

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München**

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Die Protein Kinase CK2 reguliert ein anti-apoptisches Programm in
Pankreaskarzinomzellen**

Rainer W. Hamacher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel (mündliche Prüfung)
3. Univ.-Prof. Dr. M. Ebert

Die Dissertation wurde am 16.05.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.01.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>IV</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 DAS PANKREASKARZINOM	1
1.2 DIE APOPTOSE	2
1.2.1 INTRINSISCHER UND EXTRINSISCHER WEG DER APOPTOSE	2
1.2.2 DIE TRAIL-REZEPTOREN	3
1.2.3 REGULATION DER APOPTOSE UND APOPTOSERESISTENZ IM PANKREASKARZINOM	4
1.3 DIE PROTEIN KINASE CK2	6
1.3.1 CK2 – AUFBAU UND REGULATION	6
1.3.2 ONKOGENE FUNKTION VON CK2	7
1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>10</u>
2.1 MATERIAL	10
2.1.1 CHEMIKALIEN	10
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	11
2.1.3 KOMMERZIELL ERHÄLTICHE KITS	11
2.1.4 GERÄTE	11
2.1.5 LÖSUNGEN UND PUFFER	12
2.1.6 ANTIKÖRPER	13
2.1.7 siRNA (SMALL INTERFERENCE RNA)	13
2.1.8 ZELLINIEN	14
2.2 EXPERIMENTALMETHODEN	14
2.2.1 ZELLKULTUR	14
2.2.2 WESTERN BLOT	16
2.2.3 HOECHST FÄRBUNG	18
2.2.4 LUCIFERASEREPORTERGEN ASSAY	18

2.2.5	MTT ZELLVIABILITÄTSASSAY	18
2.2.6	GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS EINES NICHTRADIOAKTIVEN CDNA-ARRAYS	19
3	<u>ERGEBNISSE</u>	25
3.1	HEMMUNG DER PROTEIN KINASE CK2 INDUZIERT APOPTOSE IN PANKREASKARZINOMZELLEN	25
3.1.1	DIE SPEZIFISCHEN CK2 INHIBITOREN DRB UND APIGENIN VERRINGERN DIE ÜBERLEBENSFÄHIGKEIT VON PANKREASKARZINOMZELLEN	25
3.1.2	DIE ABNAHME DER ZELLVITALITÄT DURCH HEMMUNG DER CK2 BERUHT AUF CASPASE-ABHÄNGIGER APOPTOSE	28
3.1.3	DIE SPEZIFISCHEN CK2 INHIBITOREN DRB UND APIGENIN FÜHREN ZUR ABNAHME DER TRANSKRIPTIONELLEN AKTIVITÄT VON NF- κ B	32
3.1.4	DER APOPTOSEWEG NACH HEMMUNG DER CK2 IST UNABHÄNGIG VON BCL-X _L	33
3.1.5	DER KNOCK-DOWN DER KATALYTISCHEN UNTEREINHEITEN VON CK2 FÜHRT ZUR ABNAHME DER ZELLVITALITÄT VON PANKREASKARZINOMZELLEN	34
3.1.6	DER KNOCK-DOWN DER KATALYTISCHEN UNTEREINHEITEN VON CK2 INDUZIERT APOPTOSE IN PANKREASKARZINOMZELLEN	36
3.2	HEMMUNG DER PROTEIN KINASE CK2 ERHÖHT DIE SENSITIVITÄT VON PANKREASKARZINOMZELLEN GEGENÜBER TRAIL-INDUZIERTER-APOPTOSE	38
3.2.1	DIE SPEZIFISCHEN CK2 INHIBITOREN DRB UND APIGENIN ERHÖHEN DIE SENSITIVITÄT VON PANKREASKARZINOMZELLEN GEGENÜBER TRAIL-INDUZIERTER APOPTOSE	38
3.2.2	DIE SPEZIFISCHEN CK2 INHIBITOREN DRB UND APIGENIN BEEINFLUSSEN DIE EXPRESSION VON APOPTOSERELEVANTEN GENEN IN PANKREASKARZINOMZELLEN	42
3.2.3	TRAIL-INDUZIERTE APOPTOSE NACH HEMMUNG VON CK2 INVOLVIERT DIE SPALTUNG VON BID	44
4	<u>DISKUSSION</u>	46
4.1	HEMMUNG VON CK2 VERMINDERT DIE ZELLVIABILITÄT VON PANKREASKARZINOMZELLEN	46
4.1.1	REDUKTION DER APOPTOTISCHEN SCHWELLE	46
4.1.2	APOPTOSEINDUKTION	48

4.2 HEMMUNG VON CK2 ERHÖHT DIE SENSITIVITÄT VON PANKREASKARZINOMZELLEN GEGENÜBER TRAIL-INDUZIRTER-APOPTOSE	50
4.3 AUSBLICKE	53
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>54</u>
<u>6 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>55</u>
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>57</u>
<u>LEBENS LAUF</u>	<u>63</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>64</u>

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère	DcR	Decoy Receptor
A1	BCL-related protein A1	ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
APAF-1	Apoptotic Protease-Activating Faktor 1	DISC	Death Inducing Signaling Complex
APO-1	Apoptosis-1 Rezeptor, FAS-R, CD95	D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
APO-2L	Apoptosis-2 Ligand	DMSO	Dimethylsulfoxid
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	DNA	Desoxyribonucleid acid
ARC	Apoptosis Repressor with a Caspase recruitment domain	DNase	Desoxyribonuclease
ATP	Adenosintriphosphat	DR	Death Receptor
BAD	BCL-2 Antagonist of Cell Death	DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosybezimidazole
BAK	BCL-2 Homologous Antagonist / Killer	DTT	Dithiothreitol
BAX	BCL-2 Associated X Protein	dUTP	Desoxy-Uracil-Triphosphate
BCL-2	B Cell Lymphoma / Leukemia-2	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BFL-1	BCL-2 Homologue Isolated from Human Fetal Liver	et al.	et alii (und andere).
BCL-W	Apoptosis Regulator BCL-X (BCL-2-like 2 Protein)	FADD	FAS-Associating Protein with Death Domain (MORT1)
BCL-X _L	Apoptosis Regulator BCL-X (BCL-2-like 1 Protein), lange Splicevariante	FAP-1	FAS-Associated Phosphatase-1
BCL-X _S	Apoptosis Regulator BCL-X (BCL-2-like 1 Protein), kurze Splicevariante	FAS	Fibroblast Associated Antigen
BH	Bcl-2-Homology	FASL	FAS-Ligand (CD95-Ligand)
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist	FAS-R	FAS-Rezeptor (CD95)
BIK	BCL-2 Interacting Killer	FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
BIM	BCL-2 Interacting Mediator of Cell Death	FLICE	FAS-Associated Death Domain-Like IL-1-Converting-Enzym
BSA	Bovines Serumalbumin	FLIP	FLICE Inhibitory Protein
Caspase	Cystein Aspartat-spezifischen Proteasen	g	Gramm (ng, µg, mg)
CD	Cluster of Differentiation	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
CD95	APO-1, FAS-R	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
CD95-L	CD95-Ligand	IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
cDNA	Complementary DNA	IKK	IκB Kinase
c-FLIP	cellulare-FLIP	IκB	Inhibitor of κB
clAP	cellulare-IAP	IL	Interleukin
CK2	Protein Kinase CK2 (Casein Kinase II)	ILP2	IAP-like protein 2
CKAP4	Cytoskeleton-Associated Protein 4	IP	Immunpräzipitation
c-Rel	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog	kD	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

I	Liter (µl, ml)	RNA	Ribonucleid Acid
M	Molar (µM, mM)	RNase	Ribonuclease
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	rpm	Rotations Per Minute
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1	RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
ML-IAP	Melanoma-IAP	Ser	Serin
MORT1	Mediator of Receptor Induced Toxicity 1	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
mRNA	messenger-RNA	siRNA	small interfering RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium Bromid	TBE	TRIS-Borat-EDTA
NIAP	Neuronal IAP	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
NF-κB	Nuclear Factor-κB	Thr	Threonin
nm	Nanometer	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol	TNF-R	TNF-Rezeptor
OPG	Osteoprotegin	TRAF	TNF-Receptor-Associated Factor
OX40	TNF-R superfamily, member 4	TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Factor
p.a.	pro analysis (zur Analyse)	TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose- Polymerase	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie	UV	Ultraviolett
PBS	Phosphat Buffered Saline	V	Volt
pDNA	plasmid DNA	v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid	XIAP	X-linked IAP
PVDF	Polyvinylidenfluorid	zVAD- fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Aps- fluormethylketon
RelA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	4-1BB-L	TNF-R superfamily ligand, member 9
RelB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B		

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hochmaligner epithelialer Tumor und gehört in Europa und Nordamerika zu den fünf häufigsten Ursachen tumorbedingter Todesfälle (Jemal et al., 2006). Es ist, bedingt durch seine frühe Metastasierung und weitgehende Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutischer Behandlung, schlecht therapierbar und wird zumeist erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. Die 5 Jahresüberlebensrate liegt unter 1% und von den 10% mit einem resezierbarem Tumor überleben nur etwa ein Fünftel die nächsten 5 Jahre (Schneider et al., 2005).

Die Entwicklung des duktales Pankreaskarzinoms geschieht über verschiedene Stadien, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN1 bis 3). Die frühen epithelialen Vorläuferläsionen PanIN-1A und -1B finden sich bei nahezu 40% der Patienten über 50 Jahre (Hruban et al., 2004). Die Korrelation der einzelnen Stadien mit den charakteristischen genetischen Mutationen führte zu einem Tumorprogressionsmodell für das duktales Adenokarzinom des Pankreas (siehe Abbildung 1), (Schneider et al., 2005).

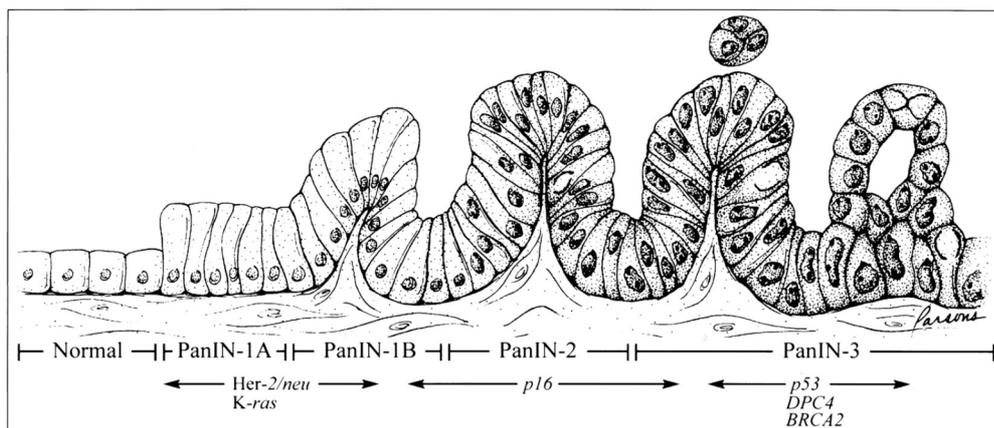


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinomes
nach Hruban et al., 2000

Zu den klassischen Merkmalen eines nahezu jeden Karzinoms gehören die Dysregulation des Zellzyklus, die Apoptoseresistenz, das invasive Wachstum, die Insensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie die Metastasierung und die Angiogenese (Hanahan & Weinberg, 2000). Diese charakteristischen Veränderungen finden sich auch im Pankreaskarzinom wieder (Schneider et al., 2005). Hierbei ist die Apoptoseresistenz ein zentraler Bestandteil in der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms. Da der Wirkmechanismus der meisten Chemotherapeutika in der Induktion von Apoptose besteht, wird dadurch auch die Therapieresistenz des Pankreaskarzinoms bedingt (Schulze-Bergkamen & Kramer, 2004).

1.2 Die Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein physiologischer Prozess, der in multizellulären Organismen kontinuierlich und geregelt stattfindet und damit zur Gewebemöostase beiträgt. Auch geschädigte Zellen werden entfernt, bevor sie maligne entarten (Igney & Kramer, 2002; Okada & Mak, 2004).

1.2.1 Intrinsischer und extrinsischer Weg der Apoptose

Die Induktion der Apoptose erfolgt über zwei alternative Signalwege, die beide zur Aktivierung von Cystein Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) führen.

Der erste Signalweg wird als intrinsischer oder auch mitochondrialer Weg bezeichnet, da das Mitochondrium eine zentrale Stellung bei der Initiation der Apoptose einnimmt. Der genaue Mechanismus der Initiation, die Reaktion der Zellen auf verschiedene Arten von Zellstress, ist noch nicht vollständig verstanden. Letztendlich führt ein Ungleichgewicht von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Familie zur Freisetzung von Apoptose-induzierenden Faktoren aus den Mitochondrien. Diese bilden im Zytosol daraufhin das Apoptosom, ein Komplex aus Cytochrom c, APAF-1, ATP und der inaktiven Initiatorcaspase Procaspase 9. Im Apoptosom wird die Caspase 9 aktiviert und induziert über Spaltung der Effektorcaspasen (Caspase 3, Caspase 6, Caspase 7) die Apoptose (Igney & Kramer, 2002; Kroemer et al., 1998).

Der zweite Signalweg, der extrinsische Weg, wird über spezielle Todesrezeptoren (death receptors) auf der Zelloberfläche aktiviert. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor (TNF-) Rezeptor Superfamilie. Dazu

gehören die Rezeptoren TNF-R1, DR3, DR6, CD95-R, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Auf intrazellulärer Seite besitzen diese Rezeptoren eine Todesdomäne (death domain). Daran lagert sich, nach extrazellulärer Bindung der spezifischen Liganden (TNF- α , Fas-L, TRAIL), das Adapterprotein FADD an und es kommt zur Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC). Innerhalb des Komplexes kommt es zur Bindung und Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 10, die anschließend die Effektorcaspasen (Caspase 3, Caspase 6, Caspase 7) aktivieren. In Typ 1 Zellen findet die Aktivierung der Effektorcaspasen direkt durch die im DISC aktivierten Initiatorcaspasen statt. In Typ 2 Zellen ist die Menge an aktivierter Caspase 8 zu gering, um die Effektorcaspasen direkt zu aktivieren. Daher wird ein mitochondrialer Amplifikationsmechanismus benötigt. Hierbei wird das pro-apoptotische BH3-only Protein BID von der Caspase 8 gespalten und aktiviert. Die gespaltenen BID Proteine translozieren in das Mitochondrium und induzieren dort die Freisetzung Apoptose-induzierender Faktoren (Igney & Krammer, 2002; Okada & Mak, 2004). Pankreaskarzinomzellen sind Typ 2 Zellen (Schneider et al., 2005).

Die Aktivierung der Effektorcaspasen führt über die Spaltung spezifischer Substrate zu den für die Apoptose typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen. So wird unter anderem die Kernlamina gespalten und dies führt zur Schrumpfung des Zellkerns und Kondensation des Chromatins. Des Weiteren werden Inhibitoren der DNase und Proteine des Zytoskelettes gespalten sowie Signalmoleküle zur Phagozytose der Zellbestandteile freigesetzt (Igney & Krammer, 2002).

1.2.2 Die TRAIL-Rezeptoren

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) oder auch APO-2L gehört, ebenso wie TNF- α und FAS-L, zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF). Bisher sind fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren bekannt: Die vier membranständigen Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) und der nicht-membranständige OPG-Rezeptor. TRAIL-R1 und -R2 gehören zu den Todesrezeptoren aus der Familie der TNF-Rezeptoren. TRAIL-R3 und -R4 besitzen keine intakte intrazelluläre Todesdomäne und konkurrieren damit um die TRAIL-Bindung, jedoch ohne Apoptose zu induzieren. Die genaue Bedeutung dieser sogenannten Decoyrezeptoren für die TRAIL-Sensitivität ist noch nicht vollständig

geklärt. Der OPG-Rezeptor kann ebenfalls keine Apoptose induzieren und fungiert möglicherweise auch als Decoyrezeptor (Srivastava, 2001). Eine hervorstechende Eigenschaft der TRAIL-induzierten Apoptose ist die weitgehende spezifische Wirkung auf Tumorzellen mit nur geringer zytotoxischer Wirkung auf nichtentartete Zellen (Nagane et al., 2001). Die Regulation der Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose ist nicht ausreichend verstanden.

1.2.3 Regulation der Apoptose und Apoptoseresistenz im Pankreaskarzinom

Während der Apoptoseeffektorapparat intakt ist, finden sich im Pankreaskarzinom Störungen auf Ebene des Todesrezeptors, des Mitochondriums und der Caspaseinhibitoren (Gerhard et al., 2002).

Die meisten Pankreaskarzinomzellen sind gegenüber der CD95L-, TRAIL- und TNF- α -vermittelter Apoptose resistent, obwohl die entsprechenden Rezeptoren in den Zellen normal exprimiert werden (Ibrahim et al., 2001; Kornmann et al., 2000). Dies wird auf Ebene des Todesrezeptors durch Störungen der DISC Funktion erklärt. Hierbei zeigt sich bisher die Beteiligung dreier anti-apoptotischer Proteine, deren Expression im Pankreaskarzinom erhöht ist: FAP-1, c-FLIP_L und TRAF2 (Schneider et al., 2005). FAP-1 ist ein Protein Tyrosin Phosphatase, die in Pankreaskarzinomzellen durch Hemmung der Caspase 8 Aktivierung zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose führt. Hierbei scheint FAP-1 die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche zu beeinflussen, wodurch die zur DISC Bildung notwendige Trimerisierung der Rezeptoren gestört wird. Auch eine direkte Blockade der Aktivierung von Caspase 8 im DISC ist möglich (Ungefroren et al., 2001). Wohingegen FAP-1 eine singuläre Wirkung auf die CD95-vermittelte Apoptose zu haben scheint, nimmt die Überexpression von c-FLIP_L in Pankreaskarzinomzellen eine zentralere Rolle in der Resistenz gegenüber rezeptorvermittelter Apoptose ein (Elnemr et al., 2001; Trauzold et al., 2003; Ungefroren et al., 2001). Durch eine zur Caspase 8 homologen Domäne kann c-FLIP_L im DISC binden und die Aktivierung der Initiatorcaspase hemmen (Igney & Krammer, 2002; Tschopp et al., 1998). Die Überexpression von TRAF2 konnte erst vor kurzem im Pankreaskarzinom gezeigt werden. Dieses Protein gehört zu einer Proteinfamilie, die über eine gemeinsame Domäne mit den TNF-Rezeptoren interagieren. Es zeigte sich weiterhin im Pankreaskarzinom, dass durch die

Überexpression von TRAF2 der normalerweise apoptoseinduzierende CD95-vermittelte Signalweg nun zur Invasivität der Zellen beiträgt (Trauzold et al., 2005).

Auf Ebene des Mitochondriums findet man im Pankreaskarzinom vor allem eine deregulierte Expression von Mitgliedern der BCL-2 Proteinfamilie, die die Apoptoseresistenz bedingen (Campani et al., 2001; Evans et al., 2001; Schneider et al., 2005). Diese Proteinfamilie besteht aus anti-apoptotischen (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, A1) und pro-apoptotischen Mitgliedern (BAX, BAK, BCL-X_S, BAD, BIK, BID), wobei die BCL-2 Proteine die Freisetzung von Apoptose-induzierenden Faktoren aus den Mitochondrien beeinflussen (Igney & Krammer, 2002). So schützt BCL-X_L, das in Pankreaskarzinomzellen überexprimiert wird, die Zellen vor CD95- und TRAIL-vermittelter Apoptose (Hinz et al., 2000).

