

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung V (Schwerpunkte: Kinderchirurgie, Kinderurologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

**Analyse der Wirkung von siRNA auf die
Chemotherapie kindlicher epithelialer Lebertumoren
unter Kulturbedingungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

**MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

HEIKE MARTINA FRANK

aus Tübingen

2008

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J.Fuchs

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M.Gregor

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| | 1.1 Das Hepatoblastom | 2 |
| | 1.1.1 Epidemiologie | 2 |
| | 1.1.2 Ätiologie | 2 |
| | 1.1.3 Pathogenese | 3 |
| | 1.1.4 Klinische Aspekte | 4 |
| | 1.1.5 Laborchemische Charakteristika | 5 |
| | 1.1.6 Radiologische Befunde | 6 |
| | 1.1.7 Tumorstaging | 6 |
| | 1.1.8 Histologische Klassifikation | 7 |
| | 1.1.9 Behandlung, medikamentöse Strategie | 8 |
| | 1.1.10 Chirurgische Strategie | 11 |
| | 1.1.11 Prognose | 12 |
| | 1.1.12 Grundlagenforschung | 13 |
| | 1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) | 14 |
| | 1.3 Resistenzmechanismen und Versuchsstrategien | 15 |
| | 1.4 Apoptose | 16 |
| | 1.4.1 Definition | 16 |
| | 1.4.2 Pathway | 17 |
| | 1.4.3 Bcl-Genfamilie | 19 |
| 2 | FRAGESTELLUNG..... | 21 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 22 |
| | 3.1 Zelllinien | 22 |
| | 3.1.1 HepT1 | 22 |
| | 3.1.2 HUH6 | 24 |
| | 3.1.3 HepG2 | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Zytostatika | 26 |
| 3.2.1 Cisplatin (CDDP) | 26 |
| 3.2.2 Doxorubicin (Doxo) | 28 |
| 3.2.3 Taxol | 29 |
| 3.2.4 Etoposid (VP16) | 31 |
| 3.3 Kultivierung der Zellen | 32 |
| 3.3.1 Kulturbedingungen | 32 |
| 3.4 Ermittlungen der IC50 für die Zytostatika | 33 |
| 3.4.1 Proliferationstest; MTT-Assay | 33 |
| 3.4.2 Methodisches Vorgehen | 34 |
| 3.4.3 Berechnung der IC-Werte | 35 |
| 3.5 Ermittlung der Verteilung: Apoptose/Nekrose/ lebende Zellen an den zuvor erfassten IC50-Werten | 36 |
| 3.5.1 Transfektion | 36 |
| 3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie und Annexin | 38 |
| 3.6 Western Blot – Nachweis von Bcl-2, Bcl-xl | 41 |
| 3.6.1 Theorie des Western Blots | 41 |
| 3.6.2 Durchführung | 42 |
| 3.6.3 Vergleich Monotherapie vs Monotherapie+siRNA | 45 |
| 3.6.4 Densitometrie / Western Blot | 46 |
| 3.7 Immunfluoreszenz – Nachweis von Bcl-2 | 47 |
| 3.7.1 Theorie der Immunfluoreszenz | 47 |
| 3.7.2 Durchführung | 47 |
| 3.8 Materialien | 49 |
| 3.8.1 Zellkultur | 49 |
| 3.8.2 Ermittlung der IC50 für die Zytostatika | 50 |
| 3.8.3 Apoptose / Nekrose / lebende Zellen | 51 |
| 3.8.4 Western Blot | 51 |
| 3.8.5 Immunfluoreszenz | 54 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | ERGEBNISSE..... | 55 |
| | 4.1 IC50 von CDDP, Doxo, Taxol, Etoposid | 55 |
| | 4.2 Transfektionseffizienz der Zellen | 60 |
| | 4.3 Fluoreszenzmikroskopie; Apoptosenachweis | 65 |
| | 4.4 Western Blot / Densitometrie | 70 |
| | 4.4.1 Nachweis von Bcl-2, Bcl-xl | 70 |
| | 4.4.2 Vergleich Monotherapie vs Monotherapie+siRNA | 73 |
| | 4.5 Immunfluoreszenz – Nachweis von Bcl-2 | 75 |
| 5 | DISKUSSION..... | 80 |
| | 5.1 Allgemeiner Teil | 80 |
| | 5.2 Eigene Ergebnisse | 83 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 87 |
| 7 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 88 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 89 |
| 9 | ANHANG..... | 94 |

1 EINLEITUNG

1.1 Das Hepatoblastom - heutiger Stand der Forschung

Das Hepatoblastom (HB) zählt zu den am häufigsten vorkommenden malignen Leberzelltumoren im Kindesalter. Der Anteil des Hepatoblastoms an der Gesamtheit aller Krebserkrankungen im Kindesalter beträgt etwa 1%. Anhand der Vielzahl von Klassifikationen und Staging-Systemen, welche bisher entwickelt worden sind, zeigt sich die Schwierigkeit der Einteilung und Charakterisierung der vorliegenden Tumorart.

Die Ätiologie des Hepatoblastoms ist unklar. Zytogenetische Veränderungen, phänotypische Merkmale und biologische Aspekte, die diese Neoplasie charakterisieren, tragen in zunehmendem Maße zum Verständnis der Pathogenese bei. Derzeit geht man von einer Genese aus pluripotenten Stammzellen aus. Ein breites Spektrum an epithelialen und mesenchymalen Differenzierungsmustern konnte bei Hepatoblastomzellen beschrieben werden (1).

Aus zell- und molekularbiologischen Erkenntnissen geht die Entwicklung neuer Behandlungsansätze hervor. Insbesondere bei schlechter Prognose steht im Vordergrund, das Outcome zu verbessern.

Der erste Hepatoblastom-Fallbericht wurde vor mehr als 100 Jahren publiziert (2). Im letzten Jahrzehnt sind mehrere klinische retrospektive Analysen, die sich mit Leberzelltumoren bei Kindern beschäftigen, erschienen. Analysen, die die biologischen Aspekte des Hepatoblastoms thematisieren, sind nur in geringer Anzahl verfügbar (3-7).

1.1.1 Epidemiologie

Inzidenz:

Das Hepatoblastom ist ein maligner Leberzelltumor mit einer jährlichen Inzidenz von 0,5-1,5 pro 1 Million Kinder unter 15 Jahren. Diese Angaben gelten für die westlichen Länder (8), obgleich auch ein Anstieg in den USA zu verzeichnen ist. Der Häufigkeitsgipfel liegt im Alter von 6 Monaten bis zum 3. Lebensjahr.

Nach dem Neuroblastom und Nephroblastom sind die primären epithelialen Leberzelltumoren die dritthäufigsten intra-abdominellen Neoplasien bei Kindern (9). Das Hepatoblastom ist der häufigste primär maligne Lebertumor beim Kind in den westlichen Ländern.

Eine Beziehung zu Geburtsgewicht oder Frühgeburt wurde beschrieben (10,11).

Es besteht eine Koinzidenz des Hepatoblastoms mit der familiären adenomatösen Poliposis (FAP) und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), was Rückschlüsse auf die Pathogenese des Hepatoblastoms ziehen läßt. (12,13). Ein Defekt der Chromosomen 5 und 11 wird diskutiert.

Die FAP wird durch eine Inaktivierung des APC (adenomatous polyposis coli) Tumor-Suppressorgens, lokalisiert auf Chromosom 5, verursacht. Die Funktion dieses Gens liegt in der Down-Regulation von β -Catenin. Bei zum Teil mehr als 67% der Patienten mit Hepatoblastom wurden Abnormitäten des APC-Gens beschrieben (14). Jedoch zeigen vergleichsweise ähnlich hohe Patientenzahlen aktivitätssteigernde Mutationen des β -Catenin-Gens (15-17).

1.1.2 Ätiologie

Zytogenetische Veränderungen:

Die zytogenetischen Analysen des HB brachten bisher kein beständiges Muster an Chromosomenanomalien hervor. Die am häufigsten vorkommenden genetischen Aberrationen sind Amplifikationen der Chromosomen 1q, 2q, 7q, 8, 17q und 20 (13,18-23).

Von größerer funktioneller Bedeutung ist der Verlust der Heterozygotie (LOH = loss of heterocytosity) des Chromosomenanteils 11p15. Dies wurde bei über einem Drittel der Patienten mit Hepatoblastom nachgewiesen und der LOH des Chromosoms 1p kam ebenfalls bei annähernd 33% der Patienten vor (24,25). Der LOH des maternalen Chromosoms 11p15 ist nahezu pathognomonisch für Patienten mit BWS, die ihrerseits ein erhöhtes Risiko besitzen, ein Hepatoblastom, einen Wilmstumor oder ein Rhabdomyosarkom zu entwickeln (13).

Bedeutende, auf 11p15 vorhandene Gene sind p57^{KIP2}, IGF2 (insuline-like growth factor) und H19. Die Gene p57^{KIP2} und H19 sind Tumorsuppressorgene, wohingegen IGF2 ein fetales Mitogen ist. Die IGF2-Transkription wird von β -Catenin-Mutationen beeinflusst. Dies scheint ebenfalls eine Rolle bei der Ausbildung eines Hepatoblastoms zu spielen. Das Gen p57^{KIP2} liegt beim HB hochreguliert vor (26), was im Grunde gegen seine Rolle als Tumorsuppressorgen spricht.

Der Verlust von Imprinting wurde für das von der Mutter stammende IGF2-Gen beschrieben. Es liegt jedoch keine gesteigerte Expression von IGF2 oder verminderte Expression von H19 vor. Dies ist bei BWS oder damit in Verbindung stehenden Tumoren der Fall (13).

Mutationen, welche mit dem Tumorsuppressorgen p53 vergesellschaftet sind und oftmals in Zusammenhang mit dem Hepatoblastom beschrieben wurden, spielen nach heutigem Stand keine pathogenetische Rolle bei der Ausbildung eines Hepatoblastoms. Diese Veränderung ist in großem Maße in vielen Tumoren vorhanden (13,27-29). Darüber hinaus korreliert die Überexpression von p53 nicht mit der Überlebensrate der Patienten (30).

1.1.3 Pathogenese

Die pathogenetischen Mechanismen, die für die Entstehung eines Hepatoblastoms verantwortlich sind, bleiben bisher unklar. Das HB, zu den embryonalen Tumoren gehörend, entstammt undifferenziertem embryonalem Gewebe.

Schnell wachsende Tumoren weisen eine höhere Sensitivität gegenüber zytotoxischen Medikamenten und der Radiotherapie auf (31,32). Die gegenwärtig akzeptierte Hypothese besagt, daß sich die Hepatoblastomzellen aus pluripotenten Leberstammzellen bilden (33-35).

Diese Stamm- oder ovalen Zellen sind in der Lage, sich sowohl in Hepatozyten als auch in biliäre Epithelzellen zu differenzieren. Dementsprechend exprimieren sie Marker beider Zelltypen. Zusätzlich wurden extramedulläre sowie im Tumor selbst stattfindende Erythropoese und Thrombopoese beobachtet (36). Hepatoblastomzellen sezernieren Interleukin 1 β (IL1 β). Dadurch kommt es in den umgebenden Fibroblasten und Endothelzellen zur Induktion der IL6-Produktion (37). Das Akute-Phase-Protein β 2-Mikroglobulin wird daraufhin vermehrt sezerniert. IL6 und IL1 β stimulieren beide die Ausschüttung des Hepatocyte-growth-factors (HGF).

HGF wird in kindlichen Hepatoblastomen von Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Er fungiert als parakriner Wachstumsfaktor für die Hepatoblastomzellen, die den HGF-Rezeptor c-met an der Oberfläche präsentieren (38,39).

Das schnelle Wachstum von wiederkehrenden, verstreuten Tumoren und/oder Metastasen, welches nach einer inkompletten Resektion ohne sonstige Weiterbehandlung auftreten kann, wird auf eine gesteigerte HGF-Sekretion, die im Anschluß an eine Resektion einsetzt, zurückgeführt.

1.1.4 Klinische Aspekte

Hepatoblastome kommen überwiegend im rechten Leberlappen vor (4,40). Die Tumore präsentieren sich im Normalfall als asymptomatische, abdominelle Raumforderung. Gewichtsverlust, Anorexie, Übelkeit und abdominelle Beschwerden weisen auf ein fortgeschrittenes Stadium hin (6). Fernmetastasen, welche bei annähernd 20% der Patienten zum Diagnosezeitpunkt gefunden werden, befinden sich meistens in der Lunge. Des weiteren wurden Metastasen im Zentralnervensystem und Augenbereich beschrieben (41,42).

1.1.5 Laborchemische Charakteristika

Anämie und Thrombozytose sind übliche Befunde bei Patienten mit Hepatoblastom (3). Dieser Befund wird auf die Fähigkeit der HB-Zellen, IL1 β zu sezernieren, zurückgeführt. Wie schon zuvor beschrieben führt dies zur Induktion der IL6-Synthese in den umgebenden Fibroblasten und Endothelzellen (37).

Aus einer Studie mit Tumorpatienten und einem Mausmodell stammen die Beobachtungen eines IL6-abhängigen Anstiegs an Thrombopoietin (TPO). Gleichfalls erhöhte sich die Thrombozytenanzahl (37,43). Dieser Befund scheint die erhöhten TPO-Spiegel und die damit verbundene Thrombozytose bei HB-Patienten erklären zu können (3).

Ein sensitiver, jedoch unspezifischer Marker des Hepatoblastoms stellt das α -Fetoprotein (AFP) dar. Nahezu 90% der HB-Patienten haben stark erhöhte AFP-Serumspiegel. Daher kann die AFP-Bestimmung als klinischer Tumormarker genutzt werden, um einerseits eine Aussage über die Effektivität der Behandlung machen, andererseits ein erneutes Tumorwachstum nach erfolgter Operation frühzeitig erkennen zu können. Die Erhöhung des AFP-Spiegels gibt ihrerseits auch Hinweise auf die vorliegende Tumorentität: Hepatoblastome mit überwiegend embryonalem Anteil weisen hohe Spiegel in Bezug auf das Lebensalter auf. Sofern fetale Anteile dominieren, sind die Spiegel vergleichsweise niedrig.

Physiologischer Weise werden hohe AFP-Spiegel in der Fetalzeit gemessen. Diese Konzentrationen nähern sich innerhalb der ersten 6 Lebensmonate dem Wert der Erwachsenen.

| Lebensalter | AFP-Mittelwert (95% Konfidenzintervall) |
|-----------------|--|
| Geburt | 158 μ g/ml (312.6-799.8 μ g/ml) |
| 1.Lebenswoche | 69 μ g/ml (12.5-34.9 μ g/ml) |
| 4.Lebenswoche | 12 μ g/ml (1.16-118.8 μ g/ml) |
| 6.Lebensmonat | 0.047 μ g/ml (0.0008-2.630 μ g/ml) |
| 12. Lebensmonat | 0.018 μ g/ml (0.0004-0.832 μ g/ml) |

Tabelle I: AFP-Werte (aus Protokoll HB99/GPOH)

1.1.6 Radiologische Befunde:

Die bildgebenden Verfahren spielen eine zentrale Rolle bei der Diagnosefindung, dem Staging sowie der Behandlung und Nachkontrolle der Hepatoblastom-Patienten. Da die vollständige chirurgische Resektion als Voraussetzung für eine Heilung anzusehen ist, sind die Kenntnis der exakten Tumorlokalisierung und die Bemessung der Tumorausdehnung wichtige Parameter. Oftmals wird die Erstdiagnose durch einen Ultraschall des Abdomens gestellt. Das Hepatoblastom präsentiert sich dabei als eine umschriebene, echoreiche, solide, normalerweise zystenfreie, intrahepatische Masse. Sehr häufig (60-70%) ist der Tumor im rechten Leberlappen lokalisiert (44).

Sowohl CT als auch MRT tragen zur Erkennung der segmentalen Ausdehnung des Tumors sowie seiner exakten topographischen Beziehung zu den hepatischen Gefäßen bei.

1.1.7 Tumorstaging:

Das derzeit gebräuchliche Tumorstaging-System entstammt der koordinierten Studie zur Behandlung kindlicher Lebertumoren HB99 der GPOH. Es basiert einerseits auf der Bildgebung, welche vor Therapiebeginn erfolgt, andererseits auf das postoperativ erzielte Resektionsresultat (45).

Ein weiteres Staging-System entstammt der „International Society of Pediatric Oncology Liver Study Group“ (SIOPEL-1; präoperative Chemotherapie und nachfolgende chirurgische Resektion) (46). Dieses präoperative Staging (pretreatment extent of disease = PRETEXT) wurde für die erste prospektiv durchgeführte Lebertumorstudie der SIOP entwickelt. Die Studienziele von PRETEXT waren die Analyse der Genauigkeit der präoperativen Einstufung, der Beobachtungsgleichheit sowie der Vergleich des Vorhersagewerts in Bezug auf die aktuell verwendeten Staging-Systeme.

PRETEXT zeigt eine mittlere Genauigkeit mit der Tendenz zum Overstaging von Patienten. Was die Reliabilität und die Vorhersage der Überlebensrate

anbelangt, erbrachte die Studie gute Resultate. Sie offeriert die Möglichkeit, die Effekte einer präoperativ durchgeführten Therapie zu überwachen und kann ebenfalls bei Patienten angewandt werden, die noch keine operative Intervention erfahren haben. Aus Gründen der Vergleichbarkeit sollten alle Hepatoblastompatienten, die in Studien eingeschlossen sind, ebenfalls PRETEXT-entsprechend eingestuft werden (47).

Die präoperativen und postoperativen Systeme nutzen die gleichen Parameter als Bewertungsgrundlage: Tumorgroße, Gefäßinvasion, Ausdehnung und Komplexität des Primärtumors sowie abschließend das Vorhandensein oder Fehlen von Metastasen.

Von einer Biopsie wird oftmals Abstand genommen, sofern der Tumor sich auf einen Leberlappen beschränkt und eine sofortige chirurgische Intervention angestrebt werden kann (48,49). Mittels der bildgebenden Verfahren ist das Hepatoblastom nahezu eindeutig bestimmbar.

Nur in seltenen Fällen, sofern die Diagnostik keine ausreichenden Daten zur Verfügung stellen kann, wird eine Biopsie durchgeführt.

Iyer et al kamen zum Ergebnis, dass epitheliale Hepatoblastome mittels einer Nadelaspiration leicht zu diagnostizieren und in fetale und embryonale Subtypen klassifizierbar sind (50).

Im HB99-Studien-Protokoll wird hingegen beschrieben, dass Nadelbiopsien sich häufig als insuffizient erwiesen haben. Deshalb wird bei Patienten, bei denen ein Hepatoblastom nicht rein klinisch diagnostizierbar ist, die Entnahme einer offenen Keilbiopsie über eine Laparotomie empfohlen (45).

1.1.8 Histologische Klassifikation:

Heutzutage dient zur Klassifikation des HB die ursprünglich entworfene Klassifikation von Ishak und Glunz. Es werden zwei morphologische Typen des HBs unterschieden (51). Der epitheliale Typ enthält embryonale und/oder fetale Zellen. In Anteilen mit gut differenzierten HB-Zellen ist eine extramedulläre

Hämatopoese zu beobachten (36,52). Der gemischte Typ enthält mesenchymales Gewebe in Verbindung mit epithelialen Elementen.

Eine Zeit lang wurde eine Klassifikation verwendet, deren Grundlage der Differenzierungsgrad der HB-Zellen bildete (53). Drei histologische Subtypen wurden hierbei unterschieden. Das Charakteristikum des geringgradig differenzierten embryonalen Typs waren tubuläre oder glanduläre histologische Strukturen. Der Hauptanteil bestand sowohl aus rosettenartig aussehenden, verlängerten Tumorzellen als auch aus daran beteiligten fetalen und anaplastischen Zellen. Hepatoblastom-Zellen vom hochdifferenzierten, fetalen Typ ähnelten normalen Hepatozyten. Sie zeigten wenige Mitosen und waren in zwei oder drei Zellschichten dicken Tumorsträngen angeordnet. Eine normale Läppchenstruktur war nicht vorhanden. Der anaplastische, ebenfalls als undifferenzierter, kleinzelliger Typ bezeichnet, war durch schmale Zellen mit dicht stehenden Zellkernen und geringem Zytoplasmaanteil gekennzeichnet (54).

Später wurde noch ein makrotrabekulärer Typ, der Ähnlichkeit zum HCC bei Erwachsenen aufwies, hinzugefügt (55).

Es ist noch umstritten, ob ein rein fetaler histologischer Phänotyp mit einer günstigen Prognose in Verbindung steht (48,54,56-59), oder ob ein anaplastischer, kleinzelliger histologischer Phänotyp eine ungünstige Prognose mit sich bringt (54,58,60).

1.1.9 Behandlung:

Als Ziel der Behandlung des Hepatoblastoms ist die komplette Resektion des Tumors anzusehen, welche für das Überleben der Patienten essentiell ist. Aktuell liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 75% (61,62). Vor 30 Jahren war die Rate vergleichsweise bei nur 35%(3).

Eine Verbesserung der Ergebnisse wurde zum einen durch die Zusammenfassung und Auswertung der Therapiestrategien und –Ergebnisse in

multizentrischen Studien, sowie zum anderen durch die Einführung eines kombinierten Ansatzes aus Operationen und Chemotherapie erzielt. Ein Ergebnis der Studien (z.B. HB99 der GPOH, SIOPEL 1 der SIOP) war die Erkenntnis, dass HB in der Regel sensibel gegenüber Chemotherapeutika sind. Zu den wichtigsten Zytostatika, die derzeit in der Behandlung des HB angewendet werden, gehören: Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid (VP16), Carboplatin.

Nach HB99 und SIOPEL 1 werden Hepatoblastome durch eine neoadjuvante Chemotherapie vorbehandelt und sekundär operiert. An die Operation schließen sich noch weitere Chemotherapie-Blöcke an. Diese Strategie gründet darauf, dass die präoperative Chemotherapie zu einer Verkleinerung des Tumors führt, der Tumor solider wird, weniger zur Streuung neigt und besser zum gesunden Lebergewebe abzugrenzen ist. Dies verbessert den Erfolg einer kompletten Resektion erheblich (6).

Als Nebeneffekt können (Mikro-) Metastasen gleichzeitig mitbehandelt werden. Eine Vorbehandlung bedingt somit eine verbesserte Resektabilität und die Vitalität der Tumorzellen nimmt aufgrund der zytostatischen Therapie ab.

Abbildung 1 verdeutlicht die Therapiestrategie nach der Studie HB99 der GPOH.

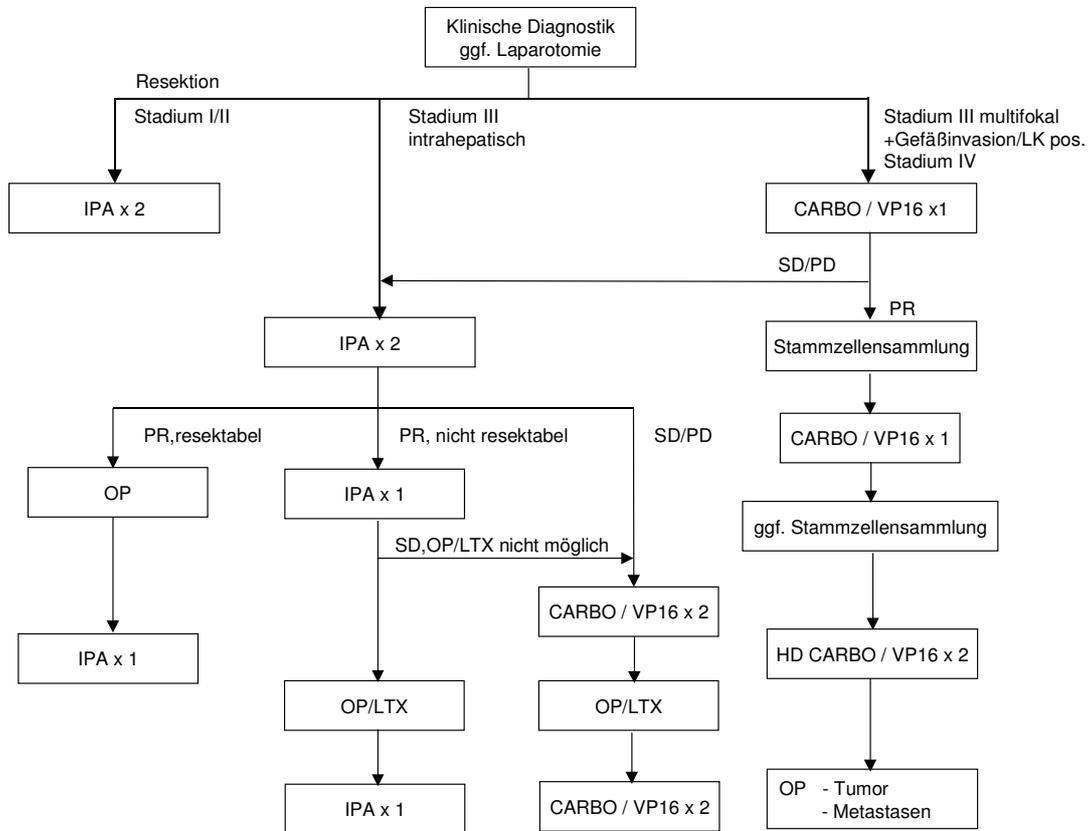


Abbildung 1:

Studiendesign der German Pediatric Liver Tumor Study HB99. IPA: Ifosfamid, Cisplatin, Adriamycin VP16/CARBO: Etoposid, Carboplatin; PR: partial response; SD/PD: stable disease/progressive disease; HD: high dose; LTX: Lebertransplantation;

| | | |
|----------------|----------------------|-----------|
| Ifosfamid | 30mg/m ² | Tag1-3 |
| Cisplatin | 20mg/m ² | Tag4-8 |
| Adriamycin | 60mg/m ² | Tag9-10 |
| Carboplatin | 800mg/m ² | Tag1-4 |
| Etoposid | 400mg/m ² | Tag1-4 |
| HD Carboplatin | 500mg/m ² | Tag 8- -5 |
| HD Etoposid | 500mg/m ² | Tag 8- -5 |

Tabelle II: Dosierungen nach Protokoll HB99

1.1.10 Chirurgische Strategie:

Ziel der chirurgischen Therapie ist die komplette Tumor-Resektion. Hierbei erwiesen sich anatomische Resektionsverfahren gegenüber atypischen als überlegen. Gegebenenfalls ist eine jeweils erweiterte Hepatektomie notwendig (63).

