

**Mechanismen der Apoptoseinduktion:  
Betulinsäure in Kombination  
mit konventionellen Zytostatika  
auf Leukämiezellen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

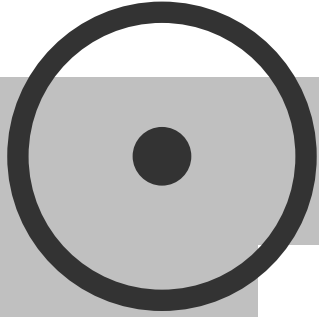


an der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Ines Höfig  
aus Stuttgart / Bad Cannstatt

München, April 2010





**In youth we learn - in age we understand.**

*Freifrau Marie von Ebner-Eschenbach, 1893*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, im April 2010

Ines Höfig

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 2010

## I.1 Inhaltsverzeichnis

<b>I.1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>I.2</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>VI</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>II.1</b>	<b>Molekularer Mechanismen der intrinsischen Apoptose.....</b>	<b>1</b>
II.1.1	Apoptose als Zelltodsignalweg mit Initiations- und Effektorphase.....	1
II.1.2	Mechanismen der intrinsischen Aktivierung von Mitochondrien.....	3
II.1.3	Pro-apoptotische Rolle der BH3-D Proteine PUMA und NOXA.....	6
II.1.4	Pro-apoptotische Rolle des Tumorsuppressors p53.....	7
II.1.5	Intrinsische Apoptoseinduktion durch etablierte Zytostatika.....	9
<b>II.2</b>	<b>Betulinsäure als zytotoxisches Agenz.....</b>	<b>10</b>
II.2.1	Bekanntes Wirkspektrum von Betulinsäure.....	10
II.2.2	Einsatz von BA in Tumorzellen, Tiermodellen und klinischen Studien....	13
II.2.3	BA-Kombinationstherapie.....	15
<b>II.3</b>	<b>Entwicklung humaner Xenograft Leukämie Modelle.....</b>	<b>17</b>
II.3.1	Geeignete Tiermodelle zur Etablierung humaner Leukämien.....	17
II.3.2	Molekulare Modifikation von Xenograft Leukämiezellen.....	18
<b>III</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>IV</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>21</b>
IV.1.1	Geräte und Software.....	21
IV.1.2	Chemikalien und Kits.....	22
IV.1.3	Reagenzien der Bakterien- und Zellkultur.....	22
IV.1.4	Bakterienstamm und humane Zelllinien.....	24
IV.1.5	Vektoren.....	25
IV.1.6	Oligonukleotide.....	26
IV.1.7	Antikörper.....	27
IV.1.8	Andere Proteine.....	29
IV.1.9	Sonstiges.....	29
<b>IV.2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
IV.2.1	Zellkultur.....	31
IV.2.1.1	Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien.....	31
IV.2.1.2	Herstellung Zytotoxika-resistenter Tumorzelllinien.....	31
IV.2.1.3	Kultivierung von primären und Xenograft Leukämiezellen.....	32

IV.2.1.4	Stimulation mit zytotoxischen Agenzien.....	33
IV.2.2	Klonierung.....	33
IV.2.2.1	shRNA Oligonukleotid Design und Annealing.....	33
IV.2.2.2	Restriktionsverdau.....	34
IV.2.2.3	Agarosegelelektrophorese und Reinigung von Vektor-DNA.....	35
IV.2.2.4	Ligation.....	35
IV.2.2.5	Transformation in kompetente Bakterien.....	35
IV.2.2.6	Kolonie-PCR.....	36
IV.2.2.7	Plasmidisolation (MINI/MIDI).....	37
IV.2.2.8	Mengenbestimmung von DNA und Sequenzanalyse.....	37
IV.2.3	Transfektionen und Herstellung stabiler Zelllinien.....	38
IV.2.3.1	Nukleofektion von humanen Suspensionszelllinien.....	38
IV.2.3.2	Nukleofektion von Xenograft Leukämiezellen.....	38
IV.2.3.3	HEK-293T Transfektion zur Lentivirenproduktion.....	39
IV.2.3.4	Lentvirale Infektion von Suspensionszelllinien.....	40
IV.2.4	Wachstumsversuch.....	40
IV.2.5	Apoptose-Assays.....	41
IV.2.5.1	FACS-Analyse mittels FSC/SSC-Analyse.....	41
IV.2.5.2	Nicoletti Färbung mittels Propidiumiodid.....	41
IV.2.6	Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung.....	42
IV.2.7	Proteinstudien.....	43
IV.2.7.1	Präparation von Zellextrakten.....	43
IV.2.7.1.1	Nicht-fraktionierte Zelllyse.....	43
IV.2.7.1.2	Mitochondriale Fraktionierung.....	43
IV.2.7.1.3	Nukleäre Fraktionierung.....	43
IV.2.7.2	SDS-Proteinacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
IV.2.7.3	Western-Blot-Analyse.....	45
IV.2.7.4	Caspase-3 und Cytochrom-C FACS-Assays.....	45
IV.2.8	„Fractional product“ Methode und statistische Analyse.....	46
IV.2.9	Tiermodell.....	47
<b>V</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>V.1</b>	<b>Untersuchungen auf Tumorzelllinien.....</b>	<b>49</b>
V.1.1	Häufigkeit der synergistischen Apoptoseinduktion durch Kombination von Betulinsäure und Chemotherapeutika.....	50
V.1.1.1	Synergistische Effekte verschiedener Chemotherapeutika und Betulinsäure auf JURKAT Leukämiezellen.....	50
V.1.1.2	Synergistische Apoptoseinduktion auf anderen Leukämie- und Lymphomzelllinien.....	52

V.1.1.3	Synergistische Apoptoseinduktion auf soliden Tumorzelllinien.....	54
V.1.1.4	Synergistische Wirkung im Fall von erworbener Zytostatika-Resistenz.....	55
V.1.2	Hemmung des Wachstums von JURKAT Leukämiezellen.....	56
V.1.3	Intrazelluläre Signaltransduktion der synergistischen Apoptoseinduktion	58
V.1.3.1	Distale Aktivierung von Caspasen.....	58
V.1.3.2	Freisetzung von mitochondrialen Faktoren.....	63
V.1.3.3	Rolle von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen.....	69
V.1.3.4	Rolle der BH3-D Proteine.....	72
V.1.3.4.1	Rolle der Aktivatoren BID und BIM.....	73
V.1.3.4.2	Rolle der BH3-D Proteine NOXA und PUMA.....	75
V.1.3.5	Rolle des Tumorsuppressors p53.....	80
V.1.3.6	Verstärkter Zellzyklusarrest nach kombinierter Stimulation.....	83
<b>V.2</b>	<b>Untersuchungen in primären und Xenograft Leukämiezellen.....</b>	<b>85</b>
V.2.1	Synergistische Apoptose in primären Leukämiezellen.....	85
V.2.2	Synergismus in Xenograft Leukämiezellen aus NOD/SCID-Mäusen.....	89
V.2.3	Hemmung des Wachstums einer Xenograft Leukämieprobe nach Kombination von Betulinsäure und Chemotherapeutika .....	90
V.2.4	Knockdown Untersuchungen in zwei Xenograft Leukämieproben.....	92
<b>VI</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
<b>VI.1</b>	<b>Betulinsäure steigert in Kombination mit etablierten Zytostatika die Apoptoseinduktion in Leukämiezellen.....</b>	<b>100</b>
VI.1.1	Modell des intrazellulären molekularen Wirkmechanismus synergistischer Apoptosesignalvermittlung.....	101
VI.1.2	Synergistische Apoptoseinduktion ist begleitet von Zellzyklusarrest.....	105
VI.1.3	Der Tumorsuppressor p53 ist zentraler Vermittler synergistischer Apoptoseinduktion in Leukämiezellen.....	105
VI.1.4	Selektive p53-vermittelte NOXA Expression führt zur Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen...	108
VI.1.5	Die gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen das große Potential von Betulinsäure im Hinblick auf die Polychemotherapie.....	109
<b>VI.2</b>	<b>Ausblick auf weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen...</b>	<b>112</b>
<b>VII</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturnachweis.....</b>	<b>116</b>
<b>IX</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>
<b>X</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>132</b>

## I.2 Abkürzungen

A	Ampère, Einheit der elektrischen Stromstärke, auch: Adenin	FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
Abb.	Abbildung	FCS	Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Ak	Antikörper	FITC	Fluorescein/isothiocyanat
Ala	Alanin	FSC/SSC	forwardscatter/sidescatter
ALL	akute lymphoblastische Leukämie	G	Guanin
Arg	Arginin	g	Erdbeschleunigung [9,81 m/s <sup>2</sup> ], auch: Gramm
AS	Aminosäure(n)	Gln	Glutamin
Asp	Asparaginase; auch: Asparaginsäure	Gly	Glycin
ATP	Adenosin triphosphat	h	Stunde
BA	betulinic acid, Betulinsäure	His	Histidin
BH3-D	BH3-Domäne Proteine ('BH3 only')	HRP	(horse radish peroxidase)
bp	Basenpaare	i.A.	im Allgemeinen
BSA	bovines Serumalbumin	IgG	Immunglobulin G
bzw.	beziehungsweise	k	kilo (x10 <sup>3</sup> )
C	Cytosin	KCl	Kaliumchlorid
°C	Grad Celsius	l	Liter
C-Atom	Kohlenstoffatom	LB	lysogeny broth
ca.	circa	Lys	Lysin
CFU	colony forming units	m	Meter, auch: milli (x10 <sup>-3</sup> )
CMV	cytomegalovirus	M	molar [1 M = 1 mol/l]
d	Tag	max.	maximal
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes [1 Da = 1 g/mol]	μ	mikro (x10 <sup>-6</sup> )
d.h.	das heißt	MCS	multiple cloning site
DMEM	Dubeco's minimum essential medium	MEF	murine embryonale Fibroblast
DMSO	Dimethylsulfoxid	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
DNA	desoxyribonuclein acid	min	Minute
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate	mind.	mindestens
ECL	enhanced chemoluminescence	mol	Einheit der Stoffmenge [1 mol ≈ 6 x 10 <sup>23</sup> Moleküle]
<i>E. coli</i>	gram-negatives Bakterium ( <i>Escherichia coli</i> )	mRNA	messenger ribonuclein acid
EDTA	Ethylen diamintetraacetat	n	nano (x10 <sup>-9</sup> )
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat	NaCl	Natriumchlorid
engl.	englisch	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )	NOD/SCID	non obese diabetic / severe combined immunodeficiency
f.	für	nt	Nukleotide
Fa.	Firma	N-terminal	aminoterminal
Fab	leichte und N-terminale Hälfte der schweren Kette eines Antikörpers	o.	oben



PAGE	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
Pro	<i>Prolin</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
RNAi	<i>RNA Interferenz</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI-1640	Zellkulturmedium, entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s.	<i>siehe</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	<i>Serin</i>
shRNA	<i>small hairpin ribonuclein acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonuclein acid</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
sog.	<i>so genannte(r/s)</i>
T	<i>Thymin</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA-Puffer</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylen-diamin</i>
Thr	<i>Threonin</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRAIL	<i>Todesligand (TNF-related apoptosis inducing ligand)</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
Tween20	<i>Polyoxyethylen-(20)- Sorbitanmonolaurat</i>
U	<i>unit [1 U = 1 µmol/min], auch: <i>Uracil</i></i>
u.	<i>unten</i>
usw.	<i>und so weiter</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
v.a.	<i>vor allem</i>
V	<i>Volt, Einheit der elektrischen Spannung</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

Weitere Abkürzungen sind in den einzelnen Kapiteln erläutert.

## II Einleitung

### II.1 Molekulare Mechanismen der intrinsischen Apoptose

Kein Forschungsgebiet der Biologie wurde in den letzten 150 Jahren wohl so oft beschrieben, vergessen und wieder entdeckt wie das Phänomen des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Cotter, 2009). Das Wort Apoptose entstammt dabei den griechischen Worten απο (,apo' = weg, ab) und πτωσις (,ptosis' = fallen) als Synonym für das Fallen der Blätter im Herbst. Nur drei Jahre nach Entdeckung der Zelle als Grundeinheit des Lebens durch Schleiden und Schwann beschrieb Carl Voigt erstmals 1842 ‚natürlichen Zelltod‘ während der Embryonalentwicklung von Geburtshelferkröten. Apoptose gehört damit zu den ältesten dokumentierten Zellvorgängen. Erst über 100 Jahre später wurde durch eine das Phänomen als Apoptose charakterisierende Publikation von Kerr et al. (1972) und die Entdeckung von Endonuclease-assoziiierter Apoptoseinduktion nach Glucocorticoidbehandlung von Thymozyten (Wyllie, 1980) breiteres wissenschaftliches Interesse geweckt und damit Apoptose als bedeutendes zellbiologisches Prinzip anerkannt.

Apoptose gilt heute als primärer programmierter Zelltod, durch den zelluläre Organismen beschädigte, genetisch fehlerhafte oder überflüssige Zellen schnell und ohne Entzündungsreaktionen entsorgen. In der Folgezeit konnte die enge Verknüpfung von Apoptoseregulation und Krebsentstehung - eine bereits 1972 von Kerr et al. beschriebene Idee - belegt werden. Dabei zeigt sich eine direkte Abhängigkeit von fehlerhafter Apoptoseregulation und Tumorwachstum, -progression sowie Therapieresistenz (Kerr et al., 1994). 2002 erhielt Bob Horvitz für seine Pionierarbeit in der Entdeckung grundlegender Aspekte des Apoptosesignalweges im eukaryotischen Modellsystem *Caenorhabditis elegans* den Nobelpreis. Bis heute gibt es kaum Gebiete der modernen Biologie, deren Publikationen nicht Mechanismen der Apoptoseinduktion aufgreifen bzw. näher beleuchten.

#### II.1.1 Apoptose als Zelltodsignalweg mit Initiations- und Effektorphase

Als gemeinsame biochemische und morphologische Charakteristika eukaryotischer Apoptose gelten Zellkondensation (,cell shrinkage') und nukleäre DNA-Fragmentation (,DNA laddering'), was im Abschnüren von kleineren Zellkörpern (,blebbing of apoptotic bodies') mündet. Diese Ereignisse werden bewirkt durch eine kaskaden-

artige Aktivierung von Cysteinyl-aspartat-spaltenden Proteinasen, sog. Caspasen, welche sukzessive weitere Caspasen und DNAsen aktivieren und eine Reihe anderer zellulärer Proteine durch Spaltung inaktivieren. Diese späte Phase der Apoptosesignaltransduktion wird als Effektorphase bezeichnet.

Zeitlich der Caspasenaktivierung vorangestellt ist die Induktionsphase der Apoptose, welche nach Art der Stimulation in zwei Hauptwege unterteilt werden kann: Zellulärer Stress und andere intrazelluläre Stimuli aktivieren den sog. intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Signalweg, der im nachfolgenden Kapitel II.1.2 detailliert beschrieben wird. Extrazelluläre Liganden aktivieren dagegen den extrinsischen rezeptorvermittelten Signalweg: Unter diesen membranständigen Rezeptoren finden sich Vertreter der TNF-Superfamilie („*tumor necrosis factor*“) wie TNF-Rezeptoren, TRAIL-Rezeptoren und der Fas-Rezeptor. Diese trimerisieren nach Ligandenbindung von TNF, TRAIL bzw. Fas und werden damit aktiviert (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989; Wiley et al., 1995).

Rezeptor-Ligand-Komplexe, im Fall der extrinsischen Apoptose DISC („*death-inducing signaling complex*“) genannt, rekrutieren weitere pro-apoptotische Signalproteine an ihre intrazelluläre Signaldomäne: Über FADD und dessen „*death domain*“ (DD) können im Fall von TRAIL-Stimulation die inaktiven Pro-Caspasen-8 oder -10 binden (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997). Diese werden autokatalytisch paarweise durch Approximation aktiviert, ins Zytosol entlassen und spalten zunächst Pro-Caspase-3, dann -6 und -7, was die oben beschriebene Exekutionsphase initiiert. Daneben ist aktive Caspase-8 in der Lage BID, als BH3-D Protein ein pro-apoptotischer Aktivator von Mitochondrien, in aktives tBID („*truncated BID*“) zu spalten. Zelltypabhängig wird so durch eine direkte Verknüpfung zum intrinsischen Apoptosesignalweg die Caspasenaktivierung noch verstärkt (Scaffidi et al., 1997; Luo et al., 1998).

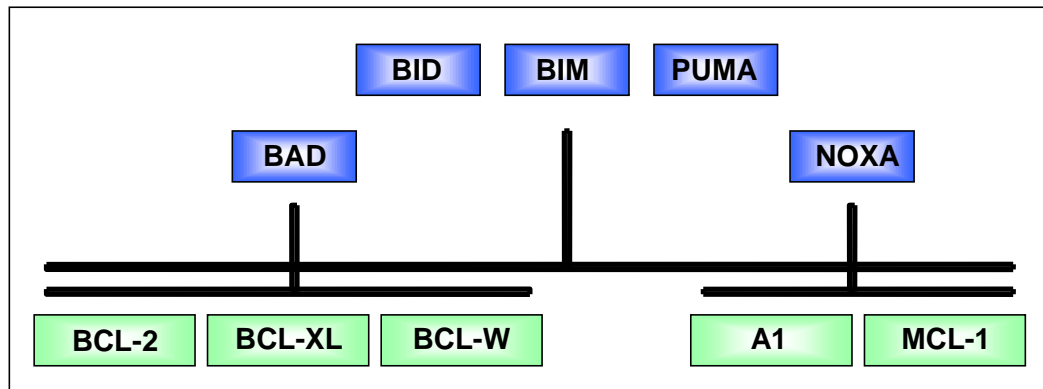
Auf Ebene der Caspasenaktivierung dienen anti-apoptotische IAP-Familienmitglieder („*Inhibitor of Apoptosis*“: XIAP, cIAP-1, cIAP-2 und Survivin) in ruhenden Zellen der Pufferung von unkontrollierter Caspasenaktivierung durch Inhibierung der katalytischen Domäne der Effektorcaspasen-3, -6, -7 und -9 (Rothe et al., 1995; Liston et al., 1996). Nach Apoptoseinduktion werden sie auto-ubiquitinyliert und degradiert (Yang und Li, 2000).

## II.1.2 Mechanismen der intrinsische Aktivierung von Mitochondrien

Mitochondrien haben als zelluläre Kraftwerke zur Energiegewinnung, als Torwächter von Signalwegen und als sog. ‚Gärten des Zelltodes‘ einzigartige duale Funktion hinsichtlich Leben und Sterben einer Zelle (Kim et al., 2005). Zytotoxische Agenzien, UV-Licht und  $\gamma$ -Bestrahlung sowie Viren, Wachstumsfaktorentzug und Adhäsionsverlust können zur Aktivierung von intrinsischer Apoptose führen. Die ruhende Zelle hält perfekte Balance in Expression und Aktivität von anti- und pro-apoptotischen Proteinen, wobei am Mitochondrium primär die heterogene BCL-2 Proteinfamilie diese Aufgabe übernimmt.

Stimulus- sowie zelltypabhängig können zunächst BH3-Domäne Proteine (wie BAD, BID, BIM, NOXA und PUMA) als initiale Sensoren post-translational aktiviert oder durch bestimmte Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert werden. Als pro-apoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie tragen sie genau eine BCL-2-Homologie-Domäne der Region 3 (‚BH3-D‘), welche für eine amphipathische  $\alpha$ -Helix kodiert. Als Beispiel aktiviert ein Entzug von Wachstumsfaktoren intrazellulär den Transkriptionsfaktor FOXO3A, welcher direkt die verstärkte Transkription des BH3-D Proteins BIM vermittelt (Liu et al., 2005). BIM kann daneben durch Freisetzung vom zellskelett-bildenden Dyneinmotorkomplex oder durch ERK Phosphorylierung post-translational aktiviert werden (Puthalakath et al., 1999; Ley et al., 2005).

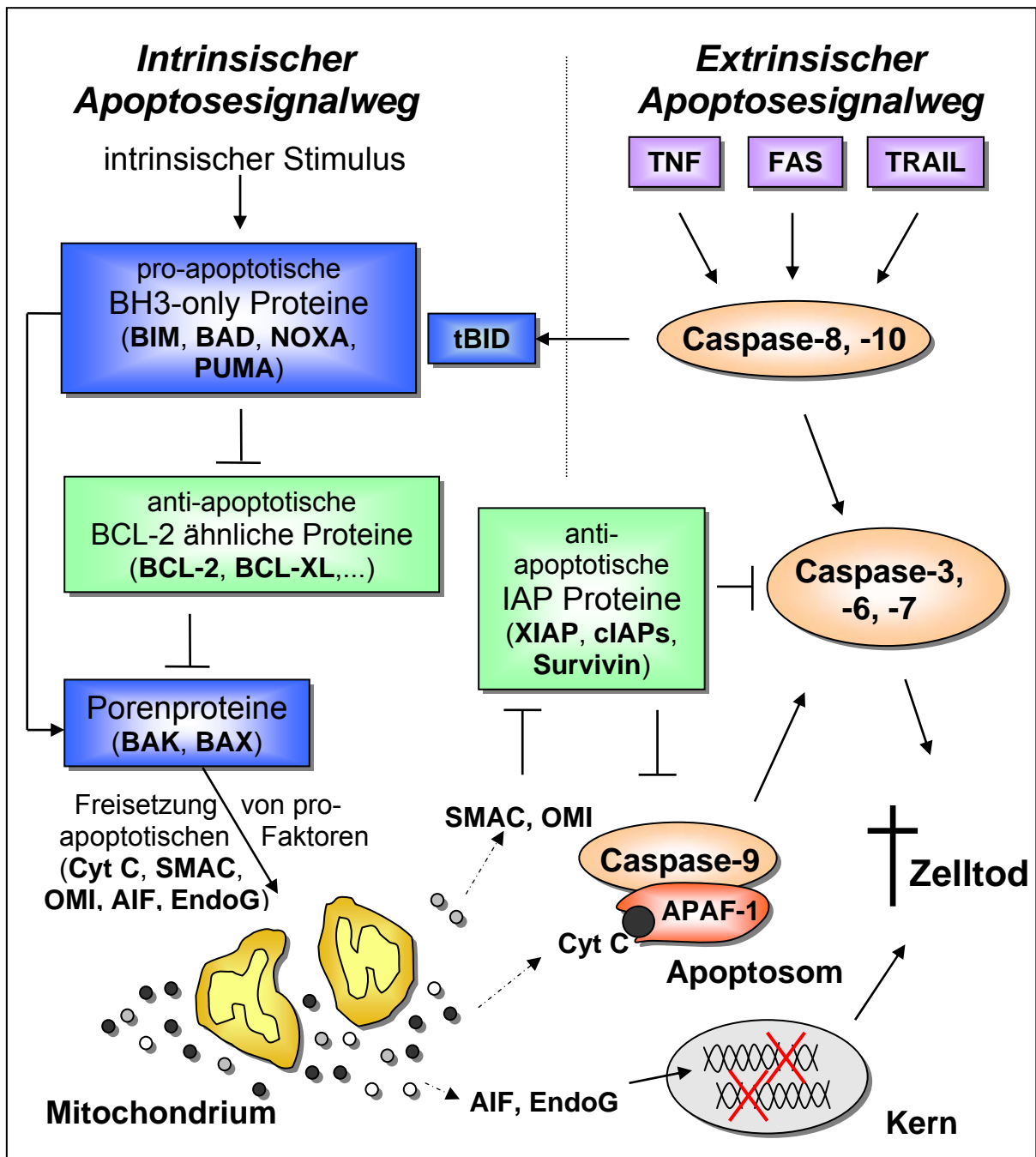
Aktiviert bzw. verstärkt exprimierte BH3-D Proteine können mit klassischen anti-apoptotischen Multidomän-BCL-2 Proteinen (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 und MCL-1) durch deren BH3-bindende Tasche interagieren (s. Abb. 1). Dabei zeigen 3 dominante BH3-D Proteine (BIM, BID und PUMA) hohe Bindungsaffinität zu allen anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen, BAD nur Bindungsvermögen zu BCL-2, BCL-XL, BCL-W und NOXA nur zu A1 und MCL-1, wodurch ihnen situationsspezifische Eigenschaften zugesprochen werden (Chen et al., 2005; Willis et al., 2007). Im zellfreien System wurde gezeigt, dass bis zu 3 dieser BH3-D Proteine (BIM, BID und eventuell PUMA), sog. Aktivatoren, direkt mit einer dritten Klasse von BCL-2 Familienmitgliedern, den pro-apoptotischen Porenproteinen BAK und BAX (bzw. BOK in reproduktivem Gewebe), interagieren können (Letai et al., 2002).



**Abb. 1: BH3-D Proteine (blau) binden selektiv an BCL-2 ähnliche Proteine (grün).** BID, BIM und PUMA interagieren mit allen BCL-2 ähnlichen Proteinen, BAD nur mit BCL-2, BCL-XL und BCL-W, NOXA nur mit A1 und MCL-1.

BAK und BAX inkorporieren daraufhin unter Konformationsänderung in die äußere Membran der Mitochondrien und bilden homogene Multiproteinporen für Proteine mit maximaler Größe von 70 kDa (Kandasamy et al., 2003). Dabei sind BAK und BAX jeweils unabhängig voneinander in der Lage, diese elementare pro-apoptotische Funktion in Zellen auszuführen (Wei et al., 2001). Im Ruhezustand sind diese Porenproteine frei im Zytosol (BAX, BOK) oder an anti-apoptotische BCL-2 Mitglieder (BAK) gebunden. Durch diese porenbildenden Vorgänge wird die äußere Mitochondrienmembran permeabel, was stimulusabhängig das Öffnen weiterer Poren, u.a. der ‚permeability transition pores‘ (PTP), und das Anschwellen der mitochondrialen Matrix induzieren kann (Newmeyer und Ferguson-Miller, 2003).

Dieser Prozess, beschrieben als MOMP (‚mitochondrial outer membrane permeabilization‘), wird begleitet vom Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) und resultiert in der Freisetzung mehrerer pro-apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol (s. Abb. 2): Cytochrom-C, Bestandteil der Atmungskette, wird in großen Mengen freigesetzt, was als irreversibler Schritt des intrinsischen Apoptosesignalweges gilt (‚point of no return‘). Cytochrom-C bindet an APAF-1 zu einem heptameren Komplex, welcher Pro-Caspase-9 binden und aktivieren kann (bezeichnet als ‚Apoptosom‘). Aktivierte Caspase-9 ist im Stande, die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 zu aktivieren (Liu et al., 1996). Neben Cytochrom-C werden stimulusabhängig die Proteine SMAC und OMI ins Zytosol freigesetzt, welche Inhibitoren der IAP-Proteinfamilie sind und deren negative Caspasenregulation aufheben (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001).



**Abb. 2: Schema der intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignaltransduktion.** Extrazelluläre Todesliganden (rechts) initiieren Aktivierung von Caspase-8 oder -10, welche weitere Caspasen (-3, -6 und -7) und zelltypabhängig Spaltung des BH3-D Proteins BID als Verknüpfung zur intrinsischen Signalkaskade aktivieren können. Intrazelluläre Stimuli (links) führen zur Aktivierung von BH3-D Proteinen (BIM, BID, BAD, NOXA und PUMA), welche anti-apoptotische BCL-2 ähnliche Proteine inhibieren oder die Porenproteine BAK und BAX aktivieren. Dies führt zur mitochondrialen Freisetzung verschiedener Faktoren (Cytochrom-C, SMAC, OMI, AIF und EndoG), welche direkt durch Cyt-C/APAF-1-Komplexbildung Caspase-9 aktivieren bzw. Caspase-blockierende IAP-Proteine inhibieren (SMAC und OMI). Dies ermöglicht Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. AIF und EndoG führen Caspasen-unabhängig im Zellkern zur DNA Fragmentation. Alle beschriebenen Prozesse enden final im Zelltod.

AIF und Endonuclease G sind weitere freisetzbare Faktoren, welche ihre Exekutionsfunktion Caspasen-unabhängig im Zellkern ausführen (Susin et al., 1999; Li et al., 2001). Sie bewirken Kondensation von Chromatin und anschließend Fragmentierung von DNA. Parallel zur Freisetzung dieser Faktoren zerfallen Mitochondrien BAK/BAX-abhängig in zahlreiche kleinere Einheiten (Martinou und Youle, 2006). Eine derartige mitochondriale Signaltransduktion bedingt eine schnellere Exekutionsphase der Apoptose, da zeitgleich eine große Anzahl von Caspasen durch IAP-Hemmung aktiviert werden kann oder Caspasen-unabhängig Endonuclease G und AIF apoptotische Ereignisse induzieren (Ekert und Vaux, 2005).

Zusammengefasst sind BCL-2 Familienmitglieder maßgeblich an Aktivierung, Regulation und Prozessierung des intrinsischen Apoptosesignalweges beteiligt.

### II.1.3 Pro-apoptotische Rolle der BH3-D Proteine PUMA und NOXA

In der Reihe der BCL-2 Mitglieder gehören zu den wichtigsten pro-apoptotischen BH3-D Proteinen NOXA und PUMA, deren Rolle erst in den vergangenen Jahren eingehender untersucht wurde. PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) wurde unabhängig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt und in diesem Zug als potentes Apoptose-induzierendes Protein auf einer Reihe maligner Zellen charakterisiert (Yu et al., 2001; Nakano et al., 2001; Han et al., 2001). Nach Translation wird das Protein zum Mitochondrium rekrutiert. Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob PUMA dort entweder wie BID und BIM die Porenproteine BAK und BAX aktiviert (Kuwana et al., 2005) oder durch Bindung anti-apoptotischer BCL-2 Proteine die Zelle für Apoptose sensitiviert (Yee und Vousden, 2007).

Als PUMA-induzierende Stimuli gelten DNA-schädigende Agenzien und ionisierende  $\gamma$ -Bestrahlung, was durch Experimente mit Puma<sup>-/-</sup> MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) belegt wurde (Villunger et al., 2003; Michalak et al., 2008). Unabhängig davon kann es durch Glucocorticoidbehandlung, Serumentzug und Hypoxie zur Aktivierung von PUMA kommen, wobei übergeordnete Signalwege noch nicht bekannt sind (Yu et al., 2001; Nakano et al., 2001; Han et al., 2001). PUMA selbst ist für eine normale embryonale Entwicklung nicht von Bedeutung, jedoch ist ein Verlust des PUMA-Genlokus mit verschiedenartigen humanen Krebserkrankungen assoziiert und intakte PUMA-Expression in Melanomgewebe korreliert mit Therapieerfolg (Karst et al., 2005; Karst et Li, 2007).

NOXA (*lat.* ‚Schaden‘, PMAIP1) ist als weiteres BH3-D Protein beschrieben. Es konnte im Hauptunterschied zu PUMA bis dato keine Korrelation zwischen Tumorgenese und Verlust oder Mutation von NOXA gezeigt werden, was ein großer Vorteil hinsichtlich NOXA zielgerichteter Therapie ist (Lee et al., 2003). NOXA wird wie PUMA nach DNA-Schädigung (speziell UV-Strahlung; Naik et al., 2007) verstärkt exprimiert und wirkt direkt am Mitochondrium, allerdings wie bis dato bekannt nur unter antagonistischer Bindung von anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen. Dies ebnet BH3-D Aktivatoren (BID, BIM und eventuell PUMA) und BAK/BAX den Weg zur Mitochondrienaktivierung (Oda et al., 2000).

NOXA<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keinen veränderten Phänotyp, selbst aus ihnen gewonnene MEFs sind insensitiv gegenüber DNA-schädigender Behandlung, allerdings sterben Thymozyten dieser Mäuse nach intrinsischen DNA-schädigenden Stimuli (Villunger et al., 2003). Adenovirale Überexpression von NOXA in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien führte zur Induktion von Apoptose, was auch für PUMA Überexpression gilt, jedoch sind nicht-kanzerogene Brustepithelzellen durch NOXA Expression nicht beeinflusst, während Überexpression von PUMA Zelltod in allen Zellen induziert (Suzuki et al., 2009). Erklärt werden kann dies durch das selektive Bindungsmodell von Chen et al. (2005), das postuliert, dass PUMA an alle anti-apoptotischen BCL-2 Proteine binden und als Aktivator von BAK/BAX dienen kann, während NOXA nur MCL-1 und A1 bindet, womit normales Gewebe geschützt sein könnte (s. Abb. 1).

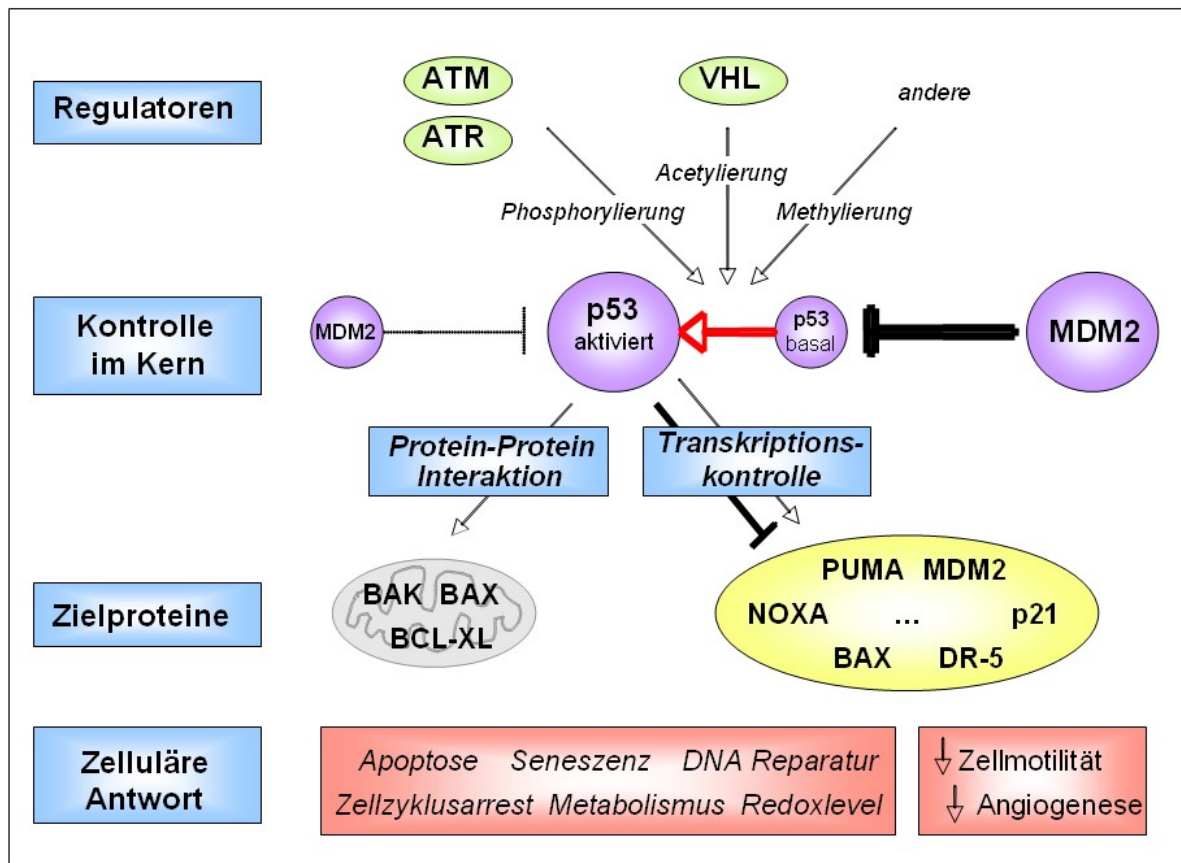
#### II.1.4 Pro-apoptotische Rolle des Tumorsuppressors p53

Als erster dokumentierter Tumorsuppressor spielt der Transkriptionsfaktor p53 eine zentrale Rolle und trägt daher den Beinamen ‚Wächter des Genoms‘ (Baker et al., 1989; Levine, 1997). Dabei bindet post-translational modifiziertes p53 an sog. ‚responsive elements‘ bestimmter Gene, um deren Transkription zu verstärken bzw. zu hemmen. Zu diesen p53-abhängigen Zielgenen gehören wichtige Proteine der Zellzykluskontrolle (z.B. p21, 14-3-3 $\sigma$ ), der Apoptose (z.B. APAF-1, BAX, DR5, NOXA, PUMA, Survivin) und u.a. der Aufrechterhaltung genetischer Integrität (el-Deiry et al., 1994; Oda et al., 2000; Nakano und Vousden, 2001; Whibley et al., 2009).

Aktivitätsverlust- oder gewinn durch Chromosomenaberration bzw. Mutation des p53 Genlokus *TP53* (17p13.1) ist eine der häufigsten genetischen Merkmale von



Tumorzellen überhaupt (Vogelstein et al., 2000). Tumorzellen werden so in die Lage versetzt, einem elementaren Beschädigungs- und Wachstumskontrollmechanismus zu entgehen, was eine Tumorzelle als solche neben Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren, Angiogenese und Metastasierung kennzeichnet (Hanahan und Weinberg, 2000). Daher ist Expression und Aktivität von p53 in normalen Zellen streng reguliert: das Protein besitzt eine kurze Halbwertszeit und liegt nur in sehr geringen Konzentrationen vor allem im Zellkern vor. Dies wird maßgeblich erreicht durch MDM-2, eine E3-Ubiquitin Ligase, welche p53 in normalen Zellen fortwährend durch nukleären Export zu proteasomaler Degradation in Zaum hält. MDM-2-Expression kann selbst durch p53 reguliert werden, was eine Regeneration nach p53-induzierter DNA-Reparatur ermöglicht (Oliner et al., 1993; Haupt et al., 1997, s. Abb. 3).



**Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des p53 Signalweges.** Übergeordneten Regulatoren (v.a. ATM/ATR und VHL) können post-translationale Modifikation von p53 induzieren, was MDM-2-Kontrolle im Kern aufhebt. Zielproteine von p53 sind entweder direkte Protein-Protein-Interaktionspartner (links) oder Zielgene zur Transkriptionskontrolle (rechts) und induzieren unterschiedliche zelluläre Antworten (unten).

Für die stressbedingte Aktivierung von p53 sind verschiedene Mechanismen beschrieben. Dabei können die Proteine HIF1 $\alpha$  und VHL beteiligt sein: Unter Normalbedingungen inhibiert VHL durch Bindung HIF1 $\alpha$ , bei zunehmend hypoxischen Bedingungen wird diese Interaktion gelöst und HIF1 $\alpha$  kann p53 durch Bindung stabilisieren. Auch ungebundenes VHL kann p53 durch Phosphorylierung und Acetylierung aktivieren (Roe et al., 2006). Zusätzlich kann HIF1 $\alpha$  als Transkriptionsfaktor des pro-apoptotischen BH3-D Proteins NOXA die Apoptoseinduktion verstärken (Kim et al., 2004). Als weitere Aktivatoren von p53 in Folge von DNA Strangbrüchen können die Kinasen ATR und ATM p53 und MDM-2 phosphorylieren und blockieren so deren Interaktion. Zusätzlich können ATR und ATM p53 spezifisch acetylieren und Transkription von stimulusabhängigen Zielgenen induzieren (Chehab et al., 1999; Tang et al., 2008). Neben der Rolle als Transkriptionsfaktor wird eine direkte pro-apoptotische Wirkung von p53 über direkte Interaktion mit BAK, BAX oder BCL-XL diskutiert (Marchenko et al., 2000; Mihara et al., 2003).

#### II.1.5 Intrinsische Apoptoseinduktion durch etablierte Zytostatika

Etablierte Chemotherapeutika in der heutigen Krebstherapie wurden seit den 1950er Jahren in Hochdurchsatz-Screenings mit natürlichen und synthetisierten Chemikalien entdeckt und durch Derivatisierung in ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit weiter optimiert. Parallel dazu wird bis heute versucht, die Mechanismen ihrer Effektivität in Krebszellen möglichst genau zu verstehen. Nach den bisherigen Erkenntnissen erfolgt die Kategorisierung der Wirkstoffe in DNA-interkalierende Agenzien (z.B. Cyclophosphamid, Platin-Wirkstoffe, Anthrazykline wie Doxorubicin und Daunorubicin), anti-metabolische Agenzien (z.B. Purin/Pyrimidin-Analoga wie 5-Fluorouracil, 6-Thioguanin und Zytarabin, Methotrexat, Asparaginase), Hormone (z.B. Tamoxifen als Anti-Östrogen und Glucocorticoide), pflanzliche Agenzien (z.B. Vinkalkaloide wie Vincristin, Etoposid, Paclitaxel, Topotecan und Irinotecan) und immuntherapeutische Agenzien (z.B. Zytokine, monoklonale Antikörper).

Dabei ist das Wissen über deren zytostatische bzw. zytotoxische Angriffspunkte in der Zelle und über den Mechanismus der intrinsischen Induktion pro-apoptotischer Signalproteine nur sehr unvollständig vorhanden: Stabilisierung von p53 (s. Kapitel II.1.4) scheint das wichtigste Bindeglied von DNA-Schädigung durch interkalierende Agenzien und Topoisomerase-Hemmer, was Insensitivität von p53-mutierten Tumorzellen von Ovarkarzinompatientinnen gegenüber Cisplatin zeigte (Shelling, 1997).

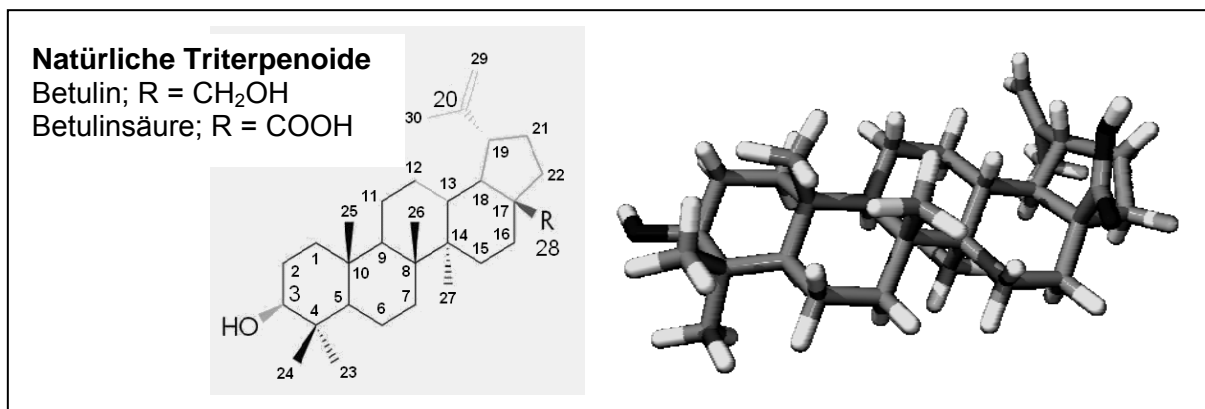
Durch DNA-Strangbrüche wurde ATR- und ATM-Kinaseaktivität induziert, was u.a. p53-abhängige Transkription von NOXA ermöglicht (Kutuk et al., 2009). Acht von neun Mammakarzinompatientinnen zeigten nach Doxorubicin-basierender Behandlung dagegen p53-abhängige, verstärkte PUMA-Expression im apoptotischen Tumorgewebe, was auf ein wirkstoffspezifisches BH3-D-Proteinaktivierungsprofil hindeutet (Middelburg et al., 2005).

Paclitaxel und Vincristin können ebenfalls p53 in Tumorzellen stabilisieren, indem sie die Dynamik von Mikrotubuli inhibieren und so den Transport von p53 zum proteasomalen Abbau stoppen (Giannakakou et al., 2002). P53 kann dann Transkription von MCL-1 und IAP-Proteinen hemmen, sowie Transkription von BAX induzieren (Blagosklonny, 2007) und BIM Aktivierung durch Freisetzung von Mikrotubuli bewirken (Li et al., 2005). Darüber hinaus ist Inhibierung von BCL-2 und BCL-XL durch Phosphorylierung (durch p38-MAP-/JNK-Kinasen) nach Paclitaxel- oder Vincristin Behandlung in malignen Zellen dokumentiert (Poruchynsky et al., 1998).

Asparaginase als ein weiteres Chemotherapeutikum zeigt einzigartige tumorspezifische Toxizität, indem durch Hydrolyse von Asparagin dessen Serumverfügbarkeit sinkt und somit die Proteinsynthese von Leukämiezellen (mit niedrigem Proteinlevel an Asparagin-Synthetase) inhibiert wird. Daraus resultieren Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion, wobei unklar ist, welche pro-apoptischen Proteine beteiligt sind (Ueno et al., 1997).

## II.2 Betulinsäure als zytotoxisches Agenz

Die pentazyklische Betulinsäure (BA) ist ein Naturprodukt, welches als sekundäres Stoffwechselprodukt in der Rinde vieler höherer Pflanzen wie Platanengewächsen, Ebenholzgewächsen und Birkengewächsen angereichert wird (Alakurtti et al., 2006). Namen stiftend war dabei die weiße Birke (*betula nana*), aus deren Rinde bereits im Jahr 1788 die erste Extrahierung und Identifizierung eines Naturheilstoffes, des Vorläuferproduktes Betulin (3 $\beta$ -lup-20(29)-en-3,28-diol), durch Sublimation gelang (Lowitz, 1788). Von 100g getrockneter weißer Birkenrinde erhält man ca. 15g Betulin und ca. 0,9g Betulinsäure, welches als Triterpencarbonsäure in Pflanzenzellen durch spezifische Oxidation am C-28 Atom des Betulin entsteht (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Pentazyklische Strukturformel von Betulin** (Anhang am C-Atom 28 = CH<sub>2</sub>OH) **bzw. Betulinsäure** (Anhang am C-Atom 28 = COOH) (links) und dessen dreidimensionale Gitterformel mit einem Molekulargewicht von 456,7 g/mol (rechts).

In der Pflanze dient Betulinsäure als niedermolekulares Terpenoid der Hemmung von Vermehrung und Ausbreitung parasitärer Mikroorganismen, wozu BA unmittelbar nach einer solchen Infektion verstärkt produziert wird. Bioaktive Substanzen wie BA kommen in einer großen Bandbreite als Naturheilmittel seit Jahrtausenden zur vielfältigen therapeutischen Anwendung, primär in der traditionellen asiatischen und Naturvölker-Medizin (Yasukawa et al., 1991 und Pisha et al., 1995). Ihr ubiquitäres Vorkommen, ihre kostengünstige Gewinnung direkt aus der Platanenrinde (entwickelt von der Fa. Biosolutions Halle GmbH (Dräger et al., 1998), Patent übernommen von der Fa. Boehringer Ingelheim GmbH) und die nebenwirkungsarme Anwendung sind Argumente, die Erforschung und damit den Einsatz von BA weiter voranbringen.

### II.2.1 Bekanntes Wirkspektrum von Betulinsäure

In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnten vielfältige Wirkungen von BA beobachtet werden: Anti-virale Wirkung wurde sowohl im Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus (Akihisa et al., 2002) als auch mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) nachgewiesen. Ein optimiertes BA-Derivat (3-O-3',3'-dimethylsuccinyl-betulinsäure, ‚*bevirimat*‘) ist Ausgangssubstanz für HIV-Therapeutika, die sich in klinischer Testung der Phase II befinden (Kashiwada et al., 2004 und Smith et al., 2007).

Außerdem waren BA und Derivate wirksam gegen Dermatophyten (Hautfadenpilze) und Plasmodien, die einzelligen parasitären Auslöser von Malaria (de Sá et al., 2009). Diese Eigenschaften von BA weisen auf den ursprünglichen Nutzen des Stoffes gegen Pilz- und Plasmodienbefall in der produzierenden Pflanze hin. Der

Wirkmechanismus ist dabei noch wenig untersucht, was auch für einen nachgewiesenen BA-induzierten Schutz von HepG2-Zellen, einer Leberkarzinomzelllinie, vor Lebergiften wie Cadmiumsalzen gilt (Szuster-Ciesielska und Kandeferszerszeń, 2005).

Daneben konnte im Zusammenhang mit Inflammation gezeigt werden, dass BA und Derivative nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen einerseits anti-inflammatorisch Makrophagen *in vitro* und *in vivo* aktivierten (Reyes et al., 2006), andererseits auch pro-inflammatorische Zytokinausschüttung (IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ ) bewirken konnten. Daher bezeichneten Yun et al. (2003) die ambivalente Rolle von BA in diesem Zusammenhang als ‚inflammationsmodulierend‘.

Um Wasserlöslichkeit und Wirkpotential zu erhöhen, wurde die pentazyklische Struktur der Terpenoide durch Anhängen aktiver Gruppen chemisch modifiziert. Wurde das C-20 Atom der Doppelbindung durch ein Stickstoffatom ersetzt, resultierte dies in höherer Plasma- und Gewebestabilität (Liby et al., 2007). Da die bioaktive Kapazität des BA-Moleküls maßgeblich an die Carboxylgruppe des C-28 Atoms gekoppelt ist, erfolgt Derivatisierung v.a. an dieser Position.