Die Hemmung der Effektorcaspasen durch die Familie der IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) stellt die dritte Ebene der Apoptoseresistenz im Pankreaskarzinom dar. Die IAP Proteinfamilie setzt sich aus folgenden Mitgliedern zusammen: cIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP, ML-IAP, ILP2, Livin, Apollon und Survivin. Dabei vermitteln diese durch Bindung der Caspasen deren Hemmung und proteasomalen Abbau (Igney & Krammer, 2002; Vaux & Silke, 2005). Im Pankreaskarzinom konnte diesbezüglich bereits die Überexpression von XIAP und Survivin gezeigt werden (Sarela et al., 2002; Satoh et al., 2001; Trauzold et al., 2003). Wobei XIAP auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der TRAIL-Resistenz von Pankreaskarzinomzellen einnimmt (Vogler et al., 2006).

Die verschiedenen Ebenen der Apoptoseresistenz werden durch zwei interagierende Signalwege reguliert (Schneider et al., 2005). Der erste Signalweg ist der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg. Dieser ist in 50 - 60% der Pankreaskarzinome aktiviert (Schlieman et al., 2003). Wobei die PI3-Kinase, durch direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und Proteinen, die Expression und die Stabilität von pro- und anti-apoptotischen Proteinen reguliert (Gukovskaya & Pandol, 2004). So induziert die Hemmung des PI3K/AKT Signalweges in Pankreaskarzinomzellen Apoptose (Bondar et al., 2002). Ein weiterer Signalweg der zur Apoptoseresistenz von Pankreaskarzinomzellen beiträgt ist der IKK – NF-κB Signalweg (Fahy et al., 2004; Liptay et al., 2003). NF-κB ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die sich aus Dimeren verschiedener Untereinheiten bildet:

RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52). Diese befinden sich überwiegend inaktiv, durch Bindung an Inhibitorproteine wie I κ B α und I κ B β , im Zytoplasma. Die Aktivierung erfolgt, indem die Inhibitorproteine durch I κ B Kinasen phosphoryliert und anschließend über Ubiquitinierung abgebaut werden (Lin & Karin, 2003). Im Pankreaskarzinom ist NF- κ B konstitutiv aktiv. Dabei fördert NF- κ B in den Karzinomzellen unter anderem die Expression von anti-apoptischen Genen, wie cFLIP_L, BCL-X_L, IAPs (Liptay et al., 2003; Wang et al., 1999b).

1.3 Die Protein Kinase CK2

Die Protein Kinase CK2, auch bekannt als Casein Kinase II, ist eine hoch konservierte Serin-Threonin Kinase, die in Säugetierzellen ubiquitär exprimiert wird. CK2 beeinflusst durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten biologische Prozesse wie Zellüberleben, Karzinogenese, Signaltransduktion, transkriptionelle Kontrolle, Apoptose und Zellzyklus (Guerra & Issinger, 1999; Litchfield, 2003; Meggio & Pinna, 2003).

1.3.1 CK2 – Aufbau und Regulation

Die CK2 kommt üblicherweise als tetrameres Holoenzym, bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten, vor. In menschlichen Zellen existieren zwei katalytische Untereinheiten CK2 α und CK2 α' sowie die regulatorische Untereinheit CK2 β . Innerhalb des tetrameren Komplexes liegt ein Dimer aus zwei CK2 β in unterschiedlicher Kombination mit zwei identischen oder verschiedenen katalytischen Untereinheiten vor. Erst später wurde CK2 α'' , eine dritte Isoform der katalytischen Untereinheiten, entdeckt (Litchfield, 2003). Im Gegensatz zu früheren Annahmen liegen die Untereinheiten nicht ständig als fester tetramerer Komplex vor, sondern sind auch einzeln in verschiedenen Kompartimenten der Zelle und im Zellkern zu finden (Filhol et al., 2004; Litchfield, 2003).

Obwohl CK2 α und CK2 α' von zwei verschiedenen Genen kodiert werden, kann man funktionell und strukturell nur geringgradige Unterschiede feststellen. Untersuchungen an Knockout-Mäusen zeigen, dass der Ausfall von CK2 α' weitgehend, wenn auch nicht vollständig, durch CK2 α kompensiert werden kann (Xu et al., 1999). Es gibt jedoch auch Unterschiede zwischen den beiden katalytischen

Untereinheiten, die unter anderem in einer ungleichen Regulation während des Zellzyklus oder durch Isoform-spezifische Interaktionsproteine deutlich werden (Guerra & Issinger, 1999; Litchfield, 2003).

Die regulatorische Untereinheit CK2 β erfüllt im Enzymkomplex drei wesentliche Aufgaben. Sie kontrolliert erstens die Stabilität, zweitens die Aktivität und drittens die Spezifität von CK2. Des Weiteren ist CK2 β für die Bindung verschiedener Substrate an das Enzym notwendig (Guerra & Issinger, 1999; Litchfield, 2003).

In den meisten Zellen zeigt CK2 eine konstitutive Aktivität, die jedoch moduliert wird. So findet sich eine zellzyklusabhängige Aktivitätsänderung und korrespondierende Steigerung der Kinaseaktivität mit zunehmender Proliferation. Über die genauen Mechanismen der Regulation ist noch relativ wenig bekannt. Bisher konnte der Einfluss auf die Kinaseaktivität durch manche Interaktionspartner und eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung von CK2 demonstriert werden (Litchfield, 2003). Auch UV-induzierte Aktivierung von CK2, die über die p38 MAPK vermittelt wird, konnte gezeigt werden (Kato et al., 2003). Daneben scheint die Expression und Zusammenlagerung der Untereinheiten direkt reguliert zu werden (Litchfield, 2003).

1.3.2 Onkogene Funktion von CK2

Die Protein Kinase CK2 nimmt Einfluss auf zentrale Bestandteil der Karzinogenese wie Zellzyklus, Proliferation und Apoptose. Tatsächlich konnten in allen bisher untersuchten menschlichen Karzinomen eine erhöhte Aktivität von CK2 nachgewiesen werden (Ahmed et al., 2002; Guerra & Issinger, 1999; Tawfic et al., 2001).

Dass die Kinaseaktivität nicht nur aufgrund vermehrter Proliferation erhöht ist, sondern CK2 aktiv an der Karzinogenese von Tumoren beteiligt ist, zeigen Versuche an transgenen Mäusen. So ist eine Überexpression von CK2 α ausreichend, um in diesen Mäusen T-Zelllymphome (Seldin & Leder, 1995) und Brustkrebs (Landesman-Bollag et al., 2001) zu erzeugen. CK2 überexprimierende Zellen zeichnen sich durch Proliferationssteigerung, veränderte Zellzykluskontrolle und erhöhte Apoptose-resistenz aus (Ahmed et al., 2002; Guerra & Issinger, 1999; Litchfield, 2003).

Im weiteren Verlauf soll die Bedeutung der CK2 für das Zellüberleben von Tumorzellen dargestellt werden. Verschiedene Studien weisen auf die allgemeine

Bedeutung von CK2 für das Überleben von Zellen hin. So führte der Knockout von CK2 α bei männlichen Mäusen zu Sterilität aufgrund einer gestörten Spermatogenese und dadurch erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen in den Hoden (Xu et al., 1999). Auch der Knockdown/-out von CK2 β im Fadenwurm und in der Maus bedingen Störungen der Embryogenese mit erhöhter embryonaler Sterblichkeit (Buchou et al., 2003; Fraser et al., 2000). Damit wird deutlich, dass sowohl die katalytischen Untereinheiten als auch die regulierende Untereinheit CK2 β , eine wichtige Funktion für das Zellüberleben haben (Ahmed et al., 2002; Litchfield, 2003).

In Tumorzellen trägt CK2 entscheidend zum Zellüberleben durch die Vermittlung von Apoptoseresistenz bei. So zeigte sich nach Hemmung von CK2 eine Sensitivierung gegenüber Chemo- und Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Farah et al., 2003; Guo et al., 2001; Izeradjene et al., 2004; Izeradjene et al., 2005; Ravi & Bedi, 2002). Hinsichtlich der anti-apoptotischen Funktion von CK2 wurden bisher die folgenden Mechanismen beschrieben:

- BID, ein pro-apoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie, wird von CK2 phosphoryliert. Dadurch kann BID nicht mehr durch die Caspase 8 gespalten werden und bleibt inaktiv. Die Verbindung zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg der Apoptose in Typ 2 Zellen wird unterbrochen (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001; Ravi & Bedi, 2002).
- Ein anderer Mechanismus ist die Beeinflussung der Aktivität von Caspasen. So konnte die Phosphorylierung von Procaspase 2 durch CK2 gezeigt werden. Nach Hemmung von CK2 wird die dephosphorylierte Procaspase 2 aktiviert und führt zur Spaltung und Aktivierung von Procaspase 8 (Shin et al., 2005).
- Das Caspase 8-inhibitorische Protein ARC liegt in seiner inaktiven Form im Zytoplasma vor. Nach Phosphorylierung durch CK2 transloziert ARC zum Mitochondrium und bindet an Caspase 8, wodurch deren Aktivität gehemmt wird (Li et al., 2002).
- Des Weiteren kann CK2 auch den anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren. Hier wurden bisher drei mögliche Mechanismen beschrieben: Einmal die Destabilisierung des NF- κ B Inhibitorproteins I κ B α nach Phosphorylierung an dessen C-terminaler PEST-Domäne durch CK2

(Kato et al., 2003; Shen et al., 2001). Daneben beobachtete man bei Aktivierung von NF- κ B durch Interleukin-1 und TNF- α eine direkte CK2-vermittelte Phosphorylierung von RelA/p65 (Bird et al., 1997; Chantome et al., 2004; Wang et al., 2000). Als dritter Mechanismus konnte erst kürzlich in Mammakarzinomzellen die CK2-induzierte Expression von IKK-i/IKK- ϵ und dadurch vermittelter Aktivierung von NF- κ B gezeigt werden (Eddy et al., 2005). Die Aktivierung von NF- κ B beeinflusst daraufhin die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. So wird die NF- κ B-vermittelte Expression der anti-apoptotischen Proteine c-FLIP und BCL-X_L durch CK2 gefördert (Ravi & Bedi, 2002).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Einfluss der Protein Kinase CK2 auf die Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms wurde bisher noch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war die Auswirkungen auf Pankreaskarzinomzellen durch Hemmung der CK2 zu untersuchen. Dazu wurde die CK2-Aktivität in den Zellen mit spezifischen chemischen Inhibitoren, sowie mittels RNA-Interferenz gehemmt.

Weiterhin war die Frage eines Einflusses von CK2 bezüglich der TRAIL-Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen zu beantworten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Albumin, Bovine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Apigenin	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, Deutschland
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim, Deutschland
Blotting Grade – Blocker – Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosybezimidazole	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
D-MEM Medium	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
FuGene6	Roche, Mannheim, Deutschland
Glycine	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Höchst Reagenz H33342	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumzitat Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim, Deutschland
Oligofectamin TM	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM [®]	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Passiv Lyse Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
D-PBS	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMFS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
Precision Plus Protein TM Standards All Blue	Bio-Rad, München, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

RPMI 1640 Medium	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Salmon Sperm DNA Solution	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio; USA
Streptavidin, Alexa Fluor® 680 conjugate	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TRAIL, Human, Recombinant, E.coli	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, entionisiert	DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
zVAD fmk	Biomol, Hamburg, Deutschland

Folgende Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen: KH_2PO_4 , NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , Ethanol, Methanol, Salzsäure, Natronlauge, Isopropanol, Eisessig, Glycerin (Glycerol).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Whatman-Papier	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	TPP® AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Kommerziell erhältliche Kits

Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche, Mannheim, Deutschland
Chemiluminescent Detection Kit	
GEArray® AmpoLabeling-LPR Kit	SuperArray Bioscience Corporation (BIOMOL GmbH, Hamburg, Deutschland)
GEArray™ Q and S Series Kits	
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.4 Geräte

Anthos Microplate Reader 2001	Anthos, Köln, Deutschland
CO ₂ -Begasungsbrutschrank HERAccl® 240	Thermo Electron (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
Hoefer™ HE33 Mini Horizontal Submarine Unit	Amersham, Freiburg, Deutschland
Hoefer™ Dual Gel Caster	Amersham, Freiburg, Deutschland

Hoefer™ SE 250 /SE260	Amersham, Freiburg, Deutschland
Hybridisierungssofen Mini OV2	Biometra, Göttingen, Deutschland
Digitalkamera PowerShot G5	Canon, Krefeld, Deutschland
Luminometer LB 9501	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Odyssey® Infrared Imaging System	Licor, Bad Homburg, Deutschland
GeneQuant™ pro RNA/DNA Calculator	Biochrom LTD, Cambridge, England
Semi-Dry-Blottingapparatur	Kreutz, Reiskirchen, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Electron (Kendro), Langenselbold, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV Transilluminator	Bio-Rad, München, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Lösungen und Puffer

Puffer für Western Blot

Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
Laufpuffer (10fach)	35mM SDS, 0,25M TRIS/HCl, 2M Glycin
Transferpuffer	39mM Glycin, 48 mM TRIS/HCl, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol, pH 8,3
PBS (10fach)	1,4M NaCl, 27mM KCl, 40mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	0,35M SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,3M TRIS/HCl, 0,7mM Bromphenolblau Na-Salz, 5% (w/v) Mercaptoethanol, pH 6,8
IP-Puffer	50mM HEPES (pH 7,9), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) Glycerin
Waschpuffer	1x PBS, 0,1% (v/v) NP40
Stripping-Puffer (Odyssey)	25mM Glycin, 1-2% (w/v) SDS, pH 2

Lösungen für GEArray™ Genexpressionssystem

SSC (20fach)	1M NaCl, 300mM Natriumzitat Dihydrat, pH 7,0, autoklaviert
20% SDS	200g SDS zu 1l Wasser (0,7M)

Puffer für Agarose Gel

TBE Puffer	0,89M TRIS/HCl, 20mM EDTA, 0,89M Borsäure, pH 8,0
Loading Buffer Orange G (6fach)	60% (v/v) Glycerin, 60mM EDTA, 0,24% (w/v) Orange G, 0,12% (w/v) SDS

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper (mit verwendeter Verdünnung)

Hase anti-BID (Human Specific)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:500
Maus monoclonal anti-PARP	BD Pharmingen, San Diego, Ca, USA	1:1000
Hase anti-BCL-X _L	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:500
Maus anti-Casein Kinase II α/α'	BD Pharmingen, San Diego, Ca, USA	1:500
Maus anti- β -Actin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:2000

Sekundäre Antikörper (mit verwendeter Verdünnung)

AlexaFluor680-coupled	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:2000
IRDye TM 800-coupled	Rockland Inc., Gilbertsville, PA, USA	1:2000

2.1.7 siRNA (small interference RNA)

Die siRNAs wurden bei Ambion (Austin Texas, USA) erworben und als 40 μ M Stock bei -80 °C aufbewahrt. Die Zielsequenzen der verwendeten siRNAs sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt:

Kontroll-siRNA	5' AACAGTCGCGTTTGC GACTGG 3'
CK2 α +411	5' AAGCAGGGCCAGAGTTTACAC 3'
CK2 α' +49	5' AACAGTCTGAGGAGCCGCGAG 3'

Tabelle 1: siRNA Zielsequenzen (Matrizenstrang)

2.1.8 Zelllinien

Es wurden ausschließlich humane Pankreaskarzinomzelllinien verwendet. Die Zellen wurden bezogen bei ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA; USA) (LGC Promochem, Wesel, Deutschland).

Die Kultivierung von MiaPaCa2- und PaTu-2 Zellen erfolgte in DMEM Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und unter 5% CO₂-Begasung.

Die Kultivierung von DanG Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und unter 5% CO₂-Begasung.

2.2 Experimentalmethoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Die Zellen wurden mit den angegebenen Medien in Brutschränken kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen in Sterilwerkbänken. Regelmäßig wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und passergiert. Zur Passage und Aussaat der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin abgelöst und vereinzelt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet.

2.2.1.2 Chemische Hemmung der Protein Kinase CK2

Als spezifische chemische Inhibitoren gegen CK2 wurden 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosybezimidazole (DRB) und Apigenin verwendet. Beide wurden nach Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Es wurden ein 100 mM Stock von DRB und ein 20 mM Stock von Apigenin hergestellt. Diese wurden bei -20 °C aufbewahrt. Zur Behandlung der Zellen wurde für jede der verwendeten Konzentrationen eine Verdünnung mit dem entsprechenden Medium hergestellt, das alte Medium von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für die angegebenen Zeiträume auf den Zellen belassen.

2.2.1.3 Chemische Hemmung der Caspasen

Zur Hemmung der Caspasen wurde der Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk verwendet. Dieser wurde als 20 mM Stock in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Behandlung der Zellen wurde eine Verdünnung auf 50 µM mit dem verwendeten Medium, indem der DRB bzw. Apigenin in der entsprechenden Konzentration bereits gelöst war, hergestellt. Der Ansatz wurde, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, auf die Zellen gegeben und für die angegebenen Zeiträume belassen.

2.2.1.4 TRAIL

Die Stimulierung von TRAIL-Rezeptoren erfolgte mit humanem rekombinantem TRAIL von *Escherichia coli* Bakterien. Dieses wurde als Stock mit einer Konzentration von 100 ng/µl in PBS gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Für die Behandlung der Zellen wurde TRAIL direkt mit dem entsprechenden Medium weiter verdünnt. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit TRAIL und den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren wurde der Ansatz mit den verwendeten Konzentrationen in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Der Ansatz wurde, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, auf die Zellen gegeben und für die angegebenen Zeiträume belassen.

2.2.1.5 siRNA-Transfektion

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Bei der Aussaat der Zellen wurde auf eine geringe Zelldichte geachtet, um damit die Effizienz des Knock-downs durch die siRNA zu optimieren. In 96-Wellplatten wurden 2.000 Zellen pro Well und in 6-Wellplatten 50.000 Zellen pro Well ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit Medium ohne FCS gewaschen, um sämtliche Serumrückstände zu entfernen. Anschließend wurden bei 96-Wellplatten 80 µl und bei 6-Wellplatten 800 µl serumfreies Medium vorgelegt.

Die Transfektion von siRNAs in die Zellen erfolgte mit OligofectaminTM nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden pro Well 200 nM siRNA eingesetzt. OligofectaminTM wurde mit Opti-MEM[®] 5 Minuten vorinkubiert und dann zu dem Ansatz aus siRNA und Opti-MEM[®] zugegeben. Nach erneuten 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Die Transfektion wurde nach 4 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank durch Medium mit 20% (w/v)

FCS gestoppt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium der transfizierten Zellen durch Frisches mit 10% (w/v) FCS ersetzt.

2.2.1.6 Ganzzellextrakte

Für die Gewinnung von Ganzzellextrakten wurden die Zellen vor der Ernte mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde IP-Puffer (mit 0,5 mM PMFS, 1 mM DTT und ggf. mit 1:100 verdünntem Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II) auf die Zellen gegeben und anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat 15 Minuten bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte durch die Methode nach Bradford (1976). Dazu wurden in eine Mikrotiterplatte je Well 300 µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Farbstoffkonzentrates pipettiert. Die Standardreihe wurde aus Rinderalbumin erstellt. Die Absorbtion der Farbreaktion wurde im Mikroplatten Absorptionsphotometer Anthos 2001 bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt und konnte daraufhin mit Hilfe der Standardreihe in die Proteinkonzentration umgerechnet werden. Anschließend wurde in allen Proben eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95 °C wurden die Extrakte bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus Ganzzellextrakten erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wurden, je nach Molekulargewicht der Proteine, Trenngele zwischen 7,5% bis 15% Acrylamid verwendet:

	Trenngele					Sammelgel
	7,5%	9%	10%	12%	15%	
ddH ₂ O	2,45 ml	2,35 ml	2,05 ml	1,7 ml	1,25 ml	1,5 ml
Trenngel-/ Sammelgelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	650 µl
Acrylamidlösung 30%	1,25 ml	1,35 ml	1,65 ml	2,0 ml	2,5 ml	375 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
APS 10%	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	12,5 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5 µl

Tabelle 2: Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel (Mengen beziehen sich auf 5,5 x 8,5 x 0,075 cm Gele)

Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet. Die Polymerisation startete nach Zugabe von APS und TEMED. Die fertige Trenngellösung wurde in eine Hoefer™ Dual Gel Caster gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 20 Minuten Polymerisation konnte das Isopropanol entfernt und mit Sammelgellösung überschichtet werden, in welches der Probenkamm eingeführt wurde. Nach entfernen des Kammes wurden die Probenaschen mit Laufpuffer gewaschen. Die Ganzzellextrakte wurden vor dem Auftragen erhitzt (5 Minuten, 95 °C) und bei einer konstanten Spannung zwischen 120-160V in einer Gel-Laufapparat Hoefer™ SE 250 bzw. SE260 aufgetrennt.