Weiterhin kommen in Ausnahmefällen (z.B. bei Invasion der großen Gefäße) Resektionen unter extrakorporaler Zirkulation sowie die Lebertransplantation zur Anwendung.

Für die Resektion von großen kindlichen Lebertumoren in kritischer Lokalisation wurde die Resektion im Kreislaufstillstand und tiefer Hypothermie an der Herz-Lungen-Maschine (HLM) eingeführt. Die Resektion wurde entweder in komplettem Kreislaufstillstand oder unter Low-flow-Kreislaufbedingungen durchgeführt. In Kombination mit der Chemotherapie konnte ein befriedigendes Langzeitüberleben trotz eines ausgedehnten Tumorwachstums erreicht werden (64).

Die Rolle der Lebertransplantation im Gesamtmanagement der Hepatoblastom-Therapie erscheint von zunehmender Wichtigkeit. Beim Vorliegen sowohl von multifokalen und solitären Hepatoblastomen, welche alle vier Lebenssektoren infiltrieren, als auch bei zentral lokalisierten Tumoren nahe den Hauptvenen, haben die SIOPEL-1-Studie sowie ausführliche Analysen der weltweiten Erfahrung gezeigt, dass die primäre Transplantation hohe, langfristig rezidivfreie Überlebensraten in der Größenordnung von 80% erbringt (65). Derzeit wird die Lebertransplantation als primäre chirurgische Maßnahme diskutiert.

Das radikale chirurgische Vorgehen ist gerechtfertigt aufgrund des prognostischen Zusammenhangs zwischen kompletter Resektion und Überleben (62).

1.1.11 Prognose

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten die Behandlungserfolge deutlich verbessert werden – unter anderem durch die Anwendung effektiver chemotherapeutischer Strategien. Die Rate für das rezidivfreie stadiumunabhängige Überleben stieg von 25-40% Anfang der 80er Jahre auf bis zu 75% gegenwärtig (63). Die Behandlungsergebnisse von fortgeschrittenen oder rezidivierenden Hepatoblastomen sind jedoch immer noch unbefriedigend. Verschiedene multizentrische onkologische Studien zeigten ein tumorfreies Überleben von etwa 66% der Patienten im Stadium III und 17% im Stadium IV. In der German Pediatric Liver Tumor Studie (HB89) zeigte sich bei 8 von 12 Patienten mit einem Hepatoblastom Stadium III/IV, die mit vier oder mehr Zyklen unter Anwendung einer Kombinationstherapie mit Ifosfamid, Cisplatin und Doxorubicin behandelt wurden, im Anschluß eine „Drug-Resistance“ .

Desweiteren wurde deutlich, dass eine Heilung der HB durch Chemotherapie allein nicht zu erreichen ist, sondern die komplette Resektion der Tumoren voraussetzt. Für die Therapie fortgeschrittener und multifokaler HB entstehen aus dieser Erkenntnis heraus noch nicht gelöste Probleme. Multifokale HB sind oft auch nach mehreren Blöcken Chemotherapie nicht resektabel und zeigen eine höhere Rezidivquote. Eventuell bietet in diesem Falle die aktuell diskutierte Lebertransplantation eine Option für betroffene kleine Patienten (65). Kinder mit metastasierten HB haben gegenwärtig eine Überlebensrate von nur 25-30%. Bei prolongierter Anwendung führen Chemotherapeutika überdies zur Ausbildung der schon zuvor erwähnten Chemotherapieresistenz bei den Tumoren.

Neben der Verbesserung der Therapieeffizienz rückte in den vergangenen Jahren die Identifikation von Risikofaktoren zunehmend in den Focus der Forschung.

Es wurde deutlich, dass die Prognose der Kinder von der eine extrahepatischen Tumorausdehnung, Multifokalität, Gefäßinvasion, DNS-Aneuploidie und entfernten Metastasen abhängig ist (56,66-68).

Ein operabler Tumor, ein Abfall der zirkulierenden AFP-Spiegel während der Chemotherapie (67) sowie ausschließliches Vorhandensein von HB-Zellen vom

fetalen Typ (56,57) werden mit einer günstigeren Prognose in Verbindung gebracht. In alternativen Therapieansätzen werden Patienten mit geringem Risiko mit weniger intensiven Chemotherapeutika vorbehandelt (SIOPEL 3).

Der Anreiz, die Therapieschemata zu verbessern, verfolgt nunmehr das Ziel, den restlichen 25% der Patienten, die bisher an ihrer Erkrankung sterben, in Zukunft eine bessere Prognose geben zu können. Neuere Verfahren arbeiten mit der Kombination verschiedener Zytostatikagruppen. Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse rücken unter anderem die Mechanismen der Chemotherapieresistenz als Faktoren für den Progress der Tumorerkrankung in den Mittelpunkt des Interesses.

1.1.12 Grundlagenforschung:

Zur weiteren Verbesserung der Therapieergebnisse, sowie zum besseren Verständnis der Tumoreigenschaften und biologischen Verhaltensweisen werden HB in der Grundlagenforschung untersucht. Neben der Etablierung kontinuierlicher Zelllinien HepT1 und HUH6 (69,70) wurde auch ein Tiermodell unter Verwendung von Nacktmäusen (immundefiziente NMRI nu/nu Mäuse) entwickelt (71).

Im Vordergrund der Untersuchungen stand zunächst die Analyse der immunhistochemischen und molekulargenetischen Faktoren, die Analyse proliferationsfördernder Zytokine sowie die Untersuchung der biologischen Eigenschaften des Tumors inklusive der in den verschiedenen Studien verwendeten Zytostatika in Zellkulturen und im Tiermodell (51,71).

1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das HCC ist aus epidemiologischer Sicht in Europa und USA selten, wohingegen es in den Tropen das am häufigsten vorkommende Malignom bei Männern mit einer jährlichen Inzidenz von 100.000 ist. Weltweit beläuft sich die Inzidenz auf 1.000.000 pro Jahr. Das HCC ist endemisch im Südosten Asiens sowie in Afrika. Der Häufigkeitsgipfel liegt, bezogen auf die endemischen Gebiete im 3.-4. Lebensjahrzehnt, in Europa und in den USA hingegen im 5.-6. Lebensjahrzehnt. Als Risikofaktoren gelten eine chronische Hepatitis B- und C-Infektion, eine erhöhte Aflatoxin-B1-Exposition, die Hämochromatose, sowie ein Alpha-1-Antitrypsinmangel. Ergebnisse epidemiologischer Studien belegen einen Zusammenhang zwischen HCC und der Hepatitis B- und C-Infektion. Die Inzidenz des HCC ist in Regionen mit hohen Hepatitis-B- Infektionsraten überdurchschnittlich hoch. Sowohl ein chronischer Hepatitis-B-Carrier-Status als auch eine materno-fetal erfolgte Virus-Transmission sind entscheidende Faktoren für die Ausbildung eines HCC (72).

Der Mechanismus des Hepatitis-C-Virus, der die Hepatokarzinogenese induziert, ist größtenteils noch nicht verstanden, jedoch tritt der Virus in einer hohen Prozentzahl mit der Erkrankung assoziiert auf. Chronischer Alkoholkonsum und Zirrhose sind weitere Cofaktoren, die das HCC-Risiko bei Patienten mit einer chronischen hepatischen Virusinfektion erhöhen.

Die Hepato-Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, welche in Verbindung mit einer Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen steht. Die Tumorgenese durchläuft die Phasen Initiation, Promotion und Progression (72).

Die histologischen Kriterien für die Diagnosestellung eines HCC sind etabliert und basieren auf zytologischen und die Zellarchitektur betreffenden Veränderungen. Gut differenzierte HCC-Zellen ähneln in ihrem ultrastrukturellen Aussehen den normalen Hepatozyten. Während des Prozesses der Dedifferenzierung findet in zunehmendem Maße eine Desorganisation der intrazellulären Organellen statt. Das fibrolamelläre Karzinom hat ein

charakteristisches histologisches Bild und ultrastrukturelle onkozytische Merkmale (72).

Die Unterschiede zwischen kindlichen und adulten hepatozellulären Karzinomen sind noch unklar. Das HCC ist im Kindesalter sehr selten. Etwa 1/7 der Kinder mit primären malignen Lebertumoren sind davon betroffen; vor allem Schulkinder und Jugendliche (45). In Mitteleuropa bilden Hepatoblastome die überwiegende Mehrzahl der Lebermalignome im Kindesalter.

Die Überlebensrate bei pädiatrischen HCC-Patienten liegt unter 30%. Die vollständige Tumoresektion erweist sich als die einzige Möglichkeit für ein Überleben. Neue prospektive Multicenter-Studien bei Kindern mit HCC sind notwendig, um die Ergebnisse verbessern und die weitere Erforschung der Unterschiede zwischen adulten und pädiatrischen HCCs ermöglichen zu können. Nur auf diese Art und Weise wird die Frage bezüglich eines Unterschiedes geklärt werden können (73).

1.3 Resistenzmechanismen und Versuchsstrategien

Die „Multi-Drug-Resistance“ (MDR) war und ist eines der Hauptprobleme bei der Therapie des fortgeschrittenen und rezidivierenden Hepatoblastoms. So weisen z.B. die Hepatoblastomzellen unter medikamentöser Therapie eine gesteigerte Expression des MDR-1-Gens auf. Dies bedingt einen Anstieg des daraus resultierenden Genprodukts, dem P-Glykoprotein (P-gp) in Abhängigkeit von der applizierten Chemotherapie (74). Das P-gp ist ein ATP-abhängiges Tunnelprotein der Membran, das Medikamente aktiv aus der Zelle transportiert. Ein Inhibitor des P-gp, der Chemosensitizer PSC833, verbesserte den Effekt der Chemotherapie beim HB unter experimentellen Bedingungen signifikant (74). Die MDR führt zur Limitierung der Anwendbarkeit von Zytostatika aufgrund der potentiellen Nebeneffekte - Kardiotoxizität, Nephrotoxizität, Ototoxizität und Knochenmarksdepression.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Therapiealternativen. Eine vielversprechende Strategie, die schon an HCC-Modellen in vivo getestet worden ist, könnte die sogenannte „suicide gene therapeutic approach“ sein (75). Damit wird eine selektive Abtötung von Tumorzellen erreicht, indem ein Gen exprimiert wird, welches membranpermeable, nicht toxische Substanzen (Prodrug) in toxische Substanzen (suicide drug) umwandeln kann. Dieser Effekt beschränkt sich alleinig auf die Tumorzellen und verhindert somit systemisch auftretende Toxizität.

Erfolg erhofft man sich ebenfalls durch den Einsatz von siRNAs (small interfering RNA).

RNA Interferenz (RNAi) hat sich zu einem wichtigen Werkzeug im Hinblick auf das Studieren von Genfunktionen entwickelt („functional genomics“) und ermöglicht den „Knock-down“ von Genen in einer Vielzahl von Organismen (76). Zu nennen sind hier Säugetiere (77), Drosophila, Nematoden, Pilze und Pflanzen. Aufgrund der Beobachtungen ist man der Ansicht, dass die RNAi an der antiviralen Abwehr beteiligt ist, einen modulierenden Einfluß auf die Transposon-Aktivität ausübt und des weiteren an der Regulation der Gen-Expression teilnimmt. (78-82). Die neue Technik der RNA Interferenz erlaubt es unter anderem, Genfunktionen in Säugerzellen im Hochdurchsatz zu analysieren.

1.4 Apoptose

1.4.1 Apoptose-Definition

Von der Nekrose unterscheidet sich der „programmierte Zelltod“ (83), auch „Apoptose“ (84) genannt. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, der im Allgemeinen nicht von einer Entzündungsreaktion begleitet wird, da keine Zellinhalte in die Umgebung freigesetzt werden (85). Auch morphologisch bestehen Unterschiede zur Nekrose. Eine apoptotische Zelle schrumpft, rundet sich ab und löst sich von

der extrazellulären Matrix. Das Zytoskelett degradiert, die Plasmamembran wird ausgestülpt, das Chromatin kondensiert und der Zellkern fragmentiert, gefolgt von der biochemisch charakteristischen, internukleosomalen Fragmentierung der DNS durch Endonukleasen (86). Anschließend erfolgt die Desintegration der Plasmamembran, die zur Bildung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen, führt. Makrophagen phagozytieren diese apoptotischen Körperchen und spalten deren makromolekulare Bestandteile während einer Lysosomen-Passage, so dass die resultierenden biochemischen Grundbausteine zum Recycling zur Verfügung stehen.

1.4.2 Pathway - Funktion der siRNA

Unter RNA-interference (RNAi) versteht man den Prozess des Einbringens einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) in das Zellinnere, wobei der Vorgang sequenzabhängig ist. Die RNAi wird im Allgemeinen als ein posttranskriptionaler „gene-silencing“ Mechanismus beschrieben, in welcher die dsRNA den Abbau der homologen mRNA (messenger RNA) im Zytoplasma triggert.

Ein wichtiges Charakteristikum des Mechanismus ist das Prozessieren von langen dsRNAs (double-stranded RNA) in 21-23 Nukleotide, den sogenannten small interfering RNAs (87) durch den Dicer-Enzymkomplex. Die siRNA bildet mit einem Proteinkomplex den sogenannten RNA-induced Silencing Complex (RISC). Dieser bindet an den antisense Strang des 21-mers und schneidet die mRNA in der Mitte des Hybrides (77). Die mRNA Degradation führt zu einem „gene-silencing“ auf posttranskriptioneller Ebene durch Inhibition der eigentlichen Proteinexpression (82).

Modell der RNA-Interferenz sowie des posttranskriptionalen „gene-silencing“ Mechanismus:

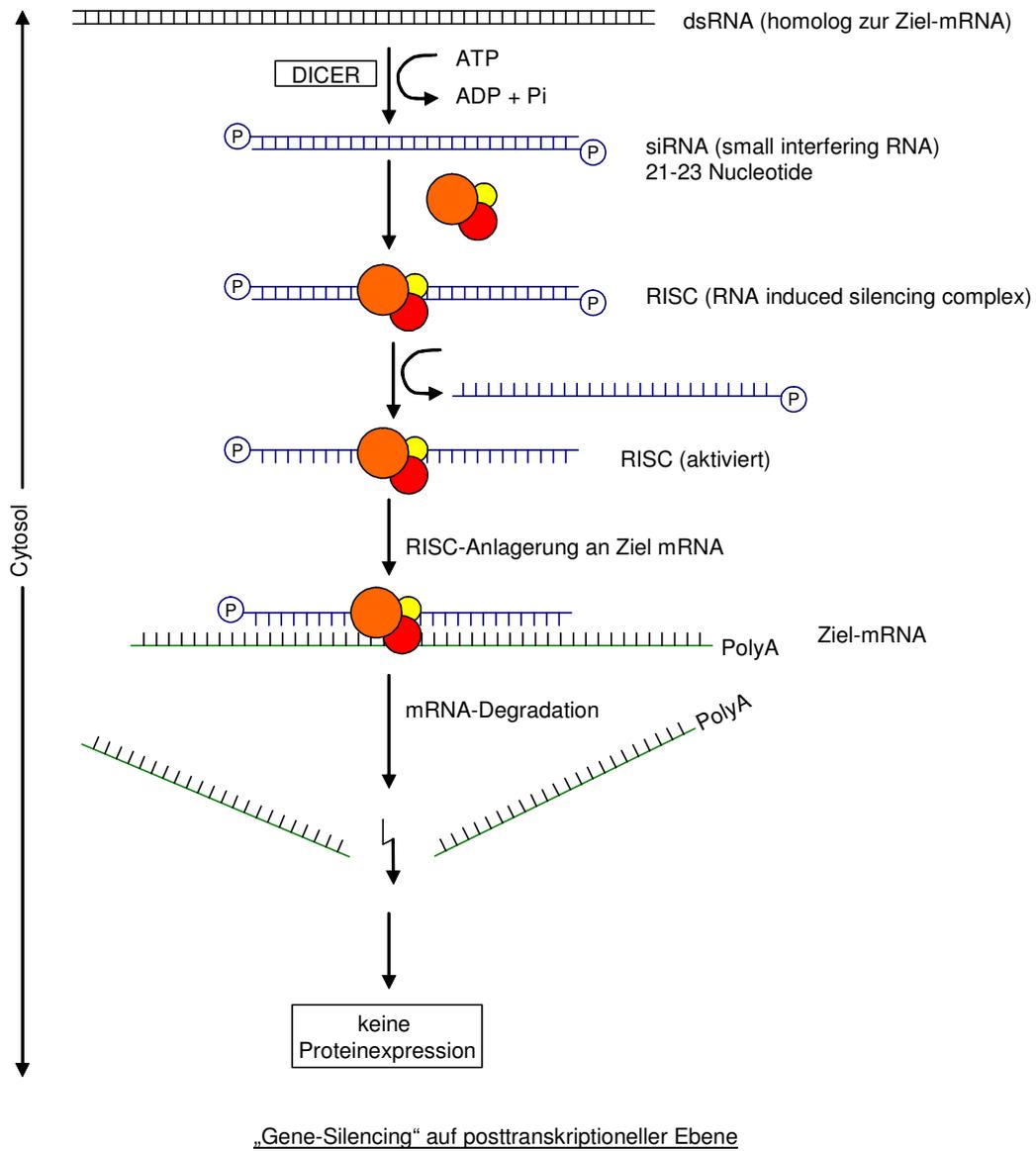


Abbildung 2: Gene-Silencing

Die siRNA-Technik bietet einerseits neue Ansätze bezüglich der Erforschung der funktionellen Genomik von Säugetieren und wird sicherlich auch in Zukunft für die Erstellung von Gen-spezifischen Therapien wegweisend sein.

1.4.3 Die Bcl-Genfamilie

Bcl2 wurde ursprünglich als Onkogen am chromosomalen Bruchpunkt t(14:18) in B-Zelllymphomen entdeckt (87). Die Bcl-Genfamilie enthält sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Mitglieder. Die Hauptvertreter der antiapoptotisch wirksamen Mitglieder sind Bcl2 und Bcl-xl.

Bezüglich ihrer Struktur und ihrer biochemischen Funktion können die proapoptotischen Mitglieder in zwei Gruppen unterteilt werden: die Multi-BH-Domänenproteine Bax, Bak und Bok verfügen über die Bcl2-Homologiedomänen BH1, -2 und -3, während die Familie BH3-only-Proteine ausschließlich Sequenzhomologien in der BH3-Domäne besitzen. Die meisten Mitglieder der Bcl2-Genfamilie verfügen über eine Transmembrandomäne am C-Terminus und können in den Membranen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und des Nukleus lokalisiert sein.

Die Aufgabe der Bcl2-Familienmitglieder scheint hauptsächlich in der Kontrolle der Freisetzung mitochondrialer Intermembranraumproteine zu liegen. Entscheidend für die Wirkung der Mitglieder als pro- und antiapoptotischer Faktoren scheint ihre Fähigkeit zu sein, miteinander zu interagieren und Hetero- bzw. Homodimere zu bilden, deren Zusammensetzung Zelltod oder Überleben signalisiert: Bcl2/Bcl2-Homodimere sowie Bcl2/Bax-Heterodimere wirken aller Wahrscheinlichkeit nach antiapoptotisch, während Bax/Bax-Dimere und – Oligomere als proapoptotisch gelten.

Die Bcl2-Proteine weisen auffällige strukturelle Ähnlichkeiten zu kanalbildenden, bakteriellen Proteinen wie Diphtherietoxin und Colchizinen auf. Sowohl pro- als auch antiapoptotische Bcl2-Mitglieder können in synthetischen Lipidmembranen Kanäle bilden (88). Unter physiologischen Bedingungen hingegen scheinen nur die proapoptotischen Mitglieder, z.B. Bax und Bak, dazu in der Lage zu sein (89). Auf bisher noch nicht bekannte Weise könnten solche Kanäle die äußere Mitochondrienmembran im Rahmen der Apoptoseinduktion permeabel für Cytochrom c und andere Intermembranraumproteine machen und so die Caspasen-Kaskade aktivieren.

Der Einfluss von Bcl-2 auf das Tumorverhalten ist bei kindlichen Leukämieformen teilweise untersucht und beschrieben. In einer aktuellen Studie wurde der Zusammenhang zwischen der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) und dem häufig auftretenden Rezidiv der Erkrankung bei Jungen nach erfolgter Therapie im Bereich der Testes untersucht. Dazu wurden ALL-Zelllinien und Zellen von ALL-Patienten bei 33 °C inkubiert.

Es zeigte sich einerseits eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika bei 33°C sowie eine Hochregulation von Bcl-2. Zelllinien der akuten myeloischen Leukämie zeigten unter gleichen Bedingungen ebenfalls eine erhöhte Widerstandsfähigkeit, allerdings ließ sich dort keine Bcl-2-Erhöhung nachweisen. Zusammenfassend wurde einerseits die Bcl-2-Erhöhung, andererseits die erniedrigte Temperatur im Bereich der Testes für das verbesserte Überleben der ALL-Zellen verantwortlich gemacht (90).

2 FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Studie analysiert die Wirkung von siRNA gegen das Bcl2-Gen auf die Therapie epithelialer kindlicher Lebertumoren unter Kulturbedingungen. Die Effektivität in Kombination mit Standardchemotherapie soll insbesondere im Hinblick auf die histologischen Unterschiede, applizierten Zytostatika und deren Konzentrationen untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zelllinien

3.1.1 HepT1

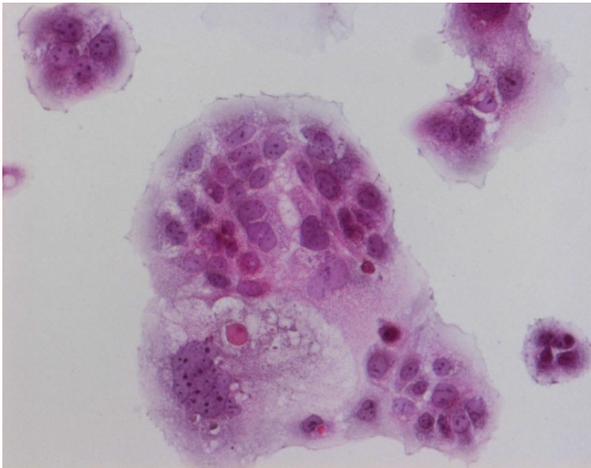


Abbildung 3: HepT1-Zellen, 20-fach vergrößert, HE-Färbung

Im Jahre 1996 wurde die Zelllinie HepT1 in Hannover von Pietsch et al. (69) etabliert und charakterisiert. Die Zellen entstammen der Leber eines 34 Monate alten Mädchens. Es bestand kein Anhalt für das Vorhandensein eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms oder der familiären Form der adenomatösen Poliposis coli. Der Tumor stellte sich als multinodulär dar und wuchs infiltrierend in das umliegende Lebergewebe. Es waren sowohl solide als auch trabekuläre Bereiche epithelialer Zellen vorhanden, welche embryonalen Hepatozyten ähnelten. Daher wurde der Tumor als Hepatoblastom vom embryonalen Subtyp eingeordnet.

Morphologisch findet sich bei den HepT1-Zellen ein granulär-eosinophiles Zytoplasma mit pleomorphen Kernen. Die Kerne enthalten zwei bis drei Nukleoli mit irregulär kondensiertem Chromatin. Die Zellen exprimieren Zytokerateratin und α -Fetoprotein.

Die Zellpopulation verdoppelt sich ungefähr alle 1-2 Tage. Sie wachsen in epithelialen, einschichtigen Clustern mit flachen, polygonalen Zellen. In einer konfluenten Kulturflasche befinden sich etwa $1,1 \times 10^4$ Zellen / cm^2 .

Sofern die HepT1-Zellen subkutan in Nacktmäuse transplantiert werden, wachsen Tumoren mit denselben zytologischen Eigenschaften wie der Ausgangstumor heran. Es lassen sich desweiteren im Xenotransplantat ein Zellkernpleomorphismus, Mitosen und extramedulläre Hämaopoese nachweisen (69).

Observiert man die HepT1-Zellen elektronenmikroskopisch, erkennt man zahlreiche Desmosomen-Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen; außerdem findet man einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat vor (69).

Die Zelllinie exprimiert, wie auch der Tumor, die folgenden Polypeptide: Zytokeratin 18, 19, Vimetin, α -Fetoprotein, Erythropoietin und den Stammzellofaktor SCF (69).

Der Karyotyp ist polyploid mit 65-125 Chromosomen pro Zelle. Zytogenetische Analysen erbrachten strukturelle und numerische Abberationen der Chromosomen 1p, 6,9,11q,13q,15p und 20.

Das Chromosom 20 kommt mit einer Häufigkeit von sechs bis achtmal pro Zelle vor. Desweiteren sind Deletionen an den Chromosomenarmen 1p und 11q zu finden. Chromosom 15 hat teilweise zusätzliches Material des Chromosomenarmes 6q am kurzen Arm. Auch lassen sich zwei Isochromosomen 9p nachweisen.