Die bedeutendste Wirkung zeigte BA als anti-tumorales, zytotoxisches Agens, was primär durch Induktion des intrinsischen Apoptosesignalweges erzielt wird. Dabei nahm BA selbst eine Sonderrolle unter den intrinsischen Apoptosestimuli ein, da sie in der Lage war, isolierte Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom-C zu stimulieren (Fulda et al. 1998, Ehrhardt et al., 2004). Dies konnte mittels Aktivierung von BAK/BAX-Poren oder mittels zelltypspezifischer Aktivierung von PT-Poren vermittelt werden, ein Vorgang der durch Vorbehandlung mit Anti-oxidantien oder Bongkreischer Säure verhindert wurde (Mullauer et al., 2009). Neben Cytochrom-C wurden AIF und SMAC als pro-apoptische Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums über beschriebene Kanäle ins Zytosol entlassen (Fulda et al., 1998; Ehrhardt et al., 2004). Auf Level des Mitochondriums pufferten anti-apoptische BCL-2-Familienmitglieder wie BCL-2 und BCL-XL pro-apoptische Signale, denn deren Überexpression verhinderten BA-induzierte Apoptose vollständig. Als weitere BA-Wirkung auf BCL-2 Mitglieder ist Hochregulation von BAX, nicht BAK und BAD, in Neuroblastom-, Glioblastom- und Melanomzellen dokumentiert, was die Freisetzung mitochondrialer Faktoren begünstigte (Fulda et al., 1997; Wick et al., 1999; Selzer et al., 2000). Zellen, in denen das mitochondriale Außenmembranpotential nach Einwirkung durch BA kurzgeschlossen wurde, zeigten sukzessive

Aktivierung von Caspase-9 und -3. Diese Caspasenaktivierung war notwendige Voraussetzung für Zelltodinduktion durch BA, da Zellen, die mit dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD vorbehandelt wurden, komplette Resistenz zeigten. Final zeigten stimulierte Zellen typische spät-apoptotische Merkmale wie PARP-Spaltung, DNA-Fragmentation und ‚blebbing‘ (Ehrhardt et al., 2004).

Neben intrinsischer Apoptoseinduktion konnten Effekte von BA in anderen anti-tumoralen Signalwegen gezeigt werden: Aminopeptidase N, ein Regulator der Angiogenese, wurde durch BA-induzierten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in bovinen Endothelzellen inhibiert (Kwon et al., 2002). Daneben konnte BA das DNA-Bindevermögen der Topoisomerase I hemmen, welches für Entwindung der DNA-Doppelhelix während der DNA-Replikation sorgt (Chowdhury et al., 2002). Auf Ebene der Zellzyklusmodulation sind kontroverse, zelltypabhängige Effekte von BA beschrieben: Während die Expression des Zellzyklusregulators p21 in Melanomzellen BA-abhängig reduziert wurde (Rieber und Strasberg-Rieber, 1998), konnte in Glioblastomzellen verstärkte p21 Expression gezeigt werden (Wick et al., 1999). In Zukunft sind daher weitere Untersuchungen nötig, um zu verstehen, ob und wie Zellzyklusmodulation und anti-tumorale Wirkung von BA korrelieren.

### II.2.2 Einsatz von BA in Tumorzellen, Tiermodellen und klinischen Studien

Anfang der 1970er Jahre wurde erstmals über die anti-tumorale Eigenschaft von BA aus Pflanzenextrakten in einem *in vivo* Wirkstoffscreening berichtet, wobei Zellen eines humanen Sarkoms (Walker 256) intramuskulär in Ratten injiziert wurden und Überlebensrate der Versuchstiere sowie Tumorgöße als Versuchsparameter dienten. Dabei wurde über signifikant positive Effekte in Konzentrationen ab 300mg BA pro kg Körpergewicht berichtet (Sheth et al., 1972). Vergleichbare Anti-tumoraktivität konnte in Mäusen beobachtet werden, in die humane Leukämiezellen (P-388) intraperitoneal inokuliert wurden (Trumbull et al., 1976). Jedoch konnten Tests des ‚US National Cancer Institute‘ diese Ergebnisse nicht bestätigen (nach Pisha et al., 1995 nicht publiziert).

Neu in den Fokus rückte die anti-tumorale Forschung mit Betulinsäure durch die Arbeitsgruppe von Yasukawa et al. (1991), die den Wirkstoff als Reinsubstanz topisch auf chemisch induzierte Hautkarzinome aufbrachten. BA wurde hier als Inhibitor der Tumormorphogenese beschrieben. Die anti-kanzerogene Wirkung von Betulinsäure wurde dann in den Folgejahren intensiv auf einer großen Bandbreite

von Tumorzelllinien, auf primären Tumorzellen und in Mausmodellen von humanen Tumoren untersucht. Dabei konnte zunächst Zytotoxizität auf der Melanomzelllinie MEL-2 nachgewiesen werden (Pisha et al., 1995), dieser folgten Tumore neuroektodermalen (Neuro-, Glio-, Medulloblastom und Ewing Sarkom), anderen Ursprungs (Kolon-, Brust-, Hepatozellular-, Lungen-, Prostata-, Nierenzell-, Ovariar- und Zervixtumor) und hämatologische Erkrankungen (Schmidt et al., 1997; Fulda et al., 1997, 1999a, 1999b; Wick et al., 1999; Zuco et al., 2002; Thurnher et al., 2003; Ehrhardt et al., 2004). Darüber hinaus war Betulinsäure wirksam gegen primäre Tumorzellen aus Patientenproben von Neuro- und Glioblastomen (Fulda et al., 1999b). Außerdem konnte nach BA-Stimulation von 47 kindlichen Leukämieproben in 65% erhöhte Apoptoseinduktion festgestellt werden. Zusätzlich zeigte Betulinsäure höhere Wirkpotenz als neun von zehn etablierten Chemotherapeutika, und dies auch im Falle der Untersuchung von Rezidivproben (Ehrhardt et al., 2004).

Therapeutische Vorteile zeigten sich auch dadurch, dass BA Zelltod in Tumormodellen mit primärer und erworbener Therapeutika-Resistenz induzieren konnte. BA agierte damit unabhängig von deren Wirkmechanismen ohne Hinweis auf Kreuzresistenzen zu anderen Klassen von Zytostatika (Fulda et al., 1997). In einem Modell von metastasierenden und nicht-metastasierenden Melanomzellen zeigte BA vergleichsweise größere Wirksamkeit gegen aggressivere, metastasierende Melanomzellen, wodurch die Substanz neben Therapieresistenz auch Metastasierung *in vitro* eindämmen konnte (Rieber und Strasberg-Rieber, 1998).

Im Zuge dieser beschriebenen wertvollen Eigenschaften als Tumorthapeutikum der Zukunft stellt sich die Frage nach der Wirkung von BA auf normales nicht-malignes Gewebe. Untersuchungen auf nicht-transformierten Fibroblasten, Melanozyten, Neuronen und Lymphozyten zeigten sehr hohe BA-Resistenz, was erst ein therapeutisches Fenster öffnet (Fulda et al., 1999a, 1999b; Selzer et al., 2000; Zuco et al., 2002). Worauf die Sensitivität maligner Zellen gegenüber BA begründet ist, konnte - wie auch für viele etablierte Tumorthapeutika - noch nicht geklärt werden und bedarf weiterer Forschungsbemühungen.

Im Tiermodell konnten zunächst Pisha et al. 1995 verminderte Tumorlast von Melanomxenotransplantaten nach intraperitonealer BA-Injektion in Nacktmäusen nachweisen. Daneben zeigten Mäuse mit inokulierten humanen Ovariartumoren nach BA Gabe signifikant höhere Überlebenszeit (Zuco et al., 2002). Dabei traten trotz Applikation von BA in hohen Konzentrationen (10 $\mu$ g / g Körpergewicht) keine

systemische Toxizität oder Gewichtsverlust auf. In darauf folgenden Tiermodellstudien (Chintharlapalli et al., 2007) konnte durch wiederholte orale Gabe von BA die Größe von Xenotransplantaten der Prostatatumorzelllinie LNCaP auf Ausgangsniveau gehalten werden, während in mit Trägersubstanz behandelten Mäusen in wenigen Wochen das Volumen der implantierten Tumore verzehnfacht wurde. Pharmakokinetische Studien BA-behandelter Mäuse zeigten, dass der phytotherapeutische Wirkstoff gut ins Blut an Serumproteine absorbiert und im Organismus verteilt wird - bei maximaler Anreicherung im Tumorgewebe (Shin et al., 1999; Udeani et al., 1999).

Derzeit wird Betulinsäure an der Universität von Illinois (Chicago, USA) in einer klinischen Phase I/II Studie unter Patienten mit *dysplastischen melanozytären Nävi* („DMN“) zur topischen Anwendung als 20%ige Salbe getestet. Als DMN werden in der Histopathologie ‚wuchernde atypische Melanozyten mit unregelmäßigem Aussehen‘ beschrieben, welche als Vorläufer des malignen Melanoms gelten. In dieser Studie soll Effektivität und Unbedenklichkeit des Wirkstoffes auf mindestens 28 Erkrankten nachgewiesen werden.

### II.2.3 BA-Kombinationstherapie

Neben dem Einsatz als Einzelsubstanz ist im Zusammenhang mit klinischer Tumorthherapie eine die Gesamtwirkung steigernde Kombination von Betulinsäure mit etablierten Tumorthérapeutika moderner Behandlungsprotokolle erstrebenswert. Ziel ist dabei, sinnvolle Kombinationen aus heute verwendeten Zytostatika und BA zu finden, welche in niedrigen Dosierungen der Einzelsubstanzen additive oder synergistische Effekte induzieren, Resistenzentwicklung minimieren und das Nebenwirkungsprofil reduzieren.

Dabei konnten bereits in ersten Ansätzen auf adhären Ten Tumorzellen und in einem Mausmodell synergistische Effekte erzielt werden (s. Tab. 1): Dies gelang zunächst im Jahr 2000 in einer Kombination von ionisierender Strahlung und BA auf Melanomzellen, jedoch ohne Nachweis der verantwortlichen Signaltransduktion. Auf verschiedenen Tumorzelllinien neuroektodermalen Ursprungs konnte in Kombination mit einer Vielzahl etablierter Chemotherapeutika, darunter Doxorubicin und Etoposid, ein synergistischer Phänotyp beobachtet werden. In diesen Untersuchungen konnten eine gesteigerte Aktivierung von Caspasen, Spaltung des anti-apoptotischen



Caspase-Inhibitors XIAP und gesteigerte mitochondriale Freisetzung der proapoptischen Faktoren Cytochrom-C und SMAC postuliert werden.

**Tab. 1: Zusammenfassung der bisherigen Therapieansätze von BA mit verschiedenen Therapeutika auf soliden Tumorzellen** unter Angabe von kombiniertem Stimulus, Tumortyp, Charakteristika des synergistischen Apoptosesignalweges und Quellenverweis.

	<i>BA in Kombination mit</i>	<i>Tumortyp</i>	<i>Charakteristika der Signaltransduktion</i>	<i>publiziert von</i>
<i>in vitro</i>	$\gamma$ -Strahlung	Melanom	keine Angaben	Selzer et al., 2000
	TRAIL	Neuroblastom	gesteigerte Caspasenaktivierung, Spaltung von XIAP, Cytochrom-C-Freisetzung	Fulda et al., 2004
	Actinomyzin D, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid und Taxol	Tumore des Neuroektoderms	gesteigerte Caspasenaktivierung, Spaltung von XIAP, Cytochrom-C- und SMAC-Freisetzung	Fulda und Debatin, 2005
	Cisplatin	Plattenepithelkarzinom an Kopf und Hals	gesteigerte Caspasenaktivierung	Eder-Czembirek et al., 2005
	5-Fluorurazil, Irinotecan und Oxaliplatin	chemoresistentes Kolonkarzinom	keine Angaben	Jung et al., 2007
<i>in vivo</i>	Vincristin	Mausmodell des murinen Melanoms	Arretierung des Zellzyklus	Sawada et al., 2004

*In vivo* Versuche führten bisher nur Sawada et al. 2004 in einem Tumormodell der metastasierenden murinen Melanomzellen B16F10 in immundefizienten C57BL/6 Mäusen durch. Sie konnten zeigen, dass durch kombinierte intraperitoneale Gabe von Vincristin und Betulinsäure eine weit höhere Inhibition der Anzahl und Größe von Lungenmetastasen nach 17 Tagen im Vergleich zur Einzelgabe beider Wirkstoffe erreicht wurde. Parallel dazu konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Vincristin eine Arretierung des Melanomzellzyklus in der G2/M-Phase, wohingegen BA eine Arretierung in der G0/G1-Phase bewirkte.

Diese erhobenen Daten zur synergistischen Apoptoseinduktion von BA-Kombinationen stellen erst einen Anfang dar, das Phänomen zu quantifizieren und zu charakterisieren. Damit zu Grunde liegende Mechanismen im Detail aufgeklärt und damit das Konzept optimal nutzbar wird, besteht noch viel Forschungsbedarf.

## II.3 Entwicklung humaner Xenograft Leukämie Modelle

Tumorzelllinien der akuten lymphatischen Leukämie wie JURKAT, CEM und SKW-VI sind aufgrund ihrer langjährigen und verbreiteten Nutzung hinsichtlich vieler wichtiger Signalwege gut untersucht. Doch Mutationen und morphologische Veränderungen über Zeit sind problematische Begleiterscheinungen. Im Fall der akuten lymphatischen Leukämie ist der Zugang zu humanen primären Tumorzellen aus peripherem Blut oder Knochenmarkpunktionen und hochreine Aufreinigung über Ficollgradienten vergleichsweise einfach. Notwendige unbehandelte Zellen vor Therapiebeginn zum Zeitpunkt der Diagnose sind dabei mengenmäßig begrenzt verfügbar und nur über wenige Tage unter *in vitro* Kulturbedingungen lebensfähig. Daher wurden ab Mitte der 1990er Jahre geeignete Tiermodelle gesucht, um humane Leukämien zu etablieren. Diese dienten zum einen als *in vivo* Modell, zum anderen zur Amplifikation der Leukämiezellen für weitere *in vitro* Versuche.

### II.3.1 Geeignete Tiermodelle zur Etablierung humaner Leukämien

Komplexe biologische Prozesse können oft nur schwer *in vitro* analysiert werden. Sinnvoller zeigte sich ihre Erforschung in *in vivo* Modellen. Im vergangenen Jahrzehnt kam es v.a. in Mäusen zu Bahn brechenden Erfolgen in Methodik und Anwendung solcher Modelle. Humanisierte Mausmodelle stellen eine besondere Brücke zwischen klassischem Tiermodell und klinischen Studien dar, da sie humane hämatopoetische Zellen oder Gewebe als Xenotransplantat („Xenograft“) tragen bzw. humane Transgene exprimieren.

Voraussetzung dafür ist ein Defekt im mauseigenen Immunsystem, damit sich möglichst keine Abstoßungsreaktion gegen diese Xenotransplantate einstellt. Ein solcher Defekt wurde erstmals 1983 von Bosma et al. in CB17-Mäusen als *Prkdc<sup>scid</sup>* Mutation („protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency“) entdeckt. Ein solcher SCID-Phänotyp geht mit einer geringen Anzahl von T- und B-Zellen einher. Die Anwachsrate von Xenotransplantaten in diesen Mäusen war jedoch sehr gering, da altersabhängig die B- und T-Zelltitel in SCID-Mäusen ansteigen können und die angeborene Immunabwehr (v.a. durch NK-Zellen) nicht beeinträchtigt ist. Außerdem führte diese Mutation zu defekter DNA-Reparatur und als Konsequenz zu spontaner Tumorbildung in Folge von Bestrahlung. Einen vergleichbaren Phänotyp lieferten zielgerichtete Mutationen im

*Rag1/2* Genlokus (‘recombination-activating gene’ 1) (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

Eine deutliche Verbesserung der Anwachsrate trat ab 1995 ein, als SCID-Mäuse mit sog. NOD-Mäusen (non-obese diabetes) zu NOD/SCID-Mäusen gekreuzt wurden, da in diesen Mäusen nur geringe NK-Zellaktivität gemessen werden konnte. Außerdem tragen diese Mäuse weitere Defekte im angeborenen Immunsystem (Shultz et al., 1995). Als dritter Schritt konnte dieses System noch optimiert werden durch Miteinbeziehung von homozygoten zielgerichteten Mutation des Genlokus der  $\gamma$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (*IL2rg*). Die  $\gamma$ -Kette des IL-2-Rezeptors ist eine essentielle Komponente vieler hochaffiner IL-Rezeptoren. Eine Mutation beeinträchtigt die Reifung und Funktion von B- und T-Zellen und verhindert NK-Zellreifung (Ito et al., 2002). Ob die Wahl des Mausstamms einen Einfluss auf die Anwachsrate eines Xenotransplantates hat, konnte bisher nicht geklärt werden.

Im Fokus dieser Dissertation steht das Krankheitsbild der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Je nach ontogenem Ursprung klassifizieren sich diese Leukämien in T-ALL, B-ALL und prä-B-ALL (mit 80% - 85% Verbreitung die häufigste ALL-Form). Im Gegensatz zur akuten myeloischen Leukämie (AML) konnten nur wenige xenogene ALL-Transplantate in NOD/SCID-Mäusen, in den meisten Fällen per intravenöser oder intrafemorale Injektion, erfolgreich etabliert werden (Liem et al., 2004; Fakler et al., 2009). Während der Expansion der humanen Leukämiezellen kommt es zur massiven Infiltration von Knochenmark und Milz. Die Xenograft Tumorzellen zeigten dabei hohe Persistenz in phänotypischen und genotypischen Charakteristika zur originären Patientenprobe über mehrere Passagen in der NOD/SCID-Maus (Borgmann et al., 2000). Dies spricht dafür, dass diese *in vivo* Modelle geeignet sind, die tatsächliche Situation der humanen Leukämieerkrankung zu reproduzieren.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse etablierte die Arbeitsgruppe ‚Apoptose‘ zu Beginn dieser Dissertation ein eigenes NOD/SCID-Mausmodell der ALL zur Amplifikation und - als Novum - zur molekularen Modifikation von Xenograft Leukämiezellen.

### II.3.2 Molekulare Modifikationen von Xenograft Leukämiezellen

In den letzten drei Jahren folgten erste Versuche, humane Xenograft Blasten amplifiziert in immundefizienten Mäusen durch Gentransfer in ihrem Proteinexpressionsprofil zu verändern. Schlechte Transfektionseffizienzen von Xenograft Leukämiezellen durch Standardmethoden wie Lipofektion sind dabei ein generelles Problem.

In Xenograft Blasten aus einem Mausmodell der chronischen myeloischen Leukämie (CML) konnte in diesem Zusammenhang erstmals von Merkerova und Kollegen 2007 gezeigt werden, dass siRNA Transfer durch Elektroporation zu einer maximalen spezifischen Hemmung des PCNA Proteinlevels 48h nach Transfektion um 63% führte. Allerdings induzierte diese Behandlung den Zelltod von über 60% aller transfizierten Zellen. Hinsichtlich Testung neuer Tumortherapeutika auf Charakteristika der Apoptosesignaltransduktion sind dies keine optimalen Voraussetzungen. Als Lösung präsentierte die Arbeitsgruppe Nukleofektion mittels technischem Equipment der Fa. Amaxa. Diese Technik führt per hochfrequentem elektrischem Impuls zur Poration der Zell- sowie Kernmembran. Die Amplitude und Dauer des Impulses kann zelltypspezifisch durch vorgewählte Programme angepasst werden. So erfolgt bei einem bestimmten Puffermilieu DNA- bzw. RNA-Transfer unmittelbar in den Kern. Mit dieser Methode zur siRNA-Transfektion konnten die Expressionsraten von jeweils sechs Zielproteinen in acht unterschiedlichen Xenograft Patientenproben 48h nach Transfektion spezifisch um 63% bis maximal 78% gehemmt werden. Die spezifische Apoptoseinduktion der Xenograft Zellen betrug dabei programmabhängig 16% bis maximal 29% gegenüber einer unbehandelten Probe.

Als neue Ansätze zur Transfektion primärer Leukämiezellen befinden sich virale und transposonbasierte Vektorsysteme in der Testphase, aufgrund der begrenzten proliferativen Aktivität leukämischer Xenograft Blasten *ex vivo*, negativer Effekte von zirkulärer transfizierter DNA und noch unbekannter Nebeneffekte viraler DNA Integration erweisen sich deren Etablierungen allerdings noch als problematisch (Seiffert et al., 2007; Huang et al., 2009).

### III Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Betulinsäure als potentiell neues Zytostatikum in die Kombinationsabfolge der Polychemotherapie der Leukämie einzuordnen und die zu Grunde liegenden Apoptose-Signalmechanismen zu charakterisieren.

Dazu sollte zunächst identifiziert werden, welche konventionellen Zytostatika zusammen mit Betulinsäure *in vitro* besonders effektiv Apoptose auf Leukämiezellen induzieren. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelllinien untersucht sowie primäre Tumorzellen von Kindern mit akuter Leukämie. Im Hauptteil sollte untersucht werden, welche Signalschritte der Apoptosesignalkaskade von einer günstigen Kombination mit Betulinsäure aktiviert werden. Ihr Einfluss auf die Apoptose-induktion sollte mittels Überexpressions- und Knockdown-Strategien definiert werden. Dabei lag ein Hauptaugenmerk auf der möglichen Aktivierung von proapoptischen Signalmolekülen der intrinsischen Apoptose, darunter Mitgliedern der BCL-2-Proteinfamilie sowie aus dem Mitochondrium freigesetzten Faktoren.

Um Zelllinienartefakte auszuschließen, sollte in einem zweiten Teil der Arbeit mit Patienten-abgeleiteten Tumorzellen gearbeitet werden. Dazu sollten frische kindliche ALL-Zellen in immuninkompetenten Mäusen vermehrt werden. Im Rahmen der Arbeit sollte eine neue Methode etabliert werden, diese Zellen mit siRNA zu transfizieren, um die mechanistischen Untersuchungen an diesen Zellen zu verifizieren.

Zusammengenommen sollten die entstehenden Daten mechanistisch begründet definieren, an welcher Stelle des Polychemotherapieprotokolls der Leukämie Betulinsäure besonders vorteilhaft eingesetzt werden könnte.

## IV Material und Methoden

### IV.1 Material

#### IV.1.1 Geräte und Software

<i>Amaxa Nucleofector</i>	Typ I mit verschließbaren Küvetten (Fa. Lonza, Köln, D)
<i>Blotting Gerät</i>	Trans-Blot Semy-dry transfer cell (Fa. BioRad, München, D)
<i>Brutschrank</i>	B 6060 für Bakterienkultur (Fa. Heraeus, Hanau, D)
<i>Durchflußzytometer</i>	FACScan (Fa. BD Bioscience, Heidelberg, D)
<i>Elektrophorese</i>	
<i>Agarose-GE</i>	EasyPhor Mini und Midi (Fa. Biozym, Oldendorf, D)
<i>SDS-PAGE</i>	Mini-PROTEAN 3 Electrophorese System (Fa. BioRad)
<i>Filme</i>	Amersham Hyperfilm ECL (Fa. GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
<i>Filmentwicklungs- maschine</i>	CP 1000 Processor (Fa. Agfa HealthCare, Köln, D)
<i>Filmkassette</i>	X-Ray Casette IEC 60406 (Fa. DsKar Health Care, China)
<i>Heizblock</i>	TS-100 Thermo Shaker (Fa. BioSan, Riga, Lettland)
<i>Inkubator</i>	Hera Cell (Fa. Heraeus)
<i>Kippschüttler</i>	Rocking Platform Model 200 (Fa. VWR, Darmstadt, D)
<i>Magnetrührer</i>	MR 3001K (Fa. Heidolph Instruments, Nürnberg, D)
<i>Mikroskope:</i>	
<i>Zellkultur</i>	Carl Zeiss 550 1317 (Fa. Zeiss, Jena, D)
<i>Digitale Fotografie</i>	CellScreen (Fa. Roche Innovatis, Bielefeld, D)
<i>Mikrowelle</i>	MW 1226 CB (Fa. Bomann, Kempen, D)
<i>NanoDrop</i>	NanoDrop 2000 (Fa. Thermo Scientific, Bonn, D)
<i>PCR-Maschine</i>	Primus 25 advanced Thermocycler (Fa. PeqLab, Erlangen, D)
<i>Pipetten (bis 1 ml)</i>	epReference Pack (Fa. Eppendorf, Hamburg, D)
<i>Pipettierhilfe</i>	Pipetboy (Fa. Integra Bioscience, Vancouver, Kanada)
<i>Schüttelinkubator</i>	Innova 4400 (Fa. New Brunswick Scientific, Edison, USA)
<i>Sterilbank</i>	HeraSafe HS12 und HS18 (Fa. Heraeus)
<i>Stromgeber</i>	PowerPac Basic (Fa. BioRad)
<i>Transilluminator mit Digitalkamera</i>	CCD Videokamera System (Fa. LTF, Wasserburg, D)

<i>Ultraschallgerät</i>	Branson Digital Sonifier, Model 250 D (Fa. Branson, Danbury, USA)
<i>Vortexgerät</i>	Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, New York, USA)
<i>Waagen</i>	
<i>Feststoffe</i>	440-43N (Fa. Kern&Sohn, Balingen, D)
<i>Feinwaage</i>	Sartorius 2001 MP2 (Fa. Sartorius AG, Göttingen, D)
<i>Wasserbaderhitzer</i>	WB14 mit Schrägdeckel (Fa. Memmert, Schwabach, D)
<i>Zentrifugen</i>	
<i>Tischzentrifuge</i>	5417C und 5417R (Fa. Eppendorf)
<i>Zellkultur</i>	Rotanta 4810 (Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D)

Als Software diente ‚MicroSoft-Office: Exel‘ und ‚MicroSoft-Office: PowerPoint‘ der graphischen Darstellung, ‚CellQuestPro‘ der Auswertung von durchflusszytometrischen Daten und ‚Jandel Scientific: SigmaStat‘ der statistischen Analyse von Datenreihen mittels t-test bzw. ONE-WAY RM ANOVA (s. Kapitel IV.2.8).

#### IV.1.2 Chemikalien und Kits

Alle verwendeten Chemikalien sind Produkte der Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma (Deisenhofen, D) oder Roche (Basel, CH) mit höchstem Reinheitsgrad ( $\geq 99\%$ ). Bei Verwendung von Chemikalien anderer Hersteller sind diese angegeben. Als Kitsysteme zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen diente das QIAquick Gel Extracion Kit, zur Aufreinigungen von Plasmiden im kleinen Maßstab (MINI) das QIAprep Spin Miniprep Kit (beide Fa. Qiagen, Hilden, D) und im mittleren Maßstab (MIDI) das PrestoSpinD PlasmidMidi Kit (Fa. Molzym, Bremen, D).

#### IV.1.3 Reagenzien der Bakterien- und Zellkultur

##### Medien und Zusätze

<i>DMEM</i>	Kulturmedium (Fa. Gibco, San Diego, USA)
<i>FCS</i>	1h bei 52°C hitzeinaktiviert (Fa. Pan Biotech, Aidenbach, D)
<i>ITS</i>	Insulin-Transferrin-Selenium, 100x (Fa. Gibco)
<i>LB-Medium</i>	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton/Pepton ad 1 l H <sub>2</sub> O, ev. mit 1 ml Ampicillin (25 mg/ml)

<i>LB-Agarplatten</i>	15 g Agar ad 1 l LB-Medium, anschließend autoklavieren, ev. 800 µl Ampicillin (25 mg/ml) zugeben und plattieren
<i>Natrium-Pyruvat</i>	100 mM (Fa. Sigma)
<i>RPMI 1640</i>	Kulturmedium mit 5 mM Glutamin (Fa. Gibco)
<i>SOC-Medium</i>	10 mM NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 10 mM MsSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose in H <sub>2</sub> O
<i>1xTrypsin</i>	0,5% Trypsin-EDTA (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D)

#### Antibiotika

<i>Ampicillin</i>	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert (Fa. Sigma)
<i>Geneticin</i>	50 mg/ml (Fa. Invitrogen)
<i>Gentamycin</i>	10 mg/ml (Fa. Biochrom AG, Berlin, D)
<i>Penicillin/ Streptomycin</i>	10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin (Fa. Gibco)
<i>Puromycin</i>	10 mg/ml (Fa. Sigma)

#### Andere Stimulanzien und Lösungen

<i>L-Asparaginase</i>	200 U/ml in H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma)
<i>Betulinsäure</i>	4 mg/ml in DMSO (Fa. Sigma)
<i>Cyclophosphamid</i>	17 mM in PBS (Fa. Baxter, Unterschleißheim, D)
<i>Dexamethason</i>	10 mM in PBS (Fa. Sigma)
<i>Doxorubicin</i>	1 mg/ml in Ethanol (Fa. Sigma)
<i>DMSO</i>	geeignet für Zellkultur (Fa. Sigma)
<i>Etoposid (VP-16)</i>	1 mM in PBS (Fa. Sigma)
<i>Ficoll</i>	(Fa. GE Healthcare, Freiburg, D)
<i>Methotrexat</i>	53 mM in PBS (Fa. Calbiochem)
<i>Polybren</i>	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma)
<i>qVD-OPh (qVAD)</i>	10 mM in DMSO (Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA)
<i>TransIT-293</i>	Transfektionsreagenz für HEK-293T Zellen (Fa. Mirus Bio, Madison, USA)
<i>Vincristin</i>	20 mg/ml in PBS (Fa. Calbiochem/Merck)
<i>Zytarabin (AraC)</i>	50 mg/ml in PBS (Fa. Sigma)



## IV.1.4 Bakterienstamm und humane Zelllinien

Zur Transformation dienten hochkompetente *E.coli* Bakterien des Stammes XL10-GOLD (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) mit folgendem Genotyp:

*Tet<sup>r</sup> D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F $\phi$  proAB lac<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]*

Die gelisteten Gene bezeichnen mutierte Allele. Außerdem besitzt dieser Stamm den *Hte* Phänotyp für hohe Transformationseffizienz (von 10<sup>9</sup> transformierten Bakterien pro  $\mu$ g Vektor-DNA) und eine Tetrazyklin- sowie eine Chloramphenicolresistenz.

Alle verwendeten ausschließlich humanen Zelllinien sind in Tab. 2 gelistet:

**Tab. 2: Verwendete humane Zelllinien** mit der Bezeichnung, dem Zelltyp, der Morphologie und dem max. Passagfaktor in 72 Stunden (*P*).

<i>Bezeichnung</i>	<i>Humaner Zelltyp</i>	<i>Morphologie</i>	<i>P</i>
A549	Lungenkarzinom	adhärent	8
A498	Nierenzellkarzinom	adhärent	8
BJAB	B-Zellymphom	suspensiv	8
BOE	B-Zelleukämie	suspensiv	8
CEM	T-Zelleukämie (ALL)	suspensiv	10
HCT-116	Kolonkarzinom	adhärent	8
HEK-293T	embryonale Nierenfibroblasten	adhärent	8
HUT-78	T-Zellymphom	suspensiv	8
JURKAT	T-Zelleukämie (ALL)	suspensiv	10
K562	erythromyeloblastische Leukämie	suspensiv	8
MCF-7	Brustzellkarzinom	adhärent	8
NALM-6	Prä-B-Zelleukämie	suspensiv	8
SKW-VI	T-Zelleukämie	suspensiv	8
THP-1	monozytische Leukämie	suspensiv	8
U937	monozytisches Lymphom	suspensiv	8

Derivative Zelllinien mit entsprechenden Kontrollzelllinien wurden dieser Arbeit freundlicherweise von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt, welche zu gleichen Bedingungen wie parentale JURKAT Zellen (s. Tab. 2) kultiviert wurden: JURKAT BAK<sup>-/-</sup> (homozygot defizient für BAK und BAX, Wang et al., 2001), JURKAT

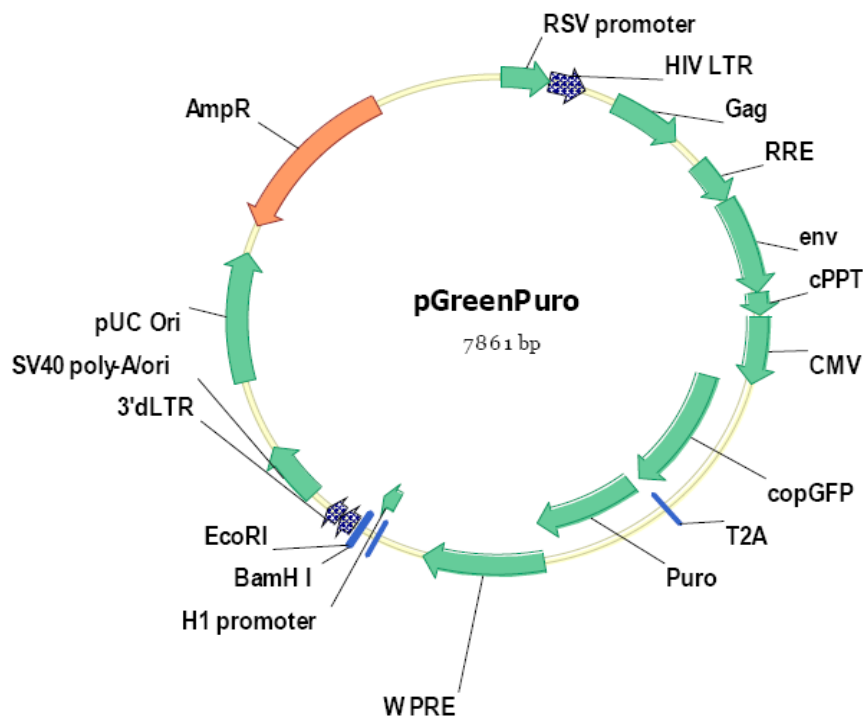
BCL-2 (BCL-2 Überexpression über pcDNA3 Plasmid; Armstrong et al., 1996), JURKAT BCL-XL (BCL-XL Überexpression via pcDNA3 Plasmid; Boise et Thompson, 1997), JURKAT CASP-9<sup>-/-</sup> und JURKAT CASP-9<sup>+/+</sup> (homozygot defizient für Caspase-9 und als Kontrolle Re-Expression von rekombinanter Caspase-9 via pcDNA3 Plasmid; Samraj et al., 2007) sowie JURKAT XIAP (XIAP Überexpression via pEBB Plasmid; Wilkinson et al., 2004).

#### IV.1.5 Vektoren

Verschieden Vektoren basierend auf RNA Interferenz Technologie (mittels short hairpin DNA = shRNA) wurden dieser Arbeit freundlicherweise von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (s. Tab. 3). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz in schwer zu transfizierende JURKAT und CEM Zellen wurde zur Generation eines shPUMA Plasmides ein lentivirales Vektorsystem der dritten Generation eingesetzt, bestehend aus dem shRNA kodierenden Vektor pGreenPuro (s. Abb. 5) und drei weiteren Verpackungs- und ‚envelope‘-Plasmiden.

**Tab. 3: Vektoren zur Transfektion humaner Zelllinien mit shRNA und zur Lentivirenproduktion in HEK-293T Zellen** mit der Bezeichnung, der Anwendung, der Resistenzen und der Bezugsquelle (Fa. System Bioscience (SBI), Mountain View, USA; Fa. Addgene, Cambridge, USA)

	<i>Bezeichnung</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Quelle</i>
<i>shRNA Plasmide</i>	pSUPERIOR	Hemmung von BID (shBID)	Neomycin/ Geneticin	Gao et al., 2005
	pQ	Hemmung von NOXA (shNOXA) bzw. BIM (shBIM)	Puromycin	Obexer et al., 2007
	pRETRO	Hemmung von p53 (shp53)	Puromycin	Brummelkamp et al., 2002
<i>Lentivirale Produktion</i>	pGreenPuro	Hemmung von PUMA (shPUMA)	Puromycin	Fa. SBI
	pRSV-Rev	Verpackungsvektor, kodiert für HIV rev (schneller RNA Kernexport)	-	Fa. Addgene
	pMDLg/pRRE	Verpackungsvektor, kodiert für gag, pol and rev Bindestelle RRE	-	
	pMD2.G	‚envelope‘-Plasmid, kodiert für Hüllprotein vsv-G	-	



**Abb. 5: Vektorkarte des lentiviralen Vektors pGreenPuro.** Dieser kodiert für BamHI/EcoRI einsetzbare shRNA-Oligonukleotide unter dem H1 RNA Promotor, für das Reporter-gen CopGFP und eine Puromycinresistenz unter dem CMV Promotor und trägt zusätzliche Ampicillinresistenz. Daneben besitzt pGreenPuro MCS-flankierende 3'- und 5'-LTRs zur Genomintegration, eine Verpackungssignalsequenz für gag und env, die Kernexport-signalsequenz RRE und cPPT, das T2A Trennsignal und WPRE zur Stabilisierung der viralen Transkripte.

Die Plasmide pSUPERIOR, pQ und pRETRO wurden mit bereits einklonierten shRNA Oligonukleotiden verwendet. Zur Hemmung des zellulären Proteins PUMA wurde eine lentivirale Transfektion mittels pGreenPuro Plasmid gewählt, wofür komplementäre Forward und Reverse Oligonukleotide zur überlappenden Bindung und anschließenden Klonierung kreiert wurden (s. Kapitel IV.1.6).

#### IV.1.6 Oligonukleotide

##### shRNA Sequenzen

shRNA gg. BID (shBID):	5'-GGA GAA GAC CAT GCT GGT G-3'
shRNA gg. BIM (shBIM):	5'-TGA TGT AAG TTC TGA GTG TG-3'
shRNA gg. NOXA (shNOXA):	5'-GTC GAG TGT GCT ACT CAA CT-3'
shRNA gg. p53 (shp53):	5'-GGG TTA GTT TAC AAT CAG C-3'
shRNA gg. PUMA (shPUMA):	5'-TCT CAT CAT GGG ACT CCT G-3'

## siRNA Sequenzen

siRNA gg. Lamin (mock):	5'-ACU GCA GCA UCA UGU AAU CTT-3'
siRNA gg. NOXA (siNOXA):	5'-GUC GAG UGU GCU ACU CAA CU-3'
siRNA gg. p53 (sip53):	5'-GGG UUA GUU UAC AAU CAG C-3'
siRNA gg. PUMA (siPUMA):	5'-UCU CAU CAU GGG ACU CCU G-3'
All Star negative control siRNA	Alexa-Fluor-488-konjugiert (Fa. Qiagen, Hilden, D), eingesetzt als Transfektions- und Negativkontrolle

## shPUMA (zur Klonierung in pGreenPuro, s. Kapitel IV.2.2.1)

FOR: 5'-gatccTCTCATCATGGGACTCCTGcttctgtcagaCAGGAGTCCCATGATGAGAttttg-3'

REV: 5'-aattcaaaaaTCTCATCATGGGACTCCTGtctgacaggaagCAGGAGTCCCATGATGAGAg-3'

## shPUMA scrambled (zur Klonierung in pGreenPuro, s. Kapitel IV.2.2.1)

FOR: 5'-gatccGCCCGTTACTGACGTTACTcttctgtcagaAGTAACGTCAGTAACGGGCtttttg-3'

REV: 5'-aattcaaaaaGCCCGTTACTGACGTTACTtctgacaggaagAGTAACGTCAGTAACGGGCg-3'

## PCR Primer

pGreenPuro\_SEQ: 5'-TGC ATG TCG CTA TGT GTT CTG GGA-3'

pGreenPuro\_REV: 5'-TGG TCT AAC CAG AGA GAC CCA GTA-3'

## IV.1.7 Antikörper

Antikörper wurden hauptsächlich eingesetzt als Primär- und HRP-konjugierte Sekundärantikörper in der Western-Blot-Analyse (s. Tab. 4). Darüber hinaus erfolgten intrazelluläre Messungen zur Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom-C und Aktivierung von Caspase-3 über konformationsspezifische Antikörper.

## Primärantikörper für FACS-Analyse

Mouse IgG2b anti-Cytochrom-C (7H8.2C12, Fa. BD Bioscience)

Rabbit IgG anti-aktive-Caspase-3, PE-konjugiert (CPP32, Fa. BD Bioscience)

Isotypkontrolle IgG2b (Fa. Dako North America, Carpinteria, USA)

## Sekundärantikörper für FACS-Analyse

Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG2b, FITC-konjugiert (Fa. CliniScien., Montrouge, F)

## Blockierung unspezifischer Bindungen in der FACS-Analyse

Mouse IgG1-κ (MOPC, Fa. Sigma)

**Tab. 4: Antikörper für die Western-Blot-Analyse** mit Antigen (cl. Casp = ‚cleaved Caspase‘), Proteingröße, Klon, Spezies, Verdünnungslösung (Lsg., MP = Milchpulver, BSA = Bovines Serumalbumin), Verdünnungsfaktor (F), und Hersteller (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; Trevigen Inc., Gaithersburg, USA; Alexis Biochemicals, Lörrach, D; Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt, D; Fa. BD Bioscience, Heidelberg, D; Affinity BioReagents/Thermo Fisher Scientific; Fa. Upstate/ Millipore, Schwalbach, D)

<i>Antigen</i>	<i>Größe [kDa]</i>	<i>Klon</i>	<i>Spezies</i>	<i>Lsg.</i>	<i>F</i>	<i>Hersteller</i>
AIF	57	H-300	rabbit	TBS/T+5%MP	1000	Santa Cruz Bio.
BAK	30	G-23	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Santa Cruz Bio.
BAX	23	N-20	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Santa Cruz Bio.
BCL-2	26	100	mouse	TBS/T	2500	Santa Cruz Bio.
BCL-XL	28	H-62	rabbit	TBS/T	2500	Santa Cruz Bio.
BID	22	-	rabbit	TBS/T+5%MP	1000	Trevigen
BIM	23/15/12	3C5	rat	TBS/T+5%MP	2500	Alexis Biochem.
cl. Casp-3	19/17	Asp-175	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Cell Signaling Bio.
cl. Casp-6	18	Asp-162	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Cell Signaling Bio.
cl. Casp-7	20	Asp-198	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Cell Signaling Bio.
Casp-8	57/43/18	FLICE	mouse	TBS/T	250	eigene Herstellung
cl. Casp-9	35	Asp-315	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Cell Signaling Bio.
Casp-9	47	2-22	mouse	TBS/T+5%MP	2500	BD Bioscience
clAP-2	68	H-85	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Santa Cruz Bio.
COX-IV	17	3E11	rabbit	TBS/T+5%MP	5000	Cell Signaling Bio.
CYT C	14	136F3	rabbit	TBS/T+5%MP	1000	Cell Signaling Bio.
ENDO G	25	Cys-122	rabbit	TBS/T+5%BSA	1000	Cell Signaling Bio.
GAPDH	36	FF26A/F9	mouse	TBS/T	5000	Affinity BioReag.
HISTON H1	33	FL-219	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Santa Cruz Bio.
NOXA	11	114C307	mouse	TBS/T+5%MP	1000	Calbiochem/Merck
OMI/Htr-A2	36	Ser-335	rabbit	TBS/T+5%BSA	1000	Cell Signaling Bio.
p53	53	DO-1	mouse	TBS/T	5000	Santa Cruz Bio.
cl. PARP	89	Asp-214	rabbit	TBS/T+5%MP	2500	Cell Signaling Bio.
PUMA	18	-	rabbit	TBS/T+5%BSA	2500	Cell Signaling Bio.
SMAC	25	78-1-118	rabbit	TBS/T+5%MP	1000	Upstate Bio.
SURVIVIN	16	6E4	mouse	TBS/T+5%MP	1000	Cell Signaling Bio.
$\alpha$ TUBULIN	55	DM1A	mouse	TBS/T	5000	Sigma
XIAP	53	3B6	rabbit	TBS/T+5%MP	1000	Cell Signaling Bio.

## Sekundärantikörper für Western-Blot-Analyse

Goat IgG (H+L) anti-mouse, HRP-konjugiert (Fa. Thermo-Fisher, Bonn, D)

Goat IgG (H+L) anti-rabbit, HRP-konjugiert (Fa. Cell Signaling/Thermo-Fisher)

Goat IgG anti-rat, HRP-konjugiert (DCO1L, Fa. Calbiochem)

## IV.1.8 Andere Proteine

## Restriktionsenzyme

HC BamHI (20 U/μl, Fa. Invitrogen)

EcoRI (10 U/μl, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, D)

## Andere Enzyme

GoTaq DNA Polymerase (5 U/μl, Fa. Promega, Madison, USA)

T4 DNA Ligase (1 U/μl, Fa. Invitrogen)

RNAse (DNAse- und proteasefrei, 10 mg/ml, Fa. Fermentas)

## Größenmarker

Precision Plus Protein all Blue Standard (Fa. BioRad)

PageRuler Prestained Protein (Fa. Fermentas)

## Protease-Inhibitor für Zellysate

als Cocktail (AEBSF, PepstatinA, E-64, Bestatin, Leupeptin,  
und Aprotinin, Fa. Sigma)

## IV.1.9 Sonstiges

<i>Acrylamidmix</i>	Rotiphorese Gel 30 (Fa. Roth)
<i>10xAnnealing-Puffer</i>	100 mM Tris (pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
<i>APS</i>	10%ige Ammoniumpersulfatlösung in H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma)
<i>DNA-Größenmarker</i>	100 bp DNA Ladder (Fa. Fermentas)
<i>5xDNA-Ladepuffer</i>	1 ml 50x TAE-Puffer, 25% Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau ad 10 ml H <sub>2</sub> O
<i>ECL-Substrat</i>	SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Fa. Pierce/Thermo Scientific)
<i>Entwickler/Fixierer</i>	(Fa. Ernst Christiansen GmbH, München, D)
<i>Ethidiumbromid</i>	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O (Fa. Sigma)
<i>Gelpuffer A (PAGE)</i>	363 g Tris, 48 ml 10 N HCl ad 1 l H <sub>2</sub> O (pH 8,9)
<i>Gelpuffer B (PAGE)</i>	57 g Tris, 256 ml 1 M phosphor. Säure ad 1 l H <sub>2</sub> O (pH 6,7)

<i>Gel-Transferpuffer</i>	3 g Tris, 14,2 g Glycin, 158 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O
<i>Kernpuffer A</i>	10 mM Hepes, 1 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5% Triton X-100 in H <sub>2</sub> O (pH 7,0)
<i>Kernpuffer B</i>	20 mM Hepes, 400 mM KCl, 0,1 mM EDTA und 25% Glycerin in H <sub>2</sub> O (pH 7,9)
<i>5xLämmli-Puffer</i>	16,7 ml 1 M Tris (pH 6,8), 33,3 ml 20%-SDS-Lösung in H <sub>2</sub> O, 33,3 ml Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau ad 100 ml H <sub>2</sub> O
<i>Nicoletti-Puffer</i>	0,1% Triton X-100, 0,1% Natrium-Citrat in H <sub>2</sub> O
<i>Nonidet P40</i>	(Fa. ICN Biomedicals, Aurora, USA)
<i>dNTPs</i>	10 µM, in H <sub>2</sub> O verdünnt von je 100 µM dATP, dTTP, dGTP und dCTP Stocklösungen (Fa. Fermentas)
<i>10xPBS</i>	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O
<i>Präparationspuffer</i>	250 mM Sucrose, 20 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> and 1 mM DTT in H <sub>2</sub> O
<i>Propidiumiodid-Lsg.</i>	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<i>PVDF-Membran</i>	Polyvinylidenfluorid-Membran (Fa. Immobilon/Millipore)
<i>RIPA-Puffer</i>	150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% Deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM Tris (pH 8.0) in H <sub>2</sub> O
<i>SDS-Lysepuffer</i>	62,5 mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau
<i>SDS-Laufpuffer</i>	15,1 g Tris, 94 g Glycin, 50 ml 10%-SDS-Lsg ad 1 l H <sub>2</sub> O
<i>50xTAE Puffer</i>	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H <sub>2</sub> O
<i>10xTBS</i>	80 g NaCl, 24,2 g Tris ad 1 l H <sub>2</sub> O (pH 7,6)
<i>TBS/T</i>	0,1% Tween20 (Fa. Sigma) in TBS
<i>TEMED</i>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (Fa. Sigma)

## IV.2 Methoden

### IV.2.1 Zellkultur

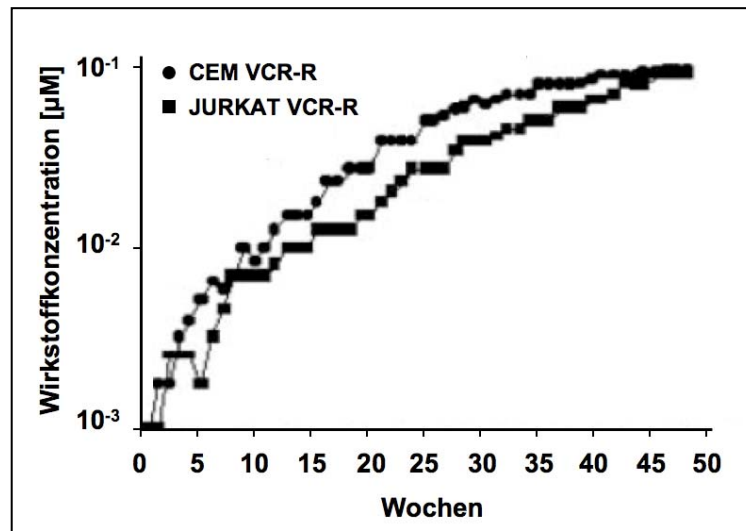
#### IV.2.1.1 Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien

Die aufgeführten Zelllinien (s. Tab. IV.1.4) wurden in mittleren Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in Kulturmedium (RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, nur HEK-293T in DMEM mit 10% FCS) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Diese Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:8 bzw. 1:10 passagiert (s. Kapitel IV.1.4). Das Ablösen der adhären wachsenden Zellen erfolgte durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (0,5%). Um Zellen einzufrieren wurden bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und graduell auf -80°C tiefgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Eingefrorene Zellen, die wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine mittlere Zellkulturflasche überführt.

