosis* 10, 1163-1174

Kumar S (2009): Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat Rev Cancer* 9, 897-903

Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y (2002): Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-1354

Louis DN, von Deimling A (1995): Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol* 5, 145-151

Lüthi AU, Martin SJ (2007): The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650

Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P (2009): Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 732-745

Mülhardt C: "Der Experimentator: Molekularbiologie." 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 2000

Packer RJ (1999): Alternative treatments for childhood brain tumors. *Child's Nerv Syst* 15, 789-794

Patzel V, Rutz S, Dietrich I, Köberle C, Scheffold A, Kaufmann SH (2005): Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* 23, 1440-1444

Persengiev SP, Zhu X, Green MR (2004): Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10, 12-18

Poeck K, Hacke W: Neurologie. 11. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2001

Rainov NG, Ren H (2003): Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy – what have we learned? *J Neurooncol* 65, 227-236

Rapoport SI (2001): Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* 10, 1809-1818

Renner C, Hartmann F, Pfreundschuh M (2002): Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung solider Tumoren. *Dtsch Arztebl* 99, A850-858

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-330

Riedl SJ, Salvesen GS (2007): The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413

Robbins M, Judge A, Ambegia E, Choi C, Yaworski E, Palmer L, McClintock K, MacLachlan I (2008): Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther* 19, 991-999

Rossi JJ (2008): Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers. *Hum Gene Ther* 19, 313-317

Rutkowski S, Fleischhack G (2008): Medulloblastome, primitive neuroektodermale Tumoren und Ependymome. *Monatsschr Kinderheilkd* 156, 1187-1193

Rutkowski S, De Vleeschouwer S, Kaempgen E, Wolff JE, Kuhl J, Demaerel P, Warmuth-Metz M, Flamen P, Van Calenbergh F, Plets C, Sorensen N, Opitz A, Van Gool SW (2004): Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *Br J Cancer* 91, 1656-1662

Rutkowski S, Fleischhack G, Gnekow A, Kramm C, Müller H, Calaminus G, Wrede B, Frühwald M, Krauss J, Faldum A, Kortmann R, Pietsch T, Warmuth-Metz M (2008): Hirntumoren bei Kindern und Jugendlichen. *Monatsschr Kinderheilkd* 156, 1165-1172

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989

Sano M, Sierant M, Miyagishi M, Nakanishi M, Takagi Y, Sutou S (2008): Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Res* 36, 5812-5821

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS (2004): Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1892-1897

Schlee M, Barchet W, Hornung V, Hartmann G (2007): Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids. *Curr Top Microbiol Immunol* 316, 207-230

Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S (2002): Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch Arztebl* 99, A2408-2416

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208

- Selkirk SM (2004): Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 80, 560-570
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW (2003): Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6347-6352
- Shapiro WR, Shapiro JR (1998): Biology and Treatment of Malignant Glioma. *Oncology* 12, 233-240
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999): Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *J Cell Biol* 144, 281-292
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839
- Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Hermann JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW (2001): Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409: 207-210
- Sontheimer EJ (2005): Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 127-138
- Speer CP, Gahr M: Pädiatrie. Springer-Verlag Berlin 2001
- Suc E, Kalifa C, Brauner R, Habrand JL, Terrier-Lacombe MJ, Vassal G, Lemerle J. (1990): Brain tumors under the age of three. The price of survival. A retrospective study of 20 long-term survivors. *Acta Neurochir* 106, 93-98
- Thieme B, Gnekow A (2008): Niedriggradige Gliome im Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 156, 1173-1180
- Troy CM, Shelanski ML (2003): Caspase-2 redux. *Cell Death Differ* 10, 101-107

Van Gool S, Maes W, Ardon H, Verschuere T, Van Cauter S, De Vleeschouwer S (2009): Dendritic cell therapy of high-grade gliomas. *Brain Pathol* 19, 694-712

Wang J, Lenardo MJ (2000): Roles of caspases in apoptosis, development and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 113, 753-757

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M: Rekombinierte DNA. 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1993

Weber F, Schackert G, Burger KJ, Floeth FW (2000): Somatische Gentherapie bei Glioblastomen. *Dtsch Ärztebl* 97, A1228-1232

Weil D, Garçon L, Harper M, Duménil D, Dautry F, Kress M (2002): Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 33, 1244-1248

Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S (2003): Caspase-3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 22, 2717-2728

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lakomek danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation.

Danken möchte ich auch Frau Regina Krügener und Frau Rita Spohr-Müller für ihre technische Unterstützung und außerordentliche Hilfsbereitschaft, durch die sie für eine angenehme Atmosphäre bei der Arbeit gesorgt haben.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Dr. Friederike Buchholz für die unvergessliche gemeinsame Zeit im Labor. Neben unserer guten Zusammenarbeit hat sich auch eine private Freundschaft entwickelt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Wilfried Kugler. Ohne seine ausgezeichnete fachliche sowie herzliche und geduldige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht gelungen. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Lebenslauf

Am 28. Januar 1981 wurde ich, Franziska Köhler, als zweites Kind der Ärztin Ruth Köhler, geb. Kietzmann, und des Diplom-Mathematikers Siegfried Köhler (verstorben im März 1999) in Rodewisch geboren.

Zu unserer Familie gehört weiterhin mein Bruder Sebastian Köhler, geboren am 25. September 1975.

Von 1987 bis 1992 besuchte ich die Friedrich-Schiller-Oberschule, anschließend das Johann-Heinrich-Pestalozzi-Gymnasium in Rodewisch und legte im Juli 1999 mein Abitur ab.

Zum Wintersemester 1999/2000 nahm ich das Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Hier absolvierte ich im Sommersemester 2001 die Ärztliche Vorprüfung und im Sommersemester 2002 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Von Oktober 2001 bis Januar 2005 führte ich den experimentellen Teil meiner Dissertation durch. Im Wintersemester 2004/2005 absolvierte ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Göttingen und im April 2006 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Bremen.

Seit Juni 2006 bin ich als Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums Bremen-Nord tätig und werde voraussichtlich in diesem Jahr meine Facharztprüfung ablegen.