

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel

Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

**Untersuchungen zur Chemo- und
Radiosensitivität und deren Auswirkungen auf
Zellzyklus, Apoptoseinduktion und
Genexpression in neuroendokrinen
Pankreastumorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin
(Dr. med.)**

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Robbel

aus Mönchengladbach

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 09.06.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. B. Simon

Koreferent: Prof. Dr. med. Engenhardt-Cabillic

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP)-Tumoren.....	1
1.1.1.	Klassifikation und Pathogenese.....	1
1.1.2.	Klinik und Diagnostik.....	2
1.1.3.	Therapie.....	3
1.1.3.1.	Allgemeine Prinzipien.....	3
1.1.3.2.	Antiproliferative medikamentöse Therapie.....	3
1.2.	Stoffgruppen und Wirkungsmechanismen von Zytostatika.....	5
1.2.1.	Proliferationskinetische Voraussetzungen der Chemotherapie.....	5
1.2.2.	Klassifikation und Wirkungsmechanismen von Chemotherapeutika.....	6
1.2.3.	Chemoresistenzentwicklung.....	9
1.3.	Strahlentherapie und Möglichkeiten der Wirkungssteigerung.....	10
1.4.	Die Regulation des Zellzyklus.....	11
1.4.1.	Der Ablauf des Zellzyklus.....	11
1.4.2.	Kontrollpunkte.....	11
1.4.3.	Regulation des Zellzyklus.....	13
1.4.4.	Fehlerhafte Zellzykluskontrolle und autonomes Wachstum.....	15
1.5.	Der programmierte Zelltod (Apoptose).....	15
1.5.1.	Einleitung.....	15
1.5.2.	Regulationsmechanismen der Apoptose.....	16
1.5.3.	Todesrezeptoren.....	17
1.5.4.	Signalwege der Apoptoseinduktion.....	18
1.5.5.	Die Bcl-2 Familie.....	19
1.5.6.	Caspasen.....	20
1.6.	Ziel der Arbeit.....	22
2.	Material und Methoden.....	23
2.1.	Geräte.....	23
2.1.1.	Allgemeine Laborgeräte.....	23
2.1.2.	Elektrophoresegeräte und Zubehör.....	23
2.1.3.	Geräte zur Zellkultur.....	24
2.1.4.	Analysegeräte und Auswertungssoftware.....	24
2.1.5.	Kühlgeräte.....	25

2.1.6.	Sonstige Geräte.....	25
2.2.	Chemikalien, Reaktionssysteme, Lösungen, Verbrauchsmaterial.....	25
2.2.1.	Enzyme.....	25
2.2.2.	Sequenzierung und RT-Polymerase-Kettenreaktion.....	25
2.2.3.	Elektrophorese.....	26
2.2.4.	Sonstige Chemikalien, Reagenzien, Kits.....	26
2.2.5.	Zellkulturmedien und -reagenzien.....	27
2.2.6.	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.2.7.	Arrays.....	27
2.2.8.	Radioaktive Substanzen.....	28
2.2.9.	Wirkstoffe.....	28
2.2.10.	Gebrauchslösungen.....	29
2.2.11.	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	29
2.2.12.	Antikörper.....	32
2.3.	Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung.....	32
2.4.	Zellbiologische Methoden.....	32
2.4.1.	Zelllinien und Kultivierung.....	32
2.4.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
2.4.3.	Behandlung von Zellen mit Wirkstoffen.....	33
2.4.4.	Bestrahlung von Zellen (Kobalt-60-Teletherapiegerät.....	34
2.4.5.	Zellzahlbestimmung.....	34
2.4.6.	Bestimmung der Zellvitalität mit Trypanblau.....	35
2.4.7.	Vitalitäts- (Zytotoxizitäts-) bestimmung mittels MTT-Assay.....	36
2.4.8.	Zellzyklusanalysen.....	37
2.4.9.	Apoptose-Analysen.....	39
2.5.	Molekulargenetische Methoden.....	40
2.5.1.	RNA Isolation und photometrische Quantifizierung.....	40
2.5.2.	cDNA Synthese durch Reverse Transkription.....	42
2.5.3.	Semiquantitative RT-PCR.....	42
2.5.4.	Multiplex-PCR.....	43
2.5.5.	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.5.6.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
2.5.7.	DNA-Sequenzanalyse.....	45
2.5.8.	cDNA-Array-Analysen.....	46
2.5.8.1.	Prinzip.....	46

2.5.8.2.	cDNA-Synthese, radioaktive Markierung und Aufreinigung.....	47
2.5.8.3.	Membranhybridisierung.....	48
2.5.8.4.	Auswertung und Wiederverwertung.....	49
2.6.	Proteinchemische Methoden.....	49
2.6.1.	Proteinextraktion aus Zellen.....	49
2.6.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	50
2.6.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	50
2.6.4.	Westernblot Analyse.....	52
3.	Ergebnisse.....	54
3.1.	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Proliferationskinetik und Chemosensitivität der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I.....	54
3.1.1.	Untersuchungen zur Proliferationskinetik von BON I Zellen und Vergleich von Testmethoden zur Bestimmung von Überlebensraten.....	54
3.1.2.	Untersuchungen zur Chemosensitivität der neuroendokrinen Tumorzelllinie BON I gegenüber antineoplastischen Substanzen <i>in vitro</i>	56
3.1.2.1.	Konzentrationsabhängige Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Mitosehemmstoffen.....	56
3.1.2.2.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber DNA-alkylierenden Zytostatika.....	57
3.1.2.3.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Topoisomerase-hemmstoffen.....	60
3.1.2.4.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Antimetaboliten...	62
3.1.2.5.	Chemosensitivität von BON I Zellen unter Behandlung mit Biotherapeutika.....	64
3.2.	Zellzyklusveränderungen in BON I neuroendokrinen Pankreastumorzellen durch antineoplastische Substanzen.....	65
3.2.1.	Zellzyklusanalyse natürlich wachsender BON I Zellen.....	66
3.2.2.	Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren.....	67
3.2.3.	Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von DNA-alkylierenden Zytostatika.....	69
3.2.4.	Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von Topoisomerase-Inhibitoren.....	72

3.2.5.	Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation des Antimetaboliten 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC).....	74
3.3.	Untersuchungen zur Apoptose-Induktion in BON I Zellen durch Chemotherapeutika.....	75
3.3.1.	Bestimmung der Apoptoserate von unbehandelten BON I Zellen....	75
3.3.2.	Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren.....	77
3.3.3.	Untersuchungen zur Apoptose in BON I Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Zytostatika und Dacarbazin.....	81
3.3.4.	Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach Behandlung mit Topoisomerasehemmstoffen.....	84
3.4.	<i>In vitro</i> Interaktion von Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel in BON I Zellen...86	
3.4.1.	Wachstumshemmung in BON I Zellen nach ⁶⁰ CO - Bestrahlung.....	86
3.4.2.	Kombination der Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel in BON I Zellen.....	88
3.4.3.	Telekobaltbestrahlung in Kombination mit Paclitaxel-induzierten Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen.....	89
3.5.	Identifizierung Paclitaxel-modulierter zellzyklus- und apoptosespezifischer Gen- und Proteinexpression in BON I Zellen.....	91
3.5.1.	Paclitaxel-induzierte Zyklin B, D1 und D3 Expression und Inhibition von Zyklin E in BON I Zellen.....	91
3.5.2.	Paclitaxel-induzierte Genexpression von <i>CDK4</i> und <i>CDK6</i> in BON I Zellen.....	93
3.5.3.	Paclitaxel-induzierte Regulation der CDK-Inhibitoren p18 ^{INK4c} , p21 ^{WAF1/CIP1} und p27 ^{KIP1} in BON I Zellen.....	94
3.5.4.	Paclitaxel verändert die Expression der apoptosespezifischen Gene <i>Bcl-xL</i> , <i>Bax</i> und <i>Bcl-2</i> in BON I Zellen nicht.....	95
3.6.	Genexpressionsanalyse in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen mit cDNA-Arrays.....	96
3.6.1.	Genexpressionsprofil des „Human Pathway Finder GEArray Kits“ in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen.....	97
3.6.2.	Identifizierung Paclitaxel-abhängiger Genexpression in BON I Zellen unter Einsatz des „Atlas Human Apoptosis Arrays“.....	100

3.7.	Demethylierungsabhängig-induzierte Veränderungen zellzyklus- und apoptosespezifischer Gene in BON I Zellen.....	112
4.	Diskussion.....	115
4.1.	Chemosensitivität der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I.....	115
4.1.1.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Mitoseinhibitoren.....	115
4.1.2.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber methylierenden und alkylierenden Substanzen.....	116
4.1.3.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Topoisomerase-hemmstoffen.....	117
4.1.4.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Antimetaboliten und demethylierenden Substanzen.....	118
4.1.5.	Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Biotherapeutika..	119
4.2.	Chemotherapeutika-assoziierte Veränderungen der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion in BON I Zellen.....	121
4.2.1.	Zellzyklusverteilung in kultivierten BON I Zellen.....	121
4.2.2.	Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren.....	121
4.2.3.	Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von DNA-alkylierenden Substanzen.....	124
4.2.4.	Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von Topoisomerase-Inhibitoren.....	126
4.2.5.	Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen nach Applikation des Antimetaboliten 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC).....	128
4.3.	Sensitivität von BON I Zellen gegenüber Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel.....	128
4.4.	Paclitaxel-modulierte Alteration zellzyklus- und apoptosespezifischer Gen- und Proteinexpression in BON I Zellen.....	130
4.5.	Demethylierung-induzierte Alteration zellzyklus- und apoptosespezifischer Gene in BON I Zellen.....	139
5.	Zusammenfassung.....	141
6.	Literaturverzeichnis.....	142
7.	Anhang.....	188

Inhaltsverzeichnis

7.1.	Verwendete Abkürzungen.....	188
7.2.	Lebenslauf.....	194
7.3.	Schriftenverzeichnis.....	196
7.4.	Akademische Lehrer.....	197
7.5.	Erklärung.....	198
7.6	Danksagung.....	199

1. Einleitung

1.1. Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP)-Tumore

1.1.1. Klassifikation und Pathogenese

Neuroendokrine gastroenteropankreatische (GEP) - Tumore sind mit einer Inzidenz von ca. 0,5/100.000 Einwohner pro Jahr seltene Neubildungen. Der Begriff „neuroendokrin“ charakterisiert die Abstammung der Tumoren aus den im Gastrointestinaltrakt ubiquitär vorhandenen, aus der embryonalen Neuralleiste abstammenden, endokrinen Zellen, die von Feyrter erstmals als „helles Zellorgan“ beschrieben wurden. Das Akronym „APUDom“ (amine precursor uptake and decarboxylation) beschreibt die Fähigkeit endokriner Tumoren, biogene Amine, wie Serotonin zu synthetisieren (Pearse et al., 1969). Endokrine Pankreastumore entwickeln sich aus den verschiedenen Zelltypen der Langerhans'schen Inselzellen. Die Klassifikation neuroendokriner GEP-Tumore kann nach der ontogenetischen Entwicklung des Verdauungstraktes, nach klinischen-funktionellen oder morphologischen Gesichtspunkten erfolgen (Capella et al., 1995). Die ontogenetische Einteilung unterscheidet Tumore des Vorderdarms (Ösophagus bis zum Treitz Band), Mitteldarms (kaudal des Treitz Bandes bis linke Kolonflexur) und Hinterdarms (distal der linken Kolonflexur bis Rektum) was prognostisch bedeutsam ist, da die 5 Jahres-Überlebensrate von Hinterdarm- zu Vorderdarntumoren abnimmt. Die morphologische Klassifikation unterteilt die Tumoren in vier Dignitätsgruppen: *benigne*, *benigne oder niedrig maligne*, *niedrig maligne* und *hoch maligne* und beruht auf den Parametern Tumorgöße, Gefäßinvasion und Differenzierungsgrad (Capella et al., 1995). Die Charakterisierung eines endokrinen Tumors als benigne oder maligne ist aufgrund des histologischen, immunhistochemischen oder ultrastrukturellen Bildes in der Regel nicht möglich. Die Invasion des Primärtumors über die Grenzen des Primärorgans hinaus sowie eine bereits erfolgte Metastasierung (v.a. in die Leber) sind die einzigen sicheren Kriterien der Malignität (Capella et al., 1995).

Neuroendokrine GEP-Tumore treten überwiegend sporadisch (>90%) auf. Bei den Tumoren des Vorderdarms, insbesondere des Pankreas und Duodenums liegt allerdings in bis zu 25% der Fälle eine familiäre Häufung im Rahmen der *Multiplen endokrinen*

Neoplasie Typ 1 (MEN 1) vor, die durch eine Keimbahnmutation im Menin-Gen (*MEN1*) auf Chromosom 11q13 bedingt ist (Simon et al, 2000). Neuroendokrine Pankreastumore können selten auch im Rahmen des *von Hippel-Lindau (VHL)-Syndroms* und Karzinoide im Bereich der Ampulla vateri bei der *Neurofibromatose Typ1* auftreten (Calender, 2000). Sporadische neuroendokrine Pankreastumoren weisen in 20% somatische *MEN1*-Genmutationen auf. Genetische oder epigenetische Veränderungen wurden auch für das *β -catenin*, *APC*, *p16^{INK4a}* oder *p14^{ARF}* berichtet (Toliat et al., 1997; Görtz et al., 1999; Perren et al., 2004, Simon und Lubomierski, 2004), während genetische Veränderungen des *ras*-Onkogens oder der Tumorsuppressorgene p53 und Rb keine pathogenetische Rolle spielen.

1.1.2. Klinik und Diagnostik

Klinisch kann zwischen *funktionell aktiven Tumoren* mit einem durch Hormonfreisetzung verursachten klinisches Syndrom und *funktionell inaktiven Tumoren*, die ohne ein hormonassoziiertes Krankheitsbild einhergehen, unterschieden werden (Arnold und Simon, 2004). Der häufigste endokrine GEP- Tumor ist ein funktionell nicht aktiver, im Pankreas oder Gastrointestinaltrakt gelegener, Tumor. Der häufigste funktionell aktive endokrine Tumor liegt im Dünndarm und kann Ursache des „Karzinoid- Syndrom“ sein. In absteigender Häufigkeit folgen Insulinom, Gastrinom, Vipom, Glukagonom, Somatostatinom, PPom und CRF oder ACTH produzierende Tumore. Empfehlenswerte Serummarker für neuroendokrine Tumoren sind Chromogranin A, neuronenspezifische Enolase und Synaptophysin. Der Nachweis spezifischer neuroendokriner Zellprodukte wie Bsp. Insulin oder Gastrin ermöglicht eine weitere Eingrenzung. Der Proliferationsindex (z.B. Ki-67) ist ein prognostisch wichtiger Marker. Bei begründetem Verdacht auf Vorliegen eines neuroendokrinen GEP-Tumors wird die Diagnostik durch bildgebende Verfahren vervollständigt, wobei die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie die höchste diagnostische Sensitivität und Spezifität (mit Ausnahme für das Insulinom) aufweist. Dennoch sind zuverlässige Prognosen über Krankheitsverlauf und Therapieerfolg kaum möglich. Dies liegt zum einen an der niedrigen Inzidenz der GEP-Tumore, deren Subentitäten hinsichtlich Wachstum und Metastasierungsrate schlecht miteinander verglichen werden können, und zum anderen an der biologischen Heterogenität auch innerhalb der Subentitäten.

1.1.3. Therapie

1.1.3.1. Allgemeine Prinzipien

Wegen der hohen interindividuellen Variabilität des Krankheitsverlaufs orientieren sich die therapeutischen Maßnahmen individuell an Symptomatik, Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors und dem Zustand des Patienten. Die Therapie neuroendokriner GEP-Tumoren beruht auf 4 Prinzipien (Simon, 2004):

1. dem **operativen Verfahren** zur Resektion solitärer Tumore als einzigem kurativem Ansatz, bzw. dem Tumordebulking in palliativer Intention
2. der palliativen **medikamentösen Therapie**
 - a) **symptomatische Therapie** bei nicht resektablen Tumoren oder zur Kontrolle tumorassoziierter Symptome
 - b) **antiproliferative Therapie** zur Kontrolle des Tumorwachstums
3. der palliativen **lokoregionalen Intervention** (Chemoembolisation, Alkohol- oder Thermoablation von Lebermetastasen und
4. der palliativen **Strahlentherapie** (Skelett- und Gehirnetastasen, infiltrierender Tumor im Beckenbereich) und **Radioligandentherapie** (Stellenwert unklar)

Da die vorliegende Arbeit die Chemosensitivität neuroendokriner Pankreastumorzellen *in vitro* zum Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Abläufe untersucht, soll im Folgenden auf die derzeitigen antiproliferativen medikamentösen Behandlungsstrategien bei neuroendokrinen GEP-Tumoren näher eingegangen werden.

1.1.3.2. Antiproliferative medikamentöse Therapie

Am Anfang der Therapieplanung bei metastasierten neuroendokrinen GEP- Tumoren steht die Beurteilung des spontanen Tumorwachstums (über 3 Monate). Somatostatinanaloga werden bei dokumentiertem Tumorwachstum (über 3 Monate) oder nichtmöglichem operativen Tumordebulking eingesetzt. Mehrere prospektive

Studien zum antiproliferativen Effekt von Octreotid zeigten eine 35-50%ige Wachstumshemmung neuroendokriner Tumore, wobei insgesamt keine Tumorregression, sondern lediglich eine Hemmung der Tumorprogression beobachtet wurde (Arnold et al., 1996a,c; Di Bartolomeo et al., 1996; Saltz et al., 1993a). Bei erfolgloser Octreotid-Monotherapie kann die zusätzliche Interferon- α -2a oder -2b Gabe erfolgen, die bei 50% der Behandelten einen antiproliferativen Effekt gezeigt hat (Frank et al., 1999), oder eine Interferon-Monotherapie, bei der in 20-40% der Fälle Stabilisierung und in 12-20% der Fälle Reduktion des Tumorwachstums beobachtet wurde (Arnold et al., 1996a; Öberg et al., 2000).

Das Ansprechen von GEP- Tumoren ist von der Primärlokalisierung abhängig. Während eine palliative Chemotherapie bei Tumoren des Vorderdarms (in erster Linie Pankreastumoren) eine klar dokumentierte Wirksamkeit aufweist, sprechen Tumoren des Mitteldarms praktisch nicht an, weshalb die Chemotherapie bei Tumoren dieser Art keine Therapieoption darstellt. Daher ist eine systematische palliative Chemotherapie nur bei neuroendokrinen Pankreastumoren nach Versagen der Octreotid oder Interferontherapie, sowie bei schnellwachsenden kleinzelligen neuroendokrinen GEP-Tumoren indiziert (Simon, 2004). Therapiestandard bei Pankreastumoren ist die Kombination von Streptozotocin und Doxorubicin mit objektiver Remissionsrate von 69% und medianer Remissionsdauer von 20 Monaten, die der Kombination Streptozotocin/5-Fluorouracil (Remissionsrate 45%, mediane Remissionsdauer 6,9 Monate) überlegen ist, mit aber ungünstigerem Nebenwirkungsprofil. Bei den schnellwachsenden kleinzelligen neuroendokrinen GEP-Tumoren scheint die Kombinationstherapie mit Cisplatin und Etoposid überlegen zu sein (Remissionsrate 67%, mediane Remissionsdauer 8 Monate, mediane Überlebenszeit 19 Monate). In Tabelle 1.1.1. sind die wichtigsten Therapiestudien zusammengefasst.

Tab. 1.1.1. Chemotherapiestudien zur Behandlung neuroendokriner GEP-Tumore

n	rd.	Behandlung	Objektives Ansprechen (CR+PR)	Mittleres-Überleben	Literatur
(84)	+	STZ vs. STZ+FU	36 vs. 63%	16,5 vs. 26 Monate	Moertel et al., 1980
(102)	+	CTZ vs. STZ+FU vs. STZ+Doxo	30 vs. 49 vs. 69%	1,4 vs. 1,4 vs. 2,2 Jahre	Moertel et al, 1992

(84)	-	STZ+FU oder STZ+Doxo	45%		Eriksson et al., 1990
(12)	-	STZ+Doxo + FU (=DSF)	54,5%	21 Monate	Rivera et al., 1998
(44)	-	CTZ+FU	32%	25 Monate	Bukowski et al., 1992
(45)	-	Cisplatin+ Etoposid	gut differenziert: 7% anaplastisch: 67%	19 Monate	Moertel et al., 1991
20 (6)		FU+Doxo+ Cisplatin	15%		Rougier et al., 1991
18 (9)	-	Leukovorin+ FU+DTIC (=DTIC-LVFU2)	Nicht-Karzinoid: 4/9 (44%) Karzinoid: 1/9 (11%)		Ollivier et al., 1998
38 (6)	-	FU+Epi+ DTIC (=FDE)	gesamt: 7 of 38		Di Bartolomeo et al., 1995
30 (15)	-	FDE, intensiviert	gesamt: 9/ 15 (60%) Pankreas: 4 /15 (27%)		Bajetta et al., 1998

STZ, Streptozotocin; FU, 5-Fluorouracil; CTZ, Chlorozotocin; Doxo, Doxorubicin; DTIC, Dacarbazin; Epi, Epirubicin; CR, komplette Remission; PR, partielle Remission, rd., randomisiert; n, Patientenzahl insgesamt, davon (in Klammern) mit neuroendokrinen Pankreastumoren.

Die meisten neuroendokrinen GEP-Tumore sprechen auf die konventionelle Chemotherapie oder Radiotherapie nicht an, so dass die Therapieerfolge bescheiden sind und neue Therapiestrategien gesucht werden müssen.

1.2. Stoffgruppen und Wirkungsmechanismen von Zytostatika

1.2.1 Proliferationskinetische Voraussetzungen der Chemotherapie

Klinisch werden die adjuvante (prä- oder postoperativ) und palliative Chemotherapie unterschieden, wobei erstere auf eine vollständige Tumoreradikation und Heilung, letztere dagegen auf eine Verbesserung der Lebensqualität abzielen. Solide Tumoren bestehen einerseits aus einer Wachstumsfraktion und andererseits aus Zellen, die sich in der Ruhephase, G₀ Phase, befinden, aber durch verschiedene Einflüsse wieder zum Wachstum rekrutiert werden können. Das Wachstum hängt im Wesentlichen von der

Größe der Wachstumsfraktion ab. Tumorzellen haben sich der normalen Wachstumsregulation entzogen. Für den Erfolg der Chemotherapie kommt es darauf an, wie viele der Tumorzellen in der chemosensitiven Teilungsphase (S-Phase) des Zellzyklus sind. Je größer die Zahl der Tumorzellen in der S-Phase und je kleiner der Anteil in der gegenüber vielen Zytostatika unempfindlichen G₀- und G₁-Phase, desto größer ist der zytotoxische Effekt. Durch eine Erhöhung der Dosis kann die auf die empfindlichen Zellen begrenzte Wirkung nicht überwunden werden, da Chemotherapeutika bei konstanter Dosis eine konstante Fraktion der Zellen abtöten („fractional cell kill“ – Hypothese), d.h. in einem Behandlungsschritt kann immer nur ein bestimmter Anteil der Zellen getroffen werden (Skipper et al., 1964). Somit lässt sich in mehreren Behandlungsschritten meistens eine komplette Remission erreichen, nicht jedoch eine Heilung.

1.2.2. Klassifikation und Wirkungsmechanismen von Chemotherapeutika

Chemotherapeutika können nach dem Angriffsort ihrer Wirkung klassifiziert werden:

- 1.) Hemmung der Purin –und Pyrimidinsynthese (Antimetabolite)
- 2.) DNA-Synthese Schädigung (Alkylantien, Topoisomeraseinhibitoren)
- 3.) Proteinsynthese (Enzyme, Hormone, Hormonantagonisten)
- 4.) Zelluläre Struktur und Funktion (Mitosehemmstoffe)

Man unterscheidet zwischen **phasen-spezifischen** und **phasen-unspezifischen** Zytostatika. Zur ersten Gruppe gehören die Antimetabolite (z.B. 5-FU), Mitosehemmstoffe (Vinca-Alkaloide) und Paclitaxel. Die Antimetabolite die die Synthese von DNA-Bausteinen hemmen wirken in der S-Phase, während die Vinca-Alkaloide und Taxane in der späten G₂- und M-Phase wirksam sind. Zu den phasen-unspezifischen Zytostatika zählen Alkylantien, Anthrazykline und Cisplatin, die die Zellen in allen Phasen des Zyklus schädigen. Ihre Wirkung kann aber dennoch von der Proliferation abhängen, sie wirken dann **zyklusspezifisch**.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytostatika aus allen Substanzgruppen eingesetzt, deren Wirkungsmechanismen, häufigste Nebenwirkungen, Anwendungsgebiete und der Referenzliteratur tabellarisch aufgeführt sind (s. Tabelle 1.2.1.).

Tab. 1.2.1. Wirkmechanismen von Chemotherapeutika

Substanz (Gruppe)	Wirkungs- mechanismus	Nebenwirkungen (Auswahl)	Anwendung (Auswahl)	Referenz
Paclitaxel (Mitose- hemmstoff)	Stabilisierung der Mikrotubuli durch Verhinderung der Depolymerisation	Knochenmarksuppression, Überempfindlichkeits- reaktionen, periphere Neuropathie	Ovarial-, Mamma-, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Rowinsky, 1990 und 1996
Vincristin (Mitose- hemmstoff)	Hemmung der Mikrotubuli- Polymerisation; Induktion der Depolymerisation	v.a. Neurotoxizität	akute lymphatische Leukämie, NHL, malignes-Melanom, Bronchialkarzinom	Gidding, 1999 Jordan, 1991 Rowinsky, 1992
Vinblastin (Mitose- hemmstoff)	s. Vincristin	v.a. Knochenmark- suppression	M. Hodgkin, NHL, Kaposi-Sarkom	Donoso, 1993, Jordan, 1992
Cisplatin (Alkylantien)	Vernetzung von DNA-Einzel- und Doppelsträngen	Nephrotoxizität, Hörschäden, Übelkeit+Erbrechen, periphere Neuropathie, Knochenmark- suppression	v.a. Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Prostata-, Hoden-, Blasen-, Bronchial- und Plattenepithel- karzinome im HNO- Bereich	Rosenberg, 1999
Carboplatin (Alkylantien)	s. Cisplatin, aber langsamere Aktivierung	v.a. Knochenmark- suppression, geringere NW als Cisplatin	s. Cisplatin	O'Dwyer, 1999; Muggia, 1989
Doxorubicin (Alkylantien)	Interkalation in DNA und RNA; Hemmung der Topoisomerase-II; Radikalbildung; Zellmembran- bindung	Knochenmark- suppression, Kardiotoxizität	akute Leukämien, Lymphome, zahlreiche solide Tumoren (Mamma-, Bronchialkarzinom, Weichteilsarkome)	Launchbury, 1993 Robert u. Gianni, 1993
Dacarbazin (Alkylantien)	Alkylierung von O6 und N7 Guaninbasen der DNA	Knochenmark- suppression, Erbrechen, Haarausfall, Exantheme, grippeähnliche Beschwerden, Neuro- und Nephrotoxizität	Malignes-Melanom, M. Hodgkin, Weichteilsarkome	Tsang, 1991 Friedman, 1995
Etoposid	Hemmung der	Knochenmark-	Bronchial-, Hoden-	Pommier, 1996

(Topoisomerase-hemmer)	Topoisomerase-II mit Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen	suppression, Mukositis, Erbrechen, Haarausfall	und Ovarialkarzinom, Lymphome, akute Leukämien	Scott , 1998
Irinotecan (Topoisomerase-hemmer)	Hemmung der Topoisomerase-I mit Bildung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen	starke Diarrhoe, akutes cholinerges Syndrom	fortgeschrittenes Kolon- und Rektumkarzinom	Pommier, 1998
5-Fluorouracil (Anti-metabolite)	Hemmung der DNA-Synthese durch Blockierung der Thymidilatsynthese sowie Inkorporation in DNA und RNA	Knochenmarksuppression, Mukositis, Diarrhoe, Dermatitis, Haarausfall, Neurotoxizität	Kolon-, Rektum-, Mamma-, Ösophagus-, Leber-, Kopf-, Hals- und Harnblasenkarzinome	Sotos, 1994; Ghoshal, 1997
5-Aza-2'-Deoxycytidin (Anti-metabolite)	Hemmung der DNA-Methylierung nach DNA-Inkorporation des Cytidinanalogons	v.a. Knochenmarksuppression	akute Leukämien, MDS, CML	Jones u. Taylor, 1980 Tate u. Bird, 1993 Nan, 1998
Octreotid (Somatostatinanalogon)	Hemmung der Sekretion hypophysärer und gastrointestinaler Peptidhormone	Hypo- und Hyperglykämien, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Steatorrhoe, Gallensteinbildung	Neuroendokrine GEP-Tumore Hypophysenadenome	Pollak, 1998 Öberg, 2000
Interferon- α -2a	Zytokin antiviral, antiproliferativ immunmodulatorisch	v.a. grippeähnliche Symptome; Leukopenie, Depression	chron. Hepatitis B u. C, verschiedene hämatologische und solide Neoplasien, u.a. neuroendokrine GEP-Tumore	Zoon 1992 Öberg, 2000 Detjen, 2000

1.2.3. Chemoresistenzentwicklung

Die Chemosensitivität gesunder Zellen beruht auf intakten genetischen Mechanismen der Zellzyklusregulation und Apoptose, die in vielen Tumorzellen alteriert sind und die Resistenzbildung begünstigen. Es wird zwischen einer primär vorhandenen Unempfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (primäre Resistenz) und einer im Laufe der Chemotherapie erworbenen (sekundäre Resistenz) unterschieden. Zu den ursächlichen Faktoren zählen *nicht zelluläre Faktoren* (z.B. ein ungeeignetes Applikationsschema) als auch *zelluläre Resistenzmechanismen*, die Folge von Mutationen und/oder Selektion von resistenten Tumorzellen sind. Zu den zellulären Resistenzmechanismen gehören u.a.:

- Abnahme eines aktiven Transports des Wirkstoffs in die Tumorzellen
- aktiver Transport einer Substanz aus der Zelle heraus infolge der verstärkten Bildung von P-Glykoprotein (P-gp)
- enzymatische Inaktivierung des Zytostatikums in der Tumorzelle, bzw. seine verminderte Bioaktivierung,
- qualitative und quantitative Veränderungen der Zielstrukturen
- vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine (z.B. Bcl-2)
- Auftreten anderer Biosynthesewege, die durch das Zytostatikum nicht beeinträchtigt werden
- verstärkte DNA-Reparatur

Für die Zukunft der herkömmlichen Chemotherapie ist es deshalb von entscheidender Bedeutung herauszufinden, inwieweit eine Änderung der Abläufe der Zellzykluskontrolle und Apoptose in malignem Gewebe Auswirkung auf das Therapieansprechen und die Resistenzentstehung hat. Dazu ist ein Verständnis der genauen molekularen Abläufe der Zellzyklusregulation und Induktion des Zelltods und deren Störung in Tumorzellen von Bedeutung, um gezielt in die Abläufe der gestörten Regulationsmechanismen einzugreifen.

1.3. Strahlentherapie und Möglichkeiten der Wirkungssteigerung

In der Klinik werden zwei Bestrahlungstechniken eingesetzt, die Brachytherapie (Strahlenquelle innerhalb oder in der Nähe des Zielorts) und die Teletherapie (Patient ist in gewisser Entfernung der Strahlenquelle). Körperzellen sind in der Mitose- und G2-Phase des Zellzyklus am strahlenempfindlichsten, dagegen in der S-Phase am strahlenresistentesten. Die direkte Strahlenwirkung führt durch Energieabsorption insbesondere zu DNA- Einzel- und Doppelstrangbrüchen, während es bei der indirekten Strahlenwirkung über chemische Reaktionen mit Produkten der Wasserradiolyse zur Radikalbildung und infolgedessen zu DNA-Schäden kommt. Durch diese und weitere Veränderungen, sowie fehlerhafte zelluläre Reparaturprozesse werden Mutationen ausgelöst. Demgegenüber ist die Proteinsynthese viel weniger strahlenempfindlich: So kann es vorkommen, dass Zellen zwar ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, aber trotzdem immer weiter wachsen und sog. Riesenzellen entstehen. Die „vier R’s“ der Strahlenbiologie charakterisieren mögliche Ursachen für Strahlenresistenz auf molekularer und zellulärer Ebene: Repair, Repopulierung, Redistribution und fehlende Reoxygenierung. Repopulation bedeutet eine starke Tumorphiliferation, Redistribution die Verteilung der Tumorzellen auf strahlenresistente Zellzyklusphasen, nachdem ein vorausgegangener Strahleninsult zu einem reversiblen Zellzyklusarrest in der G2-Phase geführt hat. Reoxygenierung kennzeichnet die verbesserte Sauerstoffversorgung von hypoxischen Zellen, nachdem die Gesamtzellzahl durch Bestrahlung vermindert wurde. Aufgrund der Tatsache, dass viele Tumorzellen eine geringere Reparaturfähigkeit haben und längere Zeit für die Erholung nach Bestrahlung benötigen, wendet man die Bestrahlung fraktioniert (mit Bestrahlungspausen) oder protrahiert (kontinuierliche Bestrahlung der gleichen Dosis über einen längeren Zeitraum) an, um die tumor- und normalgewebespezifischen Erholungsvorgänge optimal auszunutzen. Verfahren zur Wirkungsverstärkung der Strahlentherapie umfassen u.a. die Sensibilisierung des Tumors durch Hyperthermie und chemische Substanzen (z.B. Nitroimidazole), sowie die hyperbare Sauerstoff- und Radiotherapie in Gewebehypoxie. Bestimmte Chemotherapeutika können die Effekte der Strahlentherapie verstärken. So kann Paclitaxel durch Arretierung der Zellen in der strahlensensitiven G2/M-Phase in einzelnen Fällen die Strahlenwirkung überadditiv beeinflussen (Tishler et al., 1992, Niero et al., 1999).

1.4. Die Regulation des Zellzyklus

1.4.1. Der Ablauf des Zellzyklus

Die Entstehung maligner Tumoren und die Bildung von Therapieresistenzen ist eng mit Veränderungen in der Zellzyklus-Kontrolle verknüpft. Der Ablauf des Zellzyklus gliedert sich in zwei Hauptphasen, die Interphase und die Teilungsphase (Mitose). Die Interphase ist der Zeitraum zwischen zwei Mitosen und wird in die G1-Phase (G von „gap“), S-Phase und G2-Phase unterteilt und nimmt etwa 90% der Gesamtzyklusdauer in Anspruch. In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf den Übergang in die S-Phase vor, in welcher der Chromosomensatz verdoppelt wird. Zwischen Abschluss der DNA-Synthese und der eigentlichen Zellteilung (M-Phase = Mitose) liegt eine weitere Vorbereitungsphase, die G2-Phase. Nach Abschluss der Mitose kann die Zelle unmittelbar in einen neuen Teilungszyklus eintreten, zum anderen vermag sie unter bestimmten Umständen aus der G1-Phase in eine Ruhephase, die sog. G0-Phase übertreten, aus der eine Rückkehr in den Teilungszyklus möglich ist. Schließlich kann die Zelle den Weg der Differenzierung oder alternativ des programmierten Zelltodes einschlagen (s. Kapitel 1.5.) (Ivanchuk und Rutka, 2004; Pietenpol und Stewart, 2002).

1.4.2. Kontrollpunkte

Kontrollpunkte („checkpoints“) (s. Abb.1.4.1.) im Zellzyklus sorgen für die ordnungsgemäße Übertragung der genetischen Information auf die Tochterzellen. Drei wesentliche Mechanismen der Zelle sorgen für die fehlerlose Weitergabe ihrer genetischen Information: 1.) DNA-Reparaturmechanismen 2.) Verzögerungsmechanismen, die Fehler in der DNA entdecken und Zellzyklus-Arrest bis zur vollständigen Reparatur bewirken 3.) Induktion von Apoptose bei irreparablen Schäden (King et al., 1998). Die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus liegen dabei:

- 1.) in der späten G1-Phase am sog. Restriktionspunkt, wo das Vorhandensein von „äußeren Faktoren“ (z.B. Nährstoffe, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle) geprüft wird, die für den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase benötigt werden. Wird dieser Punkt überschritten, so werden die weiteren

Zellzyklusphasen unabhängig von äußeren Einflüssen durchlaufen. Ansonsten geht die Zelle in einen Ruhezustand (G₀-Phase) über.

- 2.) am G₁/S-Phase Übergang wird nach Überwinden des Restriktionspunktes die Intaktheit der DNA und die Anwesenheit von Faktoren geprüft, die für eine fehlerfreie Verdoppelung der DNA in der S-Phase benötigt werden. Dort entscheidet sich auch, ob bei DNA-Schädigung ein Zyklus-Arrest mit anschließender Reparatur erfolgt, oder ob Apoptose eingeleitet wird.
- 3.) in der späten G₂-Phase (G₂/M-Kontrollpunkt) wird verhindert, dass die Mitose vor Beendigung der DNA-Replikation beginnt oder sich eine weitere Verdoppelung der DNA anschließt. Ferner wird überprüft, ob Fehler bei der DNA-Replikation aufgetreten sind und ggf. Reparatursysteme aktiviert.

Daneben gibt es einen sog. Spindel-Checkpoint in der Mitosephase und einen S-Phase-Checkpoint, wobei der Verlust des Spindel-Checkpoints zu Veränderungen der Chromosomenzahl in den Tochterzellen führt.

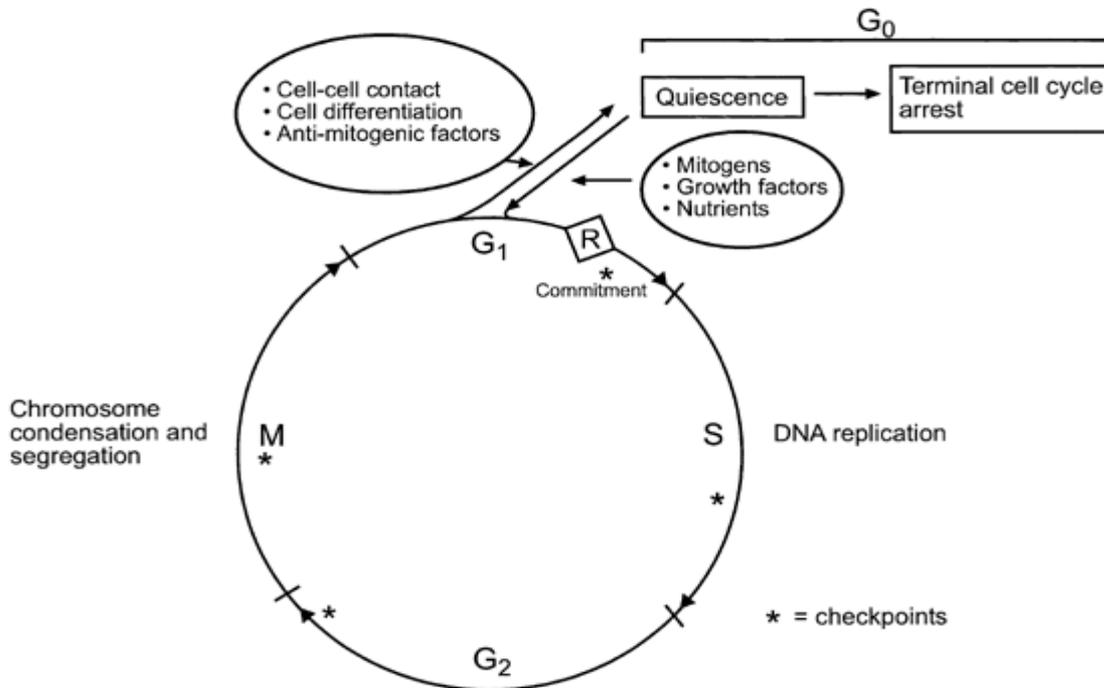


Abb.1.4.1. Kontrollpunkte des Zellzyklus. Schematische Präsentation der Zellzyklusphasen. Sobald der Restriktionspunkt (R) durchschritten ist, werden keine „äußeren Faktoren“ mehr für eine weitere Zellzyklusprogression benötigt. Verschiedene Signale können einen Eintritt der Zelle aus der G₁-Phase in einen Ruhezustand (G₀-Phase) bewirken. Kontrollpunkte des Zellzyklus („checkpoints“) sind

durch Sternchen (*) gekennzeichnet. [Kastan, M.B., Skapek, S.X., 2001; entnommen aus: DeVita, Hellman, Rosenberg. *Principles and Practice of Oncology*, 6. Auflage 2001].

1.4.3. Regulation des Zellzyklus

Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Zyklin-abhängige Kinasen (Cyclin dependent kinases, CDKs) reguliert (s. Abb. 1.4.2.), die nur in Assoziation mit den regulatorischen Untereinheiten, den sog. Zyklinen, aktiv sind (Morgan et al., 1997; Sidle et al., 1996; Sherr, 1996). CDK4 und 6 sind in Verbindung mit D-Zyklinen von entscheidender Bedeutung für die Überschreitung des Restriktionspunkts in Gegenwart von Überlebens- und Wachstumsfaktoren und für den Eintritt der Zellen in die S-Phase. D-Zykline sind die ersten Zyklone, die im Verlauf des Zellzyklus nach Abschluss der Mitose nachweisbar sind und ihre regulatorische Bedeutung ist auf die G1-Phase beschränkt. In der späten G1- und der frühen S-Phase tritt Zyklin-E im Komplex mit CDK2 auf, im weiteren Verlauf der S-Phase wird Zyklin-E dann durch Zyklin-A ausgetauscht (Del Sal et al., 1996; Sherr, 1996).

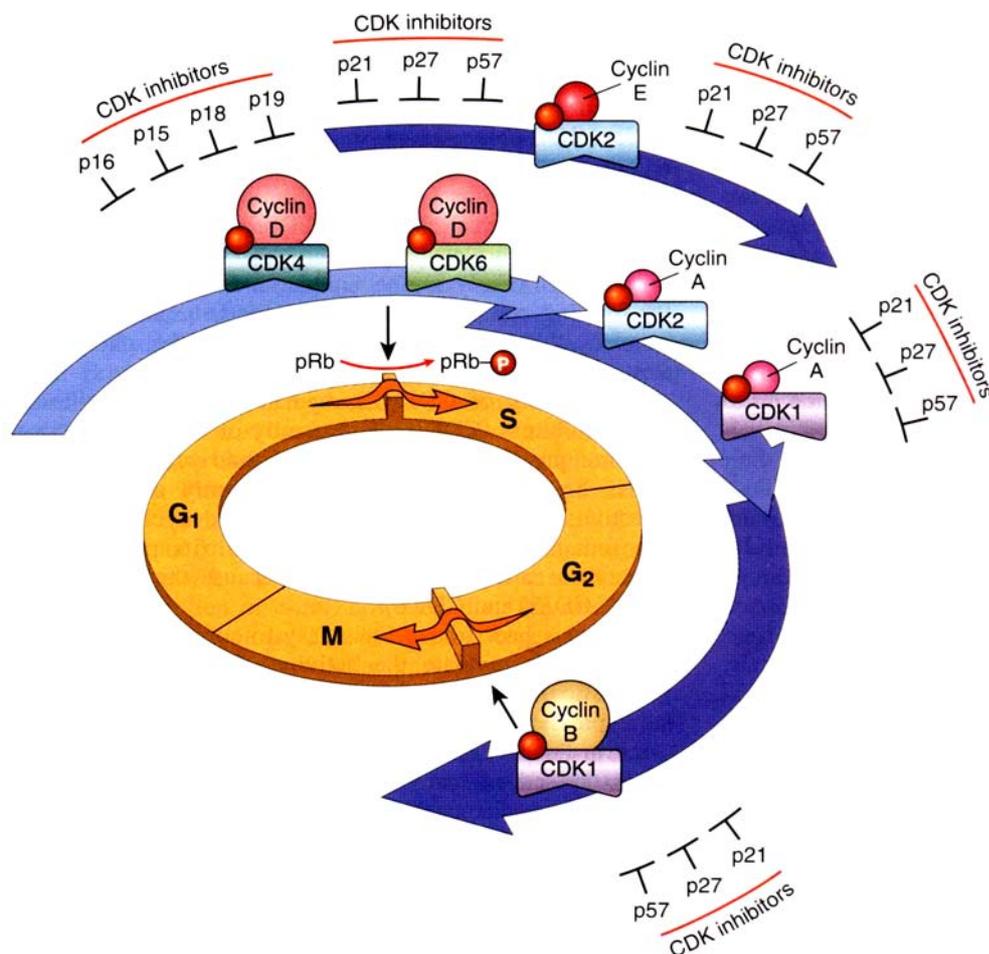


Abb.1.4.2. Schematische Darstellung der Regulation der Zellzyklus-Progression. Phasenspezifische Veränderungen der Aktivität von progressionsfördernden Zyklin-/CDK-Komplexen und progressionshemmenden CDK-Inhibitoren [entnommen aus Cotran, Kumer, Collins. *Pathologic Basis of Disease*, 6. Auflage 1999].