#### IV.2.1.2 Herstellung Zytostatika-resistenter Tumorzelllinien

Als Model einer erworbenen Chemotherapieresistenz von Tumorzellen wurden JURKAT Zellen durch sukzessive Erhöhung der Zytostatika-Konzentrationen im Kulturmedium resistent gemacht gegenüber der Zytostatikatherapie als Modell für erworbene Zytostatikaresistenz (Ehrhardt et al., 2004). Dazu wurden parentale JURKAT Zellen mit Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin kokultiviert, so dass ca. 5% der Zellen diese Behandlung überlebten. In maximal wöchentlichem Rhythmus wurden diese Konzentrationen schrittweise erhöht, wobei weiterhin ca. 5% der Zellen überlebten (vgl. Abb. 6 als Beispiel für Vincristin). Beendet wurde die Behandlung bei Erreichen der ‚plasma peak concentration‘ (PPC), der im Durchschnitt maximal erreichbaren humanen Plasmakonzentration des jeweiligen Chemotherapeutikums. Diese liegen für Asparaginase bei 1 U/ml, für Doxorubicin bei 500 nM und für Vincristin bei 100 nM. Diese Zellen wurden dann als JURKAT Asp-R (Asparaginase resistent), JURKAT Doxo-R (Doxorubicin resistent) und JURKA VCR-R (Vincristin resistent) bezeichnet und ohne Chemotherapeutikum in Kulturmedium weiter passagiert.





**Abb. 6: Exemplarische Darstellung der Resistenzmachung von JURKAT und CEM Leukämiezellen gegen Vincristin (VCR-R) durch gesteigerte Wirkstoffgabe, nach Ehrhardt et al., 2004.**

#### IV.2.1.3 Kultivierung von primären und Xenograft Leukämiezellen

Primäre Leukämiezellen wurden aus Knochenmarkspunktatresten von Leukämieerkrankten (mit leukämischen Blastenkonzentrationen von >80% im peripheren Blut) oder der Milz von NOD/SCID-Mäusen als Xenograft Zellen (s. Kapitel IV.2.9) gewonnen. Blut- bzw. Milzzellsuspension wurde auf 50 ml PBS verdünnt und 10 ml Ficoll wurden mit je 25 ml dieser Verdünnung überschichtet. Anschließend erfolgte 30minütige Zentrifugation bei 400 g und 20°C ohne Rotorbremse. Dabei bildete sich ein Interphasering mit Lymphozyten, welche mit einer Pasteurpipette in ein 15ml Eppendorfgefäß transferiert und mit PBS aufgefüllt wurden. Die Zellen wurden zweimal in 15 ml PBS gewaschen, d.h. bei Raumtemperatur abzentrifugiert (400 g, 10 min), dekantiert und in PBS resuspendiert. Final folgte ein weiterer Waschschrift in optimiertem RPMI-Kulturmedium (RPMI 1640 mit 20% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Gentamycin, 6 µl/ml ITS, 1 mM Na-Pyruvat und 50 µM 1-Thioglycerol). Die Zellen wurden zu  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in diesem Medium verdünnt, in Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### IV.2.1.4 Stimulation mit zytotoxischen Agenz

Suspensionszelllinien wurden zu  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml Kulturmedium in Zellkulturplatten (100  $\mu$ l zur FACS-Analyse) oder mittleren Kulturflaschen (bis 25 ml/Flasche zur Western-Blot-Analyse) ausgesät. Patientenzellen oder Xenograftzellen aus NOD/SCID-Mäusen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml optimiertem Kulturmedium (s. Kapitel IV.2.1.3) in Zellkulturplatten (100  $\mu$ l zur FACS-Analyse, 5 ml zur Western-Blot-Analyse) ausgesät. Adhärenz Zelllinien wurden mittels Trypsinbehandlung abgelöst und in Zellkulturplatten à  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml Kulturmedium (1 ml zur Nicoletti-Analyse) über Nacht sedimentiert.

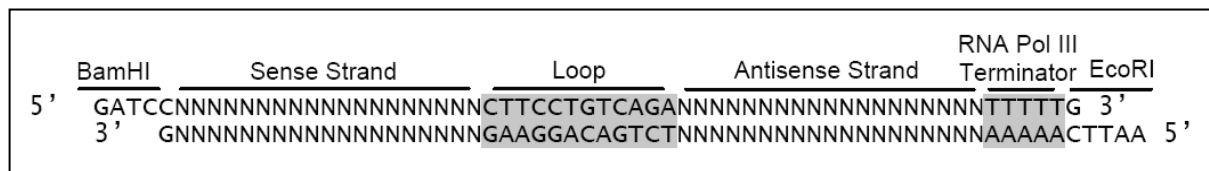
Zytotoxische Agenzien (s. Kapitel IV.1.3) wurden in Stockkonzentrationen bei  $-80^\circ\text{C}$  in Aliquots gelagert, bei Raumtemperatur aufgetaut und gegebenenfalls in PBS verdünnt. Betulinsäurelösung wurde ebenfalls bei  $-80^\circ\text{C}$  in Aliquots gelagert, jedoch im Schüttelinkubator bei  $37^\circ\text{C}$  für 20 min aufgetaut um Kristallbildung zu vermeiden und anschließend in DMSO von  $37^\circ\text{C}$  verdünnt. Dabei wurde zur Minimierung der Toxizität DMSO zu maximal 0,25% eingesetzt und DMSO-Toxizitätstestungen parallel durchgeführt. Nach Applikation der Stimulanzien wurde jeder Ansatz gut durchmischt und bis zur Probenentnahme bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

#### IV.2.2 Klonierung

##### IV.2.2.1 shRNA Oligonukleotid Design und Annealing

Zur Klonierung des auf RNA-Interferenz Technologie basierenden Vektors pGreenPuro (s. Abb. 5) wurden komplementäre ca. 60 bp Oligonukleotide nach folgendem Schema kreiert (s. Abb. 7): Ein ‚sense‘ oder ‚forward‘ Oligonukleotid startete in 5'-3' Richtung mit der Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI (5'-GATCC-3'), gefolgt von einer ‚sense‘ shRNA Sequenz, einem 12bp Loop, der ‚antisense‘, also invertierten Sequenz der shRNA, der RNA-Polymerase III Terminatorsequenz (TTTTT) und einem finalen Guanin.

Komplementär dazu startete das ‚antisense‘ oder ‚reverse‘ Oligonukleotid in 5'-3' Richtung mit der Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI (5'-AATTC-3'), der komplementären RNA-Polymerase III Terminatorsequenz (AAAAA), der ‚sense‘ Sequenz der shRNA, dem komplementären Loop, der ‚antisense‘ shRNA Sequenz und final einem Guanin-Nukleotid.



**Abb. 7: Schematische Darstellung eines Oligonukleotids zur Klonierung in das pGreenPuro Vektorsystem** mit überhängenden BamHI und EcoRI Schnittstellen, ‚sense‘ and ‚antisense‘ shRNA Sequenzen (‚Strand‘), Loop-Struktur und RNA-Polymerase III Terminator Sequenz.

Als shRNA Sequenzen dienten eine validierte 19 bp shRNA Sequenz zur Hemmung von PUMA (Gu et al., 2004) und eine durch Nukleotidmix (‚scrambling‘) gewonnene Kontrollsequenz (s. Kapitel IV.1.6). Diese Oligonukleotide wurden als Einzelstränge synthetisiert. Die Verschmelzung, das sog. ‚Annealing‘, erfolgte in folgendem Ansatz:

- 1 µl ‚sense‘ Oligonukleotid (100 µM)
- 1 µl ‚antisense‘ Oligonukleotid (100 µM)
- 5 µl 10xAnnealing Puffer
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde im Thermocycler auf 95°C (für 5 min) erhitzt, dann 10 min auf 70°C inkubiert und anschließend mit einer Rate von 1,5 °C pro min schrittweise auf 37°C abgekühlt, wodurch sich beide Oligonukleotide aneinander komplementär anlagerten. So entstand ein DNA-Doppelstrang mit geschnittener BamHI-Stelle am 5'-Ende und EcoRI-Stelle am 3'-Ende.

#### IV.2.2.2 Restriktionsverdau

Um doppelsträngige Oligonukleotide in die ‚multiple cloning site‘ (MCS) des pGreenPuro ligieren zu können, musste dieser mit geeigneten Restriktionsenzymen (BamHI und EcoRI) linearisiert werden, wodurch überhängende Enden entstanden, passend zu denen der doppelsträngigen Oligonukleotide. Ein Ansatz zum Restriktionsverdau umfasste 50 µl folgender Zusammensetzung:

- 1 µl Bam-HI (ca. 20 U)
- 2 µl EcoRI (ca. 20 U)
- 5 µl 10x EcoRI Puffer
- 2 µl pGreenPuro Plasmid DNA
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz inkubierte bei 37°C eine Stunde. Anschließend wurde der geschnittene pGreen Puro Vektor gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### IV.2.2.3 Agarosegelelektrophorese und Reinigung von Vektor-DNA

Zur Auftrennung des restriktionsverdauten linearisierten Vektors oder anderer DNA-Produkte diente die Agarosegelelektrophorese: Das Gel bestand aus 3% Agarose in der Mikrowelle gelöst in 100ml TAE-Puffer mit 5 µl Ethidiumbromid. Der mit 5 µl 5xDNA-Ladepuffer versetzte Restriktionsansatz bzw. andere bereits mit Ladepuffer versetzte PCR-Produkte wurden neben eine DNA-Markerspür geladen und in TAE-Puffer bis zu 45 min bei 110 V aufgetrennt. Zur weiteren Klonierung konnte aus dem Gel die relevante DNA-Bande des linearisierten Vektors unter dem UV-Transilluminator, wo in DNA interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar wurde, ausgeschnitten und nach Anleitung des QIAquick Gel Extracion Kit aufgereinigt werden. Im letzten Schritt wurde dabei die gereinigte Vektor-DNA in 30 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### IV.2.2.4 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung von linearisierter Plasmid-DNA mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid diente ein Ligationsansatz mit T4 DNA Ligase. Die eingesetzte Menge von Vektor-DNA und Oligonukleotid wurde so abgeschätzt, dass ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von ca. 1:2 vorlag. Ein Ligationsansatz von 15 µl enthielt neben 10,5 µl Vektor-DNA und dem entsprechenden Volumen (2 µl) an Insert-DNA 1,5 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase. Diese Komponenten inkubierten über Nacht bei 4°C. Als Ligationskontrolle diente ein Ansatz ohne Insert-DNA (doppelsträngiges Oligonukleotid).

#### IV.2.2.5 Transformation in kompetente Bakterien

10 µl Ligationsansatz bzw. Ligationskontrolle wurden mit 50 µl auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten XL10-Gold *E.coli*-Bakterien 30 min ebenfalls auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz erst 1,5 min bei 42°C und danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium folgte eine Stunde auf dem Schüttelinkubator bei 37°C, bevor eine Minute bei max. Geschwindigkeit abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen im Rückfluss

resuspendiert. Zuletzt erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten. Diese wurden über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert.

#### IV.2.2.6 Kolonie-PCR

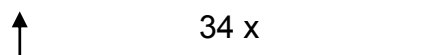
Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) diente nach der Transformation zum Test auf positive Klone („screening“): Bis zu zwölf Einzelkolonien wurden je mit einer Pipettenspitze gepickt und sowohl in einem PCR-Ansatz resuspendiert als auch anschließend auf einer Masterplatte (LB-Agar mit Ampicillin) ausgestrichen.

Der PCR-Ansatz enthielt:

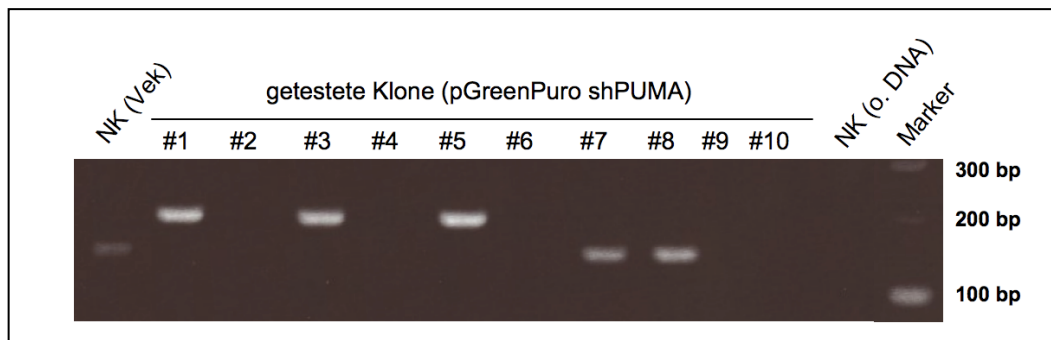
- 0,2 µl GoTaq-Polymerase
- 5 µl 5x GoTaq-Green Puffer
- 2 µl dNTPs (10 µM)
- je 1,6 µl Forward/Reverse Primer (pGreenPuro\_SEQ/pGreenPuro\_REV, 5 µM)
- 0,4 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (50 mM)
- ad 25 µl H<sub>2</sub>O

Als Negativkontrolle dienten ein Ansatz ohne gepickten Klon und ein Ansatz mit 1 µl zirkulärem pGreenPuro Vektor. Die gut gemischten Ansätze durchliefen ca. 90 min nachfolgendes Programm des PCR-Thermocyclers:

2 min 94°C → 15 sek 94°C → 30 sek 56°C → 90 sek 68°C → 5 min 68°C → ∞ 4°C



Anschließend wurden die PCR-Ansätze direkt per 2%iger Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Kapitel IV.2.2.3). Die Negativkontrolle (zirkulärer pGreenPuro) und alle Klone ohne Insert zeigten ein PCR-Produkt mit einer Größe von 150 bp. Positive Klone zeigten eine 210-bp-Bande, welche zusätzlich das doppelsträngige Oligonukleotid mit einer Größe von 60 bp enthielten (s. Abb. 8). Leere Spuren waren Klone ohne Vektor bzw. mit degradiertem Vektor. Je drei positive Klone wurden per MINI bzw. MIDI Plasmidisolierung amplifiziert und aufgereinigt.



**Abb. 8: Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese einer Kolonie-PCR zum Nachweis positiver pGreenPuro shPUMA *E.coli* Klone.** NK (Vek) ist die Negativkontrolle bei Ligation mit leerem pGreenPuro Vektor, NK (o. DNA) die Negativkontrolle ohne DNA. Klone #1, #3 und #5 sind positiv, da auf richtiger Höhe von ca. 210 bp.

#### IV.2.2.7 Plasmidisolierung (MINI/MIDI)

Für eine MINI Über-Nacht-Kultur wurden 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit einem positiv getesteten Klon von einer Masterplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt der Bakterien-suspension bei 5000 rpm (4°C für 10 min). Der Überstand wurde abgossen und die Plasmid-DNA aus dem Zellpellet nach Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert und in 30 µl Wasser aufgenommen. Nach positiver Sequenzierung (s. Kapitel IV.2.2.8) wurde in einem zweiten Schritt DNA eines positiven Klones per MIDI nach Herstellerangaben (PrestoSpinD PlasmidMidi Kit) für höhere Ausbeute aus 100 ml Über-Nacht-Kultur isoliert.

#### IV.2.2.8 Mengenbestimmung von DNA und Sequenzanalyse

Zur Ermittlung der isolierten DNA-Konzentration wurden 2 µl der Plasmid-DNA im Photometer (NanoDrop) bei 260 nm gemessen. Als Referenz diente autoklaviertes Wasser. Die Konzentrationen der Plasmid-DNA-Isolationen lagen zwischen 800 und 1500 ng/µl. Zur Sequenzanalyse wurde 1 µg DNA zusammen mit dem Forward Primer (pGreenPuro\_SEQ) an die Firma Eurofin MWG Biotech (Ebersberg, D) geschickt, welche die Sequenzierungen mit speziellen ‚short hairpin‘ neutralisierenden Agenzien durchführte. Um Abweichungen (z.B. Punktmutationen und Deletionen) von der *in silico* synthetisierten Zielsequenz zu ermitteln, wurde ein Vergleich zweier Nukleotidsequenzen mit dem Logarithmus ‚blast‘ durchgeführt.

### IV.2.3 Transfektion und Herstellung stabiler Zelllinien

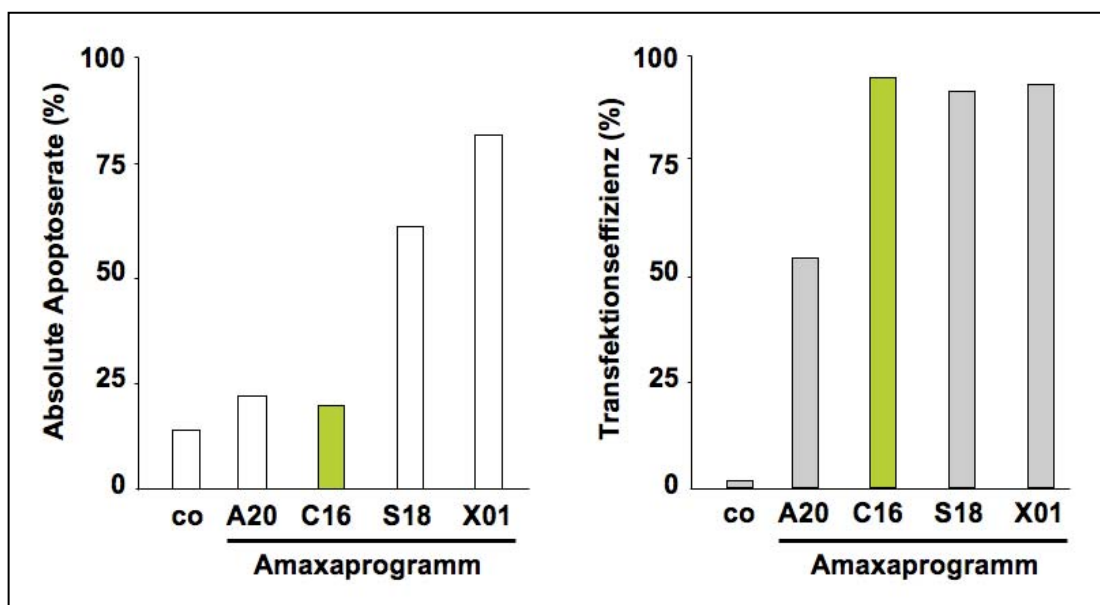
#### IV.2.3.1 Nukleofektion von humanen Suspensionszelllinien mittels Amaxa

JURKAT bzw. CEM Zellen wurden zu einer Millionen Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2000 rpm, 5 min) pelletiert und in 100 µl auf 37°C vorgewärmten Amaxa Puffer V resuspendiert. Es wurden 5 µl zu transfizierende Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 200 ng/µl zupipettiert, der Ansatz in eine Amaxa Reaktionsküvette überführt und diese verschlossen. Nach Einstellen in den Amaxa Nukleofektor wurde die Probe durch das Programm C16 elektroporiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Küvette wurde anschließend mit 500 µl Kulturmedium (mit 1xPenicillin/Streptomycin und 1xGentamycin) aufgefüllt und in weitere 1,5 ml Medium in einer Zellkulturplatte überführt. Als Negativkontrolle wurden Zellen im selben Verfahren ohne Plasmid-DNA behandelt. Zur Selektion wurden nach 24h je 200 µl dieser Zellen in 800 µl Kulturmedium mit geeignetem Selektionsagens (s. Kapitel IV.1.5) in einer Konzentrationsreihe überführt und ca. 2 Wochen kultiviert. Final lagen diese Konzentrationen bei ca. 10 µg/ml Puromycin und ca. 1 mg/ml Geneticin. Der Erfolg der Hemmung durch transfizierte, Plasmid-kodierte shRNA wurde per Western-Blot-Analyse kontrolliert.

#### IV.2.3.2 Nukleofektion von Xenograft Leukämiezellen

Wie in Kapitel IV.2.9 beschrieben wurden primäre kindliche ALL-Zellen als Xenografts in Mäusen vermehrt. Xenograft Leukämiezellen der Patientenproben #50 und #53 wurden je zu 5 Millionen Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße pelletiert (2000 rpm, 5 min) und in 100 µl auf 37°C vorgewärmten Amaxa-Puffer V resuspendiert. Dazu wurden 5 µl zu transfizierende siRNA (20 µM) pipettiert und der Ansatz in eine Amaxa Reaktionsküvette überführt und mit Programm C16 im Amaxa-Nukleofektor behandelt (s. Kapitel IV.2.3.1).

In Vorversuchen konnte dieses Amaxaprogramm als optimal hinsichtlich maximaler Transfektionseffizienz bei minimaler Apoptoseinduktion etabliert werden (s. Abb. 9). Die getesteten Programme wurden zur Transfektion primärer Leukämiezellen vom Hersteller empfohlen und unterschieden sich hinsichtlich Länge und Intensität des elektrischen Impulses.



**Abb. 9: Testung verschiedener Nukleofektionsprogramme zur siRNA Transfektion in Xenograft Leukämiezellen der Patientenprobe #50.** Links: Absolute Apoptoserate von unbehandelten Zellen (co) und per Nukleofektion transfizierten Zellen unter Anwendung verschiedener Amaxaprogramme (A20, C16, S18, X01) 48h nach Transfektion. Rechts: Transfektionseffizienz, induziert durch verschiedene Amaxaprogramme, als Fluoreszenzintensität gemessen 48 h nach Transfektion der ‚AllStars negative control‘ siRNA (konjugiert mit dem Fluorochrom ‚Alexa Fluor 488‘). Grün unterlegt ist das optimale Programm C16, das für weitere Versuche in Xenograft Leukämiezellen verwendet wurde.

Als Transfektion- und Negativkontrolle wurden Zellen mit ‚AllStars negative control‘ siRNA (konjugiert mit dem Fluorochrom ‚Alexa Fluor 488‘) behandelt (s. Kapitel IV.1.6). Der Küvetteninhalt wurde mit 500  $\mu$ l optimiertem Kulturmedium (s. Kapitel IV.2.1.3) in weitere 4,5 ml in einer Zellkulturplatte überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert bzw. zur Stimulation ausgesät. Der Erfolg der Hemmung durch transfizierte siRNA wurde per Western-Blot-Analyse 48h nach Transfektion kontrolliert.

#### IV.2.3.3 HEK-293T Transfektion zur Lentivirenproduktion

HEK-293T Zellen wurden in einer Zellkulturplatte ausgesät (5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 5 ml DMEM Kulturmedium) und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. 280  $\mu$ l DMEM (ohne FCS) wurden vorsichtig mit 20  $\mu$ l TransIT-293 Transfektionsreagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, während in einem Parallelansatz 1,6  $\mu$ g pRSV-Rev Plasmid, 3,2  $\mu$ g pMDLg/pRRE Plasmid, 0,8  $\mu$ g pMD2.G Plasmid und 1,6  $\mu$ g pGreenPuro (shPUMA oder scrambled) zu 40  $\mu$ l DMEM (ohne FCS) pipettiert



wurden. Nach vorsichtigem Vermischen beider Ansätze wurde weitere 30 min inkubiert. Das Medium der HEK-293T Zellen wurde vorsichtig abgesaugt, durch 5 ml DMEM + 10%FCS ersetzt und der Transfektionsansatz darauf tropfenweise verteilt. Die Zellen wurden zur Virusproduktion und -sekretion 72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor der Zellüberstand 10 min bei 2000 rpm abzentrifugiert wurde. Dann wurde der zellfreie Überstand durch einen 0,45-µm-Filter passiert und durch Ultrafiltration mit Amicon-Ultra-15 Gefäßen (Fa. Millipore) aufkonzentriert. Dieses Viruskonzentrat konnte direkt zur lentiviralen Infektion eingesetzt oder aliquotiert bei -80°C gelagert werden. Eine Virustiterbestimmung auf HEK-293T Zellen ergab eine Ausbeute von ca.  $4,5 \times 10^{10}$  Viruspartikel pro ml für ‚pGreenPuro scrambled‘, ca.  $3,3 \times 10^{10}$  pro ml für ‚pGreenPuro shPUMA‘ Lentiviren.

#### IV.2.3.4 Lentivirale Infektion von Suspensionszelllinien

JURKAT bzw. CEM Zellen wurden zu einer Millionen Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße pelletiert (2000 rpm, 5 min) und in 1 ml Kulturmedium mit 8 µg/ml Polybren und 2 µl pGreenPuro (shPUMA oder scrambled) Lentiviren resuspendiert. Diese Zellen wurden in eine Zellkulturplatte überführt und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dann wurden je 200 µl dieser Zellen in 800 µl Kulturmedium mit Puromycin in einer Konzentrationsreihe überführt und ca. eine Wochen bei Puromycinkonzentrationen bis zu 10 µg/ml Puromycin inkubiert. Der Erfolg der Transfektion wurde zunächst per FACS-Analyse des exprimierten CopGFP gemessen, die Hemmung der Expression durch transfizierte shRNA wurde per Western-Blot-Analyse kontrolliert.

#### IV.2.4 Wachstumsversuch

JURKAT bzw. Xenograft Leukämiezellen wurden wie in Kapitel IV.2.1 beschrieben mit zytotoxischen Agenzien in einer Zellkulturplatte stimuliert. Nach 72h im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Zellkulturplatte auf dem Objektisch des CellScreen Mikroskops eingespannt, auf Zellen autofokussiert und acht Ausschnitte pro Vertiefung digital im *jpg*-Bildformat aufgenommen (100fache Vergrößerung, PS/CL Modul).

## IV.2.5 Apoptose-Assays

### IV.2.5.1 FACS-Analyse mittels FSC/SSC-Analyse

Zur Analyse der Viabilität stimulierter Suspensionszellen wurden diese von der Zellkulturplatte (s. Kapitel IV.2.1.4) in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 100µl PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Messung der Probe am FACScan in der sog. ‚DotBlot‘ Einstellung bei FSC (‚forward scatter‘) gegen SSC (‚sideward scatter‘). Wurden die Zellemissionswerte des Vorwärtstreulichtes (FSC) und Seitwärtstreulichtes (SSC) so gegeneinander aufgetragen (‚DotBlot‘), stellten sich morphologisch ähnliche Zellen als zusammenhängende Wolke dar (s. Abb. 10). Deutlich trennte sich dabei eine lebende Zellpopulation von einer Population aus kleineren, granuläreren apoptotischen Zellen, wodurch es möglich war, deren prozentualen Anteil durch eine Trennlinie zu bestimmen (‚gating‘). Die spezifische Apoptoserate wurde dabei folgendermaßen berechnet:

$$\frac{[\text{absolute Apoptoserate (behandelte Zellen)} - \text{absolute Apoptoserate (unbehandelte Zellen)}] \times 100\%}{[1 - \text{absolute Apoptoserate (unbehandelte Zellen)}]}$$

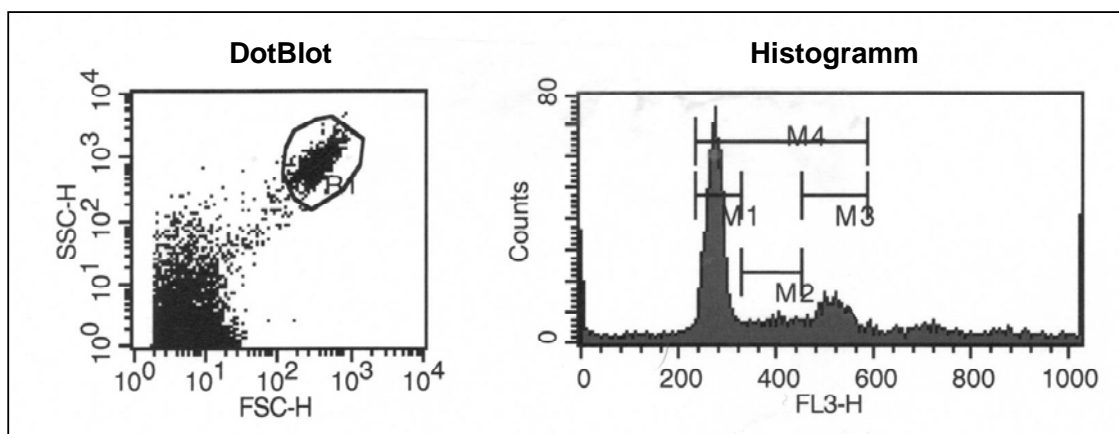
### IV.2.5.2 Nicoletti Färbung mittels Propidiumiodid

Zur Bestimmung der Apoptoserate von adhärennten Zellen, welche sich morphologisch nicht nach lebenden und apoptotischen Zellen unterscheiden lassen, wurde eine Färbung mit Propidiumiodid nach Nicoletti (1991) durchgeführt. Dazu wurde der Überstand der Zellen einer Zellkulturplatte in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbliebenen sedimentierten Zellen in der Zellkulturplatte wurden mit 200 µl Nicoletti-Puffer überschichtet und 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und durch Vortexen vermischt. Diesem Ansatz wurden 10 µl Propidiumiodid-Lösung zugesetzt, nochmals durch Vortexen vermischt und am FACScan bei abgegrenzter Kernpopulation die Fluoreszenzemission im roten Kanal gemessen. Dabei zeigte sich im Histogramm (Fluoreszenzintensität gegen Zellzahl) bei unbehandelten Zellen der charakteristische Doppelpeak des Zellzyklus. Bei zunehmender Fragmentation der DNA in Folge von zytotoxischen Stimuli stieg der Anteil an Kernen mit kleinerem Fluoreszenzsignal (‚sub G1 Peak‘)

linear zur Apoptoserate (s. Abb. 10). Aus dessen prozentualem Anteil konnte die spezifische Apoptose berechnet werden (s. Kapitel IV.2.5.1).

#### IV.2.6 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung

Eine Millionen JURKAT Zellen wurden in 15 ml Falcon-Reaktionsgefäßen pelletiert (1000 rpm, 5 min) und in 1 ml PBS resuspendiert. Diese wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, nochmals pelletiert (2000 rpm, 5 min) und in 1 ml 70%-igen Ethanol für 45 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in PI Mastermix (40 µg/ml Propidiumiodid und 100 µg/ml RNase in PBS) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung am FACScan. Dabei konnten Zellen in G0/G1-, S- und G2/M-Phase des Zellzyklus durch ‚gaten‘ voneinander abgegrenzt und deren prozentualer Anteil bestimmt werden (s. Abb. IV.2.6)



**Abb. 10:** Links: **DotBlot als Seitwärtsstreulicht (SSC-H) gegen Vorwärtsstreulicht (FSC-H)** mit R1-Gate von unbehandelten, Propidiumiodid gefärbten Leukämiezellen. Rechts: **Histogramm (FL-3-H: Rotkanal) der Zellen des R1-Gates mit typischem DNA-Doppelpeak.** Gate M4 beinhaltet alle Zellkerne mit normalem DNA-Gehalt, Gate M1 Zellen in der G0/G1-Phase mit einfachem DNA-Gehalt, Gate M3 Zellen der G2/M-Phase mit doppeltem DNA-Gehalt, dazwischen sind im Gate M2 Zellen in der S(ynthese)-Phase.

## IV.2.7 Proteinstudien

### IV.2.7.1 Präparation von Zellextrakten

#### IV.2.7.1.1 Nicht-fraktionierte Zelllyse

Zur Aufbereitung von zellulären Proteinen („whole cell lysate“) zur Western-Blot-Analyse wurden eine Millionen Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), in 1 ml PBS aufgenommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde dann in 500  $\mu$ l SDS-Lysepuffer mit 5  $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und 20 min auf Eis bei gelegentlichem Vortexen inkubiert. Der Ansatz wurde im nächsten Schritt per Ultraschall (5 Impulse à 0,5 sek) behandelt, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand 5 min bei 95°C im Schüttelinkubator denaturiert. Zur Western-Blot-Analyse wurden ca. 25  $\mu$ g Protein aufgetragen.

#### IV.2.7.1.2 Mitochondriale Fraktionierung

Zur Separation von zytosolischen und mitochondrialen Proteinen wurden mindestens drei Millionen Zellen mit PBS gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l Präparationspuffer mit 5  $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Der Lyseansatz wurde anschließend dreimal durch eine 25G Nadel passiert und 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und diente als zytosolische Fraktion. Das Pellet wurde in 50  $\mu$ l RIPA-Puffer resuspendiert und ebenfalls 20 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz diente als mitochondriale Fraktion. Zur Probenaufbereitung für die Western-Blot-Analyse wurden 8  $\mu$ l zytosolische Fraktion bzw. 4  $\mu$ l mitochondriale Fraktion mit 2  $\mu$ l bzw. 1  $\mu$ l 5xLämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C im Schüttelinkubator denaturiert.

#### IV.2.7.1.3 Nukleäre Fraktionierung

Zur Separation von zytosolischen und nukleären Proteinen wurden mindestens zwei Millionen Zellen mit PBS gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 400  $\mu$ l Kernpuffer A mit 4  $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Der Lyseansatz wurde anschließend 5 sek bei

13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und diente als zytosolische Fraktion. Das Pellet wurde in 40 µl Kernpuffer B mit 1 µl Nonidet P40 resuspendiert und ebenfalls 20 min auf Eis inkubiert. Nach weiteren 20 min Zentrifugation bei 13.000 rpm blieb dieser Überstand als nukleäre Fraktion. Zur Probenaufbereitung hinsichtlich Western-Blot-Analyse wurden 8 µl zytosolische Fraktion bzw. 4 µl nukleäre Fraktion mit 2 µl bzw. 1 µl 5xLämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C im Schüttelinkubator denaturiert.

#### IV.2.7.2 SDS-Proteinacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung individueller Proteinlevel in zellulären Lysaten wurden diese unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus Trenn- und Sammelgel, wobei sich beide v.a. in ihrer Acrylamidmix-Konzentration unterschieden. Das Trenngel wurde in folgender Reihenfolge pipettiert, vermischt und zwischen zwei Glasplatten des BioRad PAGE Systems gegossen:

Trenngel (15%ig): 1,7 ml H<sub>2</sub>O  
3,8 ml Acrylamidmix  
1,9 ml Gelpuffer A  
75 µl 20% SDS  
75 µl APS  
3 µl TEMED

Das Trenngel wurde mit 3 ml Wasser überschichtet, um einen ebenen, luftblasenfreien Übergang zum Sammelgel zu erhalten. Nach einer Polymerisationsphase von 30 min wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel aufgegossen:

Sammelgel (4%): 1,7 ml bidest. Wasser  
425 µl Acrylamidmix  
313 µl Gelpuffer B  
25 µl 20% SDS  
25 µl APS  
2,5 µl TEMED

Die neben eine Proteinmarkerspur geladenen Proben trennten sich zunächst ca. 10 min bei 80 V bis die blaue Lauffront sich an der Sammel/Trenngelgrenze gleichmäßig verteilt hatte und anschließend ca. 60 min bei 180 V bzw. bis die Lauffront das Gel vollständig verlassen hatte. Darauf folgte eine Western-Blot-Analyse.

#### IV.2.7.3 Western-Blot-Analyse

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennten Proteine konnten per Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Zunächst wurden drei Whatman Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und in eine Blotkammer eingebracht. Es folgte die kurz durch Methanol aktivierte und ebenfalls getränkte PVDF-Membran, das proteinhaltige Trenngel der SDS-PAGE und eine weitere Lage aus drei getränkten Whatman Filterpapieren. Der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte über 90 min bei 90 mA pro Gel. Die PVDF-Membran inkubierte anschließend 30 min bei RT in Blocklösung (5% Milchpulver in TBS/T) auf dem Kippschüttler. Zur Detektion des jeweiligen Proteins diente ein spezifischer Primärantikörper, der nach Herstellerangaben in TBS/T, Blocklösung oder TBS/T mit 5% BSA zwischen 1:5000 und 1:250 verdünnt wurde (s. Tab. 4). Die Membran inkubierte darin über Nacht bei 4°C auf dem Kippschüttler. Anschließend wurde sie dreimal in TBS/T je 10 min gewaschen. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnungsfaktor und -lösung wie Primärantikörper). Darauf wurde erneut dreimal in TBS/T je 10 min gewaschen. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase setzte eine ECL-Substratlösung in 2 min Inkubationszeit zu einem lumineszierenden Produkt um. Dieses belichtete während kurzer Exposition einen Röntgenfilm, der dann entwickelt, fixiert und getrocknet wurde.

#### IV.2.7.4 Caspase-3 und Cytochrom-C FACS-Assays

Zur Detektion von intrazellulärer Caspase-3-Aktivierung und Cytochrom-C-Freisetzung wurden eine Millionen JURKAT Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert und mit 1 ml PBS mit 1% BSA (PBS/BSA) gewaschen, d.h. Zellen wurden darin resuspendiert, bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde das Pellet in 100 µl PBS mit 4% Paraformaldehyd (PBS/PFA) resuspendiert, 20 min auf Eis fixiert und anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Im

nächsten Schritt wurde das Pellet in 200 µl PBS mit 0,2% Saponin resuspendiert und kurz durch Vortexen gemischt. Die Zellen wurden dann für zwei Minuten auf Eis inkubiert und mit PBS/BSA gewaschen. Das Pellet wurde durch Resuspension mit 50 µl PBS mit 10% MOPC 5 min bei Raumtemperatur blockiert, bevor entweder 20 µl Cytochrom-C-Antikörper bzw. Isotypkontrolle (frisch 1:20 in PBS verdünnt) oder 10 µl PE-konjugierter aktive Caspase-3 Antikörper (ebenfall frisch 1:20 in PBS verdünnt) zugegeben wurden (s. Kapitel IV.1.8). Diese Ansätze inkubierten 20 min auf Eis und wurden in PBS/BSA gewaschen. Die Zellen mit Cytochrom-C-Antikörper bzw. Isotypkontrolle wurden ein weiteres mal 20 min auf Eis mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert und erneut mit PBS/BSA gewaschen. Jedes Pellet wurde ein letztes mal in 200 µl PBS/PFA aufgenommen und am FACScan gemessen. Dabei kam es bei Caspase-3-Aktivierung zu einer Zunahme des roten Fluoreszenzsignals und bei Cytochrom-C-Freisetzung zu einer Abnahme des grünen Fluoreszenzsignals, da dieser Cytochrom-C-Antikörper konformationsspezifisch nur an die mitochondriale Form bindet.

#### IV.2.8 ‚Fractional product‘ Methode und statistische Analyse

Eine auf Enzymforschung basierende Methode, um den kombinierten Effekt von zwei oder mehr therapeutischen Wirkstoffen abschätzen zu können, wurde von Webb (1963) entwickelt und als ‚fractional product‘ Methode bezeichnet. Dabei gilt die Annahme, dass die Wirkstoffe unabhängig voneinander wirken. Der Kombinationseffekt kann kalkuliert werden durch Multiplikation der fraktionalen Restaktivität, die jeweils nicht durch den Wirkstoff beeinflusst wurde. Im Fall von Apoptoseinduktion ist diese Restaktivität die spezifische Überlebensrate, die ein zytotoxischer Wirkstoff unberührt lässt. Da die spezifische Überlebensrate leicht in spezifische Apoptoserate umgerechnet werden kann (spez. Überlebensrate + spez. Apoptoserate = 1), gilt für die Vorhersage der Kombination zweier zytotoxischer Wirkstoffe:

$$A_{1,2} = A_1 + A_2 - A_1 \times A_2$$

$A_{1,2}$ : kalkulierte spezifische Apoptoserate

$A_1$ : spezifische Apoptoserate induziert durch Wirkstoff 1

$A_2$ : spezifische Apoptoserate induziert durch Wirkstoff 2

Diese kalkulierte spezifische Apoptoserate wurde als Referenzwert zur statistischen Analyse der Apoptoseeffekte von Betulinsäure und Zytostatika herangezogen.

Ein Beispiel:

Wirkstoff 1 induzierte 20% (0,2) spezifische Apoptose in einer Leukämiezelllinie, Wirkstoff 2 dagegen 30% (0,3). Für die Kombination dieser beiden Wirkstoffe lässt sich nach Webb folgender Wert abschätzen:

$$A_{1,2} = A_1 + A_2 - A_1 \times A_2 = 0,2 + 0,3 - (0,2)(0,3) = 0,5 - 0,06 = \underline{0,44} \text{ (oder } \underline{44\%})$$

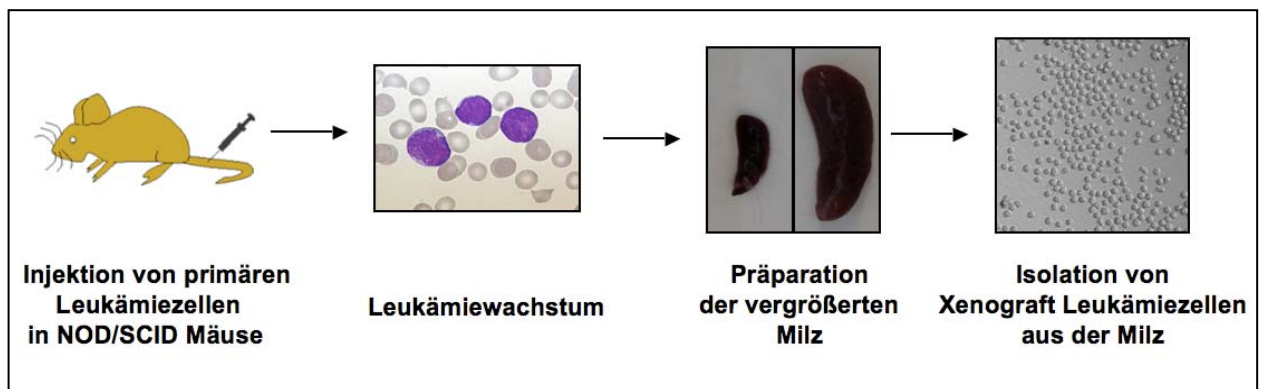
Übersteigt der gemessene spezifische Apoptosewert den Referenzwert von 44% um mindestens 10%, so wirkt die Kombination der Wirkstoffe 1 und 2 synergistisch. Unterschreitet der gemessene Wert den Referenzwert von 44% um mindestens 10%, so wirkt die Kombination antagonistisch. Liegt der gemessene Wert um 44%, wirken bei Substanzen additiv.

Für alle FACS-Messungen wurden Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte  $\pm$  SEM ('standard error of the mean', Standardfehler) dargestellt, wenn nicht anderweitig beschrieben. Um statistisch signifikante Unterschiede zweier Behandlungen zu ermitteln, wurde ein gepaarter t-test bzw. für multivariate Datenanalyse ein ONE WAY RM ANOVA mit Hilfe der Software SigmaStat durchgeführt (s. Kapitel IV.1.1). Dabei wurde ein Unterschied als statistisch signifikant bewertet (und mit \* gekennzeichnet) bei einem p-Wert  $< 0,05$ .

#### IV.2.9 Tiermodell

Der Arbeitsgruppe standen für dieses Projekt gemäß Ethikvotum der Ludwig-Maximilians-Universität München von 2006 (Stellungnahme vom 24.1.2006) und der Technischen Universität München von 2008 (2115/08) Reste von Knochenmarkpunktionen von Patienten mit kindlicher akuter Leukämie vor Therapiebeginn zur Verfügung. Diese wurden nach Durchführung der klinischen Routinediagnostik nicht mehr benötigt. Seit 2007 wurden bis zu 10 Millionen frische oder kryokonservierte, über Ficollgradienten gereinigte leukämische Blasten in NOD/SCID-Mäuse (ohne B- und T-Zellen und wenig NK-Zellaktivität; Shultz et al., 1995) intravenös appliziert (s. Abb. 11). Die Vermehrung dieser Zellen wurde per FACS-Detektion von human-CD45-positiven Zellen im Blut kontinuierlich verfolgt. Nach Einstellen erster Krankheitssymptome (z.B. Gewichtsverlust, Immobilität), in der Regel nach ein bis fünf Monaten, wurde ein Tier getötet.





**Abb. 11: Schema der Gewinnung von Xenograft Leukämiezellen in einem *in vivo* Mausmodell.** Dabei wurden NOD/SCID-Mäuse mit primären Patientenzellen inokuliert, das Wachstum der Leukämie verfolgt und nach Einstellung von Krankheitssymptomen das Tier geopfert. Aus der Milz erfolgte Isolation und Aufreinigung der amplifizierten Xenograft Leukämiezellen.

Die Xenograft Leukämiezellgewinnung erfolgte aus der Milz, wo bei Einstellung erster Symptome bereits >95% humane Leukämiezellen vorzufinden waren. Die Xenograft Zellen wurden über ein Zellsieb (Porengröße: 70  $\mu\text{m}$ ) in homogene Zellsuspension gebracht und über Ficollgradienten in mehreren Zentrifugationsschritten aufgereinigt (s. Kapitel IV.2.1.3). Die Zellausbeute variierte zwischen 25 und 1000 Millionen Zellen, was eine Expansionsrate aus dem Ausgangsmaterial von bis zu 500fach darstellte.

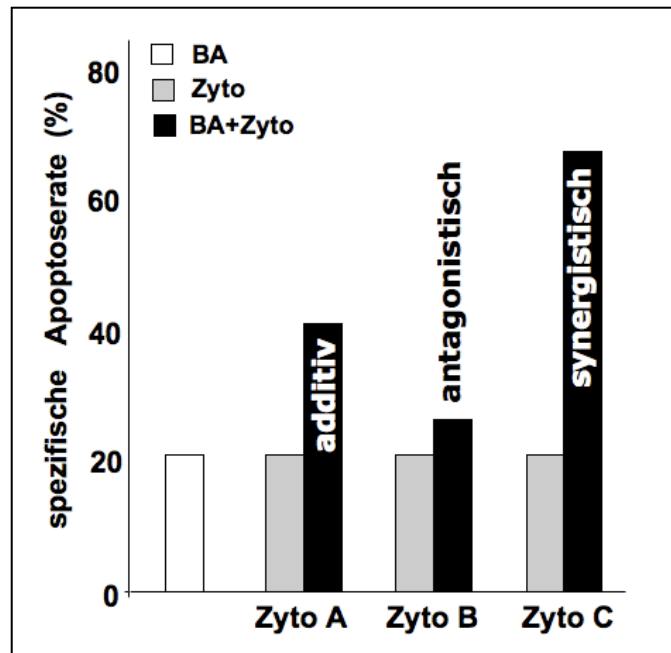
## V Ergebnisse

Leukämietherapie basiert auf dem Prinzip der Polychemotherapie, wobei chemotherapeutische Wirkstoffe aufeinander abgestimmt eingesetzt werden. Ein neuer Kandidat ist der Naturstoff Betulinsäure, der als Einzelsubstanz in verschiedenen Tumormodellen erfolgreich Zelltod induziert (s. Kapitel II.2).

Die Untersuchungen dieser Dissertation sollten klären, ob und an welche Stelle des Polychemotherapieprotokolls der Leukämiebehandlung Betulinsäure eingefügt werden sollte und welche Apoptose-Signalmechanismen dabei aktiviert werden. Zu diesem Zweck standen mehrere Tumorzellsysteme zur Verfügung: Zunächst wurden etablierte Tumorzelllinien von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren zur Analyse herangezogen. In einem zweiten Teil wurden primäre Leukämiezellen von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie untersucht.