3.1.2 HUH6

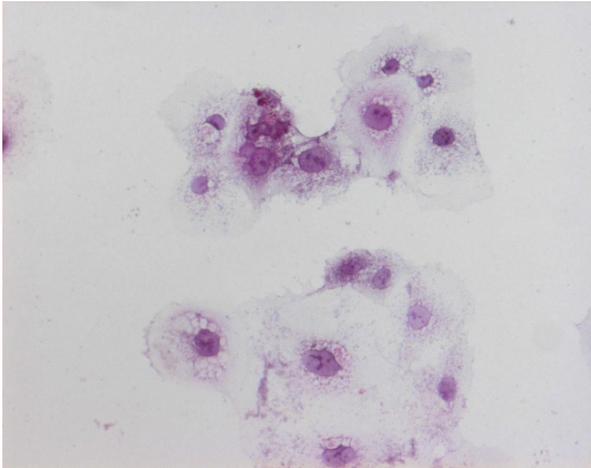


Abbildung 4: HUH6-Zellen, 20-fach vergrößert, HE-Färbung

Die Zelllinie wurde im Jahre 1976 von Doi (70) etabliert. Das Gewebe, aus dem die Zellen entnommen wurden, entstammt dem rechten Leberlappen eines einjährigen Jungen. Er starb wenige Monate nach der Tumorentfernung aufgrund vorhandener Lungen- und Gehirnetastasen. Die Histologie des Tumors erbrachte gut differenzierte, massive, noduläre Strukturen. Diese beinhalteten Tumorzellen, vaskuläre Anteile, extramedulläre Hämatopoese. Desweiteren waren gemischte Anteile an squamösen Zellen sowie fokale chondro-osteogenetische Gewebeformen vorhanden. Zirrhotische Bereiche wurden nicht gefunden (70). Insgesamt wachsen die Zellen recht langsam, wobei sich die gesamte Population jeweils innerhalb von 1-2 Tagen verdoppelt. Die Zellen bilden α -Fetoprotein.

Das „Australian-antigen“ konnte nicht nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch kann man epitheliales Gewebe mit zahlreichen Desmosomen und Tonofibrillen erkennen. Zusätzlich findet man viel glykogene Granula im Zytoplasma vor. Im Vergleich zum kondensierten Chromatin ist der Nukleolus dieser Zelllinie verhältnismäßig groß. Die Größe der Tumorzellen lässt sich insgesamt als mittelgroß bis klein beschreiben. Das Verhältnis Nukleus zu Zytoplasma ist ungefähr 1:1 bis 1:2. Nukleäre Pleomorphismen der Tumorzellen wurden selten gesehen. Der Tumor konnte als Hepatoblastom vom gut differenzierten Typ charakterisiert werden (70).

In allen Zellklonen lassen sich 48 Chromosomen nachweisen.

3.1.3 HepG2

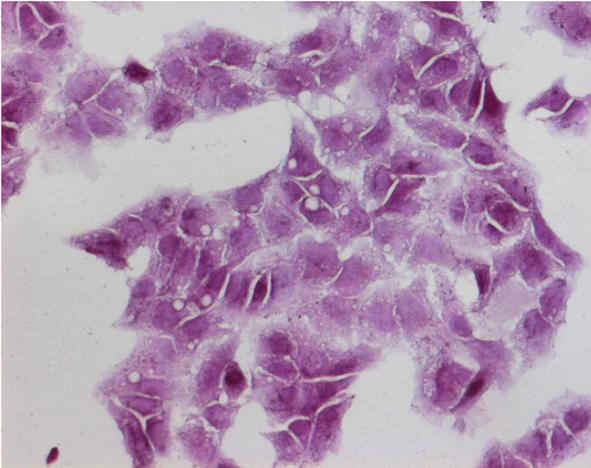


Abbildung 5: HepG2.Zellen, 20-fach vergrößert, HE-Färbung

Die Zelllinie HepG2 wurde 1975 von Aden et al. (90) aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen etabliert. Histologisch handelt es sich hierbei um ein gut differenziertes hepatozelluläres Karzinom vom trabekulären Typ. Aus morphologischen Gesichtspunkten weisen die HepG2-Zellen Ähnlichkeiten zu den Leber-Parenchymzellen auf.

Die Zelllinie exprimiert α -Fetoprotein und Albumin. Desweiteren finden sich 15 weitere humane Plasmaproteine, wie beispielsweise Transferrin, Plasminogen oder Fibrinogen.

Die Zellen haben einen polyploiden Karyotyp von 50-56 Chromosomen, wobei es mehrere Isoformen des Chromosoms 1 gibt.

Die Zelllinie HepG2 exprimiert das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigens HBsAg (90).

3.2 Zytostatika

Zytostatika greifen in den Stoffwechsel der Tumorzellen ein oder zerstören deren Zellstrukturen. Einige Zytostatika sind dabei selbst kanzerogen, mutagen oder teratogen. Oft werden Zytostatika kombiniert, um die Wirksamkeit und Effizienz der Therapie zu erhöhen. Zudem erhofft man sich eine Reduktion der jeweiligen Nebenwirkungen.

Einteilung der Zytostatika:

Man teilt die Zytostatika ein nach:

- | | |
|----------------------------|--|
| a) Herkunft der Substanzen | pflanzliche Hemmstoffe Antibiotika Synthetische Substanzen |
| b) Wirkungsweise | Alkylantien Antimetabolite Spindelzellgifte |

3.2.1. Cisplatin

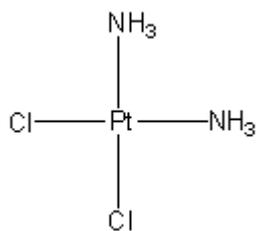


Abbildung 6: molekulare Struktur von Cisplatin

Cisplatin gehört der Gruppe der Alkylantien an. Die alkylierenden Substanzen transferieren Alkylreste auf SH-, NH₂-, COOH- und Phosphatgruppen.

Daraus resultiert letztendlich die Entstehung eines falschen Basenpaares. Daneben kann der Reduplikationsmechanismus behindert werden, indem der 5er-Ring des Guanins durch Alkylanlagerung gesprengt wird oder zwei Guaninreste durch Ausbildung einer Alkylbrücke miteinander interagieren. Auch RNA- und Proteinmoleküle können alkyliert werden, wodurch ihre biochemischen Eigenschaften modifiziert werden und letztendlich ein Verlust derselben daraus resultiert.

Cisplatin entspricht in seinem Wirkungsmechanismus demjenigen der bifunktionellen Alkylantien. Die Ammoniakgruppen werden durch H₂O ersetzt, darauf werden die Chlormoleküle durch Nukleophile substituiert. In der DNS reagieren Guaningruppen am N7 und es kommt hauptsächlich zwischen Guaningruppen oder zwischen Guanin und Proteinen zur Verknüpfung mit benachbarten Strängen – auch „cross-linking“ genannt. Dadurch wird die weitere Zellteilung gehemmt.

Zu den Nebenwirkungen gehören Oto- und Nephrotoxizität.

Verwendete Form:

| | |
|------------------------------|-----------------------------|
| Platinex [®] Lösung | (Bristol-Myers Squibb GmbH) |
| Wirkstoff: | Cisplatin |
| MG: | 300,05 g/M |
| Konzentration: | 1ml = 0,5mg |

3.2.2 Doxorubicin

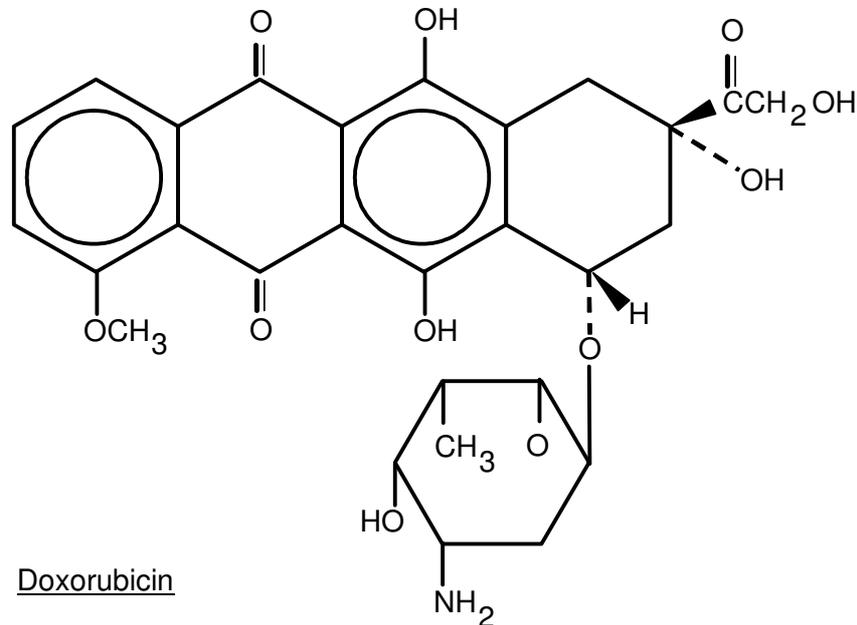


Abbildung 7: molekulare Struktur von Doxorubicin

Doxorubicin zählt zur großen Gruppe der Naturstoffe, genauer gesagt zur Gruppe der Antibiotika. Der Wirkungsmechanismus ist der Folgende: die Antibiotika hemmen die RNA-Biosynthese. Sie verhindern durch Bindung an die DNS deren Reduplikation und somit auch die RNA-Biosynthese. Es kommt zur DNS-Fragmentierung und einer daraus resultierenden Hemmung der Proteinbiosynthese. Die Einlagerung von Doxorubicin und anderen Stoffen zwischen die Basenpaare der DNS nennt man Interkalation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Antibiotika das Zellwachstum in proliferierenden Geweben hemmen.

Zu den Nebenwirkungen zählen die Knochenmarksdepression, Immunsuppression, Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen

Zusätzlich besteht bei den Anthrazyklinen, zu denen auch Doxorubicin gehört, ein erhöhtes Kardiotoxizitäts-Risiko. Es können fibrinoide Herzmuskelnekrosen auftreten.

Verwendete Form:

Adriblastin[®]-Lösung 50mg (PHARMACIA)

Wirkstoff: Doxorubicin-Hydrochlorid

MG: 57,99g/M

Konzentration: 1ml = 2mg

3.2.3 Paclitaxel (Taxol)

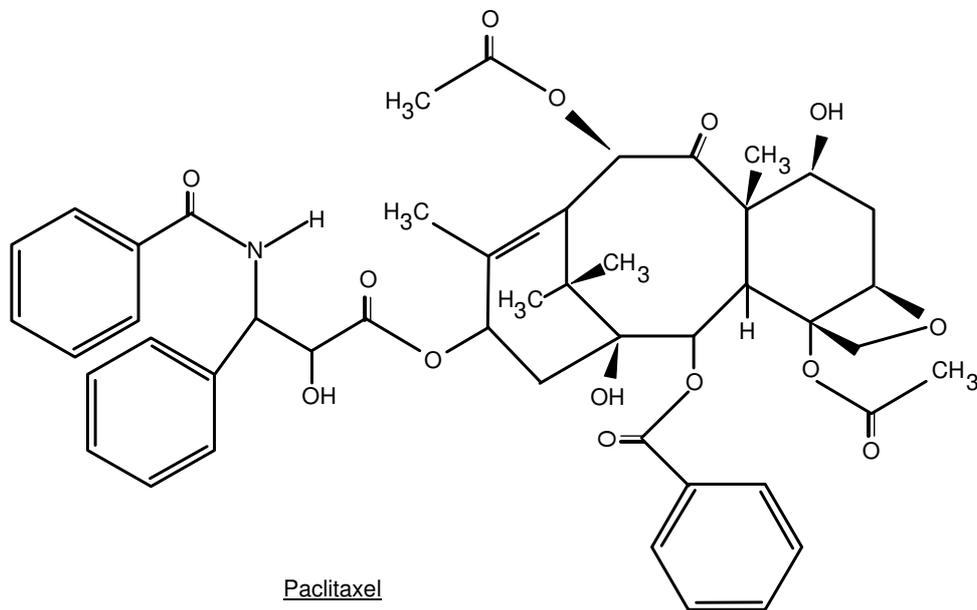


Abbildung 8: molekulare Struktur von Taxol

Paclitaxel ist eine organische Verbindung und der erste Wirkstoff aus der Klasse der Taxane, der sich als antineoplastisch erwiesen hat (NATIONAL CANCER INSTITUTE 1990). Der Wirkstoff von Paclitaxel wurde im Jahre 1967 aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, isoliert. 1971 gelang es WANI et al., die Strukturformel von Paclitaxel zu identifizieren und die zytotoxische Wirkung gegen verschiedene murine Tumoren nachzuweisen.

1979 wurde schließlich der eigentliche Wirkungsmechanismus aufgeklärt. Im Vergleich mit anderen neoplastisch wirksamen Substanzen verfügt Paclitaxel über einen völlig neuartigen Wirkmechanismus (92).

Paclitaxel fördert die Aggregation von Mikrotubuli aus Tubulindimeren und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Zusätzlich induziert Paclitaxel eine abnorme Anordnung und Bündelung multipler mikrotubulärer Teilungssysteme während der Mitose. Daraus resultiert eine Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes, das für die vitale Zellfunktion in der Interphase und während der Mitose von entscheidender Bedeutung ist (91).

Paclitaxel kommt bei verschiedenen Karzinomformen zum Einsatz – zu nennen wären hierbei das Ovaralkarzinom, das Mammakarzinom sowie das Bronchialkarzinom.

Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression, in erster Linie die Neutropenie.

Verwendete Form:

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Taxol [®] 6mg/ml | (Bristol-Myers Squibb) |
| Wirkstoff: | Paclitaxel |
| MG: | 853,93g/M |
| Konzentration: | 1ml = 6mg |

3.2.4 Etoposid

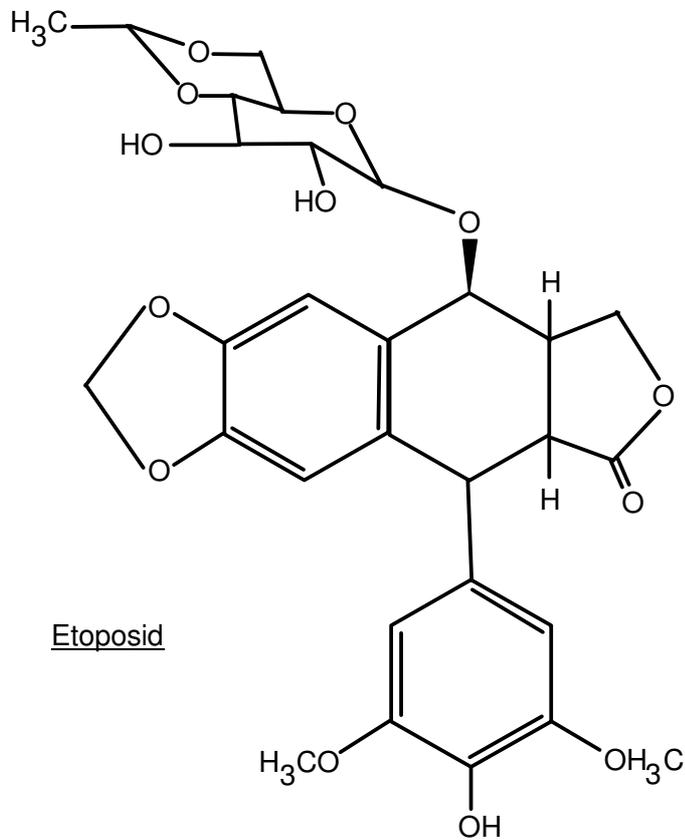


Abbildung 9: molekulare Struktur von Etoposid

Etoposid zählt zur Gruppe der Podophyllotoxin-Derivate. Die i.v.-Applikation erfolgt meist in Form von Etoposidphosphat. Diese Verbindung wird in vivo schnell und vollständig durch Dephosphorylierung in die aktive Substanz Etoposid umgewandelt. Da Etoposid und Etoposidphosphat biäquivalent sind, können die folgenden Aussagen Etoposid betreffend auf Etoposidphosphat übertragen werden:

Etoposid wirkt antineoplastisch und zytozid. Seine zytozide Wirkung beruht auf DNS-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen durch Interaktionen mit dem DNS-Reparaturenzym Topoisomerase II und/oder intrazellulärer Bildung freier Radikale.

Etoposid wirkt Zellzyklusphasen-sensitiv und in hohen Konzentrationen auch auf ruhende Zellen zytozid.

Nebenwirkungen sind die Knochenmarkssuppression, Übelkeit, Erbrechen, allergische Reaktionen, Bronchospasmen, Hypotonie.

Verwendete Form:

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Etopophos ^R 1000mg | (Bristol-Myers-Squibb) |
| Wirkstoff: | Etoposidphosphat |
| MG: | 712,51g/M |
| Konzentration: | 1ml = 10mg |

3.3 Kultivierung der Zellen

3.3.1 Kulturbedingungen

Als Grundmedium diente für die Zelllinien HepT1, HepG2 und HUH6 DULBECCO`s MEM (500ml-Flaschen) mit einem Zusatz von 50ml FCS, 5ml Glutamin und 12.5ml Hepes-Buffer. Die näheren Angaben der Zusammensetzung sind jeweils der Tabelle 3.8.1 zu entnehmen.

Die Zellen wurden in 75cm² großen Kulturflaschen der Firma COSTAR bei 37°C mit 10% CO₂ in einem konventionellen Inkubator der Firma HERAUS angezüchtet. Ein Mediumwechsel erfolgte durchschnittlich 2 Mal pro Woche, indem das alte Medium komplett verworfen wurde und jeweils 10ml frisches DULBECCO`s MEM-Medium erneut hineinpipettiert wurde.

Sobald die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren, wurden sie passagiert.

Als ersten Schritt wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Dispersion der Zellen mittels 3ml Trypsin-EDTA-Lösung je Flasche. Im Anschluß an die unter dem Lichtmikroskop der Firma LEITZ beobachtete Zellablösung wurde die Reaktion mit 10ml DULBECCO`s MEM je Flasche gestoppt. Zur Vermeidung einer möglichen Schädigung durch Trypsineinwirkung wurde die Ablösung der Zellen nach spätestens fünf Minuten abgebrochen. Das die abgelösten Zellen enthaltene Medium wurde zu gleichen

Anteilen in zwei Kulturflaschen gegeben und mit frischem Medium bis 10 ml aufgefüllt. Das Ergebnis wurde jeweils nochmals unter dem Lichtmikroskop evaluiert und danach erfolgte die erneute Inkubation. Etwa zwei Stunden später hafteten die Zellen wiederum am Boden der Kulturflaschen.

Alle Zellen wurden zu Beginn der Experimente und nachfolgend regelmäßig auf Kontamination durch Mykoplasmen oder Bakterien in der Abteilung der Mikrobiologie mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens untersucht. Eine Kontamination konnte stets ausgeschlossen werden.

3.4 Ermittlung der IC 50 für die Zytostatika

3.4.1 Proliferationstest MTT-Assay

In der Zellbiologie sind Proliferationstests eine häufig angewandte Methode, um Wachstumsfaktoren, Zytokine, Nährstoffe, zytotoxische und chemotherapeutische Substanzen zu messen. Dabei gibt es verschiedene Verfahren, um die Anzahl der Zellen zu bestimmen: direkt durch Auszählen unter dem Mikroskop oder mit Hilfe eines elektronischen Teilchenzählers, indirekte Radioaktivitätsmessung, Bestimmung des Gesamtproteins mit chromogenen Farbstoffen oder aus der Umsatzrate von zellulären Enzymen.

Im Jahre 1956 wurde zum ersten Mal eine Publikation über die Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Indikator für die Zellvitalität veröffentlicht. Diese Methode beruhte auf der Entdeckung, dass von lebenden Zellen farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können. Diese Reduktion erfordert intakte Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle inaktiv werden. Hieraus ergibt sich eine ausgezeichnete Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen.

| | | |
|------------------|-------------------------|--------------------|
| Inhalt des Kits: | Substrat, lyophilisiert | 10 Fläschchen |
| | Aktivatorlösung | 1 Fläschchen, 30ml |

Assay-Schema:

Als erstes wurde das Substrat in 2,5ml Aktivator gelöst. Je 20 μ l Substratgemisch wurden daraufhin in jedes Well pipettiert und 2-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 450(492)nm mit 620nm als Referenz im ELISA-Reader gemessen.

3.4.2 Methodisches Vorgehen

Ermittlung der IC50-Werte:

Für jede der eingesetzten Zelllinien wurde die Konzentration der verwendeten Zytostatika bestimmt, die das Wachstum der Zellen zu 50% inhibiert. Die IC50 wurde zunächst für jede Zelllinie sowohl durch den oben erwähnten MTT-Assay, als auch durch die Auszählung nach Tryptanblau-Färbung ermittelt.

Die Zellen wurden hierfür wie zuvor beschrieben mit PBS gewaschen, trypsiniert und unter Zugabe von Medium wurde die Reaktion beendet und die Zellen wurden vom Boden der Kulturflaschen unter Zuhilfenahme einer Pipette abgespült. Das nun mit Zellen angereicherte Medium wurde in 15ml Falcon-Tubes der Firma Cellstar überführt und bei 1300U/min 3 Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Medium bis auf das Pellet abgesaugt und mit frischem Medium resuspendiert, so dass die Zellen in etwa 2-3ml Medium gleichmäßig verteilt waren.

Die gewonnene Anzahl an lebenden Zellen wurde ermittelt, indem ein Aliquot der Zellsuspension (100 μ l) mit gleicher Menge an Tryptan-Blau (100 μ l) versetzt wurde. In diesem Gemisch stellen sich unter einem Lichtmikroskop (Firma LEITZ) in einer Neubauer-Zählkammer lebende Zellen zartblau gefärbt dar, während tote Zellen aufgrund der erhöhten Permeabilität ihrer Membran stark blau gefärbt sind.

Danach wurden je 100 μ l der Zellsuspension in 96-Well-Platten der Firma COSTAR mit einer Konzentration von 2×10^5 Zellen /ml pro Loch ausgesät; siehe Schema. In die unterste Reihe der Platten wurde in jedes Loch 200 μ l

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden alle Versuche nach 7-10 Tagen wiederholt und darüber hinaus in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.5 Ermittlung der Verteilung: Apoptose / Nekrose / lebende Zellen an den zuvor erfassten IC50-Werten

3.5.1 Transfektion

Am ersten Tag wurde mit der Zellaussaat auf 96-Well-Platten begonnen. Die Endkonzentration wurde mit 1×10^5 Zellen/ml festgelegt.

Zum Ablösen der Zellen von den Kulturplatten wurden diese für die Dauer von 1-2 Minuten trypsinisiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde nach Gabe in 15ml-Falcons bei 1300U/min etwa 3 Minuten lang zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand wurde bis auf das Pellett abgesaugt, die Zellen mit neuem Medium (DMEM) resuspendiert und zum Auszählen der Zellen 100 μ l der Suspension entnommen. Diese versetzte man mit Trypanblau und mittels der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt. Danach erfolgte die Ermittlung der erwünschten finalen Zellkonzentration und die Aussaat auf 96-Well-Platten.

Am zweiten Tag erfolgte dann die Transfektion. Durch die Transfektionsreagenz jetSI wurde das effektive „gene silencing“ ermöglicht und eine reproduzierbare Transfektion mit geringer Toxizität erreicht. Dadurch konnten siRNA-Duplexe mit einer Konzentration von 20pmol/ μ l effizient in Tumorzellen eingeschleust werden. Der Mechanismus ist der Folgende: jetSI wandelt siRNA-Duplexe in positiv geladene Partikel um, welche ihrerseits mit den anionischen Proteoglykanen an der Zelloberfläche interagieren können und somit die Zellen durch endozytotische Vorgänge penetrieren können. Mittels endosomaler Freisetzung gelangen die Duplexe an ihren Wirkort.

Je nach Well-Anzahl wurde eine bestimmte Menge der für die Transfektion notwendigen Substanzen gemischt, für jeweils unterschiedliche Zeit inkubiert und nach Absaugen des Wachstumsmediums die Transfektionsreagenz zu den

Zellen hinzugefügt. Damit die Zellen nicht austrockneten, musste jeweils 100µl Serum-freies Medium hinzugefügt werden.

Die Platten wurden nach diesen Vorgängen für die Dauer von 4 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran wurde entweder nur Medium zu nicht transfizierten Zellen, Zytostatika zu nicht transfizierten Zellen oder Zytostatika zu zuvor transfizierten Zellen hinzugegeben. Die Konzentration der Zytostatika entsprach dabei der jeweils ermittelten IC50. Neben den Negativ-Kontrollen (Zellen/Medium) wurden Zellen unbehandelt mit Nonsense-RNA transfiziert zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen.

Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden mit dem schon zuvor verwendeten MTT-Assay (EZ4U) die Extinktionen durch den Elisa-Reader ermittelt.

Ansatz einer Platte:

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
| P B S | PBS | PBS | PBS | PBS | P B S | P B S | PBS | PBS | PBS | P B S | P B S |
| P B S | | Zellen, Medium | Zellen, Medium | Zellen, Medium | | | Zellen, Medium | Zellen, Medium | Zellen, Medium | | P B S |
| P B S | | Zellen, siRNA, Cytostat. | Zellen, siRNA Cytostat. | Zellen, siRNA, Cytostat. | | | Zellen, siRNA, Cytostat | Zellen, siRNA, Cytostat. | Zellen, siRNA, Cytostat. | | P B S |
| P B S | | Zellen, Cytostat. | Zellen, Cytostat. | Zellen, Cytostat. | | | Zellen, Cytostat. | Zellen Cytostat. | Zellen, Cytostat. | | P B S |
| P B S | | Zellen, Nonsense -RNA | | | | | | | Zellen, Nonsense -RNA | | P B S |
| P B S | PBS | PBS | PBS | PBS | P B S | P B S | PBS | PBS | PBS | P B S | P B S |

Abbildung 11: Befüllung der 96-Well-Platten

3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie und Annexin

Grundlagen des Apoptosevorgangs:

Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin bindet spezifisch an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher als Nachweis von Apoptose.