Eine Voraussetzung für die Überschreitung des Restriktionspunktes und Progression von der G1- in die S-Phase ist die Inaktivierung des Retinoblastomproteins (pRb) durch Phosphorylierung durch in der G1- und S-Phase vorliegende Zyklin-D1,2,3/CDK4 bzw. 6 und Zyklin-E/CDK2-Komplexe (Sidle et al., 1996; Sherr, 1996). Daraus resultiert die Freisetzung des zuvor an pRb gebundenen Transkriptionsfaktors E2F-1 (Weinberg, 1995; Kaelin, 1997), der für den Eintritt der Zelle in die S-Phase und die vollständige DNA-Replikation notwendig ist. Die Regulation des G2/M-Checkpoints findet über einen MPF („Maturation Promoting Factor“) genannten Proteinkomplex aus Zyklin-B und CDK1, der auch CDC2 genannt wird, statt.

Die Zyklin/CDK-Aktivität wird durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert. Die meisten Zyklin/CDK-Komplexe werden erst durch bestimmte Kinasen und Phosphatasen aktiviert. (Ohi et al., 1999; Nurse, 1994). Die sog. „Cyclin dependent kinase inhibitors“ (CKIs) hemmen die Aktivität vieler Zyklin/CDK-Komplexe und nehmen damit indirekt Einfluss auf die Phosphorylierung des pRb-Proteins. Durch die CKIs kann die Passage des Zellzyklus als Antwort auf externe- (z.B. mitosehemmende Faktoren) und interne Signale (z.B. DNA-Schädigung oder Differenzierungsfaktoren) gehemmt werden. Es werden zwei Familien von CKIs unterscheiden. Die eine umfasst die Proteine p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}. p21^{WAF1/CIP1} wird durch das Tumorsuppressor-Protein p53 infolge von DNA-Schädigung stimuliert und führt über Hemmung von CDK2, -4 und -6 zu einem G1-Arrest (Kastan et al., 1991, Hall et al., 1993). Starke DNA-Schädigung führt zur p53-vermittelten Apoptoseinduktion. Anderen Untersuchungen zufolge gibt es jedoch auch fördernde Einflüsse von p21^{WAF1/CIP1} auf die Aktivität ausschließlich von CDK4 und Zyklin D (LaBaer et al., 1997). p27^{KIP1} ist ein in der G1-Phase aktiver Regulator wachstumshemmender Signale (z.B. IL2, CSF-1 oder TGF-β) und blockiert D-Zyklin- und E-Zyklin-Komplexe. Bei der Blockierung des Eintritts in die S-Phase steht die Inaktivierung von Zyklin-E/CDK2-Komplexen im Vordergrund (Polyak et al., 1994). Untersuchungen weisen darauf hin, dass p27^{KIP1} den Ein- und Austritt von Zellen in die G0-Phase vermittelt (Sherr 1996). p57^{KIP2} scheint wie p27^{KIP1} und p21^{WAF1/CIP1} ein universeller Inhibitor von Zyklin/CDK-Komplexen zu

sein (Matsuoka et al., 1995). Die zweite Familie umfasst 4 Proteine (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, und p19^{INK4d}), die spezifisch Zyklin D-assoziiert CDK4 und -6 binden und hemmen.

1.4.4. Fehlerhafte Zellzykluskontrolle und autonomes Wachstum

Eine Störung der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion kann unkontrollierte Proliferation und genetische Instabilität begünstigen. Der *INK4a/ARF*-Lokus gehört nach dem Tumorsuppressorgen *p53*, das etwa in der Hälfte aller menschlichen Tumoren mutiert ist, zu denjenigen Genloki, die in menschlichen Tumoren am häufigsten verändert sind (Hall und Peters 1996; Hollstein et al., 1991). Zwei potentielle Mechanismen kommen für die Hemmung der Tumorentstehung durch *p53* in Betracht: In Zellen mit intaktem *p53* kommt es nach DNA-Schädigung zu einer verstärkten Expression und Stabilisierung von *p53*. Unter noch unzureichend verstandenen Bedingungen kommt es einerseits über die verstärkte Expression von *p53*-abhängigem p21^{WAF1/CIP1} zu einer Blockierung der Zellen in der G1-Phase. Verlust von intaktem *p53* kann somit zu vermehrter Replikation geschädigter DNA und zum Überleben von solchen Zellen führen, die normalerweise zum Zelluntergang bestimmt sind (Lane 1992). Die Entwicklung eines malignen Tumors ist ein schrittweiser multifaktorieller Prozess, der zur Akkumulation verschiedener genetischer Alterationen führt. Diese Veränderungen bewirken schließlich ein unkontrolliertes Wachstum und einen erhöhten Zellproliferationsanteil, was u.a. durch die Aktivierung verschiedener Onkogene (z.B. RAS), fehlerhafter Zellzykluskontrolle (z.B. Verlust von Tumorsuppressorgenen) und durch Resistenzmechanismen gegenüber der Induktion von Apoptose (z.B. vermindertes bax- und *p53*-Protein, Bcl-2-Überexpression) bedingt sein kann.

1.5. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

1.5.1. Einleitung

Apoptose (gr. Apoptos: Das Herabfallen) ist ein kontrollierter, energieabhängiger sogenannter „programmierter Zelltod“, der im Laufe der Embryonal- und Organentwicklung von Zellverbänden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchlaufen werden muss, um die Integrität eines multizellulären Organismus zu erhalten (Kerr et

al., 1972). Jede Körperzelle ist mit einem Programm zur Apoptose ausgestattet und adäquate Stimuli können dieses Programm auslösen. Morphologisch geht die Apoptose mit der Kondensation des Chromatins, blasiger Veränderung und Schrumpfung des Zellkerns und Zelle einher und endet schließlich mit der Auflösung der Zelle in viele Zellkörperchen (apoptotic bodies). Diese werden von Makrophagen phagozytiert. Störungen dieser Vorgänge können neben Tumoren auch zu anderen Krankheiten (z.B. neurodegenerative Krankheiten) führen. Bei neurodegenerativen Krankheiten (M. Alzheimer, M. Parkinson) kommt es zu einer erhöhten Bereitschaft zum programmierten Zelltod, bei Tumoren dagegen ist die Ausführung dieses Selbstmordprogrammes gestört (Duke et al., 1997).

Apoptose und Nekrose sind unterschiedliche Formen des Zelltodes, welche durch eine Vielzahl unterschiedlicher morphologischer Veränderungen (Tabelle 1.5.1) definiert sind.

Tab. 1.5.1. Charakteristika von Apoptose und Nekrose

Apoptose	Nekrose
<ul style="list-style-type: none"> • Aktiver, energieverbrauchender Prozess 	<ul style="list-style-type: none"> • Passiver, nicht energieverbrauchender Prozess, ausgelöst z. B. durch mechanische Zellschäden
<ul style="list-style-type: none"> • Zellschrumpfung 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellschwellung (Oncose)
<ul style="list-style-type: none"> • Chromatinkondensation 	<ul style="list-style-type: none"> • Zerstörung der Plasmamembran
<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Membranasymmetrie mit Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche 	<ul style="list-style-type: none"> • Freisetzung des Inhalts des Zytosols und von Zellorganellen in den interzellulären Raum.
<ul style="list-style-type: none"> • Bildung von DNA-Bruchstücken durch Endonukleasen („DNA-Laddering“) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammatorische Begleitreaktion mit Gewebeschädigung
<ul style="list-style-type: none"> • Bildung von Ausstülpungen (Zeiose) und membranumschlossender Vesikel („Blebbing“), welche von umgebenden Makrophagen aufgenommen werden 	
<ul style="list-style-type: none"> • Keine inflammatorische Begleitreaktion 	

1.5.2. Regulationsmechanismen der Apoptose

Verschiedene Stimuli können Apoptose auslösen. Dazu gehören zum einen Zytokine (z.B. TNF- α) bzw. Oberflächenmoleküle anderer Zellen (z.B. Fas-Ligand), die durch Bindung an ihre Rezeptoren, sog. „Todesrezeptoren“ eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslösen, die zur Apoptose führt (Baker und Reddy 1998). Auch das Fehlen von Überlebenssignalen (Yao et al., 1995) und irreparable DNA-Schäden, die beispielsweise durch Chemotherapeutika ausgelöst werden können zur Apoptose führen. Beteiligt an der durch DNA-Schäden ausgelösten Apoptose ist das Tumorsuppressorgen p53, welches je nach Ausmaß der DNA-Schädigung entweder deren Reparatur fördern, oder die Induktion von Apoptose bewirken kann (Zambetti und Levine, 1993) (siehe auch Abschnitt 1.4.4.).

1.5.3. Todesrezeptoren

Durch Aktivierung bestimmter Zellrezeptoren durch Liganden kann unter physiologischen Bedingungen Apoptose ausgelöst werden. Die am besten beschriebenen Rezeptoren sind der CD95/Apo1/Fas Rezeptor und der TNFR-I/p55/CD120a Rezeptor, die zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehören. Sie können auch durch agonistische stimulierende Antikörper aktiviert werden. Der Ligand CD95L (APO-1L/FAS-L) und sein Rezeptor CD95 (Suda et al., 1993) spielen u.a. bei der Beseitigung entarteter Zellen eine Rolle (Rouvier et al., 1993). Daneben konnte die die Expression von CD95L auch in verschiedenen neoplastischen Zellen gezeigt werden (Hahne et al., 1996, Strand et al., 1996).

Bei der Induktion von Apoptose kommt es zur Trimerisation von Rezeptoren durch die Liganden, was zur Weiterleitung des Todessignals in das Innere der Zelle führt (Banner et al., 1993). Da der intrazelluläre Teil von CD95 selbst keine enzymatische Funktion aufweist, muss das Signal durch rezeptorassoziierte sog. Adapter-Proteine, z.B. FADD/MORT1 („Fas-Associated Death Domain“) übertragen werden (Huang, D.C. et al., 1997, Kramer, 2000). Diese Adapter-Proteine lagern sich homolog mit ihren eigenen Todesdomänen an die intrazellulären Todesdomänen der trimerisierten Rezeptoren an und bilden am Beispiel von CD95 den sog. „Death Inducing Signalling Complex“ (DISC) (Kischkel et al., 1995). FADD zieht Procaspase-8 (ein Eiweiß spaltendes Enzym) in den DISC. Dieses Proenzym (Zymogen) wird autokatalytisch

gespalten und am DISC in das aktive Enzym Caspase-8, auch „Fas-associated death domain-Like Interleukin-1 β Converting Enzyme“ (FLICE) genannt, überführt (Muzio et al., 1996). Die aktive Caspase-8 spaltet und aktiviert dann weitere Caspasen wie z.B. Caspase-3 (sog. „Effektorcaspasen“), die schließlich zelluläre Substrate (Todessubstrate) spalten und das morphologische und biochemische Bild der Apoptose bestimmen (s. Abschnitt 1.5.6.).

1.5.4. Signalwege der Apoptoseinduktion

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Signalwege der Apoptoseinduktion: den rezeptorvermittelten, also exogen ausgelösten, und den mitochondrialen, also endogenen Signaltransduktionsweg (Abb. 1.5.1). Beide Wege besitzen eine gemeinsame Endstrecke in der Aktivierung von Caspasen.

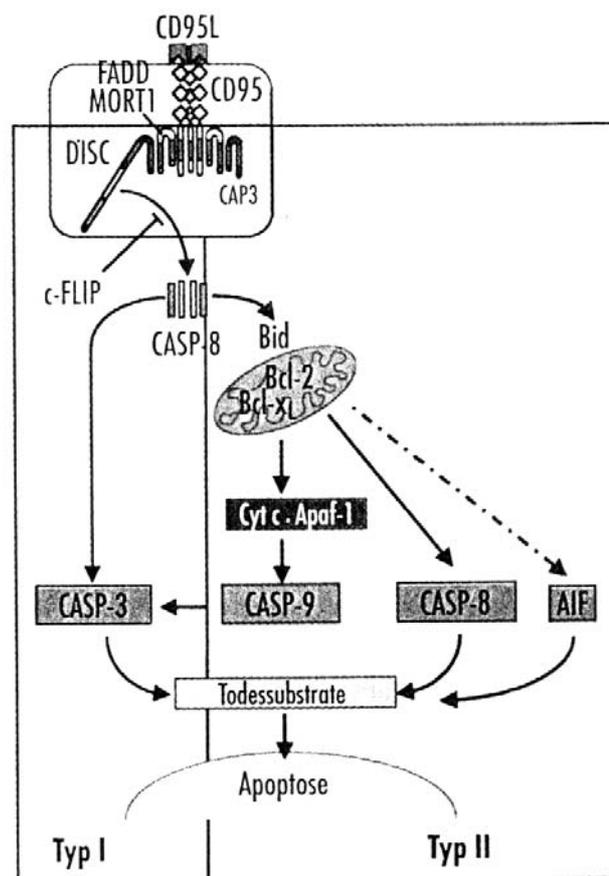


Abb.1.5.1. Apoptose-Signalwege in Typ-I und Typ-II-Zellen [nach Kramer, 2000]

Während in sog. Typ-I Zellen die Caspasenaktivierung zur Vermittlung des Apoptosesignals ausreicht, sind Typ-II-Zellen auf die mitochondriale Verstärkung des Signals angewiesen (Erklärung siehe Text).

Der Signalweg in sog. Typ-I-Zellen zeichnet sich durch eine reine Caspasenkaskade aus. Der Signalweg in Typ-II-Zellen benutzt Mitochondrien als Verstärker, weil hier die DISC-Bildung und die Caspase-8-Aktivierung aus noch unbekanntem Gründen nicht ausreicht, um eine Caspasenkaskade zur Apoptosesignalgebung zu ermöglichen (Scaffidi et al., 1998 und 1999). Die geringe Aktivität von Caspase-8 reicht aus, um BID zu spalten, was zur Aktivierung von Mitochondrien führt, die Cytochrom C freisetzen. Cytochrom C komplexiert mit zytoplasmatischem APAF-1 und ATP das sog. „Apoptosom“, an dem wiederum Caspase-9 aktiviert wird. Diese aktiviert ihrerseits weitere Effektorcaspasen, wie Caspase-3 (Srinivasula et al., 1998). Die mitochondriale Aktivierung geht neben der Freisetzung von Cytochrom C mit Porenbildung in der Mitochondrienmembran und damit Abfall des Transmembranpotentials einher. Dieser mitochondrienabhängige Weg wird jedoch nicht nur bei einem Teil der Signaltransduktion über Todesrezeptoren beschränkt. Auch zahlreiche andere zelluläre Stressfaktoren wie Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung können die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien bewirken.

1.5.5. Die BCL-2 Familie

Die Familie von Bcl-2 homologen Proteinen kann in eine proapoptotische- und eine antiapoptotische Unterfamilie aufgeteilt werden (Chao und Korsmeyer, 1998). Die Aktivierung der Mitochondrien, die Bildung des Apoptosoms und Apoptose können durch Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-xL verhindert werden. (Kluck et al., 1997; Yang, J. et al., 1997). Sie sind integrale Membranproteine, die sich in der äußeren mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und in der Kernhülle oder auch frei im Zytoplasma befinden. (Boise et al., 1993). Durch Bindung von Bcl-xL an APAF-1 wird die Aktivierung von Caspase-9 durch APAF-1 gehemmt (Hu et al., 1998) und infolgedessen mitochondrienabhängige Apoptose verhindert. Desweiteren wird diskutiert, ob Bcl-xL das mitochondriale Potential aufrecht erhalten kann (Reed et al., 1998, Minn et al., 1997). Bcl-xL hemmt somit die Signalgebung v.a. in Typ-II-Zellen, bei denen die Mitochondrien im Mittelpunkt stehen (Scaffidi et al., 1998 und 1999). Proapoptotische Mitglieder befinden sich im Zytoplasma oder Zytoskelett. Nach einem apoptotischen Signal erfahren sie posttranslatorische Modifikationen und wandern in die Mitochondrienmembran (Gross et al., 1998).

Generell scheint der relative Anteil pro- und antiapoptotischer Familienmitgliedern sehr wichtig für die Auslösung, bzw. Hemmung der Apoptose zu sein (Dragovich et al., 1998). Überexpression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2, kann die Immortalisierung und Tumorbildung sowie die Resistenzenbildung von Tumorzellen gegenüber apoptoseinduzierenden Substanzen, wie z.B. Chemotherapeutika, begünstigen. Eng gekoppelt an die Apoptoseinduktion ist die Regulation der Zellproliferation. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Tumorsuppressorgenen (z.B. des Retinoblastomproteins) und die Aktivierung von Onkogenen (c-Myc, E1A) erst in Verbindung mit gestörter Apoptoseinduktion autonomes Wachstum begünstigt (Evan et al., 1992, Galaktionov et al., 1996, Hueber et al., 1997, Harrington et al., 1994).

1.5.6. Caspasen

Caspasen umfassen eine Familie hochspezifischer ICE („Interleukin-1 β Converting Enzyme“)-homologer Proteinasen (Alnemri et al., 1996). Sie liegen intrazellulär als inaktive Enzymvorstufen (Zymogene) synthetisiert und nach proteolytischer Spaltung in die aktive Form überführt (s. Abb. 1.5.2.).

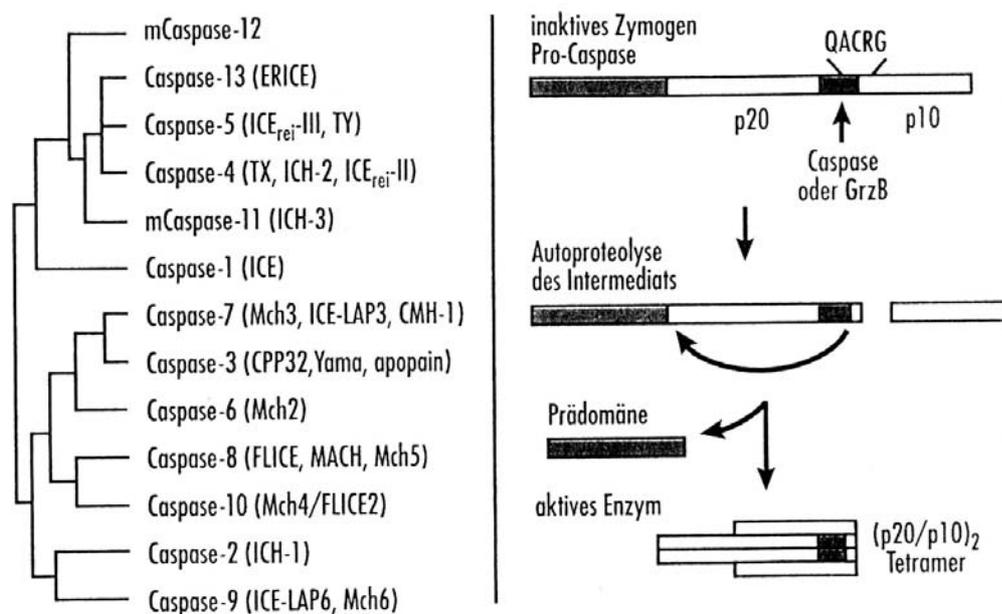


Abb. 1.5.2. Die Caspasen-Familie und ihr allgemeines Aktivierungsschema [nach Kramer, 2000]

Alle Caspasen werden als inaktive Proenzyme exprimiert und bestehen aus drei Domänen. Einer NH₂-terminalen, einer Großen (p20) und einer Kleinen (p10). Nach Spaltung zwischen der großen und kleinen

Untereinheit verbinden sich beide zu einem Heterodimer, worauf zwei ein Tetramer fusionieren und die aktive Form der Caspasen bilden.

Caspasen können je nach Funktion in sog. „Initiator-Caspasen“, welche proapoptotische Signale, z.B. von den Todesrezeptoren (s. Abschnitt 1.5.3.) in die Signalkaskade weiterleiten (z.B. Caspase-8), und in „Effektor-Caspasen“ unterteilt werden, welche innerhalb der Signalkaskade zur Degradation der Zelle führen (z.B. Caspase-3) (Froelich et al., 1998). In der Apoptose stellt die Caspasenaktivierung die gemeinsame Endstrecke des exogenen und endogenen Weges dar (s. Abschnitt 1.5.4.), wobei die Caspase-8 als Bindeglied für den rezeptorvermittelten, und Caspase-9 für den mitochondrial eingeleiteten Apoptoseweg fungiert.

Die Aktivierung von Caspasen wird durch Wechselwirkung ihrer sog. Protein-Interaktionsdomänen mit bestimmten Adaptermolekülen mit ähnlichen Domänen ermöglicht (Chinnaiyan et al., 1995, Muzio et al., 1996, Fernandes-Alnemri et al., 1996). Dadurch kommt es zu einer sich selbst verstärkenden proteolytischen Kaskade, welche mit der Aktivierung der Effektorcaspasen Caspase -3, -6, -7 in den apoptosespezifischen morphologischen Veränderungen mündet. Eine Schlüsselstellung nimmt dabei die Effektorcaspase-3 ein, die infolge unterschiedlicher Apoptosesignalwege aktiviert wird (Cohen, 1997; Janicke et al., 1998; Okano und Rustgi, 2001). Die Effektorcaspasen spalten zelluläre Substrate z.B. Zellstrukturproteine wie Aktin und nukleäre Laminine (Lazebnik et al., 1995), Reparaturenzyme wie PARP (Lazebnik et al., 1994), anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2 und Bcl-xL (Cheng et al., 1997, Clem et al., 1998) und verschiedene Kinasen (Widmann et al., 1998). Darüber hinaus spalten und inaktivieren die Effektorcaspasen Proteine, die DNA-spaltende Enzyme (Endonukleasen) hemmen. Dies bewirkt, dass diese Enzyme in den Zellkern wandern und dort die DNA „geordnet“ in charakteristische Bruchstücke zerlegen.

1.6. Ziel der Arbeit

Die in malignen neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren eingesetzten Chemotherapeutika haben bisher nur teilweise zu geringem Ansprechen und verbesserten Überlebenszeiten in kleinen Patientenkollektiven geführt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Chemosensitivität einer etablierten neuroendokrinen pankreatischen Tumorzelllinie unter Behandlung mit verschiedenen ausgesuchten Chemotherapeutika-Substanzklassen, bzw. unter Bestrahlung *in vitro* zu analysieren und die zugrundeliegenden molekularen zellulären Veränderungen näher zu charakterisieren, in der Hoffnung, chemotherapeutische Therapiemöglichkeiten optimieren zu können. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) welche Chemotherapeutika besitzen bei äquivalenter Dosierung den stärksten proliferationshemmenden Effekt in BON-1-Zellen ?
- 2.) Welche Auswirkung hat die Telekobaltbestrahlung evtl. auch in Kombination mit Paclitaxel auf die Zellproliferation ?
- 3.) Zu welchen Zellzyklusveränderungen führen wirksame Chemotherapeutika oder die Telekobaltbestrahlung in BON-1 Zellen ?
- 4.) Führen die wirksamen Chemotherapeutika zum apoptotischem und/oder nekrotischen Zelltod in BON-1 Zellen ? Welches der Zytostatika besitzt den größten apoptoseinduzierenden Effekt ?
- 5.) Zu welchen Änderungen des Expressionsprofils zellzyklus- und apoptosespezifischer Gene und Proteine führen ausgesuchte wirksame Chemotherapeutika in BON-1 Zellen? Ergeben sich Hinweise auf die Signalwege ?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

2.1.1. Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage: AE 163	Mettler, Gießen
Autoklav: Laborautoklav Typ GLA 40	Fritz Gösler, Hamburg
Filmentwickler: Curix 60	AGFA, Leverkusen
Fluoreszenzmikroskop Diaplan	Leitz, Wetzlar
Heizblock:	
DRI-Block DB1 und DB2A	Techne, Princeton, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsofen	Bachhofer, Reutlingen
Hybridisierungsglasrohr	Bachhofer, Reutlingen
Magnetrührer: MR3001	Heidolph, Gießen
Multipipettierer	
PCR-Cycler: Thermo-Dux PHC-3	Techne, Princeton, USA
Pipetten (1000µl, 100µl, 20µl, 10µl)	
Pipettierhilfe: Pipetus-Akku	
Rotoren: JA-14, JA-20, SW27	Beckman, München
Tischzentrifugen:	
Biofuge 13 Sepatech	Heraeus, Hanau
Biofuge 15R, Sepatech	Heraeus, Hanau
MicroCen 13	Herolab, Wiesloch
Vortex: REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Waage: 572-33	Kern, Albstadt
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifuge: J2-21	Beckman, München

2.1.2. Elektrophoresegeräte und Zubehör

Agarosegelapparaturen: HE 99, HE 33 Minigel	Hofer, Heidelberg
Blotting-Apparatur: Mini-Trans-Blot	BioRad, München

Netzgeräte:

PS 500 XT	Hoefler, Heidelberg
-----------	---------------------

3000 Xi	BioRad, München
---------	-----------------

Röntgenkassetten

DuPont, Bad Nauheim

SDS-Gelelektrophorese:

EC120 Mini-Vertikal Gel System	EC, New York, USA
--------------------------------	-------------------

Transilluminator: TFX-20M

MWG-Biotech, München

Video-Dokumentationssystem:

DocuGel V Scanalytics	MWG-Biotech, München
-----------------------	----------------------

2.1.3. Geräte zur Zellkultur

Inkubator: Cytoperm 8080

Heraeus, Karlsruhe

Mikroskop: Olympus IX 50

Olympus, Hamburg

Neubauer-Kammer

Schreck, Hofheim

Sterile Werkbank: Lamin Air HLB 2448

Heraeus, Karlsruhe

Stickstoff-Tank: 35 VHC

tec-Lab, Königstein

Zentrifuge: Labofuge GL

Heraeus, Karlsruhe

2.1.4. Analysegeräte und Auswertungsoftware

Abi-Prism 310 Genetic Analyzer

Perkin-Elmer, Langen

Bio-Imaging Analyzer BAS-1800

Fujifilm, Düsseldorf

Auswertungssoftware: AIDA 2.11	Raytest GmbH, Straubenhardt
--------------------------------	-----------------------------

Digitalkamera Colpix 900

Nikon, Düsseldorf

Durchflusszytometer (FACS Scan)

Becton Dickinson, Heidelberg

Auswertungssoftware:

Cell-Quest	BD Biosciences, Heidelberg
------------	----------------------------

ModFit LT 2.0	Verity Software House Inc., USA
---------------	---------------------------------

Liquidszintillationsspektrometrie

LBK Wallac, Finnland

Mikroplatten-Lesegerät:

Labsystems Multiskan RC (type 351)	Labsystems GmbH, München
------------------------------------	--------------------------

Auswertungssoftware:

Genesis-Lite PC Software	Life Sciences International
--------------------------	-----------------------------

Power macintosh G3	Apple, Kalifornien, USA
Spektralphotometer: Uvikon 860	Kontron, Eching
Schreib- und Graphikprogramme: Microsoft® Office	Microsoft® Corporation, WA, USA

2.1.5. Kühlgeräte

-80°C: UF 75-45 DS, E80	Colora Messtechnik, Lorch
-20°C, +4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Eismaschine: 50-35	Ziegra, Isernhagen

2.1.6. Sonstige Geräte

Kobalt-60- Teletherapiegerät	Philips, Hamburg
------------------------------	------------------

2.2. Chemikalien, Reaktionssysteme, Lösungen, Verbrauchsmaterial

2.2.1. Enzyme

AmpliTaq	Perkin Elmer, Langen
Taq-Polymerase	Quiagen, Hilden
Reverse Transkriptase Superscript	Gibco, Eggenstein
DNase-I (RNase-frei)	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNase A (Dnase-frei)	Boehringer Mannheim, Mannheim
RNasin Ribonuclease Inhibitor (28000 U/ml)	Promega, Madison, USA

2.2.2. Sequenzierung und RT- Polymerase-Kettenreaktion

CytoXpress™ Multiplex PCR	BioSource Europe, Belgien
DNA-Sequencing Kit	Perkin Elmer, Langen
dNTPs	Quiagen, Hilden
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
MgCl ₂ -Puffer 10x	Quiagen, Hilden

Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer Mannheim, Mannheim
Oligonukleotide	MWG-Biotech, München Metabion, Martinsried
Q-Puffer	Quiagen, Hilden

2.2.3. Elektrophorese

Agarose	Sigma, München
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad Laboratories, München
BioRad <i>DC</i> Protein Assay-Kit	BioRad Laboratories, München
CHAPS	Sigma, München
DNA Marker, 3	MBI Fermentas, Litauen
DTT	Sigma, München
Glycerol	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
6x Ladepuffer	MBI Fermentas, Litauen
Lambda Magermilchpulver	Difco, Detroit, USA
3MM Papier	Whatman, Madison, UK
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
PMSF	Fluka, Buchs, CH
Protein Marker, Broad Range	NEB, New England, USA
PUC Mix Marker, 8	MBI Fermentas, Litauen
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma, München
Tris-Base	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma, München
Trypan-Blau	Sigma, München

2.2.4. Sonstige Chemikalien, Reagentien, Kits

Chloroform	Mallinckrodt- Baker, USA
Cremophor EL	Sigma, München
DAPI	Sigma, München
ECL-detection Kit	Amersham, Braunschweig

EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Hahn AG, Seelze
Ficoll Paque separating solution (1,077 g/ml)	Amersham Biosciences, Freiburg
HCl	Merck, Darmstadt
Heringsperma-DNA	Boehringer Mannheim, Mannheim
Hoechst 33342	Sigma, München
Wasser (HPLC-Grade)	J. T. Baker, Deventer, NL
Human Apoptosis Set 2	Biosource, Nivelles, Belgien
Isopropanol	Sigma, München
MTT	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Biomol, Hamburg
Propidiumiodid	Sigma, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
Rekombinantes Protein-G	Sigma, München
RNA-Clean™-Systems	AGS-Chemie, Heidelberg

2.2.5. Zellkulturmedien und -reagentien

DMSO	Sigma, München
Fetales Kälberserum	PAA, Cölbe
Glutaminsäure	Gibco, Eggenstein
Medium (RPMI, DMEM/HAM F12)	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein

2.2.6. Verbrauchsmaterialien

ml-Pipetten (50ml, 25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	Roth GmbH, Karlsruhe
Einwegküvetten	Hellma, Mühlheim/Baden
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen und -schalen	Greiner, Frickenhausen
	Nunc, Wiesbaden
96-Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden

Kryoröhrchen Cryo Vials	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen (1000µl, 100µl, 20µl, 10µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 1250µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Kodak, New York State, USA
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner, Frickenhausen Falcon, Heidelberg

2.2.7. Arrays

Atlas™ Human Apoptosis Array	Clontech, Palo Alto, USA
Human Pathway Finder-1 GEArray Kit	Biomol, Hamburg

2.2.8. Radioaktive Substanzen

α[32P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig
α[32P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig

2.2.9. Wirkstoffe

Die Zytostatika wurden von der klinikinternen Zytostatikazubereitung in der angegebenen Konzentration bezogen.

Carboplatin, Konz: 12mg/1,2ml, MW 371,3	ribosepharm GmbH, München
Cisplatin (cis-dichlorodiammineplatinum II), MW 300, Konz: 0,5mg/ml	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten
Dacarbacin (Dacarbacin), MW182,2 Konz:10mg/ml	Medac GmbH, Hamburg
Doxorubicin, MW 580, Konz: 12mg/6ml	Cellpharm GmbH, Hannover
Etoposid, MW 588,6, Konz: 12mg/0,6ml	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten
5- Fluorouracil, MW 130,1, Konz: 2mg/0,24ml	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten
Irinotecan-hydrochlorid-Trihydrat ,MW 677	

Konz: 10mg/0,5ml	Aventis Pharma GmbH, Frankfurt
Paclitaxel (Taxol ^R), MW 853,9, Konz: 6mg/ml	Bristol Arzneimittel GmbH, München
Vinblastin, MW 909,1, Konz: 1mg/ml	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten
Vincristine, MW: 923, Konz: 1mg/ml	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten
Camptothecin	Sigma, München
5-Aza-2'-Deoxycytidine (DAC)	Sigma, München
Interferon α -2a, 3Mio.I.E. Fertiglösung	Hoffmann-LaRoche, Grenzach Whylen., CH
Octreoidacetat (Sandostatin ^R)	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg

2.2.10. Gebrauchslösungen

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die gängigen Stammlösungen nach Maniatis et al. (Maniatis et al. 1982) aus bidestilliertem Wasser sowie den üblichen Chemikalien in *p.A.* Qualität hergestellt.

2.2.11. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Primername	Primersequenz 5' > 3'	Fragmentgröße
p18 INK4c f:	AGT CGG ATC CAT GGC CGA GCC TTG GGG GAA C	507bp
p18 INK4c r:	AGT CGA ATT CTT ATT GAA GAT TTG TGG CTG C	
p21 ^{WAF1/CIP1} f:	AGT CGG ATC CAT GTC AGA ACC GGC TGG GG	496bp
p21 ^{WAF1/CIP1} r:	AGT CGA ATT CTT AGG GCT TCC TCT TGG AGA	
β -Aktin f:	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG	838bp
β -Aktin r:	CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC	
egr-1 f:	TTC GGA TCC TTT CCT CAC TC	605bp
egr-1 r:	TGT GGC TCA GGG AAA ATG TC	
PIG6 f:	GCC ATT AAG CTC ACA GCA CTG GG	480bp
PIG6 r:	CTG ATG GCC GGC TGG AAG TAG	
cdc 37 homolog f:	AGA TGC GCA AGA AGG AGA AG	598bp
cdc 37 homolog r:	TCA GGG AGG GAC TCG TAG AC	

FAST f:	TAC CTC TCC CTG CTG GAC AC	503bp
FAST r:	CTC TGG GAC TCC AGT TCC TC	
E2F-3 f:	ATC CTC ACC ACG AAC ACT TCC	461bp
E2F-3 r:	ACT TTT AGC ACT TCT GCT GCC	
FasL f:	TCT ACC AGC CAG ATG CAC AC	523bp
FasL r:	TGG AAA GAA TCC CAA AGT GC	
E2F-5 f:	AAG CGG CTG CTG ATA CTT TG	497bp
E2F-5 r:	AGG AAA AAC CAC GGG CTT AG	
p53 f:	CTG CAC CAG CAG CTC CTA C	298bp
p53 r:	CTC ACA ACC TCC GTC ATG TG	
IGF1 f:	TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG	324bp
IGF1 r:	GGT GGC ATG TCA CTC TTC AC	
CDC2 f:	CCC TCCT GGT CAG TAC ATG G	503bp
CDC2 r:	CCA AGC CAT TTT CAT CCA AG	
CDK5 f:	AAG GCA CCT ACG GAA CTG TG	513bp
CDK5 r:	TGG ACG TGG AGT ACA GCT TG	
TFDP-1 f:	CCC TTC ATC ATC GTC AAC ACC	437bp
TFDP-1 r:	TCG TTG AAG TCA TCG TCC TCC	
JNK3A2 f:	CAC AAG CTT CAT GAT GAC TCC	434bp
JNK3A2 r:	TGA TGT AGG GAT GCT GTA AGG	
GRB-IR / GRB10 f:	ACC AGC TGA ACA AAG GAG TCC	531bp
GRB-IR / GRB10 r:	ATG AGT TGA AAC GCC ACA TCC	
CD27BP f:	AGA AGA CCA AGC GAC TCC TGT TC	370bp
CD27BP r:	TCG TAC ATG TCA CTG CAG TCC-3'	
CASP9 f:	TGT TCA GGC CCC ATA TGA TCG AG	373bp
CASP9 r:	TCC ATG CTC AGG ATG TAA GCC	
gadd45 f:	GAA TTC TCG GCT GGA GAG C	605bp
gadd45 r:	CCC TTG GCA TCA GTT TCT G	

Zyklus D2 f:	AAC TCC ATC AAG CCT CAG GAG C	271bp
Zyklus D2 r:	TCC TCA TCC TGC TGG AGC CCA CA	
Zyklus D1 f:	ATG CCA ACC TCC TCA ACG ACC	211bp
Zyklus D1 r:	TCC AGG TAG TTC ATG GCC AGC	
Zyklus B f:	CCA TTA TTG ATC GGT TCA TGC AGA	584bp
Zyklus B r:	CTA GTG CAG AAT TCA GCT GTG GTA	
CDC25 Hs f:	GCG CTG CCA ACC GTG TCA GGG AAA	612bp
CDC25 Hs r:	TCT GCT CAG GGT TTC TGC AGT GTC	
Zyklus E f:	GCG GAT CCT GGG CAA ATA GAG AGG AAG TCT GG	597bp
Zyklus E r:	GGC TCG AGA AAT GAT ACA AGG CCG AAG C	
Zyklus A f:	AGA CCC TGC ATT TGG CTG TG	157bp
Zyklus A r:	ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG	
p27 KIP1f:	GAT CGG ATC CAT GTC AAA CGT GCG AGT GTC	597bp
p27 KIP1r:	GAT CGA ATT CTT ACG TTT GAC GTC TTC TGA G	
Zyklus D3 f:	GAT CCC TGC CTG TTC GCT GCC CGA GTA	923bp
Zyklus D3 r:	GAT CCA CTC CAG AGG GCC TCT CCA GG	
CDK 6 f:	GAG GTG GCG GTG CTG AGG CAC CTG	441bp
CDK 6 r:	GCA GCC AAC ACT CCA GAG ATC CAC	
CDK 4 f:	ACC CTG GTG TTT GAG CAT GT	255bp
CDK 4 r:	AAC CAC GGG TGT AAG TGC CA	
CDK 2 f:	GGA GTG GAT CCA TGG AGA ACT TCC AAA AG	900bp
CDK 2 r:	TTG AGA ATT CTA TCA GAG TCG AAG ATG GGG	
NEDD5 homolog f:	TTG AGT TCA CAC TGA TGG TGG	389bp
NEDD5 homolog r:	CAC ATC TAA GGG CTT AAG TCC	

Die Bezeichnung „f“ steht für forward und entspricht dem Sense-Primer, „r“ steht für reverse und bezeichnet den Antisense-Primer.

2.2.12. Antikörper

Human Fas (CD95/APO-1) Maus IgG1

monoklonaler Antikörper, Klon DX2	PharMingen, USA
Actin (I-19) , Schaf IgG polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
p27 (C-19), Maus IgG monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
p21 (C-19), Schaf IgG polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Zyklin E , Maus IgG monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Zyklin D1, Maus IgG monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Zyklin D3, Schaf IgG polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Zyklin B1, Maus IgG monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Maus IgG-HRP, Sekundärantikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Schaf IgG-HRP, Sekundärantikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA

2.3. Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung

Gentechnische Arbeiten wurden gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen erfolgte gemäß der Strahlenschutzverordnung. Der Umgang mit gesundheitsgefährdenden Substanzen erfolgte unter der Werkbank. Zum Schutz wurden grundsätzlich immer Einweghandschuhe und Laborkittel getragen. Radioaktiver Abfall sowie Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurden getrennt in entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Zelllinien und Kultivierung

PBS 1x: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 18 mM Na₂HPO₄,
1,47 mM KH₂PO₄

Für die Untersuchungen wurde die humane Zelllinie BON I, die aus einem neuroendokrinen Pankreastumor (Karzinoid) etabliert wurde (Evers et al., 1991, Kaku et

al., 1980), eingesetzt. Als Positivkontrolle für die RT-PCR-Versuche diente die, von einem primären humanen pankreatischen Adenokarzinom abstammende, metastastische Zelllinie Patu 8902 (Elsässer et al., 1993). Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (Lamin Air). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/HAM F12 im Verhältnis 1:1 mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS) und Penicillin-Streptomycin (1% w/v) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Begasung. Bei 70-90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA gelöst. Mit Wachstumsmedium wurden die Zellen durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt, gezählt (s. 2.4.5.) und in frischem Medium ausgesät.

2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach Trypsinbehandlung (s. 2.4.1.) in einem 15ml Zentrifugenröhrchen 5min bei 1200 U/min zentrifugiert, mit 1x PBS gewaschen, und anschließend das Zellpellet in 900µl Medium mit 100µl DMSO (10%) aufgenommen. DMSO verhindert intrazelluläre Kristallbildung. Nach Aliquotierung in 1ml Kryoröhrchen wurden die Zellen langsam auf -80°C abgekühlt (ca. 1°C/min) und im flüssigen Stickstoff (-196°C) gelagert. Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte zügig im 37°C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in einem mediumhaltigen 15ml Zentrifugenröhrchen 5min bei 1200U/min zentrifugiert, in 1x PBS gewaschen und das Zellpellet in frischen Medium resuspendiert und ausgesät.

2.4.3. Behandlung von Zellen mit Wirkstoffen

Zur Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Wirkstoffen (s. 2.2.9.) wurden je nach Inkubationsdauer 2,5-8 x 10⁵ Zellen auf Ø3,5cm Gewebekulturschalen in 1 ml Medium pro Schale oder 6,25 x 10³ Zellen pro Well auf 96-Mikrotiterplatten in jeweils 100 µl Medium (was etwa der Zellzahl/Fläche auf den Ø3,5cm Gewebekulturschalen bei 72-stündiger Inkubation entsprach) ausgesät und 24h zur Adhäsion kultiviert. Anschließend erfolgte nach Mediumwechsel die Behandlung und Inkubation mit den im Kulturmedium gelösten Wirkstoffen in ansteigender Konzentration über die angegebenen Zeiträume, während die Kontrollzellen nur einen Mediumwechsel ohne Stoffzugabe erfuhren.

Bei den DAC-behandelten Zellen erfolgte eine 72-stündige Inkubation unter täglich erneuter Zugabe von 1µM DAC in frischem Medium (insgesamt 3x) (Lubomierski et al., 2001). Danach wurden die behandelten und unbehandelten Zellen für Untersuchungen zur Überlebensrate (s. 2.4.7.), Zellzyklusregulation (s. 2.4.8.) und Induktion von Apoptose (s. 2.4.9.) eingesetzt. Es wurden jeweils die Mittelwerte von drei bis vier gleichartig durchgeführten Experimenten (+/- eine Standardabweichung) mit Microsoft[®] Excel graphisch dargestellt. Zudem wurde aus den mit Paclitaxel-behandelten und nichtbehandelten Zellen Gesamt-RNA zur weiteren Verwendung für cDNA-Array (s. 2.5.8.) und RT-PCR- Untersuchungen (s. 2.5.4.) isoliert.

2.4.4. Bestrahlung von Zellen (Kobalt –60- Teletherapiegerät)

Für die Versuche wurden jeweils ca. 2×10^5 Zellen auf Ø 3,5cm Gewebekulturschalen ausgesät und 24h kultiviert. Vor der Kobalt-60-Bestrahlung wurden die Zellen für 6h mit 0,1µM oder 0,01µM Paclitaxel in je 1ml frischen Medium behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, sowie nur mit Paclitaxel behandelte aber nicht bestrahlte Zellen. Nach 6-stündiger Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel. Danach wurden die Zellen mit einem Kobalt-60-Bestrahlungsgerät in einer ansteigenden Energiedosisreihe von jeweils 1Gy, 4Gy, 7Gy und 10Gy behandelt. Es handelt sich dabei um Gamma-Strahlung, die beim Zerfall des radioaktiven Isotops Kobalt 60 entsteht. Kobalt 60 hat eine Halbwertszeit von 5,3 Jahren und eine Gammaenergie von etwa 1,3 MeV. Die Bestrahlung erfolgte in einem Abstand der Proben zur Strahlenquelle von 80cm innerhalb einer Feldgröße von 30x30cm². Nach der Bestrahlung wurden die Zellen 72h bei 37°C kultiviert, geerntet und sowohl die Überlebensraten mittels Trypanblau-Färbung (s. 2.4.6.) bestimmt, als auch Zellzyklusuntersuchungen (s. 2.4.8.) durchgeführt. Es wurden jeweils die Mittelwerte von drei gleichartig durchgeführten Experimenten (+/- eine Standardabweichung) mit Microsoft[®] Excel graphisch dargestellt.

2.4.5. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzählung wurde nach dem Ablösen der Zellen (s. 2.4.1.) ca. 10 µl Aliquot der Zellsuspensionen entnommen und die Zellzahl in den 4 großen Eckquadraten der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (400x Vergrößerung) nach den

2.4.7. Vitalitäts- (Zytotoxizitäts-) bestimmung mittels MTT Assay

MTT-Lösung

0,833mg/ml MTT in 1x PBS

Zur Beurteilung der Zytotoxizität der zu untersuchenden Wirkstoffe (s. 2.2.9) in BON I Zellen wurde der MTT-Assay in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt.