Blotten. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe einer Semi-Dry-Blottapparat auf eine Immobilon-P PVDF Membran übertragen. Dazu wurde das Trenngel für 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Die Membran wurde zuerst in Methanol aktiviert, dann in ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer gelegt. Das Blotten erfolgte je nach Proteingröße zwischen 20 und 45 Minuten bei 0,8 mA/cm².

Immundetektion. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockingpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer) für 45 Minuten geblockt. Anschließend wurde der erste Antikörper in 3 ml Blockingpuffer verdünnt auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Behandlung mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran in Waschpuffer (3x 10 Minuten) gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper verwendet. Die 60minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2.000 in Blockingpuffer) erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Membran wurde daraufhin wieder, wie oben beschrieben, lichtgeschützt gewaschen. Anschließend konnte die Intensität der Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen 700 nm bzw. 800 nm mit dem Odyssey® Infrared Imaging System gescannt werden.

Strippen. Nach erfolgter Antikörperreaktion können diese wieder von der Membran abgewaschen werden (Strippen), um mit einem anderen Antikörper eine Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran durch zu führen. Dazu wurde die Membran bei Raumtemperatur 20 Minuten in Stripping-Puffer geschwenkt, kurz in Waschpuffer gewaschen und anschließend wieder für 45 Minuten in Blockingpuffer geblockt. Daraufhin erfolgte eine erneute Immundetektion, wie oben beschrieben.

2.2.3 Hoechst Färbung

Die Färbung der Zellkerne nach Hoechst erfolgte in 96 Wellplatten. Dazu wurden für die Behandlung mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren 4.000 Zellen pro Well und für die Transfektion mit siRNA 2.000 Zellen pro Well ausgesät und nach 24 Stunden entsprechend behandelt. Zur Darstellung des Zellkernes wurde die DNA mit dem Hoechst Reagenz H33342 gefärbt. Dazu wurde ein 2 mM Stock in einer Endverdünnung von 1:500 zu dem Medium gegeben. Nach 15 Minuten konnte die Kernstruktur in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Apoptotische Zellen wurden anhand der veränderten Kernstruktur identifiziert. Zur quantitativen Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen wurden in ein bis zwei Gesichtsfeldern 250 bis 350 Zellen und gleichzeitig alle apoptotisch veränderten Zellen gezählt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.

2.2.4 Luciferasereporter Assay

24 Stunden vor der Transfektion wurden in 12-Wellplatten 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und pro Well 1 ml Medium vorgegeben. Das pGL3-3 κ B-Luc Reporter gen wurde bereits früher beschrieben (Hausler et al., 2005). Die Transfektion des Plasmides erfolgte mit FuGene6 nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden pro Well 500 ng pDNA eingesetzt. Der Ansatz aus serumfreien Medium, FuGene6 und pDNA wurde 20 Minuten vorinkubiert, bevor pro Well je 100 μ l zugegen wurden.

Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für 6 Stunden mit den angegebenen chemischen CK2 Inhibitoren behandelt. Anschließend wurden die behandelten Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 15 Minuten in Lysepuffer gelöst und geerntet. Nach 20 Minuten auf Eis wurde das Lysat 15 Minuten bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Aktivität der Luciferase wurde mit einem Luciferase Assay System am LB 9501 Luminometer bestimmt. Die Versuche wurden im Triplikate durchgeführt.

2.2.5 MTT Zellviabilitätsassay

Für den MTT Zellviabilitätsassay wurden 4.000 Zellen bei Behandlung mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren bzw. 2.000 Zellen bei Transfektion mit siRNA im 96-Wellplatte pro Well als Triplikate ausgesät und nach 24 Stunden

entsprechend behandelt. Nach Inkubation der Zellen wurde der Assay gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu pipettierte man pro Well 10 µl MTT labeling reagent zum Medium (Endkonzentration 0,5 mg/ml). Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank gab man pro Well 100 µl Solubilization solution dazu, um die entstandenen Formazankristalle aufzulösen und inkubierte die Zellen über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde die spektrophotometrische Absorption im Mikroplatten Absorptionsphotometer Anthos 2001 bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde eine Wellenlänge von 650 nm verwendet.

2.2.6 Genexpressionsanalyse mittels eines nichtradioaktiven cDNA-Arrays

Für die Genexpressionsanalyse verschiedener in der Apoptose involvierter Gene wurde der „GEArray™ Q Series Human Apoptosis Gene Array“ verwendet. Mit diesem konnten 96 für die Apoptose relevante Gene auf Expressionsveränderungen untersucht werden. Es waren dazu drei identische, mit je 4 cDNA-Spots pro Gen beschichtete, Nylonmembranen vorhanden. An die cDNA-Spots bindet Biotin-markierte cDNA, abhängig von ihrer Menge. An das Biotin bindet spezifisch Streptavidin, das mit fluoreszierendem Farbstoff markiert ist. Mit Hilfe der Intensität der Fluoreszenz lassen sich Aussagen über Genexpressionsänderungen machen.

RNA Isolierung. Für die Durchführung der Expressionsanalyse musste als erstes die RNA aus den Kontroll- und den behandelten Zellen isoliert werden. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm etwa 60 - 70% konfluent ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren behandelt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zellernte. Mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits wurde die Gesamt-RNA nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Medium wurde dazu von den Zellen abgesaugt und diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale mit 600 µl RLT Puffer (mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT Puffer) pro Schale lysiert und mit einem Zellschaber abgekratzt. Das Zelllysate wurde zum homogenisieren in eine QIAshredder Spinsäule gegeben und für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Zu dem homogenisierten Zelllysate wurde je 600 µl 70%iger Ethanol zugegeben, um die selektive Bindung der RNA an der RNeasy Silicagel-Membran zu optimieren. Danach

wurde jeweils 700 µl des Zellysates auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 13.600 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt wiederholt, bis kein Zellysat mehr vorhanden war. Danach wurde die an der Membran gebundene RNA gewaschen, indem auf die Säulen je 350 µl RW1 Puffer gegeben und 15 Sekunden bei 13.600 rpm zentrifugiert wurde. Die RNA wurde anschließend noch mit DNase behandelt, um auch kleinste Reste von DNA zu entfernen. Nach Angaben des Herstellers wurde dazu das QIAGEN RNase-Free DNase Set verwendet. Dazu wurde auf jede Membran 80 µl DNase-I-Mischung (10 µl DNase-I-Stammlösung und 70 µl RDD Puffer) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNase wieder mit RW1 Puffer (siehe oben) abgewaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation bei 13.600 rpm für zuerst 15 Sekunden und dann 2 Minuten. Daraufhin wurden die Säulen zum Trocknen der Membran nochmals für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Zum Eluieren der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und nach kurzer Inkubation für 1 Minute bei 13.600 rpm zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden die RNA Proben 1:20 mit Wasser verdünnt und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde zusätzlich mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Die Nukleinsäuren wurden dazu auf ein 1%igem Agarose Gel mit Zusatz von Ethidiumbromid aufgetragen. Die Agarose wurde in 1fach TBE Puffer gelöst. Pro Probe wurde 1 µl RNA Probe mit 7 µl Wasser und 2 µl Loading Buffer Orange G (6fach) gemischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V in 1fach TBE Puffer. Das Gel wurde anschließend mit einer Digitalkamera unter UV-Licht aufgenommen. Dabei wird das Verhältnis der 28S zur 18S Bande, welches idealerweise 2:1 betragen sollte, beurteilt. Des Weiteren wird auf Verunreinigungen in der Laufstrecke geachtet.

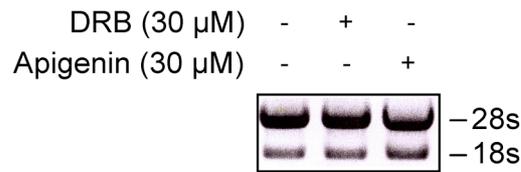


Abbildung 2: Gelelektrophoretische Kontrolle der Reinheit der isolierten RNA. MiaPaCa2 Zellen wurden mit 30 μ M DRB und Apigenin behandelt und nach 24 Stunden zur RNA Isolierung geerntet. Die Reinheit der RNA wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1%igem Agarose Gel mit Ethidiumbromid kontrolliert. Dargestellt sind die 28S und 18S Bande der isolierten RNA

Herstellung der Biotin-markierten cDNA. Für den Array wurde die RNA mit dem „GEArray™ AmpoLabeling Kit“ nach Angaben des Herstellers in Biotin-markierte cDNA umgeschrieben. Als erstes erfolgte mittels reverser Transkriptase das Umschreiben der RNA in cDNA. Folgender Annealingansatz wurde dazu verwendet: 0,5 - 5 μ g der Proben-RNA und 1 μ l RT-Primer (P) wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Anschließend kamen die Proben für 3 Minuten zur Denaturierung bei 70 °C in einen Thermocycler und wurden für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde der RT Cocktail vorbereitet:

	1fach	2fach	4fach
Puffer BN	4 μ l	8 μ l	16 μ l
RNase freies Wasser	4 μ l	8 μ l	16 μ l
RNase Inhibitor (RI)	1 μ l	2 μ l	4 μ l
Reverse Transkriptase (RE)	1 μ l	2 μ l	4 μ l
Endvolumen	10 μ l	20 μ l	40 μ l

Tabelle 3: RT-Cocktail

Zu jedem Annealing Ansatz wurden 10 μ l des RT-Cocktails pipettiert. Der Ansatz wurde für weitere 25 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf 85 °C erhitzt, um die RNA zu hydrolysieren und die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt.

Die Markierung der cDNA mit Biotin-16-dUTP erfolgte während einer linearen Polymerase Kettenreaktion. Dazu wurde zu jedem Reverse Transkriptions Ansatz 30 μ l LPR Cocktail zugegeben:

	1fach	2fach	4fach
Puffer L	18 µl	36 µl	72 µl
Puffer AF	9 µl	18 µl	36 µl
Biotin-16-dUTP	2 µl	4 µl	8 µl
DNA	1 µl	2 µl	4 µl
Endvolumen	30 µl	60 µl	120 µl

Tabelle 4: LPR Cocktail

Anschließend erfolgte die Linear Polymerase Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm: 5 Minuten bei 85 °C Denaturierung, dann folgten 30 Zyklen mit Denaturierung (85 °C/1 min), Annealing (50 °C/1 min) und Komplettierung (72 °C/1 min). Nach den 30 Zyklen wurde für die abschließende Komplettierung die Temperatur noch für 5 Minuten bei 72 °C gehalten und dann auf 4 °C abgesenkt.

Kontrolle der Biotin-markierten cDNA. Um die gleichmäßige Markierung der cDNA mit Biotin zu kontrollieren wurde eine 4 stufige Verdünnungsreihe einer jeden Probe mit Gel Loading Puffer hergestellt (1:80, 1:320, 1:1.280, 1:5.120). Von jeder Verdünnungsstufe wurde 1 µl auf eine HyBond Nylonmembran aufgetragen und 10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die Biotin-markierte cDNA auf der Membran dargestellt und die Abnahme der Intensität entsprechend der Verdünnung beurteilt.

Hybridisierung. Als nächster Schritt erfolgte die Hybridisierung der Biotin-markierten cDNA mit den entsprechenden cDNA Spots auf der Nylonmembran. Zur Vorbereitung erfolgte eine Vorhybridisierung der Membranen mit Salomon Sperm DNA, um unspezifische Bindungen der Membranen zu blockieren. Dazu wurden die Membranen in den mitgelieferten Hybridisierungsröhrchen mit 5 ml entionisiertem Wasser angefeuchtet. Zum Denaturieren der Salomon Sperm DNA wurde diese für 5 Minuten auf 100 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gelegt. Die GEApreehyb Vorhybridisierungslösung wurde hergestellt, indem die Salomon Sperm DNA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml in der auf 60 °C erwärmten GEAhyp Hybridisierungslösung gelöst wurde. Die Temperatur wurde dabei immer auf 60 °C gehalten. Das Wasser wurde aus den Hybridisierungsröhrchen entfernt und zu jeder Membran wurden 2 ml der GEApreehyb Lösung gegeben. Die Röhrchen wurden vorsichtig geschüttelt und anschließend für 1 - 2 Stunden im Hybridisierungsofen bei

5 - 10 rpm und 60 °C umgewälzt. Die Biotin-markierte cDNA wurde für 5 Minuten bei 97 °C denaturiert und dann komplett in 0,75 ml 60 °C warmer GEAPrehyb Lösung gegeben. Die GEAPrehyb Vorhybridisierungslösung wurde durch die Lösung mit der Biotin-markierten cDNA ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im Ofen bei 60 °C und einer Umwälzung von 5 - 10 rpm. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen mit zwei speziellen 60 °C warmen Waschlösungen gewaschen:

Waschlösung 1	100 ml SSC Lösung (20fach) und 50 ml 20%ige SDS Lösung auf 1 l Wasser (2fach SSC und 1% SDS)
Waschlösung 2	5 ml SSC Lösung (20fach) und 25 ml 20%ige SDS Lösung auf 1 l Wasser (0,1fach SSC und 0,5% SDS)

Tabelle 5: Waschlösungen für GEArray™ Genexpressionssystem

Die Membranen wurden zuerst zweimal mit je 5 ml Waschlösung 1 und anschließend zweimal mit je 5 ml Waschlösung 2 bei 60 °C und einer Umwälzung von 20 - 30 rpm gewaschen.

Darstellung der Biotin-markierten cDNA. Die Darstellung der Biotin-markierten cDNA erfolgte mit fluoreszierendem-Farbstoff-markiertem Streptavidin (Streptavidin-Alexa Fluor 680), wobei das Streptavidin spezifisch an Biotin bindet. Zuerst wurden die Membranen mit je 2 ml GEAblocking Lösung Q für 40 Minuten unter ständigem schütteln (20 - 30 rpm) geblockt. Das Streptavidin-Alexa Fluor 680 (Konzentration 2 mg/ml) wurde im 1fach- GEA Puffer F im Verhältnis 1:15.000 gelöst. Danach wurde die GEAblocking Lösung Q verworfen und durch 2 ml Puffer F mit dem Streptavidin ersetzt. Die Membranen wurden für 10 Minuten unter leichtem Schütteln lichtgeschützt inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschrte. Begonnen wurde mit 4 Waschschrten je 5 Minuten mit jeweils 4 ml 1fach Puffer F. Dann wurden die Membranen zweimal mit je 3 ml Puffer G ab gespült und abschließend für 3 Minuten in 0,5%iger SDS Lösung gewaschen. Anschließend konnte die Intensität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 680 nm mit dem Odyssey® Infrared Imaging System dargestellt werden.

Auswertung. An die cDNA Spots auf den Membranen bindet die markierte cDNA aus den Proben. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei mit der vorhandenen Menge an cDNA in der Probe. Die Auswertung der Intensität bei den einzelnen Spots erfolgte mit Hilfe der Software des Odyssey® Infrared Imaging Systems. Damit lassen

sich Aussagen über Genexpressionsänderungen machen. Da die Membranen nicht direkt vergleichbar sind, erfolgte eine Normierung über eines der Haushaltsgene. Die Intensität der Gene des Arrays mit der Kontroll-Probe wurde auf 1 gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Hemmung der Protein Kinase CK2 induziert Apoptose in Pankreaskarzinomzellen

Um die Effekte nach Hemmung von Protein Kinase CK2 bezüglich der Viabilität von Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurde diese sowohl chemisch gehemmt als auch die Expression der katalytischen Untereinheiten mittels RNA-Interferenz herunterreguliert.

3.1.1 Die spezifischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin verringern die Überlebensfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen

Um die Bedeutung von CK2 beim Pankreaskarzinom zu untersuchen wurden die zwei Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und DanG mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin behandelt. Das Zellüberleben wurde daraufhin nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden bei ansteigender Konzentration der Inhibitoren mittels des MTT Zellviabilitätsassays bestimmt.

Dabei zeigte sich bei MiaPaCa2 Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der lebenden Zellen im MTT Zellviabilitätsassays. Nach 24 Stunden mit der höchsten verwendeten Konzentration von DRB (200 μM) war der Anteil der lebenden Zellen auf 51% und nach 48 Stunden auf 31% gesunken. Bei der Behandlung der Zellen mit Apigenin zeigte sich ebenfalls eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der lebenden Zellen auf 45% nach 24 Stunden und auf 33% nach 48 Stunden bei der höchsten verwendeten Konzentration von 150 μM .

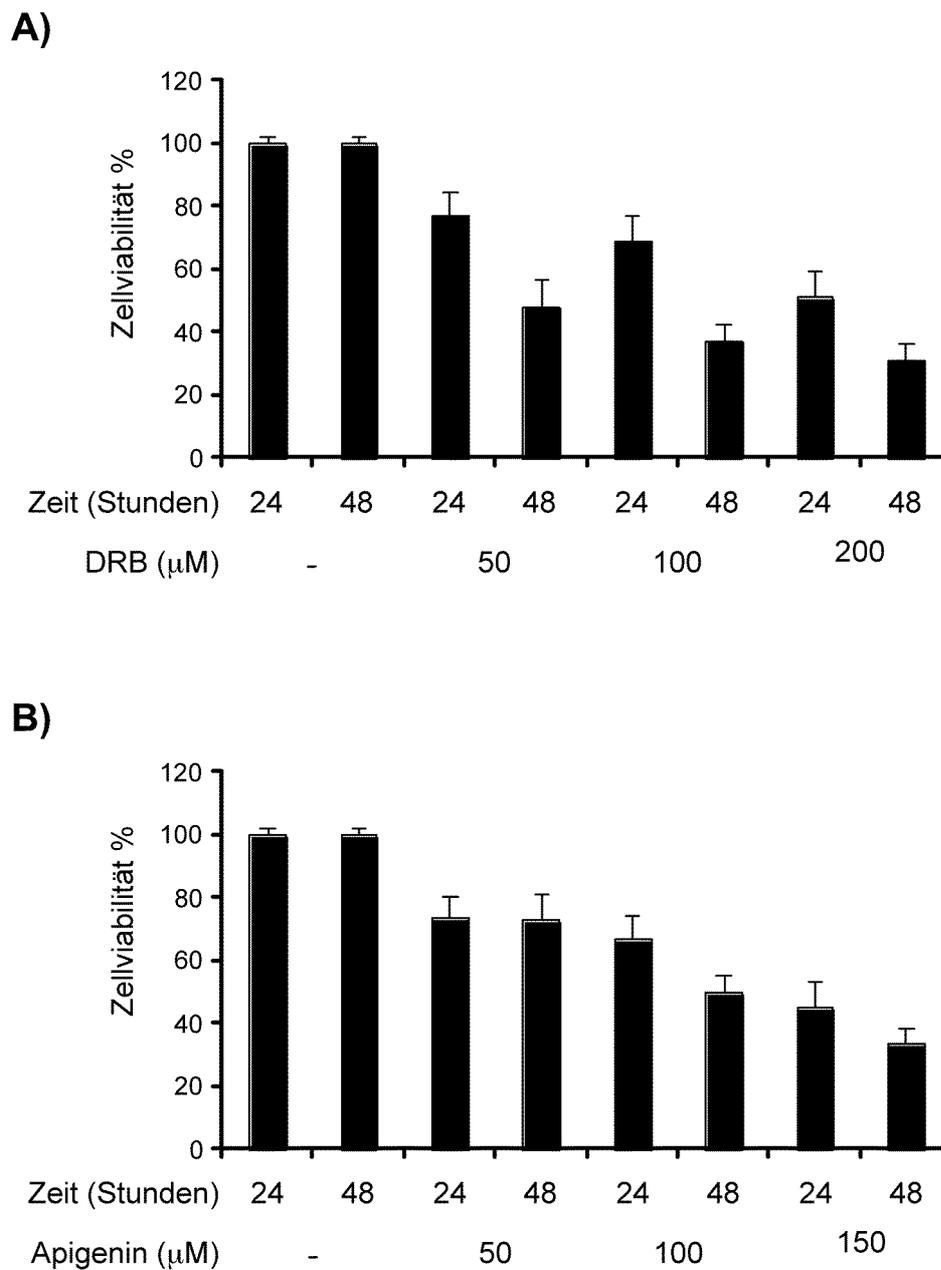


Abbildung 3: Die Hemmung von CK2 führt zur Reduktion der Zellviabilität von MiaPaCa2 Zellen. **A)** MiaPaCa2 Zellen wurden mit 50, 100 und 200 µM DRB behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt. **B)** MiaPaCa2 Zellen wurden mit 50, 100 und 150 µM Apigenin behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei DanG Zellen beobachtet werden. Auch hier fiel der Anteil an lebenden Zellen bei der Behandlung mit DRB und Apigenin konzentrations- und zeitabhängig ab. Nach 24 Stunden Inkubationszeit waren mit DRB in der höchsten Konzentration von 200 µM noch 48% und mit Apigenin in der höchsten Konzentration von 150 µM noch 55% lebende Zellen im MTT-Assay nachweisbar.