### V.1 Untersuchungen auf Tumorzelllinien

Im ersten Versuchsteil dieser Dissertation sollten Chemotherapeutika und etablierte humane Tumorzellliniensysteme identifiziert werden, die sich für die Kombinationstherapie mit BA und die Erforschung der zu Grunde liegenden Apoptosesignaltransduktion eignen. Im Weiteren sollten in dieser Leukämiezelllinie die molekularen Grundlagen synergistisch wirkender BA-Kombinationen im Detail analysiert werden. Als synergistisch gilt eine Wirkung dann, wenn das Zusammenspiel zweier Agenzien deren Einzelwirkungen, in diesem Fall die Apoptoseinduktion durch Einzelstimulation, potenzieren (s. Abb. 12).



**Abb. 12: Beispiele für kombinierte Wirkung von Betulinsäure (BA) und Zytostatika (Zyto), dargestellt als fiktive Apoptoseanalyse.** Zytostatikum A (Zyto A) hat in Kombination mit BA additive Wirkung, da sich die Einzelwirkungen nach Webb (1972) summieren. Zytostatikum B (Zyto B) zeigt durch Kombination mit BA hemmende, antagonistische Wirkung. BA und Zytostatikum C (Zyto C) potenzieren ihre Einzelwirkungen, weisen so synergistische Apoptoseinduktion auf.

### V.1.1 Häufigkeit der synergistischen Apoptoseinduktion durch Kombination von Betulinsäure und Chemotherapeutika

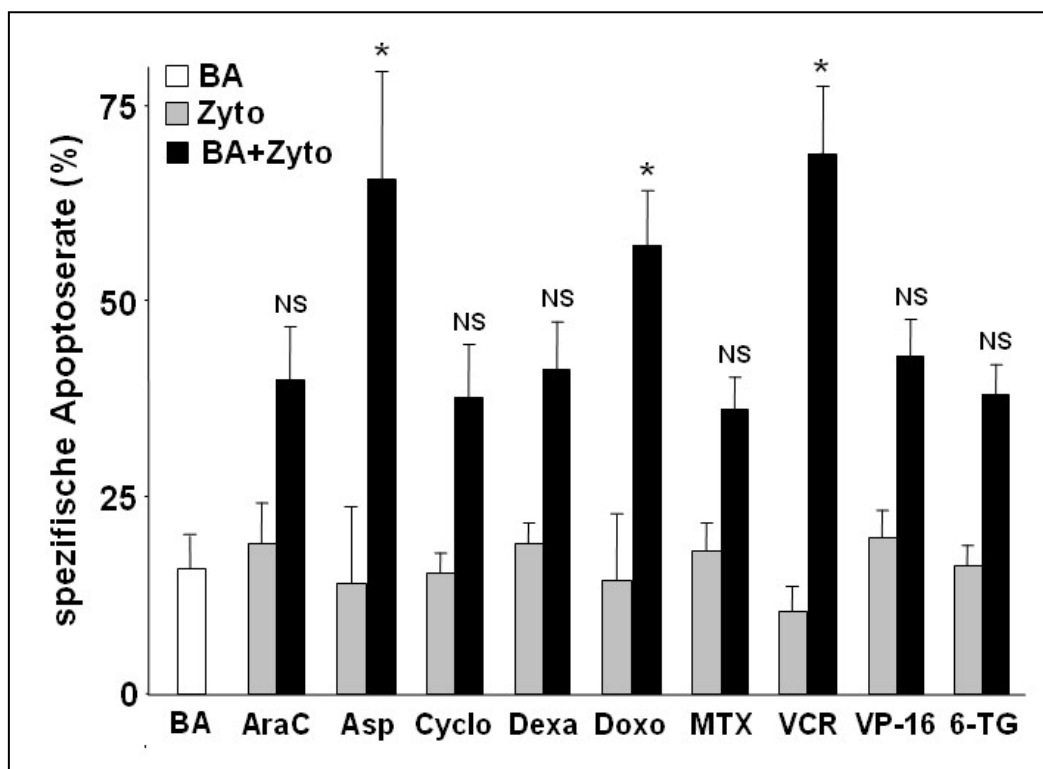
Zunächst stand die Bestimmung der Quantität optimaler, synergistischer BA-Kombinationen mit etablierten Chemotherapeutika im Vordergrund. Dabei sollten erst geeignete BA-Kombinationen in einer Leukämiezelllinie aufgedeckt werden, bevor diese auf einem weiten Spektrum etablierter Lymphom- und Leukämiezelllinien, sowie auf soliden Tumorzelllinien bestätigt werden konnten. Zusätzlich sollte in einem geeigneten *in vitro* Modell geklärt werden, ob BA in der Lage ist, erworbene Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika zu überwinden.

#### V.1.1.1 Synergistische Effekte verschiedener Chemotherapeutika und Betulinsäure auf JURKAT Leukämiezellen

Zunächst wurde untersucht, welche Zytostatika sich zur Kombination mit BA auf der T-ALL Zelllinie JURKAT eignen. Zur experimentellen Klärung dieser Frage wurden neun verschiedene etablierte Zytostatika der Leukämiebehandlung (Asparaginase,

Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, 6-Thioguanin, Vincristin und Zytarabin) ausgewählt und einzeln bzw. in Kombination mit BA auf JURKAT Zellen für 72h inkubiert (s. Abb. 13). JURKAT Zellen sind eine etablierte Leukämiezelllinie und stammen von einem 14jährigen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) bei erstem Rezidiv aus dem Jahr 1976 ab. Um die Präsenz einer synergistischen Wirkung zu erkennen, wurden die Dosierungen so gewählt, dass eine spezifische Apoptoserate von maximal 40% bei Einzelstimulation erzielt wurde.

Dabei zeigte sich für die Kombination von Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin Apoptoseinduktion in höherem Maße als durch Summation der Einzeleffekte. Die Kombinationen von BA mit Zytarabin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Etoposid, Methotrexat oder 6-Thioguanin bewirkten additive Effekte.



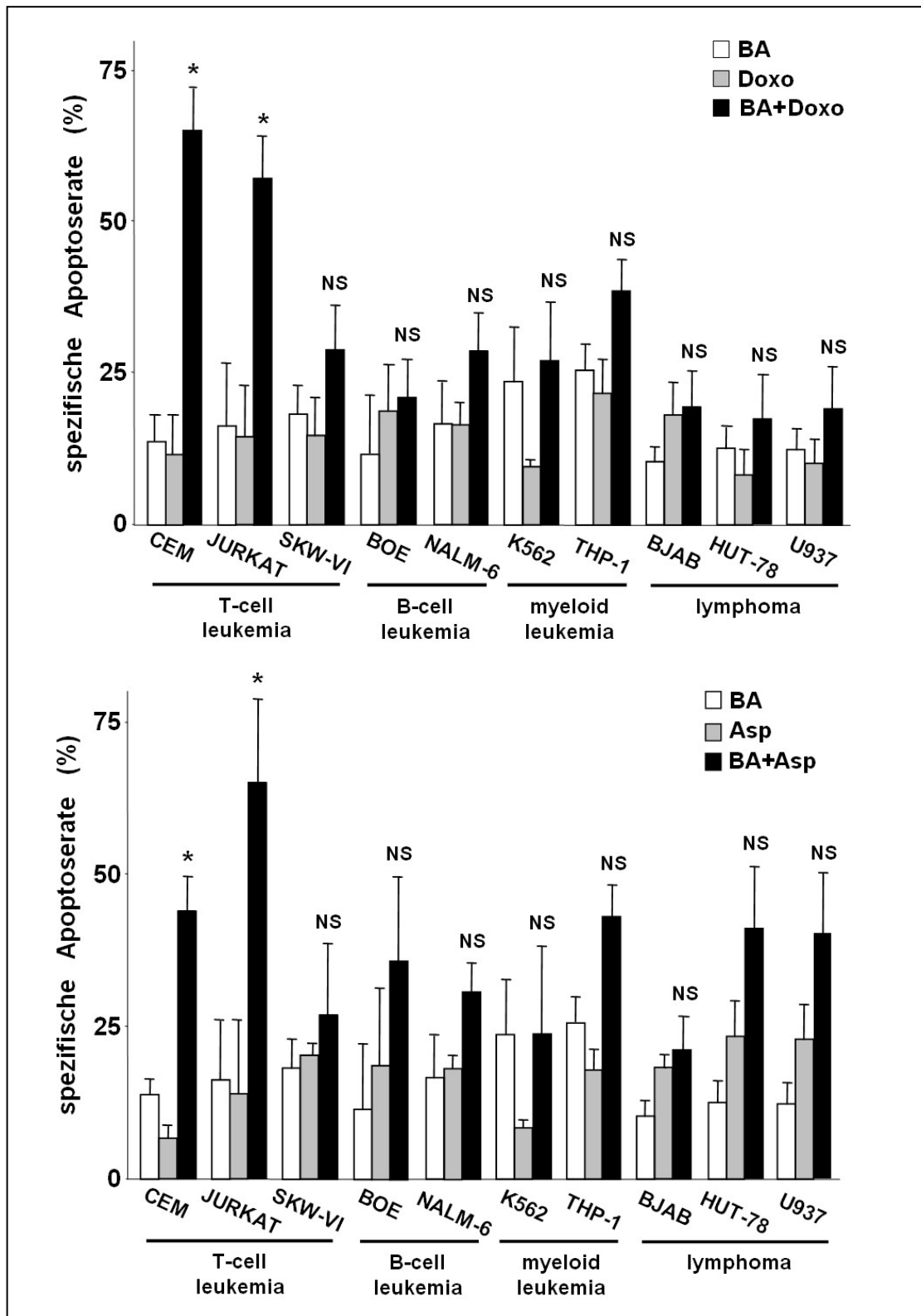
**Abb. 13: FSC/SSC-Apoptoseanalyse zur Untersuchung von synergistischer Apoptoseinduktion in JURKAT Leukämiezellen.** Diese wurden 72h stimuliert mit Zytarabin (AraC, 20 µM), Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml), Cyclophosphamid (Cyclo, 2 µM), Dexamethason (Dexa, 100 µM), Doxorubicin (Doxo, 20 nM), Methotrexat (MTX, 5 nM), Vincristin (0,5 nM), Etoposid (VP-16, 0,2 µM), 6-Thioguanin (6-TG, 0,2 µM), Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und der Kombination von Zytostatikum (Zyto) und BA. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

Für weitere Untersuchungen wurden daher die Chemotherapeutika Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin als Kombinationskandidaten ausgewählt. Doxorubicin ist dabei ein wichtiger Repräsentant der Familie der Anthrazykline und findet in vielen Therapieprotokollen von diversen Tumorerkrankungen Anwendung (Geffen und Man, 2002).

#### V.1.1.2 Synergistische Apoptoseinduktion auf anderen Leukämie- und Lymphomzelllinien

Neben JURKAT Zellen wurden neun weitere Leukämie- und Lymphomzelllinien von unterschiedlichem Typ mit den Chemotherapeutika Doxorubicin oder Asparaginase und Betulinsäure koinkubiert, um die synergistische Wirksamkeit dieser Kombinationen auf weiteren Tumorzellsystemen zu testen. JURKAT und CEM Zellen stammen je von Jugendlichen mit akuter lymphatischer T-Zellleukämie (ALL) ab. Die anderen untersuchten Zelllinien entstammen einer nicht weiter charakterisierten T-Zellleukämie (SKW-VI), B-Zellleukämien (BOE, NALM-6), Leukämien myeloischen Ursprungs (K562, THP-1) oder Lymphomen (BJAB, HUT-78, U937).

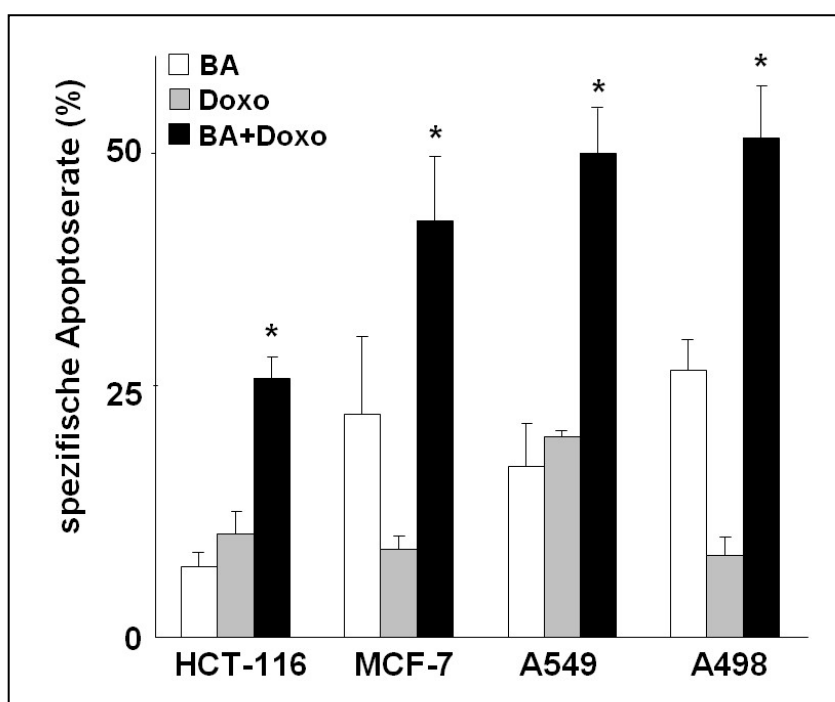
Kombination von Doxorubicin oder Asparaginase und BA induzierte synergistischen Zelltod im Vergleich zur Summation der Einzeleffekte in JURKAT Zellen (s. Abb. 13) und auch in CEM Zellen. Auf den weiteren Zelllinien zeigten diese Kombinationen additive Apoptoseinduktion, aber keine negative Interaktion (s. Abb. 14).



**Abb. 14: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von zehn Leukämie- und Lymphomzelllinien unterschiedlichen Typs.** Diese wurden 72h stimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinensäure (BA, 1 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

## V.1.1.3 Synergistische Apoptoseinduktion auf soliden Tumorzelllinien

Neben Leukämie- und Lymphomzelllinien wurden Zelllinien von soliden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs mit Doxorubicin und Betulinsäure koinkubiert. Dabei sollte die generelle Relevanz der auf Leukämiezelllinien gezeigten synergistischen Apoptoseinduktion für die Tumorthherapie geklärt werden. Dabei kam exemplarisch nur die Kombination von Doxorubicin und Betulinsäure zum Einsatz, da Asparaginase exklusiv in Leukämitherapieprotokollen und Vinkalkaloide deutlich seltener als Anthrazykline in der Therapie solider Tumore eingesetzt werden.



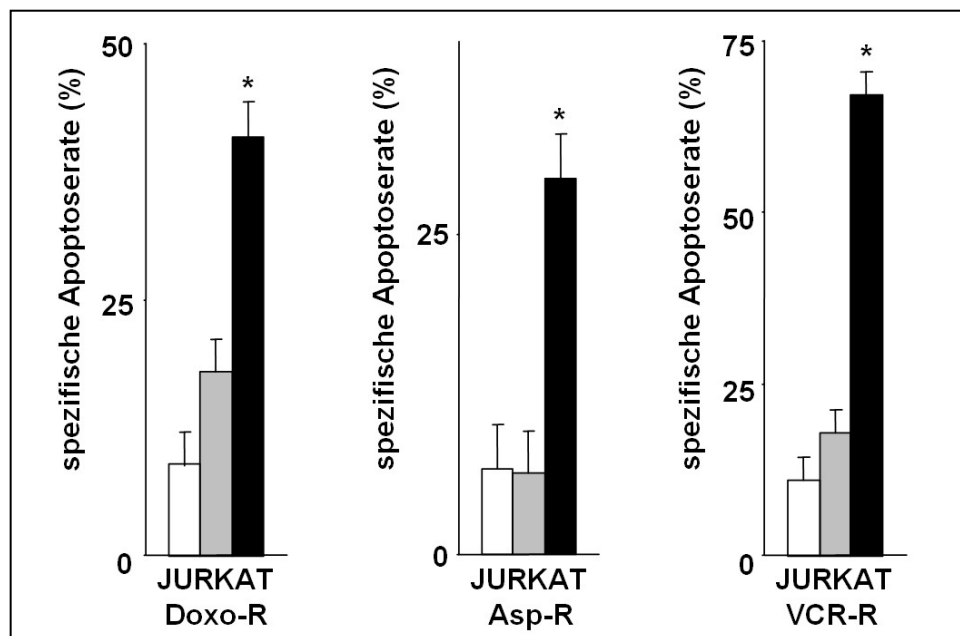
**Abb. 15: Nicoletti-Apoptoseanalyse für die Kombination von Doxorubicin (Doxo, 0,5  $\mu$ M) und Betulinsäure (BA, 3  $\mu$ g/ml) auf vier adhärenenten Tumorzelllinien.** Diese sind unterschiedlichen geweblichen Ursprungs (HCT-116: Kolonkarzinom, MCF-7: Mamma-karzinom, A549: Lungenkarzinom und A498: Nierenkarzinom) und wurden 96h einzel- und koinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten; \* $p$ <0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963).

Aufgrund der höheren Apoptoseresistenz solider Tumorzelllinien wurden die Zytostatikadosierungen höher gewählt als bei den Leukämiezelllinien, sie lagen aber weiterhin unter dem humanen therapeutischen Plasmakonzentrationsbereich. Dies ist das Konzentrationsniveau eines Wirkstoffs, das maximal nach Applikation im menschlichen Körper erreicht werden kann bevor Abbauprozesse einsetzen.

Signifikante synergistische Apoptoseinduktion konnte so auf der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116, der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, der Lungenkarzinomzelllinie A549 und der Nierenkarzinomzellen A498 gezeigt werden (s. Abb. 15). Kein synergistischer Effekt zeigte sich auf den Zelllinien HT29 (Kolonadenokarzinom), KELLY und SHEP (Neuroblastom).

#### V.1.1.4 Synergistische Wirkung im Fall von erworbener Zytostatika-Resistenz

BA zeigte als Einzelsubstanz im Fall eines Tumorrezidivs oder bei Zytostatika-Resistenz viel versprechende Wirksamkeit (Ehrhardt et al., 2004). In einem Leukämiezelllinienmodell der erworbenen Zytostatika-Resistenz (s. Kapitel IV.2.1.2) sollte nun die Frage geklärt werden, ob auch hier Synergismus durch Kombination mit BA auftrat.



**Abb. 16: FSC/SSC-Apoptoseanalyse zur Untersuchung von synergistischer Apoptoseinduktion in JURKAT Leukämiezelllinien mit erworbener Resistenz** (Doxorubicin-resistent: Doxo-R, Asparaginase-resistent: Asp-R, Vincristin-resistent: VCR-R). Diese Zellen wurden entsprechend mit Doxorubicin (Doxo, 0,5 µM, links in grau), Asparaginase (Asp, 1 U/ml, zentral in grau) oder Vincristin (VCR, 300 nM, rechts in grau) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml, je in weiß) und der Kombination von Zytostatikum und BA (je in schwarz) für 72h stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963).



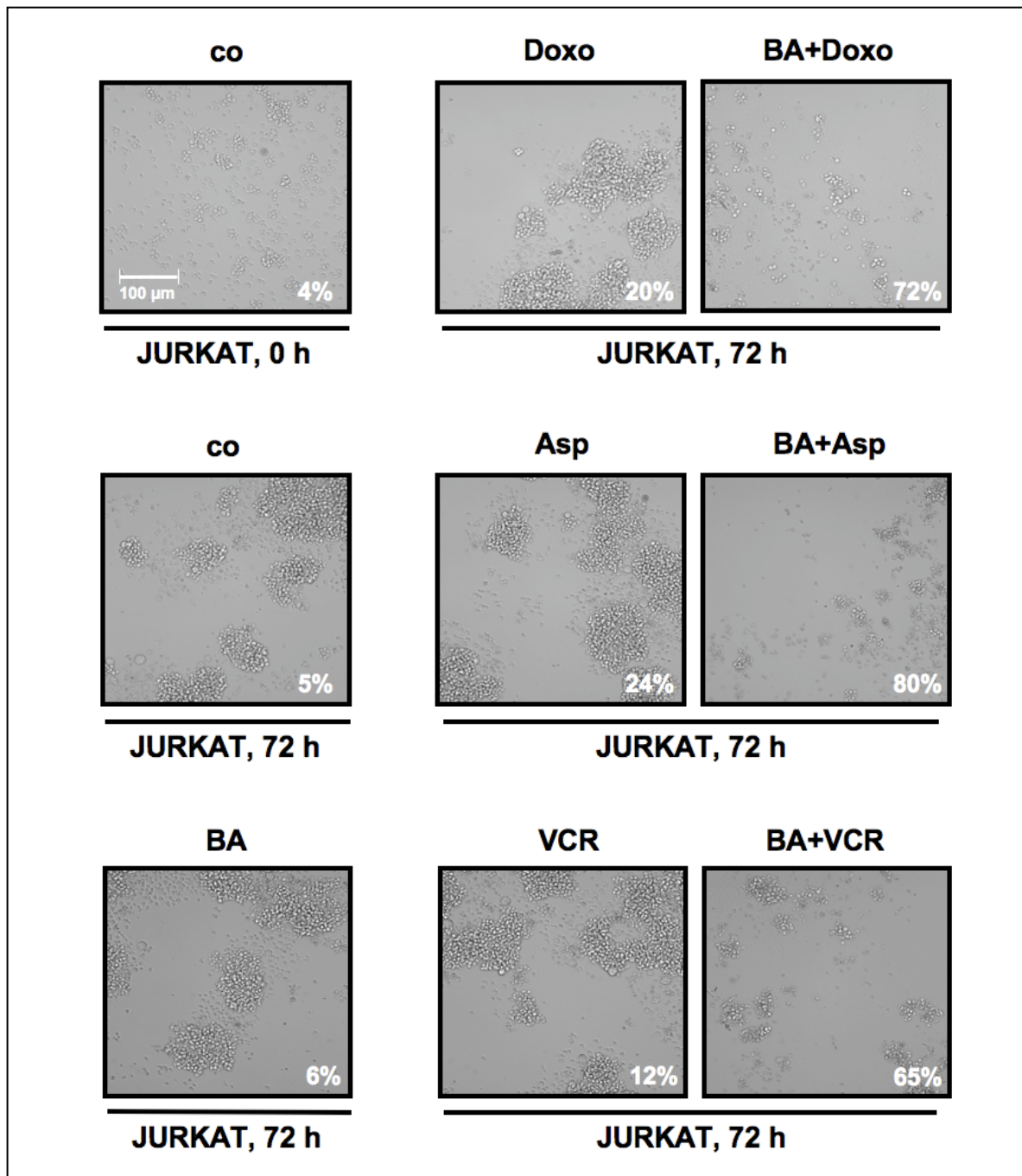
Wie in Abbildung V.1.1.4 zu sehen, konnte in Zytostatika-resistenten Zellen durch Koinkubation mit BA und dem jeweiligen Chemotherapeutikum (in maximaler humaner Plasmakonzentration, s. Kapitel V.1.1.3) synergistische Apoptoseinduktion induziert werden, so dass diese Resistenzmechanismen überwunden wurden.

Zusammengefasst konnte durch die Untersuchungen in Kapitel V.1.1 gezeigt werden, dass Behandlung mit Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin in Kombination mit Betulinsäure zu gesteigerter Apoptoseinduktion in T-Zell-Leukämiezellen (JURKAT und CEM) und - im Fall von Doxorubicin - in soliden Tumorzellen führen konnte. Außerdem konnte die Kombination von BA und je einem der drei Zytostatika Resistenz gegen Asparaginase, Doxorubicin bzw. Vincristin in JURKAT Zellen überwinden.

#### V.1.2 Hemmung des Wachstums von JURKAT Leukämiezellen nach Kombination von Betulinsäure und Chemotherapeutika

Als weiteres klinisch relevantes Kriterium neben der effektiven Apoptoseinduktion sollte der Einfluss der Kombinationstherapie auf das erneute Wachstum von Leukämiezellen untersucht werden. Dazu wurden JURKAT Leukämiezellen zu Beginn und nach 72-stündiger Inkubation mit Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin und BA per digitaler Photographie dokumentiert (s. Kapitel IV.2.4).

Es entstanden über Zeit Multizellkolonien aus Einzelzellen, sog. 'colony forming units' (CFU) in Ansätzen mit unbehandelten Zellen und zum Teil in reduzierter Zahl und Größe im Fall der niedrig dosierten Einzelstimuli. Nur vereinzelt, minimales Wachstum in Kolonieform trat dagegen für jede Kostimulation aus Chemotherapeutikum und Betulinsäure ein (jeweils rechtes Bild in Abb. 17). Somit wurden sowohl die Zahl als auch die Größe neu gebildeter Kolonien durch Kostimulation vermindert.



**Abb. 17: Wachstumshemmung von JURKAT Leukämiezellen nach BA-Zytostatika-Kostimulation.** Zellen wurden einzel- und kostimuliert (wie in Abb. V.1.1.1 beschrieben), um Wachstum dieser Zellen über 72h mittels digitaler Photographie zu dokumentieren. Die Ausgangssituation zu Versuchsbeginn (co bei 0h) gibt der Bildausschnitt oben links wieder. Gezeigt ist ein repräsentativer Bildausschnitt von acht Bildausschnitten pro Vertiefung in 100facher Vergrößerung. Angegebene Prozentangaben repräsentieren absolute Apoptoseraten einer nachfolgend durchgeführten FSC/SSC-Apoptoseanalyse derselben Probe.

Diese Beobachtung zeigte neben einem zytotoxischen Effekt zusätzlich eine zytostatische Wirkung der Kombinationstherapie mit Betulinsäure. Hinsichtlich Patiententherapie von Leukämien ist diese Zweifachwirkung auf Tumorzellen sehr von Vorteil, da sowohl Zellwachstum wie -viabilität effektiv inhibiert werden kann.

### V.1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion der synergistischen Apoptoseinduktion

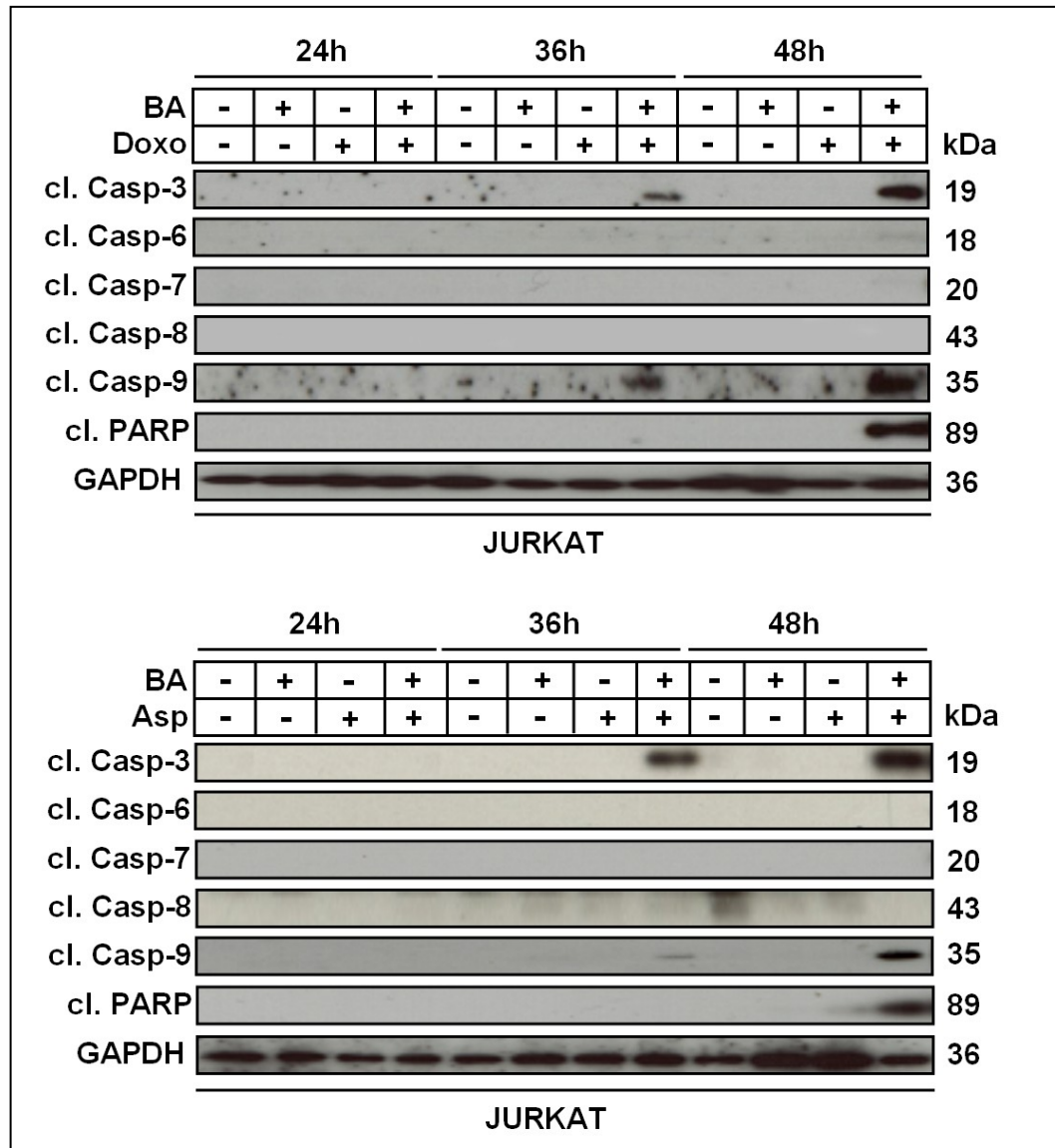
Betulinsäure und Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin führten also zu synergistischer Apoptoseinduktion in sensitiven T-Zell-Leukämiezelllinien und soliden Tumorzelllinien sowie resistenten Leukämiezellen. Es schloss sich die Frage an: Welche intrazellulären pro-apoptischen Signalprozesse wurden durch diese Kombinationen von BA und Zytostatika aktiviert?

Um diese Frage detailliert zu klären, wurden zunächst distale Ereignisse der apoptotischen Signalkaskade untersucht, um eine potentielle Signalblockade zu erkennen. Diese könnte bei Einzelstimulation nicht überwindbar sein, aber durch BA-Kombination aufgehoben werden, was synergistische Apoptoseinduktion erklären kann. Dem intrinsischen Signalweg revers folgend wurden intrinsische Apoptoseereignisse rund um das Mitochondrium unter Miteinbeziehung von Faktorfreesetzung aus dem Intermembranraum und der BCL-2 Mitglieder betrachtet. Final wurde analysiert, ob Kostimulation Einfluss auf die Kontrolle des Zellzyklus hat. Dabei werden nur Ergebnisse der Kombination mit Doxorubicin bzw. Asparaginase gezeigt. Die Prinzipien bestätigten sich funktional auch im Fall von Vincristin.

#### V.1.3.1 Distale Aktivierung von Caspasen

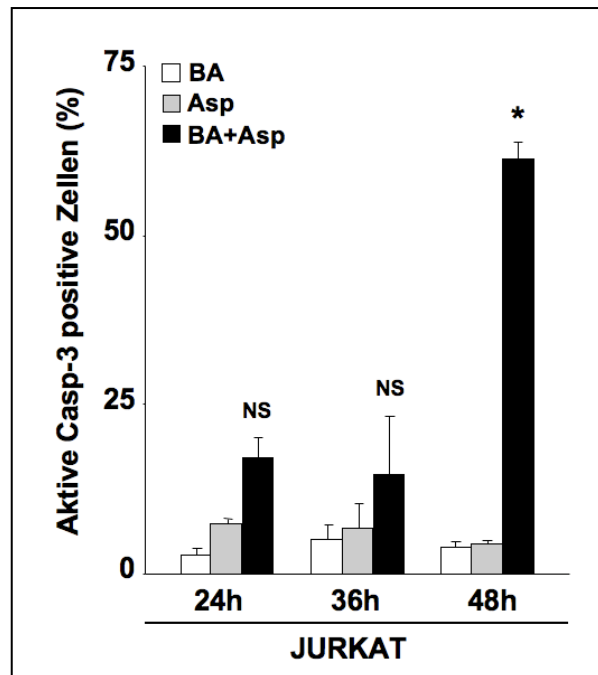
Typisch für den Vorgang der Zytostatika-induzierten intrinsischen Apoptose ist die Miteinbeziehung Cystein-abhängiger Proteinasen, sog. Caspasen, welche kaskadenartig aktiviert werden und den Aktivitätsstatus weiterer zellulärer Proteine durch Spaltung ändern (MacKenzie und Clark, 2008). In den meisten Fällen erfolgt nach Freisetzung mitochondrialer Faktoren wie Cytochrom-C zunächst Aktivierung von Caspase-9 als Bestandteil des Apoptosoms (mit APAF-1), welche dann Caspase-3, -6 und -7 als sog. Effektorcaspasen aktiviert.

Um die Rolle dieser Proteine bestimmen zu können, wurden per Western-Blot-Analyse aktive Spaltprodukte dieser Caspasen in einer Kinetik detektiert. In einer alternativen Messmethode wurde per FACS-Analyse Aktivierung von Caspase-3 durch Asparaginase- und BA-Kostimulation über Zeit verfolgt.



**Abb. 18: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zum Nachweis von Caspasenaktivität.** Diese wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und nach angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die primären Antikörper detektierten spezifisch die aktiven Spaltprodukte von Caspasen (cl. Casp = 'cleaved caspase') und PARP. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Dabei zeigte sich für die kombinierte Applikation von Doxorubicin- oder Asparaginase mit BA Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung frühestens nach 36h, während Caspase-6, -7 und -8 auch nach prolongierter Inkubation keine Spaltung und damit Aktivierung aufwiesen. Zusätzlich wurde als ein typisches Zielprotein von Caspasen und Ausdruck der Effektorfunktion im Rahmen der Zelltodinduktion nukleäres PARP nach 48h gespalten (s. Abb. 18 bzw. Abb. 19).



**Abb. 19: FACS-Analyse zum intrazellulären Nachweis von aktiver Caspase-3.** JURKAT Zellen wurden über 48h einzel- und kostimuliert mit Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml) und Betulinsäure (BA, 1  $\mu$ g/ml). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten; \* $p < 0,05$  (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

Um zu klären, ob verstärkte Caspasenaktivierung zur synergistischen Apoptose-induktion zwingend notwendig ist, wurden diese Proteine in JURKAT Zellen blockiert. Dies gelang biochemisch durch den irreversiblen Pan-Caspase-Inhibitor qVAD und alternativ durch Überexpression des zelleigenen Caspase-Inhibitorproteins XIAP (s. Abb. 21). XIAP blockiert als anti-apoptotisches IAP-Protein die katalytische Aktivität der Caspasen-3, -7 und -9 und besitzt Ubiquitylierungsfunktion, wodurch blockierte Caspasen durch das Proteasom degradiert werden.

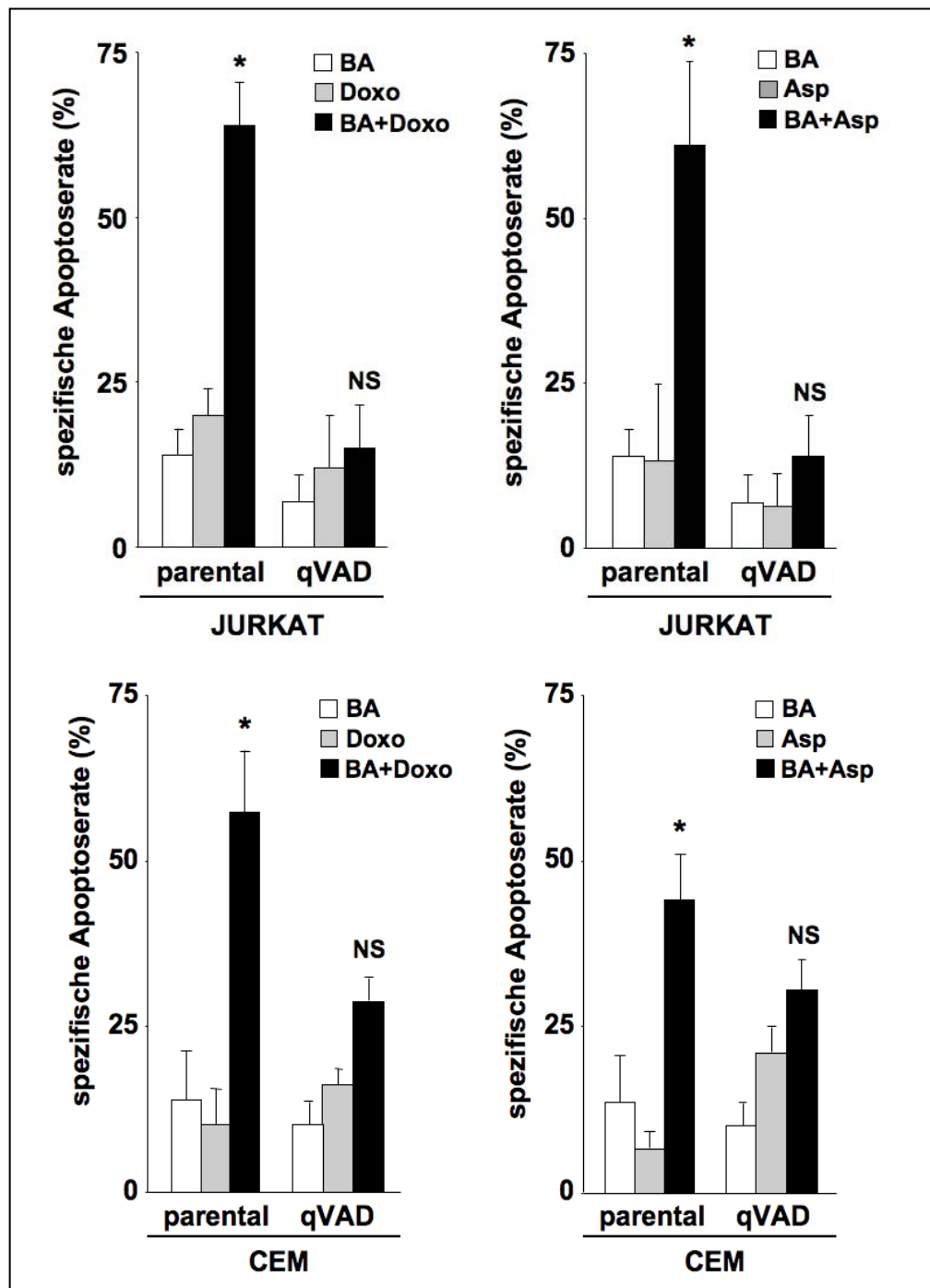
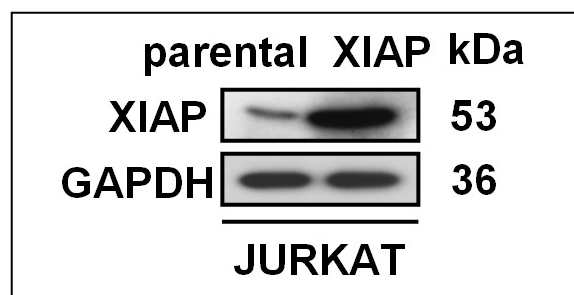


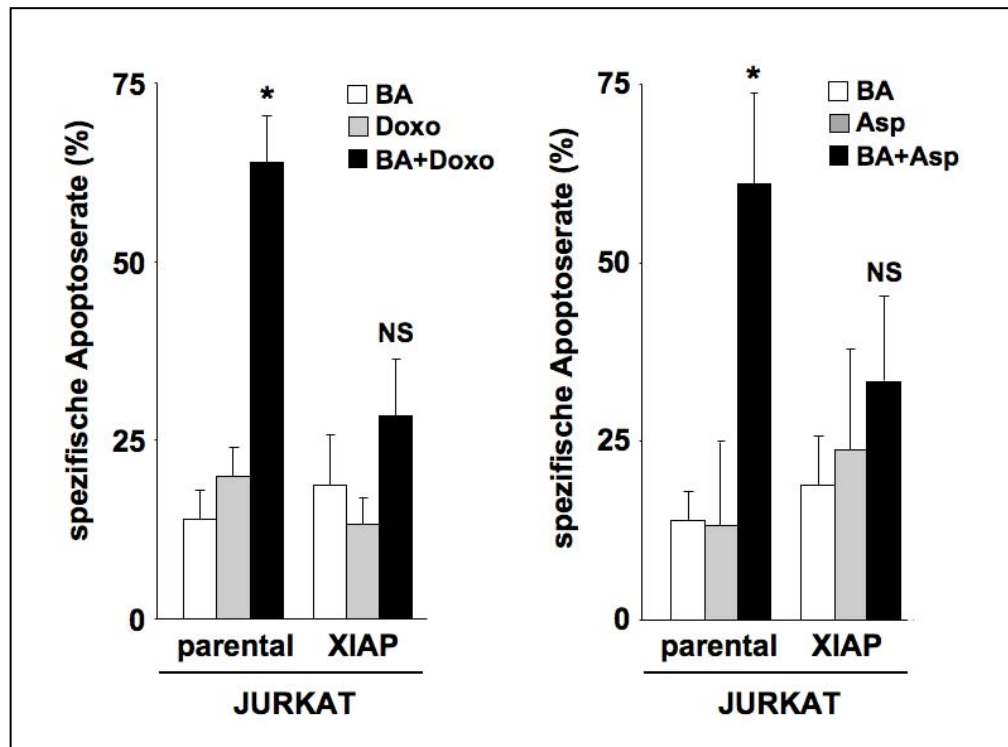
Abb. 20: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen und mit dem Caspasen-Inhibitor qVAD vorbehandelten JURKAT und CEM Zellen (qVAD: 50  $\mu$ M; 6h Vorinkubation). Alle Zelllinien wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; JURKAT: 20 nM; CEM: 10 nM), oder Asparaginase (Asp; JURKAT und CEM: 0,2 U/ml) und Betulinsäure (BA; JURKAT: 1  $\mu$ g/ml; CEM: 1,5  $\mu$ g/ml) und 72 h inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

Es zeigte sich nach Vorbehandlung mit qVAD, dass Caspasenaktivierung Voraussetzung für synergistische Apoptoseinduktion durch Doxorubicin oder Asparaginase mit BA war: qVAD-vorbehandelte JURKAT Zellen zeigten keine verstärkte Apoptoseinduktion nach kombinierter Stimulation. Eine weitere Leukämiezelllinie mit synergistischer Apoptoseinduktion nach BA-Kostimulation mit Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin, CEM Zellen, wurde zur Verifizierung der Untersuchungen auf JURKAT Zellen im Sinne einer generellen Signifikanz des synergistischen Effektes herangezogen. Derart Caspasen-inhibierte CEM Zellen zeigten ebenfalls keine synergistische Apoptoseinduktion nach 72stündiger Kostimulation (s. Abb. 20).



**Abb. 21:** Western-Blot-Analyse von parentalen JURKAT Zellen (parental) und derivativen, stabil XIAP-überexprimierenden JURKAT Zellen (XIAP) auf XIAP Expression. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Durch Überexpression von XIAP konnte in einem alternativen molekularen Ansatz gezeigt werden, dass eine solche Inhibierung der Caspasenaktivität den synergistischen Phänotyp unterdrückt (s. Abb. 22). Dabei wurden in einem Vorexperiment zunächst gleiche Zytostatikadosierungen für parentale und derivative XIAP-überexprimierende JURKAT Zellen eingesetzt. Diese Stimulation zeigte jedoch im Gegensatz zu parentalen JURKAT Zellen keinen Apoptoseeffekt auf derivativen JURKAT Zellen, da sie durch Überexpression eines anti-apoptischen Proteins (bzw. eines Inhibitors eines pro-apoptischen Proteins) verstärkte Apoptoresistenz aufwiesen. Um einen zu parentalen JURKAT Zellen vergleichbaren Apoptoseeffekt durch Einzelstimulation zu erhalten, wurden in diesem wie in den folgenden Experimenten in derivativen Zelllinien entsprechend höhere Zytostatikadosierungen eingesetzt, so dass vergleichbare Apoptoseraten nach Einzelstimulation wie auf parentalen Zellen erzielt wurden.



**Abb. 22: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen und derivativen XIAP-über-exprimierenden JURKAT Zellen (XIAP).** Alle Zelllinien wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental: 20 nM; XIAP: 50 nM; links) oder Asparaginase (Asp; parental: 0,2 U/ml; XIAP: 0,5 U/ml; rechts) und Betulinsäure (BA; parental: 1 µg/ml; XIAP: 1,5 µg/ml) und 72 inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

Bei analogen Experimenten mit dem Zytostatikum Vincristin bestätigte sich die Abhängigkeit der synergistischen Apoptoseinduktion von Caspasenaktivierung.

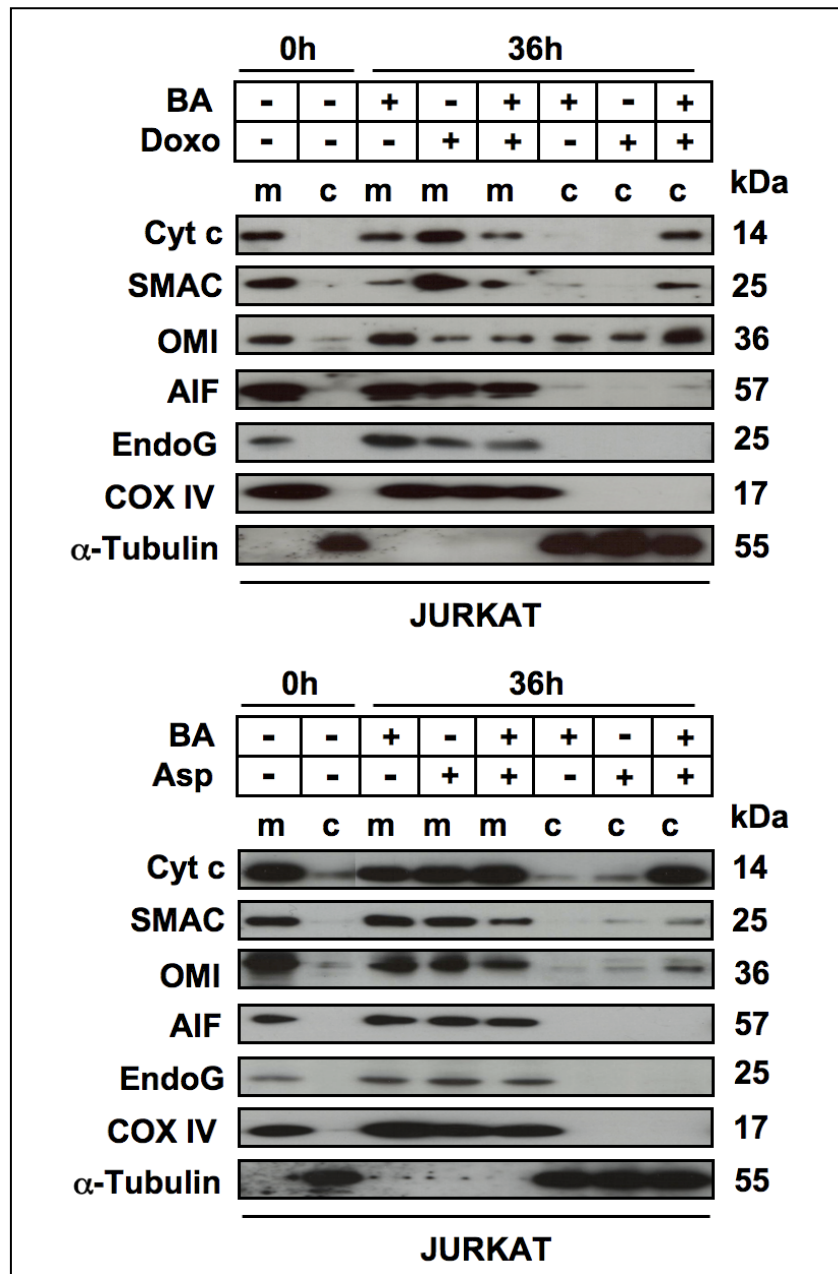
Zusammenfassend konnte für die distale Apoptosesignaltransduktion gezeigt werden, dass selektiv Caspase-9 und Caspase-3 nach Kostimulation von BA und Doxorubicin oder Asparaginase auf JURKAT Zellen aktiviert wurden. Diese Caspasenaktivierung war essentielles Ereignis für synergistischen Zelltod in Folge dieser Kostimulation, da Caspaseninhibition den Effekt blockierte.