Annexin V ist ein 35-36kD großes Protein, das Ca^{2+} -abhängig an PS binden kann. Durch Annexin V, an das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, können apoptotische Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin V binden kann, muß gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt werden. Dieser Farbstoff färbt nur die DNS von toten Zellen an. Zellen, die sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumjodid färben lassen, sind im Prozeß der Apoptose begriffen. Mit den Annexin V-Kits kann man frühe Apoptose von später Apoptose und Nekrose unterscheiden. Die Zellen können im Fluoreszenzmikroskop oder auch im Durchflußzytometer untersucht werden.

Vorgehensweise:

Am ersten Tag begann man mit dem Aussäen der Zellen auf den Objektträger, der jeweils in 8 Kammern unterteilt war. In jede Kammer wurde 100µl der Zellsuspension pipettiert. Die Konzentration der Zellen betrug zu jenem Zeitpunkt 2×10^5 Zellen/ml. Das Ganze wurde für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Am Tag 2 wurde die Transfektion in jeweils 2 Kammern pro Objektträger durchgeführt – in gleicher Weise und Konzentration wie für die schon zuvor beschriebene Transfektion unter Punkt 3.5.1. Jeweils 2 Kammern wurden ausschließlich mit Zellen und Medium (DMEM/FCS/Hepes-Buffer) gefüllt, in 2 Kammern wurden die Zytostatika in entsprechenden IC50-Konzentrationen

pipettiert, zu den zuvor transfizierten Zellen wurden die Zytostatika in gleicher Weise und Konzentration hinzugefügt. Eine Kammer, in der nochmals nur Zellen mit Medium enthalten waren, wurde mit der Negativkontrolle (siehe ebenso voriges Transfektionsprotokoll) bestückt.

Befüllung der Kammern der Objektträger:

| | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Zellen, Medium | Zellen, Medium | Zellen, Medium | Zellen, Medium |
| Zellen, Zytostatikum1 (LD50) | Zellen, Zytostatikum 2 (LD50) | Zellen, Zytostatikum 3 (LD50) | Zellen, Zytostatikum 4 (LD50) |
| Zellen, Zytostatikum1 und siRNA | Zellen, Zytostatikum2 und siRNA | Zellen, Zytostatikum3 und siRNA | Zellen, Zytostatikum4 und siRNA |
| Zellen, Medium, Nonsense-RNA | -/- | Zellen, Medium, Nonsense-RNA | -/- |

Abbildung 12

Dieser Ansatz wurde für die Zelllinie HUH6 in Dreifachbestimmung durchgeführt.

An Tag 5 erfolgte dann die Zellfluoreszenz. Begonnen wurde mit der Herstellung der Annexin-Fluos-labeling Lösung laut Angaben der Firma. Die Annexin-Fluos-labeling Reagenz wurde je nach Bedarfsmenge mit Inkubationspuffer verdünnt und desweiteren die entsprechende Menge an Propidium-Iodid-Lösung hinzugefügt.

Die Arbeitsschritte waren wie folgt:

Zuerst wurden die Zellen auf dem Objektträger (Kammerunterteilung noch vorhanden) mit 37°C warmem PBS gewaschen, das ganze dann vorsichtig

abgesaugt und im Anschluss daran mit Formalin (4%), 37°C warm für 10-15 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (3x5min) und schließlich vorsichtig das PBS entfernt.

Nach den genannten Vorgängen entfernte man die Kammern mitsamt dem Silikon vom Objektträger. Das verbliebene PBS wurde sorgfältig seitlich abgekippt und die Objektträger mit der zuvor angesetzten Annexin-Labeling-Lösung bedeckt. Für 10-15 Minuten inkubierte man die Objektträger in einer feuchten Kammer (um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern) bei 15-25°C. Als letzten Schritt wurden die Deckplatten auf die Objektträger aufgebracht mittels des erwähnten Eindeck-Mediums fixiert.

Nun konnten die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

(Wellenlänge: 450-500nm; 515-565nm).

Sofern die Zellen im Inbegriff der Apoptose waren, erschienen sie durch die Zellfluoreszenz grün, nur bei vorhandener Nekrose war die DNS der Zellen rot angefärbt.

Auf dem Objektträger wurde nunmehr jedes Feld mit einer unterschiedlichen Belichtung, Verstärkung und Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop und einer gleichzeitig integrierten Kamera fotografiert.

Die Sequenz war wie folgt:

| Bild | Inhalt | Belichtung | Verstärkung | Vergrößerung | Bildart |
|------------|----------------------|------------|-------------|--------------|-------------------|
| Bild Nr. 1 | Zelllinie und Zusatz | 71,2ms | 3,0-fach | 63-fach | Nativbild |
| Bild Nr. 2 | Zelllinie und Zusatz | 2,3ms | 3,0-fach | 63-fach | Grüne Fluoreszenz |
| Bild Nr. 3 | Zelllinie und Zusatz | 230ms | 3,0-fach | 63-fach | Rote Fluoreszenz |
| Bild Nr. 1 | Zelllinie und Zusatz | 10,6ms | 2,2-fach | 20-fach | Nativbild |
| Bild Nr. 2 | Zelllinie und Zusatz | 3,0s | 4,3-fach | 20-fach | Grüne Fluoreszenz |
| Bild Nr. 3 | Zelllinie und Zusatz | 1,5s | 2,2-fach | 20-fach | Rote Fluoreszenz |

Tabelle III: Bildsequenz

Bild 1-3 entspricht jeweils einer Kammer des Objektträgers. Zuerst wurden die Zellen nativ fotografiert, um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie viele Zellen sich generell auf dem Objektträgerfeld befinden. Als nächsten Schritt wurde der Anteil der Apoptose beurteilt und als letztes im Vergleich dazu der Anteil an nekrotischen Zellen. Als nekrotisch waren nur die Zellen zu werten, deren DNS sich rot angefärbt hatte. Eine leichte Hintergrundfärbung um die Zellen ist somit kein Hinweis auf Apoptose.

Zuletzt wurden die Bilder der grünen und roten Fluoreszenz überlagert und zu einem Gesamtbild vereint. Somit erhielt man pro Objektträgerfeld ein Nativbild sowie ein Übergangsbild zum Vergleich Apoptose-Nekrose.

3.6 Western Blot – Nachweis von Bcl-2, Bcl-xl

3.6.1 Theorie des Western Blots

Der Western Blot gehört in den Bereich der elektrophoretischen Verfahren. Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Unterschiedliche Ladungen und Größen der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Eines der Verfahren der Elektrophorese ist die sogenannte Zonenelektrophorese mit einem homogenen Puffersystem. Insgesamt bieten die elektrophoretischen Verfahren ein gutes Auflösungsvermögen. Sie haben sich in einem weiten Spektrum analytischer und präparativer Anwendungen etabliert, vor allem in der Biochemie und Molekularbiologie, in klinischer und forensischer Medizin sowie in der Taxonomie von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren.

Das Trennprinzip der Elektrophorese ist das Folgende: Geladene Teilchen unterschiedlicher Ladung wandern im elektrischen Feld mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, die einzelnen Substanzen bilden diskrete Zonen. Die Teilchen werden zusätzlich durch die Gele, die in Form von porösen

Matrices vorliegen, je nach Größe unterschiedlich verzögert (retardiert), so dass die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe und der Ladung abhängig ist.

3.6.2 Western-Blot-Durchführung

Vorbereitung der Zellen:

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Die finale Zellkonzentration betrug wiederum 1×10^5 Zellen. Die Wells wurden wie folgt befüllt (jede Konzentration in 2-fach-Bestimmung):

| | |
|-------|------------------------|
| HUH6 | Medium |
| HUH6 | CDDP (LD50: 2.5µg/ml) |
| HepT1 | Medium |
| HepT1 | CDDP (LD50: 4.2µg/ml) |
| HepG2 | Medium |
| HepG2 | CDDP (LD50: 6.2µg/ml) |

Die Wells waren insgesamt mit 2ml befüllt (Zellen und Medium/oder Zytostatika). Für die Western Blots wurden die Zellen 48h nach Zytostatika- oder Mediumzugabe abgelöst und aufbereitet. Exemplarisch erfolgte die Durchführung unter Zugabe eines Zytostatikums – in diesem Falle CDDP. Zur Verhinderung eines vorzeitigen Proteinabbaus durch proteolytische Enzyme wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Das Medium wurde nach 48h von den Platten abgesaugt, mit PBS gewaschen und danach mit Hilfe des Lysepuffers unter Zusatz des Protease-Inhibitor-Cocktails abgelöst.

Die unbehandelten und behandelten Zellen wurden jeweils in Tubes eingefüllt und ein Puffergemisch (Laemmli) hinzugefügt. Die Tubes wurden zum Schluß 10 Minuten gekocht, um eine Haltbarkeit zu erreichen. Die Zellvorbereitung war hiermit abgeschlossen.

Ablauf des Western-Blots:

Zunächst wurden die Glasplatten und die Spacer zusammengesetzt und in eine vorgesehene Halterung eingespannt, um das Trenn- und Sammelgel pipettieren zu können.

Es wurden Gele verwendet mit der folgenden Zusammensetzung:

| Trenngel (15%ig) | Sammelgel (4%ig) |
|----------------------------|----------------------------|
| 2.4ml H ₂ O | 6.1ml H ₂ O |
| 5.0ml Acrylamid 30% | 1.3ml Acrylamid/Bis 30% |
| 2.5ml 1.5% Tris/HCL pH 8.8 | 2.5ml 0.5% Tris/HCL pH 6.8 |
| 0.1ml 10% SDS | 0.1ml 10% SDS |
| 50µl 10%APS | 50µl APS 10% |
| 5µl Temed | 10µl Temed |

Tabelle IV

Als erstes wurde das Trenngel pipettiert und mit 50% Butanol vorsichtig überschichtet, um Luftblasenbildung zu vermeiden. Nach 45 Minuten Auspolymerisation wurde das Butanol entfernt, mit Aqua dest. ausgespült, das Sammelgel eingefüllt und als letzter Schritt der Kamm mit den Taschen für die spätere Probeneinfüllung eingehängt. Es erfolgte eine erneute Auspolymerisation von 45 Minuten.

Die Gele mit den Glasplatten wurden in die verwendeten horizontalen Elektrophoreseapparaturen eingebaut, innere und äußere Kammer mit Laufpuffer befüllt. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Proben nach folgendem Schema in die Taschen gefüllt:

Western Blot

(Zellfixierung nach 48h)

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|-----------------|-----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Standard | HUH6, Medium | HUH6, CDDP (2,5µg/ml) | HepT1, Medium | HepT1, CDDP, (4.2µg/ml) | HepG2, Medium | HepG2, CDDP, (6.2µg/ml) |
| 10µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl |

Tabelle V: WB

Nach Befüllen der Taschen und Vorbereitung der Elektrophoreseapparatur wurden an das Gel 150V für konstant 45 Minuten angelegt. Gegen Ende des Blots erfolgten die Vorbereitung der Blotmembran sowie der Aufbau der Elektroblotapparatur.

Das Gel wurde nach Ablauf der 45 Minuten vorsichtig von den Glasplatten entfernt, in Laufpuffer aufgenommen und auf Nitrozellulose übertragen. Der Elektroblotvorgang dauerte 30 Minuten bei 10V.

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulose in Ponceau S geschwenkt, um die Proteine anzufärben. Dies diente unter anderem als Kontrolle, ob eine Proteinwanderung bzw. –auftrennung stattgefunden hatte. Desweiteren wurden die Banden des Standards angezeichnet.

Nach Entfärben und waschen der Membran wurde das Ganze mit Net/Gelatine 0,2% geblockt, der jeweils erste Antikörper (1:200 Anti-Bcl2/Anti-Bcl-xl) hinzugefügt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte ein erneutes Waschen mit NET und der zweite Antikörper (1:15.000 Anti-Mouse IgG-HRP, Upstate) wurde für die Dauer von einer Stunde hinzugefügt. Das Ganze wurde im Anschluß daran nochmals gewaschen, mit PBS das EDTA entfernt, der Blot mit Luminiszenzlösung ECL zwei Minuten inkubiert, danach in Haushaltsfolie eingeschlagen und dann in der Dunkelkammer auf einem Film für gewisse Zeit exponiert.

Als letztes erfolgte die Entwicklung des Röntgen-Films.

Insgesamt wurden 2 Blots in beschriebener Weise durchgeführt:

| | | |
|--------|--|---------------------------------------|
| Blot A | Anti-bcl 2 Molekulargewicht: 26kDA | Bcl2: anti-apoptotisches Onkogen |
| Blot B | Anti-bcl-xl Molekulargewicht: 32kDA | Bcl-xl: anti-apoptotisches Onkogen |

Tabelle VI: WB-Versuchsansätze

Als Positivkontrolle wurde zeitgleich jeweils ein Blot mit GAPDH, einem Protein mit einer molekularen Masse von 37kDA, durchgeführt.

Idealerweise sollten die GAPDH Banden bei jeder Zelllinie nahezu identisch sein, damit davon ausgegangen werden kann, dass jeweils äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden.

Die verwendete Verdünnung von GAPDH betrug 1:200. Als zweiter Antikörper wurde in diesem Falle ein Anti-Rabbit Antikörper, Verdünnung 1:15.000, verwendet.

Die Anordnung der Taschenfüllung erfolgte wie bereits oben dargestellt

3.6.3 Vergleich Monotherapie versus Monotherapie+siRNA

Vorbereitung der Zellen:

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Die finale Zellkonzentration betrug 1×10^5 Zellen. Je zwei Wells wurden wie folgt befüllt:

| | | |
|------|--------|---------------------------------------|
| HUH6 | Medium | (DMEM, 10%FCS, 1% Glut, Hepes Buffer) |
| HUH6 | CDDP | (IC50: 2.5µg/ml) |
| HUH6 | CDDP | (IC50: 2.5 µg/ml) + siRNA |

Die Wells waren insgesamt mit 2ml befüllt. Für die Western Blots wurden die Zellen 48h nach Zytostatika mit/ohne siRNA oder Mediumzugabe abgelöst und aufbereitet.

Die Transfektion der Zellen mit der siRNA (Anti-Bcl2) wurde wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben, durchgeführt.

Das Medium mit/ohne siRNA und CDDP wurde nach entsprechender Zeit (48h) von den Platten abgesaugt; danach wurden die Wells mit PBS gewaschen – alles musste auf Eis gekühlt erfolgen (siehe Punkt 3.5.1) – und danach mit Hilfe des Lysepuffers unter Zusatz des Protease-Inhibitor-Cocktails abgelöst.

Die unbehandelten und behandelten Zellen wurden jeweils in Tubes eingefüllt und ein Puffergemisch (Laemmli) hinzugefügt. Die Tubes wurden zum Schluss 10 Minuten gekocht, um eine Haltbarkeit zu erreichen. Die Zellvorbereitung war hiermit abgeschlossen.

Durchführung des WB:

Der WB wurde wie unter Punkt 3.6.2 durchgeführt. Als Antikörper wurde Bcl-2 verwendet. Ebenfalls diente als Positivkontrolle GAPDH.

Die Taschen wurden wie folgt befüllt:

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| Standard | HUH6, CDDP, siRNA | HUH6, CDDP, siRNA | HUH6, Medium | HUH6, Medium | HUH6, CDDP | HUH6, CDDP |
| 5µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl |

Tabelle VII: WB

3.6.4 Densitometrie, Western Blot

Die semi-quantitative Auswertung der Western Blots erfolgt mit Hilfe der Densitometrie. Die Densitometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Schwärzungsgrade von beliebigen Teilen eines Bildes. Die Densitometrie wurde mit der Software AIDA 1D-Evaluation durchgeführt. Die Western Blots wurden in Schwarz-Weiß-Bildern mit 256 Graustufen digitalisiert und anschließend mit AIDA 1D-Evaluation jede der Banden einzeln markiert und der Schwärzungsgrad entlang der Laufrichtung der Banden (Schnittlinie) durch die

Software ermittelt. Die Software ermittelt den Schwärzungsgrad anhand der abgebildeten Graustufen der Banden durch die Schnittlinie als graphisches Profil. Die schwankenden Hintergrundschwärzungsgrade der Western Blots werden von der Software erkannt und kompensiert. Berechnet wird der maximale Schwärzungsgrad jeder Bande und der hintergrundkompensierte Integralwert der Schwärzung.

3.7 Immunfluoreszenz – Nachweis von Bcl-2

3.7.1 Theorie der Immunfluoreszenz

Der Immunfluoreszenztest dient als immunologische Methode zum mikroskopischen Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in histologischen oder zytologischen Präparaten, zur Differenzierung von Zellen und verschiedenen Gruppen von Immunglobulinen oder findet Anwendung in der immunologischen Diagnostik von Autoimmunkrankheiten.

Im vorliegenden Falle soll mittels dieser Methode der Nachweis von Bcl-2 erbracht werden. Unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers, der sich direkt an das homologe „Antigen“ Bcl-2 bindet, soll die Expression mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bildhaft dargestellt werden.

3.7.2 Durchführung

An Tag 1 wurden die Zellen HUH6, HepT1 und HepG2 subkonfluent jeweils separat auf einen Objektträger in einer Petrischale mit 8ml Medium (DMEM) ausgesät sowie gleichzeitig auf je einen Objektträger in einer Zellkulturkammer mit je 4ml Medium. Insgesamt wurden die Zellen auf 6 Objektträgern ausgesät (je 2 Objektträger pro Zelllinie).

An Tag 2 (nach 24h) wurde das Medium aus den Kammern und Petrischalen vorsichtig abgesaugt und die der jeweiligen IC50 entsprechende Zytostatikakonzentration (siehe WB), gelöst in 4ml Medium, zu den Zellen in

der Kulturkammer hinzugegeben. Die Objektträger mit Zellen, die in den Petrischalen kultiviert wurden, wurden jeweils so belassen.

Wiederum 24h später an Tag 3 fixierte man alle Objektträger mit den Zellen in einem Formalinbad. Nach 3maligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Hilfe des DakoPens in 2 Hälften unterteilt. Anschließend blockierte man die Zellen mit 1.5% Goat-Serum für die Dauer von 30 Minuten. Damit sollen unspezifische Anbindungen des Antikörpers, der im nächsten Schritt auf die Objektträger pipettiert wird, verhindert werden.

Einteilung der Objektträger:

| | | |
|----------------|-------------------|--|
| Feld ohne 1.AK | Anti-bcl2 (1:100) | |
|----------------|-------------------|--|

Abbildung 13

Auf die jeweils rechte Seite wurde nun der Antikörper (Anti-Bcl2) pipettiert, die linke Seite wurde mit PBS bedeckt. Die Träger wurden für die Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluss daran erneut mehrmals mit PBS gewaschen und danach Cy3 (Indocarbocyanin), ein rot fluoreszierender Farbstoff, mit der Verdünnung von 1:300 auf die gesamten Objektträger für 30 Minuten gegeben. Wiederum wurde mit PBS gewaschen. Mit Dapi (1:10000) erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne für die Dauer von 60 Sekunden. Als letztes wurden die Objektträger nochmals mit PBS gewaschen und mittels Mounting Medium eingedeckt.

Die Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und alle Zelllinien unter gleichen Bedingungen fotografiert. Die verwendeten Filter hatten folgende Charakteristika:

| | | | | | |
|-------|---------------|-----------|--------|---------------|-----------|
| Rot | excitation: | BP 546/12 | Blau | excitation: | BP 363/12 |
| (Cy3) | beamsplitter: | FT 580 | (Dapi) | beamsplitter: | FT 395 |
| | emission: | LP 590 | | emission: | LP 397 |

3.8 Materialien**3.8.1 Zellkultur**

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| Kulturmedium | DULBECCO`s MEM (1x) w 3,7 g/l NaHCO ₃ w 1,0 g/l D-Glucose w/o L-Glutamine testet for endotoxine | Cat.No. F 0415 Lot.No. 661FF BIOCHROM AG |
| Medium-Zusatz | Hepes Buffer Solution 1M | Cat.No. 15630 – 056 Lot.No. 3081945 GIBCO TM |
| Medium-Zusatz | L-Glutamine 200mM | Cat.No. K 0283 Lot.No. 069 FF BIOCHROM AG |
| Medium -Zusatz | FCS (fetal calve serum) Fetal bovine serum testet for mycoplasma | Cat.No. S 0115 Lot.No. 611 A BIOCHROM AG |
| Zellbehandlung (Passagieren) | PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺ | Cat.No. L 1823 Lot.No. 153 E BIOCHROM AG |
| Zellbehandlung (Passagieren) | Trypsin / EDTA Solution 0,05% / 0,02% (w/v) in PBS | Cat.No. L 2143 Lot.No. 554 A BIOCHROM AG |
| Kulturflaschen | 75cm ² Cell Culture Flask 2µm Vent cap | 3376 COSTAR ^R |
| Inkubator | Heraeus BBD 6220 37 °C ,10%CO ₂ , 95%rH | |

| | | |
|----------------|--|--|
| Lichtmikroskop | LEITZ WILD MPS 52 Herbrugg Switzerland | |
|----------------|--|--|

3.8.2 Ermittlung der IC50 für die Zytostatika

| | | |
|---|--|---|
| Kulturplatten | 96Well Cell Culture Cluster Flat bottom with lid Tissue culture treated | 3596 COSTAR ^R |
| Anfärbung der Zellen (Neubauer Zählkammer) | Tryptan Blue Solution Sterile filtered Prepared in 0,81% sodium chloride and 0,06% potassium Phosphate, dibasic | T 8154 SIGMA-ALDRICH- CHEMIE GmbH |
| Zytostatika-Handschuhe | Cytostatic protective gloves | BERNER |
| Proliferationstest | MTT-ASSAY EZ4U Nonradioactive cell proliferation and cytotoxicity assay | Cat.No. BI-5000 10x96 determinations |
| Falcon tubes | PP-Test tubes 15ml Sterile | Cat.No. 188271 CELLSTAR |

3.8.3 Ermittlung der Verteilung: Apoptose/Nekrose/lebende Zellen

| | | |
|---------------------------------------|--|--|
| Transfektion | JetSI Transfection reagent 0,4ml | Cat.No 401-04 |
| Transfektion | Bcl2 siRNA/siAB Assay kit | Upstate catalog 60-004 Lot 26558 |
| Zellfluoreszenz | Annexin-V-FLUOS Staining kit 1) Annexin-Fluoreszin 2) Propidium-Iodid 3) Inkubationspuffer | Cat.No 1 988 549 (250 Tests) Firma ROCHE |
| Fluoreszenzmikroskop | | |
| Objektträger | LabTek Chamber Slide System 8-well-chamber 154534 | NalgeNunc International 200 Aurora Road Naperville IL 60563 – 1796 USA Lot 091001 8 6 |
| Eindeckmedium für die Objektträger | DakoFluorescent Mounting Medium | Lot. 07351 Exp 0704 CodeNo. S 3023 |

3.8.4 Western Blot

| | | |
|---------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Trenngel /Sammelgel | 1,5M Tris HCL Buffer pH8.8 | Cat.No 161-0798 Bio-RAD |
| | 0.5M Tris HCL Buffer pH6.8 | Cat.No 161-0799 Bio-RAD |
| | SDS Solution 10%(w/v) | Cat.No 161-0416 Bio-RAD |

MATERIAL UND METHODEN

| | | |
|--|---|---|
| | APS | Cat.No 161-0700 Bio-RAD |
| | Temed | Cat.No 161-0800 Bio-RAD |
| Puffer | Laemmli Sample Buffer | Cat.No 161-0737 Bio-RAD |
| Proteinfärbung | Ponceau S Solution | 81462 Fluka Biochemika |
| Blotting-Papier | Thick blot paper Mini blot size | Cat.No 1703966 Bio-RAD |
| Blot-Membran | Hybond-ECL Nitrocellulose membrane | Amersham Biosciences Code: RPN 303 D |
| Detektions-Reagenz | Detection Reagent 1,2 | Amersham Biosciences RPN 2109 D2 Lot 94, lot 95 |
| Elektrophoreseapparatur | Mini-PROTEAN 3 Cell Instruction Manual | Cat. No 165-3301 165-3302 |
| Blotapparatur | Trans Blot Semi-dry | Cat. No 170-3940 BioRAD |
| Antikörper 1 (bcl 2) | Anti-bcl2 (N-19) Rabbit polyclonal IgG | Santa Cruz Biotechn. Sc-492 Lot A 3105 |
| Antikörper 1 (bcl-xl) | Anti-bcl-xl (H-5) Mouse polyclonal IgG | Sc-8392 Lot K 2304 |
| Antikörper 1 (bax) | Anti-bax (N20) Rabbit polyclonal IgG | Sc-493 Lot L 1004 |
| Antikörper 1 (GAPDH) = Positivkontrolle | GAPDH (FL-335) Rabbit polyclonal IgG | Sc-25778 Lot K 1704 |
| Antikörper 2 (anti-rabbit) HRP-conjugatet | Peroxidase labelled anti-rabbit antibody | Na 934 VS; Lot 224513 Amersham Biosciences |
| Antikörper 2 (anti-mouse) HRP-conjugatet | Peroxidase labelled anti-mouse antibody | Na 931 VS; Lot 313637 Amersham Biosciences |

| | | |
|------------|--|----------------------------|
| Standard | Prestained SDS-Page Standards, Broad Range | Cat.No 161-0318 |
| Laufpuffer | 10x Tris/Caps Buffer | Cat.No. 161-0778 BioRad |

Lysepufferzusammensetzung:

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Tis HCl pH 7.4 | SIGMA T1503 |
| NP 40 Triton | SIGMA N3516 |
| Sodium desoxycholate | MERK 6504 |
| NaCl | MERK 1.06404.1000 |
| EDTA | SIGMA E6758 |
| PMSF | SIGMA P7626 |
| Na ₃ VO ₄ | SIGMA S6508 |
| NaF | SIGMA 7681-49-4 |
| Protease-Inhibitor-Cocktail | SIGMA P8340 |

PMSF = Phenylmethanesulfonylfluoride / Na₂VO₄ = Sodiumorthovanadate

Tabelle VIII

Pufferlösung:

| | | Menge: 1000ml | Menge: 100ml |
|---|-------------|--|----------------|
| 50nM Tris HCl pH7.4 | 121.1g/mol | 6055mg | 605.5mg |
| 1% NP40 Triton | | 10ml | 1ml |
| 0.25% Sodium desox. | 414.57g/mol | 2.5g (2500mg) | 250mg |
| 150nM NaCl | 58.44g/mol | 8766mg | 876.6mg |
| 1mM EDTA | 292.2g/mol | 292.2mg | 29.22mg |
| 1mM Na ₃ VO ₄ | 183.9g/mol | 183.9mg | 18.39mg |
| 1mM NaF | 41.99g/mol | 41.99mg | 4.199mg |
| 1mM PMSF (erst vor Gebrauch zugeben !) | 174.2g/mol | 174.2mg | 17.42mg |
| Protease-Inh-Cocktail (erst vor Gebrauch zugeben) | | → Menge richtet sich nach dem Bedarf ! | |

Tabelle IX

3.8.5 Immunfluoreszenz

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| Objektträger | Super Frost Plus R. Langenbrinck | Art.No.: 041300 Lot 12694 |
| Petri-Schalen | | CELLSTAR Lot: 4450152 |
| Zellkulturgefäß (4 Kammern) | quadriPERM 16x12 | Greiner bio-one KatlNo.: 96077308 |
| Goat-Serum | | DAKO CodeNo. X 0907 Lot/Ch-B 061(101) |
| DAPI | | SIGMA Lot.: 093K4042 |
| CY 3 | Cy TM 3 conjugated AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG(H+L) | CodeNr: 115-165-062 Lot Nr. 61375 |
| Antikörper | Anti-bcl2, clone 100 Mouse monoclonal IgG | Upstate Cat.No: 05-729 Lot: 26504 |
| Fluoreszenzmikroskop | 100...200 V AC 50...60 Hz 100 Va | ZEISS Axioskop 40 HBO 50/AC |
| Dako-Pen | DakoCytomationPen | Lot 7643 S 2002 |
| Eindeckmedium | DAKO Fluorescent Mounting Medium | DAKOCYTOMATION Lot: 7359 CodeNo: S 3032 |

4 ERGEBNISSE

4.1 IC-50 Werte der einzelnen Zelllinien

Tabellarisch sind die ermittelten IC50-Werte der verwendeten Zytostatika dargestellt, die der jeweiligen Zelllinie entsprechen:

IC 50 / Zelllinien / Zytostatika

| | HUH6 | HepG2 | HepT1 |
|-------------|------------|------------|--------------|
| CDDP | 2.588µg/ml | 6.188µg/ml | 4.217µg/ml |
| Doxorubicin | 0.068µg/ml | 0.525µg/ml | 3.753µg/ml |
| Taxol | 0.069µg/ml | 0.696µg/ml | 2.004µg/ml |
| Etoposid | 16,84µg/ml | 69,91µg/ml | 101.980µg/ml |

Tabelle X: IC50-Werte

Alle untersuchten Hepatoblastom- und HCC-Zelllinien zeigen eine Sensibilität gegenüber den verwendeten Zytostatika CDDP, Doxorubicin, Taxol und Etoposid (VP16). Bei der Zelllinie HUH6 waren bei allen verwendeten Zytostatika die Konzentrationen zum Erreichen der IC 50 am niedrigsten im Vergleich mit den Zelllinien HepT1 und HepG2.