Der Anteil der lebenden Zellen fiel nach 48 Stunden weiter auf 22% bei Verwendung von DRB (200 μM) und auf 27% bei Verwendung von Apigenin (150 μM) ab. Damit sieht man in beiden Zelllinien nach chemischer Hemmung von CK2 eine deutliche zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme an lebenden Zellen.

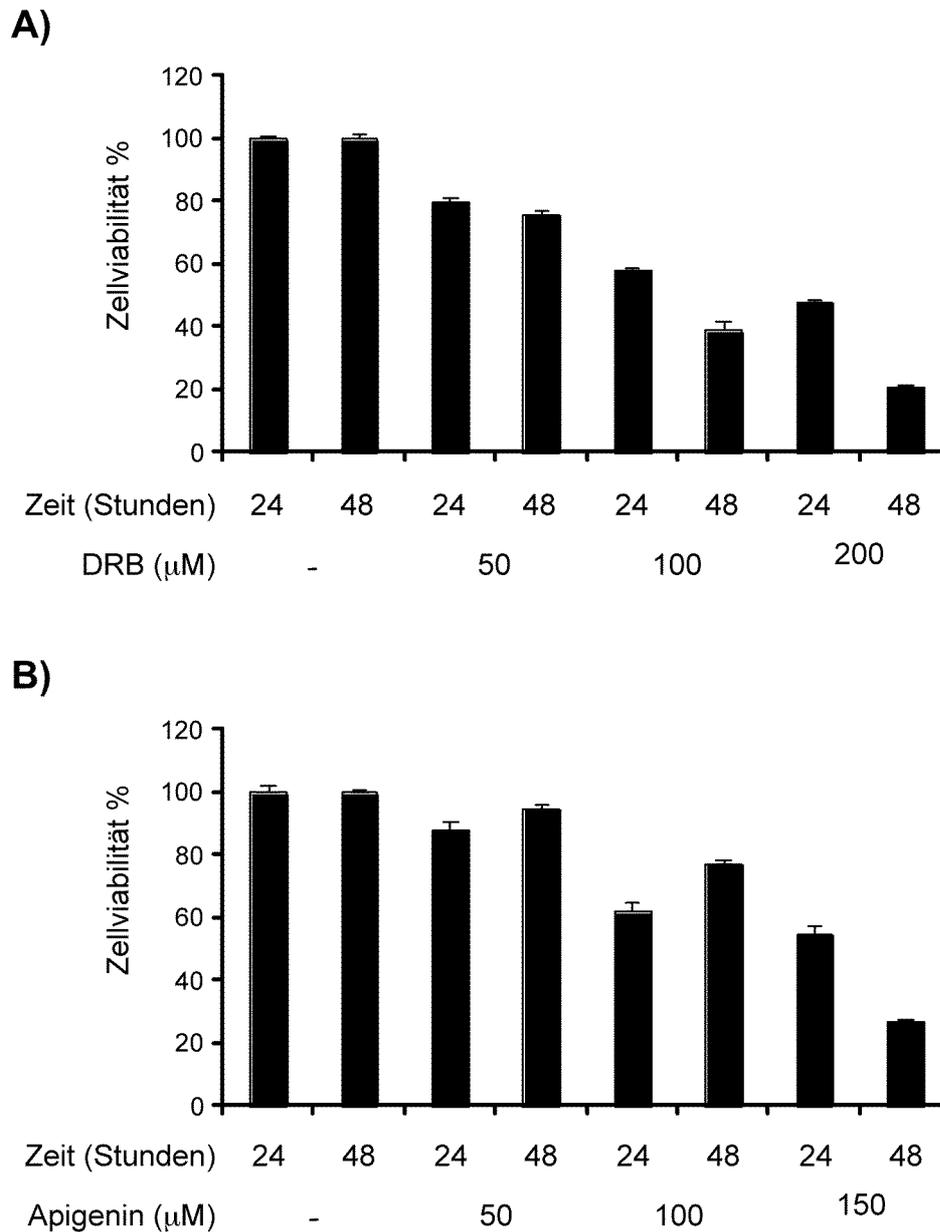


Abbildung 4: Die Hemmung von CK2 führt zur Reduktion der Zellviabilität von DanG Zellen.
A) DanG Zellen wurden mit 50, 100 und 200 μM DRB behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt. **B)** DanG Zellen wurden mit 50, 100 und 150 μM Apigenin behandelt. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt.

3.1.2 Die Abnahme der Zellvitalität durch Hemmung der CK2 beruht auf Caspase-abhängiger Apoptose

Die Reduktion der Viabilität der Pankreaskarzinomzellen nach der Behandlung mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin kann verschiedene Ursachen, wie Proliferationshemmung oder Apoptose, haben. Daher wurden die MiaPaCa2 Zellen nach der Behandlung mit den CK2 Inhibitoren zunächst auf apoptotische Veränderungen untersucht.

Die Zellen wurden wie gewohnt mit DRB und Apigenin behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellkerne mit Hoechst Reagenz angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die typischen apoptotischen Veränderungen untersucht (siehe Abbildung 5). Nach Hemmung von CK2 mit DRB (200 μM) und Apigenin (150 μM) erkennt man in Abbildung 5B und D als Nachweis für Apoptose die typischen apoptotischen Veränderungen, wie Schrumpfung der Zellkerne und Kondensation des Chromatins. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit DRB bzw. Apigenin und dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk waren die apoptotischen Veränderungen im Zellkern nicht nachweisbar.

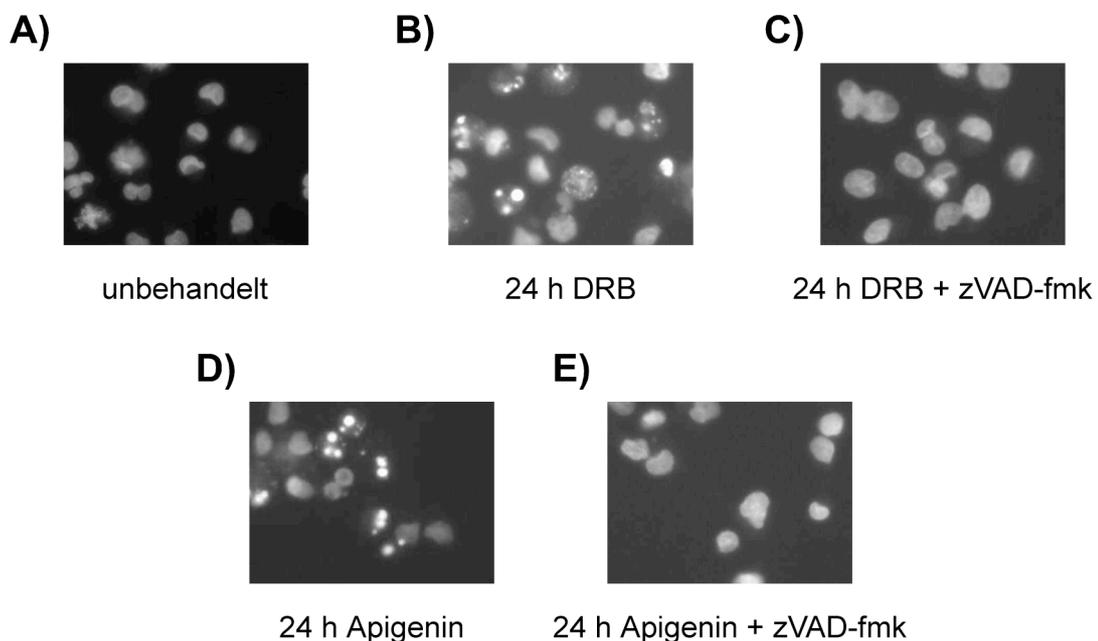


Abbildung 5: Die Hemmung von CK2 führt in Pankreaskarzinomzellen zu typisch apoptotischen morphologischen Veränderungen. Die Abbildungen zeigen Mikrofotografien in der Fluoreszenzmikroskopie (Originalvergrößerung 40fach) von MiaPaCa2 Zellen nach Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz. Dabei zeigen die einzelnen Fotografien unbehandelte Zellen (**A**), Zellen die 24 Stunden mit 200 μM DRB (**B**) und mit 150 μM Apigenin (**D**), sowie gleichzeitig mit 50 μM Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk (**C** und **E**) behandelt wurden.

Um das Ausmaß der Apoptose nach Hemmung der CK2 zu quantifizieren wurden die MiaPaCa2 Zellen für 24 und 48 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von DRB und Apigenin behandelt. Anschließend wurden die Zellkerne wieder mit Hoechst Reagenz angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Es zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der apoptotischen Zellen nach Hemmung von CK2 mit DRB, die bei der höchsten Konzentration von 200 μM nach 24 Stunden auf 35% und nach 48 Stunden auf 54% anstieg. Bei gleichzeitiger Behandlung mit DRB (200 μM) und dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk wurde der Anteil der apoptotischen Zellen wieder auf 3,6% nach 24 Stunden bzw. 5,4% nach 48 Stunden gesenkt. Bei Hemmung von CK2 mit Apigenin (150 μM) stieg der Anteil apoptotischer Zellen ebenfalls konzentrations- und zeitabhängig bis auf 48% nach 24 Stunden und auf 71% nach 48 Stunden an. Wiederum konnte der Anteil an apoptotischen Zellen durch die gleichzeitige Behandlung mit Apigenin (150 μM) und dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk auf 12% nach 24 Stunden bzw. 18% nach 48 Stunden gesenkt werden.

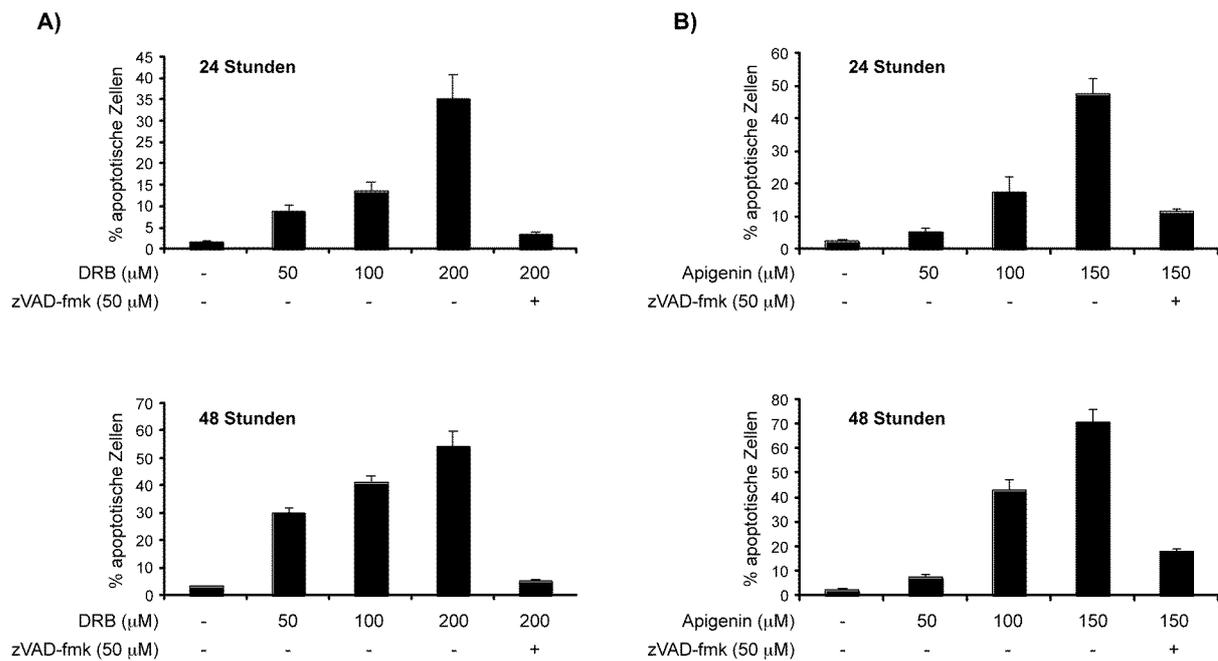


Abbildung 6: Spezifische chemische CK2 Inhibitoren induzieren in Pankreaskarzinomzellen konzentrations- und zeitabhängig Apoptose. A) MiaPaCa2 Zellen wurden mit 50, 100 und 200 µM DRB behandelt. Nach 24 Stunden (oberes Diagramm) und nach 48 Stunden (unteres Diagramm) wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz in der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. **B)** MiaPaCa2 Zellen wurden mit 50, 100 und 150 µM Apigenin behandelt. Nach 24 Stunden (oberes Diagramm) und nach 48 Stunden (unteres Diagramm) wurde wiederum der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Die Caspaseabhängigkeit wurde durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 50 µM Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk demonstriert.

Als weiteren Nachweis apoptotischer Veränderung nach Hemmung der CK2 wurde die Spaltung von PARP untersucht. Dieses Substrat der Caspasen wird spezifisch während der Apoptose gespalten. Dazu wurden MiaPaCa2 Zellen wie gewohnt 24 Stunden mit den CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin behandelt. Aus den Zellen wurden Ganzzellextrakte hergestellt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich sowohl nach Hemmung von CK2 mit DRB als auch mit Apigenin, bei steigender Konzentration eine zunehmende Spaltung von PARP. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit DRB bzw. Apigenin und dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk konnte die Spaltung von PARP verhindert werden.

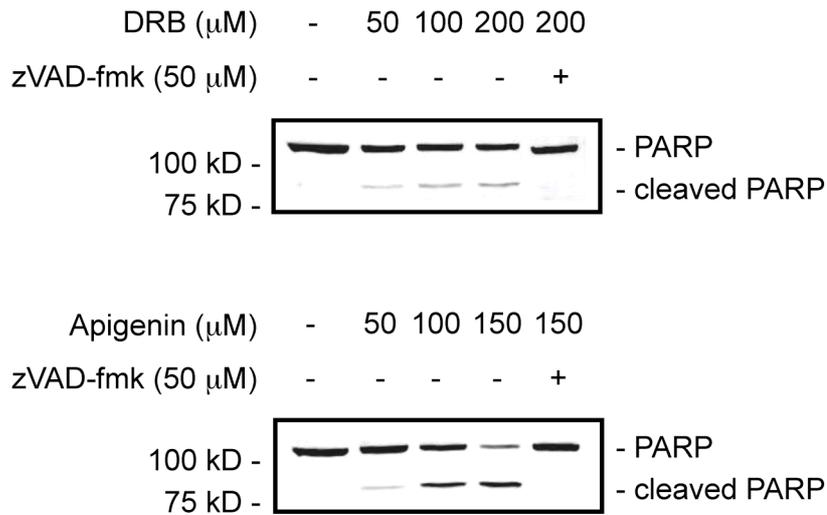


Abbildung 7: Die Hemmung von CK2 führt zu caspaseabhängiger Spaltung von PARP.
MiaPaCa2 Zellen wurden 24 Stunden mit 50, 100, 200 μM DRB (obere Abbildung) und mit 50, 100, 150 μM Apigenin (untere Abbildung) behandelt. Die Spaltung von PARP wurde im Western Blot nachgewiesen. Die Caspaseabhängigkeit wurde durch gleichzeitige Behandlung mit 50 μM Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk demonstriert.

Um die zeitliche Kinetik der Apoptose nach Hemmung von CK2 mit DRB (200 μM) und Apigenin (150 μM) zu untersuchen, wurden MiaPaCa2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit den beiden CK2-Inhibitoren behandelt. Die Zellen wurden daraufhin für Ganzzellextrakte und anschließender Analyse im Western Blot geerntet. Als Beginn der Apoptose wurde der früheste Nachweis des 75 kD großen PARP-Fragmentes nach Spaltung von PARP gewertet. Hierbei zeigte sich der Beginn der Apoptose nach Hemmung der CK2 mit DRB (200 μM) bereits nach 6 Stunden und mit Apigenin (150 μM) nach 6 bis 8 Stunden.

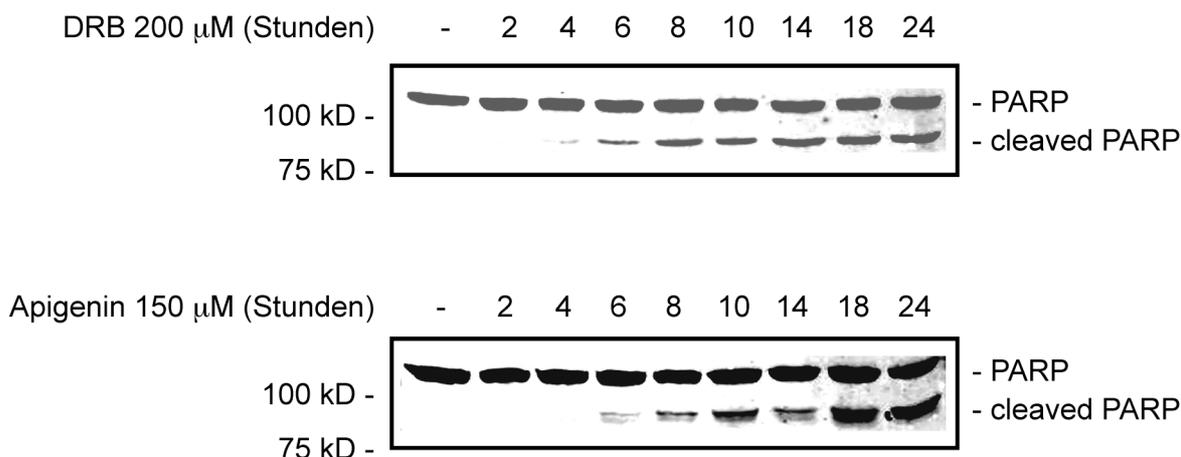


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des Apoptosebeginnes nach Hemmung von CK2. MiaPaCa2 Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit 200 µM DRB (obere Abbildung) und 150 µM Apigenin (untere Abbildung) behandelt. Die beginnende Apoptose wurde durch Nachweis des 75 kD großen PARP-Fragmentes bestimmt.