Zur Bestimmung der für die Versuche einzusetzenden Zellzahlen wurde eine „Eichkurve“ aus dem Verhältnis zwischen zunehmender Zelldichte und Photoabsorption ermittelt. Die Zellzahl für die Zytotoxizitätsversuche wurde dann so gewählt, dass diese im linear ansteigenden Kurvenanteil lag und somit zur gemessenen Absorption annähernd proportional war. Außerdem sollte die Zellzahl mit der auf den Ø 3,5cm Gewebekulturschalen eingesetzten Zelldichte vergleichbar sein. Beides war bei einer Zelldichte von $6,25 \times 10^3$ Zellen pro Well gewährleistet.

Nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen (s. 2.4.3.), wurde jeweils 20µl MTT-Lösung pro Well hinzugegeben und 2,5h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der gelbe wasserlösliche Farbstoff MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) wird dabei durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase (Slater et al., 1963) der Zellen zu einem blau gefärbten, wasserunlöslichen Formazankristall reduziert, dessen Konzentration photometrisch gemessen werden kann und der Anzahl der vitalen Zellen proportional ist (Mosmann, 1983). Nach Absaugen des Mediums wurden die Formazan-Kristalle in 100µl DMSO pro Well gelöst und nach 30min die Absorption bei 540nm und der Referenzwellenlänge 620nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät mithilfe der Genesis-lite PC Software (Labsystems International) gemessen. Die Überlebensraten wurden als prozentualer Anteil der Extinktion der vitalen Zellen zu den unbehandelten Kontrollzellen mit Microsoft® Excel graphisch dargestellt. Der prozentuale Überlebensanteil berechnete sich folgendermaßen:

$$\% \text{ Überlebensrate} = \frac{\text{Extinktion (behandelte Zellen)}}{\text{Extinktion (unbehandelte Zellen)}} \times 100$$

Zum Ausschluß einer Beeinflussung der Formazankristallbildung durch das Medium oder durch die zugesetzten Zytostatika, wurde jeweils die Differenz der gemessenen

Extinktionen von be- und unbehandelten Zellen mit einem „Leerwert“ (Medium +/- Zytostatikum ohne Zellen) zur Berechnung der Überlebensraten in die Formel eingesetzt. Die Konzentration der jeweiligen Wirksubstanz, die die Nettozunahme der Zellzahl um 50 % reduzierte (IC₅₀) wurde graphisch bestimmt.

2.4.8. Zellzyklusanalysen

Färbe-Lösung 0,1% Triton X-100, 0.01% EDTA (1M),
2mg/10ml RNase A, 200µl Propidiumiodid
(Stock: 1mg/ml, 4⁰C, dunkel) auf 10ml PBS

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS für engl. Fluorescence Activated Cell Sorting) können durch Ermittlung des zellulären DNA-Gehaltes die Zellzyklusphasenanteile einer Zellpopulation bestimmt werden. Zellen im G₀/1-Stadium weisen den einfachen DNA-Gehalt auf, Zellen im G₂-Stadium den Doppelten und Zellen in der S-Phase werden dazwischen detektiert. Die Zellen werden dazu vorher mit bestimmten Farbstoffen, die sich zwischen den Basenpaaren der DNA einlagern, angefärbt. Der Farbstoff Propidiumiodid wird durch den Argon-Laser des Zytometers mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt und emittiert rotes Licht (630nm) (Krishan, 1975), wobei die Intensität zum DNA-Gehalt proportional ist. Anhand der Durchflusszytometrie können Zellen auch phänotypisch charakterisiert werden. Die einzelnen Zellen werden von einem fokussierten Laserstrahl detektiert und auf Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften überprüft. Zellgröße und Granularität werden über die Lichtstreuung erfasst: die Zellgröße über das Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FSC), die Granularität über das Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC). Die jeweiligen Histogramme wurden mit der Cell-Quest Software erstellt und die prozentuale Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte mit dem ModFit LT 2.0 Zellzyklusprogramm.

Blutlymphozyten wurden aus menschlichem Frischblut mittels Ficoll Gradient isoliert. Zwei Heparinblutröhrchen mit Eigenblut wurden in 50ml Greiner Röhrchen gefüllt und 1:1 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Blut wurde in mehrere 15ml Greiner Röhrchen, in welche jeweils 5ml Ficoll-Paque gefüllt worden war, zu gleichen Anteilen vorsichtig überschichtet. Nach 12 min. Zentrifugation bei 2800 U/min bildeten sich in den

Röhrchen 4 Schichten aus: oben Plasma, darunter Lymphozyten- und Thrombozytenschicht, darunter Ficoll-Paque und ganz unten Granulo- und Erythrozyten. Die Lymphozytenschichten wurden mit einer Pipette entnommen und zur Aufreinigung zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1400 und 1200 U/min, 12min). Danach wurden die aufgereinigten Lymphozyten in 5ml PBS mit 70% Ethanolzusatz fixiert und bei + 4°C gelagert. Für die Zellzyklusexperimente wurden die Proben je nach gewünschter Zelldichte mit PBS verdünnt und am Durchflußzytometer (FACScan) gemessen.

Für die Zellzyklusexperimente wurden die Zellen auf Ø3,5cm Gewebekulturschalen ausgesät und über einen Zeitraum von 5-72h mit spezifischen Substanzen inkubiert (s. 2.4.3.) Danach wurden die Zellen in je 400µl Trypsin-EDTA gelöst, und mit der gleichen Menge Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 15ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (5min, 1200U/min), das Pellet in 3ml gekühlten PBS resuspendiert und die Zellen auf 5×10^5 - 1×10^6 /ml verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen 2h in 5ml 70% Ethanol bei 4°C fixiert, zentrifugiert und das Ethanol verworfen. Nach einem Waschschrift in 3ml gekühlten PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in je 1ml Propidiumjodid-Färbelösung (siehe oben) resuspendiert. Da Propidiumjodid ein Farbstoff ist, der in doppelsträngige DNA und -RNA interkaliert, wurde vor der Messung des DNA-Gehaltes die in den Zellen enthaltene RNA durch die RNase in der Färbelösung degradiert. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurde der DNA-Gehalt am FACS bei 488nm innerhalb einer Stunde gemessen. Insgesamt wurden pro Ansatz 15.000 Zellen gemessen. Gemessene Zellverklumpungen wurden bei der Auswertung mit dem Programm ModFit 2.0 ausgespart und die jeweiligen Zellzyklusanteile der Zellpopulationen errechnet. Anschließend wurden jeweils die Mittelwerte von drei gleichartig durchgeführten Experimenten (+/- eine Standardabweichung) mit Microsoft® Excel graphisch dargestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte, gefärbte BON I Zellen. Als Standard wurden die extrahierten menschlichen Blutlymphozyten eingesetzt. Die Variationsbreite der Fluoreszenz (CV) im G0/1-Anteil der unbehandelten Tumorzellen lag unterhalb 8%, der CV des Blutlymphozytenstandards unter 4%. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der G2/M-Zellpopulation zur G1-Population als Maß für die Linearität der DNA-Färbung betrug bei allen Messungen zwischen 1,95 und 2,05 (Ormerod et al., 1998).

2.4.9. Apoptose-Analysen

Färbe-Lösung	6µl Hoechst 33342 (Stock: 13,3mM) 16,67µl Propidiumjodid (Stock: 1mg/ml) auf 2ml PBS
--------------	--

Mit dieser Färbung kann zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff Bisbenzimid (HO33342, Hoechst 33342) bindet an adenin –und thymidinreiche Sequenzen und färbt spezifisch DNA im Zellkern an. Er weist morphologische Veränderungen des Zellkerns während der Apoptose, wie Chromatinkondensation und Kernfragmentierung durch die bevorzugte Interkalation in die DNA direkt nach (Myc et al, 1992). Die DNA von lebenden und früh-apoptotischen Zellen wird ausschließlich mit Hoechst 33342 angefärbt, da dieses aufgrund seiner Lipophilie die intakte Zellmembran durchdringen kann. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 emittiert bei Anregung im UV-Bereich (340nm) blaues Licht mit einer Wellenlänge von etwa 450nm (Shapiro, 1981). Nekrotische und spät-apoptotische Zellen werden zusätzlich mit Propidiumjodid (PI) angefärbt (roter Fluoreszenzfarbstoff), da deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Das Absorptionsmaximum dieses Stoffes liegt bei 535nm, das Emissionsmaximum bei 617nm (Arndt-Jovin und Jovin, 1989).

Für die Untersuchungen wurden die Zellen auf Ø 3,5cm Gewebekulturschalen angesetzt und 5h bis 72h mit verschiedenen Substanzkonzentrationen (s. 2.4.3) inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das überstehende Medium wurde bewahrt, die Zellen mit je 400µl Trypsin-EDTA gelöst und mit der gleichen Menge an Medium suspendiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, 1200 U/min) und das Pellet in 2ml gekühltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen je nach Dichte mit 20-100µl Färbe-Lösung (siehe oben) 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen können noch ein bis zwei Stunden lichtgeschützt bei 4°C aufgehoben werden. Nach Auftragen der Zellsuspension auf einen Objektträger wurde der jeweilige unversehrte, apoptotische und nekrotische Zellanteil mit einem Hämazytometer unter dem Fluoreszenzmikroskop (DAPI Fluoreszenz-Filter, Exzitation 340–380 nm, Emission 430 nm; Rhodamin Filter, Exzitation 530–560 nm, Emission 580 nm) mit 400-facher Vergrößerung nach

morphologischen Kriterien analog Lee und Shacter, 1997 (s. 3.3.1.) ausgezählt und mit einer Digitalkamera fotografiert. Um den prozentualen Anteil der verschiedenen Zellanteile zu bestimmen, wurden je Ansatz mindestens 400 Zellen gezählt. Es wurden jeweils die Mittelwerte der lebenden-, apoptotischen- und nekrotischen-Zellpopulationen von jeweils drei gleichartig durchgeführten Experimenten (+/- eine Standardabweichung) mit Microsoft® Excel graphisch dargestellt.

2.5. Molekulargenetische Methoden

Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.5.1 RNA Isolation und photometrische Quantifizierung

TE-Puffer	10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), sterilfiltrieren
Natriumacetat	3M; pH 5,4

Die Gesamt-RNA Isolation erfolgte zur Durchführung von cDNA-Array Analysen und semiquantitativer RT (Reverse-Transkriptase) -PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Bestätigung von Expressionsunterschieden. Die RNA wurde mit Hilfe des RNA-Clean™-Systems, das Guanidium Thiocyanat und Phenol enthält, nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Nach Waschen der Zellen wurde jeweils 4ml RNA-Clean™ zu Ø17,5 cm Gewebekulturschalen zugegeben, die Zellen in 15ml Zentrifugengefäße überführt und mit 1/10 des Gesamtvolumens mit Chloroform gemischt. Nach 15min Inkubationszeit auf Eis erfolgte die Zentrifugation (4°C, 5000U/min, 15min) zur Phasentrennung. Die RNA-enthaltende obere wässrige Phase wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gut gemischt. Nach Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in 200µl DNase-I-Puffer gelöst. Die zueinander gehörenden Aliquots wurden in je einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt. Zur Beseitigung von genomischer DNA wurden die Proben mit jeweils 20U DNase-I 30min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und nach erneuter Zentrifugation (14000U/min, 4°C, 10min) befand sich die RNA in der

oberen wässrigen Phase. Zur weiteren Reinigung und Präzipitation der RNA wurde die Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und der 3-fachen Menge 100%igen Ethanols versetzt und anschließend bei -80°C mindestens 2h inkubiert. Die RNA wurde pelletiert (4°C , 30min, 14000U/min) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einem erneutem Zentrifugationsschritt (15min, 4°C , 14000U/min) und Entfernen des Alkohols folgte die Trocknung des Pellets bei 37°C und Aufnahme in 400 μl TE-Puffer.

Die Konzentration und Reinheit der RNA-Lösung wurde durch Lichtabsorption von gelöster RNA photometrisch mittels UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm beziehungsweise 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\text{OD}_{260} \times 40 \times 1/\text{Verdünnung} = \text{RNA-Konzentration} (\mu\text{g}/\text{ml})$). Die Bestimmung der Reinheit der isolierten RNA errechnet sich aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, der bei 1,8 bis 2,0 liegen sollte. Desweiteren wurden 1 μl der extrahierten RNA mit 1 μl 6x Ladepuffer (s. 2.5.5) und 10 μl Aqua dest. in einem 1%igen Agarose-Gel in 50ml 0,5xTBE-Puffer (s. 2.5.5.) nach Zusatz von 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid bei 80V aufgetrennt. Proben, die degradierte ribosomale RNA anzeigten, wurden verworfen.

2.5.2. cDNA Synthese durch Reverse Transkription

Für die Erststrang-cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase wurde intakte Gesamt-RNA aus be- und unbehandelten BON I Zellen mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis-Kit“ nach Empfehlung des Herstellers in „komplementäre“ DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden 5 μg Gesamt-RNA in ein Endvolumen von 20 μl gegeben und 10min auf 70°C erhitzt. Nach anschließender Kühlung auf Eis für 1min und Zugabe von reverser Transkriptase sowie Oligo-dT-(18)-Primer wurde 1h bei 37°C inkubiert. Der Oligo-dT-(18)-Primer bindet an die Poly-A-Sequenzen der mRNA und bietet so der reversen Transkriptase einen Ansatzpunkt für die cDNA-Synthese. Die Synthese wurde durch Erhitzung auf 70°C beendet. Nach Kühlung auf Eis für 1min erfolgte ein Verdau verbliebener transfer- und ribosomaler-RNA durch Zugabe von 8 μg RNase A und Inkubation für 20min bei 55°C an. Die erhaltene cDNA wurde direkt für eine nachfolgende PCR verwendet oder für einen späteren Einsatz bei -20°C gelagert.

2.5.3. Semiquantitative RT-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann dem Nachweis bekannter DNA-Abschnitte dienen. Ihr zugrunde liegt das Prinzip, einzelsträngige DNA als Vorlage für die Synthese eines komplementären Stranges zu gebrauchen und diesen ebenfalls wieder als Vorlage zur Herstellung einer Kopie des ersten Einzelstranges einzusetzen. Dies gelingt in zyklisch ablaufenden Synthese-Schritten unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase, freien Desoxynukleotiden und Oligonukleotiden mit genspezifischer Sequenz (Primer). Bei einem 25µl-Reaktionsansatz erfolgte neben 1-3µl cDNA der be- oder unbehandelten Zellen die Zugabe von 5 µl Q-Puffer, 5 µl 10-fach MgCl₂ Puffer, 2,5 µl dNTPs (2mM), 1 µl forward und reverse Primer (10pmol/µl) sowie 0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl). Es wurden folgende Temperaturen und Zyklenzahlen eingesetzt: zur initialen Denaturierung 95°C 5min, anschließend 30 Zyklen mit 95°C 1min (Denaturierung), 60°C 1 min (Anlagerung) und 72°C 1 min (Synthese), sowie eine 10 minütige Pause bei 72°C zur Beendigung unvollständiger Synthesen. Die Zyklenzahl und Anlagerungstemperatur wurden für die Primerpaare und verwendete cDNA optimiert. Pro PCR-Ansatz erfolgte eine Negativ-Kontrolle mit Aqua-dest. anstelle von cDNA. Zudem wurden die PCR-Amplifikate nach der Agarose-Gelelektrophorese eluiert und sequenziert (s. 2.5.5. – 2.5.7.). Die Expressionsunterschiede der untersuchten Gene (s. Tabelle 2.5.1.) wurden aufgrund der Bandenintensitäten auf den Agarosegelen im Vergleich zum β-Aktin-Standard semiquantitativ ermittelt.

Tab. 2.5.1. Spezifikationen und PCR-Bedingungen der untersuchten Genprodukte

Genname	Genbank- Accession	Fragmentgröße (Basenpaare)	Primeranlagerungs- temperatur (°C)	Zyklenanzahl
Zyklin A	X 51688	157	59	33
Zyklin B	M 25753	584	59	33
Zyklin D1	M 64349	211	62	30
Zyklin D2	X 68452	271	59	30
Zyklin D3	M 90814	923	62	30
Zyklin E	M 73812	597	59	33
CDK2	X 62071	900	56	33
CDK4	U 79269	255	56	33
CDK6	NM_001259	441	56	33
p18 ^{INK4c}	U 17074	507	56	33

p21 ^{WAF1/CIP1}	S 67388	496	58	33
p27 ^{KIP1}	U 10906	597	58	33
p53	AF 136270	298	55	30
CDC25 Hs	M 34065	612	56	33

2.5.4. Multiplex PCR

Die Anwendung des CytoXpress Multiplex PCR-Kit („Human Apoptosis Set 2“) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die PCR-Ansätze setzten sich jeweils zusammen aus 5 µl cDNA bzw. 10x Kontroll cDNA (Kit), 30,5 µl Aqua dest., 5 µl 10x hAPO2G MPCR Puffer, 5 µl 10x hAPO2 MPCR Primer, 4 µl dNTPs, (3,12mM) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl). In Tabelle 2.5.2. sind die Genprodukte mit den PCR-Bedingungen angegeben. Der Ablauf der PCRs umfasste jeweils 1 Zyklus bei 96°C über 1 min (initiale Denaturierung); 2 Zyklen bei 96°C über 1min und 55-60°C über 4min (Denaturierung, Anlagerung, Synthese); 28-33 Zyklen bei 94°C über 1min und 55-60°C über 2,5min (Denaturierung, Anlagerung, Synthese) und 10min Pause bei 70°C (Beendigung unvollständiger Synthesen). Als Kontrolle diente die Amplifikation des „Housekeeping genes“ Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Anhand der Unterschiede in der Bandenstärke der untersuchten Genprodukte im Vergleich zu GAPDH konnten die über- und unterexprimierten Gene zwischen be- und unbehandelten BON I Zellen ermittelt werden. Weiterhin wurden bei jedem Versuchsansatz eine Negativ-Kontrolle und zusätzlich eine im Kit enthaltene Positiv-cDNA-Kontrolle mitgeführt.

Tab. 2.5.2. Spezifikationen und Multiplex-PCR-Bedingungen

Genname	Genbank-Accession	Fragmentgröße (Basenpaare)	Primeranlagerungstemperatur (°C)	Zyklusanzahl
Human LICE/Caspase-3	U 13737	318	58	30
Human Bcl-2	M 13995	235	58	30
Human Bax	L 22473	270	58	30
Human Bcl-xS	Z 23116	183	58	30
Human Bcl-xL	Z 23115	371	58	30
Human GAPDH	M 33197	500	58	30

2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

TBE (1X)	90 nM Tris/Cl pH 8,3; 90 nM Borsäure, 2,5 mM EDTA
6x Ladepuffer	0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylen-cyanol, 60% Glycerin/60mM EDTA

Die Auftrennung von PCR-Produkten (RNA) erfolgte in 1-2%igen Agarose-Gelen (0,5xTBE-Puffer, 0,2µg/ml Ethidiumbromid) bei 80-120V. Zum Anfärben und Erhöhen des spezifischen Gewichtes der Proben erfolgte die Zugabe von 2µl 6x Ladepuffer zu 10µl PCR-Produkt. Als Größenstandard diente 1µl einer 1kB-DNA-Leiter (PUC Mix Marker, 8). Unter UV-Licht wurden die DNA-Amplifikate durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar gemacht, fotografiert und zur Bestätigung eluiert und sequenziert (s. 2.5.6. und 2.5.7.).

2.5.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Agarosegel-Elution wurde der „QIAquick Gel Extraction Kit“ verwendet. Nach Ausschneiden des Amplifikates aus dem Agarosegel und Zugabe eines 3-fachen Volumens des Gelgewichtes an QG-Puffer wurde das Gel durch Erwärmung (50°C, 10min) im Puffer gelöst und die Flüssigkeit nach Hinzugabe eines gleichen Volumens Isopropanol in die Zentrifugationssäulchen geladen. Es folgten drei Zentrifugationen (13000 U/min, 1min), unterbrochen durch Entnahme des Durchflusses und Zugabe von 0,5ml QG-Puffer, bzw. 0,75ml PE-Puffer. Eine weitere Zentrifugation führte zur Trocknung des Eluates im Säulenfilter. Nach Zugabe von 50µl Aqua dest. und 1min Inkubation erfolgte die Entnahme der DNA durch Wechsel des Auffangröhrchens mit einem 1,5ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation (13000U/min, 1min). Die eluierte DNA wurde bis zur Sequenzanalyse bei -20°C gelagert.

2.5.7. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung erfolgte zur Kontrolle der Identität der PCR-Amplifikate (s. Tabelle 2.5.1.). mithilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer) nach vorausgegangener Sequenzierungsreaktion (Kit Perkin

Elmer). Hierzu erfolgte ein 20µl Reaktionsansatz durch Gabe von 50-100ng des amplifizierten Template aus der PCR, 1µl forward oder reverse Primer (10pmol/µl), 4µl Pre-Mix (enthält fluoreszenzmarkierte Nukleotide sowie Reaktionshilfsstoffe) in ein 0,5ml Reaktionsgefäß. Anschließend wurde der Ansatz mit Aqua dest. auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Menge des für die Sequenzierungsreaktion eingesetzten eluierten Templates konnte durch den Vergleich der Bandenstärken der auf den Agarosegelen (s. 2.5.5.) aufgetrennten PCR-Produkte mit der Bandenstärke eines Größenstandards abgeschätzt werden (DNA-Leiter aus insgesamt 5216 Basenpaaren, Konzentration von 500ng/µl). Es erfolgte die 25 Zyklen dauernde Reaktion im Thermal-Cycler, bei der ein Zyklus aus 96°C für 10s, der primerspezifischen Anlagerungstemperatur für 5s und der Elongation bei 60°C für 4min bestand. Anschließend erfolgte die Fällung durch Gabe von 80µl Aqua dest., 10µl 3M Natriumacetat (pH 4,6) und 250µl 100%iges Ethanol zum Reaktionsgemisch, das nach vorsichtigem Mischen mit Hilfe der Pipette bei Raumtemperatur zentrifugiert (15000U/min, 15min) wurde. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation (15000U/min, 5min). Nach Entfernung des Überstandes folgte die Trocknung des Pellets im Heizblock (50°C, 5min) sowie ein kurzer Denaturierungsschritt durch Gabe von 20µl Template Suppression Reagent (TSR) und Erhitzung (90°C, 2min). Nach kurzer Lagerung auf Eis wurde die Probe im Sequenziergerät ausgewertet.

2.5.8. cDNA Array-Analysen

2.5.8.1. Prinzip

Die Genexpressionsanalysen dienten dazu, die Expression von zellzyklus- und apoptoseregulierenden Genen unter Paclitaxel –und DAC-Behandlung in der neuroendokrinen BON I Zelllinie näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde der „Atlas Human Apoptosis Array“ von Clontech und der „Human Pathway Finder-1 GEArray Kits“ von Biomol nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

Anders als bei der RT-PCR ist es mit dieser Methode möglich, eine Vielzahl von Genen gleichzeitig zu analysieren. Die Arrays bestehen aus einer großen Anzahl von cDNAs derjenigen Genprodukte, deren Expressionsprofil man untersuchen möchte. Die cDNA-Proben sind jeweils doppelt in der gleichen Konzentration nebeneinander auf einer

positiv geladenen Nylon-Membran angeordnet und ihre Länge beträgt beim Atlas-Array zwischen 200 und 600 Basenpaare. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden sind nur Amplifikate von solchen mRNA-Regionen ausgewählt, die keinen Poly-A-Schwanz, repetitive Strukturen oder hochgradige Homologien aufweisen. Zusätzlich sind auf jeder Membran Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativ-Kontrollen sowie cDNAs einiger „House-keeping“-Gene (s. 3.5.) als interner Standard enthalten. Die cDNA-Array Technik beruht auf dem Prinzip, daß die isolierte RNA aus den zu untersuchenden be- und unbehandelten Zellen mit Hilfe des genspezifischen Primer-Mix aus dem Kit in einem ersten Schritt durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wird. Der besondere Primer-Mix sorgt dafür, daß nur cDNA von denjenigen Genen synthetisiert werden kann, die sich auch auf der Nylonmembran befinden. Dadurch erhöht sich die Sensitivität des Verfahrens, da unspezifische cDNA-Synthesen vermieden werden. Die Menge der synthetisierten cDNA hängt davon ab, wieviele mRNA-Kopien der jeweiligen Genprodukte sich in den Zellen befanden. Während der Synthese werden gleichzeitig die cDNA-Fragmente durch die im Reaktionsansatz hinzugegebenen ³²P-markierten dNTPs radioaktiv markiert. In einem zweiten Schritt wird die so hergestellte cDNA mit der Nylonmembran des Kits hybridisiert. Die cDNA-Proben aus den be- und unbehandelten Zellen werden dabei getrennt auf zwei identische Nylonmembranen unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. Dabei lagern sich die synthetisierten, radioaktiv markierten cDNA-Stränge komplementär an die cDNA-Proben auf der Nylon-Membran an und markieren sie somit je nach dem Gen-Expressionsprofil, welches intrazellulär vorgeherrscht hat, unterschiedlich stark. Nach einem Waschschrift können somit Unterschiede in der Genexpression zwischen be- und unbehandelten Zellen nach Abgleich mit den „House keeping“-Genen semiquantitativ ermittelt werden. Die Aktivität des Hybridisierungsmusters kann mit Hilfe von Röntgenfilmen oder einem Phosphorimager gemessen werden und das Genexpressionsprofil anschließend mit einer speziellen Software ausgewertet werden.

Mit der cDNA-Hybridisierungstechnik gelingt es, mRNA in einer Menge von 10-20 Kopien pro Zelle nachzuweisen; entsprechend ca. 0,0025% der Gesamtpopulation. Im Folgenden sind die wesentlichen Schritte der cDNA-Array Analyse dargestellt.

2.5.8.2. cDNA-Synthese, radioaktive Markierung und Aufreinigung

Labeling Mix:	5x Reaction Buffer	2 μ l
	10x dNTP Mix	1 μ l
	$[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)	3,5 μ l
	DTT (100mM)	0,5 μ l

In einem ersten Schritt wurden aus der zuvor isolierten Gesamt-RNA (s. 2.5.1.) radioaktiv markierte cDNA-Proben der zu untersuchenden Gene durch reverse Transkription und radioaktive Markierung mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP (Clontech's Atlas Human Apoptosis Array) oder $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP (Human Pathway Finder-1 GEArray Kit) hergestellt. Beim Atlas-Array wurden dazu pro untersuchter RNA-Probe der sog. „Labeling-Mix“ (siehe oben) bei Raumtemperatur in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde in einem zweiten 1,5ml Reaktionsgefäß, pro untersuchter RNA-Probe, 2-5 μ g isolierte RNA mit 1 μ l 10x CDS Primer Mix versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 3 μ l mit Aqua dest. angefüllt. Dieser Ansatz wurde im Heizblock bei 70°C für 2min erhitzt und anschließend für weitere 2min bei 48°C gehalten. Währenddessen wurde 1 μ l MMLV Reverse Transkriptase zum Labeling Mix pipettiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit der RNA wurden 8 μ l des Labeling Mix zu jeder RNA-Probe hinzugegeben, gemischt, und für weitere 25min bei 48°C inkubiert. Anschließend wurde die Synthesereaktion durch Hinzufügen von 1 μ l 10x Termination Mix je Ansatz beendet.

Als nächster Schritt erfolgte die Aufreinigung der synthetisierten und radioaktiv markierten cDNA von nichtinkorporierter Aktivität und kleinen (< 0,1 kB) cDNA-Fragmenten durch Chromatographie-Säulchen. Die Säulchen enthalten eine Gelmatrix, durch die die aufgetragene cDNA-Probe der Schwerkraft nach hindurchfließt und dabei aufgereinigt wird. Die gereinigte Probe wird in 1,5ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Insgesamt wurden nach dem Auftragen der Probe jeweils 6 Fraktionen durch wiederholte Zugabe von 100 μ l Aqua dest. in 6 verschiedenen 1,5ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bei -20°C zwischengelagert. Zur Feststellung, in welcher Fraktion sich die aufgereinigte Probe befand, wurde die Radioaktivität in allen 6 Fraktionen, nach Zugabe von jeweils 2 μ l der Fraktionen in entsprechende Szintillationsgefäße mit jeweils 5ml Szintillationsflüssigkeit, im ^{32}P Kanal des Szintillationszählers bestimmt. Nach

Erstellung des Aktivitätsprofils befanden sich die gereinigten und markierten Proben im ersten Aktivitätsanstieg (Peak), welcher größtenteils in der 2. bis 3. Fraktion mit einer Gesamtaktivität von ca. $1,1-1,3 \times 10^6$ cpm lag. Somit wurden die 2. und 3. Fraktion gepoolt und für die Hybridisierungsreaktion weiterverwendet. Für den Human Pathway Finder-1 GEArray wurde der komplette Ansatz für die Hybridisierungsreaktion verwendet.

2.5.8.3. Membranhybridisierung

2x Neutralisierungslösung	27,6g NaH ₂ PO ₄ auf 200 ml H ₂ O; pH 7
10x Denaturierungslösung	1M NaOH, 10 mM EDTA

Die Array-Membranen wurden mit hitzedenaturierter Heringssperma-DNA prähybridisiert zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Dazu wurde pro Membran 0,5mg Heringssperma-DNA bei 95-100°C für 5min denaturiert, kurz auf Eis gelagert, und anschließend in 5ml vorgewärmte (68°C) ExpressHyb-Lösung gegeben. Nach 2 minütiger Inkubation in 200ml und 80-90°C warmer 0,5%iger SDS-Lösung wurde jede Membran in einen Hybridisierungszylinder transferiert und der Zylinder mit Aqua dest. gefüllt, so dass sich die Membranen luftblasenfrei an die Glasinnenwände anlagerten. Anschließend wurden jeweils 5ml der zuvor vorbereiteten Heringssperma-Lösung in die Hybridisierungszylinder gegeben und die Membranen im Hybridisierungsofen unter ständiger Rotation (ca. 10U/min) präinkubiert (68°C, 30min). Zwischenzeitlich wurde für die Hybridisierung etwa 200µl der jeweiligen markierten und aufgereinigten cDNA-Proben (s.o.) zu 1/10 des Gesamtvolumens mit 10x Denaturierungslösung (siehe oben) versetzt und 20min bei 68°C inkubiert. Die denaturierten Proben wurden zur Hälfte des Gesamtvolumens mit 2x Neutralisierungslösung (siehe oben) gemischt und 5µl der im Kit enthaltenen C0t-1 DNA hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation (10 min, 68°C) wurde diese Lösung direkt nach der Präinkubation in die Hybridisierungszylinder zu den Membranen und Präinkubationslösung hinzugegeben und über Nacht unter ständiger Rotation der Zylinder bei 68°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen unter kontinuierlicher Rotation 3x 30min mit 200ml Waschlösung-1 (2xSSC, 1% SDS) und 1x30min mit 200ml Waschlösung-2 (0,1xSSC, 0,5% SDS) bei 68°C gewaschen.

Danach erfolgte ein letzter Waschschrift mit 200ml 2xSSC (s. 2.6.3.) über 5 min bei Raumtemperatur.

2.5.8.4. Auswertung und Wiederverwertung

Die Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und auf Röntgenfilmen bei -80°C über einen Zeitraum von 24-120h (Clontech's Atlas Human Apoptosis Array) oder 18-72h (Human Pathway Finder-1 GEArray) exponiert. Zudem erfolgte die Aktivitätsmessung der radioaktiv markierten hybridisierten cDNA-Proben auf dem Atlas Array mit einem Phosphorimager über 24h und computergestützte Analyse der Expressionsdaten. Die Auswertung des Genexpressionsprofils erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware AIDA 2.11 (Raytest). Dabei diente das Verhältnis (± 2 Standardabweichungen) der Hybridisierungsintensitäten der „House-keeping“- Gene von be- und unbehandelten Zellen als Standard, an dem die übrigen Intensitäten der hybridisierten cDNA-Proben zur Bestimmung von über- und unterexprimierten Genen abgeglichen wurden. Alle Gene, deren Quotient aus den Expressionsstärken (Aktivitäten) von be- und unbehandelten Zellen mehr oder weniger als 2 Standardabweichungen von dem der Housekeeping-Gene nach oben oder nach unten abwich, wurden als signifikant hoch-, bzw. herunterreguliert beurteilt. Somit konnten über- und unterexprimierte Gene semiquantitativ ermittelt und in Excel graphisch dargestellt werden. Nach den Versuchen wurden die Membranen durch 10 min Inkubation in kochender 0,5% SDS-Lösung und anschließend kurzem Waschen (2x SSC, 1% SDS) von den hybridisierten cDNA-Proben befreit. Die so „gestrippten“ Membranen wurden daraufhin bei -20°C aufbewahrt.

2.6. Proteinchemische Methoden

2.6.1. Proteinextraktion aus Zellen

CHAPS-Lysis-Puffer (frisch anzusetzen) 0,5% CHAPS, 10 nM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0,1 mM Benzamidin, 5 mM Mercaptoethanol, 10% Glycerol, PMSF (1mM)

Nach Behandlung der Zellen mit Paclitaxel oder mit Cremophor EL (Lösungsmittel für Paclitaxel) über einen Zeitraum von 24 und 48h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 4ml eiskaltem PBS gewaschen und 1893,73 μ l CHAPS-Lysis-Puffer mit 6,27 μ l PMSF (Endkonzentration 1mM) pro \emptyset 3,5cm Gewebekulturschale hinzugegeben. Die Schalen wurden auf Eis 10min inkubiert, die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig vom Untergrund abgelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Der proteinhaltige Überstand wurde nach Zentrifugation (4°C, 14000U/min, 20min) in ein 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.6.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteinextrakte wurde photometrisch mit dem BioRad *DC* Protein Assay-Kit nach Anweisung des Herstellers bestimmt. In 1,5ml Reaktionsgefäßen wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe einer Standardproteinlösung (BSA, Rinderserumalbumin) (1-8 μ g) inklusive eines Nullwertes angefertigt. Das Gesamtvolumen des BSA in Wasser betrug 200 μ l. Von den zu messenden Proteinextrakten wurden 1 und 2 μ l mit Aqua dest. auf 200 μ l Gesamtvolumen verdünnt. Anschließend wurde in jedes Gefäß der BSA-Konzentrationsreihe und des Proteinextrates 100 μ l der Lösung A' bestehend aus 1000 μ l Lösung A und 20 μ l Lösung S des BioRad Kits, hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurden 800 μ l der Lösung B auf jeden Probenansatz gegeben, gevortext und 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Kalibrierung des Nullwertes wurden die Absorptionen der Standardproteinreihe bei einer Wellenlänge von 750nm in einer 0,5mm Einwegküvette im Photometer gemessen, dann die Absorptionen der Proteinextrakte. Anhand der BSA-Standardmessung wurden die Konzentrationen der Proteinextrakte aus den Zellen indirekt bestimmt.

2.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Acrylamidlösung	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS, pH 8,8

Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS, pH 6,8
Trenngel 12%	2 ml Trenngelpuffer, 1,8 ml Glycerol, 1 ml Aqua bidest, 3,2 ml Acrylamidlösung, 25 µl 10% APS, 12,5 µl TEMED
Trenngel 14%	2 ml Trenngelpuffer, 1,8 ml Glycerol, 0,45 ml Aqua bidest, 3,75 ml Acrylamidlösung, 25 µl 10% APS, 12,5 µl TEMED
Sammelgel	2,5 ml Sammelgelpuffer, 5,9 ml Aqua bidest, 1,6 ml Acrylamidlösung, 60 µl 10% APS, 20 µl TEMED
10 x Laufpuffer	0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1% SDS, pH 8
4x SDS Probenpuffer	2 g Tris-HCl, 4 g SDS, 30 ml H ₂ O, 25 mg Bromphenolblau ad 50 ml mit Glycerol; pH 6,8 (vor SDS Zugabe)
20x SSC	175,4g NaCl, 88,2g Na ₃ -Zitrat · 2H ₂ O, auf 1000 ml H ₂ O; pH 7
20% (w/v) SDS	200g SDS auf 1000 ml H ₂ O
10% (w/v) APS	Ammoniumpersulfat in Aqua bidest

Eine Auftrennung zu untersuchender Proteine nach ihrer Größe erfolgte per SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dem Logarithmus ihrer Masse direkt proportional. Je nach dem erwarteten Molekulargewicht wurden 12%ige oder für kleinere Proteine auch 14%ige Trenngele angewandt. Das Trenngel wurde bis ca. 1,0 cm unter den oberen Rand der Glasplatten der Mini-Gelapparatur gegossen und mit A. bidest überschichtet, um den Kontakt mit Luftsauerstoff zu unterbinden und eine ebene Geloberfläche zu schaffen. Nach der Polymerisation wurde das Wasser dekantiert und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Nach Aushärtung wurden jeweils identische Mengen Proteinextrakt (50-100µg) von Paclitaxel- be- oder unbehandelten Zellen mit

4x SDS Probenpuffer verdünnt und bei 95-100°C für 10min denaturiert. Zusätzlich wurde ein denaturierter Protein-Molekulargewichts-Marker aufgetragen. Durch das diskontinuierliche Gelsystem aus Sammelgel (Fokussierung der Probe) und Trenngel (Auftrennung nach Molekulargewicht) wurden die Proteine nach Befüllen der gewaschenen Geltaschen in 1x Laufpuffer bei 120V für 1,5h oder bei 20V über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt.

2.6.4. Westernblot-Analyse

Verwendete Lösungen:

Transfer-Puffer 100 ml Laufpuffer, 200 ml Methanol, 700 ml H₂O

10 x TBS-Puffer 24,2 g/l Tris-Base, 80 g/l NaCl, pH 7,6 in dest. H₂O

1 x TBS-Tween-Puffer 100 ml 10 x TBS, 900 ml H₂O, 200 µl Tween

Die im Trenngel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran mit einem Elektroblood in einer Transferkammer mit Transferpuffer über 1h bei 300mA oder über Nacht bei 50mA übertragen. Nach Ende wurden die Membranen in Blocking-Puffer (TBS-Tween mit 5% Magermilchpulver) mindestens 2h bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt, um unspezifische Bindung zu vermeiden. Es folgte der immunologische Nachweis der Proteine auf Nitrocellulose durch Chemolumineszenz. Die Antikörper wurden in Blocking-Puffer verdünnt. Die Primärantikörper (s. 2.2.12.) gegen Zyklin B1, Zyklin D1, p27, Zyklin D3, p21 und β -Aktin wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, der Anti-Zyklin E 1: 500 verdünnt. Der Zweitantikörper (s. 2.2.12.) Anti-Maus wurde 1: 1000 und Anti-Schaf 1: 3000 verdünnt eingesetzt. Der für das zu untersuchende Protein spezifische Primärantikörper wurde entweder 1h bei RT oder über Nacht mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 6x 30 min mit je 10ml TBS-Tween bei RT gewaschen und der mit dem Enzym HRP (engl.: „horseradish peroxidase“) gekoppelte Zweitantikörper für 1h hinzugegeben. Abschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen in TBS-Tween (6 x 5min) entfernt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Anschluss mit Hilfe des „ECL-detection Kit“ (ECL: enhanced chemiluminescence) gemäß den Angaben des Herstellers. Das an den Zweitantikörper

gekoppelte Enzym HRP regt dabei das in der ECL-Lösung vorhandenen Substrat (Luminol) an, in dessen Folge Chemolumineszenz auftritt und das emittierte Licht einen Röntgenfilm an dieser Stelle schwärzt. Abhängig von der Stärke der Chemolumineszenz wurden die Röntgenfilme 0,5 - 20min exponiert. Die Standardisierung und Quantifizierung erfolgte mit Aktin-Antikörper.

3. Ergebnisse

3.1. *In vitro* Untersuchungen zur Proliferationskinetik und Chemosensitivität der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I

Die Untersuchungen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit hatten das Ziel, Aufschluss über die Chemosensitivität der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I *in vitro* gegenüber antineoplastischen Substanzen zu erhalten

3.1.1. Untersuchungen zur Proliferationskinetik von BON I Zellen und Vergleich von Testmethoden zur Bestimmung von Überlebensraten

Zunächst wurde die Proliferationskinetik natürlich wachsender BON I Zellen untersucht. Dazu wurde das Zellwachstum anhand des Trypan-Blau-Tests in der Neubauer-Zählkammer (s. 2.4.5. und 2.4.6.) bestimmt. Die ausplattierte Zellzahl wurde so bestimmt, dass auch nach 72h die Zellen nicht vollständig konfluierend waren, um Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition zu vermeiden. Unbehandelte BON I Zellen zeigten ein fast exponentielles Zellwachstum, wobei die Zellverdopplungszeit bei weniger als 24h lag und die Ausgangszellzahl nach 72h verzehnfacht war. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1.1. dargestellt.

Da Dacarbazin und Interferon- α -2a zur Behandlung von Patienten mit neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren eingesetzt werden (Öberg et al, 2000; Moertel et al. 1993), wurde vergleichend deren Wirkung auf die Proliferation der BON I Zellen *in vitro* untersucht. Monotherapie mit Interferon- α -2a (Dosierung 1500 I.E.) führte nach 72h zu einer moderaten Proliferationshemmung auf etwa 60% der unbehandelten Zellen. Dagegen führte Dacarbazin (4000 μ M) zur weitgehenden Wachstumshemmung auf weniger als 20 % des Wachstums der unbehandelten Kontrollzellen, welche durch zusätzliche Gabe von Interferon- α -2a (Dosierung 1500 I.E.) nicht signifikant verstärkt wurde.

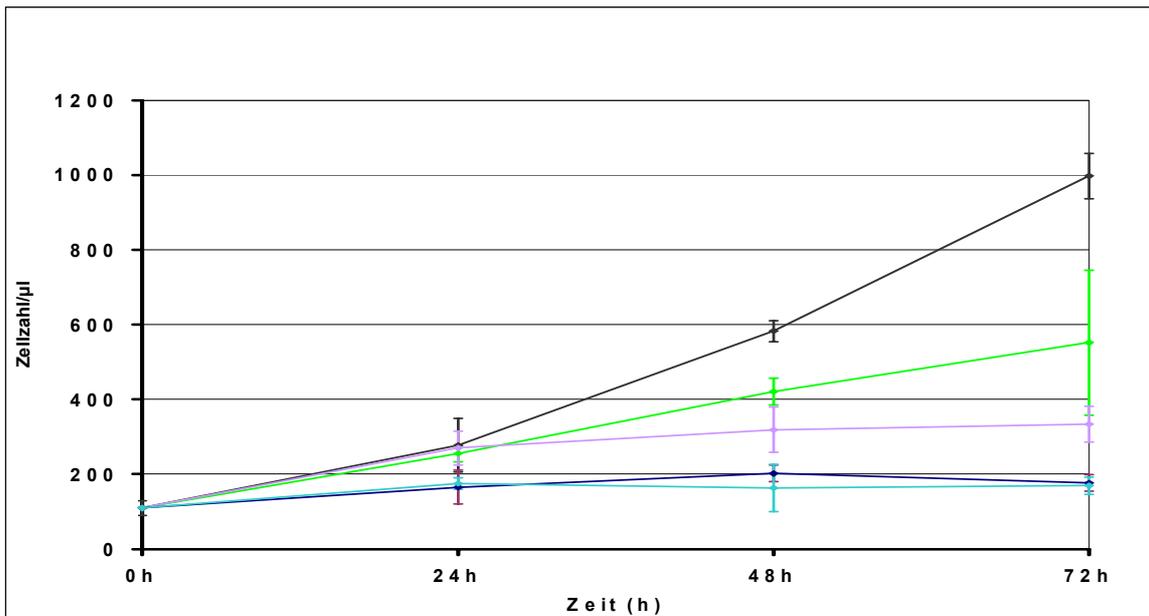


Abb. 3.1.1. Proliferationskinetik von unbehandelten und mit Interferon α -2a und Dacarbazin behandelten neuroendokrinen Pankreastumorzellen BON I. Nach 48h Inkubationszeit von BON I Zellen (nicht dargestellt) erfolgte an Zeitpunkt 0h entweder täglich nur Mediumwechsel zur Beurteilung der Proliferationskinetik oder mit Zugabe der unten angegebenen Wirkstoffe in angegebener Konzentration zu definierten Zeitpunkten. Die Auswertung erfolgte anhand des Trypan-Blau-Test. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten graphisch dargestellt. (h, Stunde/n; I.E, Internationale Einheiten).