Bei HepT1 waren die höchsten Zytostatika-Konzentrationen bei Doxorubicin, Taxol und Etoposid zum Erreichen der IC 50 erforderlich, bei HepG2 war es CDDP.

Exemplarisch sind im Folgenden in Form einer graphischen Darstellung die Wirkungen der Zytostatika CDDP und Doxorubicin auf die einzelnen Zelllinien herausgegriffen. Die verwendeten Zytostatika-Konzentrationen sind so gewählt, dass die IC 50 aus der Graphik entnommen werden kann.

Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen abgebildet, auf der y-Achse die jeweilige Zytostatika-Konzentration in µg/ml.

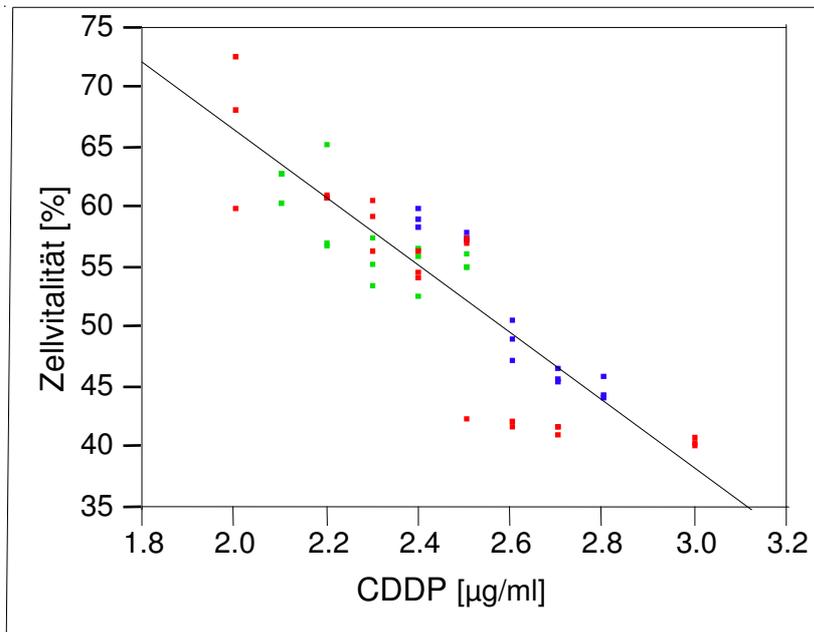
Die dabei verwendeten Farbpunkte entsprechen der jeweiligen Messreihe.

| | | |
|-------------------|----------|------------------------------------|
| Rot | = | erste Messreihe; Woche 1 |
| Grün | = | zweite Messreihe; Woche 3 |
| Blau | = | dritte Messreihe; Woche 5 |
| Orange | = | vierte Messreihe; Woche 7 |
| Kreuz grün | = | fünfte Messreihe; Woche 9 |
| Kreuz blau | = | sechste Messreihe; Woche 11 |

|

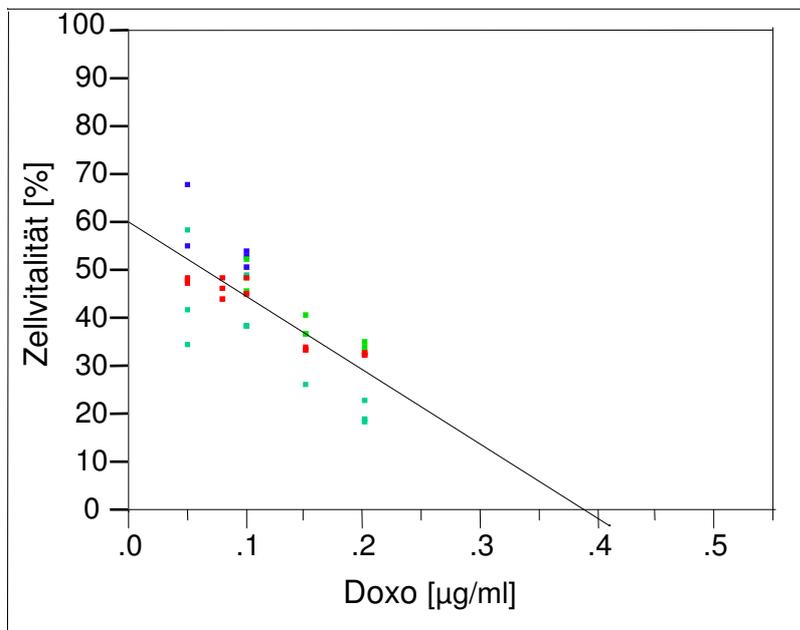
Zelllinie HUH6:

Abbildung 14: Medikament=CDDP



IC50 (µg/ml) 2.5877669258

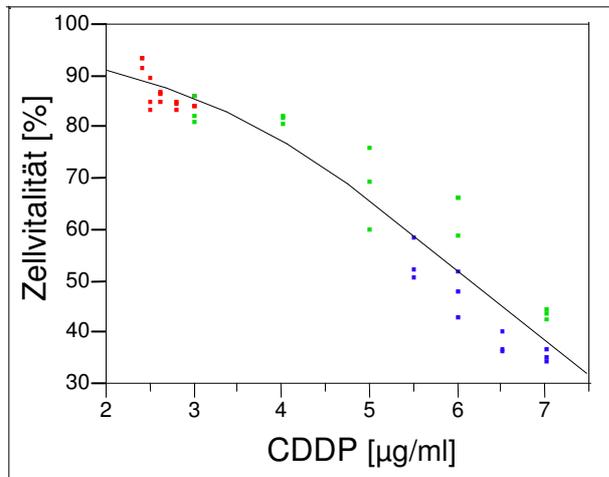
Abbildung 15: Medikament=Doxo



IC50 (µg/ml) 0.0683938459

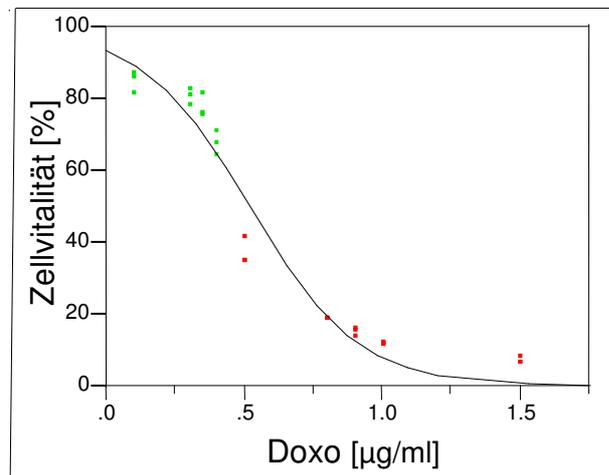
Zelllinie HepG2

Abbildung 16: Medikament=CDDP



IC50 (µg/ml) 6.187824424

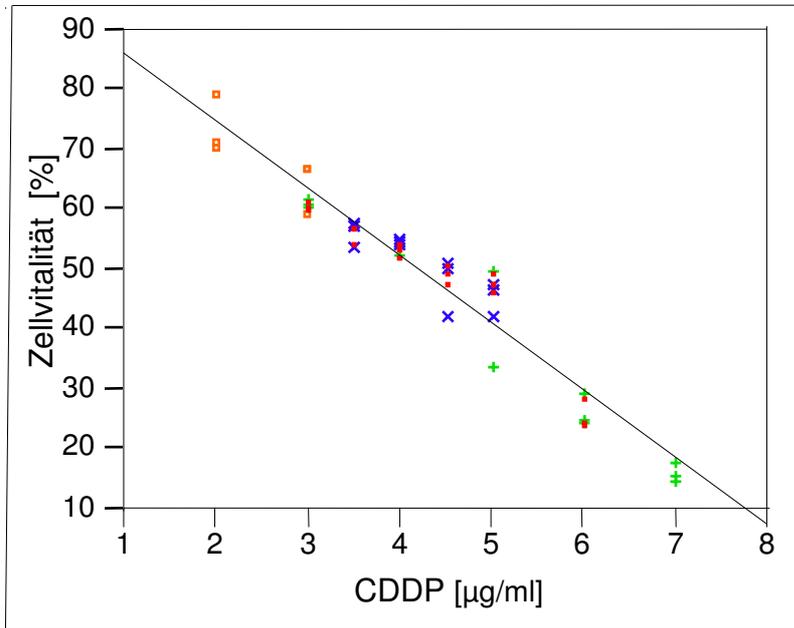
Abbildung 17: Medikament=Doxo



IC50 (µg/ml) 0.5247637386

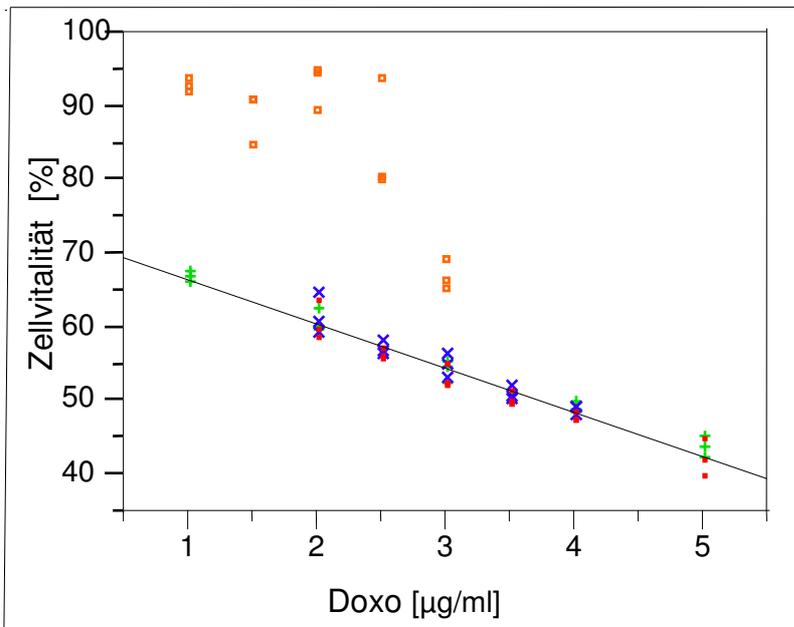
Zelllinie HepT1

Abbildung 18: Medikament=CDDP



IC50 (µg/ml) 4.2168167414

Abbildung 19: Medikament=Doxo



IC50 (µg/ml) 3.7531813126

4.2 Effizienz der Zell-Transfektion

Es wurden die der IC50-entsprechenden Extinktionswerte der jeweiligen Zelllinie, unter Verwendung der einzelnen Zytostatika, den gemessenen Werten bei Vorbehandlung der Zellen mit siRNA gegenübergestellt.

Unter Zuhilfenahme des t-Tests sowie der Varianzanalyse wurde untersucht, inwieweit Unterschiede bzgl. der Verteilung zweier Stichproben (mit/ohne siRNA) als signifikant anzusehen sind und als letzteres die P-Werte ermittelt.

Zunächst die tabellarische Darstellung der ermittelten Signifikanz-Niveaus, welche sich aus dem Vergleich –Therapie der Zellen mit Zytostatika, jeweils mit und ohne Transfektion ergaben. Im Anschluss folgt eine detaillierte Darstellung für die Zelllinie HUH6.

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------|------------------|------------------|
| α | ≥ 0.05 | ≤ 0.05 | ≤ 0.01 | ≤ 0.001 |
| Signifikanzniveau | Nicht signifikant | Signifikant | Sehr signifikant | Hoch signifikant |

Das Ergebnis wird dann als signifikant zum Niveau α (Irrtumswahrscheinlichkeit) bezeichnet, wenn die zu den Daten berechnete tatsächliche Fehlerwahrscheinlichkeit $p \leq \alpha$ ist.

P-Werte

| | CDDP | Doxorubicin | Taxol | Etoposid |
|-------|--------|-------------|--------|----------|
| HUH6 | <0.001 | 0.0054 | <0.001 | <0.001 |
| HepG2 | 0.3066 | 0.5842 | 0.7567 | 0.7428 |
| HepT1 | 0.9228 | 0.9674 | 0.9390 | 0.8181 |

Tabelle XI: p-Werte

Für die Zellen zeigte sich nur bei HUH6 eine signifikante Verbesserung der Therapie nach Transfektion. Im Falle von HUH 6 lieferte die Transfektion der Zellen mit nachfolgender Zytostatika-Therapie unter Verwendung von CDDP, Taxol und Etoposid ein hoch signifikantes Resultat, für das Zytostatikum Doxorubicin ein sehr signifikantes.

HepG2 und HepT1 zeigten keine Veränderung der Therapieeffizienz mit und ohne Transfektion. Somit war keine Signifikanz zu verzeichnen. Bei den beiden letztgenannten Zelllinien bedeutete dies, dass sich die Extinktionswerte unter Verwendung der IC50-Dosis der einzelnen Zytostatika nicht von denen mit siRNA-Zusatz unterschieden.

Im Folgenden in tabellarischer Form die Primärdaten, welche im Falle von HUH6 für die einzelnen Zytostatika ermittelt werden konnten.

In Spalte 2-4 sind die jeweiligen Extinktionswerte (Elisa-Reader, Einheit nm) abgebildet. Diese entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 3 Einzelmessungen (siehe S.37, Abb.11).

Spalte 2 beinhaltet die Messwerte der Zellen mit Medium, in Spalte 3 die gemessenen Werte mit Nonsense-RNA als Negativkontrolle. In der 4. Spalte wurden die Zellen mit der der IC50 entsprechenden Zytostatika-Konzentration behandelt, bei Spalte 5 wurden die Zellen zusätzlich transfiziert.

Die Effizienz wurde mit Hilfe der Formel auf S. 35 (IC-Berechnung) für die IC50-Spalte und die siRNA-Spalte durchgeführt. Daraus konnte die Effizienzsteigerung errechnet werden, Ergebnisse siehe Spalte 6.

In der letzten Spalte ist die Effizienzzunahme dann für alle Einzelwerte als Mittelwert angegeben.

Die dazu gehörigen p-Werte können der Tabelle XI entnommen werden.

Zelllinie HUH6

Medikament CDDP:

| | Medium | Nonsense | IC 50 | siRNA | Eff.↑ | Eff. Ges. |
|-------------|--------|----------|-------|-------|-------|------------|
| Messreihe 1 | 0.740 | 0.738 | 0.362 | 0.146 | 29.2% | 27.85+/-2% |
| Messreihe 2 | 0.870 | 0.892 | 0.429 | 0.211 | 26.5% | 27.85+/-2% |

Medikament Doxorubicin:

| | Medium | Nonsense | IC 50 | siRNA | Eff.↑ | Eff. Ges. |
|-------------|--------|----------|-------|-------|-------|------------|
| Messreihe 1 | 0.744 | 0.734 | 0.377 | 0.221 | 20.9% | 17.90+/-3% |
| Messreihe 2 | 1.006 | 1.006 | 0.553 | 0.379 | 14.9% | 17.90+/-3% |

Medikament Taxol:

| | Medium | Nonsense | IC 50 | siRNA | Eff.↑ | Eff. Ges. |
|-------------|--------|----------|-------|-------|-------|------------|
| Messreihe 1 | 0.832 | 0.828 | 0.415 | 0.237 | 21.4% | 21.90+/-1% |
| Messreihe 2 | 0.839 | 0.830 | 0.410 | 0.242 | 22.4% | 21.90+/-1% |

Medikament Etoposid:

| | Medium | Nonsense | IC 50 | siRNA | Eff.↑ | Eff. Ges. |
|-------------|--------|----------|-------|-------|-------|------------|
| Messreihe 1 | 0.829 | 0.832 | 0.424 | 0.205 | 26.4% | 24.50+/-2% |
| Messreihe 2 | 0.827 | 0.839 | 0.427 | 0.214 | 22.6% | 24.50+/-2% |

Tabelle XII:

Die Extinktionswerte der Spalte „Medium“ und „Nonsense“ der jeweiligen Messreihe differieren in nur geringem Maße, so dass eine unspezifische Reaktion, ausgehend von der Transfektionsreagenz, ausgeschlossen werden konnte.

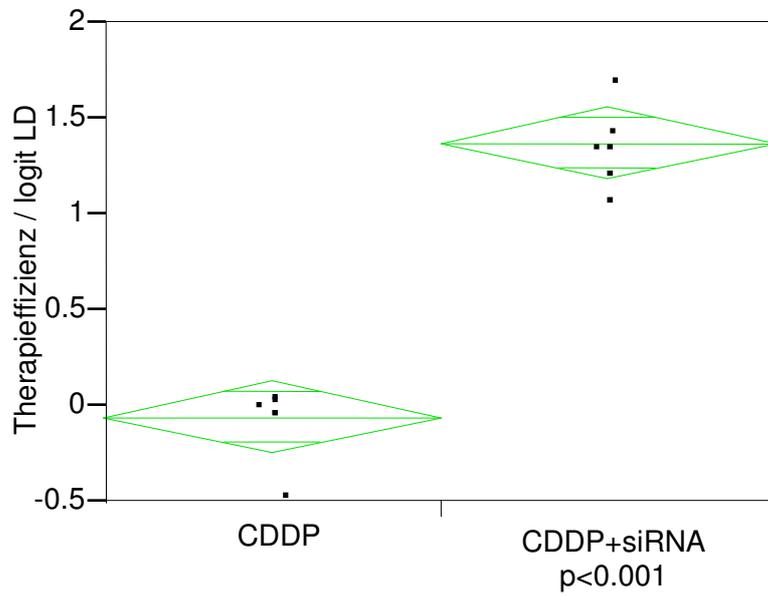
Als wirksamste Kombination erwies sich HUH6/CDDP/siRNA mit einer Effizienzsteigerung von 27.85+/-2%.

Ebenfalls wurden die tabellarischen Auswertungen der Zelllinie HUH6 in Form einer Graphik dargestellt.

Die x-Achse entspricht der Therapieeffizienz und ist in logarithmischer Form aufgetragen. Auf der y-Achse ist linksseitig die Behandlung der HUH6-Zellen mit dem jeweiligen Zytostatikum aufgetragen. Die verwendete Dosis entspricht der IC 50. Rechtsseitig wurden die Zellen zusätzlich zu den Zytostatika mit siRNA behandelt.

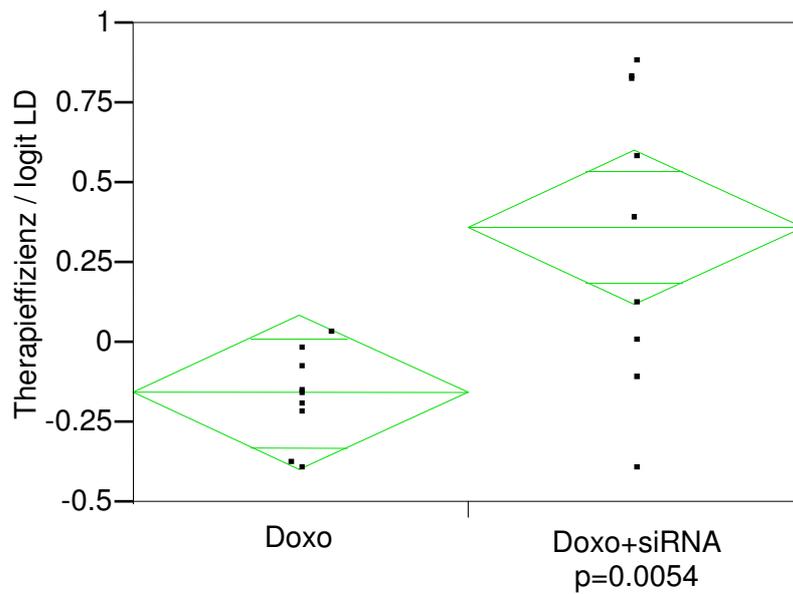
Zelllinie=HUH6, Medikament/Kontrolle=CDDP

Abbildung 20



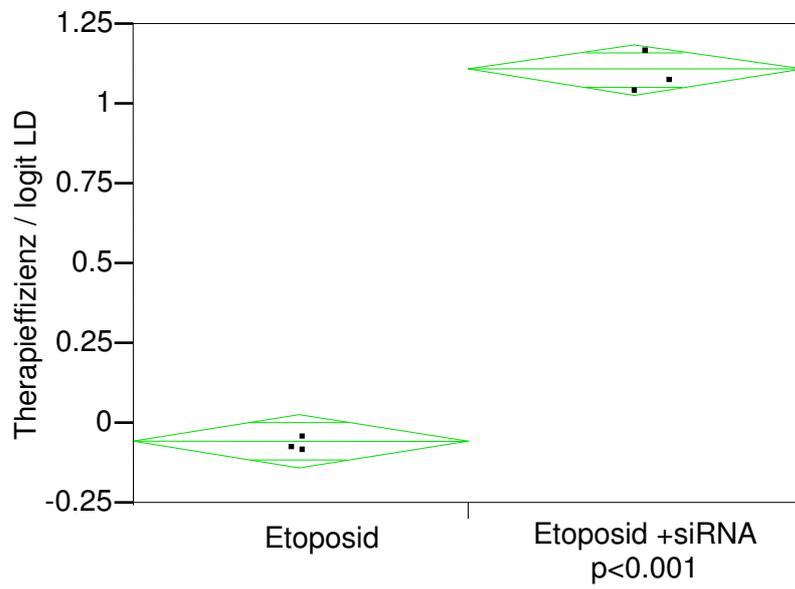
Zelllinie=HUH6, Medikament/Kontrolle=Doxo

Abbildung 21



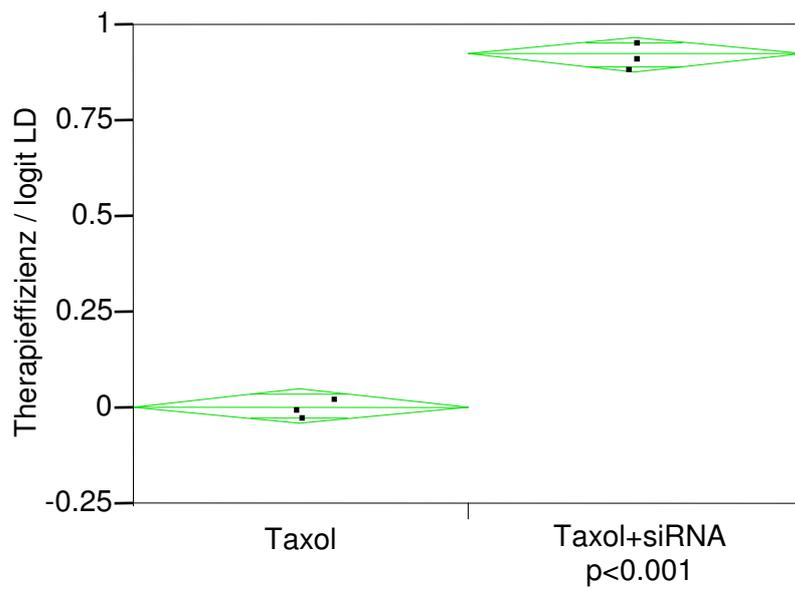
Zelllinie=HUH6, Medikament/Kontrolle=Etoposid

Abbildung 22



Zelllinie=HUH6, Medikament/Kontrolle=Taxol

Abbildung 23



4.3 Fluoreszenzmikroskopie – Apoptosenachweis

Die Versuche wurden mit der Zelllinie HUH6 durchgeführt, da die Zellen in diesem Versuchsteil erneut mit siRNA behandelt wurden und sich im MTT-Assay ausschließlich bei HUH6 eine Verbesserung der Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten Zytostatika gezeigt hat.