Somit führt die Behandlung der MiaPaCa2 Zellen mit den CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin zur Caspase-abhängigen Apoptose. Hierbei war die Apoptose schon 6 bis 8 Stunden nach Hemmung nachweisbar.

3.1.3 Die spezifischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin führen zur Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF-κB

Eine wichtige anti-apoptotische Strategie von CK2 ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Eddy et al., 2005; Landesman-Bollag et al., 2001; Romieu-Mourez et al., 2002; Shen et al., 2001).

Aus diesem Grund wurde in MiaPaCa2 Zellen die transkriptionelle Aktivität von NF-κB nach Hemmung der CK2 mit den spezifischen chemischen Inhibitoren (DRB und Apigenin) mittels eines pGL3-3xκB-Luc Reportergens (Hausler et al., 2005) in einem Luciferasereporter Assay untersucht. Da sich die ersten apoptotischen Veränderungen bereits nach 6 Stunden gezeigt haben (siehe 3.1.2), wurde die transkriptionelle Aktivität von NF-κB ebenfalls zu diesem Zeitpunkt bestimmt. Es zeigte sich bereits zu diesem Zeitpunkt bei Verwendung beider CK2 Inhibitoren eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF-κB. In der höchsten verwendeten Konzentration von DRB (200 µM) fiel die

Aktivität auf 33% und bei Verwendung von Apigenin (150 μM) auf 9% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

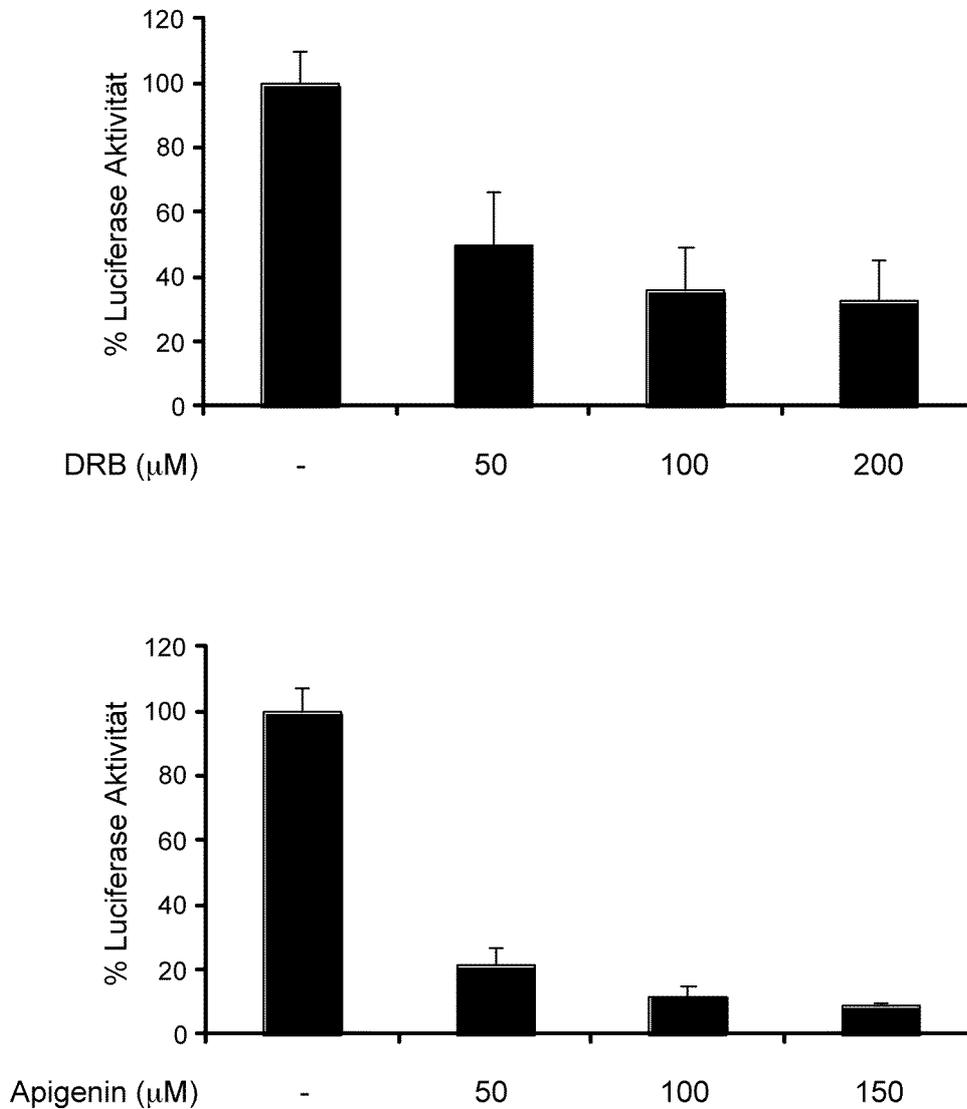


Abbildung 9: Die Hemmung von CK2 bewirkt eine Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. MiaPaCa2 Zellen wurden mit 500 ng eines κ B-Luciferasereportergens transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 6 Stunden mit 50, 100, 200 μM DRB (oberes Diagramm) und 50, 100, 150 μM Apigenin (unteres Diagramm) behandelt, um anschließend die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B zu messen.

3.1.4 Der Apoptoseweg nach Hemmung der CK2 ist unabhängig von BCL-X_L

BCL-X_L ist ein anti-apoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie, dessen Expression durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert wird (Chen et al., 2000). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen BCL-X_L und der beobachteten Apoptose bei

transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde im Western Blot nachgewiesen. Bei Transfektion mit der siRNA CK2 α +411 sieht man nach 48 Stunden eine deutliche Abnahme der Proteinmenge von CK2 α auf 22% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der Knock-down von CK2 α führte dabei zu keinen erkennbaren Veränderungen bei der Proteinmenge von CK2 α '. Die Transfektion der siRNA CK2 α ' +49 führte ebenfalls nach 48 Stunden zu einer eindeutigen Reduktion der Proteinmenge von CK2 α ' auf unter 10% im Vergleich mit den Kontrollzellen, ohne dabei die Proteinmenge der anderen katalytischen Untereinheit CK2 α signifikant zu verändern.

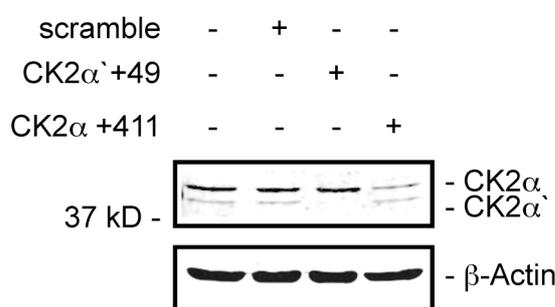


Abbildung 11: Erfolgreicher Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2.

Der Knock-down der beiden katalytischen Untereinheiten von CK2 erfolgte in MiaPaCa2 Zellen mittels der spezifischen siRNAs CK2 α ' +49 und CK2 α +411. Der Knock-down wurde 48 Stunden nach Transfektion mittels Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte und mit unspezifischer Kontroll-siRNA (scramble) transfizierte Zellen untersucht.

Um die Auswirkungen des Knock-downs der katalytischen Untereinheiten auf MiaPaCa2 Zellen zu untersuchen, wurde 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion, der Anteil lebender Zellen im MTT Zellviabilitätsassay bestimmt. Hier zeigte sich bei Transfektion mit CK2 α +411 eine Reduktion des Anteils lebender Zellen auf 90%, 68% und 51% verglichen mit den nicht-transfizierten Kontrollzellen. Der Knock-down von CK2 α ' mittels der siRNA CK2 α ' +49 führte nach 48, 72 und 96 Stunden zur Abnahme der lebenden Zellen auf 73%, 63% und 45% verglichen mit den nicht-transfizierten Kontrollzellen.

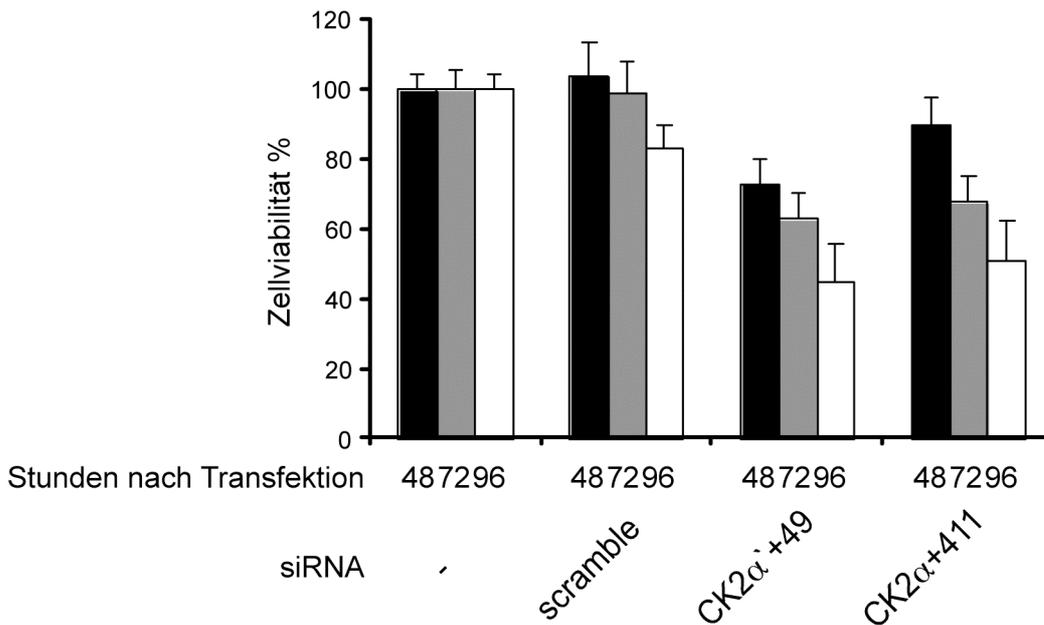


Abbildung 12: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 führt zur Abnahme der Zellviabilität von Pankreaskarzinomzellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (scramble) und zwei siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten von CK2 (CK2 α +49 und CK2 α +411) transfiziert. 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt.

3.1.6 Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 induziert Apoptose in Pankreaskarzinomzellen

Auf Grund der bereits vorliegenden Ergebnisse konnte man Apoptose als wahrscheinliche Ursache für die Abnahme der lebenden Pankreaskarzinomzellen bei Knock-down der katalytischen Untereinheiten CK2 α und CK2 α ' annehmen. Deshalb wurden die Zellen auf apoptotische Veränderungen untersucht.

Zunächst wurden MiaPaCa2 Zellen wieder mit den beiden siRNAs CK2 α +411 und CK2 α '+49 gegen die katalytischen Untereinheiten der CK2 transfiziert. Nach 48, 72 und 96 Stunden erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz und die anschließende Untersuchung auf die typischen apoptotischen Veränderungen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde durch Zählung bestimmt. Die Transfektion der Zellen mit der siRNA CK2 α +411 führte nach 48, 72 und 96 Stunden zu einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen auf 10%, 18% und 31%. Ebenfalls konnte bei Verwendung der siRNA CK2 α '+49 ein Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen auf 10%, 25% und 28% nach 48, 72 und 96

Stunden beobachtet werden. Während des kompletten Zeitraumes von 96 Stunden blieb dabei der Anteil der apoptotischen Zellen bei den nicht-transfizierten und mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen unter 5%.

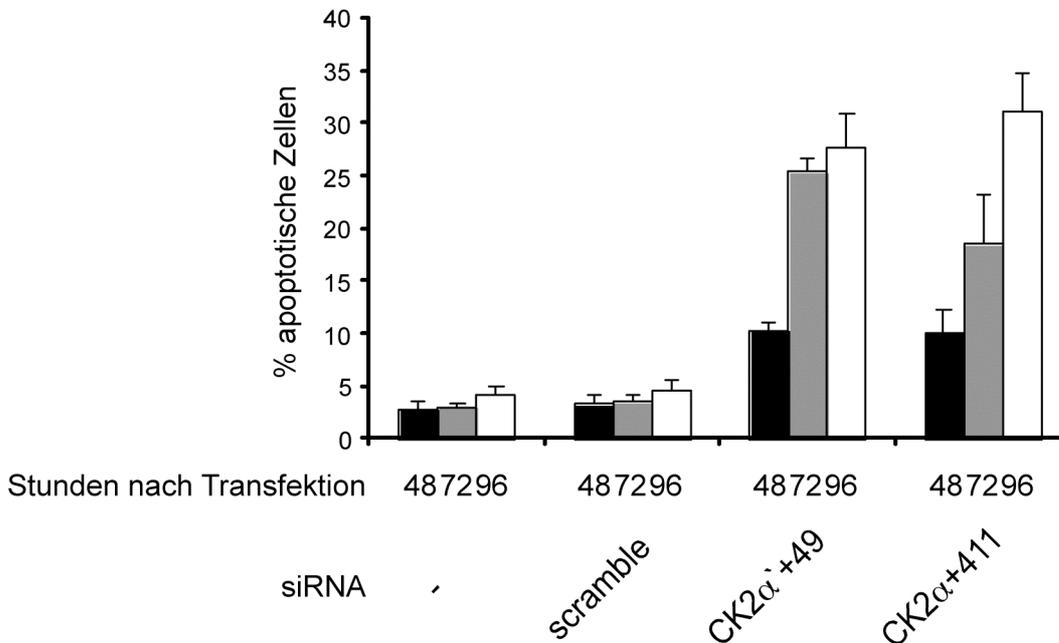


Abbildung 13: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 induziert in Pankreaskarzinomzellen Apoptose. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (scramble) und zwei siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten von CK2 (CK2 α +49 und CK2 α +411) transfiziert. 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz in der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Als weiterer Apoptosenachweis zeigte sich 96 Stunden nach der Transfektion mit den beiden siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten von CK2 im Western Blot eine deutliche Spaltung von PARP. Somit führt der gezielte Knock-down von CK2 α und CK2 α ' zu einer durch Apoptose bedingten Reduktion der Viabilität von MiaPaCa2 Zellen.

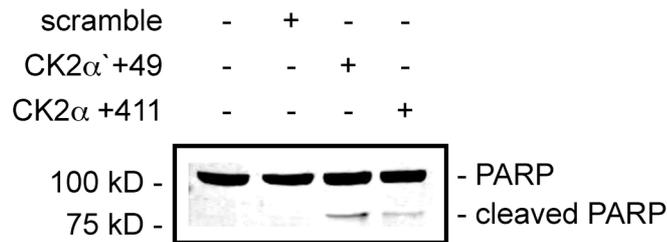


Abbildung 14: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 führt zur Spaltung von PARP. MiaPaCa2 Zellen wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (scramble) und zwei siRNAs gegen die katalytischen Untereinheiten von CK2 (CK2 α +49 und CK2 α +411) transfiziert. Die Spaltung von PARP wurde 96 Stunden nach Transfektion mittels Western Blot nachgewiesen.

3.2 Hemmung der Protein Kinase CK2 erhöht die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose

Bei verschiedenen Karzinomzelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass durch Hemmung von CK2 die Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose erhöht wird (Izeradjene et al., 2004; Izeradjene et al., 2005; Ravi & Bedi, 2002; Wang et al., 2005). Pankreaskarzinomzellen sind relativ unempfindlich gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Ozawa et al., 2001).

3.2.1 Die spezifischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin erhöhen die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose

Die Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose wurde an MiaPaCa2 und PaTu-2 Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen über 24 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von TRAIL alleine und gleichzeitig mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin behandelt, um anschließend den Anteil apoptotischer Zellen durch Hoechst Färbung zu bestimmen. Die Behandlung von MiaPaCa2 Zellen mit TRAIL alleine führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen bis auf 46% bei 30 ng/ml TRAIL. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit DRB erhöhte sich deutlich der Anteil apoptotischer Zellen auf 85% bei 30 ng/ml TRAIL und 15 μ M DRB bzw. auf 95% mit 30 μ M DRB. Die Behandlung mit TRAIL und Apigenin zeigte

ebenfalls eine Zunahme des Anteils an apoptotischen Zellen auf 63% bei 30 ng/ml TRAIL und 30 μ M Apigenin bzw. auf 71% mit 50 μ M Apigenin.

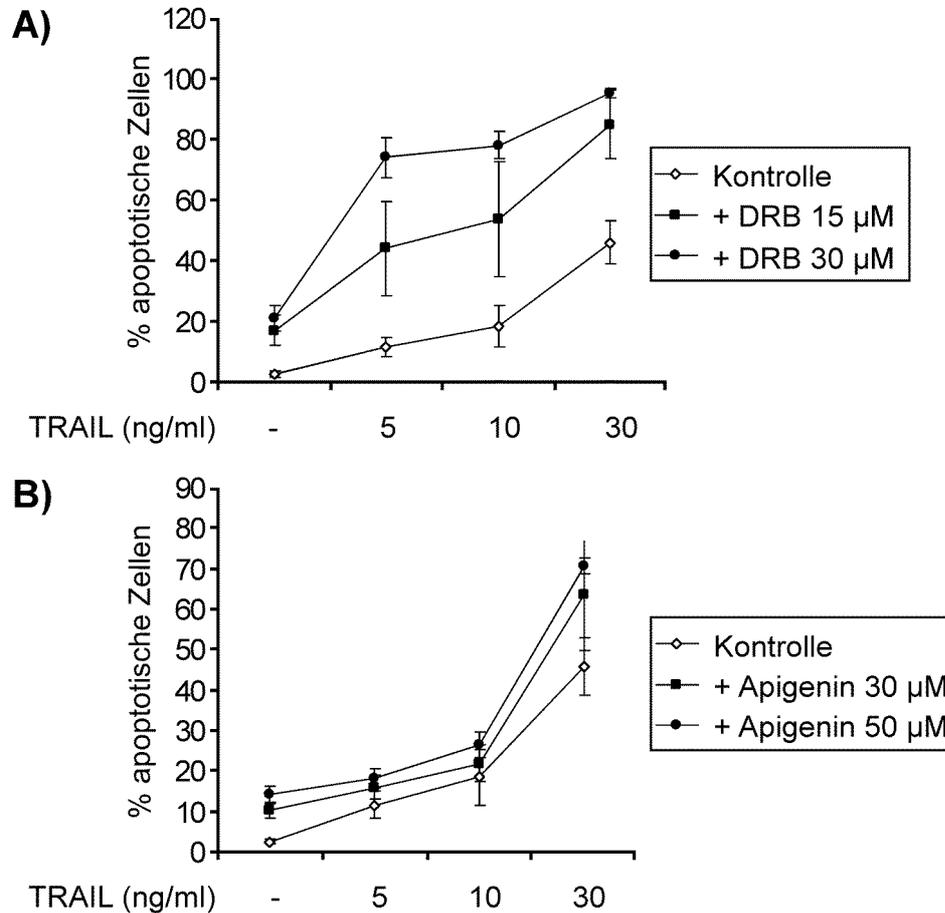


Abbildung 15: Die Hemmung von CK2 führt zur Sensibilisierung von MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

A) MiaPaCa2 Zellen wurden mit 5, 10, 30 ng/ml TRAIL alleine, sowie gleichzeitig mit 15 und 30 μ M DRB behandelt. **B)** MiaPaCa2 Zellen wurden wiederum mit TRAIL alleine, sowie gleichzeitig mit 30 und 50 μ M Apigenin behandelt. Anschließend wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz in der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Eine höhere Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose zeigten die PaTu-2 Zellen. Die Behandlung der Zellen mit TRAIL alleine zeigte nur einen sehr geringen konzentrationsabhängigen Anstieg auf 7% apoptotische Zellen bei 30 ng/ml TRAIL. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit DRB bzw. Apigenin führte zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber TRAIL. Der Anteil apoptotischer Zellen stieg bei 30 ng/ml TRAIL mit 15 μ M DRB auf 51% und mit 30 μ M DRB auf 69%. Mit Apigenin erhöhte sich der Anteil apoptotischer Zellen auf 25% bei 30 ng/ml TRAIL und 30 μ M Apigenin bzw. auf 37% mit 50 μ M Apigenin.