- ◆ Unbehandelte Kontrollzellen
- ◆ Interferon- α -2a (1500 I.E.) Zugabe bei 0h, 24h, 48h
- ◆ Interferon- α -2a (1500 I.E.) Einmalgabe bei 0h und Dacarbazin (4000 μ M) Zugabe bei 24h, 48h
- ◆ Dacarbazin (4000 μ M) Zugabe bei 0h, 24h und 48h
- ◆ Interferon- α -2a (1500 I.E.) und Dacarbazin (4000 μ M) Zugabe bei 0h, 24h, 48h

Für die folgenden Untersuchungen sollte die Chemosensibilität von BON I Zellen gegenüber zahlreichen Substanzen dosis –und zeitabhängig untersucht werden. Der MTT Test (s. 2.4.7.) erlaubt die Quantifizierung der *in vitro* Chemosensitivität von Tumorzellen mit geringerem zeitlichen und materiellen Aufwand und hoher Präzision bei einer große Anzahl von Proben. Dabei wird der Umsatz eines zu den Zellen hinzugegebenen Tetrazoliumsalses durch Photoabsorption gemessen, wobei die Absorption proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen ist (Mosmann, 1983). Wie in Abbildung 3.1.2. dargestellt, zeigten der Trypan-Blau-Test und MTT-Test in Dacarbazin behandelten BON I Zellen vergleichbare Ergebnisse mit einer Reduktion der Zellproliferation auf unter 20% der unbehandelten Kontrollzellen nach 72-stündiger Behandlung. Daher kam in den weiteren Versuchen zur Quantifizierung der Chemosensitivität der MTT-Test zur Anwendung.

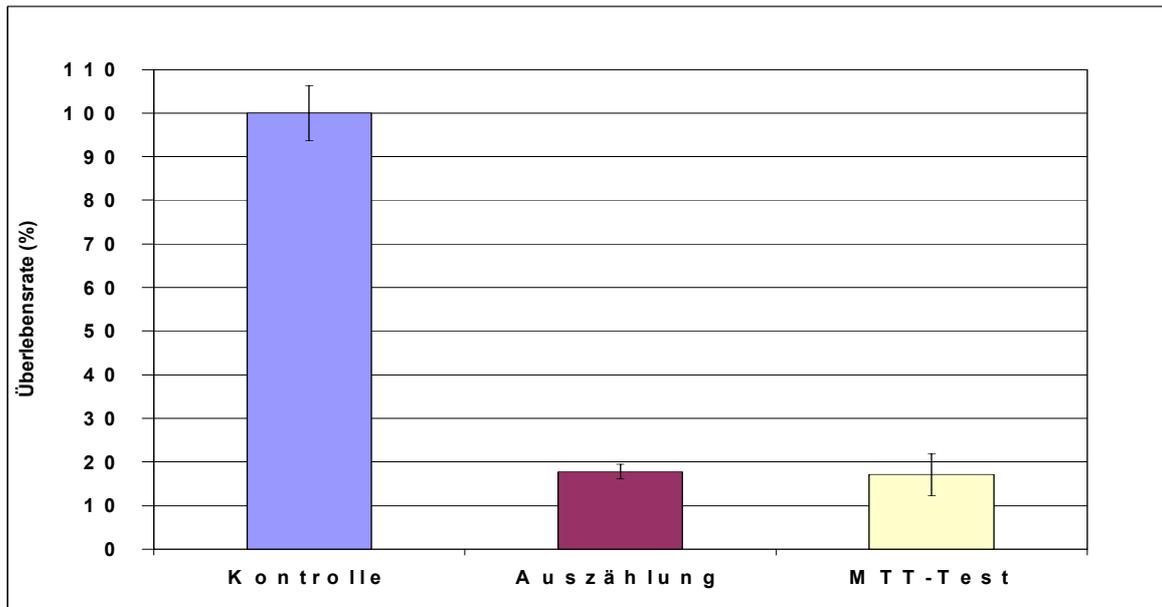


Abb. 3.1.2. Methodischer Vergleich zur Bestimmung der Überlebensraten von BON I Zellen. BON I Zellen wurden ohne/nach Darcarbazin (4000 μ M) Zugabe für 72h kultiviert. Die Überlebensraten der Zellen wurden mittels Trypan-Blau-Test (Auszählung) oder MTT-Test ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

3.1.2. Untersuchungen zur Chemosensitivität der neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I gegenüber antineoplastischen Substanzen *in vitro*

3.1.2.1. Konzentrationsabhängige Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Mitosehemmstoffen

Um die Chemosensitivität gegenüber Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel zu ermitteln wurde die Vitalität der BON I Zellen nach 72-stündiger Behandlung in Abhängigkeit ansteigender Konzentrationen der Agentien mittels MTT-Test (s. 2.4.7.) bestimmt. Dabei zeigten die BON I Zellen konzentrationsabhängig eine Minderung der Zellvitalität. Die Inkubation mit den Mitosehemmstoffen Vincristin und Vinblastin führte bereits bei Konzentrationen von 0,01 μ M zu Überlebensraten von nur ca. 20% der unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 3.1.3.), während erst bei 0,1 μ M Paclitaxel die Überlebensrate auf ca. 30% sank. Ein unerklärlicher geringfügiger Anstieg der Überlebensrate wurde wiederholt bei 1 μ M Paclitaxel beobachtet. Die IC₅₀-Konzentration, d.h. diejenige Stoffkonzentration, die zu einer 50%igen

Wachstumshemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation führte, wurde graphisch ermittelt. Sie betrug für Vincristin und Vinblastin ca. 4 nM, für Paclitaxel ca. 20 nM. Diese Ergebnisse zeigen, dass BON I Zellen eine deutliche Chemosensitivität gegenüber den Mitosehemmstoffen, insbesondere Vincristin und Vinblastin aufweisen.

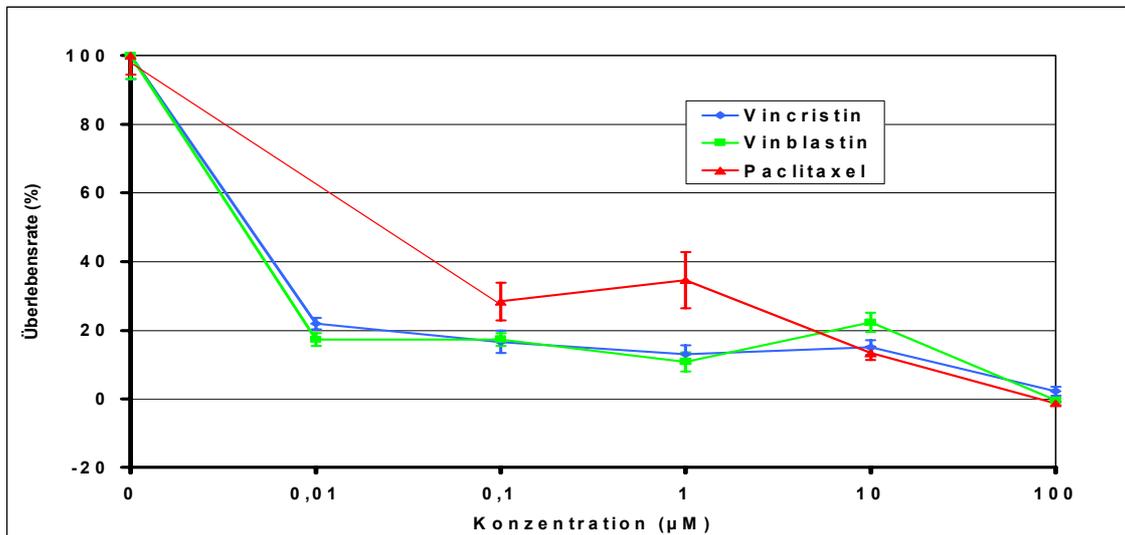


Abb. 3.1.3. Überlebensrate von BON I Zellen unter Vincristin-, Vinblastin- und Paclitaxelbehandlung. BON I Zellen wurden ohne/ mit Zugabe der verschiedenen Agentien in ansteigenden Konzentrationen (0-100 µM) ohne Mediumwechsel kultiviert. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

3.1.2.2. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber DNA-alkylierenden Zytostatika

Um die Zytotoxizität der alkylierenden Chemotherapeutika Doxorubicin, Cisplatin und Carboplatin und dem methylierenden Dacarbazin konzentrationsabhängig zu ermitteln, wurde die Vitalität von BON I Zellen nach 72-stündiger Behandlung mittels MTT-Test (s. 2.4.7.) bestimmt. Es wurde ein konzentrationsabhängiger Einfluss von Dacarbazin auf die BON I Zellen beobachtet. Erst über 2000 µM Dacarbazin führte zur Reduktion der Überlebensrate unter 30%, wobei die IC_{50} -Dosis von Dacarbazin bei ca. 1300 µM graphisch ermittelt wurde (Abb. 3.1.4.). Dagegen erreichte das Anthrazyklinderivat Doxorubicin bereits ab einer Dosis von 1 µM Überlebensraten von unter 10% in (Abb. 3.1.5.). Die IC_{50} Dosis lag bei ca. 0,2 µM.

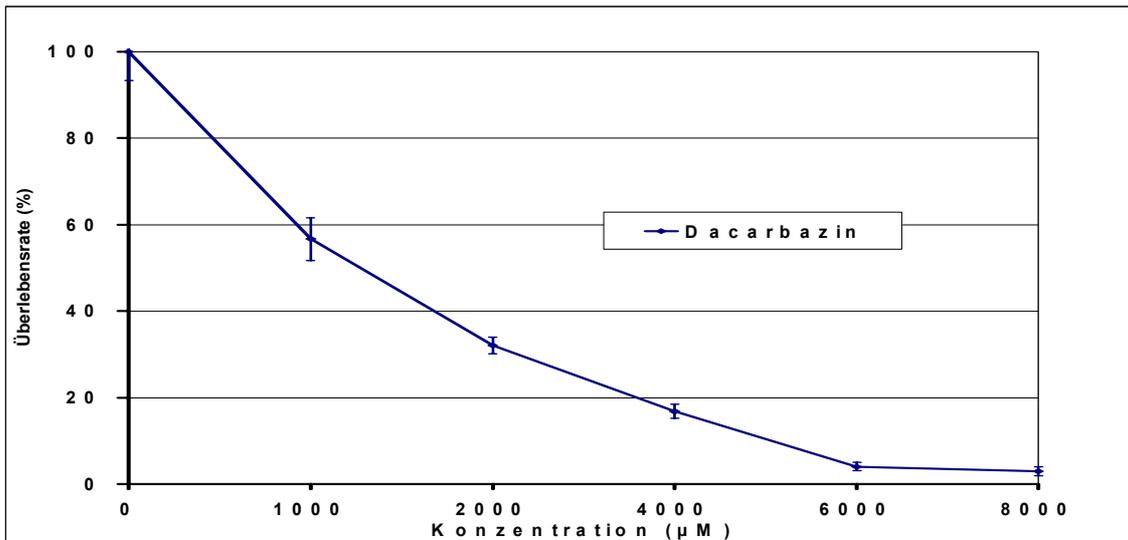


Abb. 3.1.4. Überlebensrate von BON I Zellen unter Dacarbazinbehandlung in BON I Zellen. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Dacarbazinkonzentration (0-8000 µM) ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

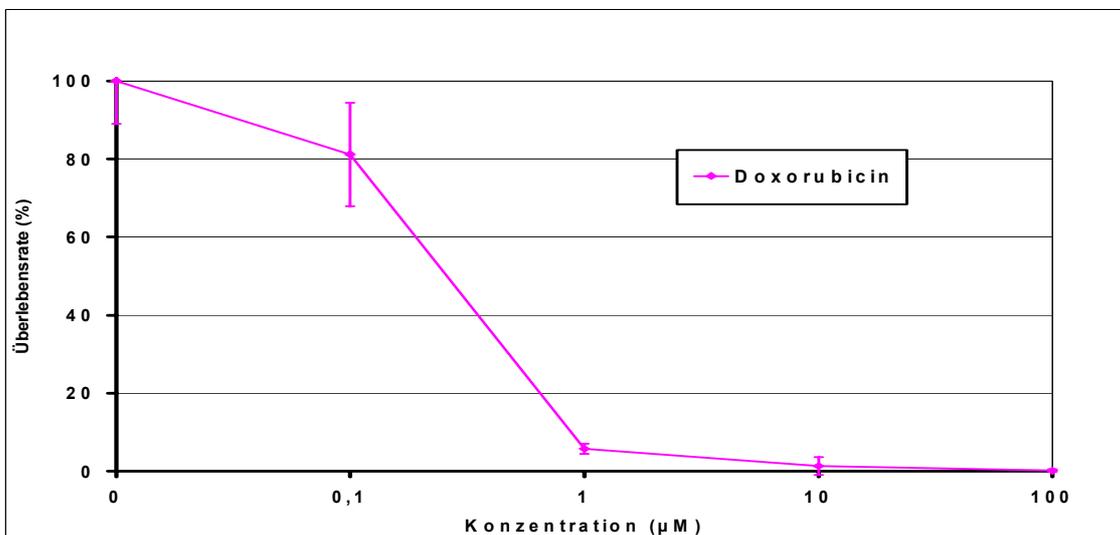


Abb. 3.1.5. Überlebensrate von BON I Zellen unter Doxorubicinbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Konzentration von Doxorubicin (0-100 µM) ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

Die Platinverbindungen Cisplatin und Carboplatin führten zu unterschiedlichen Überlebenskurven der BON I Zellen. Während Cisplatin erst bei einer Konzentration von 10 μM zur Überlebensrate von ca. 75% der Kontrollzellen führte, wies das Struktur analogon Carboplatin zwar bereits bei 1 μM eine vergleichbare Überlebensrate auf, die aber bei höherer Dosierung (100-facher Dosis) relativ konstant blieb (s. Abb. 3.1.6.). Die IC_{50} -Konzentration von Carboplatin wurde im gewählten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Die Cisplatin-behandelten BON I Zellen zeigten dagegen ab einer Konzentrationen von ca. 10 μM eine starke Reduktion der Überlebensrate. Die IC_{50} Dosis von Cisplatin wurde in einem unabhängigen Versuch mit kürzeren Dosierungsintervallen innerhalb des Konzentrationsbereiches 0-20 μM bei ca. 15 μM ermittelt (nicht gezeigt).

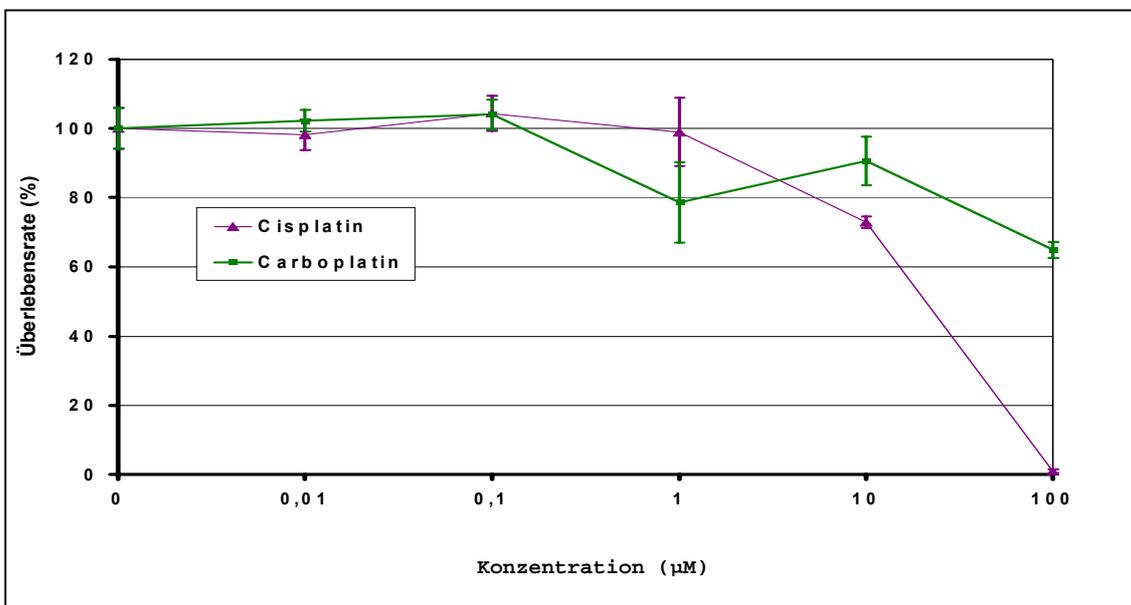


Abb. 3.1.6. Überlebensrate von BON I Zellen unter Cisplatin- und Carboplatinbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Konzentration von Cisplatin oder Carboplatin (0-100 μM) ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Chemosensitivität der BON I Zellen gegenüber einzelnen Substanzen der Klasse unterschiedlich ist. Während das Anthrazyklinderivat Doxorubicin zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate führte, wiesen die Untersuchungen mit Carboplatin auf eine gewisse Chemoresistenz der BON I Zellen.

3.1.2.3. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Topoisomerasehemmstoffen

Um die Chemosensitivität gegenüber den Topoisomerasehemmstoffen Irinotecan und Etoposid zu ermitteln, wurde die Vitalität der BON I Zellen nach 72-stündiger Behandlung in Abhängigkeit ansteigender Konzentrationen der Agentien mittels MTT-Test (s. 2.4.7.) bestimmt. Bei der Quantifizierung der Chemosensitivität zeigten mit 0,1 μM Etoposid behandelte BON I Zellen eine Reduktion der Überlebensrate auf 30% der unbehandelten Kontrollzellen (s. Abb. 3.1.7.). Wie bereits bei Paclitaxel beobachtet, führte der Konzentrationsanstieg auf 1 μM zu einer vorübergehenden Wirkungsabschwächung, die erst bei einer Konzentration von 100 μM überwunden wurde. Diese Beobachtung wurde wiederholt nachgewiesen. Legt man den Konzentrationsabschnitt zwischen 0 und 0,1 μM zur Ermittlung der IC_{50} -Dosis zugrunde, so liegt diese vergleichbar mit Paclitaxel bei ca. 50 nM.

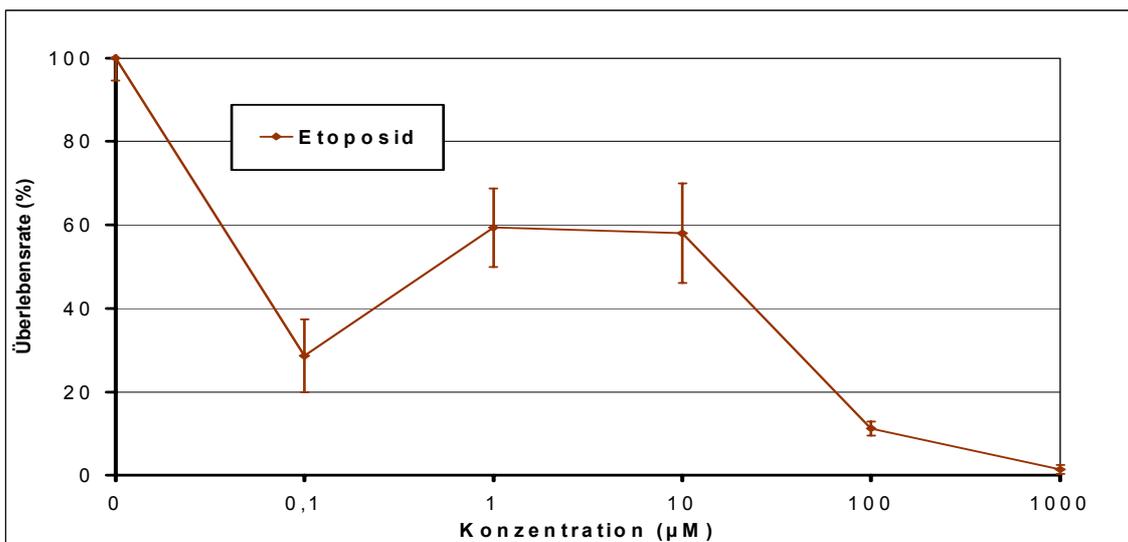


Abb. 3.1.7. Überlebensrate von BON I Zellen unter Etoposidbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Konzentration von Etoposid (0-1000 μM) ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

Bei der Behandlung von BON I Zellen mit Irinotecan (CPT-11) zeigte sich bei einer Konzentration von 0,01 μM überraschend Zellproliferation, bei 0,1 μM kein Unterschied

zu der Überlebensrate der Kontrollzellen, und erst ab einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ eine konzentrationsabhängige Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (s. Abb. 3.1.8.). Zur Klärung ob diese Beobachtung auf eine zu geringere Sensitivität des MTT-Testes zurückzuführen ist, wurde die Chemosensitivität mit dem Trypan-Blau-Test bestimmt, die bei der Konzentration von $1\mu\text{M}$ im Vergleich zum MTT-Test abwich. Die Irinotecan IC_{50} -Dosis betrug nach dem MTT-Test $10\mu\text{M}$, mit dem Trypan-Blau-Test $< 1\mu\text{M}$. Der Unterschied zwischen beiden Verfahren war bei höherer Konzentration nicht mehr nachweisbar, so dass in diesem Fall die Sensitivität des MTT-Testes im niedrigen Konzentrationsbereich zu niedrig erscheint.

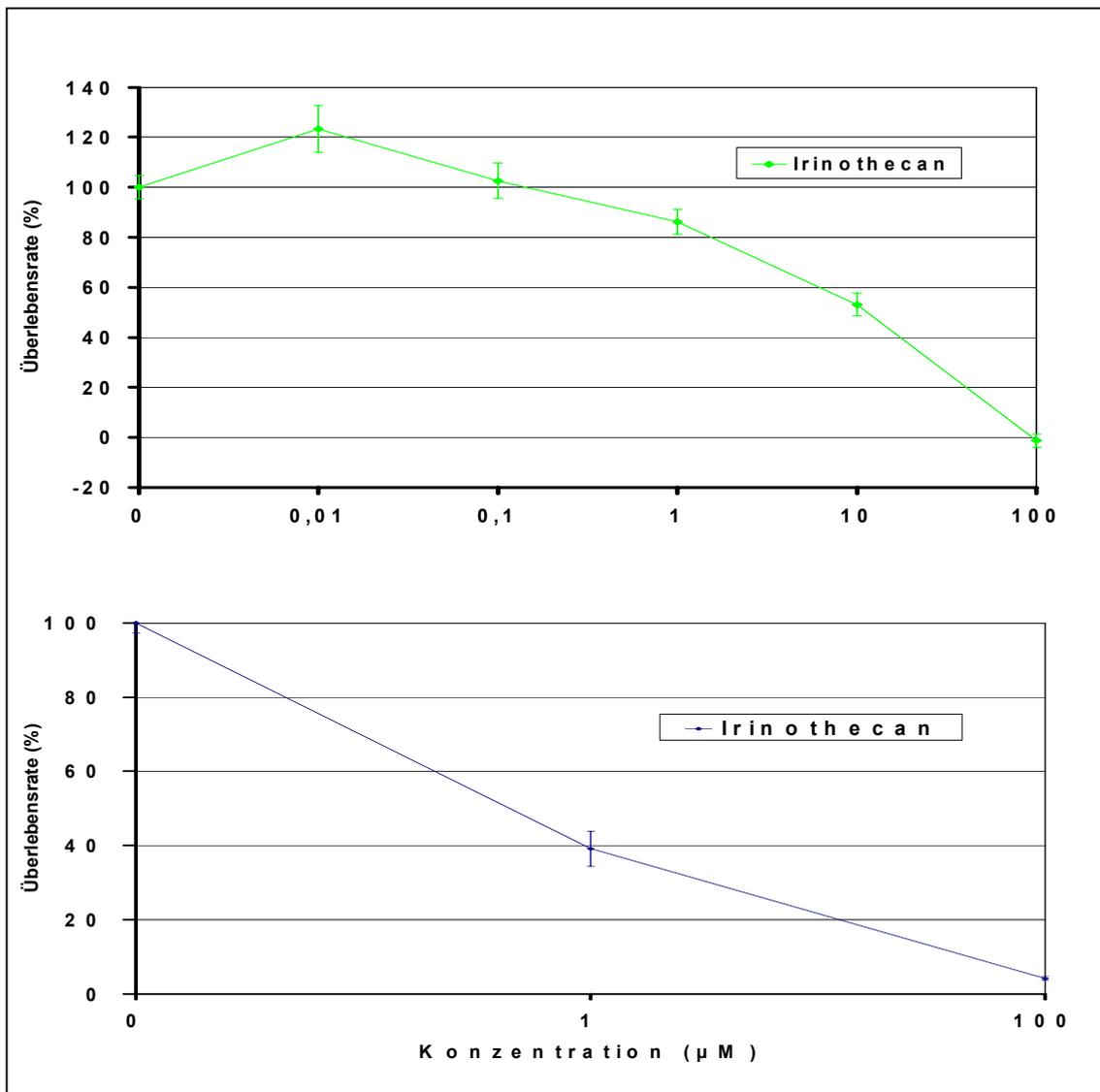


Abb. 3.1.8. Überlebensraten von BON I Zellen unter Irinotecan (CPT-11) -behandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Konzentration von Irinotecan ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden entweder

mit dem MTT-Test (obere Hälfte) ermittelt und in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben, oder anhand des Trypan-Blau-Tests (untere Hälfte). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 (MTT-Test) oder 3 (Trypan-Blau-Test) Experimenten dargestellt.

3.1.2.4. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Antimetaboliten

Stellvertretend für die Stoffgruppe der Antimetabolite wurde die Chemosensitivität von BON I Zellen nach 5-Fluorouracil (5-FU)- und (5-Aza-2'-Deoxycytidin) DAC-Behandlung untersucht. Als Antimetabolite werden Tumortheraeutika zusammengefaßt, die als „falsche“ Stoffwechselbausteine die Synthese von DNA und RNA hemmen.

Die IC_{50} -Hemmkonzentration wurde in 5-FU-behandelten BON I Zellen im gewählten Konzentrationsintervall nicht erreicht. Insgesamt konnte mit dem MTT-Test keine signifikante Reduktion der Überlebensrate in 5-FU-behandelten BON I Zellen im gewählten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (s. Abb. 3.1.9).

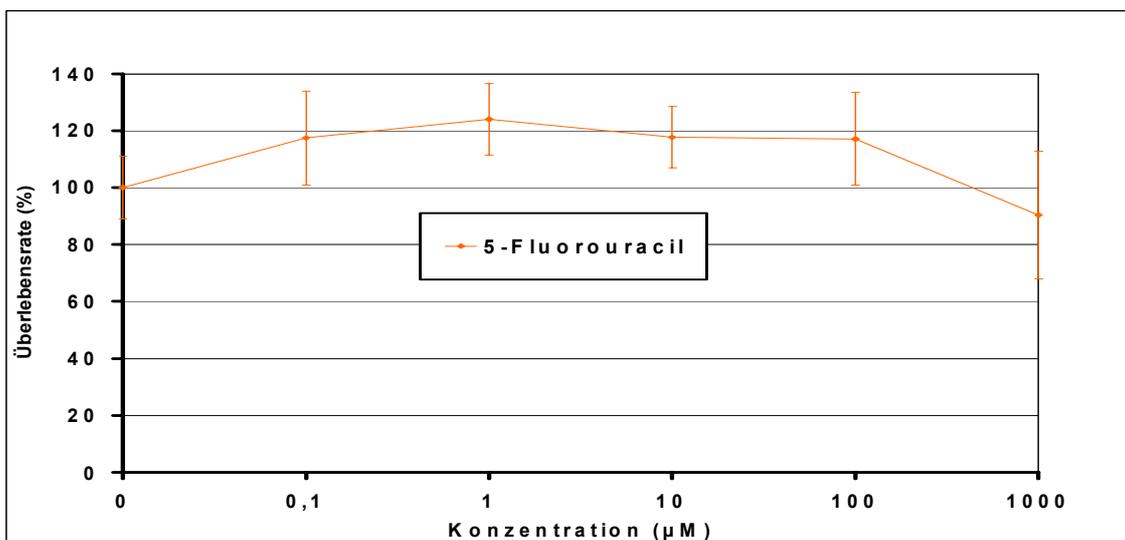


Abb. 3.1.9. Überlebensrate von BON I Zellen unter 5-Fluorouracilbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung mit Fluorouracil in ansteigender Konzentration ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

Dagegen wurden sowohl im MTT- als auch Trypan-Blau-Test unter DAC-Behandlung konzentrationsabhängig reduzierte Überlebensraten der BON I Zellen nachgewiesen. Bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ DAC zeigten beide Tests Überlebensraten von ungefähr 40% der unbehandelten Kontrollzellen. Die mittels MTT-Test gemessene IC_{50} -Konzentration lag graphisch ermittelt bei ca. $7\mu\text{M}$, die durch Trypan-Blau-Test ermittelte Dosis bei ca. $5\mu\text{M}$ (s. Abb. 3.1.10.).

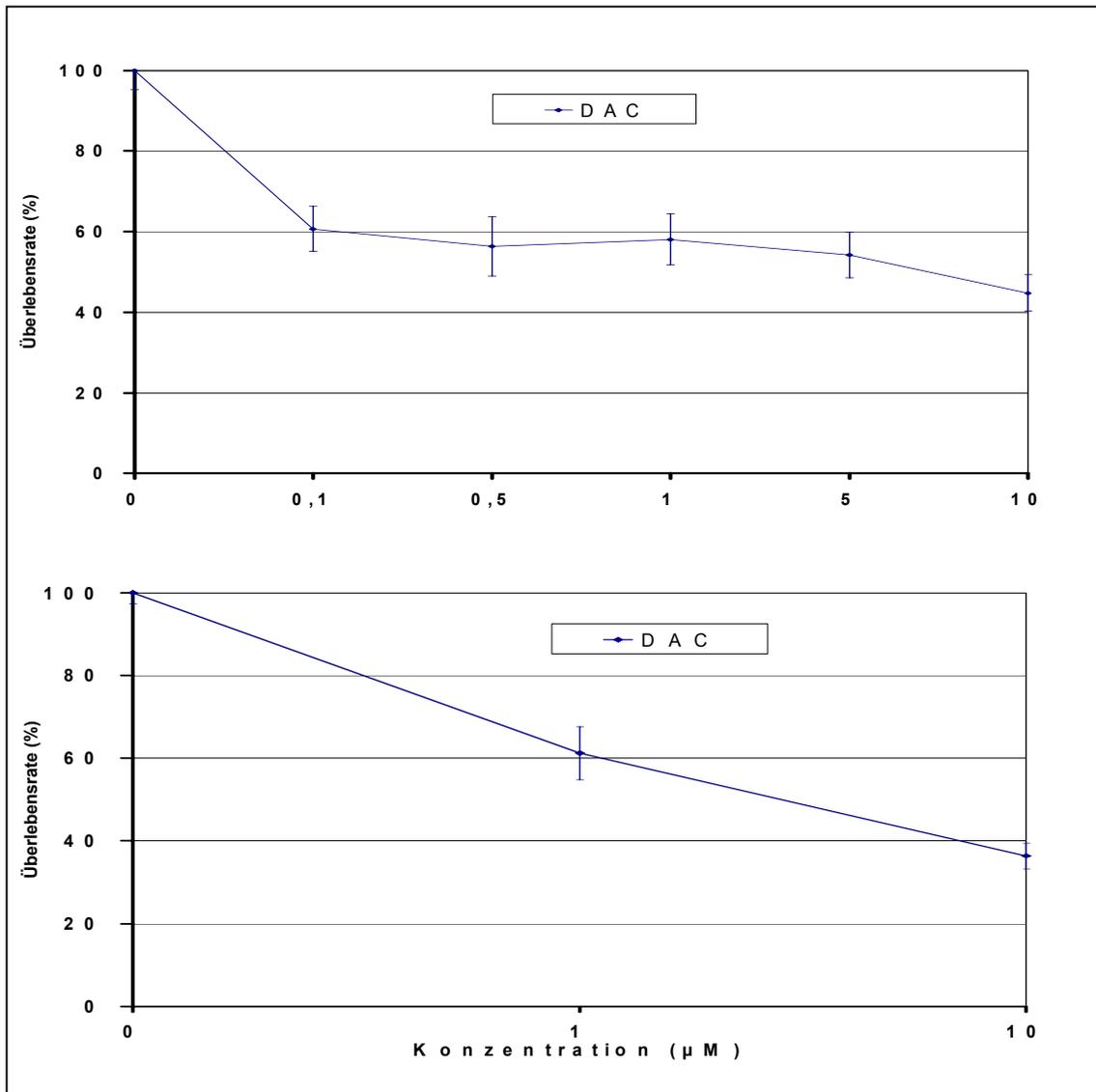


Abb. 3.1.10. Überlebensraten von BON I Zellen unter 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) Behandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung von BON I Zellen mit ansteigender Konzentration mit täglicher DAC-Behandlung und Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden entweder mit dem MTT-Test (obere Hälfte) ermittelt und in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben, oder anhand des Trypan-Blau-Tests (untere Hälfte). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 (MTT-Test) oder 3 (Trypan-Blau-Test) Experimenten dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen eine Resistenz der BON I Zellen gegenüber 5-Fluorouracil, wogegen die DAC-Behandlung zu einer signifikanten Wachstumshemmung der BON I Zellen führt, die sowohl im MTT-Test als auch Trypan-Blau-Test bestätigt wird.

3.1.2.5. Chemosensitivität von BON I Zellen unter Behandlung mit Biotherapeutika

Da die zu den Biotherapeutika bzw. Immunmodulatoren gehörenden Substanzen Octreoidacetat (Sandostatin^R) und Interferon- α -2a in vielen Therapieprotokollen bei neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren eingesetzt werden (Öberg, 2001; Simon, 2004), wurde die Chemosensitivität der mit verschiedenen Konzentrationen behandelten BON I Zellen *in vitro* mittels MTT-Test quantifiziert. In beiden Fällen wurde keine 50%ige Wachstumsinhibition erreicht. Octreoidacetat (Sandostatin^R) zeigte unter einer bei Patienten therapieäquivalenten Dosierung keine signifikante Wachstumsreduktion der BON I Zellen (s. Abb. 3.1.11.). Unter Interferon- α -2a kam es in ebenfalls bei Patienten verwendeten therapeutischen Dosierungen bei starker Streuung der Messwerte im MTT-Test zu einer leichten, aber signifikanten Proliferationshemmung auf maximal etwa 70% (s. Abb. 3.1.12.). Der Vergleich der mit dem Trypan-Blau-Test erhaltenen Überlebensraten der mit 1500 I.E. Interferon-behandelten BON I Zellen (s. Abb. 3.1.1.) und der mit dem im MTT-Test ermittelten Ergebnissen, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Verfahren.

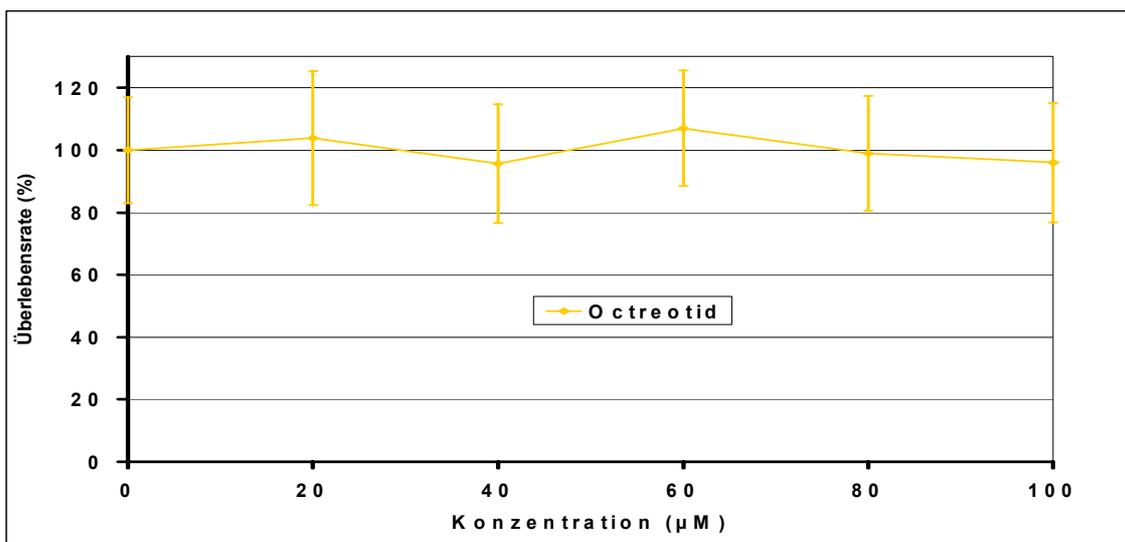


Abb. 3.1.11. Überlebensrate von BON I Zellen unter Octreotidacetat (Sandostatin^R) -behandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung mit Octreotidacetat

(Sandostatin^R) in ansteigenden Konzentrationen ohne Mediumwechsel. Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

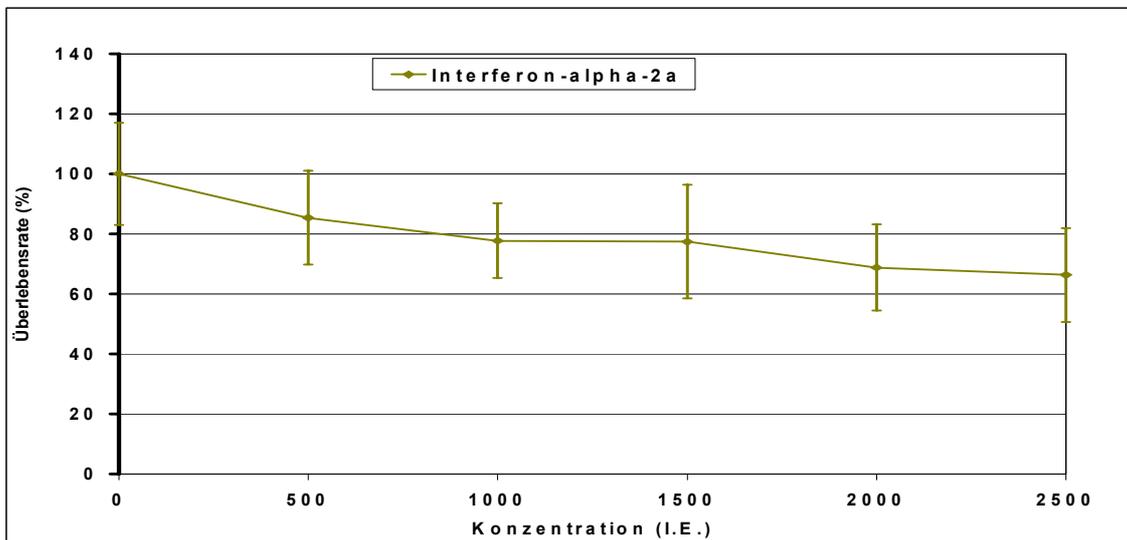


Abb. 3.1.12. Überlebensrate von BON I Zellen unter Interferon- α -2a-Behandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte eine 72-stündige Kultivierung mit Interferon- α -2a in ansteigender Konzentrationen ohne Mediumwechsel (I.E., Internationale Einheiten). Die Überlebensraten der Zellen wurden anhand des MTT-Tests ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) nach Abzug des Leerwertes (Medium alleine) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

3.2. Zellzyklusveränderungen in BON I neuroendokrinen Pankreastumorzellen durch antineoplastische Substanzen

Um die Wachstumsinhibition der BON I Zellen durch die in Abschnitt 3.1. eingesetzten Chemo- oder Biotherapeutika näher zu charakterisieren wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dabei wurde der DNA-Gehalt der Zellen mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (Propidiumiodid) durchflusszytometrisch gemessen und die Zellzyklusanteile in der Zellpopulation ermittelt (s. 2.4.8.).

3.2.1. Zellzyklusanalyse natürlich wachsender BON I Zellen

Zunächst wurden die Zellzyklusphasenanteile natürlich wachsender BON I Zellen nach 24-stündiger Kultivierung ermittelt. Als interner Standard dienten normale Blutlymphozyten. Die Zellzyklusphasenanteile sind in Tabelle 3.2.1. zusammengefasst.

Tab. 3.2.1. Zellzyklusanteile von BON I Zellen und normalen Blutlymphozyten

Zellzyklusphasenanteile	BON-1-Zelllinie	Lymphozytenstandard
G0/1-Anteil (%)	45	97
S-Anteil (%)	31	< 0,3
G2/M-Anteil (%)	24	3

Die BON I Zellen wiesen gegenüber dem diploiden Lymphozyten einen hyperploiden DNA-Gehalt auf. Entsprechend lag der DNA-Index (DI), d.h. der Quotient aus dem Mittelwert des aneuploiden G0/1-Peaks der BON I Zellen und dem diploiden G0/1-Peak des Lymphozytenstandards bei etwa 1,3 – 1,4. (Histogramm nicht gezeigt).

Die Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen wurden zu weiteren Zeitpunkten über 96h Inkubation analysiert (Abbildung 3.2.1). Zwischen 24h und 96h Kultivierung stieg der in der G0/1-Phase arretierten Zellen von 46% auf 70%, während der Anteil der sich teilenden Zellen (S-Phase) von 31% auf unter 10% sank. Der G2/M-Zellzyklusanteil blieb im Beobachtungszeitraum konstant bei knapp über 20%.

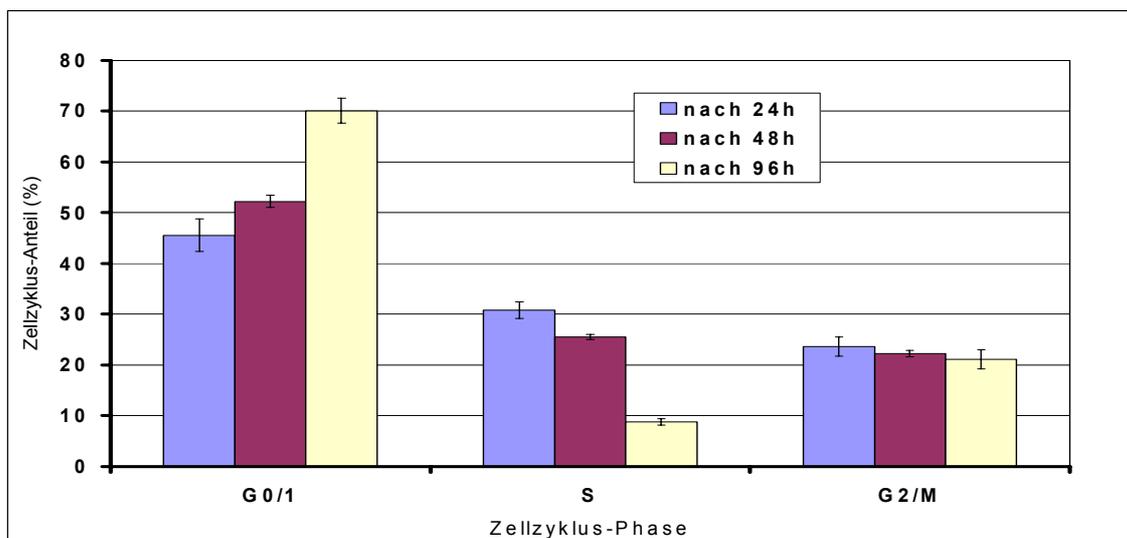


Abb. 3.2.1. Zellzyklusanalyse in unbehandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel 24h, 48h oder 96h kultiviert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

3.2.2. Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren

Zur Charakterisierung der Wachstumsinhibition der BON I Zellen durch die Mitosehemmstoffe Vinblastin, Vincristin und Paclitaxel wurden Zellzyklusanalysen nach Inkubation der Zellen über verschiedene Zeitintervalle mit derjenigen Stoffkonzentration durchgeführt, die beim MTT- Test eine Wachstumsreduktion von mindestens 50% erreicht hatte (s. 3.1.2.1.).

Die Inkubation mit 0,1 μ M Paclitaxel führte bereits nach 5h zu einem erhöhten G2/M-Anteil von etwa 45% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (26%), der nach 24h-stündiger Inkubationszeit auf 95% anstieg, wogegen der G1/0-Phasenanteil im gleichen Zeitraum auf 1,3% abfiel. Der S-Phase-Anteil sank nach 72 auf ca. 3,5% im Vergleich zu den Kontrollzellen (8,8%) (s. Abb. 3.2.2.).

Die 24-stündige Inkubation der BON I Zellen mit verschiedenen Paclitaxel-Konzentrationen zeigte erst ab einer Konzentration von 0,1 μ M Paclitaxel einem ausgeprägtem G2/M-Arrest, der sich bei Konzentrationssteigerung nicht signifikant veränderte (s. Abb. 3.2.3.).