Die Grundlagen des Apoptosevorganges sind unter Punkt 3.5.2 beschrieben.

Zellen, welche den Vorgang der Apoptose eingeleitet haben, zeigen eine ausgeprägte Grünfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Annexin V kann in diesem Falle an die Phosphatidylserinreste der Außenmembran der Zellen binden. Annexin V ist an einen grünlich fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt.

Sofern die Zellen im Inbegriff der Nekrose sind, färbt sich deren DNS intensiv rot. Dies geschieht durch Anbindung von Propidiumjodid an die Erbsubstanz. Die Rotfärbung ist in diesem Fall ausschließlich auf den Nukleus beschränkt.

Sofern sich die Zellmembran einer Zelle sowohl mittels des an Annexin gebundenen fluoreszierenden Farbstoffes grün darstellen als auch deren Nukleus sich mit Propidiumjodid rot anfärben lassen, befindet sich die Zelle in der späten Phase der Apoptose.

Die nachfolgenden Photographien beinhalten die Bilder der Zelllinie HUH6 bei 20-facher sowie bei 63-facher Vergrößerung.

Zelllinie HUH 6; 20-fache Vergrößerung

Linksseitig sind jeweils die überlagerten Bilder der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt, wie unter Punkt 3.5.2, Seite 41 beschrieben. Rechtsseitig wurde das jeweilige linke Bild in nativ fotografiert.

▼ **Annexin + Propidiumjodid**

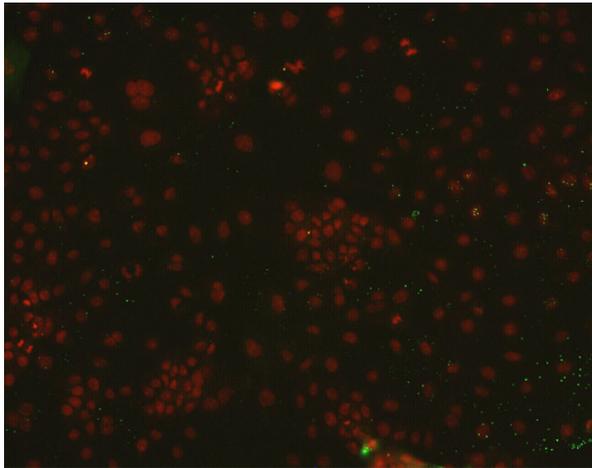


Abb. 24: HUH6 mit Medium

▼ **Nativ**

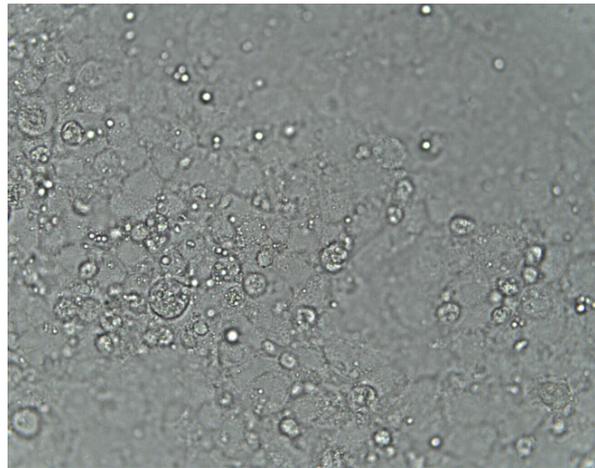


Abb. 25: Nativbild

Abb. 24: Die HUH6-Zellen wurden ausschließlich mit Medium behandelt. Es zeigte sich eine unspezifische Reaktion des Zellhintergrundes mit Propidiumjodid (rot). Vereinzelt sind Zellen im Inbegriff der Apoptose (grün).

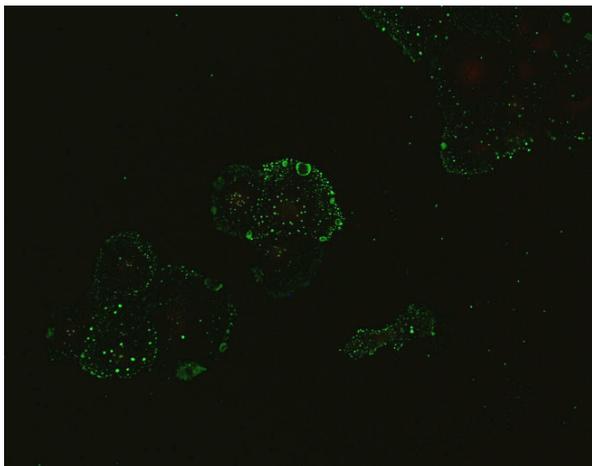


Abb. 26: HUH6 mit CDDP (IC 50: 2.6µg/ml)

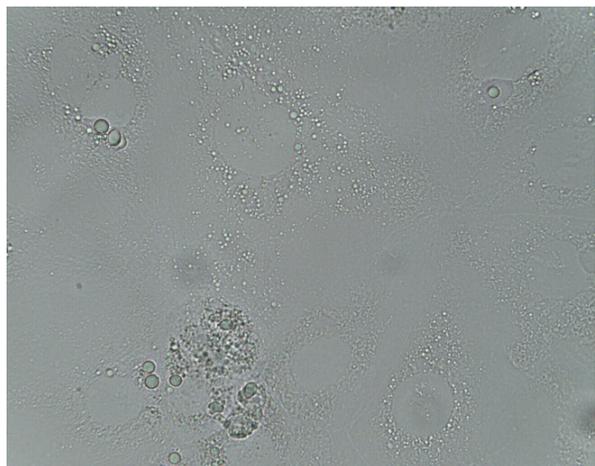


Abb. 27:Nativbild

Abb. 26: Die HUH6-Zellen wurden mit CDDP behandelt. Die Zellen zeigten eine Zunahme der Apoptose-Vorgänge (grün) unter Zytostatikabehandlung.

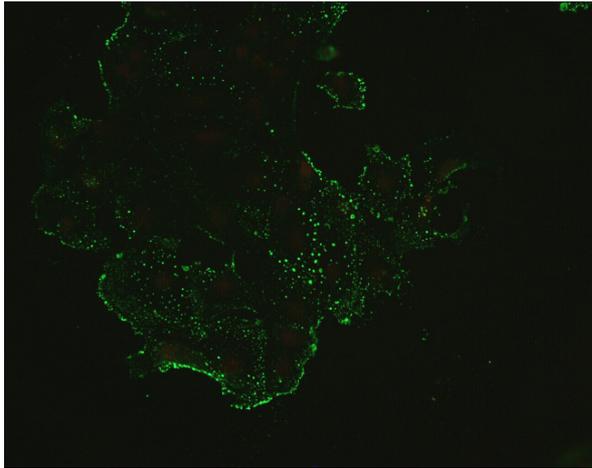


Abb. 28: HUH6 mit CDDP(2.6µg/ml) + siRNA

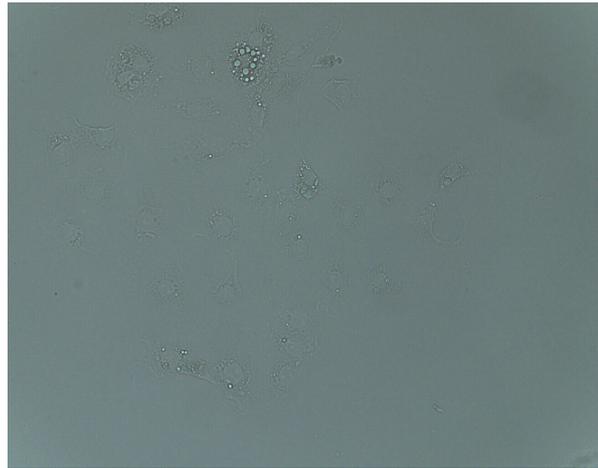


Abb. 29: Nativbild

Abb.28: Die Zellen wurden zusätzlich zu CDDP mit siRNA behandelt. Darunter war eine deutlichere Zunahme der Grünfärbung und somit der Apoptoserate im Gegensatz zur ausschließlichen Behandlung mit CDDP zu verzeichnen.

Zelllinie HUH6; 63-fache Vergrößerung

▼ Annexin + Propidiumjodid 63x

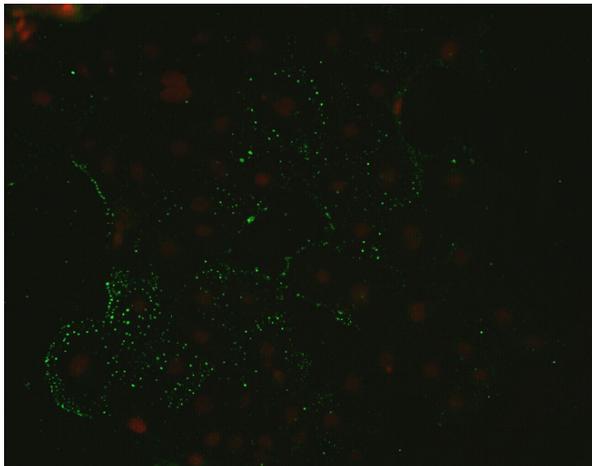


Abb. 30: HUH6 mit DOXO (IC50: 0.07µg/ml)

▼ nativ 63x

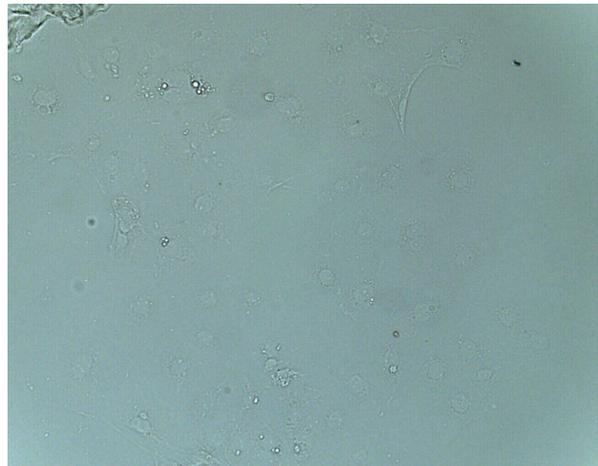


Abb. 31: Nativbild

Abb 30: die Zellen wurden mit Doxorubicin behandelt. Vergleichbar mit der CDDP-Behandlung der Zellen ist ebenfalls eine deutliche Grünfärbung erkennbar. Es zeigen sich erneut Apoptosevorgänge.

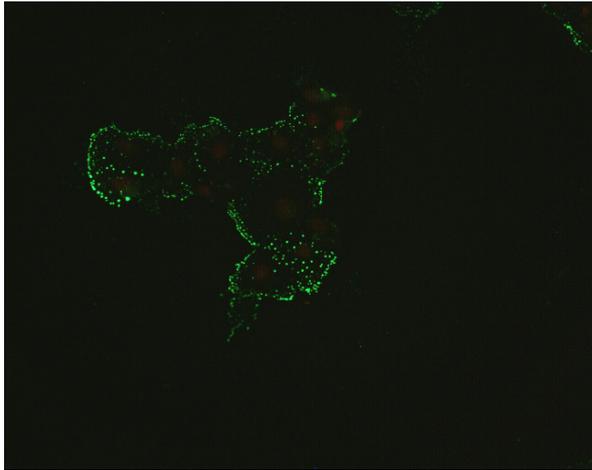


Abb. 32: HUH6 DOXO (0.07µg/ml) + siRNA

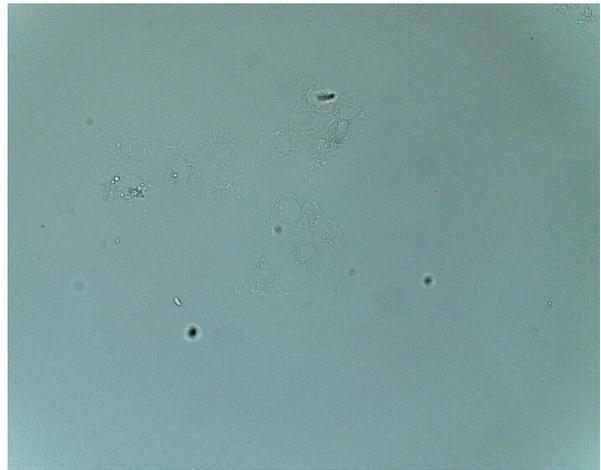


Abb. 33: Nativbild

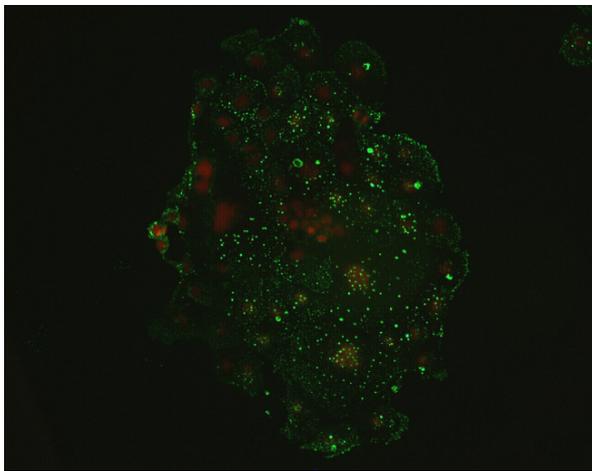


Abb. 34: HUH6 Doxo (0.07µg/ml)+ siRNA

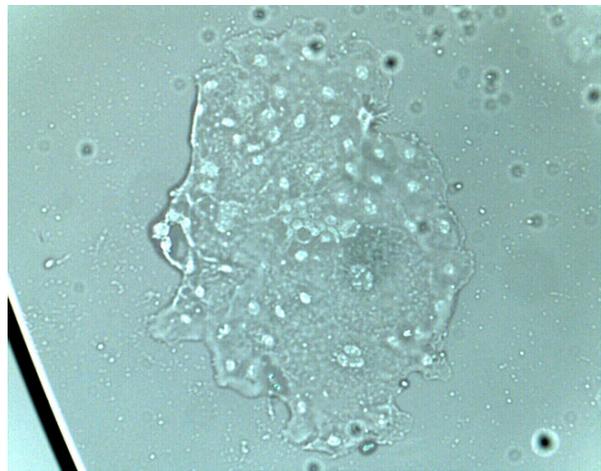


Abb. 35: Nativbild

Abbildungen 32 und 34: die Zellen wurden ebenfalls zusätzlich mit siRNA behandelt. Die Grünfärbung der Zellen unter Behandlung mit Zytostatika und siRNA verstärkt die Grünfärbung erneut. Vereinzelt sind Zellen in der späten Apoptose sichtbar. Diese stellen sich dar mit leuchtend roter Anfärbung der Zellkerne und gleichzeitig grüner Anfärbung der Zellmembran.

Vergleich : Behandlung mit Medium und Negativkontrolle – Behandlung mit Medium

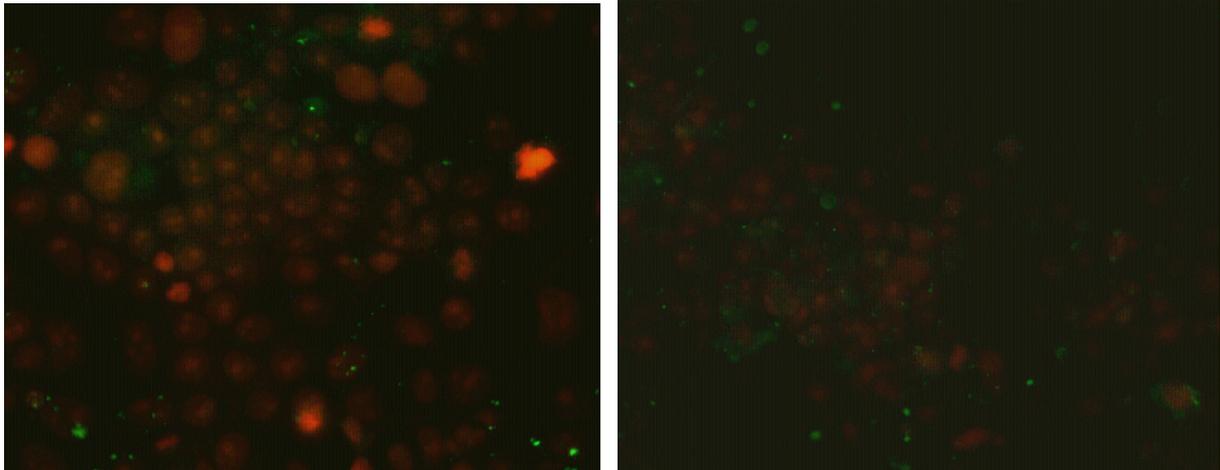


Abb. 36: HUH6 Negativkontrolle siRNA

Abb. 37: HUH6 Medium

Abb.36,37: der Zellbehandlung mit Medium wurde die Zellbehandlung mit siRNA-Negativkontrolle gegenübergestellt. Bei beiden Bildern zeigte sich eine unspezifische Rotfärbung des Zellhintergrundes durch Propidiumjodid. Vereinzelt sind Apoptosevorgänge (grün) sichtbar, ebenfalls auf Abb. 36 drei nekrotische Zellen, die sich leuchtend rot anfärben.

In der Zusammenschau zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch bei Behandlung der Zellen mit Zytostatika eine deutliche Grünfärbung der Zellmembranen, was den Beweis liefert, dass die Zellen unter medikamentöser Therapie den Vorgang der Apoptose einleiten. Unter Einsatz der siRNA gegen das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 verstärkte sich die Intensität und Menge der grünlichen Anteile bei der Zelllinie HUH6 unter Verwendung der gleichen Zytostatika-Konzentration.

Bei den Zellen nach Vorbehandlung mit Medium oder unter Zugabe der siRNA-Negativkontrolle (Nonsense-RNA) war vorwiegend eine unspezifische Rotfärbung des Zellhintergrundes sichtbar.

4.4 Western Blot / Densitometrie

4.4.1 Nachweis der Proteine Bcl-2 und Bcl-xl

Western Blot

Schema: Befüllung der Blot-Taschen:

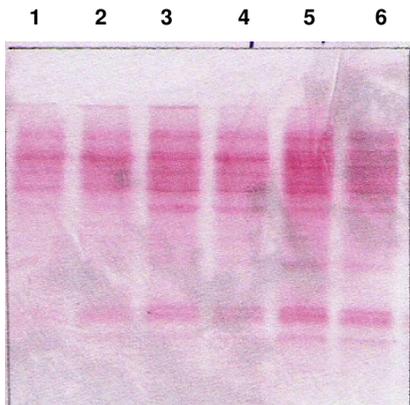
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------|-----------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Standard | HUH6, Medium | HUH6, CDDP (2,5µg/ml) | HepT1, Medium | HepT1, CDDP, (4.2µg/ml) | HepG2, Medium | HepG2, CDDP, (6.2µg/ml) |
| 10µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl |

Tabelle XIII: WB; Zelllinienanordnung mit jeweiliger Therapie

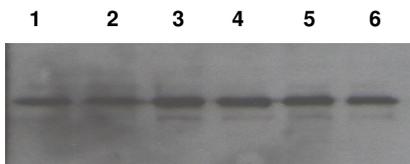
Die Ponceau-Färbung der Blotmembran zeigte ein für jede Zelllinie charakteristisches Bandenmuster und dient der Veranschaulichung. Der mit GAPDH als Antikörper durchgeführte WB diente der Positivkontrolle.

Mit Hilfe der Densitometrie wurden die Schwärzungsgrade aller Banden ermittelt. Der Schwärzungsgrad korreliert mit der jeweils vorhandenen Proteinmenge pro Bande nach der Regel: „Je höher der Schwärzungsgrad einer Bande, desto größer ist die Proteinmenge der Bande“. Der Schwärzungsgrad jeder einzelnen Bande ist - unter Berücksichtigung der schwankenden Hintergrundschwärzungsgrade der Western Blots - in tabellarischer Form im Anschluss an die dargestellten Blots angegeben.

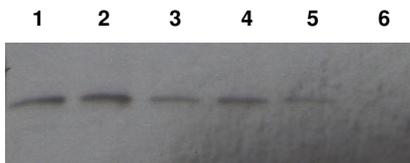
- 1: HUH6, Medium
- 2: HUH6, Zytostatikum
- 3: HepT1, Medium
- 4: HepT1, Zytostatikum
- 5: HepG2, Medium
- 6: HepG2, Zytostatikum



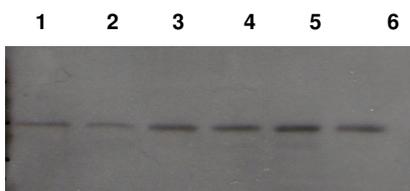
Ponceau Färbung



GAPDH (37kDa)



Bcl-2 (27kDa)



Bcl-xl (32 kDa)

Abbildung 38-41.

Die Ergebnisse der Densitometrie im Folgenden.

Die Zahlen 1-6 sind identisch zu den Angaben, die sich auf die Western Blots beziehen. Die Zeile „Messreihe“ gibt den tatsächlich gemessenen Schwärzungsgrad jeder Bande wieder, jeweils unter Berücksichtigung des Hintergrundes. Die

verwendete Einheit „a.u.“ entspricht dem Integralwert der Schwärzungsgrade, beziehungsweise der aufsummierten Schwärzungsgrade einer Bande.

Die Zeile „Vergleichsdaten“ spiegelt die Werte wider, welche man erhält, sofern man von der Annahme ausgeht, dass die GAPDH-Banden alle den gleichen Schwärzungsgrad haben (bei einer Höhe des Schwärzungsgrades von 6.0 a.u.).

Unter dieser Bedingung ist die jeweils aufgetragene Menge an Protein für jede Zelllinie identisch.

| Zelllinien +/- Therapie | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| GAPDH | | | | | | |
| Messwerte (a.u.) | 5.94 | 4.22 | 6.13 | 7.16 | 7.48 | 6.96 |
| Vergleichsdaten (a.u.) | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| Bcl 2 | | | | | | |
| Messwerte (a.u.) | 5.39 | 6.21 | 3.24 | 3.61 | 1.72 | ---- |
| Vergleichsdaten (a.u.) | 5.44 | 7.16 | 3.17 | 3.02 | 1.38 | ---- |
| Bcl-xl | | | | | | |
| Messwerte (a.u.) | 1.96 | 1.62 | 3.21 | 3.29 | 4.31 | 4.36 |
| Vergleichsdaten (a.u.) | 1.98 | 1.86 | 3.14 | 2.76 | 3.46 | 3.76 |

Tabelle XIV

Die Banden-Intensität des GAPDH-Western Blots zeigte geringe Unterschiede der Intensität der Schwärzung (siehe Zeile „Messwerte“). Sofern der GAPDH-Wert jeweils die gleiche Höhe (hier 6.0a.u.), erhält man folgendes Ergebnis:

Der Western-Blot mit Bcl-2 als Antikörper zeigte für HUH6/Medium (5.44a.u.) und HUH6/CDDP (7.16a.u.) eine deutliche Bcl-2-Bande, für HepT1/Medium (3.17a.u.) und HepT1/CDDP (3.02 a.u.) eine schwächere und für HepG2 eine schwache Bande bei HepG2/Medium (1.38a.u.).

Bei HUH6 war eine Bcl-2- Expressionssteigerung durch CDDP und eine damit in Zusammenhang stehende größere Menge an Bcl-2-Protein im Vergleich zur Kontrolle (Zellen mit Medium) zu verzeichnen. (HUH6: 5.44a.u. vs 7.16a.u.).

Unter Verwendung von Bcl-xl als Antikörper waren die Banden bei der Zelllinie HUH6 sowohl unter Verwendung von Medium (1.98a.u.) als auch bei Zytostatikum (1.86a.u.) schwach ausgeprägt. Hingegen zeigte sich bei HepT1 und HepG2 in beiden Fällen – unter Verwendung von Medium (HepT1: 3.14a.u./HepG2: 3.46a.u). oder Zytostatikum (HepT1: 2.76a.u./HepG2: 3.76a.u.) – eine deutlichere Bcl-xl-Expression und somit ein größerer Bcl-xl- Proteinanteil als bei HUH6.

4.4.2 Vergleich Monotherapie versus Monotherapie+siRNA

Wegen der signifikanten Ergebnisse im MTT-Assay wurde eine Western-Blot-Analyse für siRNA/CDDP durchgeführt.

Schema: Befüllung der Blot-Taschen.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| Standard | HUH6, CDDP, siRNA | HUH6, CDDP, siRNA | HUH6, Medium | HUH6, Medium | HUH6, CDDP | HUH6, CDDP |
| 5µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl |

Tabelle XV: WB mit/ohne siRNA + Zytostatikum

Der mit GAPDH als Antikörper durchgeführte WB diente erneut der Positivkontrolle. Mit Hilfe der Densitometrie, wie schon zuvor beschrieben, wurden die Schwärzungsgrade der jeweiligen Banden ermittelt. Damit erneut von äquivalenten Proteinmengen der jeweiligen Zelllinien ausgegangen werden konnte, wurden mit Hilfe der ermittelten „Messwerte“ ebenfalls die sogenannten „Vergleichsdaten“ errechnet.