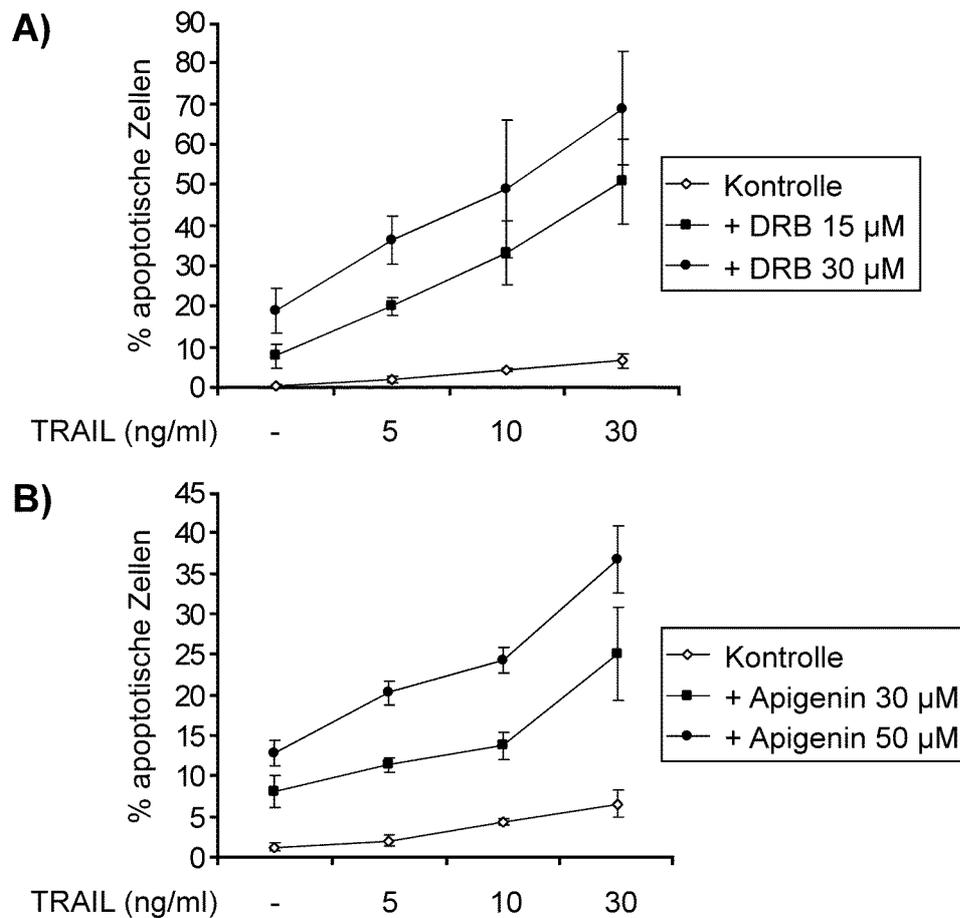


Abbildung 16: Die Hemmung von CK2 führt zur Sensibilisierung von PaTu-2 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. A) PaTu-2 Zellen wurden mit 5, 10, 30 ng/ml TRAIL alleine, sowie gleichzeitig mit 15 und 30 μM DRB behandelt. **B)** PaTu-2 Zellen wurden wiederum mit TRAIL alleine, sowie gleichzeitig mit 30 und 50 μM Apigenin behandelt. Anschließend wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst Reagenz in der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Alle weiteren Untersuchungen erfolgten nur an MiaPaCa2 Zellen. Dabei wurde als Nächstes das Zellüberleben mittels des MTT Zellviabilitätsassays nach Stimulation der Zellen mit TRAIL alleine und bei gleichzeitiger Hemmung von CK2 untersucht. TRAIL alleine zeigte kaum eine erkennbare Reduktion der lebenden Zellen. Die Behandlung der Zellen mit DRB (30 μM) führte zur Abnahme des Anteils lebender Zellen auf 79%. Bei gleichzeitiger Stimulation mit TRAIL (30 ng/ml) reduzierte sich der Anteil lebender weiter auf 43%. Die gleichzeitige Verwendung von Apigenin (50 μM) und TRAIL (30 ng/ml) verminderte sich der Anteil lebender Zellen auf 63%.

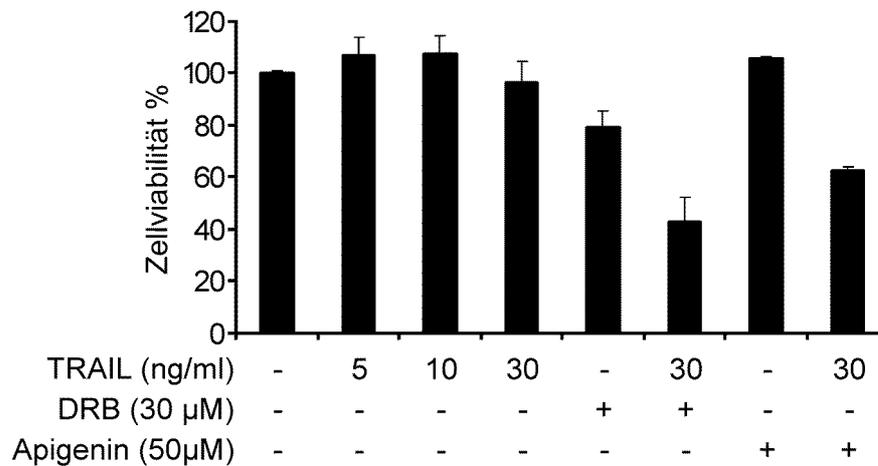


Abbildung 17: Die Stimulation mit TRAIL führt in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2 zur Abnahme der Zellviabilität. MiaPaCa2 Zellen wurden mit 5, 10, 30 ng/ml TRAIL, 30 μ M DRB und 50 μ M Apigenin, sowie gleichzeitig mit 30 ng/ml TRAIL und einem der CK2 Inhibitoren behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt.

Das Apoptoseverhalten der MiaPaCa2 Zellen nach Behandlung der Zellen mit TRAIL und Hemmung von CK2 wurde auch im Western Blot anhand der Spaltung von PARP analysiert. Hierbei zeigte sich bei TRAIL (30 ng/ml), DRB (30 μ M) und Apigenin (50 μ M) alleine nur eine geringe Spaltung von PARP. Wurden die Zellen dagegen gleichzeitig mit TRAIL und einem der beiden spezifischen CK2 Inhibitoren behandelt, zeigte sich sowohl mit DRB als auch mit Apigenin eine deutlich verstärkte Spaltung von PARP und damit eine Zunahme der Apoptose.

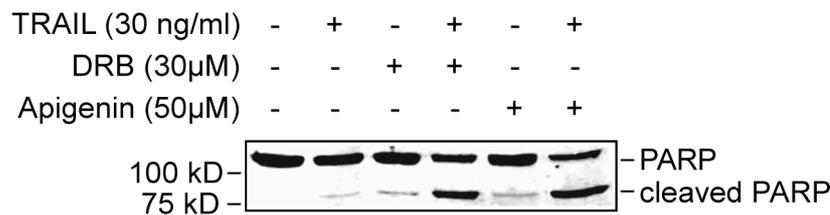


Abbildung 18: Die gesteigerte TRAIL-induzierte Apoptose nach Hemmung von CK2 in Pankreaskarzinomzellen zeigt sich auch durch vermehrte Spaltung von PARP. MiaPaCa2 Zellen wurden 24 Stunden mit 30 ng/ml TRAIL, 30 μ M DRB und 50 μ M Apigenin, sowie gleichzeitig mit TRAIL und einem der CK2 Inhibitoren behandelt. Die Spaltung von PARP wurde im Western Blot nachgewiesen.

Damit führt die Hemmung der CK2 durch die spezifischen chemischen Inhibitoren DRB und Apigenin zu einer Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierten Apoptose.

3.2.2 Die spezifischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin beeinflussen die Expression von apoptoserelevanten Genen in Pankreaskarzinomzellen

Um mögliche CK2 regulierte Gene zu identifizieren, die eine TRAIL-Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen erklären, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels eines nichtradioaktiven cDNA-Arrays durchgeführt. Mit dem dazu verwendeten „GEArray™ Q Series Human Apoptosis Gene Array“ ließ sich gleichzeitig die Expression von 96 apoptoserelevanten Genen darstellen. Die Untersuchungen erfolgten an MiaPaCa2 Zellen, die dafür 24 Stunden mit den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren DRB (30 μ M) und Apigenin (30 μ M) behandelt wurden. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert und der Array durchgeführt.

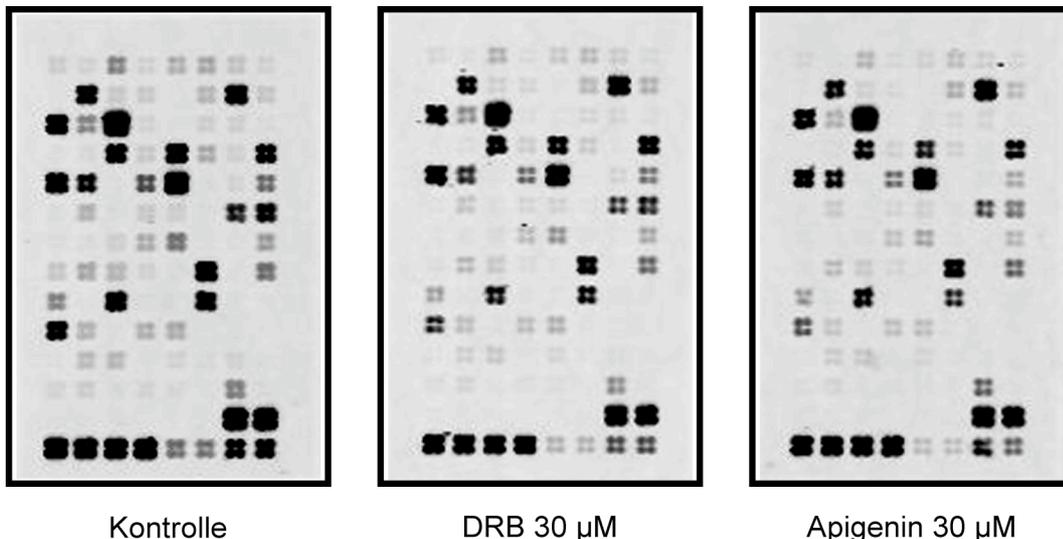


Abbildung 19: Darstellung der Genexpressionsänderungen in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2. MiaPaCa2 Zellen wurden 24 Stunden mit 30 μ M DRB und Apigenin behandelt. Die Untersuchung der Genexpressionsänderungen erfolgte in einem nichtradioaktiven cDNA-Array, in dem sich die Expressionsänderungen von 96 apoptoserelevanten Genen darstellen ließen. Die Abbildungen zeigen die Membranen mit den entsprechenden cDNA-Spots, an die die markierte cDNA bindet.

Die Hemmung der CK2 mit 30 μ M DRB oder mit 30 μ M Apigenin zeigte bei 6 Genen eine deutlich erkennbare Hochregulierung der Expression (siehe Tabelle 6). Die Expression von einem Gen wurde um mehr als die Hälfte gehemmt (siehe Tabelle 7).

Die Intensität der Gene wurde zur Normierung auf die Intensität des Haushaltsgens GAPDH bezogen und die Intensität der unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt. Zu den Genen, deren Expression verstärkt wurde, gehören TRAIL-R3/DcR1 und Ox40 (CD134). Beide sind Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Die Expression von TRAIL-R3/DcR1, einem Decoyrezeptor ohne intrazelluläre Todesdomäne, wurde nach Hemmung der CK2 mit DRB (30 μ M) verdoppelt und mit Apigenin (30 μ M) um das 1,9 fache gesteigert. OX40 gehört ebenfalls zu den Rezeptoren ohne Todesdomäne und dessen Expression wurde mit DRB um das Doppelte und mit Apigenin um das 5,7 fache hochreguliert. FasL und 4-1BB-L, beides Liganden an Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie, zeigten eine deutliche Steigerung der Expression nach Behandlung mit den CK2 Inhibitoren. Für FasL, welches als Antigen am FAS Rezeptor bindet und damit die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose initiiert, wurde eine Zunahme der Expression bei Hemmung der CK2 mit 30 μ M DRB um das 2,3 fache und mit 30 μ M Apigenin um das 1,9 fache beobachtet. Die Expression von 4-1BB-L, das am 4-1BB-Rezeptor aus der TNF-Rezeptor Superfamilie bindet und vor allem bei der Immunantwort von T-Lymphozyten eine Rolle spielt, stieg mit DRB um das Doppelt und mit Apigenin um das 1,9 fache. Des Weiteren wurden die Caspaseinhibitorproteine cIAP1 und cIAP2 durch die Hemmung von CK2 hochreguliert. cIAP1 wurde um das 2,2 fache bei Behandlung der Zellen mit DRB (30 μ M) und um das 3,2 fache mit Apigenin (30 μ M) reguliert. Ähnlich sehen die Ergebnisse bei cIAP2 aus, dessen Expression mit DRB um das 3,3 fache und mit Apigenin um das 2,4 fache reguliert wurde.

Gen-Name	Faktor der Expressionsveränderung, nach Behandlung der Zellen mit		Gen-Bank Nr.	UniGene Nr.
	DRB (30 μ M)	Apigenin (30 μ M)		
cIAP1	2,2	3,2	NM_001166	Hs.503704
cIAP2	3,3	2,4	NM_001165	Hs.127799
TRAIL-R3/DcR1	2,0	1,9	NM_003841	Hs.119684
OX40	2,0	5,7	NM_003327	Hs.129780
FASL	2,3	1,9	NM_000639	Hs.2007
4-1BB-L	2,0	1,9	NM_003811	Hs.1524

Tabelle 6: Gene, die nach Hemmung von CK2 verstärkt exprimiert werden. MiaPaCa2 Zellen wurden mit 30 μ M DRB und Apigenin behandelt. Nach 24 Stunden wurde die RNA für einen nichtradioaktiven cDNA Array isoliert. Dargestellt sind Gene mit einer signifikanten Expressionssteigerung nach Hemmung von CK2.

Signifikant vermindert wurde die Expression von CKAP4, einem zytoskelett-assoziiertem Transmembranprotein, dessen Expression nach Hemmung der CK2 mit 30 μ M DRB nur noch 40% und mit 30 μ M Apigenin nur noch 30% gegenüber der Expression bei unbehandelten MiaPaCa2 Zellen betrug.

Gen-Name	Faktor der Expressionsveränderung, nach Behandlung der Zellen mit		Gen-Bank Nr.	UniGene Nr.
	DRB (30 μ M)	Apigenin (30 μ M)		
CKAP4	0,4	0,3	NM_006825	Hs.74368

Tabelle 7: **Gen mit verminderter Expression nach Hemmung von CK2.** MiaPaCa2 Zellen wurden mit 30 μ M DRB und Apigenin behandelt. Nach 24 Stunden wurde die RNA für einen nichtradioaktiven cDNA Array isoliert. Dargestellt ist ein Gen mit einer signifikanten Expressionsverminderung nach Hemmung von CK2.

3.2.3 TRAIL-induzierte Apoptose nach Hemmung von CK2 involviert die Spaltung von BID

Da BID als pro-apoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie sowohl in der CK2 vermittelten Apoptoseresistenz als auch bei der TRAIL-induzierten Apoptose eine zentrale Rolle einnimmt, wurde dieses auch in diesem Zusammenhang näher betrachtet (Ravi & Bedi, 2002). Dazu wurden MiaPaCa2 Zellen mit TRAIL und den spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren DRB und Apigenin behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für Ganzzellextrakte geerntet. Als Zeichen der Spaltung von BID zeigte sich im Western Blot, bei Behandlung der Zellen mit 30 ng/ml TRAIL und gleichzeitiger Hemmung von CK2 mit 30 μ M DRB oder 50 μ M Apigenin ein fast vollständiges Verschwinden der 22 kD großen Bande von BID. Bei alleiniger Behandlung der Zellen mit TRAIL, DRB oder Apigenin sah man dagegen keine erkennbaren Veränderungen der Bande.

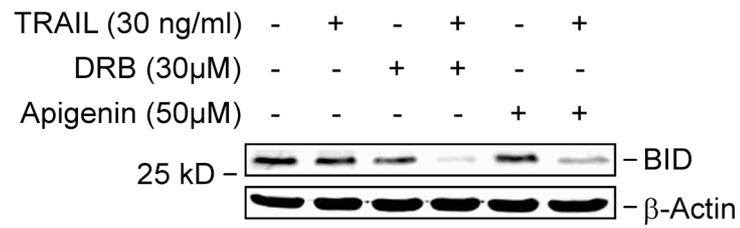


Abbildung 20: TRAIL-induzierte Apoptose nach Hemmung von CK2 führt in Pankreaskarzinomzellen zur Spaltung von BID. MiaPaCa2 Zellen wurden mit 30 ng/ml TRAIL, 30µM DRB und 50 µM Apigenin behandelt, sowie gleichzeitig mit TRAIL und einem der CK2 Inhibitoren behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Spaltung von BID im Western Blot nachgewiesen.

4 Diskussion

4.1 Hemmung von CK2 vermindert die Zellviabilität von Pankreaskarzinomzellen

In verschiedenen Zellsystemen wurde die Schlüsselfunktion der Protein Kinase CK2 für das Zellüberleben demonstriert (Ahmed et al., 2002; Guo et al., 2001; Litchfield, 2003). Die Bedeutung der CK2 für die Zellviabilität von Tumorzellen, konnte ebenfalls schon mehrfach nachgewiesen werden (Faust et al., 2000; Ruzzene et al., 2002; Seeber et al., 2005; Slaton et al., 2004). Diese Arbeit zeigt nun, dass die Viabilität von Pankreaskarzinomzellen von CK2 abhängig ist. Sowohl die Hemmung von CK2 mit spezifischen chemischen Inhibitoren, als auch mittels RNA-Interferenz führte zu Caspase-abhängiger Apoptose. Dass Apoptoseinduktion ursächlich für die Abnahme der Zellviabilität von Tumorzellen ist, konnte schon in mehreren in vitro und in vivo Experimenten gezeigt werden. So führte eine Verminderung der CK2 Aktivität durch Verwendung des spezifischen chemischen CK2 Inhibitors TBB in leukämischen T-Lymphozyten zu Apoptose (Ruzzene et al., 2002). Auch durch Knock-down der katalytischen Untereinheiten mittels Antisense-Oligonukletide und siRNA konnte in anderen menschlichen Tumorzelllinie sowie in einem Xenograft-Modell des menschlichen Prostatakarzinoms Apoptose induziert werden (Seeber et al., 2005; Slaton et al., 2004). Der Mechanismus der Apoptoseinduktion nach Hemmung von CK2 in Pankreaskarzinomzellen ist dabei unklar.