### V.1.3.2 Freisetzung von mitochondrialen Faktoren

Klassischerweise erfolgt die Stimulation der Exekutionsphase des intrinsischen Apoptosesignalwegs durch Freisetzung von Apoptose-vermittelnden Faktoren aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Zu diesen zählen Cytochrom-C, ein Protein der Atmungskette, welches mit Pro-Caspase-9 und APAF-1 zum sog. Apoptosom komplexiert und dadurch weitere Caspasen aktiviert. Eine zweite Klasse



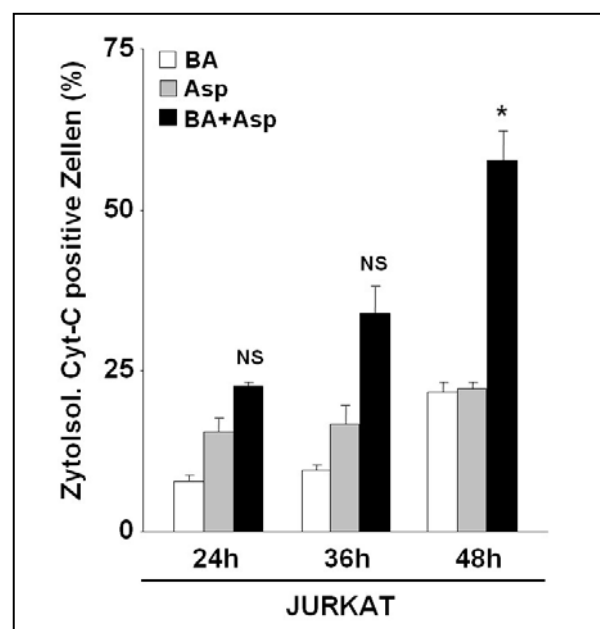
von freigesetzten pro-apoptotischen Proteinen, SMAC und OMI, inhibieren direkt die blockierende Interaktion von IAP Proteinen und Caspasen über Interferenz der blockierenden Domäne (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Zwei weitere Faktoren, Endonuclease G und AIF, wirken nach Freisetzung Caspasen-unabhängig direkt im Kern und führen zur Degeneration von DNA-Strängen und nukleären Proteinen.



**Abb. 23: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zur Detektion der Freisetzung von mitochondrialen Faktoren.** Zellen wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1  $\mu$ g/ml) und zu den angegebenen Zeitpunkten, getrennt in zytosolische und mitochondriale Fraktionen, lysiert. Primäre Antikörper detektierten mitochondriale pro-apoptotische Faktoren (Cyt C, SMAC, OMI, AIF und EndoG). Als Ladekontrolle dienten COX IV für mitochondriale Fraktionen (m) und  $\alpha$ -Tubulin für zytosolische Fraktionen (c).

Um zu beurteilen, welche dieser Faktoren bei synergistischer Apoptoseinduktion eine Rolle spielen, erfolgte eine getrennte Untersuchung der zytosolischen und mitochondrialen Zellfraktion, um die Freisetzung von Cytochrom-C, SMAC, OMI, Endonuclease und AIF aus dem Mitochondrium ins Zytosol detektieren zu können. Bei mitochondrialer Freisetzung eines dieser Proteine sinkt dessen Level in der mitochondrialen und steigt in der zytosolischen Fraktion. Dies war in JURKAT Zellen für Cytochrom-C, SMAC und OMI bei Kombination von Doxorubicin oder Asparaginase und BA nach 36h der Fall, nicht jedoch für AIF und Endonuclease G (s. Abb. 23).

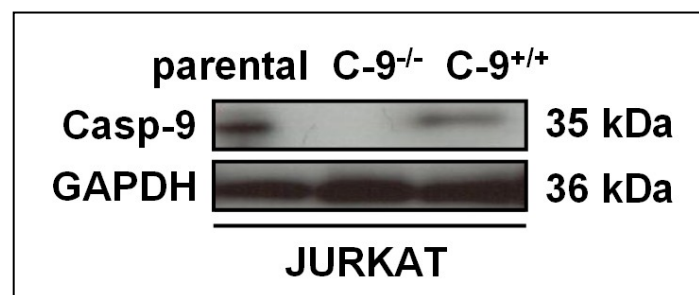
Um die Freisetzung von Cytochrom-C bei Kombination von Asparaginase und BA mittels einer zweiten unabhängigen Methode intrazellulär nachzuweisen, wurden JURKAT Zellen per FACS-Analyse mit einem spezifischen Primärantikörper gegen mitochondriales Cytochrom-C inkubiert. Dieser konformationsspezifische Antikörper bindet nur an die mitochondriale Form von Cytochrom-C, somit kann bei Cytochrom-C-Freisetzung eine Abnahme des Fluoreszenzsignals über Zeit detektiert werden. Es zeigte sich ein Anstieg der zytosolischen Cytochrom-C-Rate nur für die Kostimulation von Asparaginase und BA bereits nach 24h, ein signifikanter Unterschied zur Addition der Einzeleffekte jedoch erst nach 48h (s. Abb. 24).



**Abb. 24: FACS-Analyse zur Freisetzung von Cytochrom-C** mittels konformationsspezifischem Antikörper. JURKAT Zellen wurden einzel- und kostimuliert mit Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml) und Betulinsäure (BA, 1  $\mu$ g/ml). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten; \* $p < 0,05$  (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

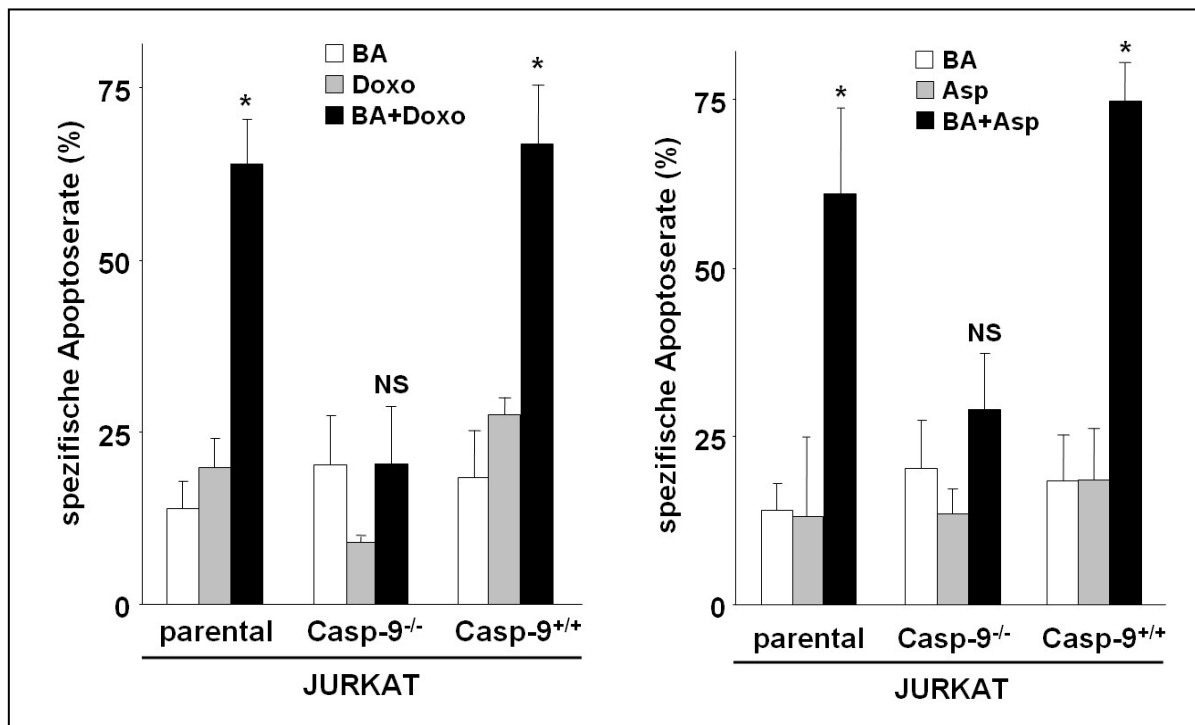
Als primär durch Cytochrom-C-Freisetzung aktivierte Caspase des intrinsischen Signalweges, sollte die Rolle von Caspase-9 zur synergistischen Apoptoseinduktion näher untersucht werden. Ist dessen Initiatorfunktion bei der Aktivierung anderer Caspasen essentiell und ist die Ausbildung des Apoptosoms Voraussetzung für den gezeigten Phänotyp?

Zur Klärung dieser Frage standen diesem Projekt derivative JURKAT Zellen mit autosomalem Caspase-9-Defekt zur Verfügung. Als spezifische Kontrolle wurde in diesen Caspase-9-defizienten JURKAT Zellen Caspase-9 per Vektor re-exprimiert (s. Abb. 25).



**Abb. 25:** Western-Blot-Analyse von parental JURKAT Zellen (parental), derivativen Caspase-9 negativen JURKAT Zellen (C-9<sup>-/-</sup>) und Caspase-9 re-exprimierenden JURKAT Zellen (C-9<sup>+/+</sup>) auf Caspase-9 (Casp-9) Expression. GAPDH diente als Ladekontrolle.

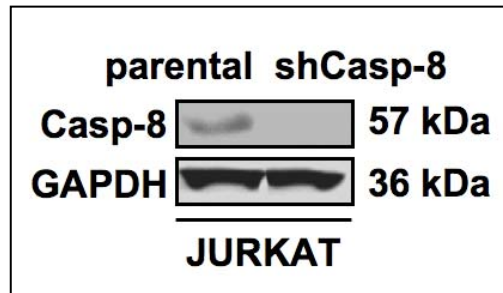
Diese Zelllinien wurden zu gleichen experimentellen Bedingungen wie in Kapitel V.1.3.1 stimuliert. Dabei war der Verlust von Caspase-9 verbunden mit dem Verlust der synergistischen Wirkung bei Kombinationstherapie für alle getesteten Kombinationen (s. Abb. 26). Somit ist die komplette Ausbildung des Apoptosoms aus Cytochrom-C, APAF-1 und Caspase-9 Voraussetzung für die beschriebenen Synergieeffekte.



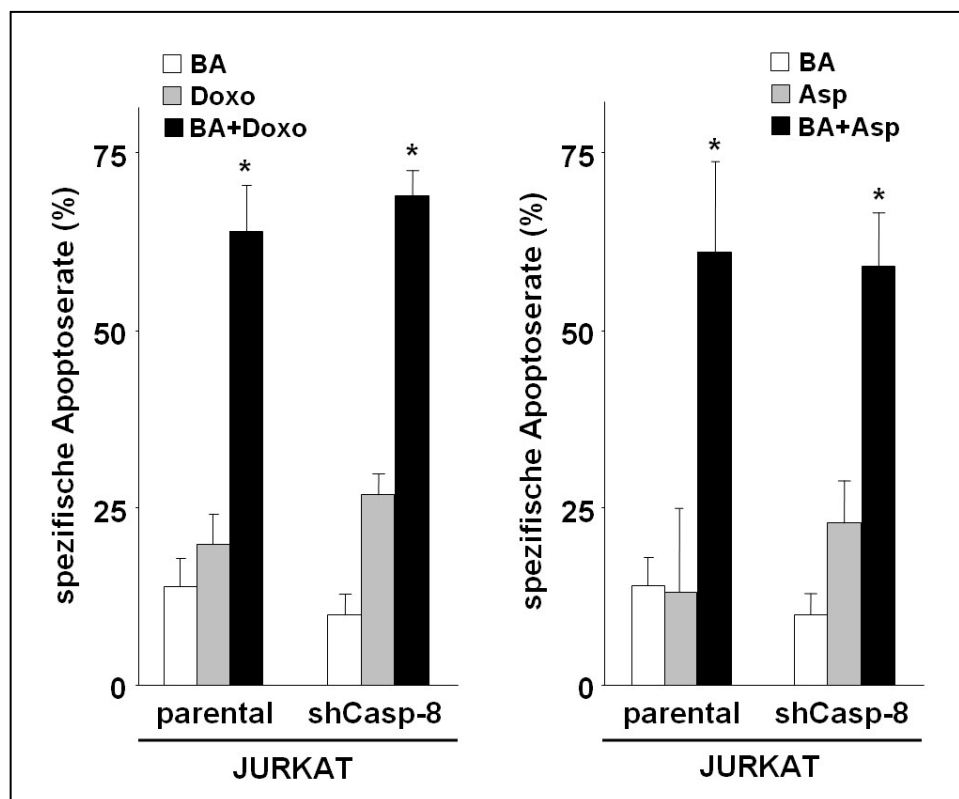
**Abb. 26: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen JURKAT Zellen, derivativen Caspase-9-defizienten JURKAT Zellen (Casp-9<sup>-/-</sup>) und JURKAT Casp-9<sup>-/-</sup> Zellen, die stabil Caspase-9 re-exprimieren (Casp-9<sup>+/+</sup>).** Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental und Casp-9<sup>+/+</sup>: 20 nM; Casp-9<sup>-/-</sup>: 50 nM; links) oder Asparaginase (Asp; parental und Casp-9<sup>+/+</sup>: 0,2 U/ml; Casp-9<sup>-/-</sup>: 1 U/ml; rechts) und Betulin-säure (BA; 1 µg/ml). \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

Eine weitere Sonderrolle zur Signalverstärkung im intrinsischen Apoptosesignalweg am Mitochondrium kann Caspase-8 einnehmen. Es ist für JURKAT Zellen aktuell beschrieben, dass im Gegensatz zu anderen Caspasen ein kleinerer Proteinanteil des zellulären Caspase-8-Speichers am Mitochondrium gebunden ist. Nach Stimulation durch zytotoxische Wirkstoffe kann Caspase-8 in der Pro-Form neben klassischer Caspasenaktivierung die Freisetzung mitochondrialer Faktoren über noch unbekannte Kanäle bewirken (Kadohara et al., 2009).

Daher wurden derivative JURKAT Zellen mit per RNA-Interferenz inhibierter Expression von Caspase-8 (s. Abb. 27) auf Beeinträchtigung des synergistischen Effektes untersucht. Dies erfolgte unter zuvor beschriebenen experimentellen Rahmenbedingungen (vgl. Kapitel V.1.3.1).



**Abb. 27:** Western-Blot-Analyse von parentalen JURKAT Zellen und per RNA-Interferenz Caspase-8-inhibierten JURKAT Zellen (shCasp-8) auf Caspase-8 (Casp-8) Expression. GAPDH diente als Ladekontrolle.



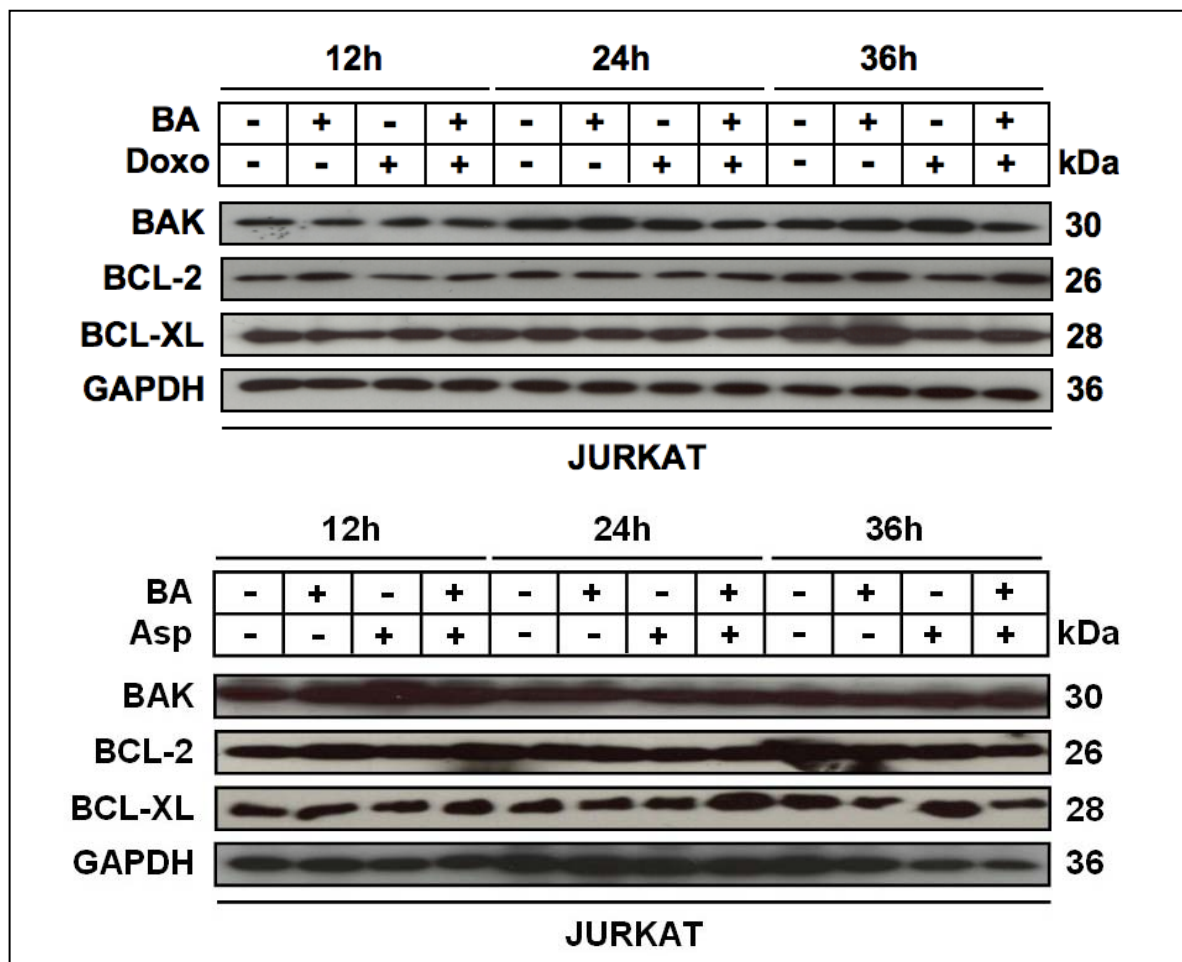
**Abb. 28:** FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen JURKAT Zellen und derivativen Caspase-8 inhibierten JURKAT Zellen (shCasp-8). Alle Zelllinien wurden für 72h einzeln und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; 20 nM; links) oder Asparaginase (Asp; 0,2 U/ml; rechts) und Betulinsäure (BA; 1 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963).

Es zeigte sich in diesen Versuchen keine Abhängigkeit von Caspase-8, da eine Inhibierung dieses Proteins keine Auswirkung auf synergistische Apoptoseinduktion hatte (s. Abb. 28).

V.1.3.3 Rolle von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen

Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Mitochondrien spielen Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie. Zu ihnen zählen u.a. pro-apoptotische porenbildende Proteine (BAK und BAX) und anti-apoptotische BCL-2-ähnliche Proteine (v.a. BCL-2 und BCL-XL), die BAK/BAX Oligomerisierung und damit Porenbildung durch direkte Interaktion blockieren.

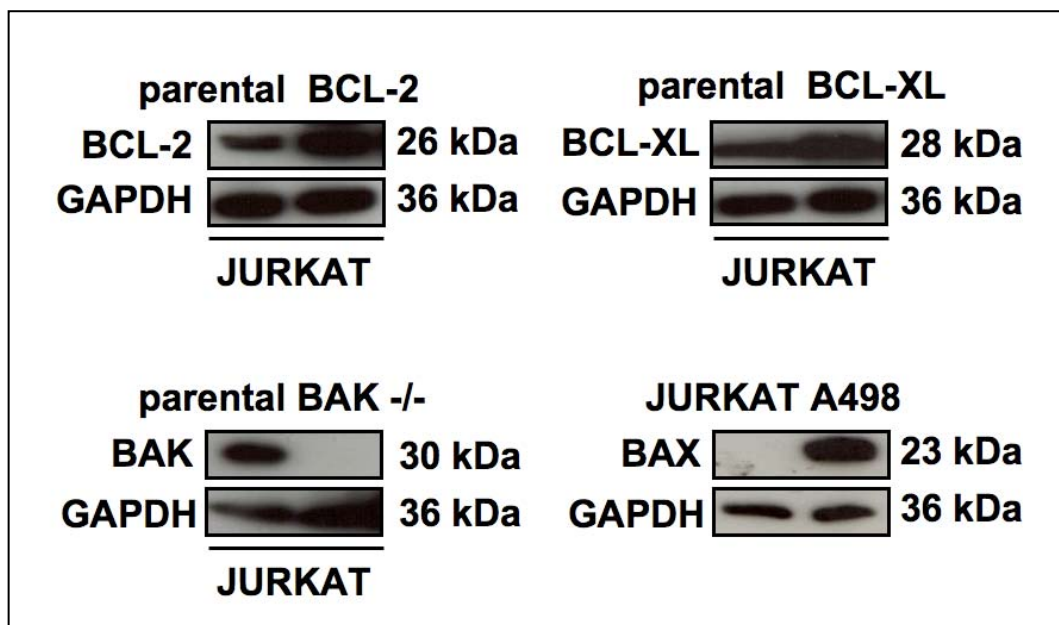
Um zu beurteilen, ob sich das Gleichgewicht der BCL-2 Proteine im Fall der Kombinationstherapie auf Proteinebene ändert, wurden Western-Blot-Analysen dieser Proteine durchgeführt (s. Abb. 29). Hochregulation von pro-apoptotischen bzw. Herunterregulation von anti-apoptotischen BCL-2 Mitgliedern kann synergistische Apoptose begünstigen.



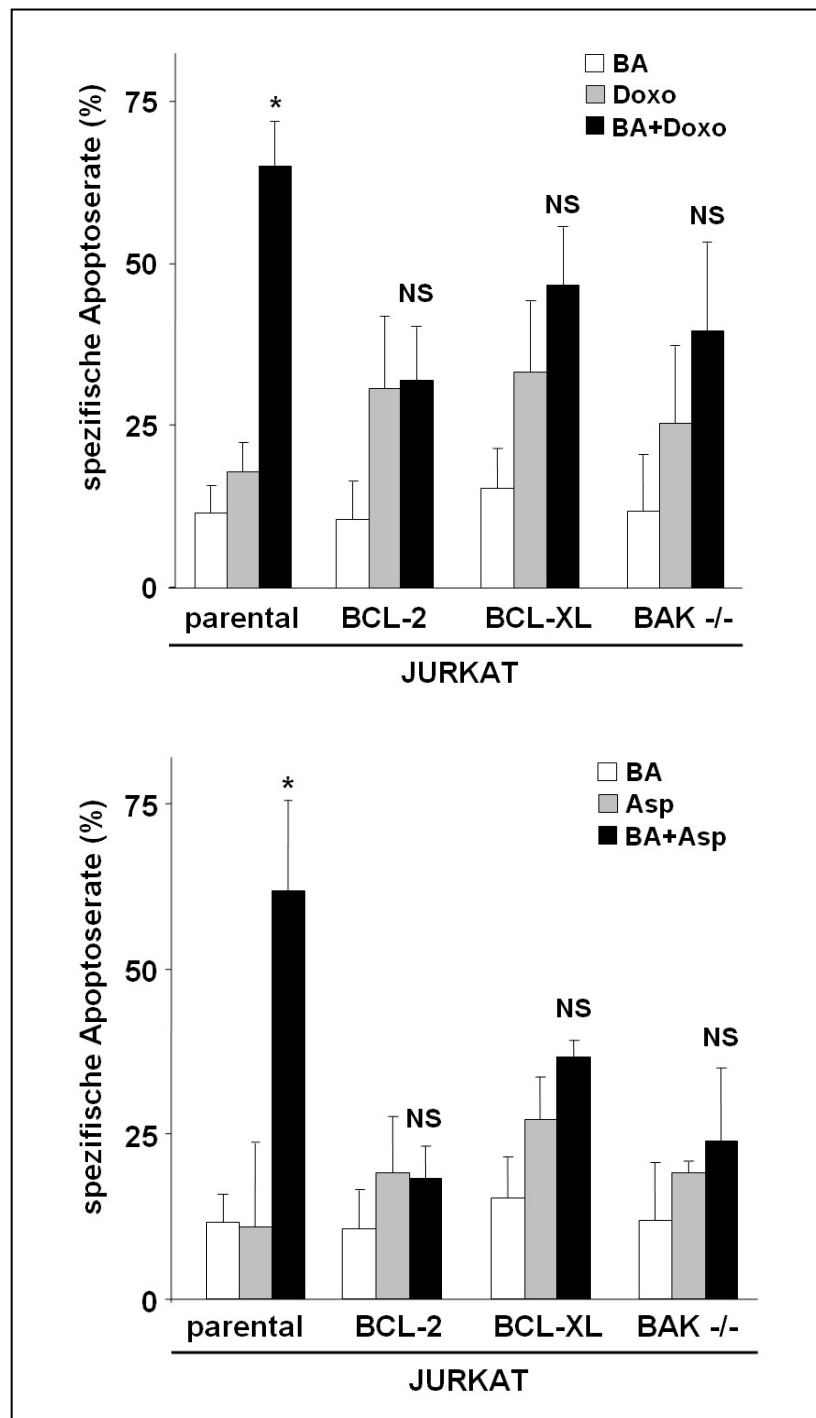
**Abb. 29: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zum Nachweis der Regulation von BCL-2 Mitgliedern.** Diese wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und nach angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die primären Antikörper detektierten Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie (BAK, BCL-2 und BCL-XL). Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Expressionslevel dieser Proteine zwischen nicht, einzel- und kostimulierten JURKAT Zelllysaten, weder im Fall der Kostimulation von BA mit Doxorubicin noch mit Asparaginase.

Um zu klären, welche Rolle die Porenbildung durch BAK zur Freisetzung von Cytochrom-C hat, wurden derivative stabil BCL-2- und BCL-XL-überexprimierende JURKAT Zellen und autosomal BAK- und BAX-defiziente JURKAT Zellen eingesetzt. JURKAT Zellen zeigen per se keine Expression des Poren-bildenden Proteins BAX, womit BAK-defiziente JURKAT Zellen weder BAK- noch BAX-Poren bilden können (s. Abb. 30).



**Abb. 30:** Obere Reihe: Western-Blot-Analyse von parental JURKAT Zellen, stabil BCL-2-überexprimierenden JURKAT Zellen (BCL-2; links), stabil BCL-XL-überexprimierenden JURKAT Zellen (BCL-XL; rechts) zur Detektion des Proteinstatus von BCL-2 bzw. BCL-XL. Untere Reihe: Western-Blot-Analyse von parental JURKAT Zellen und BAK-negativen JURKAT Zellen (BAK<sup>-/-</sup>; links) zur Detektion des BAK Proteinlevels und von parental JURKAT und A498 Zellen zur Detektion der Proteinexpression von BAX (rechts). GAPDH diente als Ladekontrolle.



**Abb. 31: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen JURKAT Zellen, stabil BCL-2-überexprimierenden JURKAT Zellen (BCL-2), stabil BCL-XL-überexprimierenden JURKAT Zellen (BCL-XL) und BAK/BAX-negativen JURKAT Zellen (BAK<sup>-/-</sup>).** Alle Zelllinien wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental: 20 nM; BCL-2, BCL-XL und BAK<sup>-/-</sup>: 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp; parental: 0,2 U/ml; BAK<sup>-/-</sup>: 0,5 U/ml; BCL-2 und BCL-XL: 1 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA; parental: 1 µg/ml; BCL-2, BCL-XL und BAK<sup>-/-</sup>: 1,5 µg/ml) und für 72h inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.



Dabei zeigte sich, dass Überexpression der anti-apoptotischen BCL-2-Mitglieder BCL-2 oder BCL-XL, die BAK/BAX-Porenbildung verhindern, zur Unterdrückung eines synergistischen Effektes führte (s. Abb. 31). Gleiches Ergebnis zeigte sich bei Eliminierung der porenbildenden Proteine BAK und BAX.

Es kann postuliert werden, dass BAK-Porenbildung Voraussetzung für die Freisetzung der Apoptose-vermittelnden Faktoren, allen voran Cytochrom-C, aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ist, was zu Caspasenaktivierung und so zu synergistischer Apoptoseinduktion durch BA und Asparaginase oder Doxorubicin führt.

#### V.1.3.4 Rolle der BH3-D Proteine

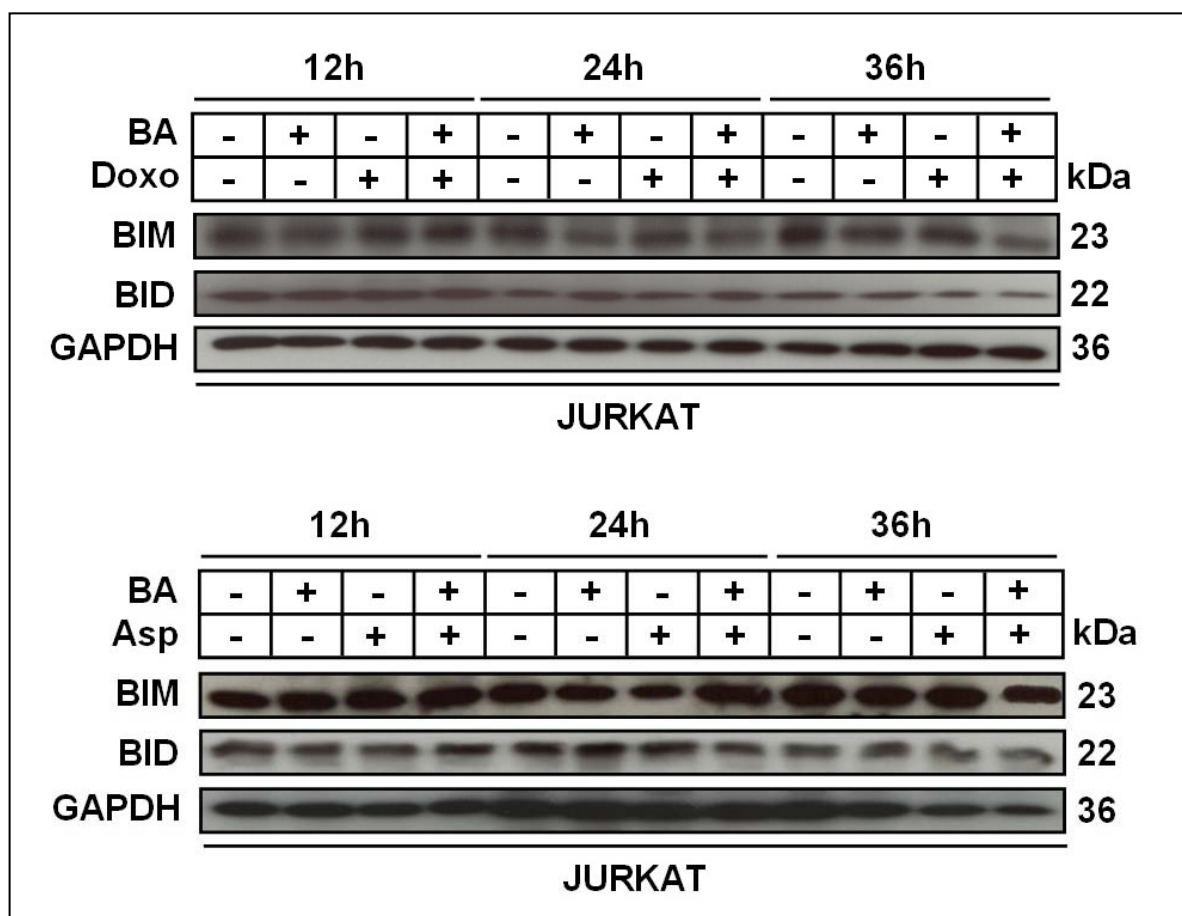
Als eine Gruppe wichtiger Triggerproteine des intrinsischen Apoptosesignalweges gelten pro-apoptotische BH3-D Proteine, welche in Folge intrinsischer Stimuli durch Spaltung direkt aktiviert, von Zytoskelettproteinen oder anderen Speicherproteinen freigesetzt oder durch aktivierte Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert werden können.

Eine prominente Untergruppe sind BID und BIM, die als direkte Aktivatoren der porenbildenden Proteine BAK und BAX gelten. Es wurde in diesem Zusammenhang kürzlich gezeigt, dass Multiproteinstapel des BH3-D Proteins BIM im Gegensatz zum Monomer durch direkte Interaktion eine Konformationsänderung von BAX induzieren können. BAX wird dadurch zur äußeren Mitochondrienmembran rekrutiert und permeabilisiert diese durch ringförmige Oligomerbildung (Gavathiotis et al., 2008).

Zusätzlich zu beschriebenen BH3-D Aktivatoren sind im Fokus aktueller Studien als sog. ‚Sensitizer‘ die BH3-D Proteine NOXA und PUMA in allen eukaryotischen Zellen vorhanden (Letai et al., 2008). Diese pro-apoptotischen BH3-D Proteine ebenen intrinsische Apoptoseinduktion durch Verdrängen der porenbildenden Proteine BAK und BAX oder der Aktivatoren BID und BIM von inhibitorischen BCL-2 ähnlichen Proteinen (BCL-2, BCL-XL oder MCL-1) auf Grund ihrer höheren Bindungsaffinität. Sie sind damit für die Feinregulation mitochondrialer Apoptoseinduktion verantwortlich, da sie mit mehreren BCL-2-Bindungspartnern je nach Stimulus interagieren können. Die Rolle all dieser BH3-D Proteine zur synergistischen Apoptoseinduktion sollte im Folgenden analysiert werden.

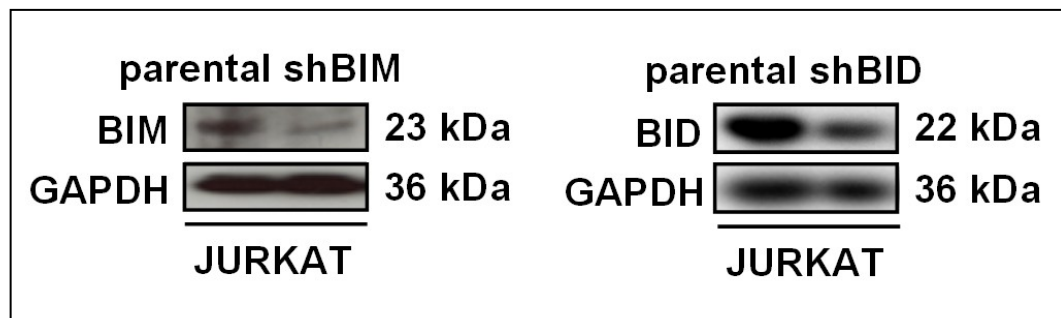
V.1.3.4.1 Rolle der Aktivatoren BID und BIM

BID und BIM sind viel versprechende Mediatoren synergistischer Apoptoseinduktion durch Zytostatika und BA und wurden im Folgenden näher untersucht. Durch Western-Blot-Analyse beginnend nach 12h wurden Proteinlevel von BID und BIM nach Einzel- und Kostimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase und Betulinsäure detektiert, um mögliche Aktivierung in Form von Proteindegradierung zu detektieren. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der Proteinlevel von BID oder BIM in kostimulierten JURKAT Zellen im Vergleich zu unbehandelten oder einzelstimulierten JURKAT Zellen (s. Abb. 32).

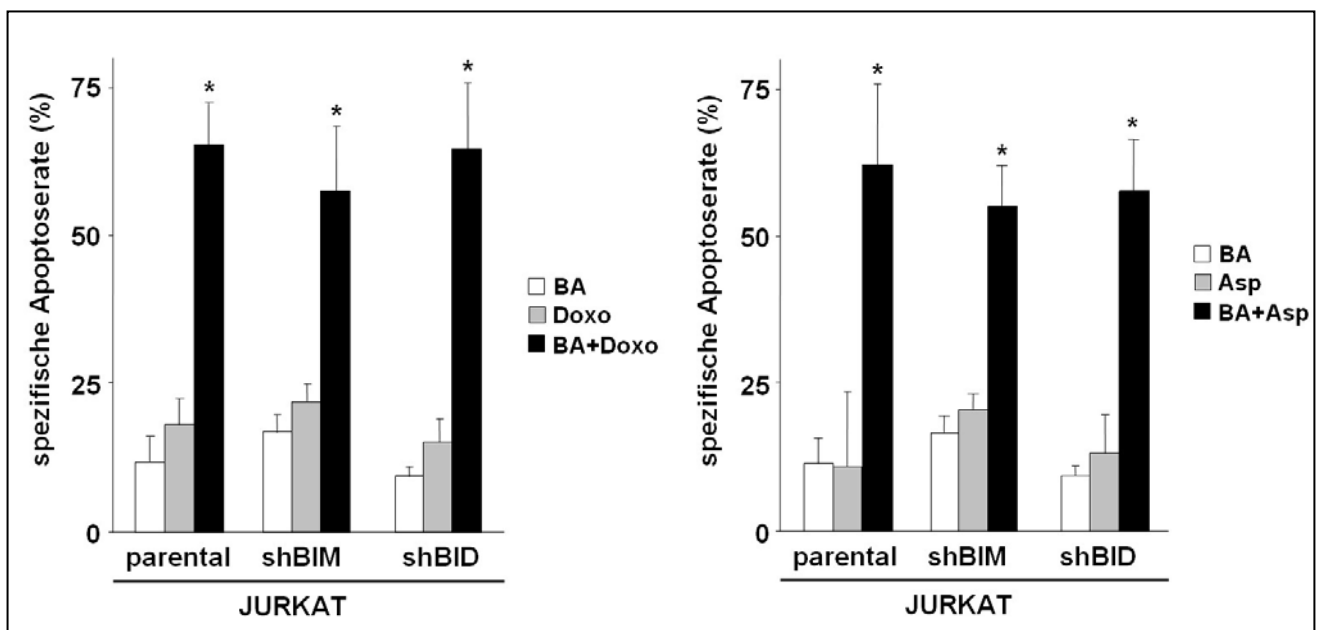


**Abb. 32: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zum Nachweis der Regulation von BID oder BIM.** Zellen wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und nach angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die primären Antikörper detektierten BID und BIM. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Zusätzlich wurden die Proteine BID oder BIM in JURKAT Zellen per RNA-Interferenz Technologie herunterreguliert (s. Abb. 33), um deren Mitwirken an synergistischer Apoptoseinduktion nicht zu übersehen. Als Transfektionskontrolle dienten jeweils mit einer RNA Kontrollsequenz transfizierte JURKAT Zellen, die keinen signifikanten Unterschied in der synergistischen Wirkverstärkung im Vergleich zu parentalen Zellen zeigten.



**Abb. 33:** Western-Blot-Analyse von parentalen JURKAT Zellen (parental), stabil mit shRNA gegen BIM (shBIM; links) und BID (shBID; rechts) transfizierten JURKAT Zellen nach Proteinstatus von BIM bzw. BID. GAPDH diente als Ladekontrolle.

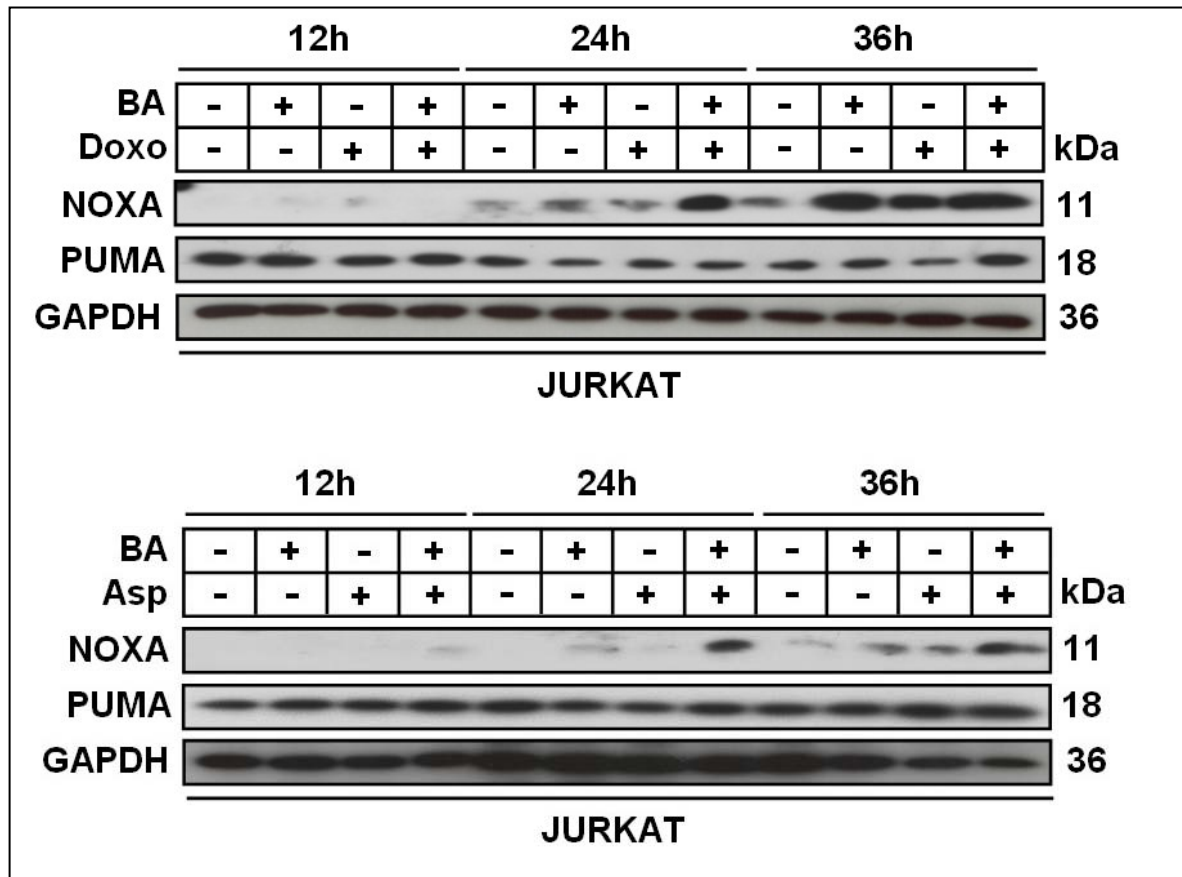


**Abb. 34:** FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen JURKAT Zellen und stabil mit shRNA gegen BIM (shBIM) und BID (shBID) transfizierten JURKAT Zellen. Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und koinkubiert mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM; links) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; rechts) und Betulinsäure (BA, 1,5 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkulierte Kombinationseffekt nach Webb (1963).

Herunterregulierung von BID oder BIM hatte keinen Einfluss auf synergistische Apoptoseinduktion, da sich diese unabhängig von BID oder BIM konstant zeigte (s. Abb. 34). BID und BIM leisten keinen Beitrag in der synergistischen Signaltransduktion durch Betulinsäure und Doxorubicin bzw. Asparaginase.

V.1.3.4.2 Rolle der BH3-D Proteine NOXA und PUMA

Im Fokus aktueller Studien stehen die BH3-D Proteine NOXA und PUMA als sog. ‚Sensitizer‘. Sie sind eher für die Feinregulation mitochondrialer Apoptoseinduktion verantwortlich, da sie mit mehreren BCL-2-ähnlichen Proteinen je nach Stimulus interagieren können.

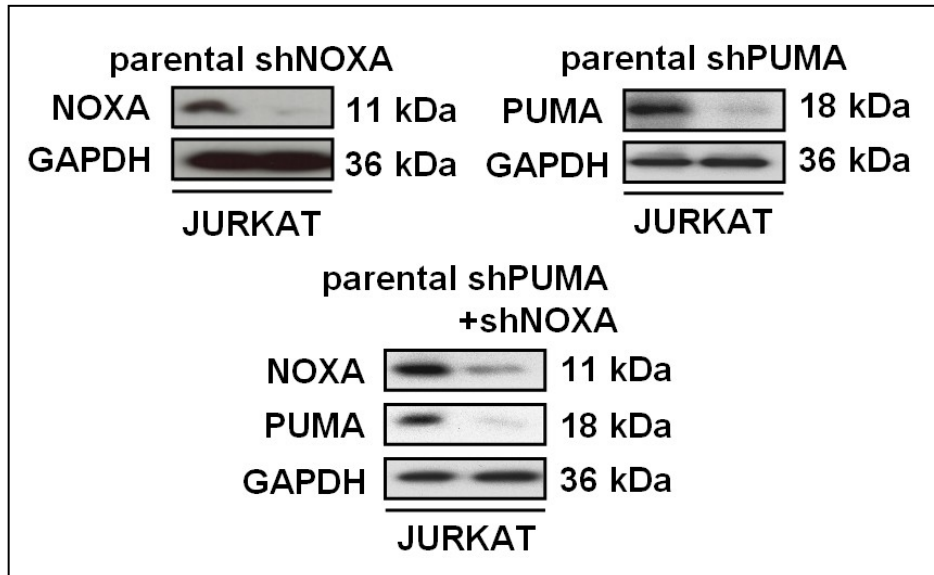


**Abb. 35: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zum Nachweis von NOXA- und PUMA-Regulation.** Diese wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und nach angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die primären Antikörper detektierten NOXA und PUMA. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

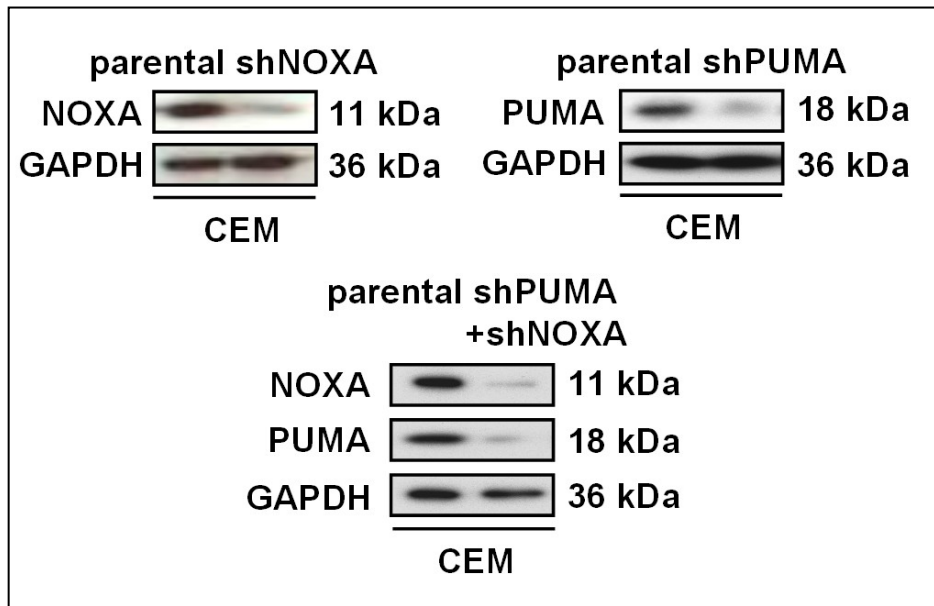
Um die Rolle von NOXA oder PUMA bzw. das Zusammenspiel beider BH3-D Proteine im Rahmen der Wirkverstärkung von Doxorubicin oder Asparaginase und BA zu charakterisieren, wurde deren Proteinstatus beginnend 12h nach Einzel- bzw. Kostimulation per Western-Blot-Analyse detektiert (s. Abb. 35).

Dabei ergab sich für PUMA keine Änderung des Proteinstatus. NOXA jedoch wurde im Fall der Kostimulation mit Doxorubicin sowie Asparaginase und BA nach 24h verstärkt und bis mindestens 36h prolongiert exprimiert. NOXA Hochregulation konnte auch für Einzelstimulation mit Doxorubicin, Asparaginase bzw. BA detektiert werden, jedoch in geringerer Höhe und zu einem späteren Zeitpunkt. Niedrige Einzelstimulation induzierte in diesen Zellen auch bei Inkubation über 72h hinaus kaum Apoptose.

Um zu klären, ob diese festgestellte prolongierte NOXA Hochregulation verantwortlich ist für synergistische Wirkverstärkung, wurden JURKAT und alternativ CEM Zellen jeweils mit einem shRNA-Plasmid gegen NOXA, gegen PUMA oder simultan mit beiden Plasmiden transfiziert (s. Abb. 36 und Abb. 37). Es ist beschrieben, dass diese Proteine unter bestimmten Stimuli kooperieren können (Villunger et al., 2003).