(Grundlage: GAPDH-Banden: Schwärzungsgrad bei 6.0a.u.).

Die Werte der Densitometrie sind nach den Western-Blots in tabellarischer Form aufgeführt.

1+2: HUH6, CDDP, siRNA

3+4: HUH6, Medium

5+6: HUH6, CDDP

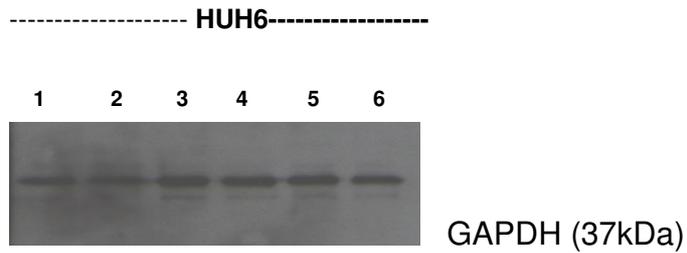


Abbildung 42

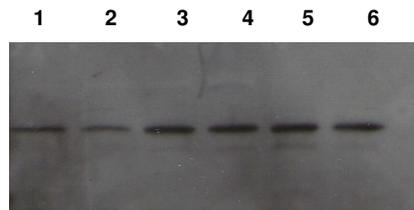


Abbildung 43

Die Werte der einzelnen Banden in tabellarischer Form:

| HUH6 +/- Therapie | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|
| GAPDH | | | | | | |
| Messwerte (a.u.) | 5.30 | 4.06 | 6.48 | 6.55 | 6.25 | 6.26 |
| Vergleichdaten (a.u.) | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| Bcl 2/siRNA | | | | | | |
| Messwerte (a.u.) | 2.00 | 1.68 | 3.21 | 3.28 | 4.31 | 4.56 |
| Vergleichsdaten (a.u.) | 2.26 | 2.48 | 2.97 | 3.00 | 4.14 | 4.37 |

Tabelle XVI

Als Vergleichsgrundlage dienten erneut die ermittelten Werte der Zeile „Vergleichsdaten“

Der Western Blot mit Bcl-2 als Antikörper brachte folgendes Ergebnis:

Zur verbesserten Darstellung werden im Folgenden prozentuale Werte angegeben. Die Kombination HUH6/Medium (2.985a.u.) wurde dabei 100% gesetzt. In Klammern sind jeweils zusätzlich die Mittelwerte der „Vergleichsdaten“ angegeben.

Bei HUH6/CDDP/siRNA waren die Banden mit 79.3% (2.37a.u.) um 20.7% schwächer ausgeprägt als bei HUH6/Medium. Die Bcl-2-Expression war bei HUH6/CDDP (4.255a.u.) mit 142.5% um 42.5% höher als bei HUH6/Medium.

Die Zugabe von siRNA führte somit zu einer effizienten Ausschaltung des Bcl-2-Gens, welche sich in einer erniedrigten Bcl-2-Expression und in Folge dessen einer geringeren Proteinmenge (korreliert mit dem Schwärzungsgrad der Banden) äußert. Sofern die Zellen mit CDDP ohne siRNA behandelt werden, steigt hingegen der Proteinanteil. In diesem Falle ist die Bcl-2-Proteinexpression am ausgeprägtesten.

4.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz – Nachweis von Bcl-2

Die Methode der Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis der zellulären Lokalisation von Bcl-2 bei den Zelllinien HUH6, HepT1 und HepG2 jeweils mit und ohne Zytostatikum angewandt.

Im Folgenden die Immunfluoreszenzbilder. Die Behandlung der Zellen sowie die Zellart sind jeweils über den einzelnen Bildern aufgeführt. In Klammern steht die Bildvergrößerung.

Zelllinie HUH6

Abb.44:HUH6, Neg.Kontr,Medium,Cy3+Dapi(40x) Abb.45: HUH6, Medium,Bcl2,Cy3+Dapi (40x)

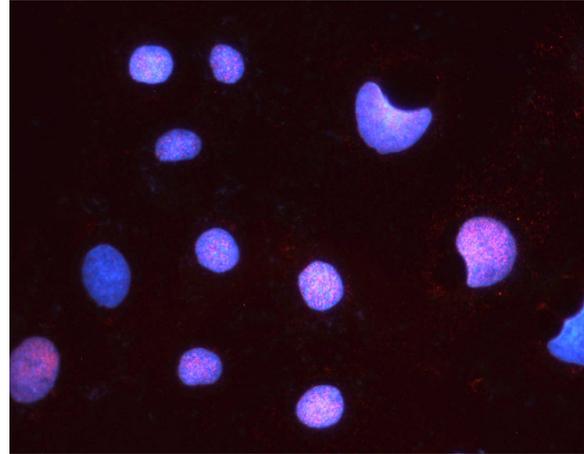
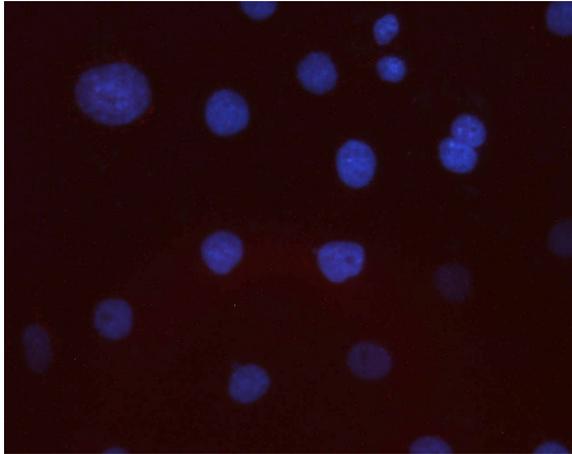


Abb.46:HUH6,CDDP, Bcl2, Cy3+Dapi(40x)

Abb.47:Abb.46 bearbeitet (Fluoreszenzverstärkung)

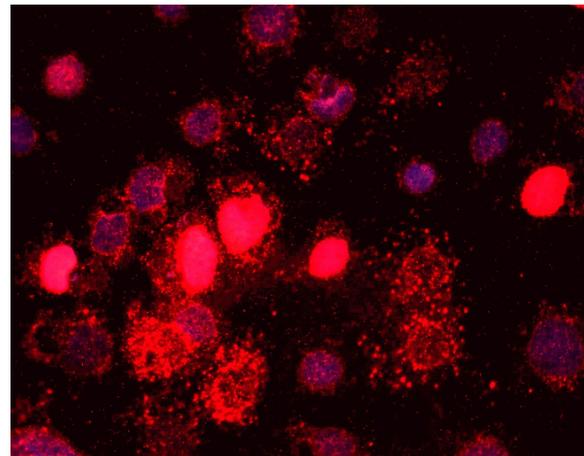
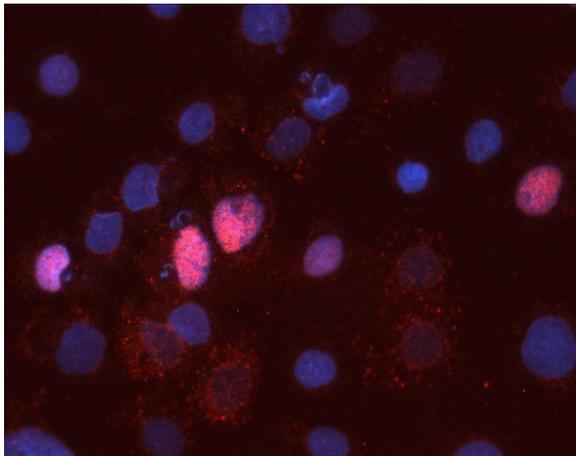


Abb. 44: dient der Negativkontrolle. Ausschließlich die Zellkerne sind mittels Dapi-Färbung bei Behandlung der Zellen mit Medium hervorgehoben.

Abb. 45: Bei Zugabe des Antikörpers für Bcl-2 zeigt sich ohne zytostatische Behandlung eine rötliche, geringe Bcl-2-Fluoreszenz – vor allem im Zytoplasma lokalisiert.

Abb. 46: unter Zytostatika-Behandlung deutliche Zunahme der Bcl-2-Fluoreszenz sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma

Abb. 47: bei Fluoreszenzverstärkung von Abb.46 zeigt sich sowohl im Zellkern- als auch im Zytoplasma eine deutliche Bcl-2-Expression.

Zelllinie HepT1

Abb.48: HepT1,Neg.Kontr,Medium,Cy3+Dapi(40x) Abb. 49:HepT1, Medium, Bcl2, Cy3+Dapi (40x)

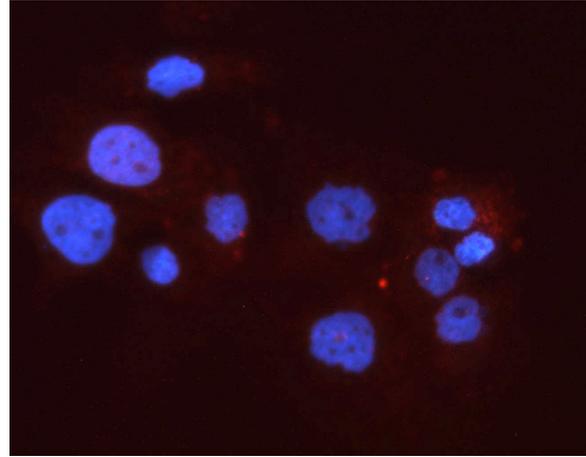
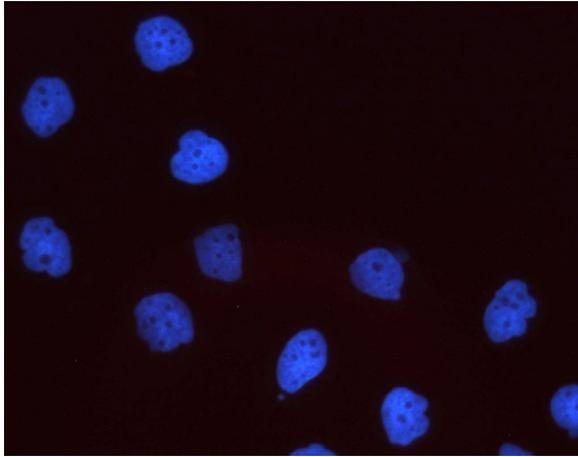
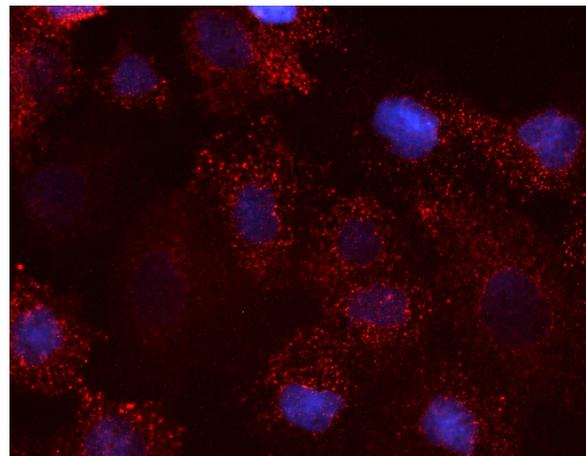
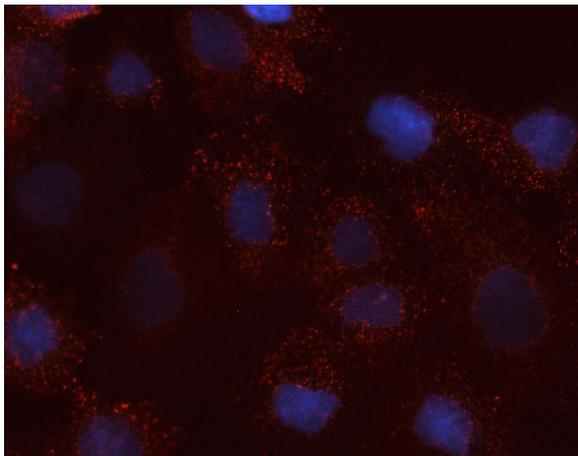


Abb.50:HepT1,CDDP, Bcl2, Cy3+Dapi (40x)

Abb.51:Abb.50 bearbeitet (Fluoreszenzverstärkung)



- Abb. 48: dient zur Negativkontrolle bei ausschließlicher Behandlung mit Medium. Nur die Zellkerne dürfen durch Dapi blau angefärbt sein.
- Abb. 49: bei Zusatz des Bcl-2-Antikörpers erscheint eine geringe Rot-Fluoreszenz im Zytosol.
- Abb. 50: bei Zytostatika-Behandlung verstärkt sich die rote Bcl-2-Fluoreszenz im Bereich des Zytosols.
- Abb. 51: unter Bildverstärkung wird die Lokalisation der roten Zellfluoreszenz nochmals deutlich. Bei HepT1 beschränkt sich die Bcl-2-Expression aufs Zytosol.

Zelllinie HepG2

Abb.52; HepG2,Neg.Kontr Medium,Cy3+Dapi(40x) Abb.53: HepG2,Medium, Bcl2,Cy3+Dapi (40x)

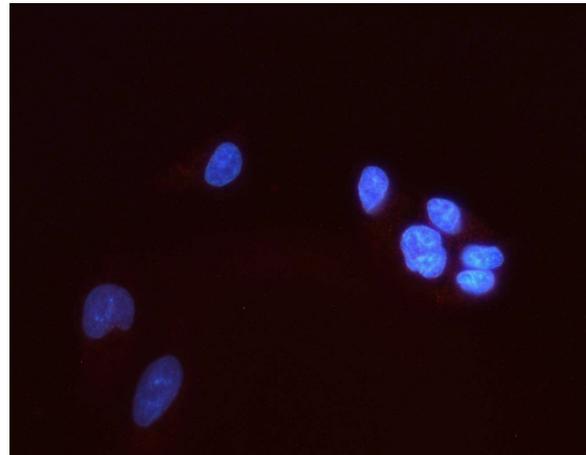
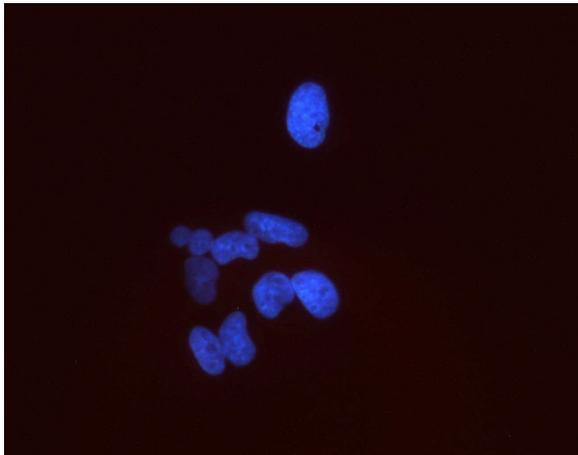


Abb.54: HepG2,CDDP,Bcl2,Cy3+Dapi (40x)

Abb.55: Abb.54 bearbeitet (Fluoreszenzverstärkung)

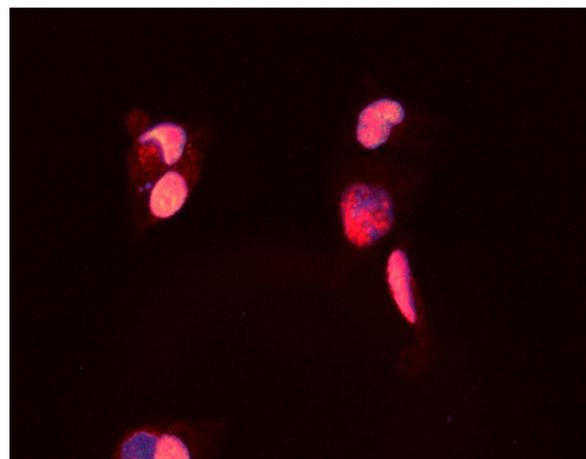
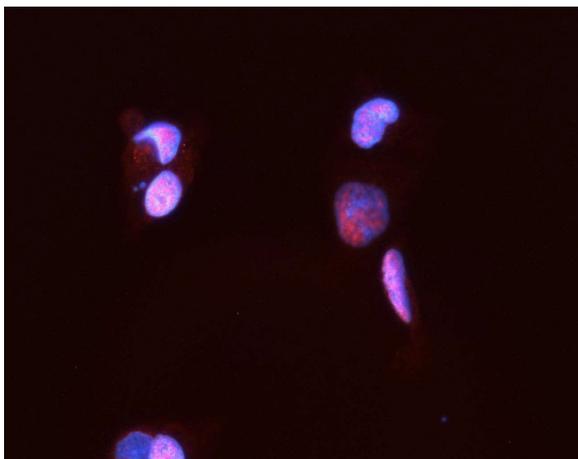


Abb. 52: wie auch bei den beiden vorausgehenden Zelllinien sind ausschließlich die Kerne durch Dapi blau angefärbt.

Abb. 53: nach Bcl-2-Zugabe zeigt sich eine dezente rote Zellfluoreszenz im Zytosol.

Abb. 54: unter Zytostatika-Therapie lässt sich die Fluoreszenz von Bcl-2 vor allem in Zellkern nachweisen.

Abb. 55: die Bildverstärkung zeigt eine schwach ausgeprägte Bcl-2-Fluoreszenz im Zytoplasma; ausgeprägter ist die Bcl-2-Expression hingegen im Zellkern.

Die Immunfluoreszenz diente dem Nachweis der zellulären Lokalisation von Bcl-2 mit und ohne Zytostatikum. Daraus ergab sich folgendes:

Bei der Zelllinie HUH6 ist Bcl-2 unter Zytostatika-Therapie sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern in ausgeprägtem Maße vorhanden. Im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien stellte sich die Bcl-2-Fluoreszenz bei HUH 6 unter Zytostatikaterapie am deutlichsten dar. Bei der Zelllinie HepG2 läßt sich vor allem im Zellkern Bcl-2 nachweisen. Bei HepT1 ist die Fluoreszenz im Zytosol ausgeprägt.

5 DISKUSSION

5.1 Allgemeiner Teil

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste maligne Lebertumor bei Kindern. Es lässt sich insgesamt schlecht mit anderen soliden Tumoren des Kindesalters vergleichen. Während der letzten Jahre konnten Teile der Pathogenese des HB in zunehmendem Maße identifiziert und Methoden etabliert werden, die mittlerweile eine suffiziente Diagnostik ermöglichen. Die Prognose der Kinder wurde entscheidend von den verbesserten chirurgischen Techniken und einer anhand von Studienprotokollen adjuvant durchgeführten Chemotherapie beeinflusst. Die Behandlungsergebnisse, sowohl beim HB als auch beim Hepatozellulären Karzinom (HCC), haben sich somit während der letzten 20 Jahre zum Positiven verändert. Im Stadium I beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Kindern, die neoadjuvant mit Doxorubicin und Cisplatin behandelt wurden, 100%; im Stadium II sind es 91%. Problemfälle sind allerdings nach wie vor fortgeschrittene Tumoren (Stadium III/IV HB), Rezidive und Metastasen. Die Metastasen finden sich vor allem in der Lunge. Die Überlebensrate für Kinder im Stadium III und IV liegt aktuell bei 68% beziehungsweise 57% (66).

Eine Verbesserung der Therapie von chirurgischer Seite für die Stadien III/IV ist kaum mehr möglich. Lebertransplantationen bzw. Hoch-Risiko-Resektionen werden teilweise unter Herz-Lungen-Maschinen-Einsatz durchgeführt (64). Um zukünftig eine Verbesserung der Prognose erzielen zu können, steht eine umfassendere Indikationsstellung zur Lebertransplantation bei fortgeschrittenem HB in Diskussion. Dies wird in der derzeitigen multizentrischen Studie der GPOH evaluiert (64,65).

Die Ursachen für das schlechte Ansprechen der fortgeschrittenen Tumoren auf Zytostatika sind bisher nur teilweise bekannt.

Unter anderem liegt einer der Gründe in der Ausbildung einer Multi-drug-resistance (MDR). Die German Pediatric Liver Tumor Study (HB89) kam zum Ergebnis, dass insgesamt 2/3 der Hepatoblastome, welche mit vier oder mehr

Chemo-Zyklen behandelt worden waren, eine MDR entwickelten (93). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind ebenfalls derzeit Gegenstand der Forschung. Mehrere Studien haben eine vermehrte MDR1-Genexpression in Hepatoblastomen nach Behandlung mit DOXO und CDDP gezeigt (74). In experimentellen Ansätzen konnte eine Verbesserung der Chemotherapie durch MDR1-Modulatoren erlangt werden. Warmann et. al konnten bei Hepatoblastom- und Karzinomzellen nachweisen, dass die Modulatoren GG 918, PSC 833 und Verapamil in der Lage sind, den Auswärtstransport der Chemotherapeutika aus den Zellen zu hemmen – die MDR somit partiell umzukehren. Die Effizienz der Modulatoren variiert im Einzelfalle. PSC 833 hat sich dabei als einer der effizientesten Modulatoren für den Bereich der Hepatoblastomtherapie erwiesen (94).

Ein weiteres molekular-biochemisches Gebiet, dem derzeit großes Interesse hinsichtlich therapeutischer Optionen entgegengebracht wird, ist die RNA-Interferenz.

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Oberbegriff für post-transkriptionales Gen-silencing. Die Ziel-RNA („target-RNA“) wird entweder durch Degradation oder durch Erzeugung eines Translationsstops ausgeschaltet.

Dieser Prozess wird von einer doppelsträngigen RNA mit homologer Sequenz und Spezifität zur Ziel-RNA initiiert. Die Entdeckung, dass die aus 21-23 Nukleotiden bestehende RNA-Duplexe (small interfering RNAs; siRNAs) RNA-Interferenz in menschlichen Zellen vermitteln können, öffnete die Tür für den therapeutischen Einsatz von siRNAs.

Die therapeutischen Vorteile der siRNAs in der Therapie viraler Infektionen, Krebs und neurologischer Erkrankungen sind bisher vielversprechend (95).

Bezüglich des Einsatzes von siRNA bei Tumoren lässt sich feststellen, dass Tumoren oftmals hochregulierte oder in ihrer Funktion veränderte Gene besitzen, die zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Einer der Ansatzpunkte für spezifische siRNA-Therapien in vivo ist somit beispielsweise das M-BCR/ABL-Fusionsgen, das onkogene Produkt des Philadelphia-Chromosoms (t9;22). Betroffene mit der genannten chromosomale Translokation erkranken

an CML (Chronisch-myeloische Leukämie). Es konnte gezeigt werden, dass gegen M-BCR/ABL-Transkripte gerichtete siRNAs den Vorgang der Apoptose in Leukämiezellen induzieren können (96).

Dies geschieht in vergleichbarem Maße zu STI 573, einer auf molekularer Ebene wirkenden Substanz, die gegenwärtig bei der CML-Therapie eingesetzt wird.

Die Entwicklung zusätzlicher therapeutischer Optionen im Hinblick auf die CML-Therapie gewinnt gegenwärtig an Bedeutung, da bereits dokumentierte Resistenzentwicklungen gegen STI 573 existieren.

Ein weiterer Einsatzbereich der siRNA liegt in der Degradation von K-RAS-Transkripten, welche eine Valin-112-Mutation tragen. Diese genetische Veränderung aktiviert RAS, was in diesem Falle zur Ausbildung von Pankreas- und Kolonkarzinomen führt.

Die nachfolgende Tabelle enthält eine Auflistung bisheriger Einsatzgebiete (97):

| KREBSART | siRNA-Target |
|------------------|------------------------------------|
| CML | BCR/ABL Fusionsprotein |
| Leukämie | c-raf, bcl2 |
| Zervixkarzinom | E6, E7, (HPV) |
| Pankreaskarzinom | K-RAS ^{V12} |
| Melanom | ATF2, BRAF ^{V559E} |
| Ovarialkarzinom | H-Ras, mVEGF, COX-2 |
| Prostatakarziom | P110 α , p110B of PI3kinase |
| Wilmstumor | Wt1, Pax2, Wnt4 |

Tabelle XVII: siRNA-Einsatzgebiete (aus Ryther RCC et al. Gene Therapy 2004).

5.2 Eigene Ergebnisse

Der Einsatz von RNA-Interferenz (siRNA) gegen den antiapoptotischen Faktor Bcl-2 beeinflusst in unterschiedlichem Ausmaß die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber den verwendeten Zytostatika. Die Zelllinien HepT1 und HepG2 zeigen kein Ansprechen auf eine Bcl-2-Degradation.

Bei der Zelllinie HUH6 hingegen waren signifikante Unterschiede durch den siRNA-Einsatz zu erzielen ($p < 0.001-0.0059$). Somit konnte die Empfindlichkeit gegenüber CDDP, Doxo, Taxol und Etoposid zwischen 17.9+/-3% und 27.85+/-2% gesteigert werden.

Die unterschiedliche Ansprechbarkeit der einzelnen Zelllinien auf die eingesetzte siRNA könnte auf die in verschiedenem Maße ausgeprägte Bcl-2-Expression zurückgeführt werden. Bei HUH6 war sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma nach Behandlung mit CDDP eine ausgeprägte Bcl-2-Fluoreszenz zu finden.

HepT1 exprimiert hingegen Bcl-2 nach Zytostatikabehandlung ausschließlich im Zytoplasma. Bei HepG2 lässt sich Bcl-2 nahezu ausschließlich im Nukleus nachweisen. Jede der einzelnen Zelllinien zeigt somit ein charakteristisches Bcl-2-Verteilungsmuster.

Damit ließe sich schlußfolgern, dass die Bcl-2-Proteinexpression für die Zelllinie HUH6 eine wesentliche Rolle in Bezug auf die Ausbildung antiapoptotisch wirksamer Faktoren spielt. Als einzige der Zelllinien ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma eine ausgeprägte Bcl-2-Fluoreszenz nachweisbar. Ebenfalls wäre denkbar, dass diese Beobachtung die Begründung dafür sein könnte, weshalb ausschließlich bei HUH6 eine Zunahme der Chemosensitivität zu sehen war.