4.1.1 Reduktion der apoptotischen Schwelle

Der zeitliche Beginn der Apoptose ist mit 6 bis 8 Stunden relativ früh und korreliert mit Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Eine Verminderung der NF- κ B Aktivität nach Hemmung von CK2 wurde auch schon in anderen Zellsystemen beobachtet und korrelierte dort ebenfalls mit einer erhöhten Apoptoserate (Farah et al., 2003; Romieu-Mourez et al., 2002). Bisher sind drei Mechanismen beschrieben, wie CK2 Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B nehmen kann. Zum einen zeigte sich, dass CK2 das NF- κ B-Inhibitorprotein I κ B α in dessen C-terminalen PEST-Domäne phosphorylieren kann. Dies führt zur Destabilisierung von I κ B α und die Aktivität von NF- κ B nimmt zu (Kato et al., 2003; Romieu-Mourez et al., 2002;

Romieu-Mourez et al., 2001; Shen et al., 2001). Des Weiteren konnte die direkte Phosphorylierung von RelA/p65 durch CK2 mit erhöhter Aktivität von NF- κ B gezeigt werden (Bird et al., 1997; Chantome et al., 2004; Wang et al., 2000). Und erst vor kurzem wurde ein dritter Mechanismus beschrieben, wobei CK2 die Expression von IKK-i/IKK- ϵ und dadurch die Aktivierung von NF- κ B induziert (Eddy et al., 2005).

Durch NF- κ B wird die Expression einer Reihe anti-apoptotischer Proteine reguliert und ist damit entscheidend an der Vermittlung von Apoptoseresistenz beteiligt (Liptay et al., 2003; Wang et al., 1999a). Da in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2 die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B abnimmt und dies zeitlich mit der Apoptoseinduktion korreliert, ist es attraktiv eine NF- κ B-vermittelte Senkung der apoptotischen Schwelle zu postulieren (Arlt et al., 2001; Muerkoster et al., 2003; Sato et al., 2003; Thomas et al., 2002).

Wie sich in diesem Zusammenhang bereits zeigte, fördert CK2 in Mammakarzinomzellen die NF- κ B-vermittelte Expression des anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitgliedes BCL-X_L (Ravi & Bedi, 2002). Doch obwohl die Hemmung der CK2 Aktivität in Pankreaskarzinomzellen zu einer frühzeitigen und deutlichen Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B führt, konnte eine Veränderung in der Expression von BCL-X_L nicht beobachtet werden. Dies deutet wie auch schon in Kolonkarzinomzellen beobachtet auf eine von BCL-X_L unabhängige Apoptose (Farah et al., 2003). Da für Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden konnte, dass die NF- κ B-vermittelte Transkription von BCL-X_L hauptsächlich durch das Heterodimer RelA/p50 und in geringem Maße auch durch das Homodimer p50/p50 reguliert wird, scheint CK2 die transkriptionelle Aktivität dieser beiden Dimere nicht zu beeinflussen (Dong et al., 2002). Weiterhin weist dies auf eine von I κ B α - und p65/RelA-Phosphorylierung alternative Regulation hin, da diese beiden Mechanismen vor allem die transkriptionelle Aktivität des Heterodimers RelA/p50 beeinflussen (Bird et al., 1997; Chantome et al., 2004; Romieu-Mourez et al., 2002; Romieu-Mourez et al., 2001; Wang et al., 2000). Inwieweit CK2 über IKK ϵ oder weitere alternative Wege die Aktivität und Expression von anderen NF- κ B Untereinheiten und deren Zielgene im Pankreaskarzinom beeinflusst, ist nicht bekannt.

Welche Proteine nach verminderter NF- κ B Aktivität durch Hemmung von CK2 zur Senkung der apoptotischen Schwelle in Pankreaskarzinomzellen beitragen, bedarf noch weiterer Untersuchungen. In der Literatur findet sich hierzu neben der

Regulation von BCL-X_L auch der Einfluss von CK2 auf andere anti-apoptotische und NF- κ B regulierte Proteine. So zeigte sich nach Hemmung von CK2 eine verminderte Expression des Caspase 8 inhibierenden Proteins c-FLIP oder des Caspaseinhibitorproteins XIAP (Izeradjene et al., 2004; Ravi & Bedi, 2002).

Auch zusätzliche NF- κ B unabhängige Veränderung, die nach Hemmung von CK2 zur Verminderung der apoptotischen Schwelle beitragen, sind denkbar. Hier sei beispielhaft der Einfluss von CK2 auf das Caspase 8-inhibitorischen Protein ARC genannt, das nach Hemmung von CK2 eine verminderte Aktivität zeigt (Li et al., 2002).

4.1.2 Apoptoseinduktion

Ob eine Verminderung der apoptotischen Schwelle nach Hemmung von CK2 ausreichend ist, um in Pankreaskarzinomzellen Apoptose zu induzieren, oder noch ein weiterer molekularer Mechanismus für die Apoptoseinduktion benötigt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht hinreichend aufgeklärt werden. Aus anderen Untersuchungen über die Apoptoseinduktion durch Hemmung von CK2 ergeben sich für einen derartigen Mechanismus in Pankreaskarzinomzellen zwei interessante Ansatzpunkte.

Einen stellt die in Ösophaguskarzinomzellen gezeigte CK2-abhängige Phosphorylierung von Procaspase 2 dar. Wobei die nach Hemmung von CK2 dephosphorylierte Procaspase 2 zur Spaltung von Procaspase 8 führt. Allerdings war dies nicht ausreichend direkt Apoptose zu induzieren, sondern sensibilisierte die Zellen nur gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose (Shin et al., 2005). Tatsächlich konnte auch in unserem Labor in der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa2 eine Spaltung von Procaspase 8 nach Hemmung von CK2 beobachtet werden (Daten nicht veröffentlicht). Mit der CK2-abhängigen Phosphorylierung des pro-apoptotischen BH3-only Proteins BID ergibt sich ein zweiter Mechanismus, der zur Apoptoseinduktion beitragen kann. Durch Hemmung von CK2 kann dephosphoryliertes BID von Caspase 8 gespalten werden, worauf es in das Mitochondrium transloziert und dort die Freisetzung von Apoptose-induzierenden Faktoren fördert (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001; Ravi & Bedi, 2002). Unterstützt wird die Annahme, dass die Spaltung von BID bei der Apoptoseinduktion nach Hemmung von CK2 auch bei Pankreaskarzinomzellen

beteiligt ist, durch die Ergebnisse zu BID in dieser Arbeit (siehe 3.2.3) und durch die in unserem Labor beobachtete Spaltung von Procaspase 8 nach Hemmung von CK2 in MiaPaCa2 Zellen (Daten nicht veröffentlicht).

Obwohl die vorliegenden Daten keine konkreten Ansatzpunkte für einen CK2-abhängigen apoptoseinduzierenden Mechanismus in Pankreaskarzinomzellen ergeben, unterstützen sie doch das folgende Modell der Apoptoseinduktion. Danach wird die Apoptose in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2 durch das Zusammenwirken einer NF- κ B-vermittelten Senkung der apoptotischen Schwelle und einen noch unbekanntem Mechanismus, der zur Apoptoseinduktion führt, ausgelöst (siehe Abbildung 21).

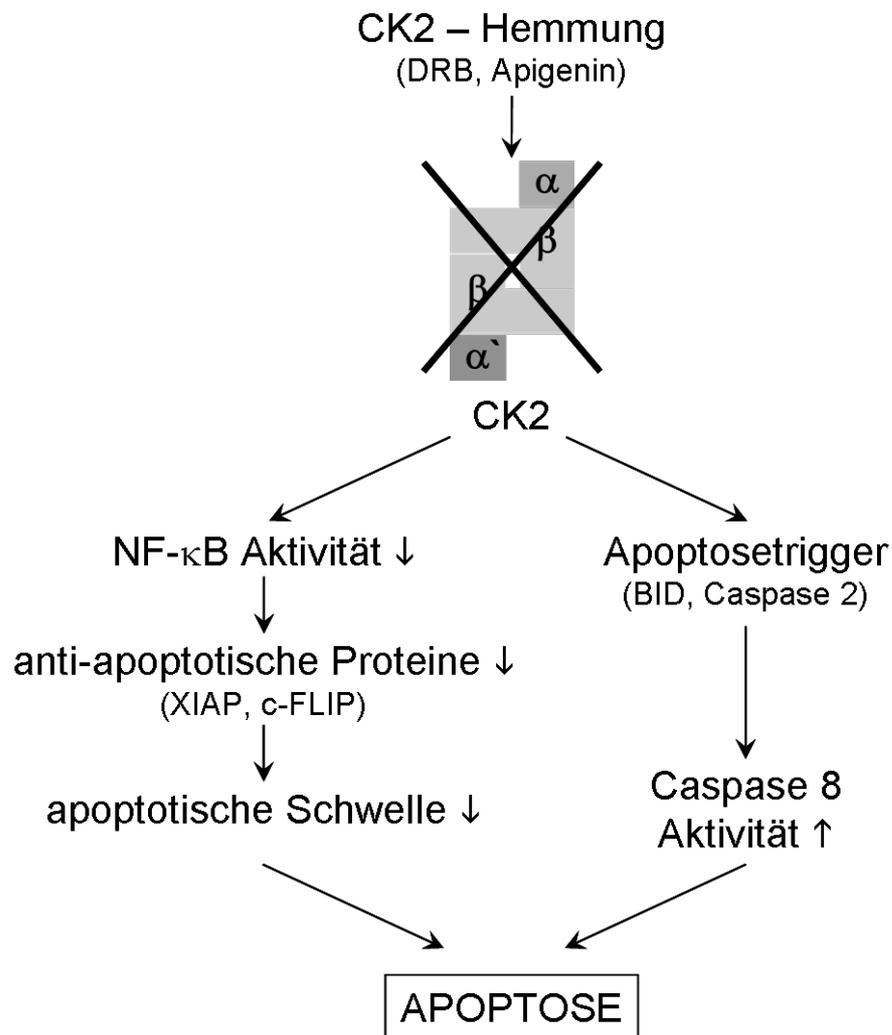


Abbildung 21: Modell der Apoptoseinduktion nach Hemmung der Protein Kinase CK2 in Pankreaskarzinomzellen. Die Hemmung von CK2 führt hierbei zu einer NF- κ B vermittelten Senkung der apoptotischen Schwelle und zu einem noch unbekanntem apoptoseinduzierenden Mechanismus.

4.2 Hemmung von CK2 erhöht die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose

Schon in mehreren Tumorzelllinien konnte erfolgreich durch Hemmung der Protein Kinase CK2 die Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose erhöht werden (Izeradjene et al., 2004; Izeradjene et al., 2005; Ravi & Bedi, 2002; Wang et al., 2005). Es zeigte sich dabei auch, dass die CK2 Aktivität in TRAIL-sensitiven Zellen niedrig und in resistenten Zellen erhöht ist (Shin et al., 2005).

Untersuchungen bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien ergaben eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber TRAIL. Im Allgemeinen scheinen Pankreaskarzinomzellen jedoch relativ unempfindlich gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose zu sein (Ozawa et al., 2001). Bei Stimulation der hier verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien mit TRAIL zeigten PaTu-2 Zellen verglichen mit MiaPaCa2 Zellen eine höhere Resistenz. Jedoch fand sich in beiden Zelllinien nach Hemmung von CK2 eine deutliche Sensibilisierung.

Rezeptorexpressionsanalysen auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzelllinien zeigten eine durchgehende Expression von TRAIL-R1 und -R2. Wobei die Decoyrezeptoren in unterschiedlicher Intensität und zum Teil gar nicht exprimiert werden. Da jedoch meist kein direkter Zusammenhang zwischen Expression von TRAIL-Rezeptoren und Sensitivität der Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden konnte, deutet dies auf von der Rezeptorexpression unabhängige und überwiegend intrazellulär regulierte Mechanismen hin (Mori et al., 2005; Ozawa et al., 2001; Trauzold et al., 2003).

Der Mechanismus der Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose nach Hemmung von CK2 ist unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen in MiaPaCa2 Zellen untersucht, die nach Hemmung von CK2 gegenüber TRAIL sensibilisiert waren. Genauer betrachtet wurde das proapoptotische BH3-only Protein BID sowie Expressionänderungen von 96 apoptoserelevanten Genen in einem nichtradioaktiven cDNA-Array.

Für BID zeigte sich im Western Blot bei Hemmung von CK2 und gleichzeitiger Behandlung mit TRAIL eine deutliche Spaltung, die mit der zuvor beobachteten Apoptose korrelierte. Dabei ist bekannt, dass CK2 durch Phosphorylierung von BID,

dieses Protein vor Spaltung durch Caspase 8 schützt. Hierdurch wird die Translokation von BID zum Mitochondrium und damit die Aktivierung des mitochondrialen Amplifikationsmechanismus bei TRAIL-induzierter Apoptose verhindert (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001; Ravi & Bedi, 2002). So scheint CK2 ein notwendiges Verbindungsglied zwischen dem rezeptorvermitteltem und dem mitochondrialen Apoptosesignalweg in Pankreaskarzinomzellen zu kontrollieren. Dass BID wichtig ist für die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL, konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. Hierbei fand man in TRAIL-resistenten Zellen eine geringere Proteinmenge an BID als in sensitiven Zellen und konnte die Sensibilität in TRAIL-resistenten Zellen durch Überexpression von BID verbessern (Trauzold et al., 2003).

Ein weiterer Mechanismus zur Beeinflussung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose findet sich in einer veränderten Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen. In Verbindung mit der CK2-vermittelten TRAIL-Resistenz konnte nach Hemmung von CK2 in verschiedenen Tumorzellen eine verminderte Expression der anti-apoptotischen Proteine c-FLIP, BCL-X_L und XIAP gezeigt werden (Izeradjene et al., 2004; Ravi & Bedi, 2002). Dass CK2 in Pankreaskarzinomzellen die Expression von BCL-X_L nicht zu beeinflussen scheint, wurde zuvor schon dargestellt.

Um mögliche andere regulierte Gene zu identifizieren, die eine TRAIL-Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen erklären, wurde nach Hemmung von CK2 die Expressionsänderung von apoptoserelevanten Genen durch einen speziellen nichtradioaktiven cDNA-Array in MiaPaCa2 Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Genexpressionsanalyse sind zu einem Teil widersprüchliche. So würde man bei erhöhter TRAIL-Sensitivität der Zellen nach Hemmung von CK2 keine vermehrte Expression des Decoyrezeptors TRAIL-R3 oder der Caspaseinhibitorproteine cIAP1 und cIAP2 erwarten, da diese eher zur Apoptoseresistenz beitragen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es als Antwort auf die erhöhte apoptotische Aktivität in den Zellen zu einer CK2-unabhängigen kompensatorischen Expressionsteigerung von anti-apoptotischen Proteinen kommt.

Zum anderen sind die Ergebnisse zur veränderten Expression nach Hemmung von CK2, wie die gesteigerte Expression von OX40 (CD134) und 4-1BB-L, noch in ihrer

Bedeutung für das Pankreaskarzinom unklar. OX40 und 4-1BB (CD137) sind Rezeptoren aus der TNF-Rezeptor Superfamilie, wobei 4-1BB-L der Ligand an 4-1BB ist. Diese Rezeptoren haben vor allem eine Bedeutung bei der Immunantwort von T-Lymphozyten. Es konnte zwar bei T-Lymphozyten, die beide Rezeptoren auf der Zelloberfläche ko-exprimieren, eine Sensibilisierung gegenüber TNF- α induzierter Apoptose gezeigt werden, jedoch ein entsprechender Effekt auf Pankreaskarzinomzellen ist bisher nicht bekannt (Ma et al., 2005).

Auch die Auswirkungen der verminderten Expression von CKAP4, einem zytoskelett-assoziiertem Transmembranprotein, sind unklar. So verbindet dieses Transmembranprotein unter anderem das Endoplasmatische Retikulum mit den Mikrotubuli (Klopfenstein et al., 1998), fungiert als Zellmembranrezeptor für den Tissue Plasminogen Aktivator (tPA) in glatten Gefäßmuskelzellen (Razzaq et al., 2003) oder als epithelialer Zellrezeptor für den antiproliferativen Faktor APF bei der Interstitielle Zystitis (Conrads et al., 2006). Jedoch wurde eine pro- oder antiapoptotische Funktion von CKAP4 bisher noch nicht beschrieben.

Ein Mechanismus nach Hemmung von CK2, der zur vermehrten Apoptose beitragen könnte, ist die verstärkte Expression des FAS-Liganden (FAS-L). FAS-L gehört zur TNF-Familie und kann über den FAS-Rezeptor Apoptose induzieren. Allerdings zeigen die meisten Pankreaskarzinomzelllinien trotz Expression von FAS-R und FAS-L eine Resistenz gegenüber FAS-induzierter Apoptose (Kornmann et al., 2000; Ungefroren et al., 1998). Denkbar wäre somit ein additiver Effekt bezüglich der vermehrten Apoptoseinduktion durch FAS-L und TRAIL nach Hemmung von CK2 (Farah et al., 2003; Wang et al., 2005).

Zusammenfassend lassen sich nach Hemmung von CK2, mit den verwendeten Konzentrationen der CK2-Inhibitoren zur Sensibilisierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, keine apoptoserelevanten Genexpressionsänderungen in MiaPaCa2 Zellen feststellen. Damit scheint die Vermittlung der TRAIL-Resistenz durch CK2, vor allem durch posttranskriptionelle Mechanismen zu geschehen. Hier zeigte sich auch in Pankreaskarzinomzellen, der bereits in anderen Tumorzelltypen bekannte Einfluss von CK2 auf das pro-apoptotische BH3-only Protein BID (Degli Esposti et al., 2003; Desagher et al., 2001; Ravi & Bedi, 2002). Ob auch andere posttranskriptionelle Mechanismen im Pankreaskarzinom, wie die bereits zuvor dargestellte CK2-vermittelte Phosphorylierung von Procaspase 2 (Shin et al., 2005)

oder des Caspase 8-inhibitorischen Proteins ARC (Li et al., 2002), für die TRAIL-Resistenz verantwortlich sind, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

4.3 Ausblicke

Die Prognose des duktales Pankreaskarzinomes ist durch seine frühe Metastasierung und weitgehende Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutische Behandlungen sehr schlecht. Obwohl sich das molekulare Verständnis der Karzinogenese im Pankreaskarzinom in den letzten Jahren kontinuierlich verbessert hat, konnte die Überlebensrate mit den bisherigen Therapiemöglichkeiten nicht wesentlich verbessert werden. Um die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms zu verbessern, müssen effektive konventionelle Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden (Schneider et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar den Einfluss der Protein Kinase CK2 auf das Zellüberleben von Pankreaskarzinomzellen. Neben der deutlich verminderten Zellviabilität führte die Hemmung der CK2 Aktivität auch zur Sensibilisierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Erst kürzlich zeigten Untersuchungen zum Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen nach Knock-down von 645 menschlichen Kinasen, dass CK2 α eine von fünf entscheidenden Überlebenskinasen in MiaPaCa2 Zellen ist (Giroux et al., 2006). Damit bestätigen diese Untersuchungen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und unterstreichen die Bedeutung der Protein Kinase CK2 für das Überleben von Pankreaskarzinomzellen.

Auch wenn die Mechanismen der Apoptoseinduktion und TRAIL-Sensibilisierung nach Hemmung von CK2 in Pankreaskarzinomzellen noch weitgehend unbekannt sind, findet man mit der CK2 eine neue molekulare Zielstruktur für die medikamentöse Behandlung des duktales Pankreaskarzinoms.

5 Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom gehört in der westlichen Zivilisation zu einer der häufigsten Ursachen für tumorassoziierte Todesfälle. Dabei zeichnet es sich durch eine weitgehende Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aus. In der vorliegenden Arbeit wurde schwerpunktmäßig der Einfluss auf die Zellviabilität von Pankreaskarzinomzelllinien nach Hemmung der Protein Kinase CK2 untersucht.