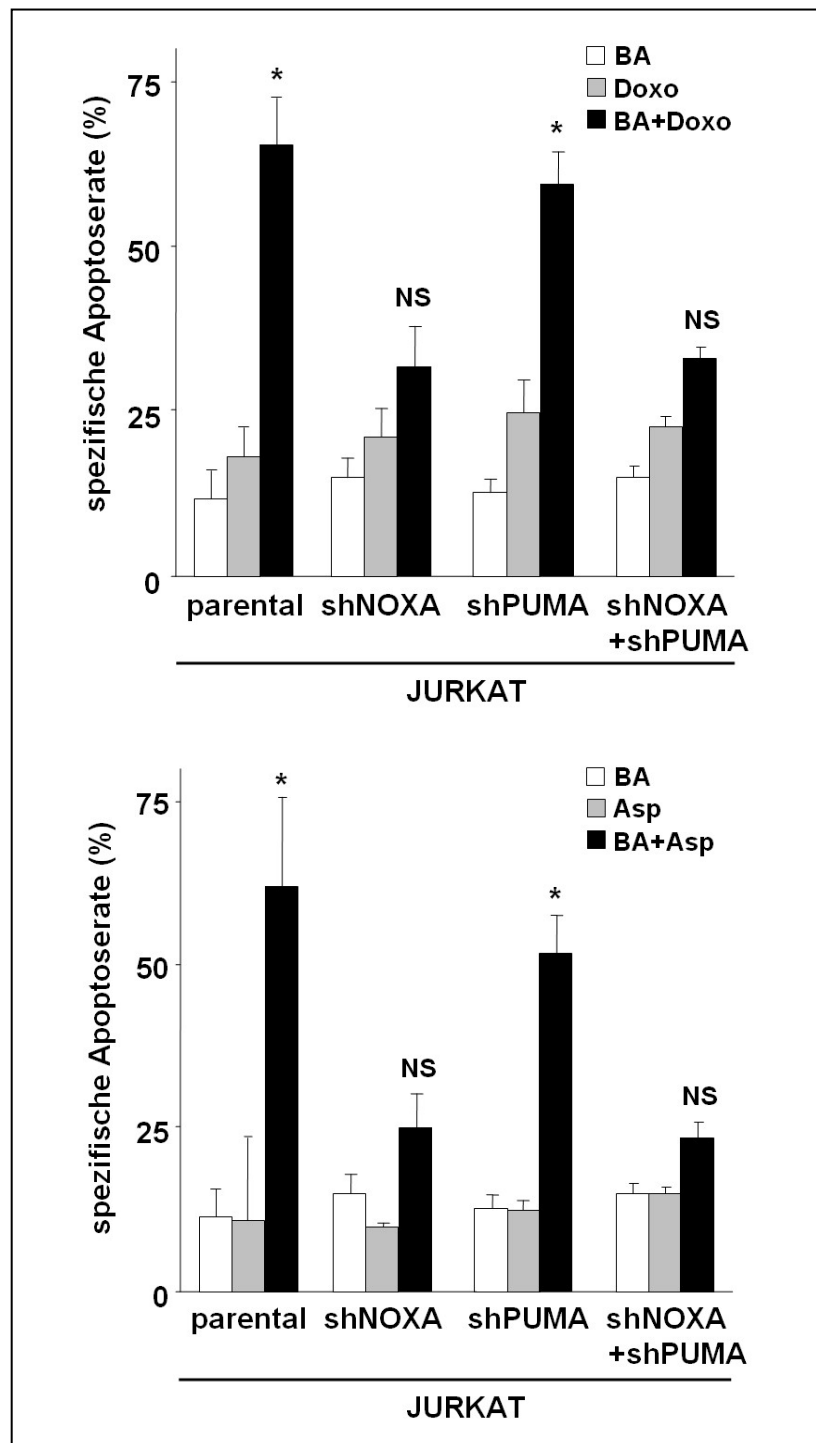
**Abb. 36:** Western-Blot-Analyse von parentalen JURKAT Zellen (parental) und stabil mit shRNA gegen NOXA (shNOXA, oben links), gegen PUMA (shPUMA; oben rechts) und mit beiden shRNA Plasmiden (shPUMA+shNOXA; unten) transfizierten JURKAT Zellen nach Proteinstatus von NOXA bzw. PUMA. GAPDH diente als Ladekontrolle.



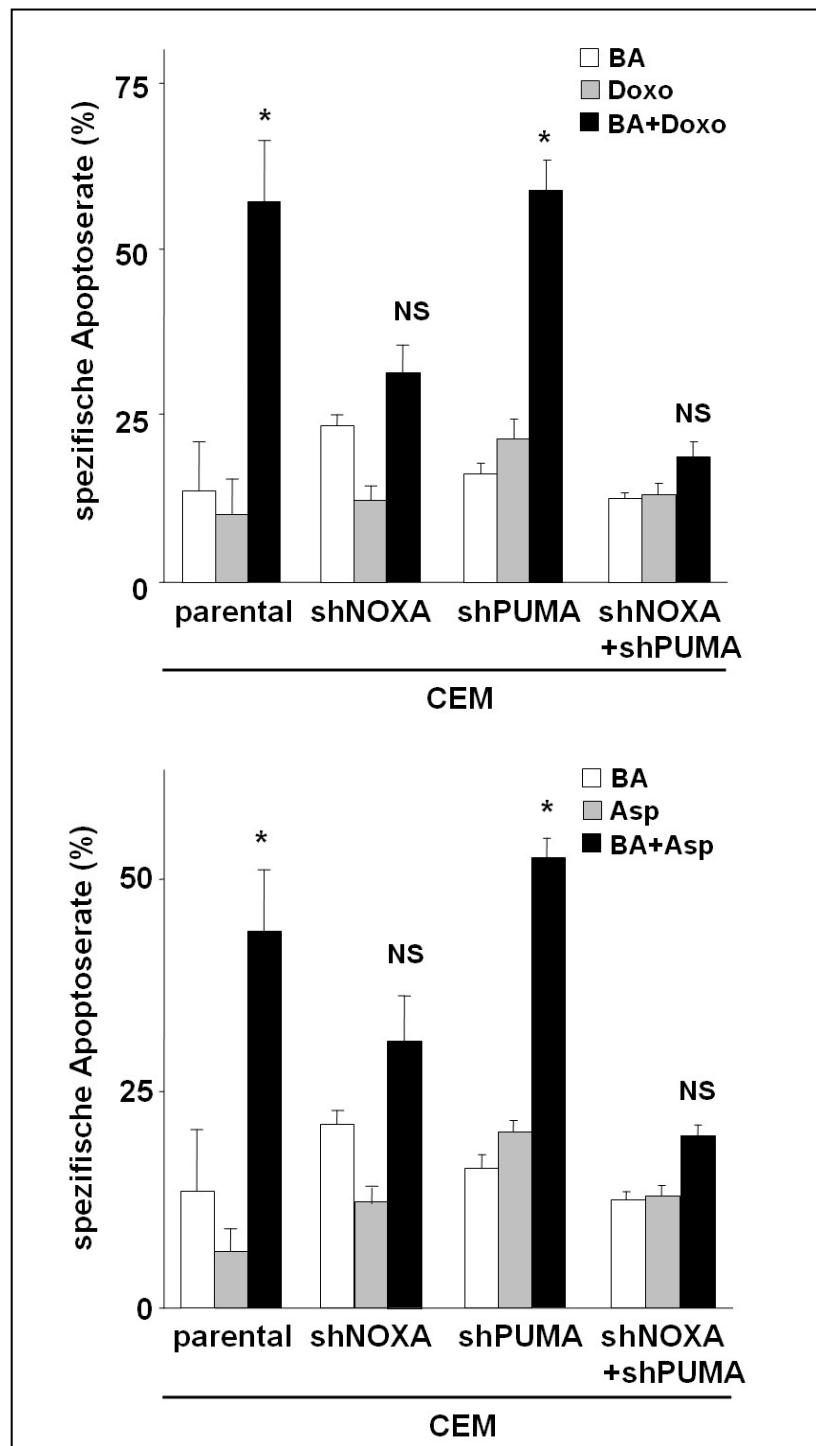
**Abb. 37:** Western-Blot-Analyse von parentalen CEM Zellen (parental) und stabil mit shRNA gegen NOXA (shNOXA, oben links), gegen PUMA (shPUMA; oben rechts) und mit beiden shRNA Plasmiden (shPUMA+shNOXA; unten) transfizierten CEM Zellen nach Proteinstatus von NOXA bzw. PUMA. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Dabei zeigten PUMA-herunterregulierte Zellen keine phänotypische Änderung des Synergismusverhaltens, NOXA-herunterregulierte Zellen alleine und in Kombination mit PUMA-Herunterregulation büßten die Fähigkeit zu synergistischer Apoptoseinduktion nach BA-Kostimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase (s. Abb. 38 und Abb. 39) ein. Bei analogen Experimenten mit dem Zytostatikum Vincristin bestätigte sich die Abhängigkeit der synergistischen Apoptoseinduktion von NOXA.

Daraus kann geschlossen werden, dass verstärkte Expression des BH3-D Sensitizers NOXA alleine verantwortlich ist für synergistische Apoptoseinduktion bei Kombination von Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin mit Betulinsäure.



**Abb. 38: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen JURKAT Zellen und stabil mit shRNA gegen NOXA (shNOXA), gegen PUMA (shPUMA) und mit beiden shRNA Plasmiden (shPUMA+shNOXA) transfizierten JURKAT Zellen.** Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental und shPUMA: 20 nM; shNOXA und shNOXA+ shPUMA: 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp; parental und shPUMA: 0,2 U/ml; shNOXA und shNOXA+shPUMA: 0,5 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA; parental und shPUMA: 1 µg/ml; shNOXA und shNOXA +shPUMA: 1,5 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

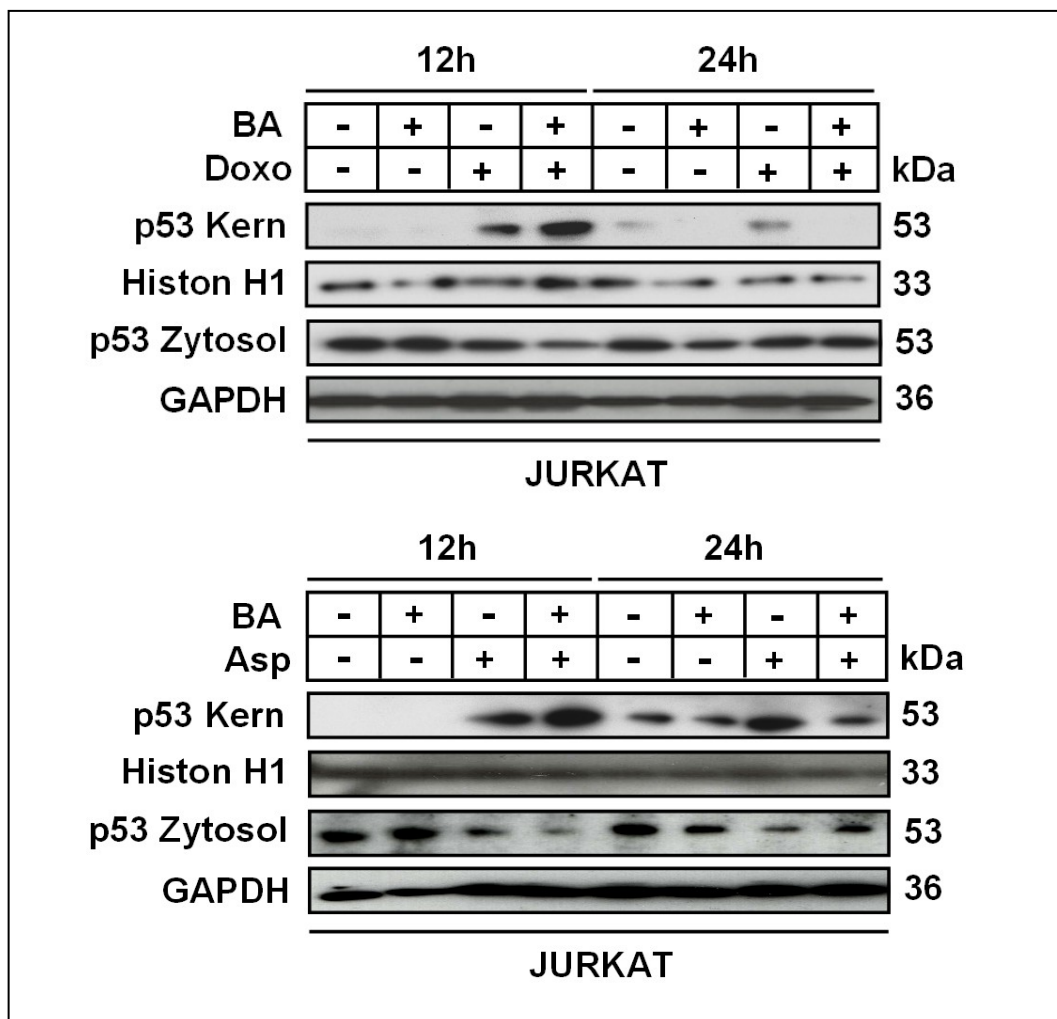


**Abb. 39: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen CEM Zellen und stabil mit shRNA gegen NOXA (shNOXA), gegen PUMA (shPUMA) und mit beiden shRNA Plasmiden (shPUMA+shNOXA) transfizierten CEM Zellen.** Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental und shPUMA: 10 nM; shNOXA und shNOXA+shPUMA: 50 nM; oben) oder Asparaginase (Asp; parental und shPUMA: 0,2 U/ml; shNOXA und shNOXA+shPUMA: 0,5 U/ml; unten) und Betulinensäure (BA; parental und shPUMA: 1,5 µg/ml; shNOXA und shNOXA +shPUMA: 2 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.



V.1.3.5 Rolle des Tumorsuppressors p53

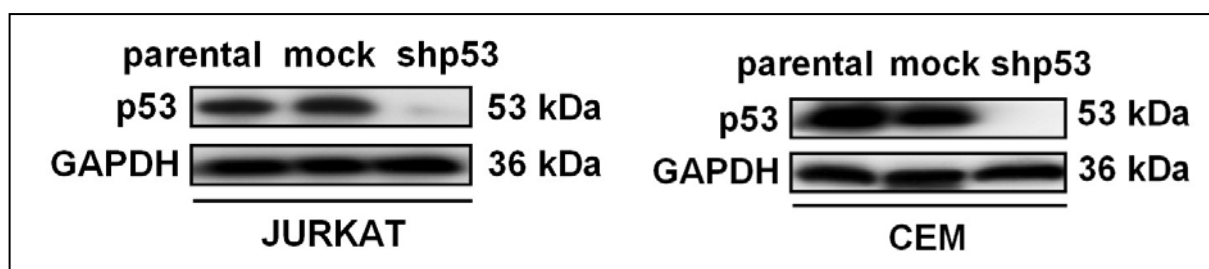
Abschließend wurde untersucht, welche intrazelluläre Signaltransduktion für die verstärkte Expression von NOXA verantwortlich ist. Dabei ist in der Literatur beschrieben, dass der Tumorsuppressor p53 u.a. ein klassischer Transkriptionsfaktor für die Genexpression von NOXA ist (Villunger et al., 2003). Diese Funktion von p53 wird v.a. induziert durch spezifische Phosphorylierung bzw. Acetylierung durch die Kinasen ATM und ATR, welche nach Zytostatika-induzierten DNA-Strangbrüchen aktiviert werden (s. Kapitel II.1.4 und II.1.5).



**Abb. 40: Western-Blot-Analyse von JURKAT Zellen zum Nachweis von p53.** Zellen wurden einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM; oben) oder Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml; unten) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml) und nach angegebenen Zeitpunkten lysiert, getrennt in zytosolische und nukleäre Fraktionen. Als Ladekontrolle diente Histon H1 für die nukleäre Fraktion, GAPDH für die zytosolische Fraktion.

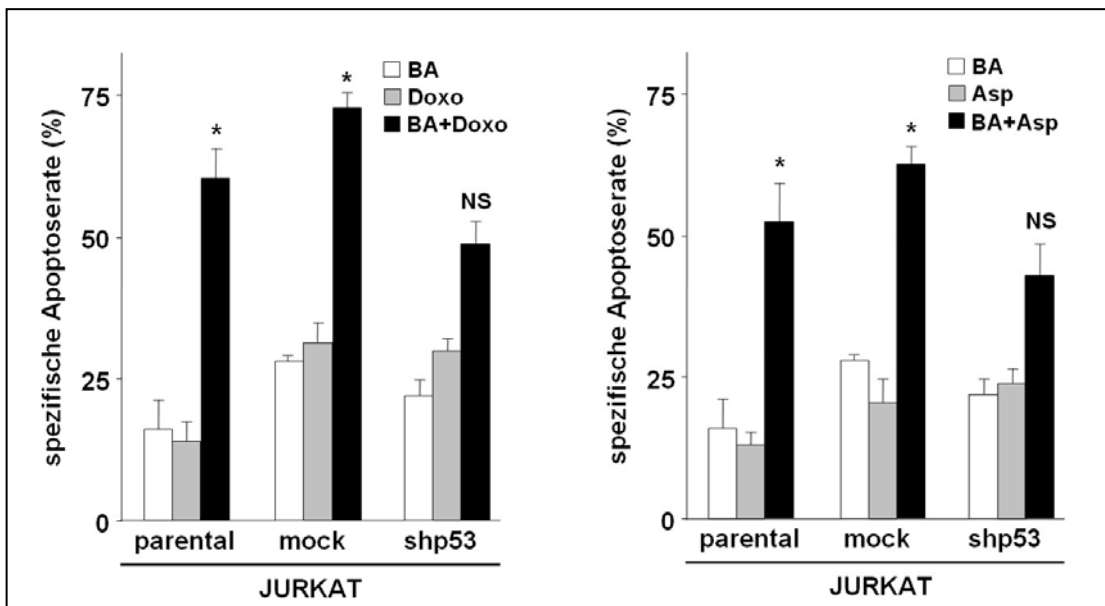
In welchem Zusammenhang eine mögliche Stabilisierung von p53 im Kern und synergistische Apoptoseinduktion steht, wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden einzel- und kostimulierter Lysate getrennt nach zytosolischer und nukleärer Fraktion. Für die kombinierte Stimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase zusammen mit BA in JURKAT Zellen wurde p53 erstmals nach 12h in der Kernfraktion nachgewiesen. Für BA-Kombination zeigten sich deutlich höhere p53-Level im Vergleich zur Einzelstimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase. Mit dieser Stabilisierung von p53 im Kern ging eine Abnahme des p53 Proteinlevels im Zytosol einher (s. Abb. 40).

Um zu Prüfen, ob diese Aktivierung von essentieller Bedeutung für synergistische Apoptoseinduktion ist, wurden JURKAT und CEM Zellen mit einem shRNA-Plasmid gegen p53 und einer Kontrollsequenz ('mock') stabil transfiziert (s. Abb. 41). Diese Zelllinien wurden mit den entsprechenden Kombinationen (Doxorubicin oder Asparaginase mit Betulinsäure) behandelt.

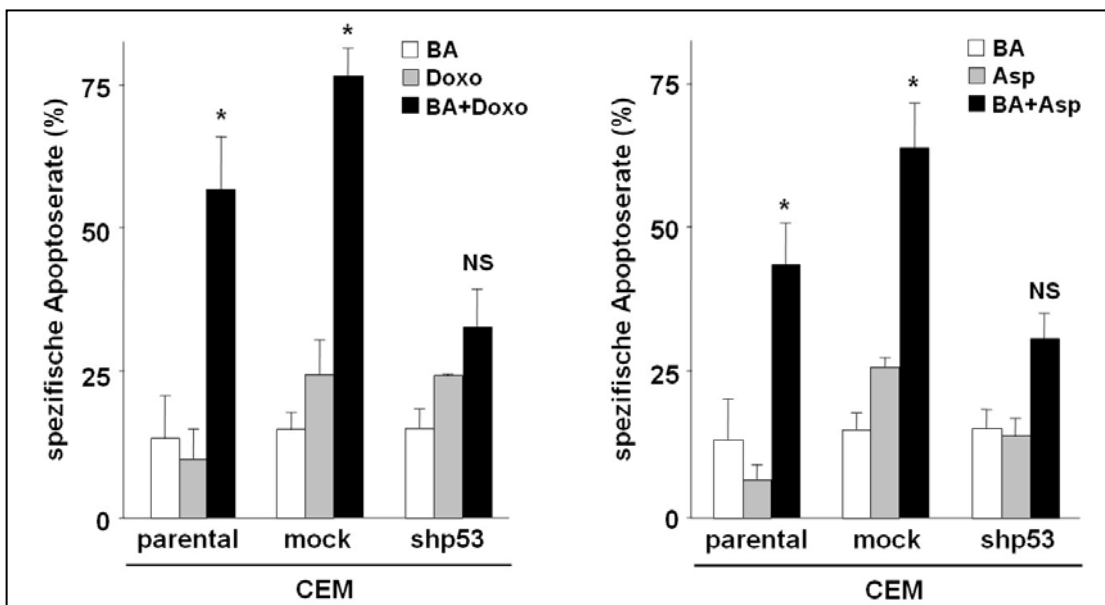


**Abb. 41:** Western-Blot-Analyse von je parental und stabil mit shRNA Kontrollsequenz (mock) bzw. shp53 transfizierten JURKAT Zellen (links) und CEM Zellen (rechts) nach p53 Proteinleveln. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die derivativen JURKAT und CEM Zellen mit inhibierter Expression von p53 zeigten im Gegensatz zu den p53 exprimierenden Zellen (parentale und kontrolltransfizierte Zellen) deutlich weniger synergistischen Zelltod (s. Abb. 42 und Abb. 43). Gleiche Ergebnisse zeigten analoge Experimente mit dem Zytostatikum Vincristin. Somit ist p53 der für die Synergieeffekte hauptverantwortliche Transkriptionsfaktor zur Transaktivierung von NOXA.



**Abb. 42: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen, Kontrollsequenz (mock) und shp53 transfizierten JURKAT Zellen.** Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental und mock: 20 nM; shp53: 50 nM; links) oder Asparaginase (Asp; parental und mock: 0,2 U/ml; shp53: 0,5 U/ml; rechts) und Betulinsäure (BA; parental und mock: 1 µg/ml; shp53: 1,5 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

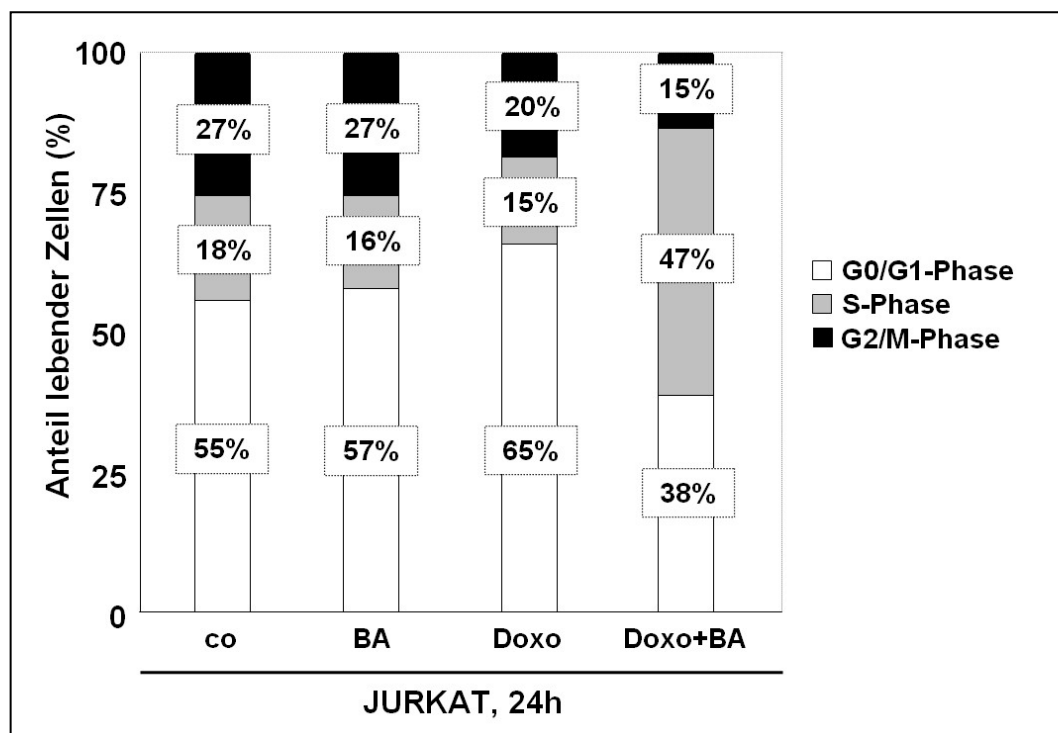


**Abb. 43: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von parentalen, Kontrollsequenz (mock) und shp53 transfizierten CEM Zellen.** Alle Zelllinien wurden für 72h einzel- und kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo; parental und mock: 10 nM; shp53: 50 nM; links) oder Asparaginase (Asp; parental und mock: 0,2 U/ml; shp53: 0,5 U/ml; rechts) und Betulinsäure (BA; parental und mock: 1,5 µg/ml; shp53: 2 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten; \*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963); NS = nicht signifikant.

V.1.3.6 Verstärkter Zellzyklusarrest nach kombinierter Stimulation

Aktivierung von p53 und zytostatische Effekte (s. Kapitel V.1.3.5 und V.1.2) werden typischerweise begleitet von einem Eingriff in die Zellzykluskontrolle, von einem sog. Zellzyklusarrest. Der Zellzyklus beschreibt vier Phasen der Zellgenese: Eine G0/G1 ('gap'), in der sich die meisten Zellen einer Zellpopulation unter *in vitro* Kulturbedingungen befinden, was sich auch im unbehandelten Zustand der JURKAT Zellen in Abb. 44 zeigte. Bei optimalen Kulturbedingungen teilen sich Leukämiezellen typabhängig etwa einmal in 24 Stunden, zunächst durch Eintritt in die S-Phase (Synthesephase), während der sich der Chromatingehalt einer Zelle verdoppelt. Final tritt diese Zelle in die G2/M-Phase (Mitose/Meiose), in der sie sich teilt, um als zwei Tochterzellen je wieder in die G0/G1-Phase einzutreten.

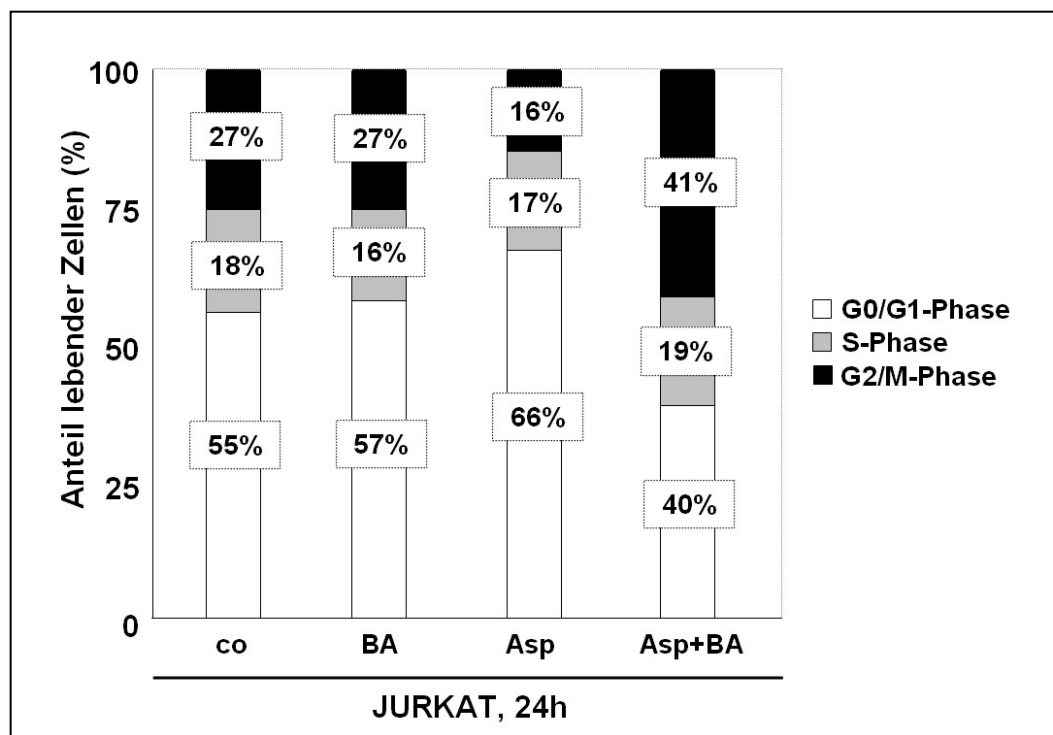
DNA-Strangbrüche bedingt durch genotoxische Agenzien führen dabei zur andauernden Arretierung des Zellzyklus in der G0/G1-Phase oder der G2/M-Phase, was im Fall eines irreparablen DNA Schadens zur Stabilisierung von p53 im Kern führt (Pellegata et al., 1996).



**Abb. 44: Zellzyklusanalyse von lebenden JURKAT Zellen 24h nach BA bzw. Doxorubicin Einzel- oder Kostimulation (Propidiumiodidfärbung).** Der Anteil lebender Zellen entspricht 100%, diese wurden den jeweiligen Zellzyklusphasen (in Prozent) zugeordnet. Die Zellen wurden mit Doxorubicin (Doxo, 20 nM) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml), sowie der Kombination behandelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Nach niedrig dosierter Stimulation mit BA trat keine Änderung der Zellpopulation bezüglich ihrer Zellzyklusverteilung nach 24h Inkubation auf. Durch Behandlung sowohl mit Doxorubicin als auch mit Asparaginase allein war eine Verschiebung zur G1-Phase (65% bzw. 66%) zu beobachten, wodurch der Anteil der Zellen in der G2-Phase halbiert wurde (s. Abb. 44 bzw. Abb. 45). Dies sprach für einen Arrest der Zellen in der G1-Phase.

Wurden JURKAT Zellen mit Doxorubicin und BA kostimuliert trat eine deutliche Arretierung des Zellzyklus nach 24h in der S-Phase auf, welche annähernd verdreifacht wurde. Durch Kostimulation mit Asparaginase zeigte sich ein abweichendes Bild: JURKAT Zellen arretierten in der G2/M-Phase. Zu diesem Zeitpunkt, nach 24h, zeigten weder einzel- noch kostimierte Zellen spezifische apoptotische Veränderungen, was eine parallel durchgeführte FSC/SSC-Apoptoseanalyse zeigte.



**Abb. 45: Zellzyklusanalyse von lebenden JURKAT Zellen 24h nach BA und Asparaginase Einzel- oder Kostimulation (Propidiumiodidfärbung).** Der Anteil lebender Zellen entspricht 100%, diese wurden den jeweiligen Zellzyklusphasen (in Prozent) zugeordnet. Die Zellen wurden mit Asparaginase (Asp, 0,2 U/ml) und Betulininsäure (BA, 1 µg/ml), sowie der Kombination behandelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von n=3.

Damit wurde gezeigt, dass Kostimulation zu Zellzyklusarretierung in der S-Phase (Doxorubicin) oder der G2/M-Phase (Asparaginase) führte und in beiden Fällen mit p53 Stabilisierung im Kern assoziiert war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Kostimulation von Betulinsäure und Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin synergistische Apoptoseinduktion in JURKAT und CEM Leukämiezelllinien bewirkte. Auf vier weiteren soliden Tumorzelllinien und in Zytostatika-resistenten JURKAT Zelllinien zeigten entsprechende BA-Kombinationen ebenfalls synergistische Effekte. Synergistische Apoptoseinduktion durch diese Wirkstoffe war assoziiert mit der Hemmung des Wachstums von Tumorzellen.

Auf molekularer Signalebene kam es in Folge der Kostimulation von Betulinsäure und Doxorubicin oder Asparaginase in Leukämiezelllinien zur Aktivierung von Caspase-3 und -9. Aktivierung von Caspasen ging Cytochrom-C- und SMAC/OMI-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraums voraus. Freisetzung dieser Faktoren erfolgte durch BAK-Porenbildung, was durch Überexpression von BCL-2 und BCL-XL inhibiert werden konnte. NOXA Akkumulation in Folge von p53-abhängiger Expression führte zu dieser Aktivierung von Mitochondrien. Das Primäreignis von p53-Akkumulation im Zellkern war begleitet von einem Zellzyklusarrest.

## V.2 Untersuchungen in primären kindlichen leukämischen Blasten

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass Betulinsäure als neuer Wirkstoff im Zusammenspiel mit etablierten Chemotherapeutika Apoptose in synergistischem Ausmaß induzieren konnte, was hinsichtlich Therapie dieses Krankheitsbildes eine neue Therapiemöglichkeit eröffnet. Tumorzelliniensysteme wie diese sind jedoch aufgrund ihrer jahrzehntelangen Verwendung und Lagerung in der Kritik, durch Mutationen Signalwege artifiziell regulieren zu können und so von der realen klinischen Tumorzellreaktion auf zytotoxische Stimuli abzuweichen (Pawlowski et al., 2009). Mit Xenograft Leukämiezellen, welche zeitnah nach Probenentnahme in der NOD/SCID-Maus amplifiziert wurden, sollte somit die *in vivo* Situation einer humanen Leukämie wirklichkeitsgetreuer modelliert werden.

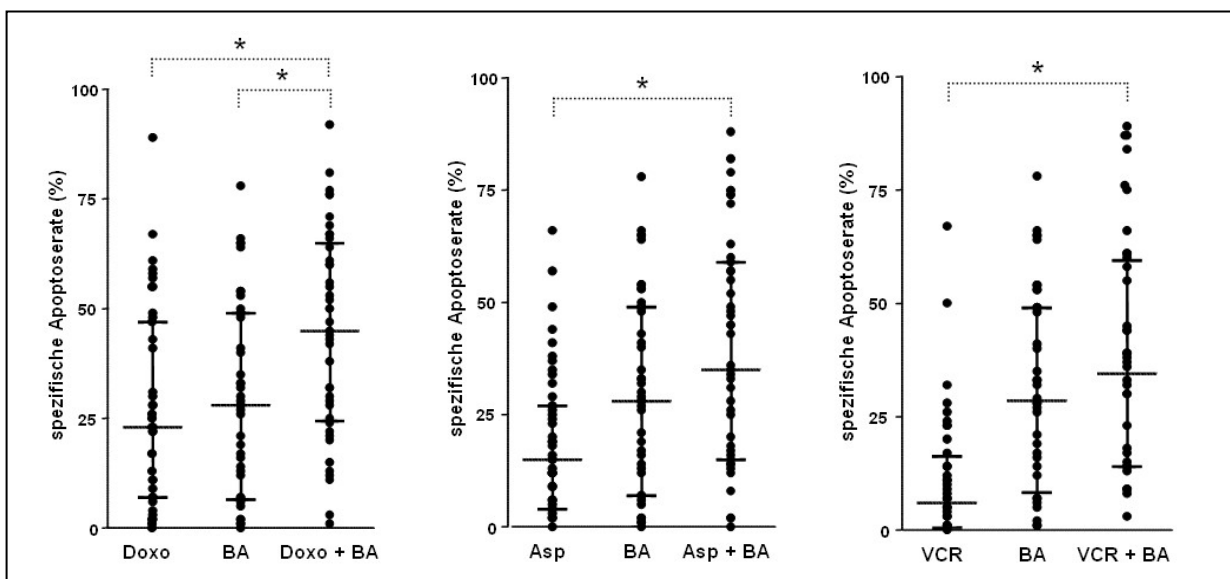
Dazu sollte zunächst in primären Proben kindlicher Leukämiezellen das Potential von Betulinsäure als zusätzliches Zytostatikum der Standardtherapie ermittelt werden. Darüber hinaus wurde ein Xenograft Mausmodell zur Amplifizierung dieser Primärproben genutzt, um erstmals die Ergebnisse der Signaltransduktion aus JURKAT und CEM Zellen molekular in Xenograft Tumorzellen einer Leukämiepatientin und eines Leukämiepatienten zu bestätigen.

V.2.1 Synergistische Apoptose in primären Leukämiezellen

Dieser Arbeit standen Daten von Stimulationsexperimenten mit Betulinsäure und Chemotherapeutika auf primären Leukämiezellen von noch unbehandelten Patienten zur Verfügung. Es wurden dazu über die letzten Jahre primäre Leukämiezellen von bis zu n=47 Patientenproben mit Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin und BA bzw. der simultanen Kombination aus Chemotherapeutikum und BA untersucht.

Im Gegensatz zu Leukämiezelllinien, welche i.A. Zytostatika-sensitiver sind, wurden die Chemotherapeutika in maximaler humaner Plasmakonzentration (s. Kapitel V.1.1.3) eingesetzt. Die Konzentration von Betulinsäure wurde zu 10 µg/ml gewählt, da diese bereits zuvor in Tiermodellen als effektiv und nebenwirkungsfrei getestet wurde (Fulda, 2009). Die maximale Inkubationszeit und damit das Versuchsende wurden erreicht, wenn unbehandelte Kontrollzellen eine spezifische Apoptoserate von 25% (bezogen auf den Versuchsbeginn) erreichten (s. Kapitel IV.2.1.3). Unter diesen Bedingungen lag die Versuchsspanne je nach Patientenprobe zwischen 24h und 72h.

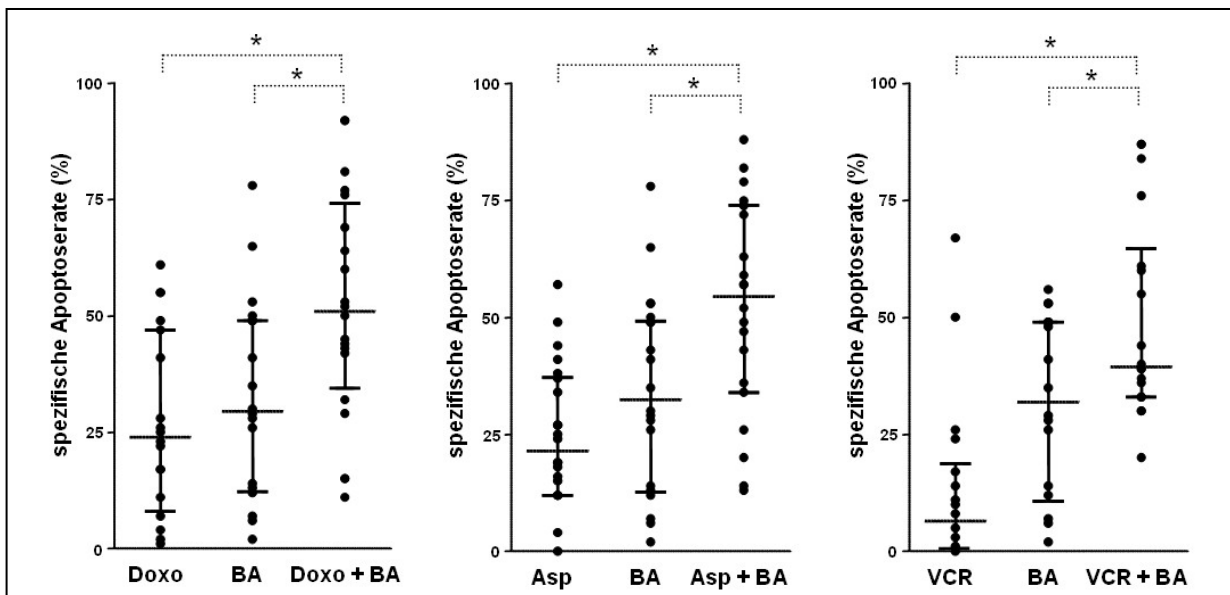
Betulinsäure konnte dabei in allen drei Fällen den spezifischen Apoptosemedian des Standardwirkstoffes signifikant steigern (s. Abb. 46). Signifikante Unterschiede im Vergleich zu beiden Einzeleffekten zeigten sich nur für die Kombination von Doxorubicin und BA.



**Abb. 46: FSC/SSC-Apoptoseanalyse primärer leukämischer Patientenproben** für mind. 24h stimuliert mit Asparaginase (Asp, 1 U/ml; n=47), Doxorubicin (Doxo, 0,5 µM; n=45), Vincristin (VCR, 30 nM, n=40) und Betulinsäure (BA, 10 µg/ml) sowie der Kombination aus Zytostatikum und BA. Gezeigt sind Mediane mit Interquartilen, \*p<0,05 (t-test).

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass synergistische Apoptoseinduktion durch die p53-abhängige verstärkte Neusynthese von NOXA bedingt war. Dieses Ereignis trat in JURKAT Leukämiezellen nach frühestens 24h auf. Daher war zu erwarten, dass längere Inkubationszeiten von primären Leukämiezellen mit BA und Zytostatika synergistische Apoptoseinduktion begünstigten.

Wurde die Untersuchung auf Patientenproben mit längerer Inkubationszeit von mind. 48h eingeschränkt, was in ungefähr der Hälfte der untersuchten Proben der Fall war, zeigten sich synergistische Apoptoseeffekte häufiger: Die Kombination von Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin und Betulinsäure führte zu signifikant höherer Apoptoseinduktion im Vergleich zum Effekt beider Einzelsubstanzen (s. Abb. 47).



**Abb. 47: FSC/SSC-Apoptoseanalyse primärer leukämischer Patientenproben mit Inkubationszeiten von mindestens 48h.** Diese wurden stimuliert mit Asparaginase (Asp, 1 U/ml, n=22), Doxorubicin (Doxo, 0,5 µM; n=20), Vincristin (VCR, 30 nM; n=18) und Betulinsäure (BA, 10 µg/ml), sowie der Kombination aus Zytostatikum und BA. Gezeigt sind Mediane mit Interquartilen, \*p<0,05 (t-test).

Zusätzlich kann festgestellt werden, dass Patientenparameter wie Alter, Geschlecht, Leukämietyp und insbesondere die Situation eines Rezidivs der Leukämie, keine Rolle hinsichtlich der Wirkverstärkung durch Betulinsäure spielten: Verstärkte Apoptoseinduktion zeigte sich für alle Zytostatika-Kombinationen gleich verteilt in jeder Patientengruppe und konnte Leukämiezellen auch im Falle eines Rezidivs wirkungsvoll eliminieren (s. Tab. 5).



**Tab. 5: Patientenparameter untersuchter kindlicher Leukämieproben (n=47)** mit laufender Probennummer (#), Patientenalter in Jahren, Geschlecht (m: männlich, w: weiblich), Leukämietyp (cALL: (kindliche) akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; (prä-)B: (prä-)B-Zellen; T: T-Zellen; NHL: Non-Hodgkin Lymphom) und Erscheinungsform der Leukämie (I: Initial oder R: als Rezidiv).

#	Alter	männl./ weibl.	Typ	Initial/ Rezidiv	#	Alter	männl./ weibl.	Typ	Initial /Rezidiv
1	4	w	cALL	I	25	5	m	cALL	I
2	9	w	AML	I	26	6	m	T-ALL	I
3	10	w	cALL	I	27	2	m	ALL	I
4	11	w	prä-B-ALL	I	28	8	m	T-ALL	I
5	4	w	ALL	I	29	2	m	cALL	I
6	3	m	cALL	I	30	3	w	cALL	I
7	4	w	ALL	I	31	4	w	cALL	I
8	12	m	T-ALL	I	32	7	m	cALL	R
9	11	m	T-ALL	I	33	6	m	cALL	I
10	<1	w	ALL	I	34	7	w	cALL	I
11	6	w	ALL	I	35	16	m	cALL	R
12	14	w	ALL	R	36	16	w	cALL	R
13	2	w	AML	I	37	11	m	AML	I
14	13	w	T-ALL	I	38	6	m	prä-B-ALL	I
15	4	m	B-NHL	I	39	5	w	prä-B-ALL	I
16	11	w	AML	I	40	11	m	T-ALL	I
17	9	w	cALL	I	41	11	m	T-NHL	I
18	7	w	prä-B-ALL	R	42	6	w	prä-B-ALL	I
19	3	m	ALL	I	43	8	m	cALL	I
20	2	m	ALL	I	44	13	m	cALL	I
21	11	m	AML	R	45	8	w	cALL	I
22	11	m	cALL	R	46	7	m	prä-B-ALL	I
23	3	m	cALL	I	47	2	m	prä-B-ALL	I
24	8	w	AML	I					

Diese Daten wiesen auf einen positiven Einfluss von Betulinsäure in Zytostatika-induzierter Apoptose in primären Leukämiezellen jeweils einer Patientenprobe hin. Dabei profitierte Apoptoseinduktion durch BA- Kombinationstherapie von einer längeren Inkubationszeit von mindestens 48h. Patientenparameter und ungünstige Prognose hatten keinen Einfluss.

V.2.2 Synergismus in Xenograft Leukämiezellen aus NOD/SCID-Mäusen

Primäre Patientenzellen wurden aus diagnostischen Punktaten gewonnen und standen daher nur in sehr beschränkter Menge für *in vitro* Versuche zur Verfügung. Diese Zellen teilen sich unter *in vitro* Kulturbedingungen nur in wenigen Fällen, daher wurde für weiterführende (molekulare) Untersuchungen nach einer Möglichkeit gesucht, Patientenproben bei geringem Mutationsrisiko zu expandieren. Dies war möglich durch ein Xenograft NOD/SCID-Mausmodell (s. Kapitel IV.2.9), welches für folgende Untersuchungen ausschließlich als Amplifikationsmethode herangezogen wurde, um ausreichend Tumorzellen für *in vitro* Versuche herzustellen. Patientenprobe #45 und elf weitere Patientenproben der kindlichen Leukämie (s. Tab. 6) wurden etabliert, wobei bei jeder Passage bis zu einer Milliarde Leukämiezellen aus der Milz dieser Tiere gewonnen werden konnten.

**Tab. 6: Patientenparameter kindlicher Leukämieproben (n=12) etabliert in einem Xenograft NOD/SCID-Mausmodell** mit laufender Probennummer (#), Patientenalter in Jahren, Geschlecht (m: männlich, w: weiblich), Leukämietyp (cALL: kindliche akute lymphatische Leukämie; prä-B: prä-B-Zellen; T: T-Zellen) und Erscheinungsform der Leukämie (I: Initial oder R: als Rezidiv).

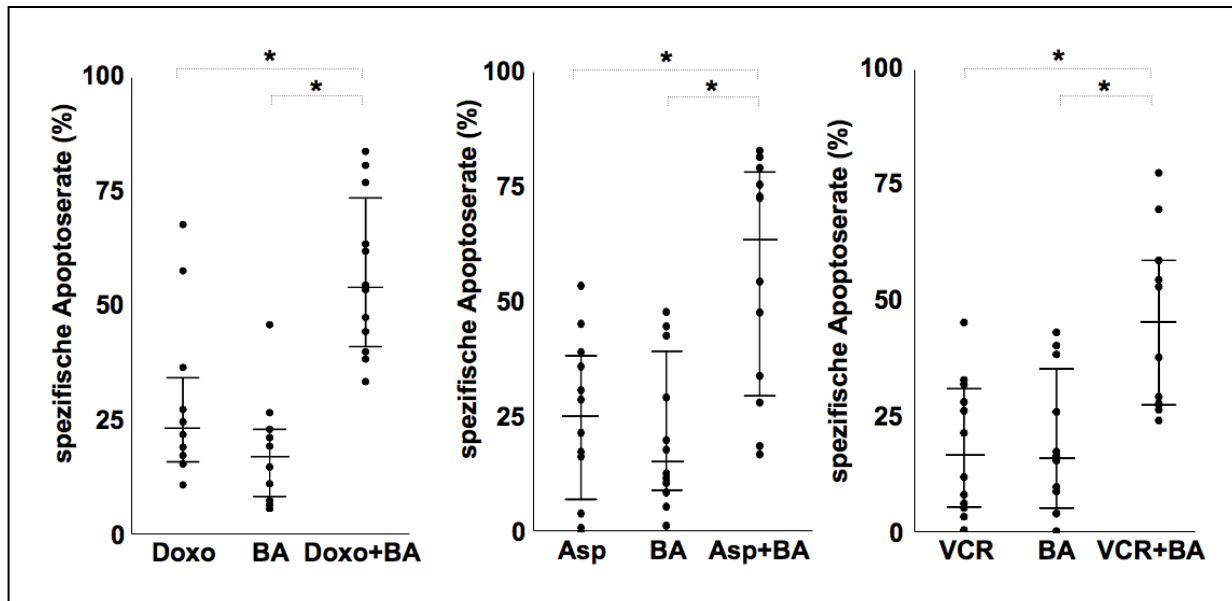
#	Alter	männl./weibl.	Typ	Initial/Rezidiv	#	Alter	männl./weibl.	Typ	Initial/Rezidiv
45	8	w	cALL	I	53	18	m	cALL	I
48	13	w	prä-B-ALL	I	54	11	m	T-ALL	I
49	3	w	prä-B-ALL	R	55	5	w	ALL	R
50	7	w	T-ALL	I	56	1	m	ALL	I
51	14	w	prä-B-ALL	R	57	4	m	T-ALL	I
52	6	w	prä-B-ALL	I	58	<1	m	ALL	I

Nach Aufreinigen und Aussäen in Zellkulturplatten wurden diese Zellen je mit Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin und Betulinsäure simultan stimuliert und bei obigen Bedingungen (s. Kapitel V.2.1) 48h bis 72h inkubiert. Diese Zytostatika-Kombinationen wurden gewählt, da sie bereits synergistische Effekte in Leukämiezelllinien und in über 40 primären Patientenproben zeigten (s. Kapitel V.1.1.1, V.1.1.2 und V.2.1).

Die Konzentrationen der Einzelwirkstoffe konnten durch Vorversuche so gewählt werden, dass sie in den für synergistische Betrachtungen idealen Bereich einer spezifischen Apoptoserate von bis zu 40% fielen. Dieser optimale Bereich für Apoptoseraten der Einzelstimuli wurde bereits für Zelllinienversuche in Kapitel

V.1.1.1 gewählt, um Präsenz von synergistischen Effekten durch Zytostatika-Kombinationen besser detektieren zu können.