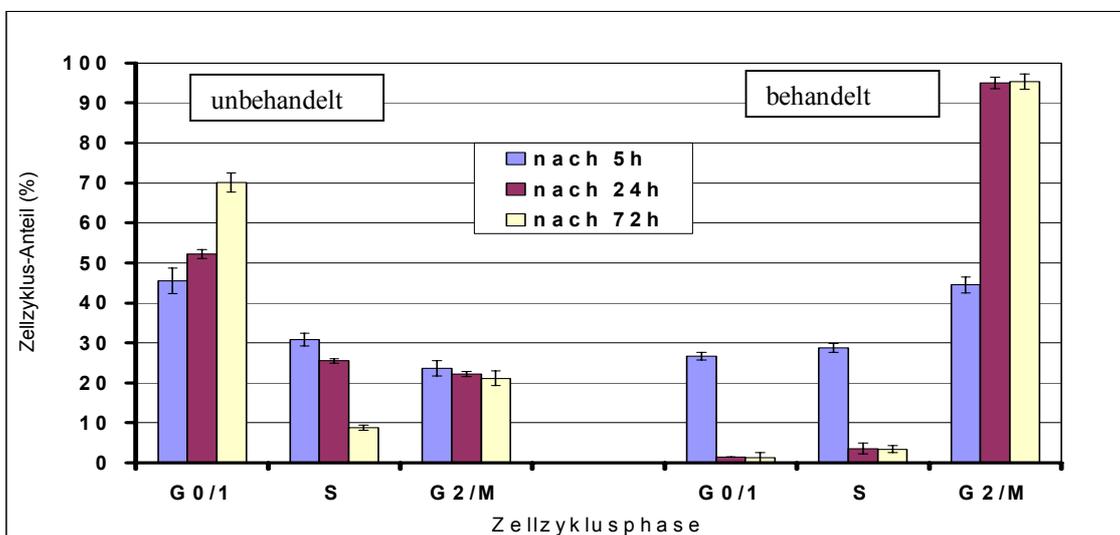


Abb. 3.2.2. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und Paclitaxel-behandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit 0,1 μ M Paclitaxel (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

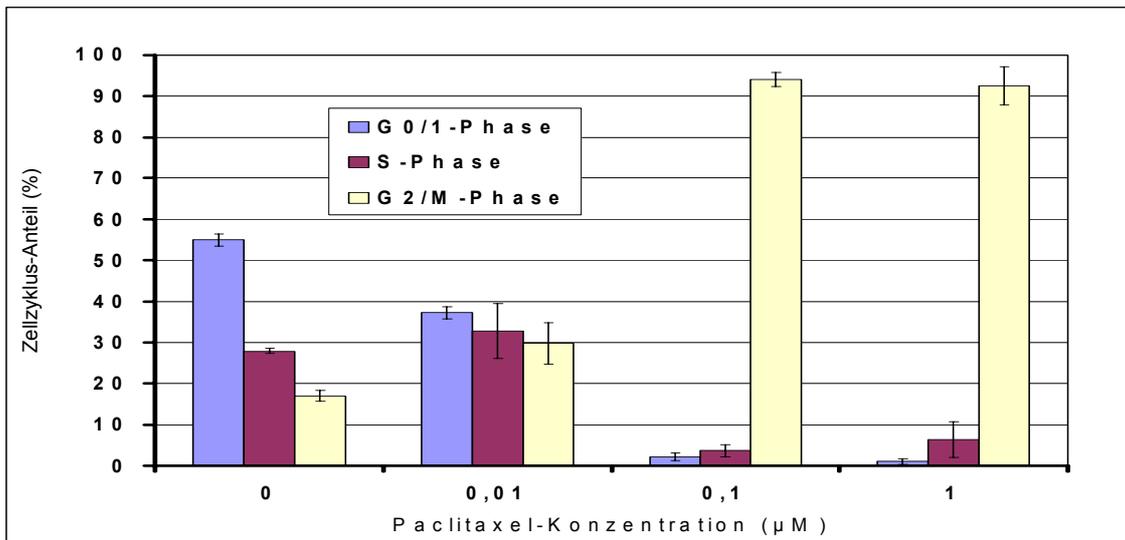


Abb. 3.2.3. Konzentrationsabhängige Wirkung von Paclitaxel auf die Zellzyklusphasenanteile von BON I Zellen. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation über 24h ohne Mediumwechsel mit den angegebenen Paclitaxelkonzentrationen inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Da die Vinka-Alkaloide Vinblastin und Vincristin fast identische Überlebensraten gezeigt hatten (s. Ergebnisse 3.1.2.1.), wurde Vinblastin stellvertretend eingesetzt. Bereits unter 0,01 μ M Vinblastin Behandlung kam es innerhalb von 24h zu einem starken G2/M-Arrest (ca. 96%), der S-Phasenanteil verminderte im selben Zeitraum auf kaum noch nachweisbare Werte unter 0,3% und der G1/0-Anteil sank auf etwa 3,4% (s. Abb. 3.2.4.). Nach 72-stündiger Inkubationsdauer ging der G2/M-Anteil auf ca. 89% leicht zurück und stattdessen nahm der G0/1-Anteil von unter 4% auf über 10% zu, wobei der S-Phasenanteil weiterhin nicht nachweisbar blieb.

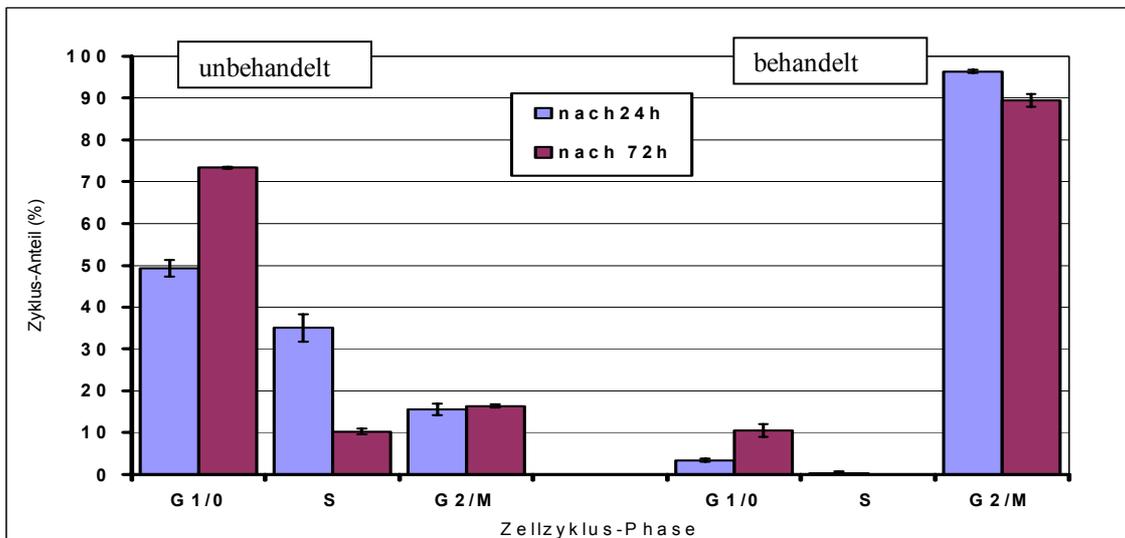


Abb. 3.2.4. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und Vinblastin-behandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit 0,01 μ M Vinblastin (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Diese Ergebnissen zeigen, dass sowohl Paclitaxel als auch Vinblastin in BON I Zellen einen zeitabhängigen und konzentrationsabhängigen (nur für Paclitaxel gezeigt) starken G2/M-Arrest induzieren.

3.2.3. Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von DNA-alkylierenden Zytostatika

Zur Charakterisierung der Wachstumsinhibition der BON I Zellen durch Dacarbazin, Doxorubicin und Cisplatin wurden Zellzyklusanalysen nach Inkubation der Zellen über verschiedene Zeitintervalle mit derjenigen Stoffkonzentration durchgeführt, die beim MTT-Test eine Wachstumsreduktion von mindestens 50% erreicht hatte (s. 3.1.2.2.).

Bereits nach 5h zeigten die mit 4000 μ M Dacarbazin behandelten Zellen eine Abnahme des G0/1-Zellanteils auf ca. 35,4% (Kontrollzellen 46%) und Anstieg des G2/M-Anteils auf etwa 34,3% (Kontrollzellen 24%). Im weiteren Verlauf blieb die Zellzyklusverteilung in den Dacarbazin-behandelten Zellen nahezu unverändert (s. Abb. 3.2.5.), während die Kontrollzellen nach 72h einen Anstieg der G0/1-Zellpopulation über 40% und eine Reduktion des S-Phaseanteils unter 10% zeigten.

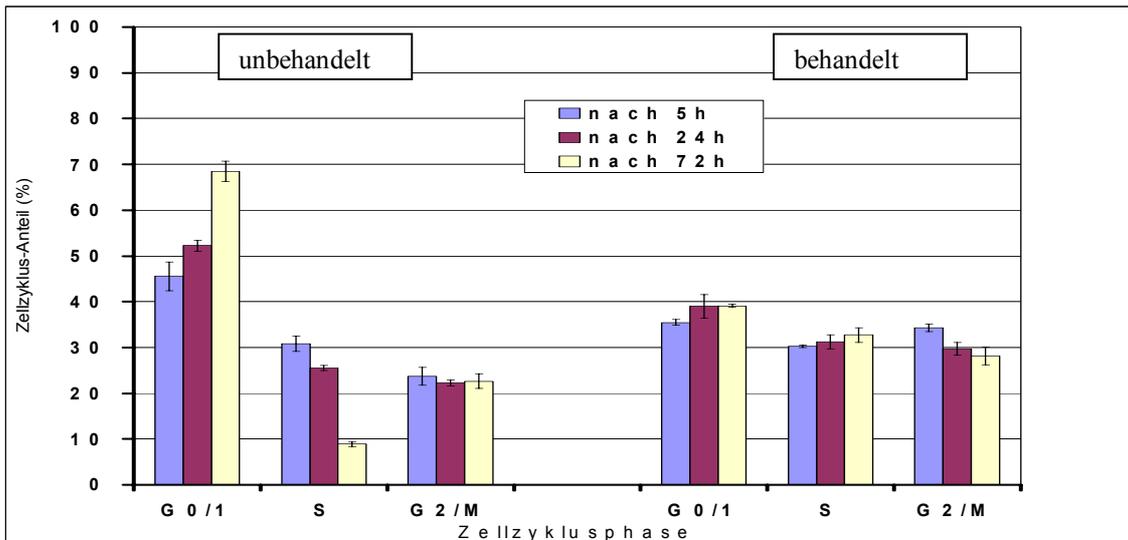


Abb. 3.2.5. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und Dacarbazin-behandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit 4000 μ M Dacarbazin (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Bei Inkubation mit 0,1 μ M Doxorubicin zeigte sich in den Zellzyklusanalysen nach 24h eine Akkumulation von BON I Zellen in der G2/M-Phase (72%), die noch nach 72h Inkubation auf ca. 85,3% zunahm (s. Abb. 3.2.6.).

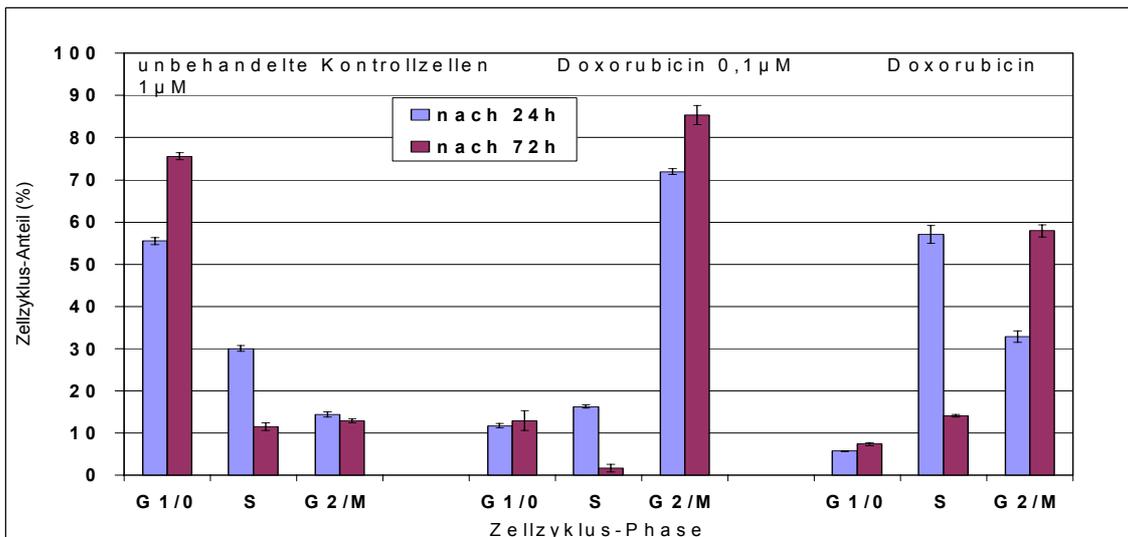


Abb. 3.2.6. Konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von Doxorubicin auf die Zellzyklusphasenanteile von BON I Zellen. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit 1 μ M Doxorubicin (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen

Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Die G0/1-Phase nahm nach 24h Inkubation auf etwa 12% ab und blieb unverändert, während der S-Phaseanteil von ca. 16% nach 24h auf unter 2% nach 72h sank. Bei höherer Doxorubicin-Konzentration (1 μ M) war der G2/M-Block nach 24h weniger stark ausgeprägt (32,9%) und erreichte nach 72h 57,9%. Stattdessen zeigte sich überraschend ein starker transienten Anstieg der S-Phase auf etwa 57%, der wieder nach 72h abgefallen war.

Bei der Behandlung von BON I Zellen mit 20 μ M Cisplatin nahm der G0/1-Anteil von ca. 40% nach 24h auf weniger als 2% nach 72h ab, gleichzeitig stieg erst der S- und dann der G2/M Anteil. So betrug der Anteil der Zellen in der S-Phase nach 24h ca. 60% und in der G2/M-Phase unter 1%, während nach 72h etwa 38,9% S-Phase und ein auf ca. 60% gesteigener G2/M-Anteil nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.2.7.).

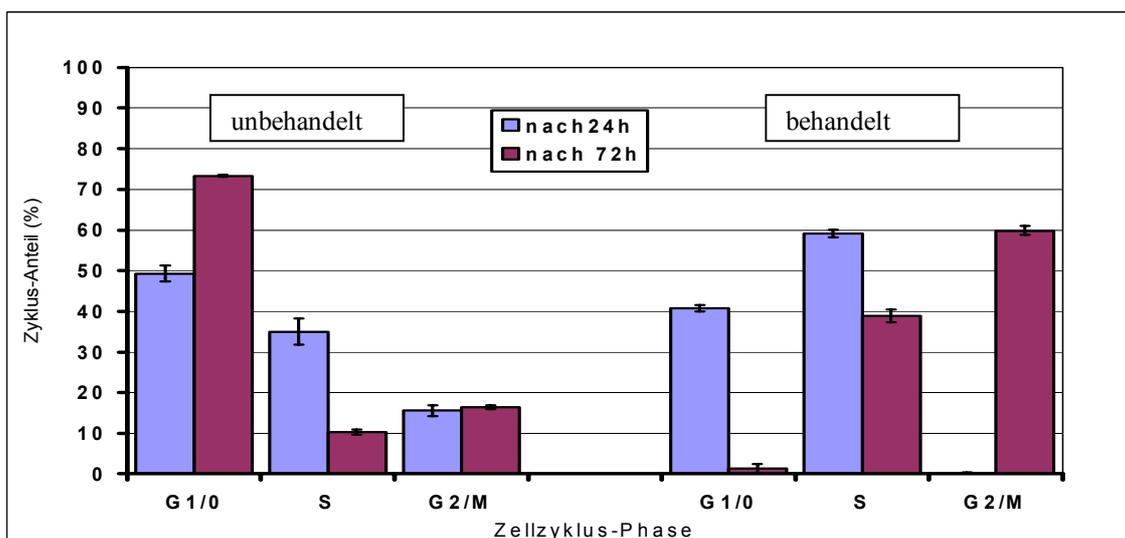


Abb. 3.2.7. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und Cisplatin-behandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit 20 μ M Cisplatin (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Doxorubicin und Cisplatin zu einer Akkumulation der BON I Zellen in der G2/M-Zellzyklusphase führen, wie bereits für Paclitaxel und Vinblastin beobachtet (s. 3.2.2.). Sowohl in Vinblastin- als auch in Doxorubicin-behandelten Zellen kam es zusätzlich zu einem G0/1-Arrest. Der Rückgang des S-Phase-Anteils in mit 0,1 μM Doxorubicin behandelten Zellen war im Gegensatz zu Vinblastin-behandelten Zellen erst nach 72h ausgeprägt. Cisplatin-behandelte Zellen zeigten eine verzögerte S-Phase-Progression mit späterem G2/M-Arrest als Vinblastin-behandelte Zellen. Im Gegensatz zu Doxorubicin- und Vinblastin-behandelten Zellen kam es über den Beobachtungszeitraum zu keinem Arrest in der G0/1-Phase.

3.2.4. Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation von Topoisomerase-Inhibitoren

Zur Charakterisierung der Wachstumsinhibition der BON I Zellen durch Irinotecan und Etoposid, wurden Zellzyklusanalysen nach Inkubation der Zellen über verschiedene Zeitintervalle mit derjenigen Stoffkonzentration durchgeführt, die beim MTT- Test eine Wachstumsreduktion von mindestens 50% erreicht hatte (s. 3.1.2.3.).

In den mit mit 1 μM Irinotecan behandelten BON I Zellen zeigte sich nach 5h ein Anstieg des S-Phaseanteils auf etwa 39,4%, der nach 72h wieder auf 13% abfiel. Der G2/M-Anteil stieg verzögert und erreichte nach 72h ein Maximum mit ca.75,5%. Parallel hierzu fiel der G0/1-Anteil von etwa 24,3% nach 24h auf ca. 11,4% nach 72h ab. Der initiale transiente S-Phase-Anstieg kam bei einer Konzentration von 10 μM Irinotecan mit etwa 82,4% (24h) noch intensiver zur Darstellung, so auch der Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase mit über 90% (72h). Der G0/1-Anteil war nach 24h kaum nachweisbar (s. Abb. 3.2.8.). Diese Ergebnisse weisen auf eine zeit- und dosisabhängig verzögerte Zellzyklus-Progression der Irinotecan-behandelten BON I Zellen durch die S-Phase hin mit dadurch bedingtem Anstieg des S-Phase-Anteils, welcher nach 72h zum G2/M-Arrest führt. Anders als in Vinblastin- und Doxorubicin-behandelten Zellen kam es nicht zum G0/1-Arrest. Damit ist das Zellzyklusverhalten der BON I Zellen unter Irinotecan und Cisplatin (s. 3.2.3.) vergleichbar.

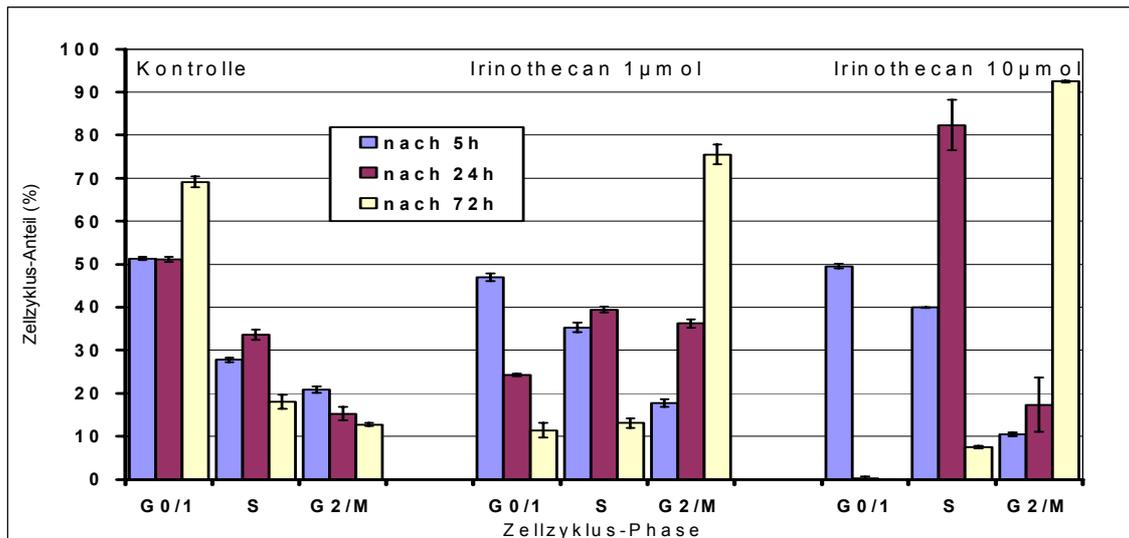


Abb. 3.2.8. Konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von Irinotecan auf die Zellzyklusphasenanteile von BON I Zellen. BON I Zellen wurden nach 24-stündiger Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte), mit 1µM (Mitte) oder 10µM Irinotecan (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Bei Etoposid wurde aufgrund des paradoxen Anstiegs der Überlebensrate von BON I Zellen im MTT-Test bei 1µM und 10µM (s. Abb 3.1.7.), diejenige Konzentration für die Zellzyklusexperimente gewählt, die in der niedrigsten Konzentration (0,1µM) zu einer mindestens 50%igen Wachstumshemmung geführt hatte (0,1 µM). In den mit 0,1 µM Etoposid-behandelten-Zellen kam es im Vergleich zu den Kontrollzellen bei gleichem S-Phaseanteil nur zu einem leichten aber signifikanten Anstieg des G2/M-Anteils auf etwa 27% und entsprechend niedrigeren G0/1-Anteilen (s. Abb. 3.2.9.). Die Ergebnisse weisen auf eine verzögerte G2/M-Progression der Etoposid-behandelten BON I Zellen im gewählten Konzentrationsbereich und Beobachtungszeitraum hin, geben aber im Gegensatz zu Paclitaxel, Doxorubicin, Irinotecan und Cisplatin keinen Hinweis auf einen manifesten Zellzyklus-Arrest.

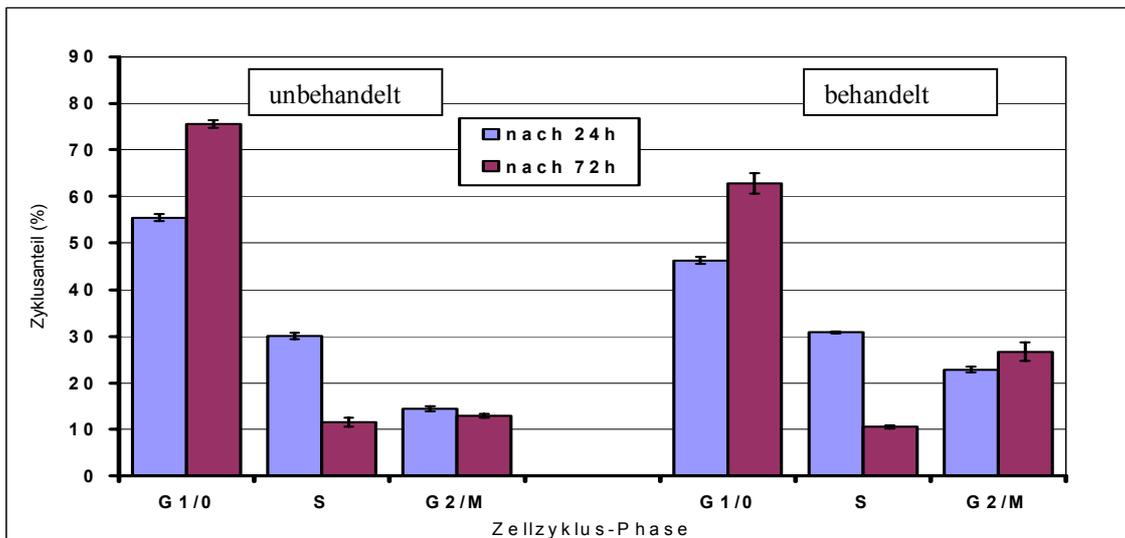


Abb. 3.2.9. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und Etoposid-behandelten BON I Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Vorinkubation entweder nicht (linke Diagrammhälfte) oder mit $0,1\mu\text{M}$ Etoposid (rechte Diagrammhälfte) in den angegebenen Zeitintervallen ohne Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

3.2.5. Zellzyklusveränderungen von BON I Zellen nach Applikation des Antimetaboliten 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC)

Zur Charakterisierung der Wachstumsinhibition der BON I Zellen durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) wurden Zellzyklusanalysen nach Inkubation der Zellen über verschiedene Zeitintervalle mit derjenigen Stoffkonzentration durchgeführt, die beim MTT- Test eine Wachstumsreduktion von mindestens 50% erreicht hatte (s. 3.1.2.4.). Nach 72-stündiger Inkubation der BON I Zellen in $1\mu\text{M}$ DAC unter täglichem Mediumwechsel stieg der G2/M-Anteil auf ca. 25,3% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (7,4%), der G0/1-Anteil erwies sich entsprechend mit ca. 39,2% erniedrigt, und der prozentuale S-Phase Anteil blieb unverändert (s. Abb. 3.2.10.). Der den apoptotischen Zellanteil repräsentierende sub-G1-Zellanteil war in den DNA-Histogrammen der behandelten Zellen geringfügig erhöht (nicht dargestellt). Die DAC-behandelten BON I Zellen zeigen ein ähnliches Zellzyklusverhalten wie Etoposid-behandelte Zellen nach 72h Behandlung und geben keinen Anhalt für einen permanenten G2/M-Arrest.

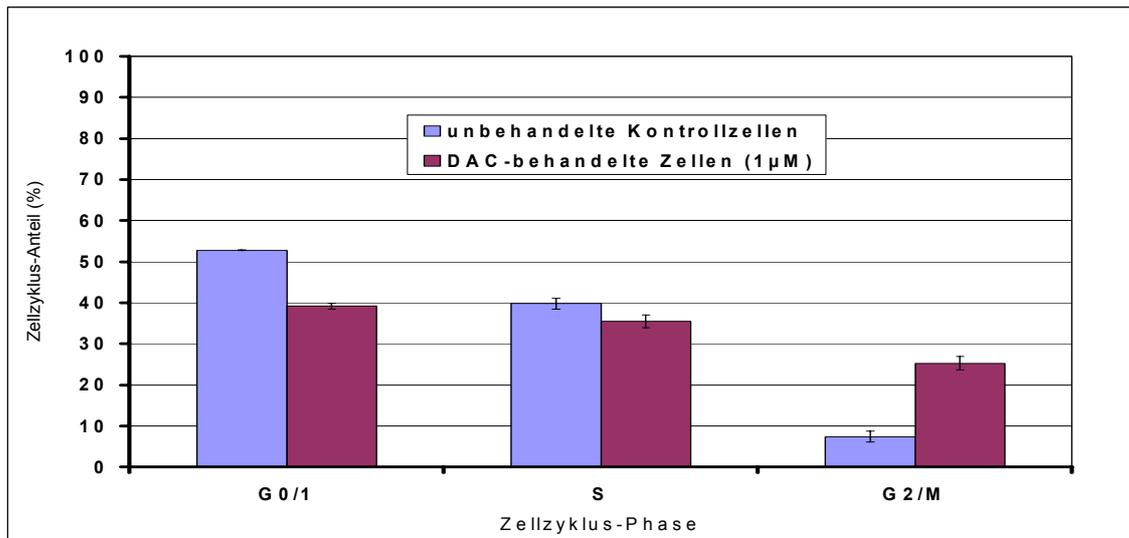


Abb. 3.2.10. Zellzyklusanalyse in unbehandelten- und DAC-behandelten BON I Zellen. BON I Zellen wurden nach 24h Vorinkubation entweder nicht (blau) oder mit 1µM DAC (rot) über einen Zeitraum von 72h mit täglichem Mediumwechsel inkubiert. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurde die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

3.3. Untersuchungen zur Apoptose-Induktion in BON I Zellen durch Chemotherapeutika

Anhand der folgenden Experimente sollte untersucht werden, ob und welche der zuvor eingesetzten Chemotherapeutika zur Apoptose (programmierter Zelltod) von BON I Zellen führen. Im Vordergrund stand dabei die Frage, inwieweit die Chemotherapeutika-induzierte Reduktion der Überlebenszeit auf die Induktion von *apoptotischem* Zelltod oder auf *nekrotischen* Zelluntergang zurückgeführt werden kann und ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzklassen bestehen. Dabei wurden die bereits in den Zellzyklusversuchen (s. 3.2.) eingesetzten Zytostatikagruppen und Stoffkonzentrationen angewandt.

3.3.1. Bestimmung der Apoptoserate von unbehandelten BON I Zellen

Zur Unterscheidung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod in unbehandelten kultivierten BON I Zellen wurde die Hoechst-33342-/Propidiumjodid Färbung eingesetzt und die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand morphologischer Kriterien (Tabelle 3.3.1) näher charakterisiert (Lee und Shacter, 1997).

Tab. 3.3.1. Morphologische Charakteristika vitaler-, apoptotischer- und nekrotischer Zellkerne nach Hoechst 33342 und Propidiumjodid-Färbung

vitale Zellkerne	früh-apoptotische Zellkerne	spät-apoptotische Zellkerne	nekrotische Zellkerne
Hoechst 33342 positiv / PI negativ : ➤ homogene Blaufärbung	Hoechst 33342 positiv/ PI negativ ➤ hellblaue Sprenkelung durch Chromatinkondensation	Hoechst 33342 positiv/ PI positiv ➤ Kernfragmentierung, apoptotische Vesikel, rötliche Sprenkelung	Hoechst 33342 positiv/ PI positiv ➤ Homogen rot-violette Färbung

PI, Propidiumjodid-Färbung

Die typischen morphologischen und färberische Kennzeichen von vitalen, apoptotischen und nekrotischen BON I Zellen sind in Abbildung 3.3.1 gezeigt.

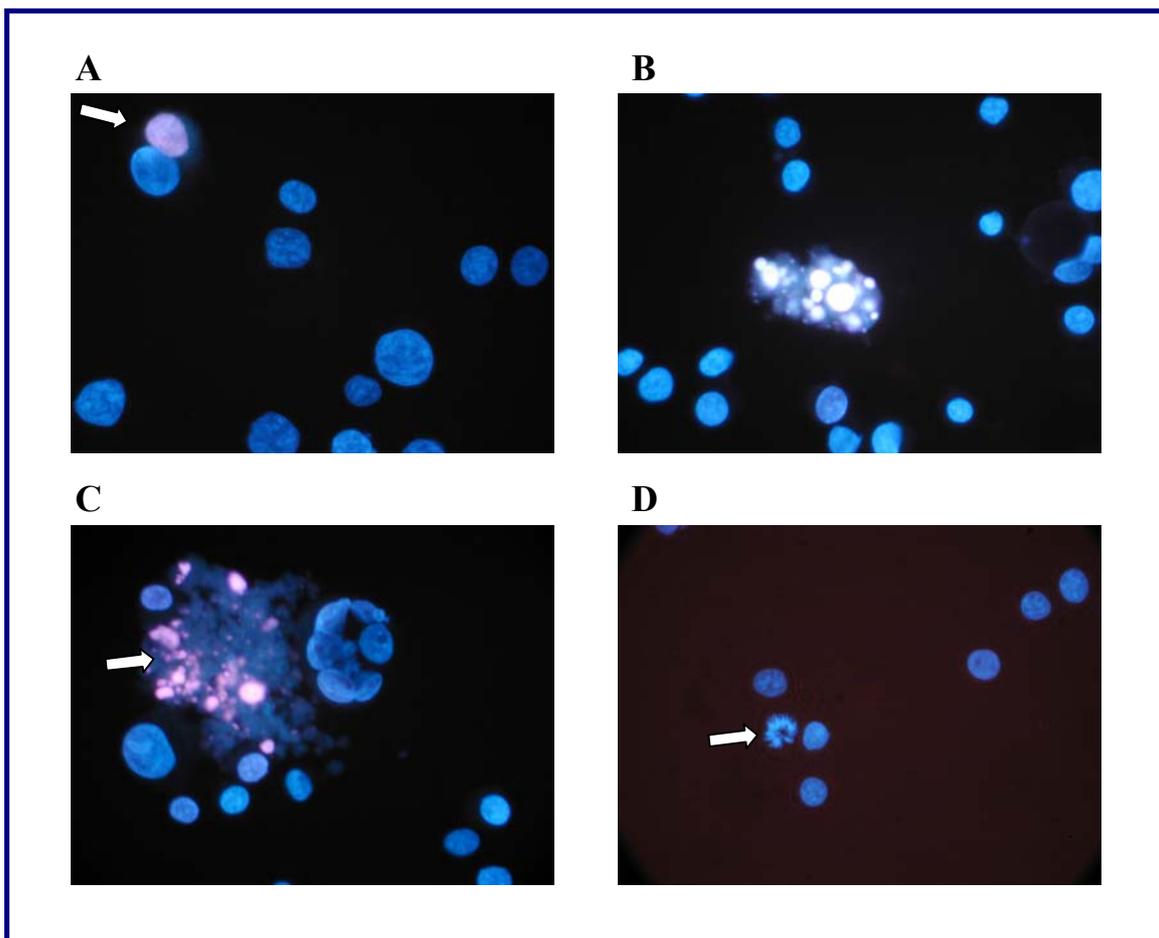


Abb. 3.3.1. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von unbehandelten BON I Zellen nach Hoechst 33342 und Propidiumjodid Anfärbung. Fluoreszenzmikroskopie x 400 (A) vitale Zellen, am oberen linken Bildrand nekrotischer Zellkern (Pfeil), (B) früh-apoptotischer Zellkern in Bildmitte

(„Apoptotic bodies“), (C) spät-apoptotische Zellkernreste in linker oberer Bildhälfte, (D) mitotischer Zellkern (Pfeil) neben Zellkernen vitaler Zellen.

Daneben traten auch vereinzelt Zellen mit mitotischem Zellkern sowie Zellen mit mehreren Zellkernen (multinukleäre Zellen) auf. Die mitotischen Zellkerne zeigten eine „kranzartige Struktur“ mit feinen strahlenartigen Ausläufern der kondensierten Chromosomen und waren intensiver blau als die hellblau angefärbten früh-apoptotischen Zellkerne. Multinukleäre Kerne waren im Unterschied zu apoptotischen Zellkernen intensiver homogen blau und wiesen klare Zellkerngrenzen auf. In Einzelfällen war es nicht immer möglich, eine Zelle zweifelsfrei als „lebend“ oder „apoptotisch“ einzustufen. In solchen Fällen wurde die Zelle als „lebend“ gezählt.

Es wurden die prozentualen Anteile von lebenden, apoptotischen und nekrotischen unbehandelten BON I Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung nach einer initialen Adhäsionszeit von 24 Stunden ermittelt. Tabelle 3.3.2. zeigt die gerundeten Mittelwerte +/- eine Standardabweichung aus 3 Experimenten. Der Anteil vitaler, apoptotischer sowie nekrotischen Zellen zeigte im Unterschied zu den Zellzyklusanalysen (s. 3.2.1.) über den Untersuchungszeitraum keine signifikante Veränderung. Der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen blieb nach 72-stündiger Kultur klein.

Tab. 3.3.2. Darstellung der Verteilung vitaler, apoptotischer und nekrotischer BON I Zellen in Kultur

Inkubationszeit	Anteil lebender Zellen (%)	Anteil apoptotischer Zellen (%)	Anteil nekrotischer Zellen (%)
6h	89 (+/- 9,26)	1,3 (+/- 0,52)	9,7 (+/- 9,48)
24h	96,4 (+/- 1,92)	0,1 (+/- 0,17)	3,5 (+/- 1,76)
72h	94,2 (+/- 2,21)	0,7 (+/- 0,18)	5,1 (+/- 2,16)

3.3.2. Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren

Zur Unterscheidung, ob die durch 0,1 μ M Paclitaxel induzierte Reduktion der Überlebensrate (s. 3.1.2.1.) auf Apoptose oder Nekrose zurückzuführen ist, wurden BON I Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (6h, 24h, 72h) mit Hoechst

33342/Propidiumiodid gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert (s. Abb. 3.3.2.).

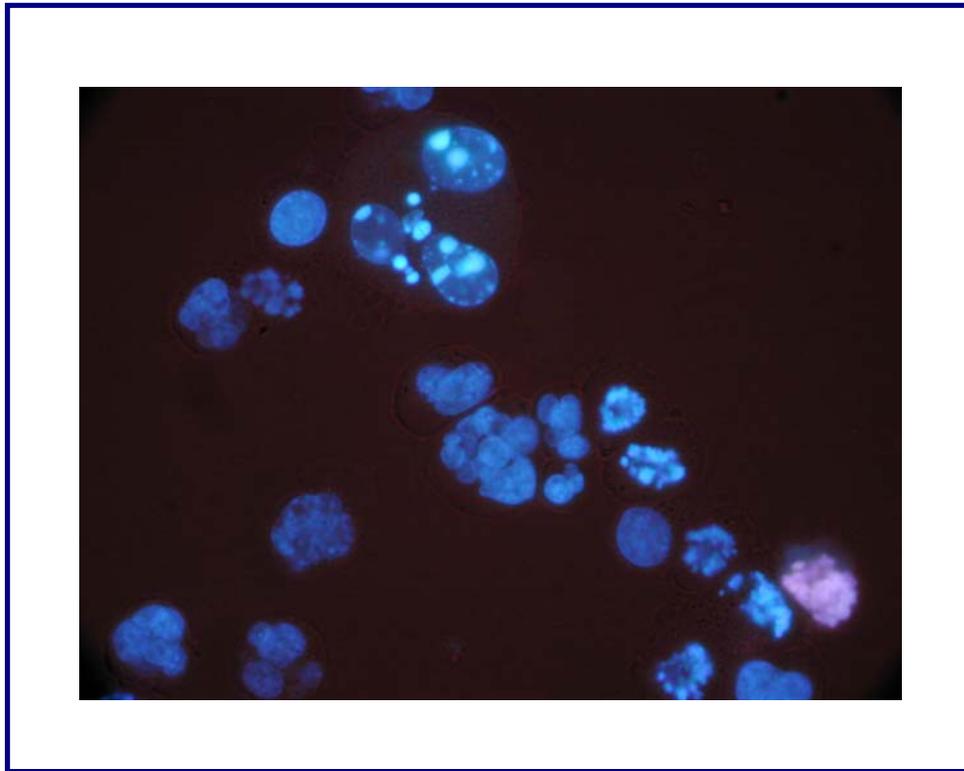


Abb. 3.3.2. Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach 24h Paclitaxel-Behandlung. Fluoreszenzmikroskopie x 400 nach Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung von mit 0,1 μ M Paclitaxel behandelten BON I Zellen. Man erkennt die in der Mitosephase arretierten Zellkerne mit den typischen Apoptosezeichen wie Chromatinkondensation und Kernfragmentierung.

In Abbildung 3.3.3. sind die Ergebnisse graphisch zusammengefasst. Die Apoptoserate stieg von etwa 16,5% nach 6h (Kontrolle <2%) bis ungefähr 90,6% nach 72h an. Der apoptotische Index (Verhältnis des prozentualen Apoptoseanteils zwischen be- und unbehandelten Zellen) betrug nach 24h etwa 724. Der Anteil nekrotischer Zellen war nach 24- und 72-stündiger Inkubationszeit nicht mehr bzw. kaum noch nachweisbar (> 1%).

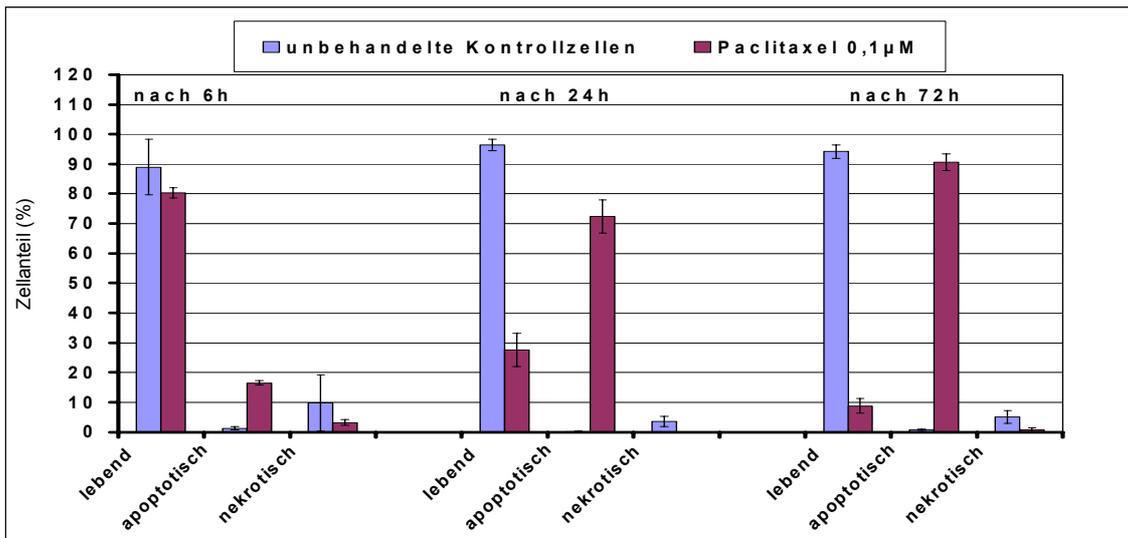


Abb. 3.3.3. Apoptotische Wirkung von Paclitaxel auf BON I Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit entweder nicht (blaue Balken) oder mit 0,1µM Paclitaxel (rote Balken) in den angegebenen Zeiträumen ohne Mediumwechsel inkubiert. Unterscheidung vitaler (lebend), apoptotischer und nekrotischer Zellanteile erfolgte mit Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine starke zeitabhängige Induktion von Apoptose in den mit Paclitaxel-behandelten BON I Zellen hin. Die Apoptoserate korrelierte mit dem in der Zellzyklusbestimmung beobachteten Zellarrest in der G2/M-Phase (s. 3.2.2.). Der apoptotische Index zeigte aufgrund der Meßschwankungen der Apoptoserate bei gleichzeitig niedrigen Mittelwerten der Apoptoseraten in den unbehandelten Zellen eine große zeitabhängige Schwankungsbreite. Der nekrotische Zelltod schien im gewählten Paclitaxel-Konzentrationsbereich keine Rolle in BON I Zellen zu spielen.

Die 24h-stündige Behandlung mit 0,01 µM Vinblastin führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate auf ca. 15,8%, bzw. 9,6% nach 72h im Vergleich zu den unbehandelten BON I Zellen (s. Abb. 3.3.4. und 3.3.5.). Der apoptotische Index lag zwischen maximal 79 nach 24h und 4,6 nach 72h. Der nekrotische Zellanteil veränderte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen über den Beobachtungszeitraum nicht signifikant.