Die CK2 ist eine ubiquitär vorkommende Serin-Threonin Kinase, deren Aktivität in allen bisher untersuchten menschlichen Karzinomen erhöht ist und grundlegende Prozesse der Karzinogenese reguliert. Deren Einfluss auf das duktales Pankreaskarzinom wurde bisher noch nicht näher untersucht.

Bei diesen Untersuchungen wurden die beiden spezifischen chemischen CK2 Inhibitoren 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbezimidazole (DRB) und Apigenin sowie RNA Interferenz-Technologie verwendet. Die Hemmung von CK2 führte zu einer deutlichen zeit- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Viabilität von Pankreaskarzinomzellen. Es konnte daraufhin gezeigt werden, dass die Verminderung der Zellviabilität durch bereits sehr frühe Induktion eines Caspase-abhängigen Apoptoseweges verursacht wird. Für die anti-apoptotische Wirkung von CK2 wurden bislang verschiedene Mechanismen beschrieben. In den Pankreaskarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass nach Hemmung der CK2 die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B konzentrationsabhängig abnimmt. Die Ergebnisse deuten hierbei auf einen BCL-X_L unabhängigen Apoptoseweg.

Des Weiteren konnten die Pankreaskarzinomzellen durch Hemmung von CK2 gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisiert werden. Wobei der Apoptoseweg über die Spaltung von BID zu verlaufen scheint. Durchgeführte nichtradioaktive Genexpressionsanalysen an apoptoserelevanten Genen konnten nicht eindeutig zur Aufklärung der Mechanismen beitragen, die zur TRAIL-Sensibilisierung nach Hemmung von CK2 führen.

Obwohl die Mechanismen der Apoptoseinduktion und TRAIL-Sensibilisierung nach Hemmung von CK2 weitgehend unbekannt blieben, erweist sich die CK2 als neue molekulare Zielstruktur für die medikamentöse Behandlung des duktales Pankreaskarzinoms.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinomes	1
Abbildung 2: Gelelektrophoretische Kontrolle der Reinheit der isolierten RNA	21
Abbildung 3: Die Hemmung von CK2 führt zur Reduktion der Zellviabilität von MiaPaCa2 Zellen	26
Abbildung 4: Die Hemmung von CK2 führt zur Reduktion der Zellviabilität von DanG Zellen	27
Abbildung 5: Die Hemmung von CK2 führt in Pankreaskarzinomzellen zu typisch apoptotischen morphologischen Veränderungen	28
Abbildung 6: Spezifische chemische CK2 Inhibitoren induzieren in Pankreaskarzinomzellen konzentrations- und zeitabhängig Apoptose	30
Abbildung 7: Die Hemmung von CK2 führt zu capaseabhängiger Spaltung von PARP	31
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des Apoptosebeginnes nach Hemmung von CK2	32
Abbildung 9: Die Hemmung von CK2 bewirkt eine Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B	33
Abbildung 10: Die Apoptose nach Hemmung von CK2 ist unabhängig von der BCL-X _L Proteinexpression	34
Abbildung 11: Erfolgreicher Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2	35
Abbildung 12: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 führt zur Abnahme der Zellviabilität von Pankreaskarzinomzellen	36
Abbildung 13: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 induziert in Pankreaskarzinomzellen Apoptose	37
Abbildung 14: Der Knock-down der katalytischen Untereinheiten von CK2 führt zur Spaltung von PARP	38
Abbildung 15: Die Hemmung von CK2 führt zur Sensibilisierung von MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose	39
Abbildung 16: Die Hemmung von CK2 führt zur Sensibilisierung von PaTu-2 Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose	40
Abbildung 17: Die Stimulation mit TRAIL führt in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2 zur Abnahme der Zellviabilität	41

Abbildung 18: Die gesteigerte TRAIL-induzierte Apoptose nach Hemmung von CK2 in Pankreaskarzinomzellen zeigt sich auch durch vermehrte Spaltung von PARP	41
Abbildung 19: Darstellung der Genexpressionsänderungen in Pankreaskarzinomzellen nach Hemmung von CK2	42
Abbildung 20: TRAIL-induzierte Apoptose nach Hemmung von CK2 führt in Pankreaskarzinomzellen zur Spaltung von BID	45
Abbildung 21: Modell der Apoptoseinduktion nach Hemmung der Protein Kinase CK2 in Pankreaskarzinomzellen.	49

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: siRNA Zielsequenzen (Matrizenstrang)	13
Tabelle 2: Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel	16
Tabelle 3: RT-Cocktail	21
Tabelle 4: LPR Cocktail	22
Tabelle 5: Waschlösungen für GEArray™ Genexpressionssystem	23
Tabelle 6: Gene, die nach Hemmung von CK2 verstärkt exprimiert werden.	43
Tabelle 7: Gen mit verminderter Expression nach Hemmung von CK2	44

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed, K., Gerber, D.A. & Cochet, C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol*, **12**, 226-30.
- Arlt, A., Vorndamm, J., Breitenbroich, M., Folsch, U.R., Kalthoff, H., Schmidt, W.E. & Schafer, H. (2001). Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene*, **20**, 859-68.
- Bird, T.A., Schooley, K., Dower, S.K., Hagen, H. & Virca, G.D. (1997). Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem*, **272**, 32606-12.
- Bondar, V.M., Sweeney-Gotsch, B., Andreeff, M., Mills, G.B. & McConkey, D.J. (2002). Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, **1**, 989-97.
- Buchou, T., Vernet, M., Blond, O., Jensen, H.H., Pointu, H., Olsen, B.B., Cochet, C., Issinger, O.G. & Boldyreff, B. (2003). Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*, **23**, 908-15.
- Campani, D., Esposito, I., Boggi, U., Cecchetti, D., Menicagli, M., De Negri, F., Colizzi, L., Del Chiaro, M., Mosca, F., Fornaciari, G. & Bevilacqua, G. (2001). Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. *J Pathol*, **194**, 444-50.
- Chantome, A., Pance, A., Gauthier, N., Vandroux, D., Chenu, J., Solary, E., Jeannin, J.F. & Reveneau, S. (2004). Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF-kappaB p65 subunit enhances inducible nitric-oxide synthase gene transcription in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 23953-60.
- Chen, C., Edelstein, L.C. & Gelinas, C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-95.
- Conrads, T.P., Tocci, G.M., Hood, B.L., Zhang, C.O., Guo, L., Koch, K.R., Michejda, C.J., Veenstra, T.D. & Keay, S.K. (2006). CKAP4/p63 Is a Receptor for the Frizzled-8 Protein-related Antiproliferative Factor from Interstitial Cystitis Patients. *J Biol Chem*, **281**, 37836-43.
- Degli Esposti, M., Ferry, G., Masdehors, P., Boutin, J.A., Hickman, J.A. & Dive, C. (2003). Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem*, **278**, 15749-57.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. & Martinou, J.C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*, **8**, 601-11.

- Dong, Q.G., Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Peng, B., Wu, T., Tsao, M.S., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., McDonnell, T.J. & Chiao, P.J. (2002). The function of multiple I κ B : NF- κ B complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, **21**, 6510-9.
- Eddy, S.F., Guo, S., Demicco, E.G., Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C. & Sonenshein, G.E. (2005). Inducible I κ B kinase/I κ B kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor- κ B activation in breast cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 11375-83.
- Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Kayahara, M., Kitagawa, H., Fujimura, T., Ninomiya, I., Fushida, S., Nishimura, G.I., Shimizu, K. & Miwa, K. (2001). Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol*, **18**, 311-6.
- Evans, J.D., Cornford, P.A., Dodson, A., Greenhalf, W., Foster, C.S. & Neoptolemos, J.P. (2001). Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology*, **1**, 254-62.
- Fahy, B.N., Schlieman, M.G., Virudachalam, S. & Bold, R.J. (2004). Inhibition of AKT abrogates chemotherapy-induced NF- κ B survival mechanisms: implications for therapy in pancreatic cancer. *J Am Coll Surg*, **198**, 591-9.
- Farah, M., Parhar, K., Moussavi, M., Eivemark, S. & Salh, B. (2003). 5,6-Dichloro-ribifuranosylbenzimidazole- and apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF- α -mediated apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, G919-28.
- Faust, R.A., Tawfic, S., Davis, A.T., Bubash, L.A. & Ahmed, K. (2000). Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2- α inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Head Neck*, **22**, 341-6.
- Filhol, O., Martiel, J.L. & Cochet, C. (2004). Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep*, **5**, 351-5.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. & Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, **408**, 325-30.
- Gerhard, M.C., Schmid, R.M. & Hacker, G. (2002). Analysis of the cytochrome c-dependent apoptosis apparatus in cells from human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, **86**, 893-8.
- Giroux, V., Iovanna, J. & Dagorn, J.C. (2006). Probing the human kinome for kinases involved in pancreatic cancer cell survival and gemcitabine resistance. *Faseb J*, **20**, 1982-91.
- Guerra, B. & Issinger, O.G. (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, **20**, 391-408.
- Gukovskaya, A.S. & Pandol, S.J. (2004). Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology*, **4**, 567-86.
- Guo, C., Yu, S., Davis, A.T., Wang, H., Green, J.E. & Ahmed, K. (2001). A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 5992-9.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

- Haussler, U., von Wichert, G., Schmid, R.M., Keller, F. & Schneider, G. (2005). Epidermal growth factor activates nuclear factor-kappaB in human proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F808-15.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. & Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, **19**, 5477-86.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, **6**, 2969-72.
- Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Kloppel, G., Longnecker, D.S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J., Shimizu, M. & Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, **28**, 977-87.
- Ibrahim, S.M., Ringel, J., Schmidt, C., Ringel, B., Muller, P., Koczan, D., Thiesen, H.J. & Lohr, M. (2001). Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death. *Pancreas*, **23**, 72-9.
- Igney, F.H. & Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **2**, 277-88.
- Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A. & Houghton, J.A. (2004). Influence of casein kinase II in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res*, **10**, 6650-60.
- Izeradjene, K., Douglas, L., Delaney, A. & Houghton, J.A. (2005). Casein kinase II (CK2) enhances death-inducing signaling complex (DISC) activity in TRAIL-induced apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *Oncogene*, **24**, 2050-8.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. & Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, **56**, 106-30.
- Kato, T., Jr., Delhase, M., Hoffmann, A. & Karin, M. (2003). CK2 Is a C-Terminal I kappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell*, **12**, 829-39.
- Klopfenstein, D.R., Kappeler, F. & Hauri, H.P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *Embo J*, **17**, 6168-77.
- Kornmann, M., Ishiwata, T., Kleeff, J., Beger, H.G. & Korc, M. (2000). Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer. *Ann Surg*, **231**, 368-79.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, **60**, 619-42.
- Landesman-Bollag, E., Romieu-Mourez, R., Song, D.H., Sonenshein, G.E., Cardiff, R.D. & Seldin, D.C. (2001). Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene*, **20**, 3247-57.
- Li, P.F., Li, J., Muller, E.C., Otto, A., Dietz, R. & von Harsdorf, R. (2002). Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol Cell*, **10**, 247-58.

- Lin, A. & Karin, M. (2003). NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol*, **13**, 107-14.
- Liptay, S., Weber, C.K., Ludwig, L., Wagner, M., Adler, G. & Schmid, R.M. (2003). Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **105**, 735-46.
- Litchfield, D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, **369**, 1-15.
- Ma, B.Y., Mikolajczak, S.A., Danesh, A., Hosiawa, K.A., Cameron, C.M., Takaori-Kondo, A., Uchiyama, T., Kelvin, D.J. & Ochi, A. (2005). The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells. *Blood*, **106**, 2002-10.
- Meggio, F. & Pinna, L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J*, **17**, 349-68.
- Mori, T., Doi, R., Toyoda, E., Koizumi, M., Ito, D., Kami, K., Kida, A., Masui, T., Kawaguchi, Y. & Fujimoto, K. (2005). Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis as a new strategy for pancreatic cancer. *Surgery*, **138**, 71-7.
- Muerkoster, S., Arlt, A., Witt, M., Gehrz, A., Haye, S., March, C., Grohmann, F., Wegehenkel, K., Kalthoff, H., Folsch, U.R. & Schafer, H. (2003). Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **104**, 469-76.
- Nagane, M., Huang, H.J. & Cavenee, W.K. (2001). The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis*, **6**, 191-7.
- Okada, H. & Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, **4**, 592-603.
- Ozawa, F., Friess, H., Kleeff, J., Xu, Z.W., Zimmermann, A., Sheikh, M.S. & Buchler, M.W. (2001). Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, **163**, 71-81.
- Ravi, R. & Bedi, A. (2002). Sensitization of tumor cells to Apo2 ligand/TRAIL-induced apoptosis by inhibition of casein kinase II. *Cancer Res*, **62**, 4180-5.
- Razzaq, T.M., Bass, R., Vines, D.J., Werner, F., Whawell, S.A. & Ellis, V. (2003). Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem*, **278**, 42679-85.
- Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C. & Sonenshein, G.E. (2002). Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells. *Cancer Res*, **62**, 6770-8.
- Romieu-Mourez, R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., Traish, A.M., Mercurio, F. & Sonenshein, G.E. (2001). Roles of IKK kinases and protein kinase CK2 in activation of nuclear factor-kappaB in breast cancer. *Cancer Res*, **61**, 3810-8.
- Ruzzene, M., Penzo, D. & Pinna, L.A. (2002). Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J*, **364**, 41-7.

- Sarela, A.I., Verbeke, C.S., Ramsdale, J., Davies, C.L., Markham, A.F. & Guillou, P.J. (2002). Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*, **86**, 886-92.
- Sato, T., Odagiri, H., Ikenaga, S.K., Maruyama, M. & Sasaki, M. (2003). Chemosensitivity of human pancreatic carcinoma cells is enhanced by IkappaBalpha super-repressor. *Cancer Sci*, **94**, 467-72.
- Satoh, K., Kaneko, K., Hirota, M., Masamune, A., Satoh, A. & Shimosegawa, T. (2001). Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*, **92**, 271-8.
- Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamooj, R., Beckett, L. & Bold, R.J. (2003). Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer*, **89**, 2110-5.
- Schneider, G., Siveke, J.T., Eckel, F. & Schmid, R.M. (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, **128**, 1606-25.
- Schulze-Bergkamen, H. & Krammer, P.H. (2004). Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol*, **31**, 90-119.
- Seeber, S., Issinger, O.G., Holm, T., Kristensen, L.P. & Guerra, B. (2005). Validation of protein kinase CK2 as oncological target. *Apoptosis*, **10**, 875-85.
- Seldin, D.C. & Leder, P. (1995). Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*, **267**, 894-7.
- Shen, J., Channavajhala, P., Seldin, D.C. & Sonenshein, G.E. (2001). Phosphorylation by the protein kinase CK2 promotes calpain-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Immunol*, **167**, 4919-25.
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H. & Kim, K. (2005). Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *Embo J*, **24**, 3532-42.
- Slaton, J.W., Unger, G.M., Sloper, D.T., Davis, A.T. & Ahmed, K. (2004). Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol Cancer Res*, **2**, 712-21.
- Srivastava, R.K. (2001). TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia*, **3**, 535-46.
- Tawfic, S., Yu, S., Wang, H., Faust, R., Davis, A. & Ahmed, K. (2001). Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol*, **16**, 573-82.
- Thomas, R.P., Farrow, B.J., Kim, S., May, M.J., Hellmich, M.R. & Evers, B.M. (2002). Selective targeting of the nuclear factor-kappaB pathway enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated pancreatic cancer cell death. *Surgery*, **132**, 127-34.
- Trauzold, A., Roder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., Martin-Subero, J.I., Siegmund, D., Muerkoster, S., Pagerols-Raluy, L., Siebert, R., Wajant, H. & Kalthoff, H. (2005). CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *Faseb J*, **19**, 620-2.
- Trauzold, A., Schmiedel, S., Roder, C., Tams, C., Christgen, M., Oestern, S., Arlt, A., Westphal, S., Kapischke, M., Ungefroren, H. & Kalthoff, H. (2003). Multiple

- and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br J Cancer*, **89**, 1714-21.
- Tschopp, J., Irmeler, M. & Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*, **10**, 552-8.
- Ungefroren, H., Kruse, M.L., Trauzold, A., Roeschmann, S., Roeder, C., Arlt, A., Henne-Bruns, D. & Kalthoff, H. (2001). FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *J Cell Sci*, **114**, 2735-46.
- Ungefroren, H., Voss, M., Jansen, M., Roeder, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Kalthoff, H. (1998). Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res*, **58**, 1741-9.
- Vaux, D.L. & Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 287-97.
- Vogler, M., Durr, K., Jovanovic, M., Debatin, K.M. & Fulda, S. (2006). Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene*.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. & Baldwin, A.S., Jr. (1999a). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*, **5**, 412-7.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L. & Baldwin, A.S., Jr. (2000). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*, **275**, 32592-7.
- Wang, G., Ahmad, K.A. & Ahmed, K. (2005). Modulation of death receptor-mediated apoptosis by CK2. *Mol Cell Biochem*, **274**, 201-5.
- Wang, W., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Larry, L., Cleary, K.R. & Chiao, P.J. (1999b). The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res*, **5**, 119-27.
- Xu, X., Toselli, P.A., Russell, L.D. & Seldin, D.C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet*, **23**, 118-21.

Lebenslauf

Name: Rainer Wilhelm Hamacher
Geburtstag: 29. September 1978
Geburtsort: München

Schulbildung

1985 - 1989 Grundschole Garching-West
1989 - 1998 Werner-Heisenberg-Gymnasium Garching
Juni 1998 Abitur

Hochschulausbildung

2000 - 2002 Vorklinisches Studium an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
19.03.2002 Ärztliche Vorprüfung
2002 - 2006 Klinisches Studium an der
Technischen Universität München
25.03.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07.09.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2005 - Sept. 2006 Praktisches Jahr am Krankenhaus München
Bogenhausen (Chirurgie) und am Klinikum rechts
der Isar (Innere Medizin in der II. Medizinische
Klinik und Psychiatrie)
26.10.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

Seit Februar 2007 Assistenzarzt
II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar,
Technischen Universität München

Promotionsarbeit

2004 - 2005 Experimenteller Teil der vorliegenden
Dissertationsarbeit an der TU München,
II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar
Doktorvater: Prof. Dr. med. Roland M. Schmid

Garching, den 04.05.2007

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor und beim Verfassen dieser Dissertationsarbeit unterstützt und gefördert haben.

Herrn Prof. Dr. Roland M. Schmid danke ich für die Überlassung dieser Promotionsarbeit und die Möglichkeit in seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu können. Ferner danke ich Ihm für die stete Förderung und die Gelegenheit erste Kongresserfahrungen sammeln zu dürfen.

Bei Herrn Dr. Günter Schneider möchte ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und ganz besonders für die fortwährende und engagierte Betreuung bedanken, die in diesem Umfang keine Selbstverständlichkeit ist. Er vermittelte mir mit Geduld und großer Hilfsbereitschaft die Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit. Seine Kompetenz und Erfahrung sowie stets neue Ideen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die unermüdliche Einweisung in sämtliche notwendigen Arbeitstechniken sowie die ständige Unterstützung und Hilfe, bedanke ich mich insbesondere bei Frau Birgit Kohnke-Ertel und Frau Konstanze Geiger. Auch bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor möchte ich mich für die freundschaftliche Unterstützung, die lehrreichen Seminare und das gute Arbeitsklima bedanken.

Des Weiteren danke ich nochmals Herrn Dr. Günter Schneider, Frau Birgit Kohnke-Ertel und Herrn Peter Engel für das kritische und konstruktive Korrekturlesen des Manuskriptes.

Abschließend gilt der Dank meinem Vater, der mir durch seinen Rückhalt und immerwährende Unterstützung das Studium und die Promotion erst ermöglicht hat.

Diese Arbeit wurde gefördert durch Mittel der Dr.-Ing. Leonhard-Lorenz-Stiftung.