Es zeigten 10 von 12 dieser Proben maximale synergistische Apoptoseinduktion bei im Vergleich zu primären Zellen niedriger dosierten Zytostatika- und BA-Konzentrationen. Hierbei überstieg der Apoptoseeffekt der kombinierten Stimulation die Summe der Einzelstimulationseffekte und war signifikant größer als die Effekte je einer Einzelstimulation von Zytostatikum oder Betulinsäure (s. Abb. 48).

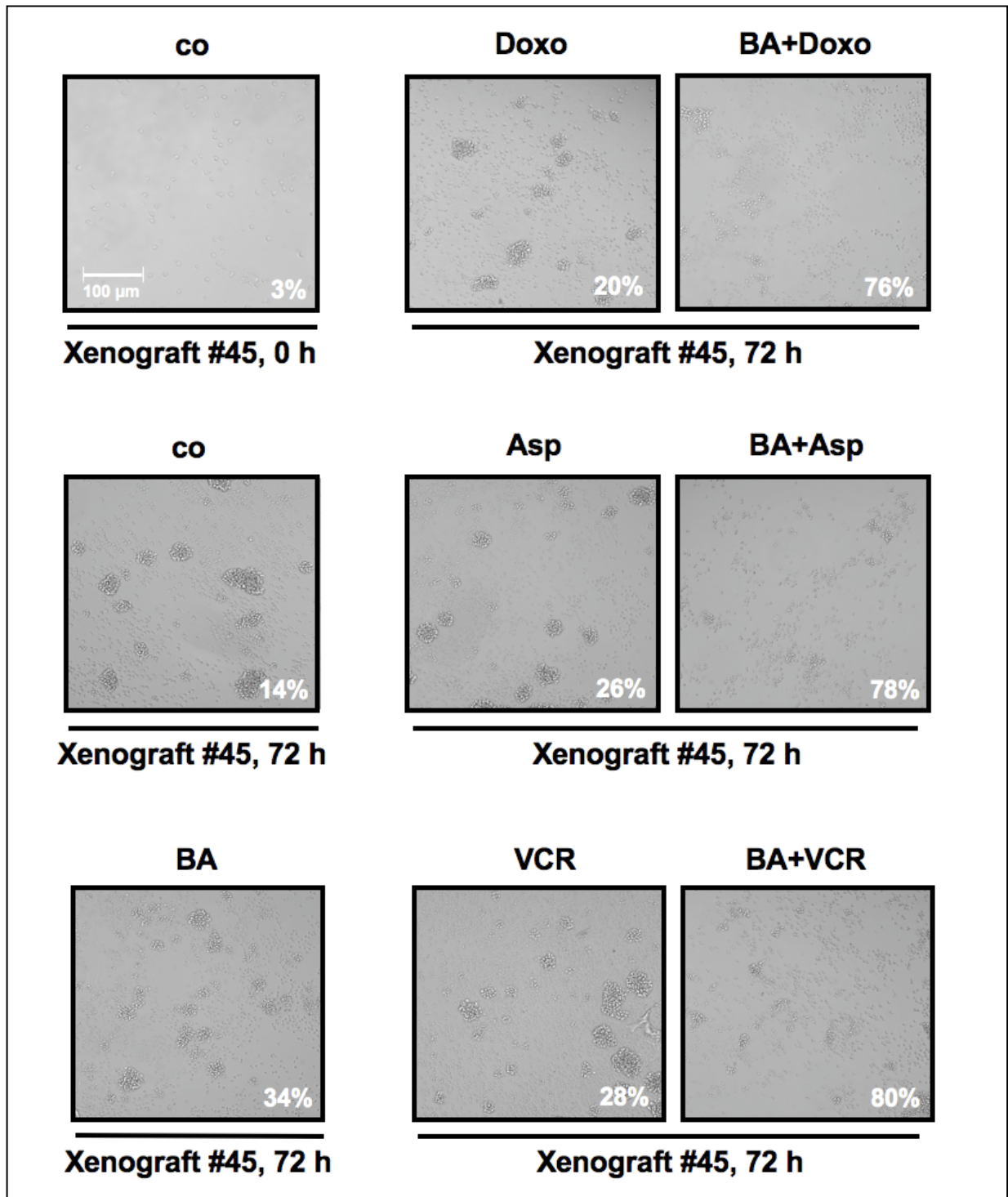


**Abb. 48: FSC/SSC-Apoptoseanalyse für synergistische Apoptoseinduktion in Xenograft Leukämiezellen aus NOD/SCID-Mäusen** (n=12 Patientenproben). Diese wurden mindestens 48h stimuliert mit Doxorubicin (Doxo, 50 nM), Asparaginase (Asp, 0,3 U/ml), Vincristin (VCR, 3 nM) und Betulinsäure (BA, 1 µg/ml), sowie der Kombination aus Zytostatikum und BA. Gezeigt sind Mediane mit Interquartilen, \*p<0,05 (t-test).

In Xenograft Leukämiezellen konnte durch ein weites Konzentrationsspektrum in einem größeren Ansatz und Inkubationszeiten von mindestens 48h synergistische Apoptoseinduktion detektiert werden. Daher trat in Xenograft Zellen deutlicher Synergismus durch Kombination von BA und Zytostatika auf als in primären Leukämiezellen.

### V.2.3 Hemmung des Wachstums einer Xenograft Leukämieprobe nach Kombination von Betulinsäure und Chemotherapeutika

Um den zytostatischen Effekt, der in Abb. 17 detektiert wurde, auch für primäre Leukämiezellen zu bestätigen, wurden Xenograft Leukämiezellen der Patientenprobe #45 herangezogen.



**Abb. 49: Wachstumshemmung von Xenograft Leukämiezellen nach BA-Zytostatika-Ko-stimulation.** Xenograft Leukämiezellen der Patientenprobe #45 wurden einzel- und ko-stimuliert mit Asparaginase (Asp; 0,3 U/ml), Doxorubicin (Doxo; 50 nM), Vincristin (VCR; 3 nM) und Betulinsäure (BA; 1 µg/ml), um Wachstum dieser Zellen über 72h mittels digitaler Photographie zu dokumentieren. Die Ausgangssituation zu Vesuchsbeginn (0h) gibt der Bildausschnitt oben links wieder. Gezeigt ist ein repräsentativer Bildausschnitt von acht Bildaus-schnitten pro Vertiefung in 100facher Vergrößerung. Angegebene Prozentangaben repräsen-tieren absolute Apoptoseraten einer nachfolgend durchgeführten FSC/SSC-Apoptoseanalyse derselben Probe.

Diese Patientenprobe wurde gewählt, da sie im Gegensatz zu anderen Xenograft Leukämiezellen spontanes Wachstum unter *in vitro* Kulturbedingungen zeigte. Wie in Kapitel V.2.2 beschrieben, ist Zellteilung primärer Leukämiezellen *in vitro* sehr selten. Zur Beurteilung einer Wachstumshemmung ist spontanes Wachstum unbehandelter Zellen aber Voraussetzung. Die Zellen wurden für 72h mit den Einzelwirkstoffen sowie jeweils mit BA kombiniert stimuliert. Kostimulierte primäre leukämische Blasten zeigten im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen und der Einzelstimulation keine Wachstumstendenz (s. Abb. 49).

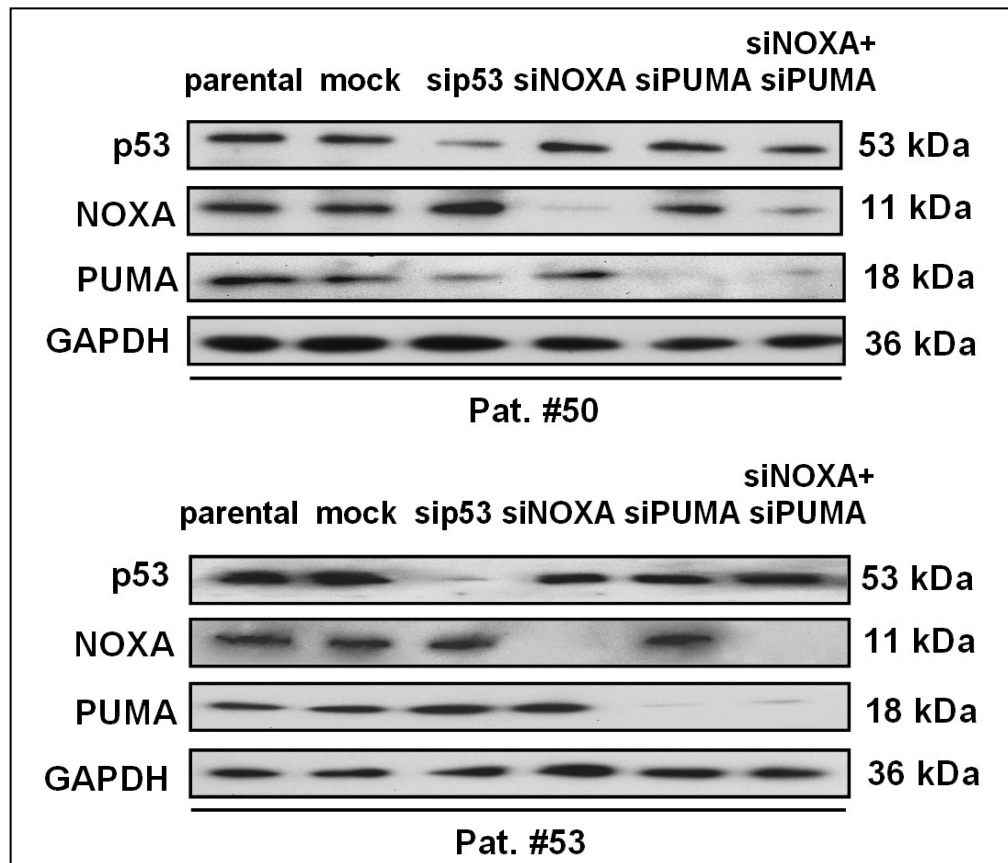
Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Kombination von Chemotherapeutikum und BA neben verbesserter Zytotoxizität eine zusätzliche zytostatische Wirkung besitzt, und bestätigten so die Daten der Zelllinienuntersuchungen auf JURKAT Zellen.

#### V.2.4 Knockdown Untersuchungen in zwei Xenograft Leukämieproben

Für die Leukämiezelllinien JURKAT und CEM konnte gezeigt werden, dass die effektive Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin und BA auf p53-abhängiger NOXA Aktivierung beruhte (s. Kapitel V.1.3). Um nun zu zeigen, dass dieser Signalweg auch in Xenograft Leukämiezellen aktiviert wird, wurden zwei Patientenproben (#50 und #53; s. Kapitel V.2.2) in gleicher Passage je dreimal in NOD/SCID-Mäusen amplifiziert. Es wurden dabei zwei Patientenproben gewählt, die mit synergistischem Zelltod auf Doxorubicin-, Asparaginase- oder Vincristin-BA-Kostimulation reagierten. Außerdem sollten diese Xenograft Zellen innerhalb kurzer Zeit in NOD/SCID-Mäusen zum Leukämiewachstum führen (< 3 Monate) und unter *in vitro* Kulturbedingungen unstimuliert eine geringe Zelltodrate nach 72h zeigen.

Diese Xenograft Leukämiezellen sollten mit siRNA gegen p53, NOXA und PUMA transient transfiziert werden, da diese Zellen *in vitro* nur über kurze Zeit kultivierbar und damit nicht stabil transfizierbar waren. Als spezifische Sequenzen zur RNA-Interferenz wurden gleiche Sequenzen wie in plasmidcodierten shRNA Versuchen verwendet (s. Kapitel IV.1.6). In Vorversuchen konnte dabei Amaxa-basierte Nukleofektion mit dem Amaxaprogramm C16 und einer Oligonukleotidkonzentration von 20  $\mu$ M als optimale Parameter etabliert werden. Dieses Verfahren zeigte minimale spezifische Zelltodinduktion (<10%) bei maximaler Transfektionsrate (>90%), was durch Transfektion eines Fluorochrom-konjugierten Kontroll-Oligonukleotids ermittelt

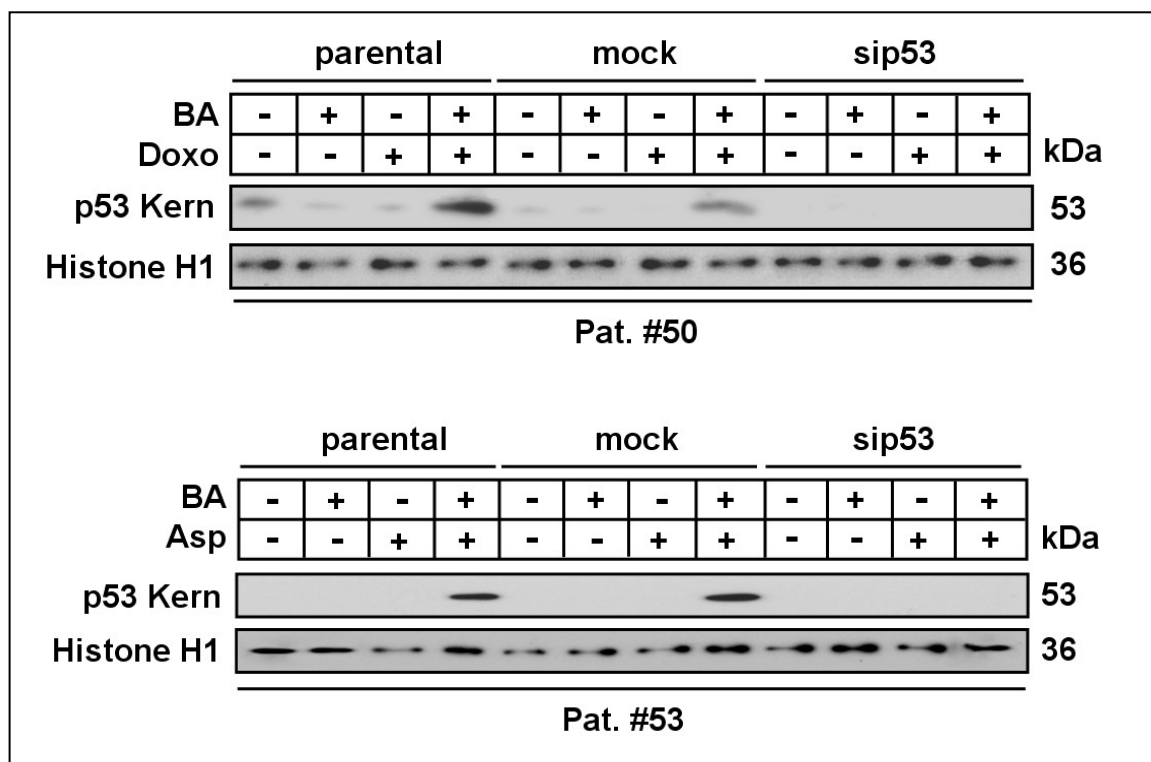
wurde (s. Kapitel IV.1.6 und IV.2.3.2). Diese Parameter gelten als kritisch zur effektiven RNA-Interferenz durch transiente Transfektion, da nicht transfizierte bzw. tote Zellen Ergebnisse weiterführender Untersuchungen verfälschen.



**Abb. 50: Western-Blot-Analyse von siRNA transfizierten Xenograft Leukämiezellen der Patientenprobe #50 (oben) und #53 (unten), 48h nach Transfektion.** Aufgetragen sind unbehandelte Zellen (parental) und per Nukleofektion mit siRNA Oligonukleotiden (je 20 µM) transfizierte Zellen: Kontrolloligonukleotid (mock), sip53 zur Herunterregulierung von p53, siNOXA zur Herunterregulierung von NOXA, siPUMA zur Herunterregulierung von PUMA sowie siNOXA+siPUMA (in Kotransfektion). Mit primären Antikörpern wurde der Proteinstatus von p53, NOXA und PUMA detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Erstmals weltweit gelang durch diese Methode in einem primären ALL Xenograft-Mausmodell die Etablierung der RNA Interferenz Technologie unter Verwendung der Xenograft Patientenproben #50 und #53 (nicht aber für Patientenprobe #45). Die Effizienz der Herunterregulation mittels siRNA wurde 48h nach transienter Transfektion überprüft: Bei Behandlung mit siRNA gegen p53, NOXA und PUMA setzte maximale Hemmung der Proteinexpression in primären Zellen nach 48h ein (s. Abb. 50).

Mit Hilfe dieser Methode sollte der Einfluss der transienten Transfektion mit entsprechender siRNA zunächst auf die Regulation von p53 in kostimulierten Xenograft Leukämiezellen untersucht werden. Dazu wurden nukleäre und zytoplasmische Fraktionen nach 24h getrennt lysiert, um p53 Stabilisierung im Kern zu detektieren.



**Abb. 51: Western-Blot-Analyse von Xenograft Leukämiezellen, getrennt lysiert nach nukleärer und zytoplasmischer Fraktion zum Nachweis von p53.** Getestet wurden unbehandelte Zellen (parental) und per Nukleofektion mit siRNA Oligonukleotiden (je 20 µM) transfizierte Zellen: Kontrolloligonukleotid als Transfektionskontrolle (mock) und sip53 zur Herunterregulierung von p53. Xenograft Patientenzellen #50 (oben) wurden für 24h einzel- bzw. kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo: 1 nM) und Betulinsäure (BA: 2 µg/ml), Xenograft Leukämiezellen #53 (unten) wurden für 24h einzel- bzw. kostimuliert mit Asparaginase (Asp: 0,5 U/ml) und Betulinsäure (BA: 0,5 µg/ml). Als Ladekontrolle diente Histon H1.

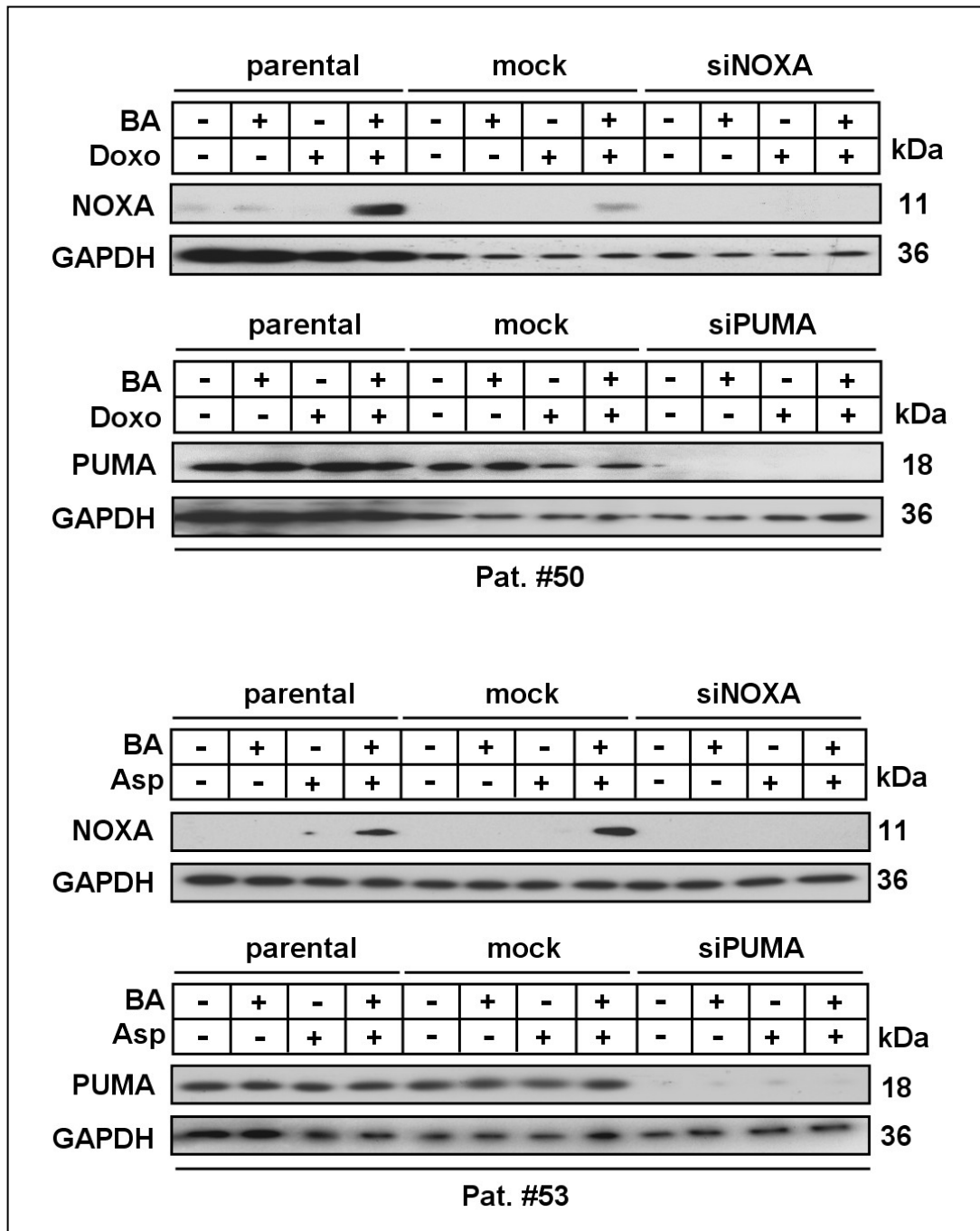
Dabei zeigte sich für die Behandlung mit Doxorubicin in Kombination mit Betulinsäure Stabilisierung von p53 in der nukleären Fraktion der parentalen und mit Kontroll-siRNA transfizierten Patientenprobe #50 nach 24h. Analog zeigte sich p53 Stabilisierung auch in Asparaginase-BA-Koinkubation nach 24h in Xenograft Leukämiezellen der Patientenprobe #53 (parental und kontrolltransfiziert). In beiden Fällen konnte p53-Akkumulation durch Transfektion von siRNA gegen p53 spezifisch inhibiert werden (s. Abb. 51).

Um p53-abhängige Regulation von PUMA und/oder NOXA auf Proteinebene für die Kombinationstherapie von Doxorubicin bzw. Asparaginase und BA zu zeigen, wurden unbehandelte und mit Kontrolloligonukleotid transfizierte Xenograft Patientenzellen entsprechend kostimuliert und per Western Blot analysiert. In diesem Fall dienten siNOXA bzw. siPUMA transfizierte Xenograft Patientenzellen der Herunterregulierung von NOXA bzw. PUMA.

Es konnte dabei in beiden Patientenproben #50 und #53 verstärkte Proteinexpression und damit Aktivierung von NOXA in parentalen und kontrolltransfizierten Xenograft Leukämiezellen nach BA-Zytostatika-Kombination (vgl. Abb. 52) nachgewiesen werden, welche durch Behandlung mit siNOXA vollständig inhibiert wurde. Die siRNA-induzierte Herunterregulierung von PUMA war effektiv, aber es kam in Xenograft Tumorzellen zu keiner Regulation von PUMA nach kombinierter Stimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase und BA (s. Abb. 52).

Vergleichbare Ergebnisse für p53- und NOXA-Akkumulation per Western-Blot-Analyse erbrachte die Kostimulation der jeweils anderen Xenograft Patientenprobe mit dem jeweils anderen Zytostatikum (#50 mit Asparaginase, #53 mit Doxorubicin).





**Abb. 52: Western-Blot-Analyse von Xenograft Leukämiezellen zum Nachweis von NOXA- und PUMA-Regulation.** Getestet wurden unbehandelte Zellen (parental) und per Nukleofektion mit siRNA Oligonukleotiden (je 20 µM) transfizierte Zellen: Kontroll-oligonukleotid (mock), siNOXA zur Herunterregulierung von NOXA und siPUMA zur Herunterregulierung von PUMA. Xenograft Patientenzellen #50 (oben) wurden für 48h einzel- bzw. kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo: 1 nM) und Betulinsäure (BA: 2 µg/ml), Xenograft Leukämiezellen #53 (unten) wurden für 48h einzel- bzw. kostimuliert mit Asparaginase (Asp: 0,5 U/ml) und Betulinsäure (BA: 0,5 µg/ml). Als Ladekontrolle diente GAPDH.

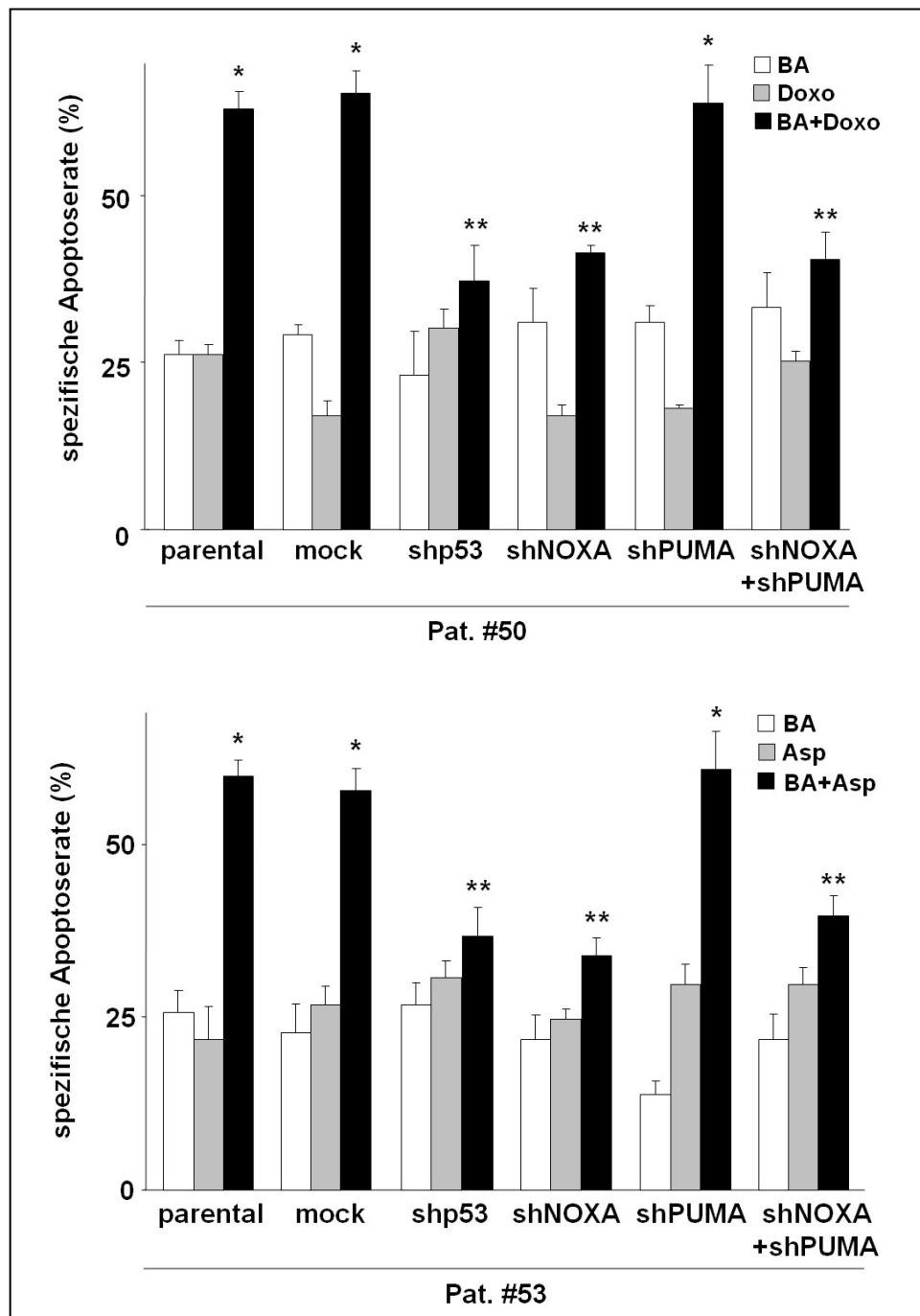
Auf molekularer Ebene konnte somit gezeigt werden, dass p53- und NOXA-Akkumulation auch in Xenograft Leukämiezellen mit kombinierter Zytostatika-BA-Gabe einherging. Um zu überprüfen, ob diese Proteine tatsächlich essentiell für synergistische Apoptoseinduktion in Xenograft Leukämiezellen sind, wurden parentale und wie zuvor siRNA-transfizierte Zellen für 72h mit Doxorubicin oder Asparaginase und BA inkubiert und anschließend die induzierte Apoptoserate gemessen.

Es zeigte sich synergistische Apoptoseinduktion in unbehandelten Zellen, in kontroll-transfizierten Zellen und in siPUMA-transfizierten Xenograft Blasten in vergleichbarer Höhe (s. Abb. 53). Die Ergebnisse bei Doxorubicin-BA-Behandlung in Xenograft Patientenzellen der Probe #50 und bei Asparaginase-BA-Behandlung in der Probe #53 waren vergleichbar.

Bis hin zur antagonistischen Ausprägung aufgehoben wurde der synergistische Effekt durch Transfektion von sip53, von siNOXA sowie nach simultaner Transfektion von siNOXA und siPUMA. Dies kann durch transiente Herunterregulierung von p53 und NOXA erklären werden (vgl. Abb. 51 und Abb. 52). Im Einklang mit den molekularen Ergebnissen zuvor hatte PUMA keinen Einfluss auf synergistische Apoptoseinduktion.

Auf die Apoptoseinduktion durch niedrig dosierte Einzelstimulation von Doxorubicin, Asparaginase oder Betulinsäure hatte die transiente Herunterregulierung von p53 oder NOXA in Xenograft Leukämiezellen keinen Einfluss. Anders als bei Leukämiezelllinienversuchen (s. Kapitel V.1.3.1) wurden Zytostatikakonzentrationen hier nicht adaptiert, d.h. sip53- oder siNOXA-transfizierte Xenograft Leukämiezellen zeigen keine Resistenz gegen niedrig dosierte Asparaginase- und Doxorubicinbehandlung.

Somit konnte in Kapitel V.2 gezeigt werden, dass primäre und Xenograft Zellen kindlicher Leukämien mit synergistischer Apoptoseinduktion durch BA und Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin bei Koinkubation von über 48h reagierten. Es trat dabei Akkumulation von p53 im Zellkern und sukzessive Akkumulation von NOXA im Zytosol auf. Inhibition dieser beiden Signalproteine inhibierte auch den synergistischen Apoptose-Phänotyp.



**Abb. 53: FSC/SSC-Apoptoseanalyse von siRNA-transfizierten Xenograft Leukämiezellen.** Getestet wurden unbehandelte Zellen (parental) und per Nukleofektion mit siRNA Oligonukleotiden (je 20 µM) transfizierte Zellen: Kontrolloligonukleotid (mock), sip53 zur Herunterregulierung von p53, siNOXA zur Herunterregulierung von NOXA, siPUMA zur Herunterregulierung von PUMA sowie siNOXA+siPUMA (in Kotransfektion). Xenograft Patientenzellen #50 (oben) wurden 6h nach Transfektion für 72h einzel- bzw. kostimuliert mit Doxorubicin (Doxo: 1 nM) und Betulinsäure (BA: 2 µg/ml), Xenograft Leukämiezellen #53 (unten) analog mit Asparaginase (Asp: 0,5 U/ml) und Betulinsäure (BA: 0,5 µg/ml). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten; \*/\*\*p<0,05 (RM ANOVA): statistisch signifikanter Unterschied zu kalkuliertem Kombinationseffekt nach Webb (1963).

Als Resümee konnte in den Zelllinienversuchen in Kapitel V.1 gezeigt werden, dass im Vorfeld zur Mitochondrienaktivierung p53 und NOXA essentielle Signalvermittler der Wirkverstärkung von Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin und Betulinsäure waren. Dieser Nachweis gelang durch Inhibition der synergistischen Apoptoseinduktion in stabil mit shp53 sowie auch mit shNOXA transfizierten JURKAT und CEM Zellen.

Analog dazu konnte nun in Kapitel V.2 die synergistische Signaltransduktion unabhängig auf zwei Xenograft Patientenproben durch Anwendung der erstmals in Primärzellen erfolgreich etablierten RNA-Interferenz Methode bestätigt werden: p53 wurde nach Kostimulation mit Doxorubicin oder Asparaginase und BA nach 24h im Kern stabilisiert und 24h zeitversetzt erfolgte für beide Kombinationen NOXA (nicht PUMA) Akkumulation in den Xenograft Patientenproben #50 und #53. Wurden diese Signalschritte per RNA-Interferenz gegen p53 und NOXA inhibiert, kam es nicht zur synergistischen Apoptoseinduktion.

Damit steht das Konzept p53-abhängiger NOXA-Akkumulation als Ursache BA-Zytostatika-kombinierter Apoptoseinduktion auf einem stabilen Fundament kliniknaher experimenteller Nachweise.

## **VI Diskussion**

Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation war es, herauszufinden, welche Kombinationen mit konventionellen Zytostatika und Betulinsäure zu synergistischer Apoptoseinduktion führen und über welche Mechanismen dies vermittelt wird.

Dabei konnte gezeigt werden, dass BA in der Lage ist, die Wirkung von drei etablierten Zytostatika zu verstärken. In den folgenden Kapiteln wird ein Modell der zu Grunde liegenden Apoptosesignaltransduktion präsentiert und die Rolle des Tumorsuppressors p53 und des BH3-D Proteins NOXA diskutiert. Außerdem wird das Auftreten des Zellzyklusarrests im Zusammenspiel mit synergistischer Apoptoseinduktion näher betrachtet. Es folgen die Schlüsse in Hinblick auf Polychemotherapie und ein Ausblick auf weiterführende Versuchsansätze, die ein noch tieferes Verständnis der molekularen Vorgängen und des therapeutischen Potentials einer BA-Kombinationstherapie ermöglichen werden.

### **VI.1 Betulinsäure steigert in Kombination mit etablierten Zytostatika die Apoptoseinduktion in Leukämiezellen**

Mit welchen der heute eingesetzten Chemotherapeutika der Leukämietherapie eine BA-Kombination sinnvoll sein kann, war Fragestellung zu Beginn der experimentellen Phase dieser Dissertation. Aus einem Spektrum von neun mit BA kombinierten zytotoxischen Agenzien unterschiedlicher Wirkstoffklassen konnten final drei Kombinationen mit synergistischer Apoptoseinduktion in Leukämiezellen gezeigt werden: Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin (s. Kapitel V.1.1.1 und V.2.2). Synergistische Apoptoseinduktion zweier Wirkstoffe ist erreicht, wenn die gemeinsame Gabe kleiner Mengen der Einzelwirkstoffe einen potenzierten Zelltodeffekt zeigt. Es war unerwartet, dass gerade diese Zytostatika synergistisch mit BA wirken, da sie in drei vollkommen unterschiedlichen Klassen von Wirkstoffen fallen. Der sehr effektive Zelltod von BA mit diesen drei Zytostatika konnte mechanistisch jeweils durch Stabilisierung des Transkriptionsfaktors p53 im Zellkern begründet werden, womit verstärkte pro-apoptotische NOXA Expression einherging, was im folgenden Modell erläutert wird.

### VI.1.1 Modell des intrazellulären molekularen Wirkmechanismus synergistischer Apoptosesignalvermittlung

Molekulare Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit hatten zum Ziel, die intrazelluläre Signaltransduktion der synergistischen Wirkung innerhalb der intrinsischen Apoptosesignalkaskade zu charakterisieren, um ein molekulares Verständnis zu erhalten und darauf aufbauend eine optimale Therapie vorzubereiten. In Abb. 54 sind alle im Untersuchungsverlauf erhaltenen Erkenntnisse in einem graphischen Modell zusammengetragen.

Die synchrone Gabe von Betulinsäure und Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin führte im Zellkern von Leukämiezellen zur massiven Akkumulation des Transkriptionsfaktors p53. Diese nukleäre Verfügbarkeit von p53 trat in Leukämiezelllinien nach 12h auf und hielt bis 24h nach Stimulationsbeginn an (s. Kapitel V.1.3.6). Es ist in diesem Zusammenhang für die eingesetzten Zytostatika beschrieben, dass durch sie induzierte DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche die sensorischen Kinasen ATM und ATR aktivieren und u.a. zur Degradation des p53-Gegenspielers MDM-2 führen (s. Kapitel II.1.4).

Es kam zur spezifischen Transaktivierung und verstärkter Expression von pro-apoptotischem NOXA im Maximum nach 24h (s. Kapitel V.1.3.5.2). Dieses BH3-D Protein der BCL-2-Familie nimmt pro-apoptotisch Einfluss auf das Gleichgewicht aller BCL-2 Mitglieder, in dem es als sog. ‚Sensitizer‘ primär mit hoher Affinität an die anti-apoptotischen BCL-2 Proteine A1 und MCL-1 bindet (s. Abb. 1) und so zur Freisetzung von direkten Aktivatoren (BID, BIM und eventuell PUMA) und dem porenbildenden Proteinen BAK führt. Ungebunden können diese direkten Aktivatoren freies BAK zur Translokation in die äußere Mitochondrienmembran dirigieren, wo es zur oligomeren Porenbildung kommt (s. Kapitel II.1.3).

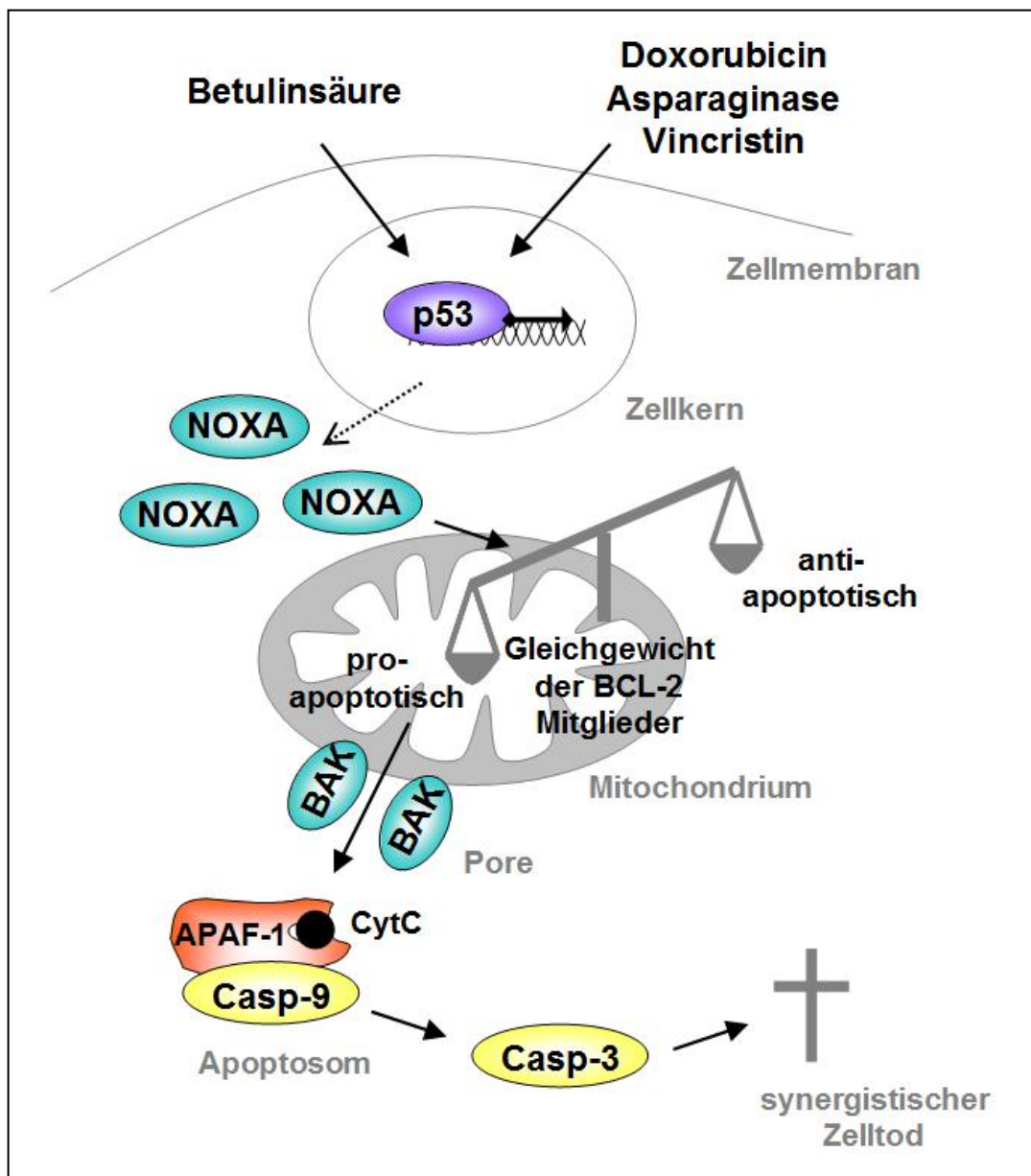
Durch diese Porenbildung ist der sog. ‚point of no return‘ der intrinsischen Apoptosesignalkaskade erreicht und die folgenden Ereignisse gelten *in vivo* als irreversibel. Das normalerweise der Atmungskette zugeordnete Protein Cytochrom-C wurde durch BAK-Poren vom Intermembranraum in großer Zahl 36h nach Beginn der Kostimulation ins Zytosol entlassen (s. Kapitel V.1.3.2). Im Fall von BAK und BAX wurde für einige intrinsische apoptotische Stimuli gezeigt, dass sie redundant zur Freisetzung von Cytochrom-C beitragen können (Wei et al., 2001). Für einzelne Stimuli intrinsischer Apoptose, z.B. Vinkalkaloide wie Vinblastin, konnte eine

dominante Rolle von BAK postuliert werden, da BAK- vor BAX-Aktivierung stattfand und nur BAK als Porenprotein essentiell war (Upreti et al., 2008). Eine redundante Rolle von BAX bestätigt sich auch in vorliegender synergistischer BAK-abhängiger Apoptoseinduktion, da BAX in JURKAT und CEM Zellen per se nicht detektiert werden kann (Brimmell et al., 1998). Inwieweit BAX die Funktion von BAK in Leukämiezellen hinsichtlich synergistischer Apoptoseinduktion ersetzen kann, bleibt offen und kann nur in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Parallel zur Freisetzung von Cytochrom-C ins Zytosol kam es zur Freisetzung von pro-apoptotischem SMAC und OMI, zwei Inhibitoren von anti-apoptotischen IAP-Proteinen wie XIAP, cIAP-1, -2 und Survivin. IAP-Proteine halten im Ruhezustand pro-apoptotische Caspasen durch Bindung inaktiv. Zytosolische Cytochrom-C Proteine komplexieren mit Pro-Caspase-9 und APAF-1 zum sog. ‚Apoptosom‘, in welchem Caspase-9 auto-katalytisch gespalten und damit aktiviert wird. Nur durch aktive Caspase-9 in diesem Komplex wird Caspase-3 als Schlüsselprotein der apoptotischen Exekutionsphase aktiviert (s. Kapitel II.1.2). Caspasenaktivierung von Caspase-9 und -3 begann 36h nach Kostimulation und erreichte ein Maximum nach 48h (s. Abb. 18). Nach 72h zeigten diese Zellen typische post-apoptotische morphologische Veränderungen wie Abnahme des Zellvolumens („shrinking“) bzw. Abschnürung von kleineren Zellkörpern („blebbing“), welche mikroskopisch und durchflusszytometrisch erkennbar waren. In diesem Stadium können Leukämiezellreste *in vivo* durch Endozytose von entsprechenden Immunzellen aufgenommen werden und so im Idealfall ohne Inflammationsreaktion entsorgt werden.

Diese Chronologie der Ereignisse synergistischer Apoptoseinduktion durch BA und Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin galt wie dargelegt für JURKAT und CEM Zellen (s. Kapitel V.1.3). In Xenograft Leukämiezellen aus Patientenproben konnte durch erstmalige Transfektion RNA-interferierender Oligomere gezeigt werden, dass auch in diesen Zellen identische Apoptosesignalwege aktiviert wurden. Die Aktivierung apoptotischer Schlüsselproteine geschah jedoch mit einer Zeitverzögerung: Detektierbare p53-Stabilisierung trat erst nach 24h ein, p53-induzierte NOXA Expression nach 48h (s. Kapitel V.2.4). Primäre Leukämiezellen zeigen *ex vivo* verlangsamten Metabolismus primärer Leukämiezellen und damit zusammenhängende geringere Zellteilungsraten, was auch eine verlangsamte Signalvermittlung erklären kann. Das Phänomen von beschleunigter Biosynthese und damit verbundenen metabolischen Prozessen in etablierten Tumorzelllinien im Vergleich zu

primären Tumorzellen *ex vivo* wurde bereits in vergleichenden Transkriptomanalysen für primäre akute myeloische Leukämiezellen (AML) dokumentiert (Lee et al., 2008).



**Abb. 54: Modell der synergistischen Apoptosesignaltransduktion durch Betulinsäure und Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin in Leukämiezellen.** Nur nach Kostimulation erfolgte effektive Stabilisierung von p53 im Zellkern und Transaktivierung des pro-apoptotischen Zielproteins NOXA. Durch kompetitive Bindung von NOXA an anti-apoptotischer BCL-2 Mitglieder wurde das Gleichgewicht der BCL-2 Mitglieder am Mitochondrium zur pro-apoptotischen Seite hin verschoben. Dies führte zur BAK-Translokation und Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die Cytochrom-C in das Zytosol entlassen wurde. Cytochrom-C komplexierte mit APAF-1 und aktivierte Caspase-9 (Apoptosom), welches sukzessive Caspase-3 als Effektorcaspase aktivierte. Final führte diese Signalkette zum synergistischen Zelltod der Zelle.



Die Versuche wurden jeweils nach 72h beendet, wobei Xenograft Leukämiezellen zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise geringe synergistische Effekte nach Kostimulation als etablierte Zelllinien zeigten. Eine Ausdehnung der Versuchsspanne war nicht möglich, da diese Zellen unter *in vitro* Kulturbedingungen eine spontan ansteigende Zelltodrate nach wenigen Tagen (abhängig von der Patientenprobe) aufwiesen und daher kaum *in vitro* über längere Zeit kultivierbar waren (s. Kapitel II.3). Um diese Hintergrundeffekte von synergistischer Apoptoseinduktion trennen zu können, wurde als Endpunkt der *in vitro* Stimulationsversuche eine spontane Apoptoserate unbehandelter Kontrollzellen von 25% (im Vergleich zu Versuchsbeginn) gewählt. Daher ist es möglich, dass größere synergistische Effekte, die sich in Xenograft Leukämiezellen durch einen geringeren Proteinumsatz *ex vivo* erst nach 72h einstellten, unerkannt blieben. Als weitere Diskrepanz zu Leukämiezelllinien zeigte transiente Herunterregulierung von p53 oder NOXA durch entsprechende siRNA-Oligonukleotide keinen Einfluss auf die Sensitivität der Xenograft Leukämiezellen gegenüber den niedrig dosierten Einzelsubstanzen Doxorubicin, Asparaginase oder Betulinsäure (s. Abb. 53). Es ist anzunehmen, dass im Vergleich zu Zellliniensystemen (mit stabiler shRNA-Transfektion) die Inhibition mittels transienter siRNA-Oligonukleotide primär die verstärkte Neusynthese von NOXA inhibierte und erst zeitverzögert auf die Basisproteinlevel von NOXA und p53 Einfluss nahm (im Maximum erst nach 48h, s. Abb. 50). Dadurch konnte es zur Inhibierung der synergistischen Apoptoseinduktion durch kombinierte Stimulation kommen, wohingegen die Apoptoseinduktion durch die niedrig-dosierten Einzelsubstanzen Doxorubicin, Asparaginase oder Betulinsäure (von <30%) unter diesen besonderen Rahmenbedingungen nicht beeinträchtigt wurde.

*In vivo* zeigen Xenograft Leukämiezellen und Leukämiezelllinien vergleichbare Proliferationsraten, erkennbar durch ähnliche Anwachsgeschwindigkeiten in immundefizienten Mäusen nach 30 bis 90 Tagen (Agliao et al., 2008). Daher ist zu erwarten, dass die Tumorzelltodinduktion in primären Leukämiezellen nach Kombination von Betulinsäure und Zytostatika *in vivo* effektiver ist als *in vitro*.