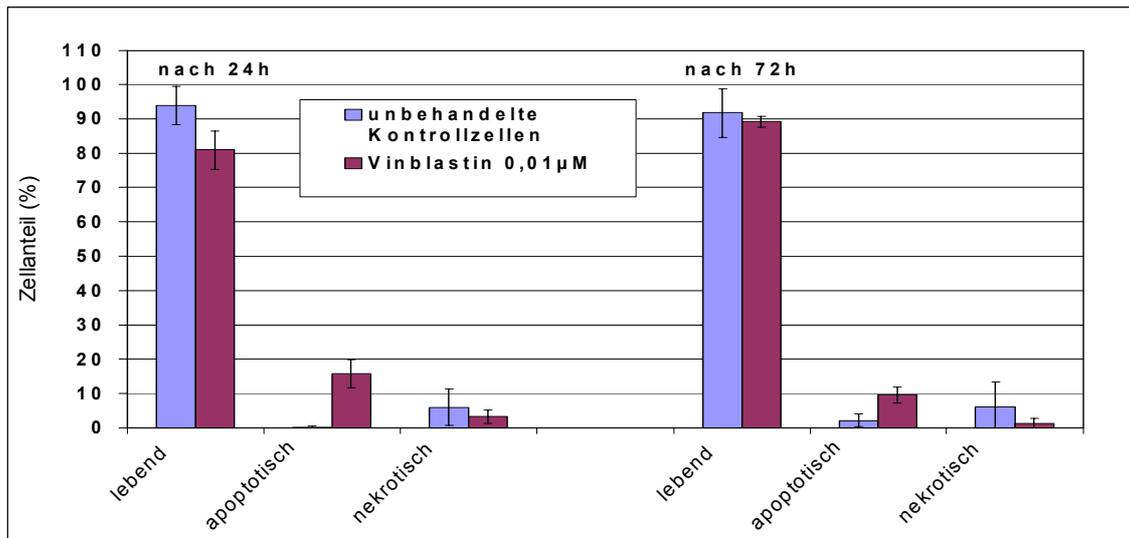


Abb. 3.3.4. Apoptotische Wirkung von Vinblastin auf BON I Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit entweder nicht (blaue Balken) oder mit 0,01 µM Vinblastin (rote Balken) in den angegebenen Zeiträumen (24h oder 72h) ohne Mediumwechsel inkubiert. Die Unterscheidung vitaler (lebend), apoptotischer und nekrotischer Zellanteile erfolgte mit Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

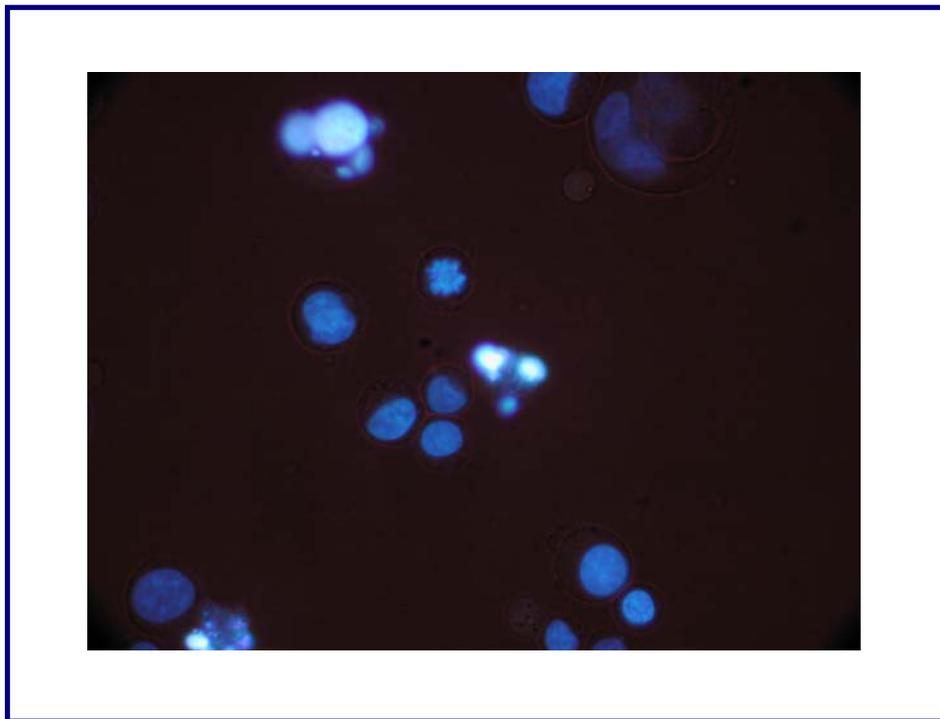


Abb. 3.3.5. Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach 72h Vinblastin-Behandlung. Fluoreszenzmikroskopie x 400 nach Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung von BON I Zellen nach Behandlung mit 0,01 µM Vinblastin. Man erkennt die in der Mitosephase arretierten Zellkerne mit den typischen Apoptosezeichen wie Chromatinkondensation und Kernfragmentierung.

Die mit 0,01 μ M Vinblastin-behandelten BON I Zellen zeigten ein geringere Apoptoserainduktion als die Paclitaxel-behandelten Zellen. Der Anstieg des apoptotischen Zellanteils war im Gegensatz zu Paclitaxel im gewählten Zeitintervall nicht zeitabhängig. Wegen der jedoch nicht signifikanten Abweichungen der Mittelwerte der Apoptoserate in den unbehandelten Zellen schwankte der Apoptoseindex in Vinblastin-behandelten Zellen wie bei den Paclitaxel-behandelten Zellen. Die Apoptoseinduktion war zeitgleich mit dem beobachteten G2/M-Arrest (s. 3.2.2.). Es gab keinen Hinweis auf Induktion des nekrotischen Zelltodes.

3.3.3. Untersuchungen zur Apoptose in BON I Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Zytostatika und Dacarbazin

Es sollte untersucht werden, ob die mit Dacarbazin, Doxorubicin und Cisplatin beobachtete Reduktion der Überlebensraten von BON I Zellen (s. 3.1.2.2.), durch Zunahme der apoptotischen oder nekrotischen Zellanteile bedingt sind. Es kamen Stoffkonzentrationen zur Anwendung, die eine 50% Reduktion der Überlebenszeiten gezeigt hatten.

Mit 4000 μ M Dacarbazin-behandelte BON I Zellen zeigten keine signifikante Zunahme der Apoptoserate nach 24-stündiger Inkubationszeit, welche nach 72h geringfügig auf etwa 2,4% im Vergleich zur Kontrolle (< 0,4%) stieg. Der Apoptoseindex war auf das etwa 6-fache erhöht. Stattdessen kam es innerhalb von 72h zu einem deutlichen Anstieg des nekrotischen Zellanteils auf über 50% (unbehandelten Zellen ca. 11,4%) (s. Abb. 3.3.6. und Abb. 3.3.8A.).

Doxorubicin-behandelte BON I Zellen zeigten nach 72h nur einen signifikanten leichten Anstieg der Apoptoserate auf ca. 4% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Apoptose-Index etwa 10-fach erhöht). Der nekrotische Zellanteil stieg im beobachteten Zeitraum nicht an (s. Abb. 3.3.6.). Die Zellkerne erschienen im Vergleich zur Kontrolle vergrößert (s. Abb. 3.3.8B).

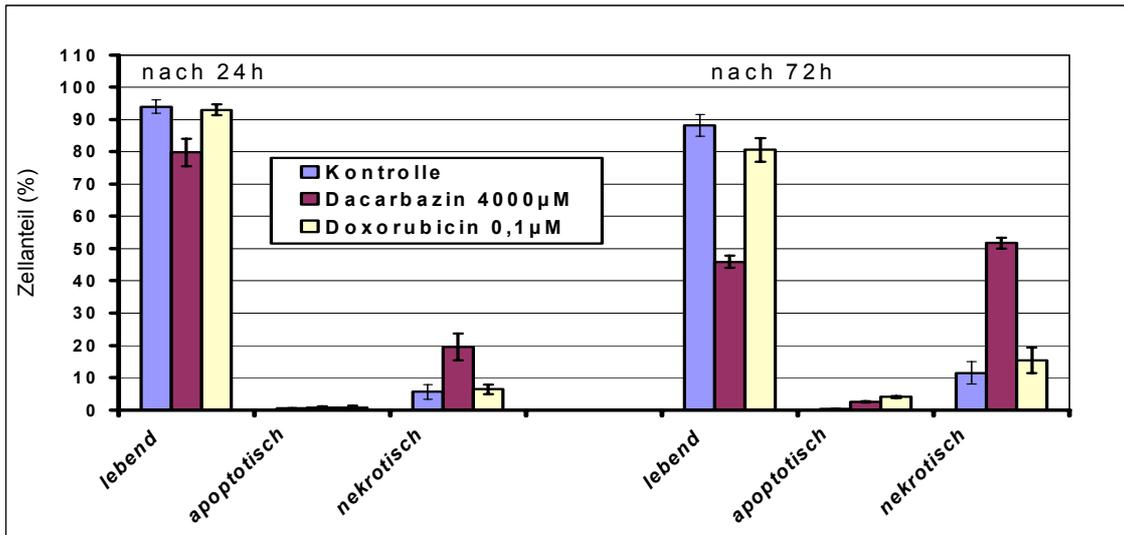


Abb. 3.3.6. Wirkung von Dacarbazin- und Doxorubicin auf apoptotische und nekrotische Zellanteile in BON I Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit entweder nicht (blaue Balken), mit 4000 µM Dacarbazin (rote Balken) und 0,1 µM Doxorubicin (gelbe Balken) in den angegebenen Zeiträumen ohne Mediumwechsel inkubiert. Die Unterscheidung vitaler (lebend), apoptotischer und nekrotischer Zellanteile erfolgte mit Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Unter 20 µM Cisplatin Behandlung stieg der apoptotische Anteil der BON I Zellen nach 72-stündiger Inkubation auf etwa 10% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (2,1%) (s. Abb. 3.3.7.). Der Apoptoseindex erhöhte sich auf das etwa 5-fache. Der Anteil nekrotischer Zellen war im Vergleich zur Kontrolle im gewählten Zeitintervall nicht signifikant verändert. Die Zellkerne erschienen im Vergleich zur Kontrolle vergrößert (Abb. 3.3.8C.).

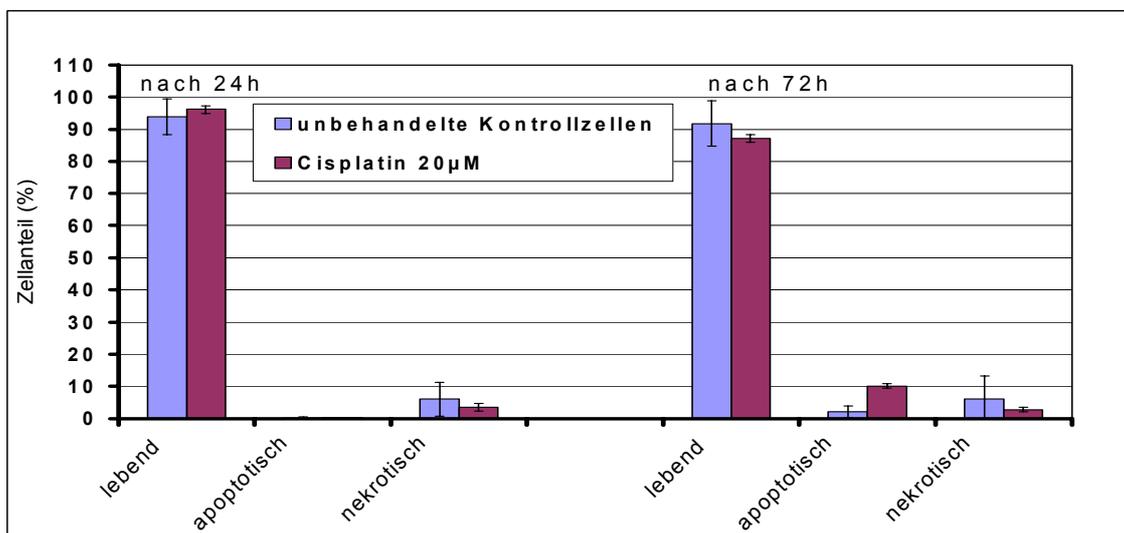


Abb. 3.3.7. Wirkung von Cisplatin auf apoptotische und nekrotische Zellanteile in BON I Zellen.

Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit entweder nicht (blaue Balken) oder mit 20 μ M Cisplatin (rote Balken) in den angegebenen Zeiträumen ohne Mediumwechsel inkubiert. Die Unterscheidung vitaler (lebend), apoptotischer und nekrotischer Zellanteile erfolgte mit Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

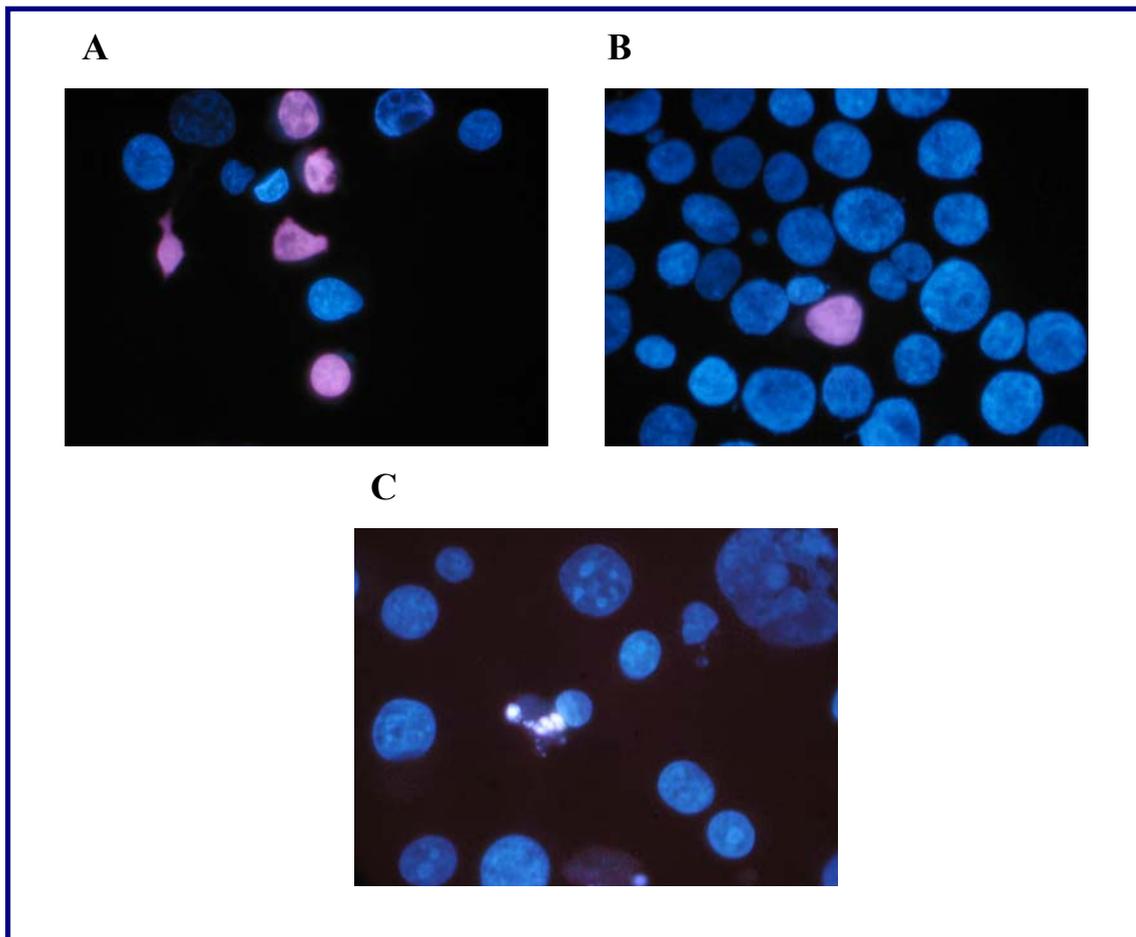


Abb. 3.3.8. Wirkung von Dacarbazin, Doxorubicin oder Cisplatin auf die Kernmorphologie von BON I Zellen. Fluoreszenzmikroskopie x 400 nach Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. (A) Mit 4000 μ M (24h) Dacarbazin-behandelte Zellen zeigen vermehrt nekrotische Zellkerne (violett-gefärbte) (B) Mit 0,1 μ M (24h) Doxorubicin-behandelte Zellkerne erscheinen vergrößert im Vergleich zu den unbehandelten Zellkernen, (C) Mit 20 μ M 72h Ciplatin-behandelte Zellkerne zeigen einen größeren Durchmesser, früh-apoptotische Zelle in Bildmitte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Dacarbazin-, Doxorubicin- und Cisplatin-behandelte BON I Zellen erst nach 72 Stunden eine im Gegensatz zu Paclitaxel und Vinblastin nur geringe (s. 3.3.2.), aber signifikante Apoptose induzieren. Dies fällt bei Doxorubicin und Cisplatin zeitgleich mit dem Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus (s.

3.2.3.), wobei die vergrößerten Zellkerne auf einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase hinweisen könnten (doppelter DNA-Gehalt). Ein mitotischer Arrest, wie unter Paclitaxel- und Vinblastin beobachtet, scheint bei fehlendem Nachweis vermehrter Mitosen unwahrscheinlich. Bei Dacarbazin ist aufgrund der hohen Konzentration ein zytotoxischer Effekt für den hohen Nekroseanteil der BON I Zellen anzunehmen.

3.3.4. Induktion von Apoptose in BON I Zellen nach Behandlung mit Topoisomerasehemmstoffen

Zur Untersuchung, ob der in Irinotecan behandelten BON I Zellen beobachtete G2/M-Zellzyklusarrest (s. 3.2.4.) mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht, wurden die Zellen mit 1 μ M Irinotecan (Stoffkonzentration, die eine 50% Reduktion der Überlebenszeiten gezeigt hatte, (s. 3.1.2.3.)) behandelt und die apoptotischen Zellanteile bestimmt (s. Abb. 3.3.9.). Dabei kam es nach 72-stündiger Inkubationszeit zu einem geringen aber signifikanten Anstieg der Apoptoserate auf unter 4% im Vergleich zu den Kontrollzellen (ca. 0,5%). Der Apoptoseindex stieg auf das ca. 8-fache, während der nekrotische Zellanteil im Behandlungszeitraum nicht signifikant erhöht war. Die Zellkerne waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen vergrößert (s. Abb. 3.3.10A).

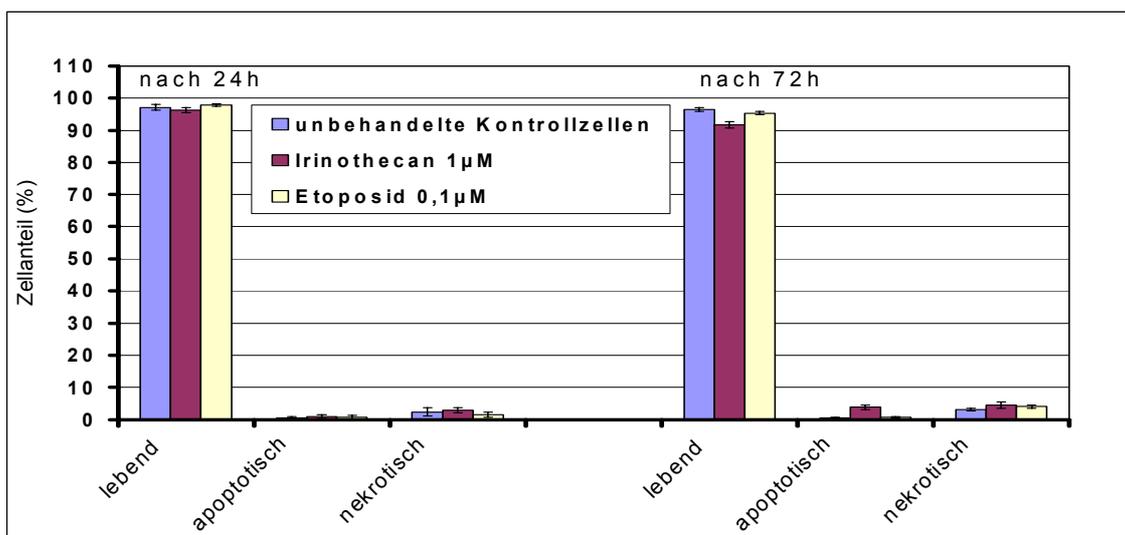


Abb. 3.3.9. Wirkung von Irinotecan- und Etoposid auf apoptotische und nekrotische Zellanteile in BON I Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit entweder nicht (blaue Balken), mit 1 μ M Irinotecan (rote Balken) oder 0,1 μ M Etoposid in den angegebenen Zeiträumen ohne Mediumwechsel inkubiert. Die Unterscheidung vitaler (lebend), apoptotischer und nekrotischer

Zellanteile erfolgte mit Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

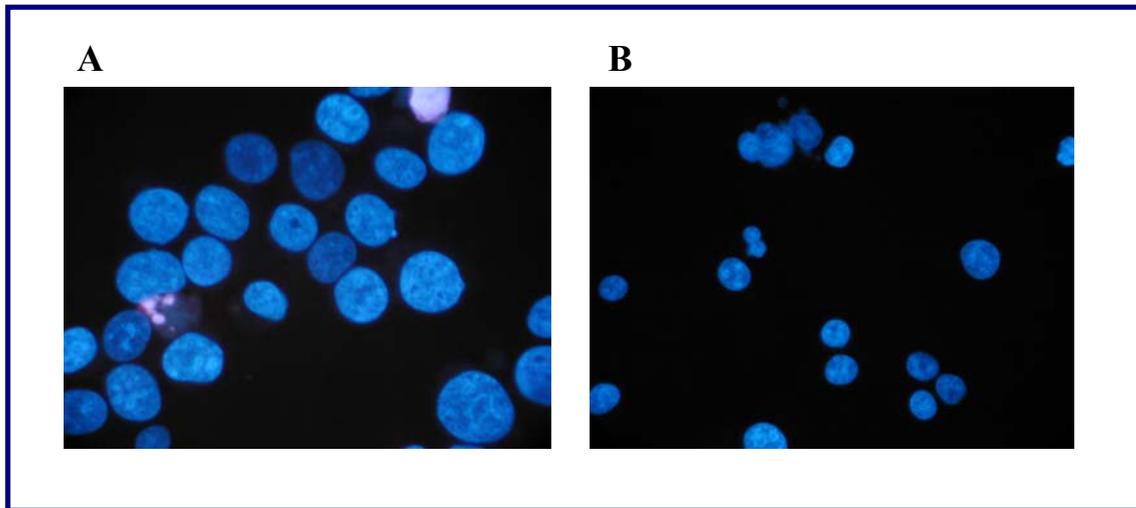


Abb. 3.3.10. Wirkung von Topoisomeraseinhibitoren auf die Kernmorphologie von BON I Zellen nach Hoechst 33342 und Propidiumiodid Anfärbung. Fluoreszenzmikroskopie x 400. (A) Mit Irinotecan (72h) behandelte Zellkerne: größerer Zellkern als bei unbehandelten Zellen, links unten spät-apoptotische Zelle, rechts oben nekrotische Zelle. (B) Mit Etoposid (24h) behandelte Zellen: Zellkerne zeigen keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass, analog zu den mit Doxorubicin und Cisplatin behandelten Zellen, ein Zusammenhang zwischen dem G2/M-Zellzyklusblock (s. 3.2.4.) und der Induktion von Apoptose besteht, der nach 72h am deutlichsten ist. Ebenso zeigten die vergrößerten Zellkerne einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase. Bei den Paclitaxel- und Vinblastin-behandelten Zellen war der G2/M-Arrest und die Induktion von Apoptose bereits nach 24h ausgeprägt (s. 3.2.2. und 3.3.2.).

Dagegen führte die Behandlung von BON I Zellen mit 0,1 μ M des Topoisomerase-II-Hemmers Etoposid innerhalb von 72h zu keinen Veränderungen der vitalen, apoptotischen oder nekrotischen Zellanteile (s. Abb. 3.3.9). Auch die Zellkerne erschienen im Vergleich zu unbehandelten Zellen unverändert (s. Abb. 3.3.10B).

3.4. *In vitro* Interaktion von Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel in BON I Zellen

3.4.1. Wachstumshemmung in BON I Zellen nach ^{60}Co -Bestrahlung

Obwohl die Strahlentherapie *per se* selten eine Therapieoption in neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren darstellt, kann in Einzelfällen bei lokaler ansonsten nicht zu therapierbaren Tumorausbreitung bei Pankreastumoren zur Tumorreduktion eine Bestrahlungstherapie erwogen werden (unpublizierte Beobachtungen). Der Effekt von Gammastrahlung durch Zerfall des künstlichen Isotops Kobalt 60 (Telekobaltgerät) sollte daher auf das Wachstumsverhalten von BON I Zellen quantifiziert werden. Der MTT-Test ergab im gewählten Strahlendosisbereich bei wiederholten Messungen in bestrahlten Zellen eine gleichmäßige Reduktion des Zellwachstums auf ungefähr 70-60% der unbestrahlten Zellen (s. Abb. 3.4.1.). Die niedrigere Überlebensrate bei einer Dosis von 13 Gray weist eine hohe Standardabweichung auf. Insgesamt wiesen die bestrahlten Zellen lichtmikroskopisch vergrößerte Zelldurchmesser auf.

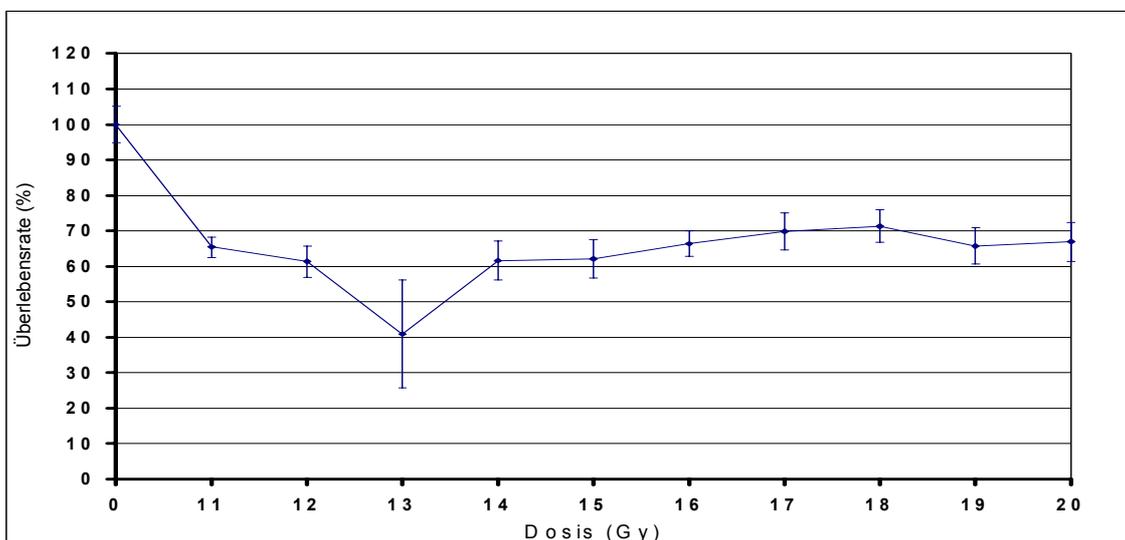


Abb. 3.4.1. Überlebensraten von BON I Zellen nach ^{60}Co -Bestrahlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden die Zellen in ansteigender Dosis bestrahlt und für weitere 72h ohne Mediumwechsel kultiviert. Die Überlebensraten der Zellen wurden mit dem MTT-Test ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Experimenten dargestellt.

Da in der Literatur über Messungenauigkeiten des MTT-Tests bei bestrahlten Zellen berichtet worden ist (Bunnak et al., 1994), wurden die Zellen zusätzlich mit Trypanblaufärbung gefärbt und die prozentualen überlebenden Zellanteile bei bestimmten Strahlendosierungen ausgezählt. Abbildung 3.4.2. zeigt die Ergebnisse bei einer Strahlendosis von 13 und 20 Gray.

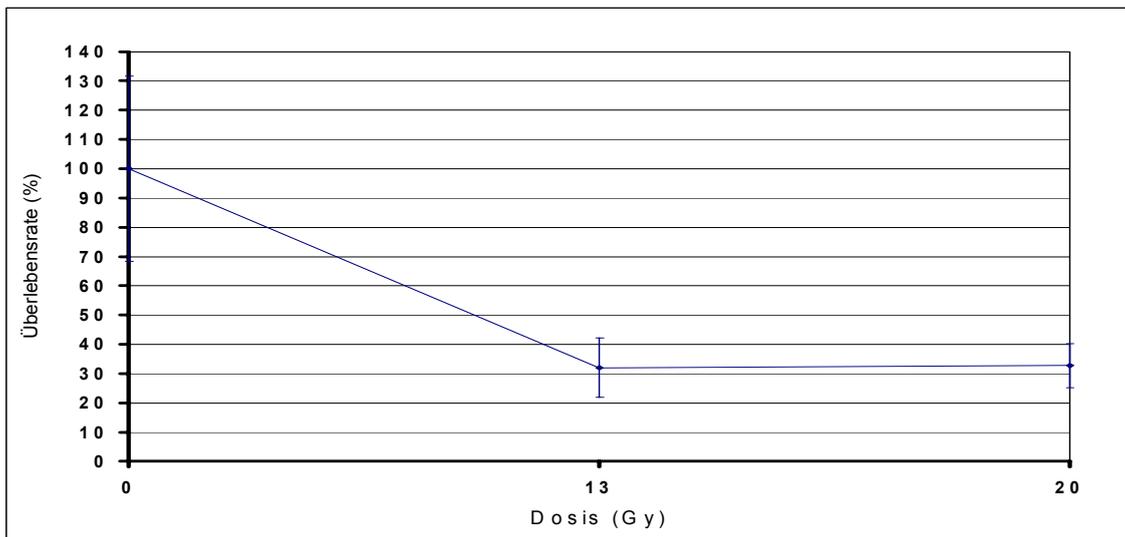


Abb. 3.4.2. Überlebensraten von BON I Zellen nach ^{60}CO -Bestrahlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden die Zellen mit einer Strahlendosis von 13 oder 20 Gy bestrahlt und für weitere 72h ohne Mediumwechsel kultiviert. Die Überlebensraten der Zellen wurden mit Trypanblau-Färbung und Auszählung ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Dabei zeigten beide Methoden im Vergleich, auch bei mehrfacher Wiederholung, unterschiedliche Überlebensraten, die ebenfalls bei niedrigeren Strahlendosen nachweisbar waren (nicht gezeigt). Das weist auf eine niedrigere Sensitivität des MTT-Tests bei bestrahlten BON I Zellen hin. Die mit beiden Methoden nachweisbare fehlende Zunahme der Wachstumshemmung der BON I Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis bis 20 Gray deutet darauf hin, dass die Bestrahlungsdosis mit dem maximalen proliferationshemmenden Effekt bereits überschritten wurde. Die lichtmikroskopisch vergrößerten bestrahlten Zellen können auf einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase oder auf einem Verlust des Zellteilungsvermögens bei fortgesetztem Zellwachstum und DNA-Replikation beruhen.

3.4.2. Kombination der Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel in BON I Zellen

Um die Wirkung der Telekobaltbestrahlung im niedrigeren Dosisbereich zu untersuchen und um eine mögliche synergistische oder antagonistische *in vitro* Interaktion mit Paclitaxel auf BON I Zellen zu festzustellen, wurden die Zellen entweder nur bestrahlt oder vor der Bestrahlung für 6h mit jeweils 0,1 μ M oder 0,01 μ M Paclitaxel inkubiert und die Überlebensraten mit Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 3.4.3. und 3.4.4. dargestellt. Bei den ausschließlich bestrahlten BON I Zellen kam es ab einer Strahlendosis von 4Gy zu einer Reduktion der Überlebenszeit mit einer maximalen Wachstumsreduktion auf ca. 45% bei 10 Gy. Nach Vorbehandlung mit 0,1 μ M Paclitaxel kam es zu keiner Veränderung der Überlebenszeit von BON I Zellen durch ^{60}CO -Bestrahlung, die im gesamten Strahlendosisbereich bei etwa 15% der Kontrolle lag, was darauf hinweist, dass der maximal wachstumshemmende Effekt bereits durch Paclitaxel-Vorbehandlung erreicht wurde. Dagegen zeigten die mit 0,01 μ M Paclitaxel vorbehandelten und anschließend bis 10Gy ^{60}CO -bestrahlten BON I Zellen eine maximale Wachstumsreduktion bis auf 20% der Kontrollzellen.

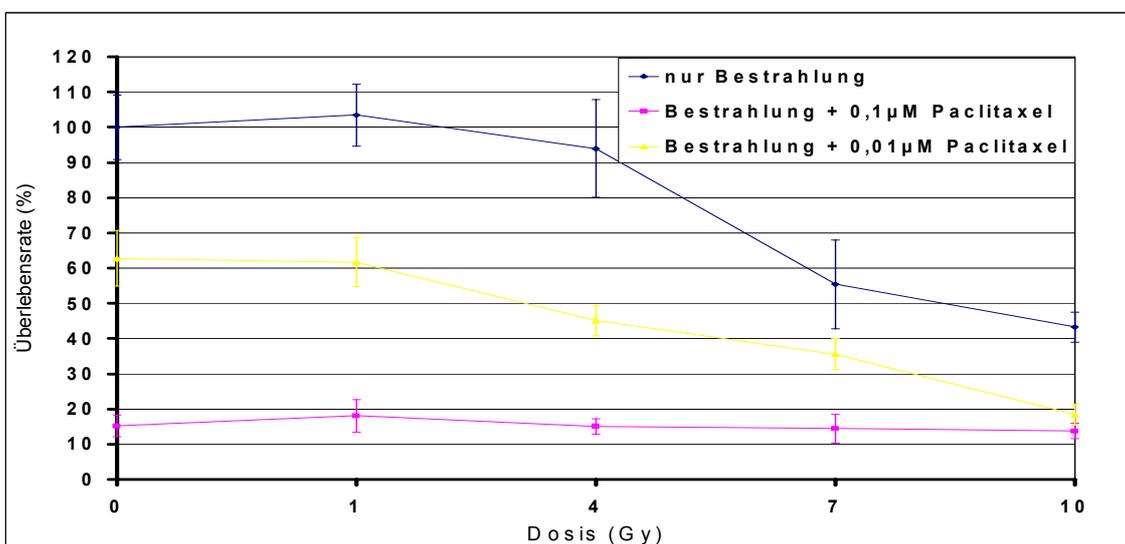


Abb. 3.4.3. Überlebensraten von BON I Zellen nach ^{60}CO -Bestrahlung mit und ohne Paclitaxel-Vorbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden die Zellen über 6h entweder mit 0,01 μ M (gelbe Kurve) oder 0,1 μ M Paclitaxel (violette Kurve) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die ^{60}CO -Bestrahlung mit den angegebenen Dosen. Als Kontrolle dienten nur bestrahlte Zellen (blaue Kurve). Nach einer weiteren 72-stündigen Inkubationszeit ohne Mediumwechsel wurden die überlebenden Zellen anhand der Trypanblau-Färbung ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige

Überlebensrate) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

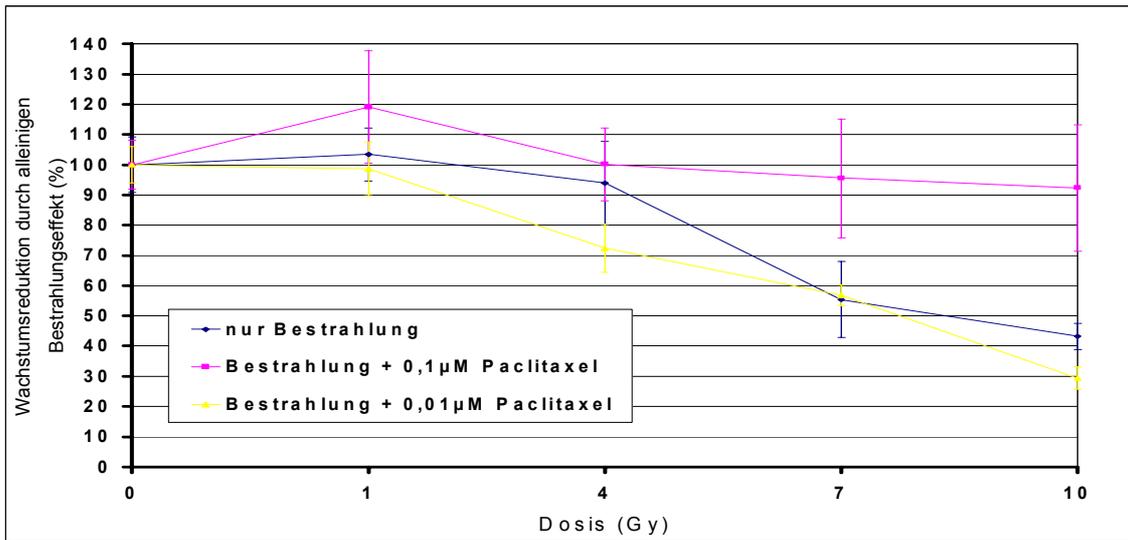


Abb. 3.4.4. Wirkung der ^{60}CO -Bestrahlung auf das BON I Zellwachstum mit oder ohne Paclitaxel Vorbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden die Zellen über 6h entweder mit 0,01µM (gelbe Kurve) oder 0,1µM Paclitaxel (violette Kurve) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die ^{60}CO -Bestrahlung mit den angegebenen Dosen. Als Kontrolle dienten nur bestrahlte Zellen (blaue Kurve). Angegeben sind die durch den alleinigen Bestrahlungseffekt bedingten Reduktionen im Zellwachstum. Nach einer weiteren 72-stündigen Inkubationszeit ohne Mediumwechsel wurden die überlebenden Zellen anhand der Trypanblau-Färbung ermittelt und sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (100%ige Überlebensrate) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt (siehe Abb. 3.4.3.).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kombination von ^{60}CO -Bestrahlung (10 Gy) und Vorbehandlung mit niedrig dosiertem Paclitaxel (0,01 µM) zu einer synergistischen zytotoxischen Wirkung führt.

3.4.3. Telekobaltbestrahlung in Kombination mit Paclitaxel-induzierten Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen

Um Veränderungen der Zellzyklusverteilung von BON I Zellen unter Telekobaltbestrahlung alleine und in Kombination mit Paclitaxel zu untersuchen, wurden die Zellen 6h ohne oder mit 0,01 µM Paclitaxel vorbehandelt, anschließend mit ansteigenden ^{60}CO -Bestrahlungsdosen behandelt, und nach 72 Stunden die Durchflusszytometrie durchgeführt.

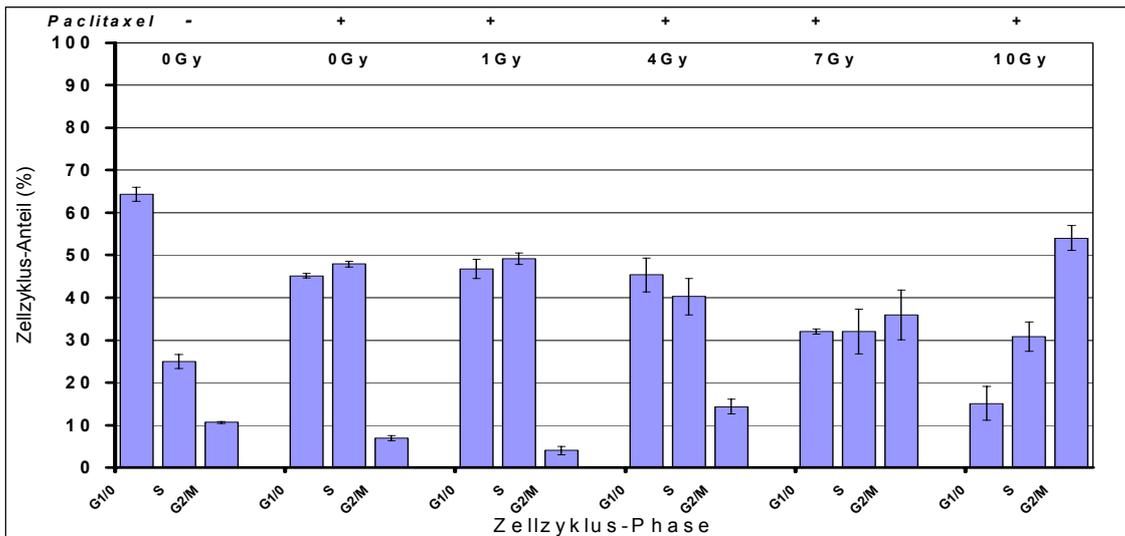


Abb. 3.4.5. Zellzyklusanalyse nach ^{60}CO -Bestrahlung von BON I Zellen mit und ohne Paclitaxel-Vorbehandlung. Nach 24-stündiger Vorinkubation wurden BON I Zellen über 6h ohne (-) oder mit 0,01 μM Paclitaxel (+) vorbehandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte, unbestrahlte BON I Zellen. Nach Mediumwechsel erfolgte die ^{60}CO -Bestrahlung mit ansteigenden Dosen (1 bis 10 Gy). Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden nach Färbung mit Propidiumiodid die Fluoreszenz mit einem Durchflußzytometer gemessen und die Zellzyklusphasenanteile quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Experimenten dargestellt.

Die FACS-Analysen (Abb. 3.4.5.) zeigten, dass die alleinige Paclitaxel-Vorbehandlung ohne oder mit niedrigen ^{60}CO -Bestrahlungsdosen zu einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der S-Phase führt mit maximal 50% bei 1Gy im Vergleich zu 25% der Kontrollzellen (unbestrahlt, unbehandelt). Die G0/1- und G2/M-Anteile gingen auf ca. 46,8%, bzw. 4,1% zurück. Bei höherer ^{60}CO -Bestrahlungsdosis kam es zu einem steigenden G2/M-Anteil der BON I Zellen, mit maximal ca. 54% bei 10Gy. Gleichzeitig ging die G0/1- und die S-Phase auf ca. 15,1%, bzw. 30,8% zurück.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der G2/M-Arrest bei 10Gy ein ^{60}CO -Bestrahlungseffekt ist, da alleinige 0,01 μM Paclitaxelbehandlung oder niedrige Strahlendosen zu keiner Zunahme des G2/M-Arrests führten. Damit läßt sich der synergistische zytotoxische Effekt (s. 3.4.2) bei 10Gy und 0,01 μM Paclitaxel-Vorbehandlung nicht durch Paclitaxel-bedingte Akkumulation der Zellen in der radiosensitiven G2/M-Phase des Zellzyklus erklären. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen (s. 3.2.2.), bei denen mit 0,01 μM Paclitaxel-behandelte BON I Zellen innerhalb von 24h keinen G2/M-Arrest aufwiesen. Andererseits läßt sich eine Mitwirkung von Paclitaxel am G2/M-Arrest nicht ganz

ausschließen, da die Zellzyklusverteilung an nur mit 10Gy bestrahlten Zellen nicht untersucht wurde.

3.5. Identifizierung Paclitaxel-modulierter zellzyklus- und apoptosespezifischer Gen- und Proteinexpression in BON I Zellen

Im folgenden sollten die an Proliferationshemmung, Zellzyklusblock und Apoptoseinduktion von Paclitaxel-behandelten BON I Zellen beteiligten molekularen Mechanismen identifiziert werden. Da ein konzentrations- und zeitabhängiger Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase mit Depletion der G0/1- und S-Phase nach Paclitaxel-Behandlung in BON I Zellen nachgewiesen wurde (s. 3.2.2.), sollte zunächst die Expression zellzyklusregulatorischer Gene bzw. Proteine untersucht werden. Die Untersuchung der Expression Zyklin-abhängiger Kinasen (CDKs), ihrer regulatorischen Untereinheiten (Zyklinen) und inhibitorischen Proteine (CKIs), die zusammen die Zellzyklusprogression regulieren, erfolgte mittels RT-PCR nach RNA-Isolierung aus Paclitaxel-be- und unbehandelten BON I Zellen. Es wurde die minimale Paclitaxel-Konzentration (0,1 μM) eingesetzt, die nach 24-stündiger Inkubationszeit noch zu einem G2/M-Arrest in BON I Zellen geführt hatte (s. 3.2.2.). Die PCR-Bedingungen sind im Material- und Methodenteil in Tabelle 2.5.1 aufgeführt. Als interner Standard diente die β -Aktin Expression. Zusätzlich wurde die Expression von Zellzyklus-Proteinen durch Western-Blot Analyse untersucht (s. 2.6.3. und 2.6.4.).

3.5.1. Paclitaxel-induzierte Zyklin B, D1 und D3 Expression und Inhibition von Zyklin E in BON I Zellen

BON I Zellen zeigten nach 48-stündiger Behandlung mit 0,1 μM Paclitaxel eine Heraufregulation des, den G2-/M- Phaseübergang regulierenden, *Zyklin B1* Gens (s. Abb. 3.5.1A.). Auch *Zyklin D1* und *D3*, welche an der Zellprogression von der G1- in die S-Phase beteiligt sind, wurden verstärkt transkribiert. Demgegenüber zeigte *Zyklin E* eine verminderte Expression in den Paclitaxel-behandelten Zellen. *Zyklin D2* wurde in BON I Zellen nicht exprimiert, *Zyklin A* wurde schwach in be- und unbehandelten Zellen gleichermaßen exprimiert. Die nach Paclitaxel-Behandlung herunterregulierte *Zyklin E* Proteinexpression bestätigte das Ergebnis der mRNA Expression. Dagegen

zeigten Zyklin B1, Zyklin D1 und D3 schwache Proteinbanden ohne sicheren Hinweis für einen Expressionsunterschied. Die als interner Standard eingesetzte Aktin Proteinexpression fiel in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen geringfügig schwächer als in unbehandelten Zellen aus. Vergleicht man die Aktin Proteinexpression mit der Zyklin B1 Expression, so könnte nach 24h eine vermehrte Expression des Zyklin B1 Proteins in Paclitaxel-behandelten Zellen vorliegen, jedoch konnte die nach 48h vermehrte *Zyklin B1* mRNA-Expression auf Proteinebene nicht bestätigt werden.