Für das Nichtansprechen der siRNA bei den Zelllinien HepT1 und HepG2 können unterschiedliche Ursachen verantwortlich sein. Bei den Zellen könnte schon a priori ein Resistenzmechanismus gegen die eingesetzte siRNA vorliegen. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass Bcl-2 in diesem Falle nicht zu den tragenden Faktoren des Anti-Apoptose-Prozesses gehört.

Luo et. al. haben für HepG2 nachgewiesen, dass vor allem das Anti-Apoptose-Protein Bcl-xl eine entscheidende Rolle spielt, wohingegen Bcl-2 keine Bedeutung zugemessen wurde (98).

„Transfizierte Zellen mit reduzierten Bcl-xl-Spiegeln reagierten gegenüber den eingesetzten Zytostatika sensitiver. Eine signifikante Veränderung in Bezug auf die IC50-Werte konnte ermittelt werden. Die Chemosensitivität von HepG2-Zellen gegenüber Taxol und Doxorubicin blieb hingegen unverändert durch Reduktion des Bcl-2-Spiegels, wohingegen die Reduktion des Bcl-xl-Spiegel die Zellen empfindlicher für die genannten Zytostatika machte. Dies legt nahe, dass das Bcl-2-Protein allein die HepG2-Zellen nicht vor der medikamenteninduzierten Apoptose schützen kann, sondern dass das Verhältnis der Apoptose-Promotoren und –Repressoren der Bcl-2-Proteinfamilie die Chemosensitivität der Zellen gegenüber den apoptotischen Stimuli bestimmt. Somit könnte das Bcl-xl ein Ansatzpunkt für die Gentherapie im Falle eines HCCs sein.“ Im Artikel von Dan Luo et al. (98) wird HepG2 als Hepatoblastom bezeichnet. Es ist mittlerweile jedoch erwiesen, dass die Zellen einem HCC entstammen.

Unsere Ergebnisse der Western Blots bestätigen diese Aussage.

Insgesamt gesehen waren bei der Zelllinie HUH6 deutlich höhere Bcl2-Spiegel mit und ohne Zytostatika-Therapie auffallend. Die Bcl-2-Expression steigt im Falle von HUH6 bei den therapierten Zellen tendenziell an.

Es konnte ebenfalls in den hier aufgeführten Untersuchungen ein gegenläufiges Expressionsmuster zu Bcl-xl bei den HUH6-Zellen beobachtet werden.

Luo et al. postulierten für eine apoptotische Aktivität das Gleichgewicht Bcl-2 zu Bcl-xl. Transfizierte HepG2-Zellen mit reduzierten Bcl-xl-Spiegeln wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zytostatika auf (98).

Aufgrund dessen wäre daher denkbar, dass für das ausschließliche Ansprechen der Zelllinie HUH6 auf die siRNA-Therapie ebenfalls die gegenläufige Bcl-2 /Bcl-xl-Relation von Bedeutung ist.

Der Blot, bei dem das Augenmerk auf die Veränderung des Bcl2 auf Proteinebene unter Verwendung der entsprechenden siRNA gerichtet war, bestätigte nochmals die Beobachtung des MTT-Assays, dass die Bcl2-

Expression bei HUH6 durch den Einsatz von siRNA/Zytostatika herunterreguliert werden kann. Durch Bcl-2 siRNA ist es somit in der Hepatoblastom-Zelllinie HUH6 möglich, eine Zunahme der Chemosensitivität zu erreichen.

Was den klinischen Einsatz von siRNA gegen Bcl-2 in anderen Tumoren anbelangt, so wurden mittlerweile schon in-vitro-Versuche im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz bei Leukämie durchgeführt.

Cioca et al. transfizierten vier Leukämiezelllinien (HL-60, U937, THP-1, K562) mit dsRNA-Duplexen gegen die Gene c-raf und bcl-2. Im Interesse dieser Studie standen einerseits die Auswirkungen der RNAi auf die Zelldifferenzierung, der Effekt auf die Apoptoseinduktion und eine dadurch erreichbare Chemosensibilisierung für den Einsatz von Daunorubicin und Etoposid.

Die mit dsRNA gegen c-raf- und bcl-2-Gene transfizierten Zellen zeigten eine Abnahme in der Expression von Bcl-2- und Raf-1-Proteinen. Der kombinierte RNAi-Einsatz gegen c-raf und Bcl-2 induzierte den Apoptosevorgang bei den Zelllinien HL-60, U937 und THP-1 Zellen. Ebenfalls war eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber den erwähnten Zytostatika zu verzeichnen. Zusammenfassend wurden diese Resultate als eine mögliche Variante für den Einsatz bei Leukämieerkrankungen angesehen, um schon vorhandene Resistenzmechanismen erfolgreicher überwinden zu können (96).

Ein weiterer Bereich des siRNA-Einsatzes in der Therapie von Lebererkrankungen ist die selektive Inhibition von Virusreplikationen.

Chunxiao Ying et al. haben beschrieben, dass, um den therapeutischen Effekt einer siRNA gegen das Hepatitis-B Virus (HBV) zu evaluieren, sie die Effekte zweier mit HB-Virus transfizierten Zelllinien (HepAD38 und HepAD79) mit siRNA-Spezifität für das sogenannte Core-Gene des HBV-Genoms studierten. Die Zelllinie HepAD38 produzierte das Wild-Typ HBV, wohingegen die HepAD79-Zellen die Lamivudine-resistente YMDD-Variante synthetisierten. Die Transfektion der HepAD38-Zellen mit siRNA zeigte eine beträchtliche Inhibition

der Virusreplikation (72-98%). Gemessen wurde der Effekt an einer in erheblichem Maße abnehmenden HBV-Core-Proteinsynthese. Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Reduktion der Virusproduktion nach Transfektion der HepAD79-Zellen unter Einsatz einer HBV-spezifischen siRNA (75-89%) (99).

Konsequenzen für eine mögliche klinische Applikation:

Bei entsprechendem histologischem Subtyp könnte der Einsatz von spezifischen siRNAs den Erfolg eine Chemotherapie bei der Behandlung des Hepatoblastoms positiv beeinflussen.

Allerdings sind Ergebnisse von in-vitro-Studien nicht unmittelbar auf in-vivo-Therapien übertragbar, so dass im Zuge nachfolgender Untersuchungen in-vivo-Studien anstehen.

Das Ziel weiterer in-vitro-Studien könnte sein, die genauen Mechanismen des Apoptosevorganges herauszuarbeiten, um Unterschiede im Hinblick auf die einzelnen Zelllinien genauer definieren zu können.

Ein alternativer Ansatz wäre im Falle der vorliegenden Zelllinien der Einsatz einer spezifischen siRNA gegen Bcl-xl – einem zur Bcl-Familie gehörigen Protein.

Für die Zelllinie HUH6 steht als nächster Schritt nun die Übertragung der Ergebnisse auf das Tiermodell an.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Hepatoblastomzelllinie HUH6 konnte ein Erfolg bezüglich der durchgeführten Transfektion mit einer spezifischen siRNA gegen Bcl-2 verzeichnet werden. Die Wirksamkeit der in Höhe der IC50- Dosis applizierten Zytostatika-Konzentrationen auf die Zellen konnte durch den siRNA-Einsatz gesteigert werden. Die Kombination HUH6/CDDP/siRNA erwies sich als die Effizienteste.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Protein Bcl-2 bei HUH6 quantitativ am häufigsten vorhanden ist und in diesem Falle eine entscheidende Rolle bei anti-apoptotisch wirksamen Vorgängen zu spielen scheint. Die Bcl2- Expression lässt sich durch den Einsatz spezifischer siRNAs bei HUH6 herunterregulieren und somit die Chemosensitivität erhöhen.

Hingegen liegt bei HepT1 und HepG2 die Vermutung nahe, dass Bcl2 im Falle dieser beiden Zelllinien nicht entscheidend im Rahmen apoptotischer Vorgänge beteiligt ist.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|---|
| AFP | Alpha-Fetoprotein |
| AK | Antikörper |
| APC | Tumorsuppressorgen (adenomatous polyposis coli) |
| Bcl2 | Genfamilie, Onkogen |
| Bcl-xl | Onkogen |
| BWS | Beckwith-Wiedemann-Syndrom |
| CDDP | Cisplatin |
| Cy3 | Indocarbocyanin |
| Dapi | 4.6 Diamidino-1-phenylindol-Dihydrochlorid; 2-(4-Anidinophenyl)-6-indolcarbamidin-Dihydrochlorid |
| DOXO | Doxorubicin |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| dsRNA | double-stranded ribonucleic acid |
| EDTA | Ethyldiamintetraessigsäure |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-Phospat-Dehydrogenase |
| GPOH | Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie |
| HB | Hepatoblastom |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| IC50 | Zytostatikakonzentration, die 50% der Zellen schädigt |
| IL | Interleukin |
| LD | Letaldosis |
| LOH | Loss of Heterozygosity |
| MDR | Multi-Drug-Resistance |
| ml | Milliliter |
| mg | Milligramm |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MTT | 3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PRETEXT | pretreatment extent of disease |
| RNA | Ribonucleinsäure (ribonucleic acid) |
| RNAi | RNA-induced silencing complex |
| siRNA | small interfering ribonucleic acid |
| SIOP | Societe Internationale d`Oncologie Pediatrique |
| TNM | Tumor-Node-Metastasis (Tumorstaging) |
| TPO | Thrombopoietin |
| VP16 | Zytostatikum, Synonym:Etoposid |
| WB | Western Blot |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ruck F, Xiao JC, Kaiserling E. Histogenesis of hepatoblastoma. Morphological, immunoelectron microscopic and immunohistochemical findings. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1995;**75**:120-5.
- 2 Misick OS. A case of teratoma hepatis. *J Pathol Bacteriol.* 1998; **5**: 128-137.
- 3 Exelby PR, Filler RM, Grosfeld JL. Liver tumors in children in the particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey 1974. *J Pediatr Surg.* 1975; **10**: 329-337.
- 4 Vos A. Primary liver tumours in children. *Eur J Surg Oncol.* 1995; **21**: 101-105.
- 5 Raney B. Hepatoblastoma in children: a review. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997; **19**: 418-422.
- 6 Perilongo G, Shafford EA. Liver tumours. *Eur J Cancer.* 1999; **35**: 953-958; discussion 958-959.
- 7 Herzog CE, Andrassy RJ, Eftekhari F. Childhood cancers: hepatoblastoma. *Oncologist.* 2000; **5**: 445-453.
- 8 Mann JR, Kasthuri N, Raafat F, et al. Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1990; **4**: 276-289.
- 9 Clatworthy HW, Schiller M, Grosfeld JL. Primary liver tumors in infancy and childhood. 41 cases variously treated. *Arch Surg.* 1974; **109**: 143-147.
- 10 Ikeda H, Matsuyama S, Tanimura M. Association between hepatoblastoma and very low birth weight: a trend or a chance. *J Pediatr.* 1997; **130**: 557-560.(Comment in: *J Pediatr.* 1997;130:516-517; *J Pediatr.* 1998;132:750; *J Pediatr.* 1998;133:585-586).
- 11 Feusner J, Plaschkes J. Hepatoblastoma and low birth weight: a trend or chance observation? *Med Pediatr Oncol.* 2002; **39**: 508-509.
- 12 Haas OA, Zoubek A, Grumayer ER, Gadner H. Constitutional interstitial deletion of 11p11 and pericentric inversion of chromosome 9 in a patient with Wiedemann-Beckwith syndrome and hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; **23**: 95-104.
- 13 Steenman M, Westerveld A, Mannens M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000; **28**: 1-13.
- 14 Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res.* 1996; **56**: 3320-3323.
- 15 Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 1999; **59**: 269-273.
- 16 Anna CH, Sills RC, Foley JF, Stockton PS, Ton TV, Devereux TR. Beta-catenin mutations and protein accumulation in all hepatoblastomas examined from B6C3F1 mice treated with anthraquinone or oxazepam. *Cancer Res.* 2000; **60**: 2864-2868.
- 17 Udatsu Y, Kusafuka T, Kuroda S, Miao J, Okada A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2001; **17**: 508-512.
- 18 Swarts S, Wisecarver J, Bridge JA. Significance of extra copies of chromosome 20 and the long arm of chromosome 2 in hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996; **91**: 65-67.
- 19 Schneider NR, Cooley LD, Finegold MJ, Douglass EC, Tomlinson GE. The first recurring chromosome translocation in hepatoblastoma: der(4)t(1;4)(q12;q34). *Genes Chromosomes Cancer.* 1997; **19**: 291-294.
- 20 Ma SK, Cheung AN, Choy C, et al. Cytogenetic characterization of childhood hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; **119**: 32-36.
- 21 Parada LA, Limon J, Iliszko M, et al. Cytogenetics of hepatoblastoma: further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization: an international collaborative study. *Med Pediatr Oncol.* 2000; **34**: 165-170.
- 22 Weber RG, Pietsch T, von Schweinitz D, Lichter P. Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol.* 2000; **157**: 571-578.

- 23 Ali W, Savasan S, Rabah R, Mohamed AN. Cytogenetic findings in two new cases of hepatoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002; **133**: 179-182.
- 24 Kraus JA, Albrecht S, Wiestler OD, von Schweinitz D, Pietsch T. Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 1996; **67**: 467-471.
- 25 Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T. Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res.* 1994; **54**: 5041-5044.
- 26 Hartmann W, Waha A, Koch A, et al. p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol.* 2000; **157**: 1393-1403.
- 27 Debuire B, Paterlini P, Pontisso P, Basso G, May E. Analysis of the p53 gene in European hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene.* 1993; **8**: 2303-2306.
- 28 Chen TC, Hsieh LL, Kuo TT. Absence of p53 gene mutation and infrequent overexpression of p53 protein in hepatoblastoma. *J Pathol.* 1995; **176**: 243-247.
- 29 Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T, Komoto Y, Yoneda A, Okada A. Mutation analysis of p53 gene in childhood malignant solid tumors. *J Pediatr Surg.* 1997; **32**: 1175-1180.
- 30 Zerbini MC, Sredni ST, Grier H, et al. Primary malignant epithelial tumors of the liver in children: a study of DNA content and oncogene expression. *Pediatr Dev Pathol.* 1998; **1**: 270-280.
- 31 Habrand JL, Nehme D, Kalifa C, et al. Is there a place for radiation therapy in the management of hepatoblastomas and hepatocellular carcinomas in children? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992; **23**: 525-531. (Comment in: *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992; **23**: 675-676).
- 32 von Schweinitz D. Identification of risk groups in hepatoblastoma - another step in optimising therapy. *Eur J Cancer.* 2000; **6**: 1343-1346.
- 33 Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, von Schweinitz D, Kaiserling E. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology.* 1997; **31**: 324-329.
- 34 Vassej CJ, De La Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology.* 2001; **33**: 130-141.
- 35 Ruck P, Xiao JC. Stem-like cells in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2002; **39**: 504-507.
- 36 von Schweinitz D, Schmidt D, Fuchs J, Welte K, Pietsch T. Extramedullary hematopoiesis and intratumoral production of cytokines in childhood hepatoblastoma. *Pediatr Res.* 1995; **38**: 555-563.
- 37 von Schweinitz D, Hadam MR, Welte K, Mildenerger H, Pietsch T. Production of interleukin-1 beta and interleukin-6 in hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 1993; **53**: 728-734.
- 38 Miyazaki M, Gohda E, Tsuboi S, et al. Human hepatocyte growth factor stimulates the growth of HUH-6 clone 5 human hepatoblastoma cells. *Cell Biol Int Rep.* 1992; **16**: 145-154.
- 39 von Schweinitz D, Faundez A, Teichmann B, et al. Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 2000; **85**: 151-159.
- 40 Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Jones PH, Harris M, Blair V. Epidemiological and familial aspects of hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 1990; **18**: 103-109.
- 41 Miyagi J, Kobayashi S, Kojo N, Watanabe M, Kuramoto S, Hirose F. Brain metastasis of hepatoblastoma - a case report and review of literature. *No Shinkei Geka (Neurol Surg).* 1984; **12**: 753-758.
- 42 Endo EG, Walton DS, Albert DM. Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol.* 1996; **114**: 757-761.
- 43 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood.* 2001; **98**: 2720-2725.
- 44 de Campo M, de Campo JF. Ultrasound of primary hepatic tumours in childhood. *Pediatr Radiol.* 1988; **19**: 19-24.
- 45 (HB99 – Protokoll zur kooperativen Therapieoptimierungsprüfung der Behandlung von malignen Lebertumoren des Kindesalters. *Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie / GPOH.* Protokollfassung Dezember 1999.)

- 46 MacKinlay EL, Pritchard J. A common language for childhood liver tumours. *Pediatr Surg Int.* 1992; **7**: 325-326.
- 47 Aronson DC et al. Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study. *J Clin Oncol.* 2005;**23(6)**:1245-52.)
- 48 von Schweinitz D, Burger D, Mildenerger H. Is laparotomy the first step in treatment of childhood liver tumors? The experience from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *Eur J Pediatr Surg.* 1994; **4**: 82-86.
- 49 Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, et al. Randomized comparison of cisplatin/vincristine/fluorouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric hepatoblastoma: A report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2000; **18**: 2665-2675.
- 50 Iyer VK, Kapila K, Argawala S, Verma K. Fine needle aspiration cytology of hepatoblastoma. Recognition of subtypes on cytomorphology. *Acta Cytol.* 2005;**49(4)**:355-64.
- 51 Fasano M, Theise ND, Nalesnik M, et al. Immunohistochemical evaluation of hepatoblastomas with use of the hepatocyte-specific marker, hepatocyte paraffin 1, and the polyclonal anti-carcinoembryonic antigen. *Mod Pathol.* 1998; **11**: 934-938.
- 52 Ishak KG, Glunz PR. Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. Report of 47 cases. *Cancer.* 1967; **20**: 396-422.
- 53 Kasai M, Watanabe I. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. A study of 70 cases collected in Japan. *Cancer.* 1970; **25**: 551-563.
- 54 Dehner LP, Manivel JC. Hepatoblastoma: an analysis of the relationship between morphologic subtypes and prognosis. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1988; **10**: 301-307.
- 55 Gonzalez-Crussi F, Upton MP, Maurer HS. Hepatoblastoma. Attempt at characterization of histologic subtypes. *Am J Surg Pathol.* 1982; **6**: 599-612.
- 56 von Schweinitz D, Hecker H, Schmidt-von-Arndt G, Harms D. Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 1997; **74**: 593-599.
- 57 Haas JE, Muczynski KA, Krailo M, et al. Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer.* 1989; **64**: 1082-1095.
- 58 Conran RM, Hitchcock CL, Waclawiw MA, Stocker JT, Ishak KG. Hepatoblastoma: the prognostic significance of histologic type. *Pediatr Pathol.* 1992; **12**: 167-183.
- 59 von Schweinitz D, Wischmeyer P, Leuschner I, et al. Clinico-pathological criteria with prognostic relevance in hepatoblastoma. *Eur J Cancer.* 1994; **8**: 1052-1058.
- 60 Haas JE, Feusner JH, Finegold MJ. Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer.* 2001; **92**: 3130-134.
- 61 Pritchard J, Brown J, Shafford E, et al. Cisplatin, doxorubicin and delayed surgery for childhood hepatoblastoma a successful approach. Results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) - SIOPEL 1. *J Clin Oncol.* 2000; **18**: 3819-3828.
- 62 Schnater JM, Aronson DC, Plaschkes J, et al. Surgical view of the treatment of patients with hepatoblastoma. Results from the first prospective trial of the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group (SIOPEL-1). *Cancer.* 2002; **94**: 1111-1120.
- 63 Fuchs et al. Pretreatment Prognostic Factors and Treatment Results in Children with Hepatoblastoma. *Cancer.* 2002;**95**:172-182.
- 64 Oldhafer KJ, Fuchs J, Steinhoff G, Millenberger H. Ausgedehnte Leberresektion bei Kleinkindern im Kreislaufstillstand unter Low-flow-Kreislaufbedingungen in der Herz-Lungen-Maschine. *Chirurg* 2000;**71**:692-695.
- 65 Otte JB et al. Liver transplantation for hepatoblastoma: indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant.* 2005; **9(5)**: 557-65
- 66 Brown J, Perilongo G, Shafford E, et al. Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma – results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL 1. *Eur J Cancer.* 2000; **36**: 1418-1425.

- 67 van Tornout JM, Buckley JD, Quinn JJ, et al. Timing and magnitude of decline in alpha-fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictors of outcome: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* 1997; **15**: 1190-1197.
- 68 Perilongo G, Brown J, Shafford E, et al. Hepatoblastoma presenting with lung metastases. *Cancer.* 2000; **89**: 1845-1853.
- 69 Pietsch T, Fonatsch C, Albrecht S, Maschek H, Wolf Hk, von Schweinitz D: Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab invest* 1996; **74**: 809-818.
- 70 Doi I: Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Jap J of Cancer Res.* 1976;**67**:1-7.
- 71 Fuchs J, Schmidt D, Pietsch T, Miller K, von Schweinitz D. Successful transplantation of human hepatoblastoma into immunodeficient mice. *J Pediatr Surg.* 1996; **31**: 1241-1246. .
- 72 Dominguez-Malgon H, Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol.* 2001; **25(6)**: 497-516.
- 73 Czauderna P. Adult type vs Childhood hepatocellular carcinoma-are they same or different lesions? Biology, natural, history, prognosis and treatment. *Med Pediatr Oncol.* 2000;**39**: 519-23.
- 74 Warmann S, Hunger M, Teichmann B, Flemming P, Gratz KF, Fuchs J. The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma: clinical course and in vivo model. *Cancer.* 2002; **95**: 1795-1801.
- 75 Cao G, Kuriyama S, Gao J, et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter. *Eur J Cancer.* 2001; **37**: 140-147.
- 76 Fire A et al. RNA-interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Gene Dev*; 2001;**15**: 188-200.
- 77 Hammond SM et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; **391**: 293-296.
- 78 Cogoni C, Macino G: Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet. Dev* 2000; **10**: 683-643.
- 79 Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM: RNA – guiding gene silencing. *Science* 2001; **293**: 1080-1083.
- 80 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ: post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2001; **2**: 110-119.
- 81 Voinet O: RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 2001; **17**: 449-459.
- 82 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA-interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; **411**: 494-498.
- 83 Lockshin RA, Williams CM. Regulation of the apoptosis/necrosis switch. *J Insect Physiol* 1965;**11**: 123-133.
- 84 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972. **26(4)**: 239-57.
- 85 Voll RE et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; **390**: 350-351.
- 86 Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis-the role of the endonuclease. *Am Journ.of Pathol.* 1991; **136**:593-608.
- 87 Vaux DL et al. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992;**258**: 1955-1957
- 88 Muchmore SW et al. X-ray and NMR-structure of human bcl-xl, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996;**381**:335-341.
- 89 Antonsson B et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by bcl-2. *Science* 1997; **277**: 370-372.
- 90 Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Kamjanov I, Knowles BB: Controlled synthesis of HbsAg in a different human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; **282**: 615-616.

- 91 Wani et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; **93**: 2325-2327.
- 92 Schiff PB, Horwitz SB. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine-5-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 1981; **20**: 3247-3252.
- 93 Fuchs J, Rydzynski J, von Schweinitz D, et al. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma – a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer* 2002; **95**: 172–182.
- 94 Warmann S, Göhring G, Teichmann B, Geerlings H, Fuchs J. MDR1-modulators improve the chemotherapy response of human hepatoblastoma to doxorubicin in vitro. *J Pediatric Surg* 2002 Nov; 37(11):1579-84.)
- 95 Gene Therapy advance online publication, 21 october 2004; doi:10.1038/sj.gt.3302356
- 96 Cioca DP, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in huma myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther.*2003 Feb;10(2):125-33.)
- 97 Ryther RCC, Flynt AS, Phillips JAIII, Patton JG. siRNA-therapeutics: big potential from small RNAs; Review; *Gene Therapy* 2004, 1-7.
- 98 Dan Luo, Samuel Chak-Sum Cheng, Hong Xie, and Yong Xie. Effects of bcl-2 und bcl-xl protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem Cell Biol* 78: 119-126 (2000);
- 99 Chunxiao Ying et al. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA-interference. *Biochem And Biophys Res Comm*, Vol 309, Issue 2, 2003, 482-484.

LEBENS LAUF

HEIKE MARTINA FRANK
geboren am 11.10.1975 in Böblingen

Schulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1982-1986 | Grundschule in Eutingen-Weitingen |
| 1986-1992 | Realschule in Horb |
| 1992-1996 | Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Freudenstadt Luise-Büchner-Schule |

Hochschulbildung/Ausbildung

| | |
|------------|---|
| 1996-1998 | Grund-und Hauptschullehramtstudium an der Pädagogischen Hochschule in Schwäbisch Gmünd |
| 1999-2001 | Ausbildung zur Kinderkrankenschwester an der Kinderkranken pflegeschule des Universitätsklinikums in Tübingen |
| 2001-2004 | Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen / Vorklinischer Abschnitt |
| 04.04.2004 | Physikum |
| seit 2004 | Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen / Klinischer Abschnitt |
| 23.09.2005 | Annahme als Doktorantin im Rahmen der vorliegenden Inaugural-Dissertation bei Herrn Prof. Dr. med. J. Fuchs im Onkologischen Labor der Abteilung für Kinderchirurgie der Universitätskinderklinik in Tübingen |
| 27.02.06 | Beginn des Praktischen Jahres am Uniklinikum in Tübingen Fächerkombination: Chirurgie, Pädiatrie, Innere Medizin |
| 04.12.2007 | Abschluß des Medizinstudiums / Staatsexamen M2neu |