Bis dato wurden synergistische Betulinsäure-Zytostatika-Kombinationen (u.a. mit  $\gamma$ -Bestrahlung, Actinomycin D, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Taxol und Vincristin) ausschließlich auf soliden Tumorzellen getestet (s. Kapitel II.2.3). Eine detaillierte Analyse der Regulation von NOXA erfolgte dabei nicht, es konnte aber gesteigerte Caspasenaktivierung, Spaltung von XIAP und Freisetzung von Cytochrom-C und

SMAC nach mehr als 24 Stunden festgestellt werden. Bis auf XIAP-Spaltung, was ein Begleiteffekt sein kann, decken sich diese intrinsischen Merkmale synergistischer Apoptoseinduktion mit den in dieser Arbeit erbrachten distalen Daten. In einem Fall wurden Zellzyklusstudien durchgeführt, welche G2/M-Arrest nach Kostimulation von BA und Vincristin in Melanomzellen zeigten - auch dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Zellzyklusarrest durch BA und Doxorubicin bzw. Asparaginase auf Leukämiezellen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass auch in zuvor untersuchten BA-Kostimulationen p53-vermittelte NOXA-Akkumulation eine bisher noch nicht entdeckte Rolle bei synergistischer Apoptoseinduktion spielen kann.

#### VI.1.2 Synergistische Apoptoseinduktion ist begleitet von Zellzyklusarrest

In Folge einer Behandlung mit zytotoxischen Substanzen tritt häufig das Phänomen des Arretierens der Tumorzellpopulation in einer Zellzyklusphase ein, da regulatorische Mechanismen beeinträchtigt werden. Für Monotherapie mit Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin ist dokumentiert, dass diese Substanzen direkt oder indirekt DNA-Schäden bis hin zu DNA-Strangbrüchen induzieren können. In Tumorzellen kommt es meist in Folge zur Stabilisierung von p53 und dosisabhängig zum Zellzyklusarrest in unterschiedlich beschriebenen Zyklusphasen (Krejci et al., 2004; Kurz et al., 2004; Ashley und Poulton, 2009).

Wurden Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Asparaginase und Betulinsäure kombiniert, trat im Gegensatz zur Monotherapie ein Zellzyklusarrest nach 24h in der S- bzw. G2/M-Phase auf (s. Kapitel V.1.3.6). Diese Beobachtung legt nahe, dass Betulinsäure die DNA-schädigende Wirkung von Doxorubicin bzw. Asparaginase begünstigt. So ist möglich, dass kostimierte Leukämiezellen vermehrt in S- bzw. G2/M-Phase eintraten, jedoch durch p53-Stabilisierung am G2/M-Restriktionspunkt arretierten, was p53-Akkumulation und synergistische Apoptoseinduktion begünstigen konnte.

#### VI.1.3 Der Tumorsuppressor p53 ist zentraler Vermittler synergistischer Apoptoseinduktion in Leukämiezellen

Der Transkriptionsfaktor p53, ein Protein bestehend aus 393 Aminosäuren, besitzt einzigartige funktionale Vielfältigkeit innerhalb des komplexen Signalnetzwerkes, das v.a. in Folge von DNA-Schädigung durch chemotherapeutische Wirkstoffe, Be-

strahlung oder andere zelluläre Stressfaktoren induziert wird (s. Kapitel II.1.4). Neben der sekundären pro-apoptotischen Rolle als direkter Interaktionspartner ist p53 primär Transkriptionsfaktor von bis dato 146 bekannten Zielgenen, darunter 37 pro-apoptotischen Genen (Menendez et al., 2009). Es werden ständig neue p53-Zielgene bestätigt, was die zentrale Rolle von p53 als ‚Wächter des Genoms‘ weiter festigt.

Für durchschnittlich 50% aller Tumorerkrankungen sind Mutationen im p53 Genlokus *TP53*, eine Absenkung des p53 mRNA-Levels oder des Proteinlevels selbst dokumentiert (Petitjean et al., 2007). Jedoch treten solche Mutationen in Leukämie- und Lymphomzellen mit unter 20% deutlich seltener auf als in soliden Tumoren. Eine Analyse von Mutationsstellen innerhalb des Genlokus *TP53* in 238 Leukämiezellen zeigte in 50% aller gefundenen Mutationen eine sog. GC→AT Transition, welche durch endogene Deamination entstehen. Die häufigsten Mutationsstellen (‚hot spots‘) in hämatologischen Krebserkrankungen betreffen die Aminosäuren 175 (Arg→His), 248 (Arg→Gln) und 273 (Arg→His), deren Codons alle durch GC→AT Transition charakterisierte Punktmutationen tragen (Peller und Rotter, 2003).

Die in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien mit synergistischem Phänotyp nach Kombinationsgabe von Betulinsäure und Zytostatika tragen - soweit bekannt - entweder die Wildtypform (Zelllinien A549, HCT-116, MCF-7) oder heterozygote Punktmutationen (Zelllinien JURKAT und CEM) in der Aminosäuresequenz von p53. Von 4 der 8 untersuchten Leukämie- und Lymphomzelllinien, die keine synergistische Apoptoseinduktion zeigen, ist bekannt, dass an Stelle des Wildtyp p53-Proteins heterozygot ‚non-sense‘ Mutanten entweder durch ‚frame shift‘ Deletionen (Zelllinien K562, THP1, U937) oder durch eine Stop-Codon-Mutation (Zelllinie HUT78) entstehen können. Es ist in der Literatur beschrieben, dass der mutationsbedingte Verlust der transaktivierenden Funktion von p53 zur Akkumulation dieser p53 Mutanten im Zellkern führt, da p53-induzierbare Proteine wie MDM-2 abgebaut werden, die normalerweise den p53-Level durch Degradation regulieren (Blagosklonny, 2002). Diese Beobachtungen legen nahe, dass diese ‚non-sense‘ Mutanten das Vermögen der Tumorzelllinie zur synergistischen Apoptoseinduktion hemmen können, da es nicht zur verstärkten NOXA Expression durch p53 als Transkriptionsfaktor kommen kann.

Spezifische p53 Punktmutationen in den Zelllinien JURKAT (Aminosäuren 256: Thr→Ala; 259: Asp→Gly; 260: Ser→Ala) und CEM (Aminosäuren 37: Ser→Pro; 175: Arg→His; 248: Arg→Gln) scheinen dagegen keinen Einfluss auf das Vermögen von

p53 zur DNA-Bindung an die Promotorregion des NOXA Genlokus und die Rekrutierung und Initiation der RNA-Polymerase II zu haben. Diese Mutationen liegen zwar in der DNA-bindenden Kernregion, erlauben jedoch die Translation eines vollständigen p53-Proteins. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass verschiedene gut charakterisierte Mutanten des p53 Proteins funktionell aktiv sein können, d.h. dennoch bestimmte p53 Zielgene transaktivieren können (Ory et al., 1994). Davor galten p53-Mutanten als anti-apoptotisch und nur die Wildtypform als pro-apoptotisch wirksam, nach heutigem Wissensstand existieren aber komplexere Zusammenhänge. Inwieweit verschiedene p53-Funktion durch bestimmte Mutationen beeinflusst ist, bleibt Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben: Beispielsweise konnte für die Kombination der Chemotherapeutika Methotrexat oder 5-Fluorouracil mit dem extrinsischen Apoptoseinduktor TRAIL gezeigt werden, dass p53-abhängige pro-apoptotische Transaktivierung von Caspase-8 als Zielgen zur Überwindung von TRAIL-Resistenz in Zellen führt. Diese Eigenschaft von p53 als Transkriptionsfaktor war unabhängig des p53-Mutationsstatus auf einem breiten Panel von Tumorzellen und primären Zellen mit geringer Caspase-8 Proteinexpression detektierbar (Ehrhardt et al., 2008).

Betulinsäure und Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin sind als Kostimulus in der Lage, unabhängig von definierten p53-Punktmutationen pro-apoptotische Expression von NOXA zu fördern. Anderen Substanzen wie Zytarabin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Etoposid, Methotrexat und 6-Thioguanin wiesen bei Kostimulation mit BA keine potenzierte, sondern maximal additive Wirkung auf. Ursache hierfür können unterschiedliche Wirkweisen der p53-Aktivierung sein: Niedrig dosierte Anti-metabolite (Zytarabin, Methotrexat, 6-Thioguanin), Glucocorticoide (Dexamethason), Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid) und DNA-alkylierende Agenzien (Cyclophosphamid) scheinen entweder nicht zur Akkumulation von p53 im Zellkern zu führen bzw. zeitgleich Translationsmechanismen zu inhibieren. Dadurch könnte es nicht zur effektiven Transaktivierung von p53-Zielgenen wie NOXA kommen (Blagosklonny et al., 2002).

Einzelstimulation der hier verwendeten Tumorzellen mit Betulinsäure oder einem der drei Zytostatika in geringer Konzentration führte generell nur zu minimaler Apoptoseinduktion in Leukämiezellen ohne Stabilisierung von p53 (s. Kapitel V.1.1.1 und V.1.3.5). Dies kann durch eine Eigenart der p53 Aktivierung erklärt werden: Die Integration onkogener Signale zur Aktivierung von p53 (wie DNA Schädigung) erfolgt

laut aktuellem Wissenstand nach Intensität des Stresssignals und nicht nach Persistenz (Junttila und Evan, 2009). Dem folgend existiert eine Intensitätsschwelle. Bei Unterschreitung dieser Schwelle können die meisten Tumorzellen das Stresssignal kompensieren und zeigen keinen apoptotischen Phänotyp. Bei Überschreitung der Signalschwelle durch Kollaboration von Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin und Betulinsäure akkumuliert p53 über mehrere Stunden im Zellkern. Es kann in dieser Zeit (noch unbekannte) post-translationale Modifikation an bestimmten p53 Aminosäuren und spezifische Transaktivierung des NOXA Genlokus erfolgen. Der zelluläre NOXA Proteinlevel steigt zeitversetzt und führt zum irreversiblen Kippen des intrazellulären Gleichgewichts hin zur pro-apoptotischen Seite (s. Modell in Abb. 54).

#### VI.1.4 Selektive p53-vermittelte NOXA Expression führt zur Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen

Als sensitivierendes BH3-D Protein ist NOXA in der Lage, durch höher affine Bindung anti-apoptotischer Proteine (A1 und MCL-1) Freisetzung von anderen aktivierenden BH3-D Proteinen (BID, BIM und eventuell PUMA) oder der porenbildenden Proteine BAK und BAX zu bewirken. NOXA-Überexpression führt aber nur zur selektiven Apoptoseinduktion in Tumorzellen, nicht in normalen Zellen. Außerdem gibt es keine Korrelation zwischen Krebsentstehung und Verlust oder Mutation des NOXA-Genlokus, was eine optimale Ausgangslage hinsichtlich NOXA-zielgerichteter Therapie darstellt (s. Kapitel II.1.3).

In dieser Dissertation konnte für die synergistische Apoptoseinduktion von BA und Zytostatika gezeigt werden, dass nur das p53-induzierbare BH3-D Protein NOXA und nicht andere p53-Zielgene wie PUMA oder das porenbildende Protein BAX pro-apoptotisches Schlüsselsignalprotein ist. Diese selektive Aktivierung ist im Einklang mit publizierten Daten, nach denen NOXA und PUMA synergistisch kooperieren können (Nakajima und Tanaka, 2007), jedoch auch in anderen Zusammenhängen distinkte Apoptosefunktion übernehmen (Naik et al., 2007). Die Modifikation(en) des p53 Proteins, welche zur Aktivierung bestimmter Zielgene nach einem apoptotischen Stimulus führen, sind noch weitestgehend unbekannt. Im Fall der Expressionskontrolle von NOXA wurde in humanen Tumorzellen gezeigt, dass die post-translationale Acetylierung der p53 Aminosäuren 320 (Lys) und 373 (Lys), die spezifische Bindungsaffinität von p53 an die Promotorsequenz des NOXA Genlokus

und damit spezifische NOXA Expression verstärken kann (Terui et al., 2003). Obwohl nicht ausgeschlossen ist, dass auch andere Modifikationen wie Phosphorylierungen und Methylierungen bestimmter p53 Aminosäuren eine spezifische NOXA Expression vermitteln, passt diese exklusive Acetylierung im C-terminalen Bereich zur obigen Beobachtung: Punktmutationen in anderen p53 Domänen wie in JURKAT und CEM Zellen haben - im Gegensatz zu Deletionen oder Stop-Codon-Mutationen - keinen Einfluss auf NOXA Transaktivierung.

Weitere Faktoren, die spezifisch Zielgene des p53-abhängigen Zelltodes regulieren können, sind zum einen die Interaktion des p53 Proteins mit Kofaktoren und die Menge an p53 Protein im Zellkern. Kofaktoren, die spezifische NOXA Expression vermitteln, sind nicht bekannt. Die Menge von aktivem p53 kann jedoch Einfluss auf den induzierten Apoptosesignalweg haben: Die Konsensussequenz jedes p53 Zielgens zur Bindung des Transkriptionsfaktors (als p53-Tetramer), das ‚responsive element‘, besteht aus zwei Decameren (10 nt) bestimmter Basenabfolge und einem Spacer (bis 13 nt). Für das ‚responsive element‘ der Promotorregion des NOXA Genlokus ist bekannt, dass dessen Decamere in der Kernregion abweichende Nucleotide aufweisen, wodurch es als schwaches ‚responsive element‘ mit geringer Bindungsaffinität zu p53 gilt. Diese unterschiedlichen Bindungseigenschaften von p53 an spezifische ‚responsive elements‘ erlauben eine feine Regulierung der apoptotischen Antwort - abhängig von Modifikation und Menge des nukleären p53 Proteins (Menendez et al., 2009). Durch Kombination von Betulinsäure und Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin kommt es zur Akkumulation großer Mengen von p53 im Zellkern über einen Zeitraum von mehreren Stunden. Diese Akkumulation von p53 scheint ausreichend für spezifische Transaktivierung des NOXA Proteins und mitochondriale Apoptose.

#### VI.1.5 Die gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen das große Potential von Betulinsäure im Hinblick auf die Polychemotherapie

Wirkverstärkung durch Kombination von zytotoxischen Agenzien zur Eliminierung von Tumorzellen ist zentraler Ansatz in Design und Optimierung von Polychemotherapieprotokollen. Diese kommen bei einem Großteil behandelbarer Krebserkrankungen solitär oder begleitend zu operativer Entfernung und Bestrahlung bzw. vor einer Stammzelltransplantation seit über 50 Jahren zum Einsatz. Die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter, die akute lymphatische Leukämie (ALL), stellt dabei

eine durch erprobte Polychemotherapie (v.a. mit Glucocorticoiden, Vinkalkaloiden, Anthrazyklinen und Asparaginase) vergleichsweise gut behandelbare Krebsform dar: Die Langzeitüberlebensrate bei Erstdiagnose liegt bei über 85%. Diese verschlechtert sich jedoch dramatisch bei entsprechenden Risikofaktoren, im Fall eines Rezidivs oder bei Erstdiagnose im Erwachsenenalter. In diesen Fällen sinkt die Langzeitüberlebensrate unter 50% (Ribera und Oriol, 2009; Suzuki et al., 2009). Dabei gilt es als unwahrscheinlich, dass diese Zahl durch derzeit angewandte Therapieprotokolle weiter verbessert wird. Simple Steigerung der Chemotherapeutikadosen kann ungewünschte Nebeneffekte wie Toxizität gegenüber gesunden Zellen erhöhen. Daher liegt bei der Entwicklung zukünftiger Therapieprotokolle die Herausforderung darin, durch die Gabe minimaler Dosen von zytotoxischen Agenzien maximale Eliminierung von Tumorzellen zu erlangen. Ein Lösungsansatz ist der Einsatz einer kombinierten Therapie mit neuen Wirkstoffen. Hierbei werden subtoxische Wirkstoffdosen in optimaler Abstimmung hinsichtlich molekularer Wirkweise und Pharmakodynamik verabreicht, um synergistische Effekte zu induzieren und die Entwicklung von Resistenzen gegen einzelne Wirkstoffe zu verzögern (Pui et al., 2009). Zusätzlich ist in soliden Tumorzellen die Apoptose-resistenz per se gegenüber hämatologischen Krebserkrankungen erhöht, so dass Polychemotherapie in vielen Fällen erfolglos ist. Hierbei liegt verstärkt die Hoffnung auf dem zukünftigen Einsatz von effektiveren Wirkstoffen.

Das Potential von Betulinsäure in Monotherapie hinsichtlich Apoptoseinduktion in Tumorzellen liegt wie bisher bekannt in der direkten Aktivierung von Mitochondrien zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wofür keine übergeordneten Signalproteine aktiviert werden müssen (s. Kapitel II.2.1). Diese Eigenschaft kann als Erklärung herangezogen werden, warum BA in Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs wirkungsvoll intrinsische Apoptose induzieren kann. In primären Leukämiezellen aus Patientenproben konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass BA apoptotischen Zelltod selbst bei ungünstiger Prognose, Therapieresistenz oder im Rezidivfall induziert. Diese direkte mitochondriale Cytochrom-C-Freisetzung wurde dabei nach hoch dosierter BA-Gabe vermittelt durch BAK/BAX- und PT-Poren (‘permeability transition’). BCL-2 oder BCL-XL Überexpression inhibierte diese Porenbildung und damit BA-induzierte Apoptose. Zusätzlich konnte als eine weitere Wirkebene verstärkte BAX-Expression nach BA-Stimulation in anderen Tumorzellen gezeigt werden. BA war daher als wirksames Einzelpräparat ein viel versprechender

Kandidat, um im Zusammenspiel mit etablierten Zytotoxika die Gesamtwirkung der Therapie, also das Gesamtvermögen zur selektiven Apoptoseinduktion in Tumorzellen zu steigern.

Nun konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass BA in Kombination mit den etablierten Zytotoxika Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin auf synergistische Weise Apoptose in Leukämiezellen induziert. Es konnte zusätzlich ein neuer Mechanismus gefunden werden, der dieser Wirkung zu Grunde liegt: Durch Kostimulation wird der Transkriptionsfaktor p53 im Zellkern stabilisiert und kann verstärkte Proteinexpression des pro-apoptischen BCL-2 Mitglieds NOXA vermitteln. Es kommt zur BAK-Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran, klassischer Cytochrom-C Freisetzung und Aktivierung von Capsase-9 und -3. Diese neu entdeckte zusätzliche Wirkweise von niedrig dosierter Betulinsäure, nämlich die Begünstigung von p53-Akkumulation und von NOXA-Transaktivierung, kann die oben beschriebene große Effektivität dieses neuen Wirkstoffes erklären. Neben BA ist durch andere Arbeiten bekannt, dass zytotoxische Wirkstoffe (wie Actinomycin D, Doxorubicin oder Vincristin) je nach Dosierung auf unterschiedliche Weise p53-abhängig und unabhängig Apoptose induzieren können (Choong et al., 2009).

Bisher konnte gezeigt werden, wie entscheidend das Gleichgewicht pro- und anti-apoptischer BCL-2 Proteine Einfluss auf Leben und Tod einer Zelle hat und wie zytotoxische Wirkstoffe (und deren Kombination) dieses Gleichgewicht beeinflussen können. In Tumorzellen ist intrinsische Apoptoseblockierung auf Ebene der BCL-2 Proteine ein typischer Resistenzmechanismus und damit Überlebensvorteil. Dabei können nach Letai et al. (2008) drei Klassen unterschieden werden: Blockierung auf Regulationsebene von BH3-D Aktivatoren, durch Herunterregulation von BAK oder BAX oder durch Überexpression anti-apoptischer BCL-2 Mitglieder. Hinsichtlich selektiver verstärkter NOXA-Expression nach BA-Kostimulation spielen dabei besonders BAK/BAX Herunterregulation und Überexpression anti-apoptischer BCL-2 Mitglieder eine Rolle. Wie in BAK/BAX-defizienten JURKAT Zellen gezeigt, ist dieser Apoptoseblock sehr effektiv und inhibiert synergistische Apoptoseinduktion vollständig, da keine Cytochrom-C-Freisetzung mehr möglich ist (s. Kapitel V.1.3.3). BCL-2- und BCL-XL-Überexpression führte in Leukämiezelllinien auch zur Pufferung des hohen NOXA-Proteinlevels nach Kostimulation. Die Überexpression von BCL-2-ähnlichen Proteinen in primären Leukämiezellen kann aber vom Niveau nicht mit vektorbasierter Überexpression in Tumorzelllinien verglichen werden. Primäre Zellen



haben also deutlich geringere Pufferkapazität für pro-apoptotische BCL-2 Proteine. Daher ist zu erwarten, dass *in vivo* Leukämiezellen von Patienten mit einem solchen Apoptoseblock durch Kombination von BA und Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin dennoch profitieren können. Tatsächlich konnte die Wirksamkeit dieser Kombination im Fall von erworbener Zytostatika-Resistenz im Rahmen dieser Dissertation auf JURKAT Zellen gezeigt werden (s. Kapitel V.1.1.4)

Die drei gefundenen Kombinationskandidaten werden in derzeitigen Standardtherapieprotokollen in der Induktions- und der Re-Induktionsphase eingesetzt. Auch für die Kombination mit BA scheint der Einsatz in dieser Therapiephase sinnvoll, da schnelle Tumorlastenreduktion durch synergistische Apoptoseinduktion erfolgen kann. Doxorubicin und Vincristin sind darüber hinaus Wirkstoffe in der Therapie von Leukämie rezidiven, sowie von Polychemotherapieprotokollen solider Tumore. Auch diese Fälle können von zusätzlichem BA-Einsatz profitieren.

Die kombinierte Gabe von BA und Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin bewirkte additive und synergistische Effekte in primären Leukämiezellen aus über 40 Patientenproben, darunter Patientenproben aus Risikogruppen und Rezidivfälle (s. Kapitel V.2.1). Der synergistische BA-Effekt kommt v.a. bei geringen Wirkstoffkonzentrationen zum Tragen. Daher kann es selbst in Gewebekompartimenten, die während der Chemotherapie geringen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt sind (wie das zentrale Nervensystem), oder bei Wirkstoffen, welche schnell metabolisiert werden, zur gesteigerten Apoptoseinduktion von Tumorzellen kommen.

Zusammengefasst belegen die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit das Potential von BA als synergistischer Kombinationspartner in der Polychemotherapie. Dabei vespricht v.a. die gemeinsame Applikation von BA mit Doxorubicin, Asparaginase und Vincristin maximale synergistische Apoptoseinduktion in Leukämiezellen.

## **VI.2 Ausblick auf weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen**

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass Betulinsäure in Tumorzelllinien sowie im Besonderen auch in primären und Xenograft Leukämiezellen mit etablierten Chemotherapeutika kooperieren kann. Dabei konnte der Transkriptionsfaktor p53 als zentraler molekularer Signalvermittler bestimmt werden, der durch spezifische Transaktivierung des NOXA Genlokus und damit gesteigerte NOXA Expression synergistische Apoptoseinduktion vermittelt. Dabei bedarf es

weiterer molekularer Studien, um die komplexen übergeordneten Signalwege zu entschlüsseln, die von niedrig dosierten etablierten Zytostatika und Betulinsäure induziert werden können und sukzessive zur Stabilisierung und eventuellen post-translationalen Modifikation von p53 und zum Zellzyklusarrest führen. Aufschlüsselung dieser Modifikationen und ihrer Vermittler kann zusätzlich zum Verständnis über die komplexe Regulation von p53 Zielgenen und anderer transkriptionsunabhängiger p53 Funktionen beitragen.

Weitere Forschungsmotivation, die sich durch die neuen Ergebnisse aus dieser Dissertation ergibt, ist die Klärung der Frage nach Wirksamkeit der BA-Kombinationstherapie auf Leukämienstamm- und Vorläuferzellen. Sie sind die wichtigsten Angriffsziele der Leukämietherapie, da ihr Therapieüberleben nach heutigem Verständnis verantwortlich ist für die Rezidivbildung einer Leukämie (Jamieson et al., 2004). Kombination mit BA stellt nur dann eine geeignete Option zur Verbesserung der Leukämietherapie dar, wenn sie in der Lage ist, leukämische Stamm- und Vorläuferzellen effizient zu eliminieren. Da eine Anreicherung von leukämischen Stamm- und Vorläuferzellen bisher kaum möglich ist, sind Repopulationsassays die Methode der Wahl, wobei die per Definition gegebene Eigenschaft der Zellen zum Leukämiewachstum *in vivo* genutzt wird. Hierbei kann das in dieser Arbeit eingesetzte Xenograft NOD/SCID-Mausmodell zur Amplifikation von primären Leukämiezellen (s. Kapitel IV.2.9) herangezogen werden. Diese Mäuse werden inokuliert mit leukämischen Proben, die stabilen Synergismus bei Kostimulation mit Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin und BA zeigten. Nach Passage in der NOD/SCID-Maus werden Leukämiezellen isoliert und *in vitro* mit BA alleine, mit einem der drei Zytostatika oder mit der Kombination aus BA und Zytostatika inkubiert. Im Zuge eines Repopulationsassay werden die so behandelten Xenograft Leukämiezellen in verschiedenen Konzentrationen in weitere Mäuse appliziert und die Entstehung einer Leukämie beobachtet. Nach Häufigkeit dieses Ereignisses kann rückgerechnet werden, wie effizient Betulinsäure alleine oder in Kombination mit einem weiteren etablierten Zytostatikum auf leukämischen Stamm- und Progenitorzellen wirkt.

Eine erfolgreiche *in vivo* BA-Kombinationstherapie zeigten schon Sawada et al. 2004 in einem Mausmodell des murinen Melanoms durch effektivste Tumorreduktion nach BA- und Vincristingabe. Für humane Leukämiezellen würde sich das in dieser Arbeit verwendete Xenograft Mausmodell in Abwandlung als *in vivo* Therapiemodell eignen. Als Ausgangsmaterial sollte auch hierbei eine Patientenprobe eingesetzt werden, bei

der *in vitro* stabile Resultate in Hinblick auf synergistische Wirkung und den molekularen Mechanismus der Apoptoseinduktion nach kombinierter Stimulation erzielt wurden. Ob eine zeitversetzte und/oder wiederholte Gabe von Betulinsäure als schneller wirkendes zytotoxisches Agens sinnvoll ist, kann darüber hinaus durch Variation der Applikationsschemata getestet werden.

Diese Untersuchungen liefern dann die Grundlage um einen klinischen Einsatz von BA im Rahmen der Polychemotherapie der Leukämie optimal vorzubereiten. Ziel ist letztlich, die Effektivität der Therapieprotokolle und damit die Prognose jedes einzelnen Leukämieerkrankten zu verbessern.

## VII Zusammenfassung

Der Naturstoff Betulinsäure (BA) induziert effektiv Apoptose in Tumorzellen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass BA auf primären Leukämiezellen besser Apoptose *in vitro* induziert als viele der heute verwendeten Zytostatika. Zelltod wird dabei direkt über Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs am Mitochondrium ausgelöst. Aufbauend auf diesen Daten war es Ziel dieser Dissertation, BA in die Kombinationsabfolge der Polychemotherapie der Leukämie einzuordnen.

Zunächst wurde untersucht, mit welchen Zytostatika der heutigen Leukämietherapie Betulinsäure kooperiert, so dass der gemeinsame Einsatz beider Substanzen synergistische Apoptose auslöst. Dabei stellte sich heraus, dass Betulinsäure mit den drei Medikamenten Asparaginase, Doxorubicin und Vincristin kooperiert, sowohl auf sensitiven Tumorzelllinien, auf Zytostatika-resistenten Zelllinien als auch auf primären Zellen von Kindern mit akuter Leukämie.

Im Hauptteil der Arbeit wurde untersucht, welche intrazellulären Signalmechanismen für die effektive Apoptoseinduktion von BA mit Asparaginase, Doxorubicin oder Vincristin verantwortlich sind. Dabei erwiesen sich für alle drei untersuchten Zytostatika die Signalmechanismen als identisch. Mittels des Einsatzes von transgenen Tumorzelllinien, der Überexpression rekombinanter Proteine sowie des Knockdowns endogener Proteine über RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass folgende Signalmoleküle die synergistische Apoptoseinduktion vermitteln: der Transkriptionsfaktor p53; das pro-apoptotische BCL-2 Familienmitglied NOXA, dessen Expression über p53 reguliert wurde; die mitochondriale Aktivierung mit Freisetzung von z.B. Cytochrom-C, die durch Mitglieder der BCL-2 Familie reguliert wurde; hierbei ermöglichte die p53-abhängige Regulation von NOXA eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung zur Apoptose; Caspasen (Casp-3 und -9). Um die intrazelluläre Signaltransduktion auch an Patienten-abgeleiteten Zellen untersuchen zu können, wurde eine neue Technik etabliert: Kindliche ALL-Zellen wurden in immuninkompetenten Mäusen vermehrt und mittels eines optimierten Protokolls der Elektroporation mit *small interfering* RNA transfiziert. Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit der synergistischen Apoptoseinduktion von p53 und NOXA.

Die dargelegten Untersuchungen legen nahe, BA in zukünftigen prä-klinischen und klinischen Studien der Leukämie in der Nähe von Doxorubicin, Asparaginase oder Vincristin einzusetzen, um von der günstigen p53-abhängigen Aktivierung von NOXA durch Zytostatika-Kombination zu profitieren.

## VII Abstract

The natural product betulinic acid (BA) effectively induces apoptosis in tumor cells. Preliminary work of our group demonstrated that BA induces apoptosis *in vitro* on primary leukemia cells more efficiently than many cytotoxic drugs currently used. Cell death is triggered directly through activation of the intrinsic apoptosis signaling pathway at the level of mitochondria. Based on these data, it was the aim of this PhD thesis to integrate BA into the combination schedule of leukemia polychemotherapy. First I investigated, with which cytotoxic drug of contemporary leukemia therapy betulinic acid cooperated, so that the combined use of both substances triggered synergistic apoptosis. As a result betulinic acid cooperated with the three drugs asparaginase, doxorubicin and vincristine on both sensitive leukemia cell lines and cytotoxic drug resistant cell lines as well as on primary cells obtained from children with acute leukemia.

In the main part of the study the underlying intracellular signaling mechanisms for effective induction of apoptosis by BA with asparaginase, doxorubicin or vincristine was analysed. For all three cytotoxic agents the signaling mechanisms were proven to be identical. Using transgenic tumor cell lines, overexpression of recombinant proteins, as well as knock down of endogenous proteins by RNA interference, it was demonstrated that the following signaling molecules mediated synergistic apoptosis induction: the transcription factor p53; the pro-apoptotic BCL-2 family member NOXA as a p53 target; mitochondrial activation with release of e.g. Cytochrome-C, which was regulated by members of the BCL-2 family; therefore p53-dependent regulation of NOXA mediated a shift in the balance of BCL-2 members towards apoptosis; caspase activation (Casp-3 and -9). To investigate the intracellular signal pathway additionally in patient-derived cells a new technique was established: Childhood ALL cells were amplified in immunoincompetent mice and *in vitro* transfected with small interfering RNA using an optimized electroporation protocol. Again, synergistic apoptosis induction was verified to be p53 and NOXA dependent.

These studies suggest that in future pre-clinical and clinical studies of leukemia BA should be used in close proximity to doxorubicin, asparaginase or vincristine to benefit from the favorable p53-dependent activation of NOXA by cytotoxic drug combination.

## VIII Literaturnachweis

A - B

- Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, Marighetti P, Rabascio C, Pruneri G. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rc null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int. J Cancer*. 2008; 123:2222–2227
- Akihisa T, Takamine Y, Yoshizumi K, Tokuda H, Kimura Y, Ukiya M, Nakahara T, Yokochi T, Ichiishi E, Nishino H. Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products. *J Nat Prod*. 2002; 65:278-282
- Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci*. 2006; 29:1-13
- Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem*. 1996; 271:16850-16855
- Ashley N, Poulton J. Anticancer DNA intercalators cause p53-dependent mitochondrial DNA nucleoid re-modelling. *Oncogene*. 2009; 28:3880-3891
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989; 244:217-222
- Blagosklonny MV. P53: An ubiquitous target of anticancer drugs. *Int J Cancer*. 2002; 98:161–166
- Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*. 2007; 6:70-74
- Boise LH, Thompson CB. Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:3759-3764
- Borgmann A, Baldy C, von Stackelberg A, Beyermann B, Fichtner I, Nürnberg P, Henze G. Childhood ALL blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. *Pediatr Hematol Oncol*. 2000; 17:635-650

## B - D

- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 198; 301:527-530
- Brimmell M, Mendiola R, Mangion J, Packham G. BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and micro-satellite instability. *Oncogene*. 1998; 16:1803-1812
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002; 296:550-553
- Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999; 96:13777-13782
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005; 17:393-403
- Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res*. 2007; 67:2816-2823
- Choong ML, Yang H, Lee MA, Lane DP. Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle*. 200; 8:2810-2818
- Chowdhury AR, Mandal S, Mitra B, Sharma S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit*. 2002; 8:254-265
- Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 501-507
- Dräger B, Neubert R, Galgon T, Wohlrab W. *Deutsches Patent Nr. DE 197 13768 A1, offengel. 8.10.1998; US Patentanmeldung Nr. 09/310,163, Canada Patentanmeldung Nr. 2,271,965*
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome-c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; 102:33-42

## D - F

- Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 608-615
- Eder-Czembirek C, Czembirek C, Erovic BM, Selzer E, Turhani D, Vormittag L, Thurnher D. Combination of betulinic acid with cisplatin-different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2005; 14:667-671
- Ehrhardt H, Fulda S, Führer M, Debatin KM, Jeremias I. Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Leukemia.* 2004; 18:1406-1412
- Ehrhardt H, Häcker S, Wittmann S, Maurer M, Borkhardt A, Toloczko A, Debatin KM, Fulda S, Jeremias I. Cytotoxic drug-induced, p53-mediated upregulation of caspase-8 in tumor cells. *Oncogene.* 2008; 27:783-793
- Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 626-630
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994; 54:1169-1174
- Fakler M, Loeder S, Vogler M, Schneider K, Jeremias I, Debatin KM, Fulda S. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood.* 2009; 113:1710-1722
- Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nuñez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 1997; 57:4956-4964
- Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem.* 1998; 273:33942-33948
- Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer.* 1999a; 82:435-441
- Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr.* 1999b; 211:319-322



- Fulda S, Jeremias I, Debatin KM. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. 2004; 23:7611-7620
- Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia*. 2005; 7:162-170
- Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discov Today*. 2009; 14:885-890
- Gao Z, Shao Y, Jiang X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280:38271-38275
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N, Walensky LD. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. 2008; 455:1076-1081
- Geffen DB, Man S. New drugs for the treatment of cancer, 1990-2001. *Isr Med Assoc J*. 2002; 4:1124-1131
- Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, O'Brate A, Yu J, Blagosklonny MV, Greber UF, Fojo T. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2002; 99:10855-10860
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2001; 98:11318-114323
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997; 387:296-299
- Huang X, Wilber A, McIvor RS, Zhou X. DNA transposons for modification of human primary T lymphocytes. *Methods Mol Biol*. 2009; 506:115-126
- Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; 100:3175-3182

## J – K

- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.* 2004; 351:657-667
- Jung GR, Kim KJ, Choi CH, Lee TB, Han SI, Han HK, Lim SC. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 101:277-285
- Junttila RJ, Evan GI. P53 – a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Canc.* 2009; 9:821-829
- Kadohara K, Nagumo M, Asami S, Tsukumo Y, Sugimoto H, Igarashi M, Nagai K, Kataoka T. Caspase-8 mediates mitochondrial release of pro-apoptotic proteins in a manner independent of its proteolytic activity in apoptosis induced by the protein synthesis inhibitor acetoxycycloheximide in human leukemia Jurkat cells. *J Biol Chem.* 2009; 284:5478-5487
- Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, Srivastava RK. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res.* 2003; 63:1712-1721
- Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene.* 2005; 24:1111-1116
- Karst AM, Li G. BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:318-330
- Kashiwada Y, Sekiya M, Ikeshiro Y, Fujioka T, Kilgore NR, Wild CT, Allaway GP, Lee KH. 3-O-Glutaryl-dihydrobetulin and related monoacyl derivatives as potent anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14:5851-5853.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239-257
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994; 73:2013-2026

## K - L

- Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J Exp Med*. 2004; 199:113-124
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 57:545-553
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995; 14:5579-5588
- Krejci O, Starkova J, Otova B, Madzo J, Kalinova M, Hrusak O, Trka J. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia*. 2004; 18:434-441
- Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2004; 279:53272-53281
- Kutuk O, Arisan ED, Tezil T, Shoshan MC, Basaga H. Cisplatin overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis via preferential engagement of Bak: critical role of Noxa-mediated lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 2009; 30:1517-1527
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 2005; 17:525-535
- Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Yu J. Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93:417-425
- Lee J, Hwang J, Kim HS, Kim S, Kim YH, Park SY, Kim KS, Ryoo ZY, Chang KT, Lee S. A comparison of gene expression profiles between primary human AML cells and AML cell line. *Genes Genet Syst*. 2008; 83:339-345
- Lee SH, Soung YH, Lee JW, Kim HS, Lee JH, Kim HS, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Kim SY, Park WS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Mutational analysis of Noxa gene in human cancers. *APMIS*. 2003; 111:599-604

L

- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002; 2:183-192
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88:323-331
- Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ*. 2005; 12:1008-1014
- Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001; 412:95-99
- Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ*. 2005; 12:292-303
- Liby K, Honda T, Williams CR, Risingsong R, Royce DB, Suh N, Dinkova-Kostova AT, Stephenson KK, Talalay P, Sundararajan C, Gribble GW, Sporn MB. Novel semi-synthetic analogues of betulinic acid with diverse cytoprotective, antiproliferative, and proapoptotic activities. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6:2113-2119
- Liem NL, Papa RA, Milross CG, Schmid MA, Tajbakhsh M, Choi S, Ramirez CD, Rice AM, Haber M, Norris MD, MacKenzie KL, Lock RB. Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies. *Blood*. 2004; 103: 3905-3914
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*; 379:349-355
- Liu JW, Chandra D, Rudd MD, Butler AP, Pallotta V, Brown D, Coffey PJ, Tang DG. Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene*. 2005; 24:2020-2031
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996; 86:147-157
- Lowitz, JT. *Crells Annalen*. 1788; 1-312

## L - M

- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94:481-489
- MacKenzie SH, Clark AC. Targeting cell death in tumors by activating caspases. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008; 8:98-109
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2000; 275:16202-16212
- Martinou JC, Youle RJ. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ*. 2006; 13:1291-1295
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 1997; 16:2794-2804
- Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:724-737
- Merkerova M, Klamova H, Brdicka R, Bruchova H. Targeting of gene expression by siRNA in CML primary cells. *Mol Biol Rep*. 2007; 34:27-33
- Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ*. 2008; 15:1019-1029
- Middelburg R, de Haas RR, Dekker H, Kerkhoven RM, Pohlmann PR, Fuentes-Albuero A, Mohar A, Pinedo HM, Lankelma J. Induction of p53 up-regulated modulator of apoptosis messenger RNA by chemotherapeutic treatment of locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:1863-1869
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003; 11:577-590
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992; 68:869-877

## M - P

- Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis*. 2009; 14:191-202
- Naik E, Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol*. 2007; 176:415-424
- Nakajima W, Tanaka N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch*. 2007; 74:148-157
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001; 7:683-694
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003; 112:481-490
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991; 139:271-279
- Obexer P, Geiger K, Ambros PF, Meister B, Ausserlechner MJ. FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14:534-547
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000; 288:1053-1058
- Oliner JD, Pietsenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*. 1993; 362:857-860
- Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T. Analysis of the most representative tumor-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J*. 1994; 13: 3496-3504
- Pawlowski KM, Krol M, Majewska A, Badowska-Kozakiewicz A, Mol JA, Malicka E, Motyl T. Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60: 85-94

## P - R

- Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a re-evaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:15209-15214
- Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat*. 2003; 21:277-284
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007; 28:622-629
- Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med*. 1995; 1:1046-1051
- Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T. Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res*. 1998; 58:3331-3338
- Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009; 360:2730-2741
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*. 1999; 3:287-296
- Ribera JM, Oriol A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23:1033-1042
- Rieber M, Strasberg-Rieber M. Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma. *DNA Cell Biol*. 1998; 17:399-406
- Roe JS, Kim H, Lee SM, Kim ST, Cho EJ, Youn HD. p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell*. 2006; 22:395-405

## R - S

- Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. 1995; 83:1243-1252
- de Sá MS, Costa JF, Krettli AU, Zalis MG, Maia GL, Sette IM, Câmara Cde A, Filho JM, Giuliatti-Harley AM, Ribeiro Dos Santos R, Soares MB. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol Res*. 2009; 105:275-279
- Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell*. 2007; 18:84-93
- Sawada N, Kataoka K, Kondo K, Arimochi H, Fujino H, Takahashi Y, Miyoshi T, Kuwahara T, Monden Y, Ohnishi Y. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer*. 2004; 90:1672-1678
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998; 17:1675-1687
- Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, Pezzuto JM. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer*. 1997; 33:2007-2010
- Seiffert M, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia*. 2007; 21:1977-1983
- Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, Kodym R. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2000; 114:935-940.
- Shelling AN. Role of p53 in drug resistance in ovarian cancer. *Lancet*. 1997; 349:744-745
- Sheth K, Joland S, Wiedhopf R, Cole JR. Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *J Pharm Sci*. 1972; 61:1819



## S - T

- Shin YG, Cho KH, Chung SM, Graham J, Das Gupta TK, Pezzuto JM. Determination of betulinic acid in mouse blood, tumor and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 732:331-336
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 1992; 68:855-867
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol.* 1995; 154:180-191
- Smith PF, Ogundele A, Forrest A, Wilton J, Salzwedel K, Doto J, Allaway GP, Martin DE. Phase I/II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/ pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against HIV infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:3574-3581
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999; 397:441-446
- Suzuki S, Nakasato M, Shibue T, Koshima I, Taniguchi T. Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells. *Cancer Sci.* 2009; 100:759-769
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* 2001; 8:613-621
- Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacol Rep.* 2005; 57:588-595
- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell.* 2008; 133:612-626

## T - W

- Terui T, Murakami K, Takimoto R, Takahashi M, Takada K, Murakami T, Minami S, Matsunaga T, Takayama T, Kato J, Niitsu Y. Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 2003; 63:8948-8954
- Thurnher D, Turhani D, Pelzmann M, Wannemacher B, Knerer B, Formanek M, Wacheck V, Selzer E. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck.* 2003; 25:732-740
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989; 245:301-305
- Trumbull ER, Bianchi E, Eckert DJ, Wiedhopf RM, Cole JR. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J Pharm Sci.* 1976; 65:1407-1408
- Udeani GO, Zhao GM, Geun Shin Y, Cooke BP, Graham J, Beecher CW, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos.* 1999; 20:379-383
- Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, Kodera Y, Hiroto M, Matsushima A, Inada Y, Nishimura H. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia.* 1997; 11:1858-1861
- Upreti M, Chu R, Galitovskaya E, Smart SK, Chambers TC. Key role for Bak activation and Bak-Bax interaction in the apoptotic response to vinblastine. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:2224-2232
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science.* 2003; 302:1036-1038
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408:307-310
- Voigt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). 130 (*Jent und Gassman*). 1842
- Wang GQ, Gastman BR, Wieckowski E, Goldstein LA, Gambotto A, Kim TH, Fang B, Rabinovitz A, Yin XM, Rabinowich H. A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *J Biol Chem.* 2001; 276:34307-34317

## W - Y

- Webb JL. Effects of more than one inhibitor. In: Webb JL (ed). *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, vol 1. Academic Press: New York. 1963;66-79
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292:727-730
- Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:95-107
- Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 289:1306-1312
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995; 3:673-682
- Wilkinson JC, Cepero E, Boise LH, Duckett CS. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:7003-7014
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*. 2007; 315:856-859
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284:555-556
- Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res*. 2000; 10:169-177
- Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, Takeuchi M, Nakagawa S. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology*. 1991; 48:72-76
- Yee KS, Vousden KH. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis*. 2008; 13:87-95

## Y - Z

- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989; 169:1747-1756
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell.* 2001; 7:673-682
- Yun Y, Han S, Park E, Yim D, Lee S, Lee CK, Cho K, Kim K. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch Pharm Res.* 2003; 26:1087-1095
- Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 2002; 175:17-25

## IX Danksagung - von unterwegs

*Da sind die, die dir ein Etappenziel setzten.*

Für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, möchte ich mich herzlich bei Irmela Jeremias bedanken. Bei meinem umsichtigen Betreuer Harald Ehrhardt bedanke ich mich dafür, dass er mir das Thema dieser Arbeit überlassen hat sowie für seinen unermüdlichen Einsatz. Ihre beiden (sprichwörtlichen) Türen standen für Besprechungen, Vorbereitungen von Präsentationen und zuletzt für Korrekturen immer offen. Bei Dirk Eick möchte ich mich für seine unterstützende Rolle als Doktorvater bedanken.

*Da sind die, die dich ein Stück begleiten.*

Für drei intensive Jahre in der Nachwuchsarbeitsgruppe ‚Apoptose‘ und für kollegiale Hilfe seien Sibylle Gündisch, Katja Schneider, Michaela Grunert, Nadia Terziyska, Catarina De Castro Tavares Alves, Ulrike Borgmeier, Amparo Hausherr-Bohn, Lili Mura, Lina Pannert, Lisa Kroll, Naschla Kohistani, Sara Brittingham, David Schrembs, Volker Groß und Guido MaBared gedankt. Vermissen werde ich unser gutes Arbeitsklima, die produktive Zusammenarbeit und die angenehmen Delikatessenpausen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Abteilung für Genvektoren und den Kollegen in der Doktorandeninitiative DINI.

*Da sind die, die dich mit Kompass und Proviant versorgen.*

Meinen Quasi-Mitbewohnerinnen, Kindergartenkameradinnen und Mitsipplingen Jule Schempp und Stefanie Grill, meinem tatsächlichen Mitbewohner Thomas Kramer, dem Ottmarsheim-nahen und -fernen Dunstkreis, dem VCP und dem VfB Stuttgart danke ich für vielfache Zerstreung und die unaufgeforderte Bereitstellung einer Handbreit Kielwasser.

*Und es sind da die, die dich auf den Weg gebracht haben.*

Für das Gelingen dieser Arbeit durch viel Geduld und Wärme weit über Familienbande hinaus möchte ich meinen Eltern, Gudrun und Gerhard, und meinen Geschwistern, Miriam und Birgit, danken.

Schön, dass es euch gibt.

## X Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name **Ines Teresa Höfig**  
E-mail **Ines.Hoefig(at)gmx.de**  
Geburtsdatum **11. August 1980**  
Geburtsort **Stuttgart / Bad Cannstatt**  
Familienstand **ledig**  
Staatsangehörigkeit **deutsch**

### SCHULBILDUNG UND STUDIUM

---

1987 - 1991 **Grund- und Hauptschule Besigheim**  
1991 - 2000 **Christoph-Schrempf-Gymnasium Besigheim**  
**Abschluss: Allgemeine Hochschulreife - Abitur**

2000 - 2006 **Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart**  
Wahlhauptfach: Experimentelle Biologie molekularbiologischer  
Ausrichtung mit Schwerpunkt Immunologie  
Wahlnebenfächer: Technische Biochemie und Bioinformatik

2005 -  
2006 **Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie**  
der Universität Stuttgart in der Arbeitsgruppe ‚Biomedical Engineering‘  
von Prof. Dr. Roland E. Kontermann zum Thema:  
**‚Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Anti-  
körpern zur Rekrutierung von Effektorzellen an Tumorzellen‘**  
**Abschluss: Diplom-Biologin (t.o.)**

### AUSLANDSAUFENTHALT

---

2004 **Dreimonatiger Forschungsaufenthalt** am biologischen Forschungs-  
und Ausbildungsinstitut in Dahab/Ägypten im Rahmen einer  
Studienarbeit am zoologischen Institut der Universität Stuttgart

---

**WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG**

---

- 2006 - 2010      **Doktorandin (*Dr.rer.nat.*)** mit begleitendem Promotionsstudium in der Nachwuchsarbeitsgruppe ‚Apoptose‘ von PD Dr. Irmela Jeremias am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München (HMGU) bei Prof. Dr. Dirk Eick als Doktorvater zum Thema:  
***„Mechanismen der Apoptoseinduktion: Betulinsäure in Kombination mit konventionellen Zytostatika auf Leukämiezellen“***
- 2008              **Posterpräsentation** im Rahmen der Teilnahme am ‚*Sixth European Workshop on Cell Death*‘ in Hauenstein
- 2009              **Posterpräsentation** im Rahmen der ASH Jahrestagung (‚*51st American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition*‘) in New Orleans

---

**WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN**

---

**Höfig I\***, Jeremias, I\*, Häcker S, Stahnke K, Nathrath M, Fulda S, Ehrhardt H. Important role of Caspase-8 for cytotoxic drug-induced apoptosis in leukemia cells. 2010; *in preparation* (\*these authors contributed equally).

Ehrhardt H\*, **Höfig I\***, Obexer P, Terziyska N, Jeremias I. Betulinic acid boosts p53-mediated expression of NOXA and apoptosis - molecular studies on patient-derived ALL cells. 2010; *in submission* (\*these authors contributed equally).

Müller D, Karle A, Meißburger B, **Höfig I**, Stork R, Kontermann RE. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:12650-12660.