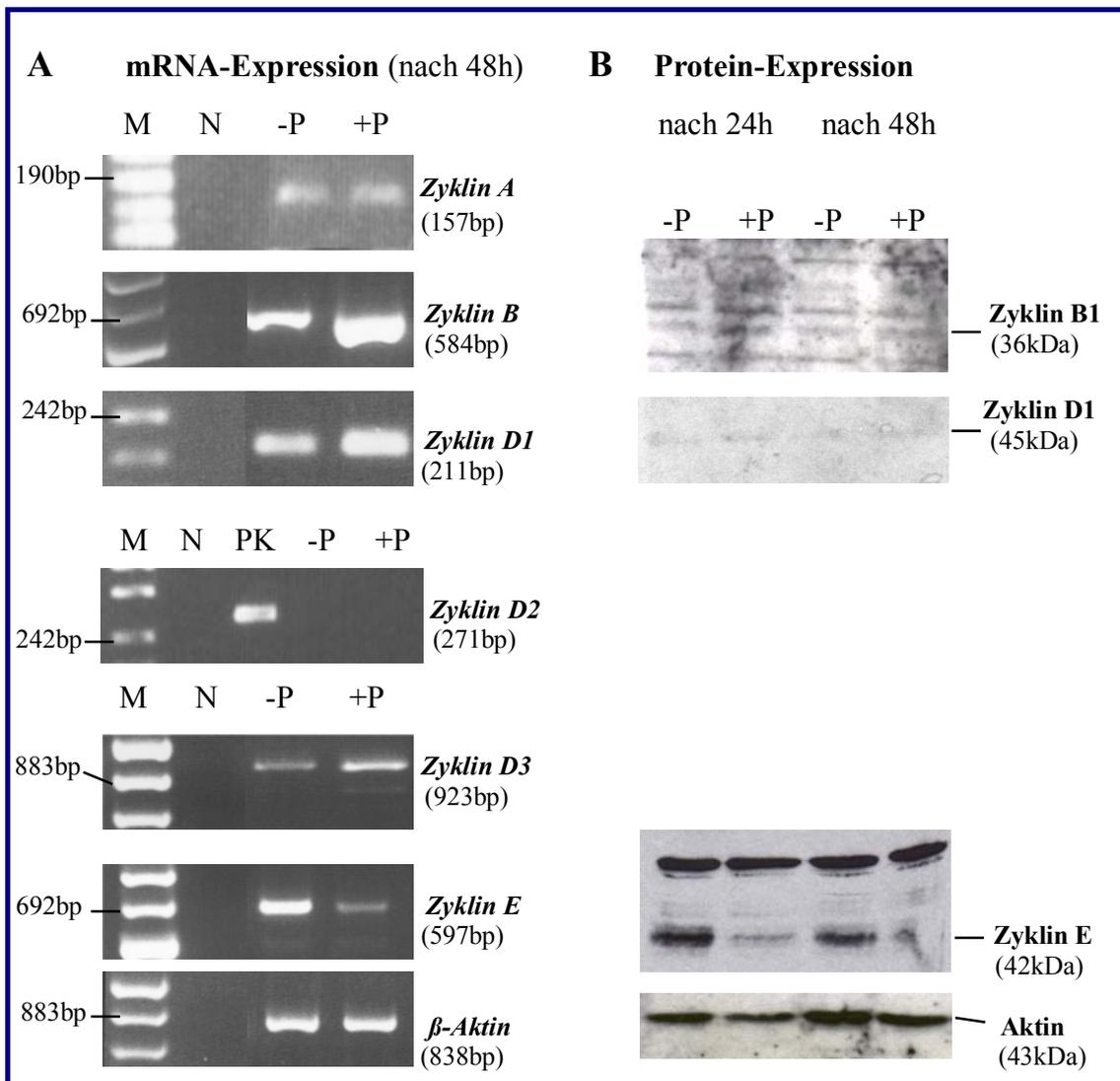


Abb. 3.5.1. Untersuchung der Paclitaxel-regulierten Zyklin Expression in BON I Zellen. (A) RT-PCR aus 48h und (B) Western Blot Analyse aus 24h bzw. 48h mit 0,1 μ M Paclitaxel ohne Mediumwechsel oder nur mit Lösungsmittel für Paclitaxel (Cremophor EL) im gleichen Zeitraum behandelte BON I Zellen. Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) oder Molekulargewichte der Proteine sind rechtsseitig angegeben. β -Aktin diente als interner Standard. M, DNA-Längenstandard (Marker), N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA H₂O in PCR-Ansatz), PK, Positiv-Kontrolle

(Pankreaskarzinomzelllinie Patu 8902), -P, unbehandelte Zellen, +P, Paclitaxel-behandelte Zellen. Bp, Basenpaar, kDa, Kilodalton. β -Aktin diente als interner Standard.

3.5.2. Paclitaxel-induzierte Genexpression von *CDK4* und *CDK6* in BON I Zellen

In den folgenden Untersuchungen wurde die Genexpression der Zyklin-abhängigen Kinasen *CDK2*, *-4* und *-6* und der Phosphatase *CDC25Hs* mit RT-PCR untersucht. Dabei zeigten *CDK4* und *-6*, deren Proteine im Komplex mit den D-Zyklinen zur Anlagerung von Phosphatgruppen an das Retinoblastom- (pRb) Protein und damit zur Freisetzung des pRb-gebundenen Transkriptionsfaktors E2F führen, in den über 48h mit 0,1 μ M Paclitaxel behandelten BON I Zellen eine verstärkte mRNA-Expression (s. Abb. 3.5.2.). Die Expression von *CDK2*, dessen Protein von Zyklin E und A aktiviert wird, sowie von *CDC25Hs* blieb weitgehend unverändert.

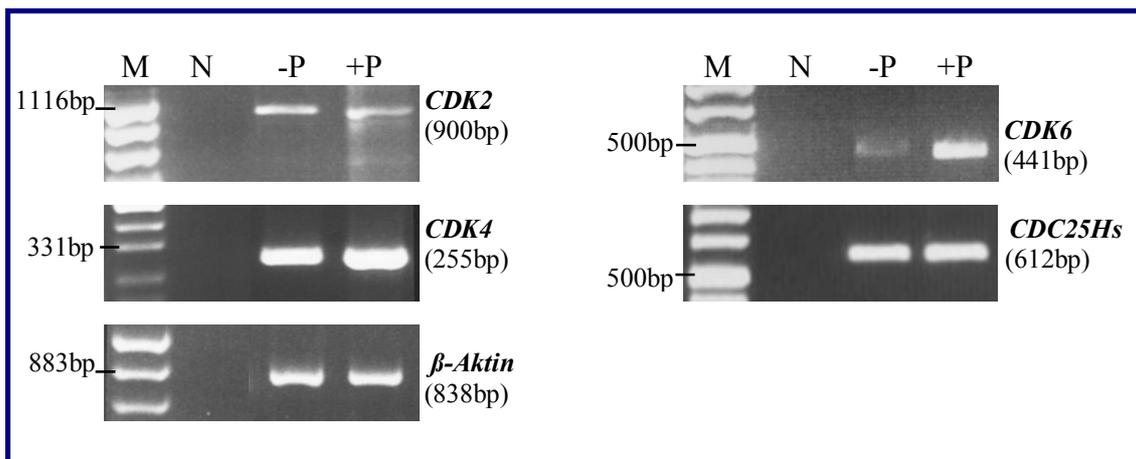


Abb. 3.5.2. Untersuchung der Paclitaxel-regulierten Expression von Zyklin-abhängigen Kinasen und *CDC25Hs* in BON I Zellen. RT-PCR Analyse aus 48h mit 0,1 μ M Paclitaxel ohne Mediumwechsel oder nur mit Lösungsmittel für Paclitaxel (Cremophor EL) im gleichen Zeitraum behandelte BON I Zellen. Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) rechtsseitig angegeben. β -Aktin diente als interner Standard. M, DNA-Längenstandard (Marker) linksseitig, N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA H₂O in PCR-Ansatz), -P, unbehandelte Zellen, +P, Paclitaxel-behandelte Zellen. Bp, Basenpaar.

3.5.3. Paclitaxel-induzierte Regulation der CDK-Inhibitoren $p18^{INK4c}$, $p21^{WAF1/CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ in BON I Zellen

Es sollte die Paclitaxel-induzierte Regulation der Expression der CDK-Inhibitoren (CDKIs) anhand von RT-PCR und Western Blot im Hinblick auf die beobachteten Zellzyklusveränderungen (s. 3.2.2.) und Induktion von Apoptose (s. 3.3.2.) untersucht werden. Der Expressionsverlust der CDK-Inhibitoren $p15^{INK4b}$ und $p16^{INK4a}$ durch homozygote Deletion des *CDKN2A* Genlokus ist in BON I bekannt (Lubomierski et al., 2001). Daher wurde die Expression der übrigen CDKIs, $p18^{INK4c}$, $p21^{WAF1/CIP1}$ und $p27^{KIP1}$, die die Zellzyklusprogression und autonomes Wachstum durch Hemmung vieler CDK-Zyclin-Komplexe verhindern (s. 1.4.3.) untersucht. Alle drei Genprodukte zeigten nach 48h Paclitaxel-Behandlung eine erhöhte mRNA-Expression (s. Abb. 3.5.3A.). Das Tumorsuppressorgen p53 war in BON I Zellen kaum aussagekräftig amplifiziert. Gegenüber den RT-PCR Ergebnissen zeigten $p21^{WAF1/CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ eine verminderte Proteinexpression in Paclitaxel-behandelten Zellen (s. Abb. 3.5.3B.), wobei die densitometrische Analyse der Bandenstärken im Vergleich zur Aktin Proteinexpression jedoch nur für $p27^{KIP1}$ eine signifikant verminderte Expression ergab.

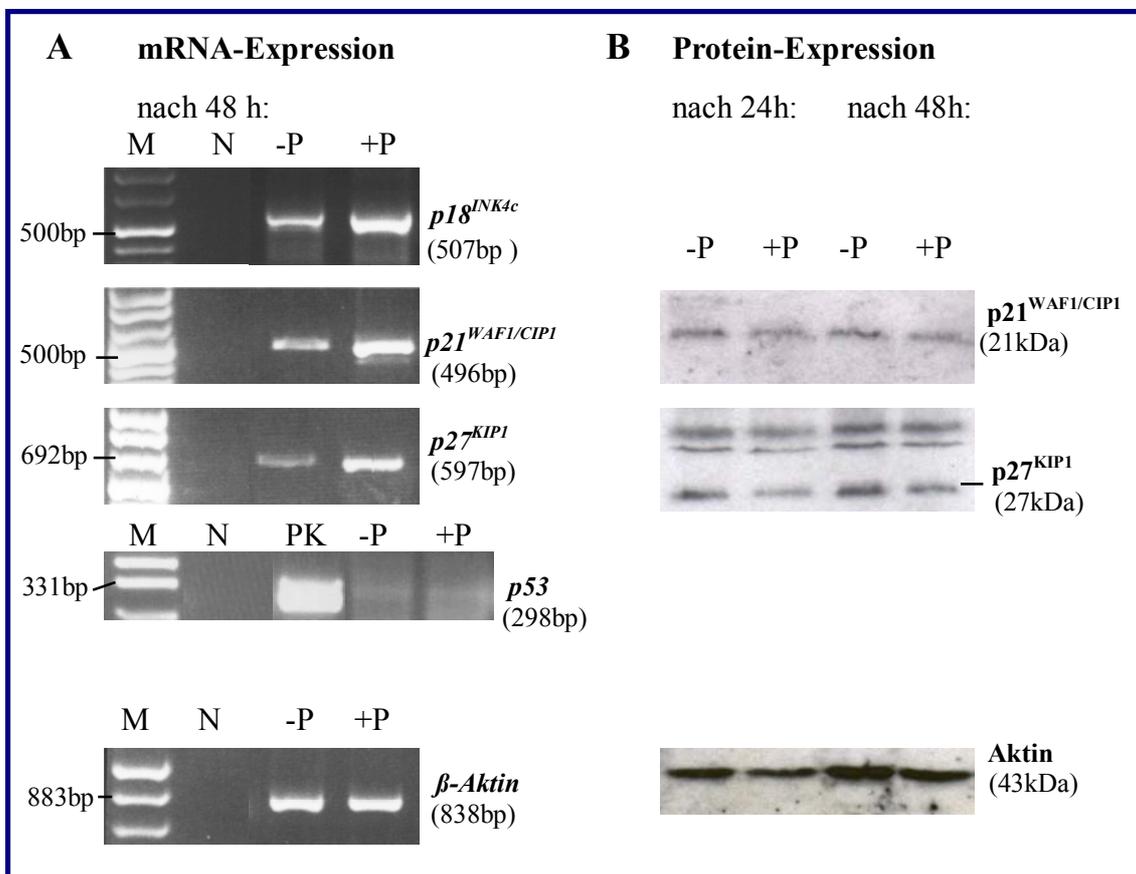


Abb. 3.5.3. Untersuchung der Paclitaxel-regulierten Expression von CDK-Inhibitoren und p53 in BON I Zellen. (A) Semiquantitative RT-PCR aus 48h (B) Western Blot Analyse aus 24h bzw. 48h mit 0,1µM Paclitaxel ohne Mediumwechsel oder nur mit Lösungsmittel für Paclitaxel (Cremophor EL) im gleichen Zeitraum behandelte BON I Zellen. Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) oder Molekulargewichte der Proteine sind rechtsseitig angegeben. β-Aktin diene als interner Standard. M, DNA-Längenstandard (Marker), N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA Einsatz von H₂O in PCR-Ansatz), PK, Positiv-Kontrolle (Pankreaskarzinomzelllinie Patu 8902), -P, unbehandelte Zellen, +P, Paclitaxel-behandelte Zellen. Bp, Basenpaar, kDa, Kilodalton.

Die gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine p53-unabhängige Genaktivierung von *p18^{INK4c}*, *p21^{WAF1/CIP1}* und *p27^{KIP1}* nach Paclitaxel-Behandlung hin, wobei unerwarteterweise die Überexpression von *p21^{WAF1/CIP1}* und *p27^{KIP1}* mRNA zu keinem Zeitpunkt mit der Proteinexpression korrelierte, und posttranslationelle Prozesse in Betracht gezogen werden können, die im Sinne eines „Feedbacks“ zu einer reaktiv veränderten mRNA-Expression geführt haben könnten.

3.5.4. Paclitaxel verändert die Expression der apoptosespezifischen Gene *Bcl-xL*, *Bax* und *Bcl-2* in BON I Zellen nicht

Aufgrund der zeitabhängigen Apoptoseinduktion in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen sollten mit Hilfe eines Multiplex-PCR-Kits (s. 2.5.4.) die Expression verschiedener an der Apoptose beteiligter Gene untersucht werden. Dabei wurde speziell die Caspasenaktivierung und Expression von Genen der Bcl-2-Familie in 48h mit 0,1 µM Paclitaxel-behandelten- und unbehandelten BON I Zellen untersucht. Aussagen zu Genexpressionsunterschieden zwischen be- und unbehandelten Zellen wurden durch Abgleich des gleichzeitig mitamplifizierten „House-keeping-Gene“ *GAPDH* ermöglicht. In Tabelle 2.5.2. sind die untersuchten Genprodukte und PCR-Bedingungen spezifiziert. Die Ergebnisse zeigen keine Paclitaxelabhängigen Expressionsunterschiede (s. Abb. 3.5.4.) des pro-apoptotischen Mitglieds *Bax* noch der anti-apoptotischen Mitglieder *Bcl-2* und *Bcl-xL*. Die Cystein-Protease LICE (Caspase-3), welche an der intrazellulären proteolytischen Kaskade des Apoptosesignals (s. 1.5.6.) beteiligt ist, war in BON I Zellen nicht in nachweisbarer Menge exprimiert und pro-apoptotisches *Bcl-xS* kaum nachweisbar (Pfeil). Insgesamt lässt sich somit im gewählten Beobachtungszeitraum keine Beeinflussung der Genregulation dieser pro-

und antiapoptotischen Proteine feststellen, so dass eine Regulation auf Proteinebene, z.B. durch translationelle Prozesse anzunehmen ist.

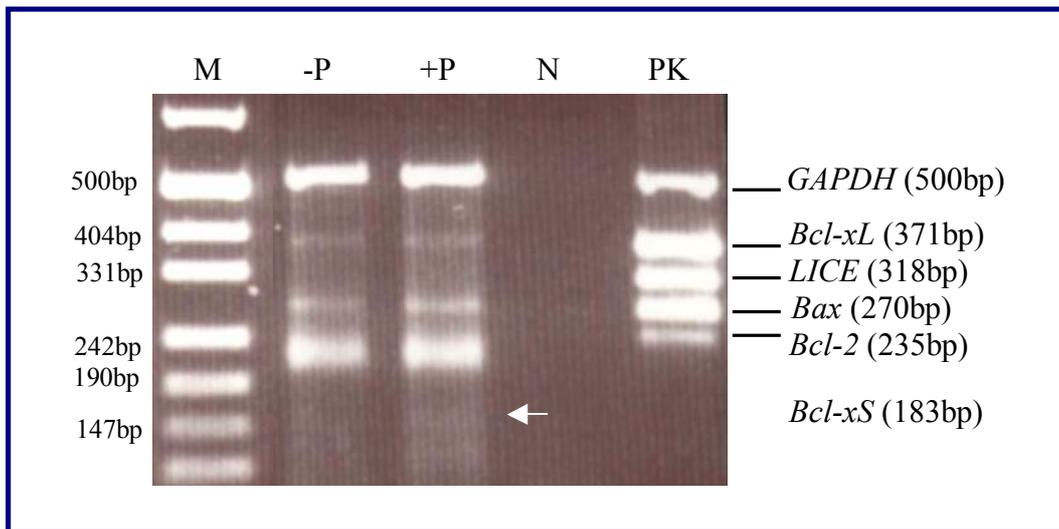


Abb. 3.5.4. Untersuchung der Paclitaxelwirkung auf die Expression apoptoseassoziiierter Gene in BON I Zellen. Multiplex-PCR Analyse aus 48h mit 0,1 μ M Paclitaxel ohne Mediumwechsel oder nur mit Lösungsmittel für Paclitaxel (Cremophor EL) im gleichen Zeitraum behandelte BON I Zellen. Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) rechtsseitig angegeben. GAPDH diente als interner Standard. M, DNA-Längenstandard (Marker) linksseitig, N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA H₂O in PCR-Ansatz), cDNA-Positivkontrolle aus dem Kit (für Bcl-xS ist keine cDNA-Matrize in der Positiv-Kontrolle vorhanden), -P, unbehandelte Zellen, +P, Paclitaxel-behandelte Zellen. Bp, Basenpaar.

3.6. Genexpressionsanalyse in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen mit cDNA-Arrays

Um weitere Kenntnis über Paclitaxel-abhängige Veränderungen im Expressionsprofil apoptose- und zellzyklusregulierender und signaltransduktion-assoziiierter Gene in BON I Zellen zu gewinnen, wurden cDNA-Arrays eingesetzt. Diese ermöglichen es, eine höhere Anzahl von Genen zeitgleich zu analysieren. Als Ausgangsmaterial diente die Gesamt-RNA aus nicht oder mit Paclitaxel-behandelten BON I Zellen. Expressionsunterschiede wurden durch Abgleich der Expressionsstärken mit den House-keeping-Genen β -Aktin und GAPDH ermittelt (s. 2.5.8.).

3.6.1. Genexpressionsprofil des „Human Pathway Finder GEArray Kits“ in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen

Mit Hilfe des „Human Pathway Finder-1 GEArray Kits“ sollte untersucht werden, ob es in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen zur Induktion bekannter Signaltransduktionswege kommt, welche Mitglieder aktiviert werden und welches Expressionsmuster in nativen BON I Zellen vorliegt. Dabei wurden folgende Signalwege und Marker Gene überprüft:

- 1.) Mitotischer Signalweg; Marker-Gene: *egr-1*, *c-fos*
- 2.) Stress-Signalweg; Marker-Gene: *c-myc*, *ATF-2*, *c-fos*, *p53*, *hsf1*, *hsp27*, *hsp90*
- 3.) NFκB-Signalweg; Marker-Gene: *iNOS*, *NFκB*, *IκB-α*, *c-myc*
- 4.) NFAT-Signalweg; Marker-Gene: *IL-2*, *FasL*, *CD5*
- 5.) Antiproliferations-/TGFβ-Signalweg; Marker-Gene: *p19*, *p21^{WAF1}*, *p57^{KIP2}*
- 6.) Wnt-Signalweg; Marker-Gene: *c-myc*
- 7.) p53-Signalweg; Marker-Gene: *p21^{WAF1}*, *pig 7*, *pig 8*, *mdm2*, *gadd45*, *Bax*
- 8.) CREB-Signalweg; Marker-Gene: *egr-1*, *CYP19* (aromatase p450), *c-fos*

Für die Versuche wurde analog zu den RT-PCR Versuchen RNA aus unbehandelten und mit 0,1μM Paclitaxel über 48h behandelten BON I Zellen für die Arrays (s. 2.5.1.) eingesetzt. Nach 48-stündiger Exposition und densitometrischer Auswertung zeigte sich das folgende Expressionsmuster (s. Abb. 3.6.1.). Die Tabellen 3.6.1 - 3.6.3. fassen die unterschiedlich, gleich, oder nicht exprimierten Gene mit Angabe von Name, Genbank-Nummer, Position und Densitometrieauswertung zusammen. In Abb. 3.6.2. sind die Genexpressionsstärken der behandelten Zellen im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen nach densitometrischer Auswertung im Vergleich zu den „House-keeping-Genen“ graphisch dargestellt.

Es zeigte sich, dass es nach Paclitaxel-Behandlung, bei nicht nachweisbarer p53-Expression, zu einer Aktivierung p53-induzierbarer Gene (*pig8*, *gadd45*, *Bax*), sowie einer verstärkten Transkription der Stressignal- und Mitose-assoziierten Gene *ATF2* und *egr-1* in den Zellen kommt, wobei jedoch die mit (*) gekennzeichneten Gene (Tab. 3.6.1.) in den unbehandelten Zellen keine sichere Expression im Array zeigten. Aufgrund der sehr schwachen Expression von *hsp27* in Paclitaxel-behandelten Zellen ließ sich keine Aussage über eine Heraufregulation treffen.

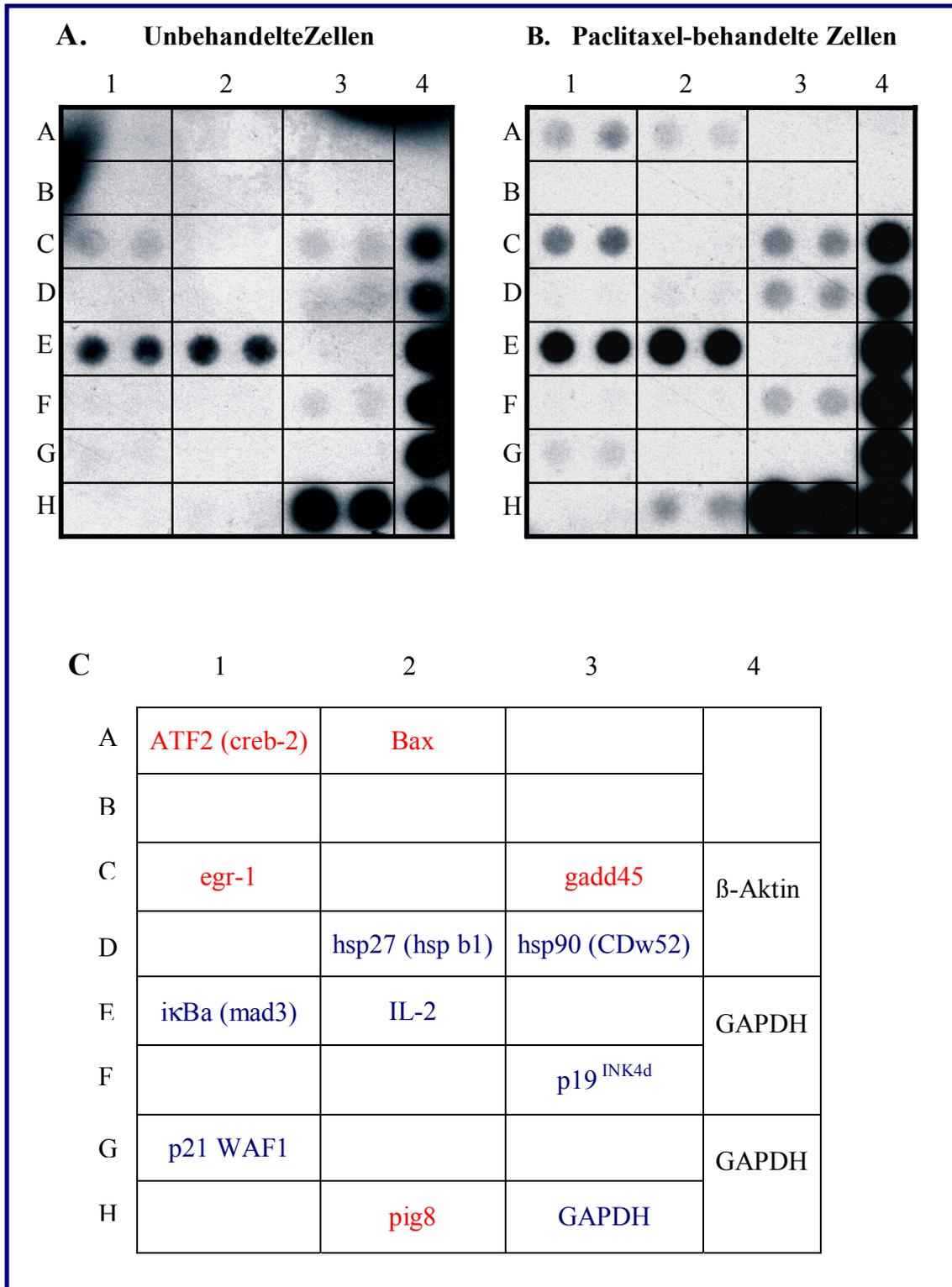


Abb. 3.6.1. Expressionsprofil von unbehandelten- und Paclitaxel-behandelten BON I Zellen anhand des „Human Pathway Finder GEArray“. (A) Unbehandelten BON I Zellen (nur Lösungsmittel Cremophor EL), (B) 0,1µM Paclitaxel-behandelte Zellen über 48h ohne Mediumwechsel, (C) schematische Übersicht mit Abkürzungen und Positionsangaben der im cDNA-Array exprimierten Gene. Unterschiedlich exprimierte Gene sind rot, gleichartig exprimierte Gene blau und die House-Keeping-Gene schwarz markiert. Die nichtexprimierten Gene in den leeren Feldern sind in Tab. 3.6.3. aufgeführt.

Tab. 3.6.1. Human Pathway Finder GEMatrix: Paclitaxel-abhängig exprimierte Gene und „House-keeping“ Gene in BON I Zellen

Pos.	Genbank-Accession	Genbeschreibung und Abkürzung	Dichte unbehandelte Zellen	Dichte behandelte Zellen	Verhältnis be-/unbehandelte Zellen
		house-keeping-Gene:			
4C,D	X 00351	β-Aktin	39,26	100	2,55
4H	M 33197	GAPDH	45,89	60	1,31
3H			112,45	170,92	1,52
		unter Paclitaxel überexprimierte Gene:			
3C	M 60974	DNA-damage-inducible transcript 1 (gadd45)	4,65	15,46	3,32
1C	X 52541	early growth response (egr-1)	3,75	22	5,87
2A	L 22474	bcl-2-associated X protein (bax)	-1,26	4,7	*
2H	AF010313	Etoposide-induced mRNA (pig8)	-0,35	8,45	*
1A	X 15875	cAMP responsive element binding protein 2 (ATF2) (creb-2)	-1,55	11,31	*

Tab. 3.6.2. Human Pathway Finder GEMatrix: Paclitaxel-unabhängig exprimierte Gene in BON I Zellen

Pos.	Genbank-Accession	Genbeschreibung und Abkürzung	Dichte unbehandelte Zellen	Dichte behandelte Zellen	Verhältnis be-/unbehandelte Zellen
3D	X 15183	90 kDa. heat shock protein (hsp90) (CDw52)	5,43	11,14	2,05
3F	U 40343	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19 INK4d)	3,45	8,5	2,46
2D	Z 23090	27 kDa. heat shock protein (hsp27) (hsp b1)	-0,84	1,43	*
2E	U 25676	Interleukin 2 (IL-2)	39,8	84,84	2,13
1E	M 69043	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (ikBa) (mad3)	35,22	67,78	1,92
1G	L 47233	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF1/ CIP1)	1,98	4,05	2,05

Tab. 3.6.3. Human Pathway Finder GEMatrix: In BON I Zellen nicht nachweisbare Gene

Pos.	Genbank-Accession	Genbeschreibung und Abkürzung
3A	X 04391	T-Cell Surface Glycoprotein CD5 (CD5)
1B	V 01512	Human cellular oncogene c-fos (c-fos)
2B	J 00120	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-myc)
3B	M 28420	Cytochrom p450, subfamily XIX (cyp19) (aromatase p450) (p450XIX)
2C	U 08137	Ligand for Fas (FasL)
1D	M 64673	Heat shock factor protein (hsf1) (tcf5)
3E	L 09210	Inducible nitric oxide synthase (NOS) (iNOS)
1F	Z 12020	Mouse double minute 2, human homolog of; p53-binding protein (mdm2)
2F	M 58603	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105) (NFκB)
2G	M 14694	Tumor protein p53 (p53)
3G	U 22398	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57KIP2)
1H	AF010312	LPS-induced TNF-alpha factor (pig7)

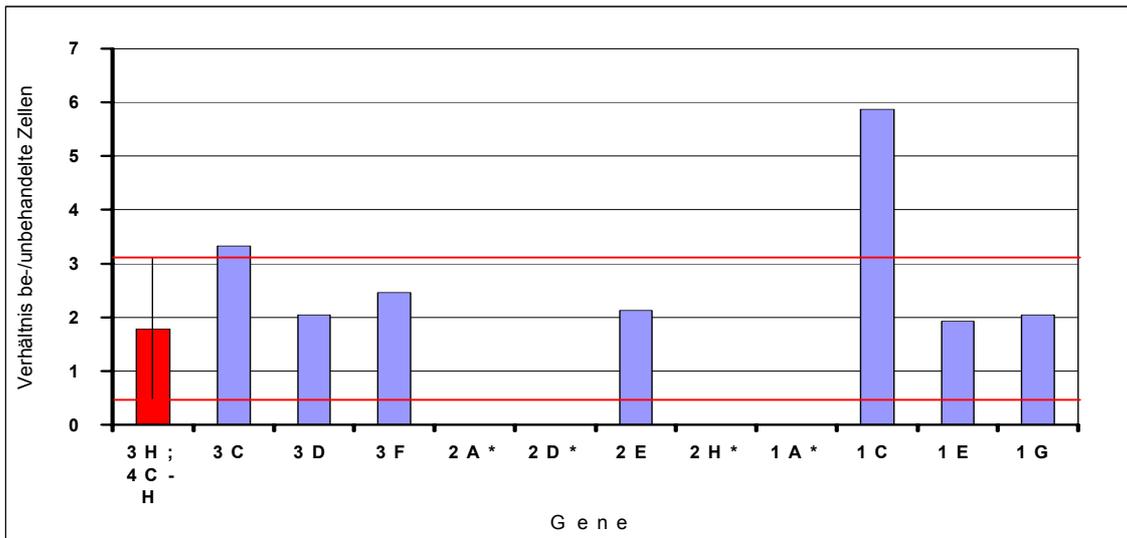


Abb. 3.6.2. Verhältnis der densitometrisch gemessenen Genexpression zwischen Paclitaxel be- und unbehandelten BON I Zellen. Als Standard dient der Quotient der Expressionsstärken der Housekeeping-Gene von be- und unbehandelten Zellen (roter Balken ± 2 Standardabweichungen). Die in Paclitaxel-behandelten Zellen überexprimierten Gene liegen oberhalb der roten Begrenzungslinie. Auf der x-Achse sind die Positions-Koordinaten (s. Abb. 3.6.1., Tabelle 3.6.1. und 3.6.2.) aufgetragen. (*), Expression der Gene (2A, 2H, 1A) in unbehandelten Zellen nicht nachweisbar, 2D bei zu schwachem Hybridisierungssignal nicht beurteilbar.

Im Unterschied zur Multiplex-PCR (s. 3.5.4.) wurde im cDNA-Array eine verstärkte Expression von proapoptotischem *Bax* in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen nachgewiesen, was auf eine verminderte Sensitivität der Multiplex-PCR hinweisen könnte. Demgegenüber konnte die mit der RT-PCR gezeigte Heraufregulation von *p21^{WAF1}* in behandelten Zellen mit dem cDNA-Array nicht nachgewiesen werden. Die RT-PCR ist hier zum Nachweis geringerer Unterschiede möglich sensitiver. Unter Paclitaxel herunterregulierte Gene wurden nicht identifiziert.

3.6.2. Identifizierung Paclitaxel-abhängiger Genexpression in BON I Zellen unter Einsatz des „Atlas Human Apoptosis Arrays“

Die Erweiterung des Paclitaxel-abhängigen Genexpressionsprofils von BON I Zellen erfolgte anhand des umfangreichen „Atlas Human Apoptosis Array“ (Clontech). Dabei wurde die Expression einer Vielzahl regulatorischer und Zellzyklus-assoziiierter Gene, des p53-Pathways, der an der Apoptose beteiligten Bcl-2-Familie und der Caspasenkaskade sowie weiteren Liganden, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren untersucht. Nach Hybridisierung der Nylonmembranen und 24-stündiger

Aktivitätsmessung durch einen Phosphorimager (s. 2.5.8.4.), stellte sich das Expressionsprofil von mit Paclitaxel be- und unbehandelten BON I Zellen dar (Abb. 3.6.3. und 3.6.4.). In den Tabellen 3.6.4. - 3.6.6. sind diejenigen Gene mit Angabe von Name, Position, Genbanknummer und Densitometrieergebnis zusammengefasst, die in be- und unbehandelten BON I Zellen unterschiedlich, gleichartig oder nicht exprimiert wurden.

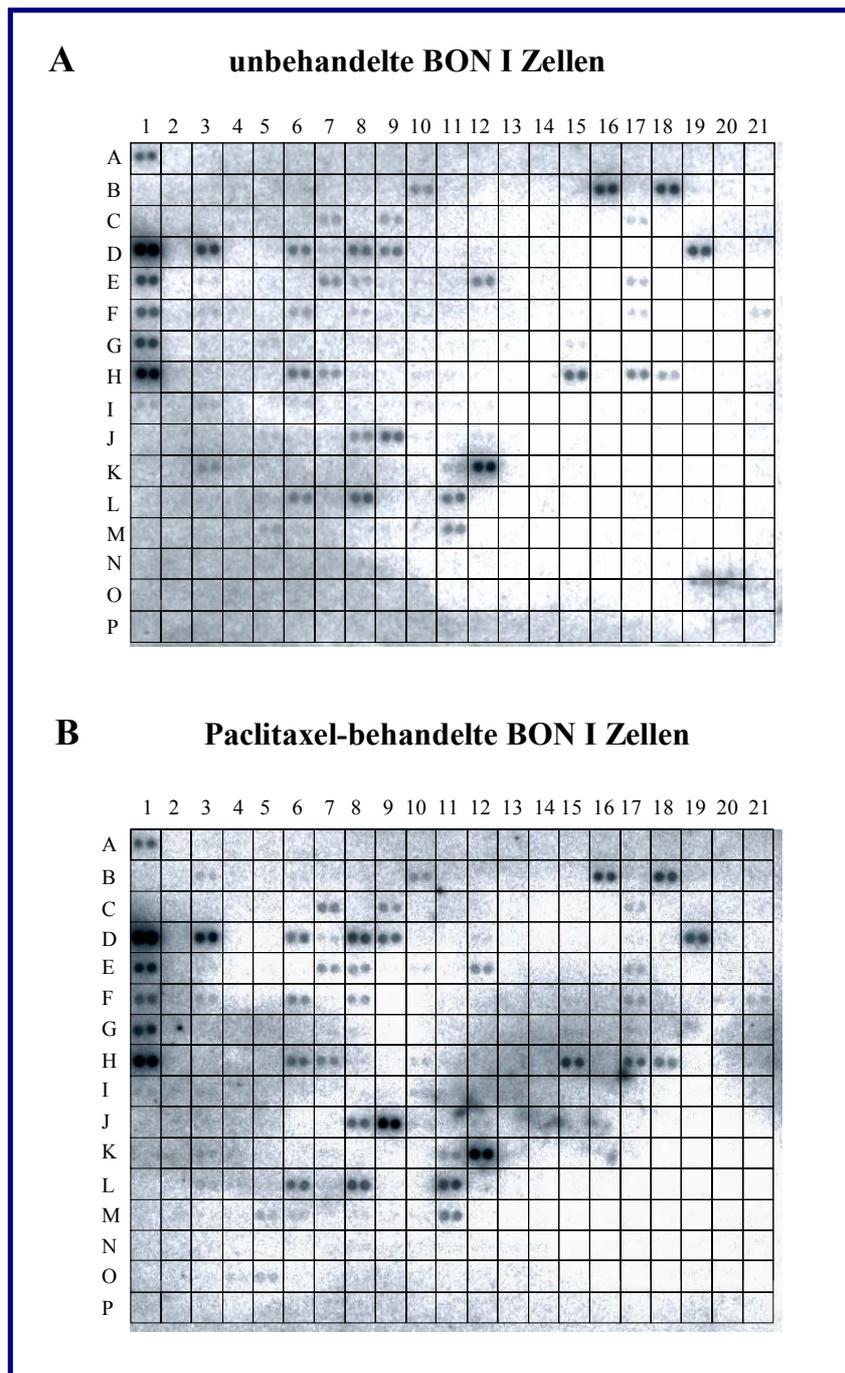


Abb. 3.6.3. Parallele Analyse der Genexpression in BON I Zellen mit oder ohne Paclitaxelbehandlung. Die Gesamt-RNA wurde aus behandelten-und nichtbehandelten BON I Zellen isoliert, in cDNA reverse transkribiert, mit α - 32 P dATP radioaktiv markiert und mit dem „Atlas Human

Apoptosis Array⁶ hybridisiert. (A) Expressionsprofil unbehandelter Zellen (nur Lösungsmittel Cremophor EL), (B) Expressionsprofil von behandelten Zellen mit 0,1µM Paclitaxel über 48h ohne Mediumwechsel.

Abbildung 3.6.4. Abkürzungen und Positionen der im Atlas Human Apoptosis Array exprimierten Gene (unterschiedlich rot; gleichartig blau, House-keeping-Gene schwarz)

	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18	19	21
A	GAPDH															
B		CDC2						GSTTL p28				IGF2		RAC- PK-beta		
C					MAPK10 JNK3A2		PFDN5						IGFBP6			
D	HLAC	CDK3		CDC34	MAPKK5	E2F-3	NME2 NM23B								RHOA; ARHA	
E	RPL13A				MAPKK1	E2F-5				MAPKKK14 NIK		DAPK1				
F	RPS9	CDK5		CDC37 homol.		DP-1							FAST			GSTT1
G	UBC															
H	phospho- lipase A2			MAPK3 ERK1	PCNA							IGF-1	PKB	CD27BP		
I	HPRT1															
J						GRB- IR / GRB10	pig6									
K		CDC25A							CASP8 FLICE	CRAF-1						
L				MAPK7 ERK5		RAFBI			CASP9 APAF3							
M			PLK						CASP10 FLICE2							
N																
O			NEDD5 protein homol.													
P																

Tab. 3.6.4. Atlas Human Apoptosis Array: unterschiedlich exprimierte und House-keeping Gene

Pos.	Genbank- Accession	Genbeschreibung und Abkürzung	Dichte unbehandelte Zellen	Dichte behandelte Zellen	Verhältnis be- /unbehandelte Zellen
		house-keeping-Gene:			
1A	X 01677	liver glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	5,22	4,41	0,84
1D	M 11886	major histocompatibility complex class	100	100,14	1

		I C (HLAC)			
1E	X 56932	ribosomal protein L13A (RPL13A)	12,18	16,61	1,36
1F	U 14971	ribosomal protein S9 (RPS9)	7,44	6,59	0,89
1G	M 26880	ubiquitin C (UBC)	13,42	14,31	1,07
1H	M 86400	phospholipase A2	47,36	55,13	1,16
1I	V 00530	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	0,55	0,26	0,47
		unter Paclitaxel überexprimierte Gene:			
3B	X 05360	cell division control protein 2 homolog (CDC2)	0,11	0,81	7,36
3F	X 66364	cell division protein kinase 5 (CDK5)	0,52	0,89	1,71
5O	D 63878	NEDD5 protein homolog; DIFF6; KIAA0158	0,02	0,93	46,5
6F	U 63131	CDC37 homolog	1,33	2,23	1,68
7C	U 34819; U 07620	mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10); c-jun N-term. kinase 3 alpha 2 (JNK3A2)	1,42	2,77	1,95
8D	Y 10479	E2F transcription factor 3 (E2F-3)	4,9	9,21	1,88
8E	U 15642	E2F transcription factor 5 (E2F-5)	0,9	1,78	1,98
8F	L 23959	E2F dimerization partner 1 (TFDP-1); (DP1)	0,75	1,59	2,12
8J	U 69276	GRB-IR / GRB10	2,25	4,64	2,06
9J	AF010310; AF010311	p53 induced protein (pig6)	5,39	32,16	5,97
11L	U 56390; U 60521	caspase-9 (CASP9); ICE-LAP6; APAF3	4,3	9,47	2,2
15H	M 27544; M 37484	insulin-like growth factor I (IGF-1); somatomedin C	5,07	8,94	1,76
17F	X 86779	fas-activated serine / threonine kinase (FAST)	0,51	1,15	2,25
18H	U 82938	CD27-binding protein (CD27BP); Siva	1,15	2,92	2,54

Tab. 3.6.5. Atlas Human Apoptosis Array: in be- und unbehandelten Zellen gleichartig exprimierte Gene

Pos.	Genbank-Accession	Genbeschreibung und Abkürzung	Dichte unbehandelte Zellen	Dichte behandelte Zellen	Verhältnis be-/unbehandelte Zellen
		Zellzyklus-assoziierte Gene:			
3D	X 66357	cyclin dependent kinase 3 (CDK3)	11,97	18,1	1,51
3K	M 81933	cell division cycle 25 homolog A (CDC25A)	1,95	0,93	0,48
5M	U 01038	polo-like kinase (PLK)	1,06	0,89	0,94
6D	L 22005	ubiquitin-conjugating enzyme E2 (CDC34)	3,73	3,97	1,06
6H	X 60188	mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) (ERK1)	3,86	4,42	1,15
6L	U 25278	mitogen-activated protein kinase 7 (MAPK7) (ERK5)	3,14	4,61	1,47
7D	U 25265	mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAPKK5)	0,27	0,34	1,26
7E	L 05624	mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1)	2,1	1,69	0,8
7H	M 15796; J 04718	proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA)	1,6	2,17	1,36
		Onkogene:			
8L	M 95712	B-raf proto-oncogene (RAFBI)	6,68	7,17	1,07

9C	D 89667	c-myc binding protein MM-1; prefoldin 5 (PFDN5)	1,35	1,7	1,26
9D	L 16785; M 36981	protein expressed in nonmetastatic cells 2 (NME2); nonmetastatic protein 23B (NM23B)	3,58	4,66	1,3
		p53 Pathway:			
10B	U 90313	glutathion-S-transferase-like protein (GSTTLp28)	2,35	1,46	0,62
		Caspasen und -Regulatoren:			
11K	U 60520	caspase 8 (CASP8); FADD like ICE (FLICE)	0,66	0,86	1,3
11M	U 60519	caspase 10 (CASP10); ICE-LAP4; FLICE2	2,77	3,47	1,25
12E	Y 10256	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 (MAPKKK14); NFκB-inducing kinase (NIK)	2,76	2,03	0,74
12K	U 21092	CD40 receptor associated factor 1 (CRAF-1)	23,3	34,48	1,48
		Wachstumsfaktoren:			
16B	M 29645	insulin-like growth factor II (IGF2); somatomedin A	13,87	8,17	0,59
17C	M 62402	insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6)	0,69	0,88	1,28
		andere Apoptose-assoziierte Regulatoren:			
17E	X 76104	death associated protein kinase 1 (DAPK1)	0,88	1,03	1,17
17H	M 63167	akt1 proto-oncogene; protein kinase B (PKB)	2,79	3,11	1,11
18B	M 77198; M 95936	akt2 proto-oncogene; rac beta serine / threonine kinase (RAC-PK-beta)	12,26	9,38	0,77
19D	L 25080	ras homolog gene family member A (RHOA; ARHA)	8,31	7,99	0,96
21F	X 79389	glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)	0,65	0,72	1,11

Tab. 3.6.6. Atlas Human Apoptosis Array: nicht sicher oder nur sehr schwach nachweisbare Gene in behandelten- und unbehandelten Zellen

Pos.	Genbank- Accession	Genbeschreibung und Abkürzung
		Zellzyklus-assoziierte Gene:
3C	M68520	cyclin-dependent kinase 2 (CDK2); cell division protein kinase 2
3E	M14505	cyclin-dependent kinase 4 (CDK4); cell division protein kinase 4
3G	X66365	cyclin-dependent kinase 6 (CDK6); cell division protein kinase 6; PLSTIRE
3H	L20320	cyclin-dependent kinase 7 (CDK7); cell division protein kinase 7; (CAK1); (STK1)
3I	U34051	cyclin-dependent kinase 5 activator regulatory subunit 2 (CDK5R2); (NCK5AI)
3J	X80343	cyclin-dependent kinase 5 activator regulatory subunit 1 (CDK5R1); (NCK5A)
3L	M81934 S78187	cell division cycle 25 homolog B (CDC25B); CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2 (MPI2)
3M	M34065	cell division cycle 25 homolog C (CDC25C)
3N	L29222	CDC-like kinase 1 (CLK1)
3O	L29216	CDC-like kinase 2 (CLK2)
4B	L29220	CDC-like kinase 3 (CLK3)
4C	X66358	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDKL1); KKIALRE
4D	X66363	PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1)
4E	X66360	PCTAIRE protein kinase 2 (PCTK2)
4F	X66362	PCTAIRE protein kinase 3 (PCTK3)

4G	L25676	cyclin-dependent kinase 9 (CDK9); cell division protein kinase 9; PITALRE; cell division cycle protein 2-like 4 (CDC2L4)
4H	M80629	cell division cycle protein 2-like 5 (CDC2L5); (CHED)
4I	L33264	cyclin-dependent kinase 10 (CDK10); cell division protein kinase 10; PISSLRE
4J	X51688	G2/mitotic-specific cyclin A (CCNA; CCN1)
4K	M25753	G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1)
4L	M7409	1 G1/S-specific cyclin C
4M	X59798	cyclin D1 (CCND1); parathyroid adenomatosis protein 1 (PRAD1)
4N	M90813; D13639	cyclin D2 (CCND2)
4O	M92287	G1/S-specific cyclin D3 (CCND3)
5B	M73812	G1/S-specific cyclin E (CCNE)
5C	U47413	G2/mitotic-specific cyclin G1 (CCNG1; CYCG1)
5D	U47414; L49506	cyclin G2 (CCNG2)
5E	U11791; U12685	cyclin H (CCNH); MO15-associated protein
5F	U09579; L25610	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A); CDK-interacting protein 1 (CIP1); wild-type p53-activated fragment 1 (WAF1); SDI1; CAP20
5G	U22398	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C); p57; KIP2
5H	L27211	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); INK4A; CMM2; MLM; (MTS1)
5I	U17075; L36844	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2B (CDKN2B); p14-INK4B; multiple tumor suppressor 2 (MTS2)
5J	U40343; U20498	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D (CDKN2D); p19-INK4D
5K	X92669	menage a trois 1 protein (MNAT1; MAT1); (CAK assembly factor); CDK7/cyclinH assembly factor
5L	U10564	wee1+ homolog
5N	U38545	phospholipase D1 (PLD1); phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D1
6B	S72008	CDC10 protein homolog Other Cell Cycle Proteins Q16181
6C	U00001	CDC27HS protein
6E	U18291	CDC16HS
6G	U77949	CDC6-related protein
6I	M84489	mitogen-activated protein kinase 1 (MAP kinase 1; MAPK1; PRKM1); (ERK2)
6J	X80692	mitogen-activated protein kinase 6 (MAP kinase 6; MAPK6;PRKM6); p97-MAPK; extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3)
6K	X59727	mitogen-activated protein kinase 4 (MAP kinase 4; MAPK4;PRKM4); ERK3-rel. prot.
6M	X79483	mitogen-activated protein kinase 12 (MAP kinase 12; MAPK12; PRKM12); MAP kinase p38 gamma; (SAPK3); extracellular signal-regulated kinase 6 (ERK6)
6N	L35253; L35263	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38);cytokine suppressive anti-inflammatory drug-binding protein (CSAID binding protein; CSBP); (MXI2)
6O	L26318	mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8; PRKM8); (JNK1); (SAPK-gamma)
7B	L31951	mitogen-activated protein kinase 9 (MAP kinase 9; MAPK9;PRKM9); (JNK2)
7F	U39657	mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP kinase kinase 6; MAPKK6; MAP2K6; PRKMK6); MAPK/ERK kinase 6 (MEK6); (SAPKK3)
7G	U78876	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAPKKK3;MAP3K3); (MEKK3)
7I	U49070	peptidyl-prolyl cis-transisomerase nima-interacting 1 (PIN1)
7J	M15400	retinoblastoma-associated protein 1 (RB1); phosphoprotein 110 (pp110)
7K	X74594	retinoblastoma-like protein 2 (RBL2; RB2); 130-kDa ret. -associated protein
7L	X74262	chromatin assembly factor 1 p48 subunit (CAF1 p48 subunit); retinoblastoma-binding protein 4 (RBBP4); RBAP48; msi1 protein homolog
7M	S66431	RBP2 retinoblastoma binding protein Basic Transcription Factors
7N	S57153; S57160	retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) isoform I + isoform II
7O	X85133	RBQ1 retinoblastoma binding protein
8B	X85134	RBQ-3 Other Cell Cycle Proteins
8C	M96577	PRB-binding protein E2F1; retinoblastoma-binding protein 3 (RBBP3); (RBAP1)
8G	U18422	transcription factor DP2 (Humdp2); E2F dimerization partner 2

8H	U23435; U31089	Abl interactor 2 (Abi-2) + Abl binding protein 3 (AblBP3)[ArgBPIB]
8I	L29511; M96995	growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2); abundant SRC homology protein (ASH)
		Onkogene:
8K	X03484	raf1 proto-oncogene
8M	J04111	jun proto-oncogene
8N	M29039	jun-B
8O	X56681	junD proto-oncogene
9B	M13228	N-myc proto-oncogene
9E	M14752	abl proto-oncogene
		p53 Pathway:
9F	M14694; M14695	p53 cellular tumor antigen
9G	Z12020; M92424	p53-binding mouse double minute 2 homolog (MDM2)
9H	AF007111	MDM2-like p53-binding protein (MDMX)
9I	Y11416	p73 (monoallelically expressed p53-related protein)
9K	AF010309	PIG3
9L	AF010312	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha factor (LPS-induced TNF-alpha factor; LITAF); p53-induced protein 7 (PIG7)
9M	AF010314	PIG10
9N	AF010315	PIG11
9O	AF010316	PIG12
10C	U66469	p53-dependent cell growth regulator CGR19
10D	AF001954	p33ING1
10E	L13698	growth arrest-specific protein 1 (GAS1)
		Bcl-2 Familie:
10F	M14745	B-cell leukemia/lymphoma protein 2 (BCL2) Bcl Family Proteins
10G	U58334	BCL2 & p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2)
10H	L22474	BCL2-associated X protein membrane (BAX)
10I	U59747	BCL2-like protein 2 (BCL2L2); B-cell lymphoma protein W (BCLW)
10J	L08246	myeloid cell leukemia protein 1 (MCL1)
10K	U29680; Y09397	BCL2-related protein A1 (BCL2A1); BFL1 protein; hemopoietic-specific early response protein; GRS protein
10L	X89986; U34584	BCL2-interacting killer protein (BIK); NBK apoptotic inducer protein; BP4; BIP1
10M	U23765; U16811; X84213	BCL2 homologous antagonist/killer 1 (BAK1)
10N	S82185	E. coli hypothetical sugar kinase in HIPB-UXAB intergenic region; YDEV
10O	U66879	BCL2 antagonist of cell death (BAD); BCL2-like protein 8 (BCL2L8); (BBC6)
11B	S83171; Z35491	BCL2-binding athanogene 1 (BAG1); glucocorticoid receptor-associated protein RAP46
11C	U76376	activator of apoptosis harakiri (HRK); neuronal death protein 5 (DP5); BID3
		Caspasen:
11D	U13699; M87507; X65019	caspase 1 (CASP1); IL1-beta convertase (IL1BC); IL1-beta-converting enzyme (ICE)
11E	U13021; U13022	caspase 2 (CASP2); neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 2 (NEDD2); ICH1
11F	U13737	caspase 3 (CASP3); apopain; cysteine protease CPP32; YAMA protein; SREBP cleavage activity 1 protein (SCA1)
11G	U28014; U28015	caspase 4 (CASP4); CASP5; ICH2 cysteine protease; ICH3; TX protease; TY protease; ICE(REL) III
11H	U20536; U20537	caspase 6 (CASP6); MCH2-alpha; MCH2-beta
11I	U37448	caspase 7 (CASP7); MCH3; ICE-like apoptotic protease 3 (ICE-LAP3); CMH-1

11J	U60520; U58143; X98172	caspase 8 (CASP8); MORT1-associated CED3 homolog (MACH); FADD-homologous ICE/CED-3-like protease (FADD-like ICE; FLICE); MCH5
		Todesrezeptoren und -assoziierte Proteine:
11N	L41690	tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein (TRADD)
11O	U69108	TNF receptor-associated factor 5 (TRAF5)
12B	U78798; L81153	TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)
12C	U59863; U63830	TRAF-interacting protein (I-TRAF); TRAF family member-associated NF-kappaB activator (TANK)
12D	U77845	TRAF-interacting protein (hTRIP)
12F	AF010127 ; Y14039; Y14040	casper, a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis (CASH-alpha + CASH-beta); FLAME-1; FLICE-like inhibitory protein
12G	U84388	caspase & RIP adaptor with death domain (CRADD); (RAIDD)
12H	U25994; U50062	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 (RIPK1); receptor-interacting protein (RIP)
12I	AF015956	death-associated protein 6 (DAP6); DAXX; BING2
12J	U12597	tumor necrosis factor type 2 receptor associated protein (TRAP3)
12L	U45878 + U37546	inhibitor of apoptosis protein 1 (HIAP1; API1) + IAP homolog C; TNFR2-TRAF signaling complex protein 1; MIHC Other Apoptosis-Associated Proteins Q13490; Q16516 Other Apoptosis-Associated Proteins P98170
12M	U45879; U37547	inhibitor of apoptosis protein 2 (hIAP2; IAP2); IAP homolog B; TNFR2-TRAF signaling complex protein 2; MIHC
12N	U45880; U32974	inhibitor of apoptosis protein 3 (API3; IAP3); X-linked inhibitor of apoptosis protein (X-linked IAP; XIAP); IAP-like protein (HILP)
12O	X01394	tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha; TNFA); (TNFSF2); cachectin
14B	D12614	lymphotoxin alpha (LT-alpha; LTA); tumor necrosis factor beta (TNF-beta; TNFB)
14C	L11015	lymphotoxin-beta (LT-beta; LTB); tumor necrosis factor C (TNFC)
14D	U69611	a disintegrin & metalloproteinase domain 17 (ADAM17); TNF-alpha-converting enzyme (TACE)
14E	D38122; U08137	tumor necrosis factor superfamily member 6 (TNFSF6); fas antigen ligand (FASL); apoptosis antigen ligand (APTL; APT1LG1)
14F	U57059	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL); APO-2 ligand (APO2L)
14G	AF017986	secreted apoptosis related protein 1 (SARP1) Death Receptor Ligands
14H	AF017988	secreted apoptosis related protein 3 (SARP3)
15B	M33294	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A); (TNFR1); tumor necrosis factor alpha receptor (TNFAR); CD120A antigen
15C	M32315; M55994	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNFRSF1B); tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2); (TNFBR); CD120B antigen
15D	Z70519	fas soluble protein; apoptosis antigen 1 (APO1; APT1)[alternatively spliced]
15E	U90875	(TNFRSF10A); (TRAILR1); death receptor 4 (DR4); APO2
15F	AF016268	(TNFRSF10B); death receptor 5 (DR5); cytotoxic TRAIL receptor 2 (TRICK2)
15G	Y09392 + U75380 + U74611 + U83597	WSL protein + TRAMP + Apo-3 + death domain receptor 3 (DDR3)
		Wachstumsfaktoren:
16C	X04434; M24599	insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) Death Receptors
16D	Y00285; J03528	insulin-like growth factor II receptor (IGF2R); cation-independent mannose-6 phosphate receptor (MPIR)
16E	D25216	KIAA0014
16F	M35410	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)
16G	M31159; M35878	insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGF-binding protein 3; IGFBP3; IBP3)

16H	M62403	insulin-like growth factor binding protein 4 (IGF-binding protein 4; IGFBP4)
17B	M65062	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGF-binding protein 5; IGFBP5)
		andere Apoptose-assoziierte Regulatoren:
17D	U18321 + X83544	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3)
17G	S78085	PDCD2
18C	U63295	seven in absentia homolog
18D	U37688	RATS1
18E	U91985	DNA fragmentation factor 45 (DFF45)
18F	AF022385	apoptosis-related protein TFAR15
18G	U56976	calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B (CAM-PDE1B); HCAM2
19B	U33286	cellular apoptosis susceptibility protein (CAS); chromosome segregation gene homolog
19C	U75285	apoptosis inhibitor 4 (API4); survivin; (BIRCP5)
19E	L09210	nitric oxide synthase 2A (NOS2A); inducible hepatocyte NOS (HEP-NOS)
19F	M58603	nuclear factor of kappa light chain enhancer in B-cells 1 (NFKB1; KBF1)
19G	M83221	transcription factor relB; I-rel
20B	U08015	cytoplasmic nuclear factor of activated T-cells 1 (NF-ATC1)
20C	D15057	defender against cell death 1 protein (DAD1)
20D	M74816	clusterin (CLU); complement-associated protein SP-40; (CLI); (APOJ); testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM2); sulfated glycoprotein 2 (SGP2)
20E	D13889	inhibitor of DNA binding 1 protein (ID1)
20F	X15722	glutathione reductase (GSR) Xenobiotic Transporters
20G	J03746	microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1); GST12
21B	X68676; S01719	glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4
21C	X08058; M24485	glutathione S-transferase pi (GSTP1); GST3; fatty acid ethyl ester synthase III (FAEES3)
21D	M25627	glutathione S-transferase A1 (GTH1; GSTA1); HA subunit 1; GST-epsilon
21E	Y00483; M21304	glutathione peroxidase 1 (GSHPX1; GPX1)
21G	S90469	cytochrome P450 reductase
22B	S40706; S62138	growth arrest & DNA damage-inducible protein 153 (GADD153); DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3); C/EBP homologous protein (CHOP)
22C	M60974	growth arrest & DNA damage-inducible protein (GADD45); DNA damage-inducible transcript 1 (DDIT1)
22D	U15172	NIP1 (NIP1)
22E	U15174	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 (BNIP3; NIP3)
22F	L07414	tumor necrosis factor superfamily member 5 (TNFSF5); CD40 ligand (CD40L); TNF-related activation protein (TRAP); gp39; hyper IgM syndrome protein 1 (HIGM1)
22G	L08096; S69339	tumor necrosis factor superfamily member 7 (TNFSF7); CD27 ligand (CD27LG); CD70 antigen
23B	X96586	FAN protein
23C	M84820; X63522; S54072	retinoic acid receptor beta (RXR-beta; RXRB)
23D	X07282; Y00291	retinoic acid receptor beta (RAR-beta; RARB); hepatitis B virus-activated protein (HAP)
23E	M93426	protein-tyrosine phosphatase zeta (R-PTP-zeta)
23F	L04791	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)
23G	D21090	UV excision repair protein RAD23 homolog B (hHR23B); xeroderma pigmentosum group C repair-complementing complex 58-kDa protein (XPC repair-complementing complex 58-kDa protein)

Mit dem Atlas Human Apoptosis Array wurde ein weiteres p53-induziertes Gen (*pig6*) in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen identifiziert. Die Expression von *p53*, *pig7* oder

von Todesrezeptoren- und ihrer Liganden war im Einklang mit dem vorherigen cDNA-Array nicht nachweisbar (s. 3.6.1.). Die Fas-aktivierte Serin-/Threoninkinase (*FAST*) war in Paclitaxel-behandelten Zellen verstärkt transkribiert, obwohl kein Fas-Rezeptor oder Ligand exprimiert nachweisbar war. Dies kann auf eine Fas-unabhängige FAST-Aktivierung oder eine Regulation des Fas-Signalweges auf Proteinebene hinweisen. Außer der Induktion von *Caspase-9* in den Paclitaxel-behandelten Zellen konnte keine weitere Caspasenaktivierung gefunden werden. Von den untersuchten Caspasen waren lediglich *Caspase-8* und *Caspase-10* in Paclitaxel be- und unbehandelten Zellen gleichartig exprimiert. Einige der durch semiquantitative RT-PCR nachgewiesenen Zellzyklus- und Tumorsuppressorgene (*Zyklin B1, D1, D3, E, CDK2-6*) sowie das Housekeeping-Gen β -*Aktin* zeigten im Atlas-Array kein Hybridisierungssignal, was auf eine niedrigere Sensitivität des Atlas gegenüber der RT-PCR weist. Auch die im „Pathway-Finder-Kit“ in Paclitaxel-behandelten Zellen hochregulierten Gene *Bax* und *gadd45*, sowie *p19^{INK4d}* und *p21^{WAF1}* (*CDKN1A*) wurden im Atlas Human Apoptosis Array nicht exprimiert, was durch eine zu geringe Sensitivität des Arrays oder eher durch zu kurze Expositionszeit der Membranen bedingt sein könnte. Insgesamt waren von 10 mit beiden Arrays untersuchten Genen (*NOS, mdm2, FasL, NFkB, p57KIP2, pig7, p21^{WAF1}, p19^{INK4d}, Bax, gadd45*) 6 gleichartig exprimiert (60%) und 4 zeigten ein unterschiedliches Expressionsmuster (*p21^{WAF1}, p19^{INK4d}, Bax, gadd45*). In Abb. 3.6.5. ist die Genexpression der behandelten BON I Zellen im Verhältnis zu den Unbehandelten nach densitometrischer Auswertung graphisch dargestellt.

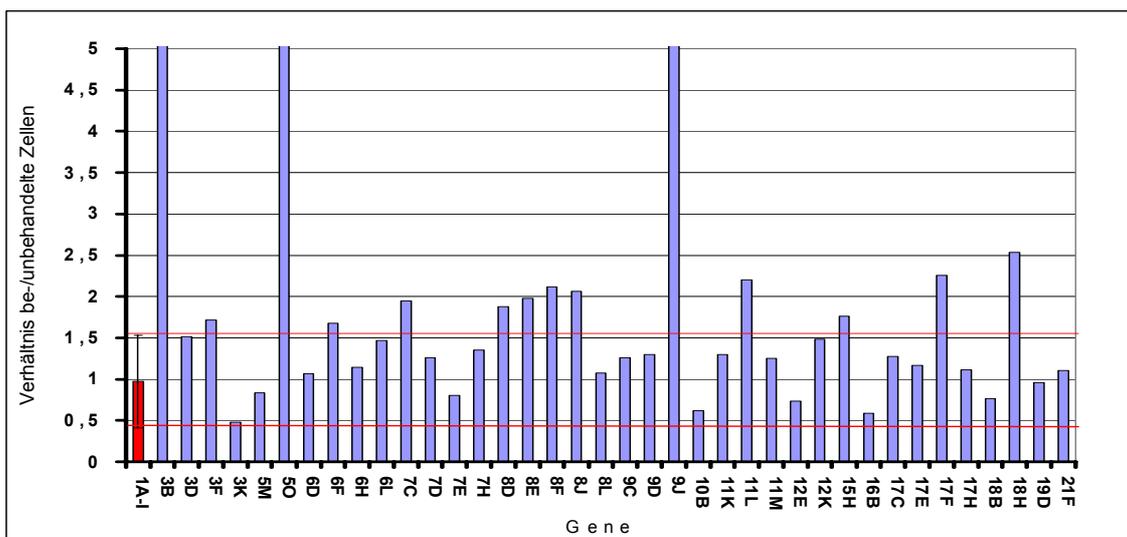


Abb. 3.6.5. Verhältnis der densitometrisch gemessenen Genexpression von Paclitaxel be- und unbehandelten BON I Zellen. Als Standard dient der Quotient der Expressionsstärken der

Housekeeping-Gene von be- und unbehandelten Zellen (roter Balken ± 2 Standardabweichungen). Die in Paclitaxel-behandelten Zellen überexprimierten Gene liegen oberhalb der roten Begrenzungslinie. Auf der x-Achse sind die Positions-Koordinaten (s. Abb. 3.6.4.) aufgetragen. Die zugehörigen Gennamen können Tabelle 3.6.4. und 3.6.5. entnommen werden.

Zur Überprüfung der mit den cDNA-Arrays (Human Pathway Finder GEArray Kit, Atlas Human Apoptosis Array) gewonnenen Ergebnisse wurden die unterschiedlich exprimierten Gene zusätzlich per semiquantitativer RT-PCR amplifiziert. Nach Optimierung der jeweiligen PCR-Bedingungen und Durchführung der PCRs, wurden diejenigen Amplifikate, deren Expressionsverhalten mit denen der Arrays übereinstimmte, sequenziert, um die Sequenzspezifität zu sichern. Auf beiden cDNA-Arrays waren in den mit Paclitaxel-behandelten BON I Zellen 19 Gene überexprimiert, von denen einige stichprobenartig mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft wurden. In Tabelle 3.6.7. sind die untersuchten Genprodukte mit Namen, Genbank-Nummer, Größe und PCR-Versuchsbedingungen aufgeführt. Als Gennamen wurde jeweils eine der eingeklammerten Abkürzungen aus Tabelle 3.6.1. und 3.6.4. verwendet (Primersequenzen s. 2.2.11.).

Tab. 3.6.7. Semiquantitative RT-PCR von in den cDNA-Arrays überexprimierten Genen in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen (Angabe des Gennamens, Genbank-Nummer, Fragmentgröße, Primeranlagerungstemperatur und Zyklusanzahl).

Genname	Genbank-Accession	Fragmentgröße (Bp.)	Primeranlagerungstemperatur (°C)	Zyklusanzahl
CDC2	X 05360	503	55	30
CDK5	X 66364	513	60	30
NEDD5 protein homolog	D 63878	389	55	30
DP-1	L 23959	437	60	30
pig6	AF010310; AF010311	480	61	30
CASP9	U 56390; U 60521	373	55	30
CD27BP	U 82938	370	55	30

Mit Hilfe der RT-PCR gelang es, die in den cDNA-Arrays gezeigte Überexpression von *CDC2*, *CDK5*, *NEDD5 protein homolog*, *TFDP1*, *CASP9* und *CD27BP* in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen zu bestätigen (s. Abb. 3.6.6.). In der anschließenden Sequenzierung wurden die Sequenzen der amplifizierten Genprodukte verifiziert. Die Überexpression von *CDC2* in Paclitaxel-behandelten Zellen deutet in Verbindung mit den vorherigen RT-PCR-Ergebnissen (s. 3.5.1.) auf eine transkriptionelle Aktivierung des CDC2/Zyklus B1-Komplexes hin, was Folge oder Ursache des unter Paclitaxel

beobachteten G2/M-Arrests in BON I Zellen sein könnte. Die Aktivierung von *Caspase-9* spricht für eine mitochondriale Beteiligung des Paclitaxel-vermittelten Zelltodes (s. 1.5.4.).

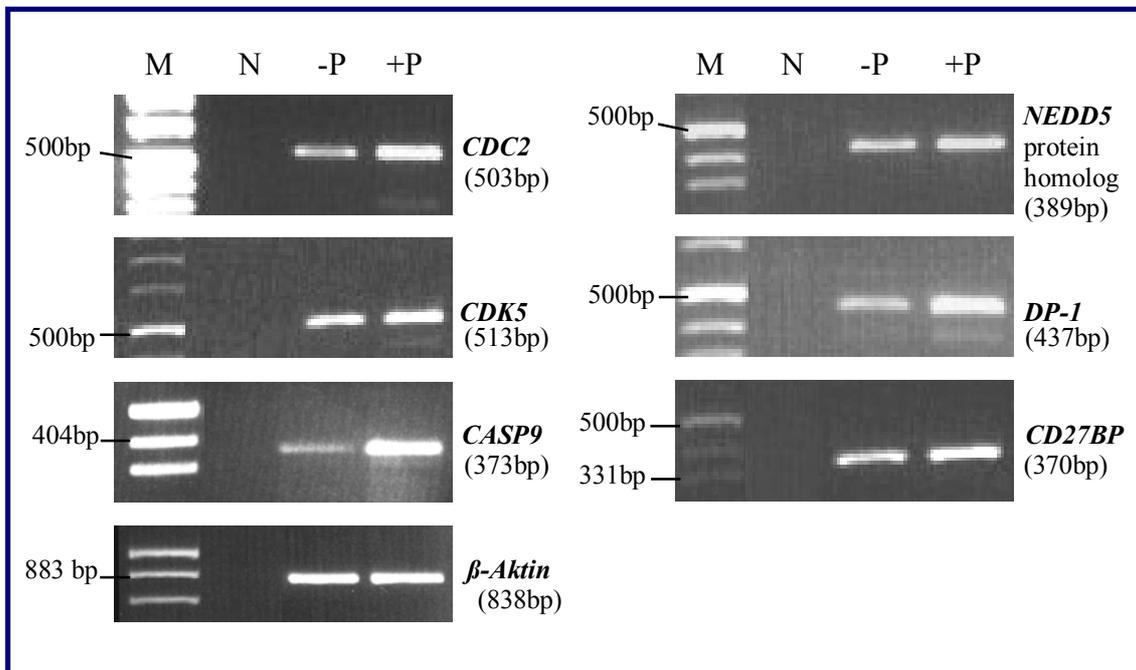


Abb. 3.6.6. Semiquantitative RT-PCR zur Bestätigung der in den cDNA-Arrays überexprimierten Gene in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen. M, DNA-Längenstandard (Marker) linksseitig, N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA Einsatz von H₂O in PCR-Ansatz), -P, unbehandelte Zellen (nur mit Lösungsmittel Cremophor EL), +P, 0,1 μM Paclitaxel-behandelte Zellen (48h ohne Mediumwechsel). Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) ist rechtsseitig angegeben. β -Aktin wurde als interner Standard amplifiziert. Bp, Basenpaar.

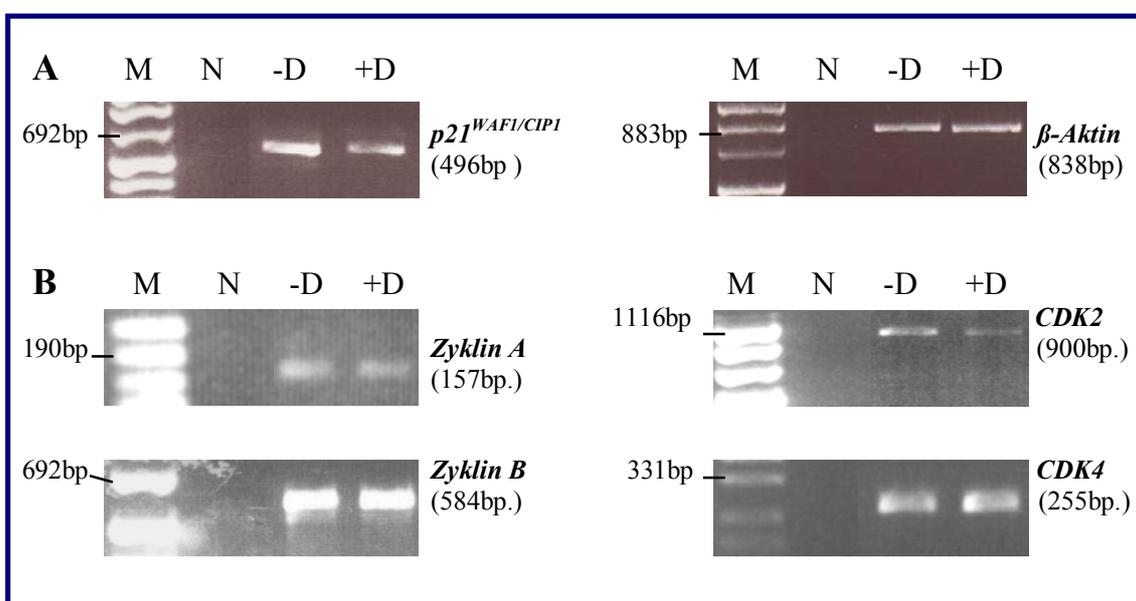
Die semiquantitativen RT-PCRs der übrigen, auf den cDNA-Arrays differentiell exprimierten Gene, konnten aufgrund zu schwacher Banden (*JNK3A2*, *GRB-IR* / *GRB10*, *pig6*), unspezifischer Banden (*egr-1*, *E2F-3*, *CDC37 homolog*) oder gleichartiger Expression in be- und unbehandelten Zellen (*E2F-5*, *IGF1*, *FAST*, *gadd45*), die in den cDNA-Arrays erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigen (nicht gezeigt). Insgesamt konnten von 16 auf den Arrays differentiell exprimierten Genen 6 mittels RT-PCR bestätigt werden (37,5%). Umgekehrt konnte die Expression von 14 Genen, die mittels RT-PCR in Paclitaxel-be- und unbehandelten BON I Zellen überprüft wurden (*Zyklin-B1*, *-D1*, *-D2*, *-D3*, *-E*, *CDK2*, *-4*, *-6*, *CDC25*, *p21^{WAF1}*, *p53*, *Caspase3*, *Bcl2*, *Bax*) nur in drei Fällen (fehlende *p53*-, *Caspase-3* und *Zyklin D2*-

Expression) mit beiden cDNA-Arrays sicher bestätigt werden (21,4%). Insgesamt ergab sich also eine Übereinstimmung beider Verfahren bei ca. 30% aller getesteten Gene.

3.7. Demethylierungsabhängig-induzierte Veränderungen zellzyklus- und apoptosespezifischer Gene in BON I Zellen

Ein molekularer Mechanismus, der zum Verlust der Transkription bei intaktem Genom führen kann ist die *de novo* Methylierung von DNA. Da 1 μ M der demethylierenden Substanz DAC zur Reduktion des Zellwachstums von BON I Zellen führte (s. 3.1.2.4.) und die Akkumulation der Zellen in der G2/M-Zellzyklusphase nach 72h Behandlung durchflusszytometrisch gemessen wurde (s. 3.2.5.), sollte mit Hilfe der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) die methylierungsabhängige Inaktivierung von Zellzyklus- und Apoptose-regulatorischer Gene (s. Tabelle 2.5.1.) in BON I Zellen anhand semiquantitativer RT-PCR sowie der Multiplex-PCR analog den Versuchsbedingungen in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen (s. 3.5.1. – 3.5.4.) untersucht werden.

Nach 72-stündiger 1 μ M DAC Behandlung von BON I Zellen mit täglicher Zugabe des Stoffes, konnte in den semiquantitativen RT-PCR Untersuchungen lediglich für p53-assoziiertes *p21^{WAF1/CIP1}* eine reproduzierbar DAC-abhängig erhöhte Expression gezeigt werden (s. Abb. 3.7.1A). Die übrigen zellzyklusregulierenden Gene (*Zyklin B1, D1, D3, E, CDC25Hs, CDK2, -4, -6* sowie die CDK-Inhibitoren *p18^{INK4c}* und *p27^{KIP1}*) waren, mit Ausnahme von *Zyklin D2* und *Zyklin A*, in DAC-behandelten wie unbehandelten BON I Zellen gleichstark exprimiert (s. Abb. 3.7.1B).



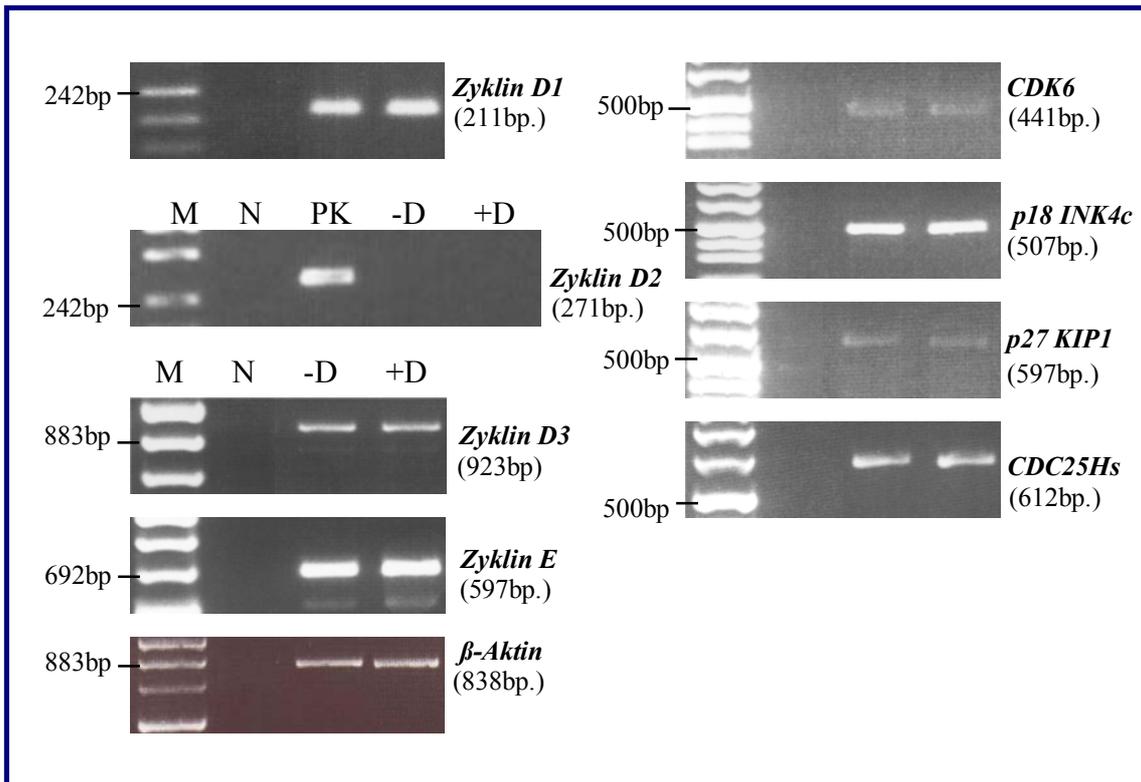


Abb. 3.7.1. Expression zellzyklusassoziierter Gene in unbehandelten und DAC-behandelten BON I Zellen anhand von semiquantitativer RT-PCR. (A) RT-PCR von $p21^{WAF/CIP1}$ (B) Gene ohne differentielle Expression in unbehandelten und DAC-behandelten BON I Zellen. M, DNA-Längenstandard (Marker) linksseitig. N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA wurde Wasser in den PCR-Ansatz gegeben). -D, unbehandelte Zellen, +D, DAC-behandelte Zellen ($1\mu\text{M}$ DAC über 72h unter täglicher erneuter Stoffzugabe in frischem Medium). PK, als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie Patu 8902 verwendet. β -Aktin diente als interner Standard.

Die Multiplex-PCR zeigte in den mit $1\mu\text{M}$ DAC über 72h behandelten BON I Zellen eine vermehrte Transkription von *Bcl-2*, sowie eine verminderten Expression von *Bcl-xL* (s. Abb. 3.7.2.) Die schwachen Amplifikate erlaubten keine Rückschlüsse auf Unterschiede in der *LICE* (= *Caspase-3*)- und *Bcl-xS*-Expression. Das Ergebnis der differentiellen Expression von *Bcl-2* und *Bcl-xL* ist überraschend, da beiden eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben wird. Nicht auszuschließen sind daher neben Veränderungen auf Transkriptionsebene auch posttranslationelle Modifikationen von *Bcl-2* und *Bcl-xL*.

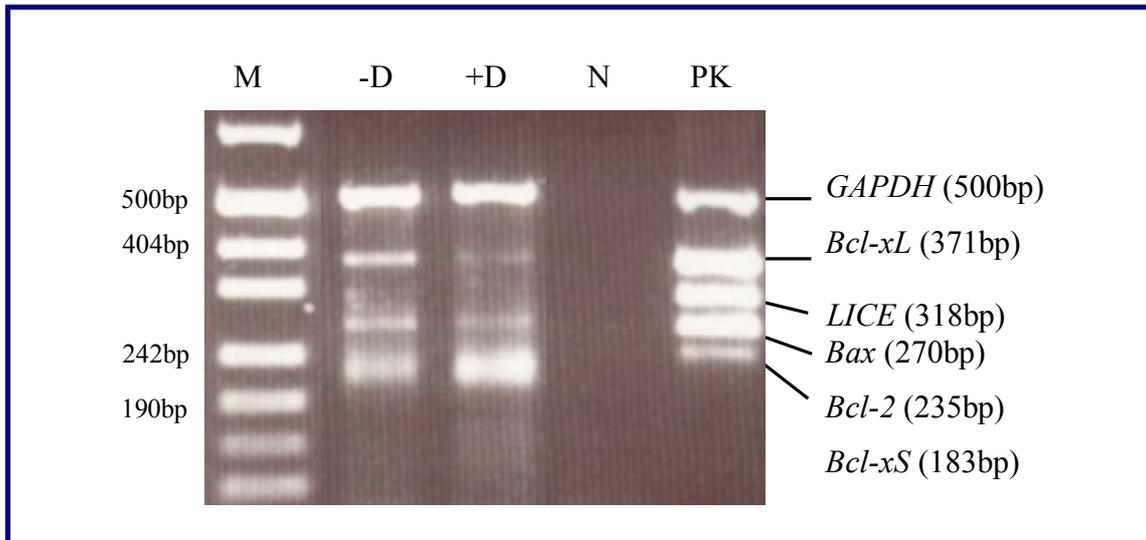


Abb. 3.7.2. Untersuchung von DAC auf die Expression apoptoseassoziierter Gene in BON I Zellen.

Multiplex-PCR Analyse aus für 72h mit 1 μ M DAC (tägliche Stoffzugabe) behandelte oder im gleichen Zeitraum unbehandelte BON I Zellen. Die Größe der PCR-Amplifikate (bp) ist rechtsseitig angegeben. GAPDH diente als interner Standard. M, DNA-Längenstandard (Marker) linksseitig, N, Negativ-Kontrolle (anstelle von cDNA H₂O in PCR-Ansatz), PK, cDNA-Positivkontrolle aus dem Kit (für Bcl-xS ist keine cDNA-Matrize in der Positiv-Kontrolle vorhanden), -D, unbehandelte Zellen, +D, DAC-behandelte Zellen. Bp, Basenpaar.

4. Diskussion

4.1. Chemosensitivität der humanen neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I

4.1.1. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Mitoseinhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten und die Sensitivität, bzw. Resistenz, der neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I *in vitro* gegenüber Chemotherapeutika umfassend untersucht. Dabei kamen sowohl bereits *in vivo* als auch bisher nicht bei neuroendokrinen gastroenteropankreatischen Tumoren angewandte Substanzen zum Einsatz. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass von allen untersuchten Chemotherapeutika die Spindelgifte Vincristin und Vinblastin in BON I Zellen bei der niedrigsten getesteten Stoffkonzentration die stärkste Proliferationshemmung erreichten. Die Behandlung mit Paclitaxel führte zur zweitstärksten Proliferationshemmung, wobei es reproduzierbar bei höheren Stoffkonzentrationen zu einem vorübergehenden Anstieg der Überlebensrate in BON I Zellen kam. Liebmann et al., 1993, 1994a und 1994b konnte ebenso in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 eine paradoxe Wirkungsabschwächung Paclitaxel-vermittelter Zytotoxizität bei Stoffkonzentrationen über 10 μM feststellen. Andere Studien zeigten für Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel bei ähnlichen Stoffkonzentrationen eine 50%-ige Wachstumshemmung in humanen Nabelschnur-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom- oder nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (Akutsu et al., 1995; Carmichael et al., 1988; Hayot et al., 2002). Dabei wurden zur 50%-igen Wachstumshemmung in Paclitaxel-behandelten Zellen in Analogie zu den BON I Zellen höhere Stoffkonzentrationen benötigt als bei Vincristin- und Vinblastin- behandelten Zellen. In einer kürzlich publizierten Phase II Studie zeigte die hochdosierte Paclitaxelbehandlung von Patienten mit metastasierten Karzinoid- und Inselzelltumoren ein geringes Ansprechen und schwere therapiebedingte Nebenwirkung (Ansell et al., 2001). Das gibt einen Hinweis darauf, dass das Ansprechen von BON I Zellen (Pankreaskarzinoid) unter Paclitaxel *in vitro* nicht uneingeschränkt auf *in vivo*-Bedingungen und insbesondere auf alle neuroendokrinen Tumorsubtypen übertragbar ist.

4.1.2. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber methylierenden und alkylierenden Substanzen

Dacarbazin (DTIC) zeigte den schwächsten konzentrationsabhängigen proliferationshemmenden Effekt in BON I Zellen (IC_{50} -Konzentration 1300 μ M). Zahlreiche Studien ermittelten bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien für die alkylierende Substanz Dacarbazin und ihr verwandtes Substrat Temozolomid höhere 50%-ige Hemmkonzentrationen (z. T. $>1000\mu$ M) im Vergleich zu anderen Substanzklassen (Bowman et al., 1998; Delaney et al., 2000; Prignano et al., 2002; Rummelink et al., 1997). Mögliche Ursachen könnten in der Zytochrom p450-abhängigen Aktivierung von Dacarbazin in Hepatozyten, in natürlichen oder erworbenen Resistenzen, oder in der Überexpression von verschiedenen Reparaturenzymen begründet sein (Lage et al., 1999; Prignano et al., 2002; Tsang et al., 1991). Die in dieser Arbeit schwächere Wachstumshemmung von Cisplatin und Carboplatin gegenüber Doxorubicin konnte ebenfalls durch andere Arbeiten an verschiedenen Tumorzelllinien beobachtet werden (Loprevite et al., 1999; Rummelink et al., 1997). Interessanterweise zeigten die humanen Melanomzelllinien SK-MEL-28 und SK-MEL-2 nach Behandlung mit verschiedenen Cisplatin- und Doxorubicin-Konzentrationen ein ähnliches Dosis-Wirkungsprofil wie die BON I Zellen, wobei es unter Cisplatin ab Konzentrationen über 10 μ M, und unter Doxorubicin ab ca. 0,4 μ M, zu über 50%-igen Proliferationshemmung kam (Dong et al., 2002). In einigen Zelltypen war die Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin vom zellulärem p53-Status abhängig (Yamamoto et al., 1999). Die *in vitro* Chemosensitivität gegenüber Cisplatin erwies sich in verschiedenen Studien an verschiedenen Zelllinien als wechselhaft und z. T. stark von erworbenen Resistenzfaktoren abhängig. Die IC_{50} -Hemmkonzentration war mit Ausnahme der resistenten Zelllinien etwas niedriger als in den BON I Zellen ($<15\ \mu$ M) (Fan et al., 1997; Hennes et al., 2002; Kim et al., 2002a; Sark et al., 1995). Die verminderte Zytotoxizität von Carboplatin gegenüber Cisplatin in BON I Zellen wurde auch in anderen Studien an hämatopoetischen und anderen Tumorzelllinien beobachtet (Akamatsu et al., 1993; Gore et al., 1989; Twentyman et al., 1992). Dacarbazin wurde bereits an kleinen Patientenkollektiven als Kombinationstherapie bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren und als Monotherapie bei Mitteldarmkarzinoiden mit Erfolg eingesetzt (Bajetta et al., 1998 und 2002; Ollivier et al. 1998; Ritzel et al., 1995). Das Anthrazyklinderivat Doxorubicin zeigte eine starke Reduktion der Überlebensrate, was

die klinische Wirksamkeit von Doxorubicin widerspiegeln könnte. Bei Patienten mit fortgeschrittenen neuroendokrinen pankreatischen Tumoren, insbesondere bei metastasiertem Insulinom und VIPom und Versagen einer Octreotid und Interferon-alpha Therapie, wird derzeit die Kombination von Doxorubicin mit Streptozotocin einer Kombination aus 5-FU und Streptozotocin wegen höherem Ansprechen und besseren Überlebensraten vorgezogen (Moertel et al., 1992). Bei schlecht differenzierten („anaplastischen“) neuroendokrinen Tumoren hat sich eine Kombinationstherapie aus Cisplatin und Etoposid günstig erwiesen (Moertel et al., 1991). Dagegen konnte für Carboplatin in einer Phase II Studie keine Wirkung bei fortgeschrittenen Karzinoiden und Inselzelltumoren nachgewiesen werden (Saltz et al., 1993b).

4.1.3. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Topoisomerasehemmstoffen

Etoposid (VP-16) zeigte in BON I Zellen ein dem Paclitaxel vergleichbares Wirkungsprofil bei einer Konzentration von 0,1 μM (s. 3.1.2.3.). Wie bei Paclitaxel kam es reproduzierbar zu einem vorübergehenden Anstieg der Überlebensrate bei höheren Konzentrationen. Vergleicht man die an BON I Zellen im MTT-Test *in vitro* ermittelte IC_{50} Konzentration für Etoposid (ca. 50 nM) mit anderen Arbeiten, so wurden auch in Magen-, Kolon-, Pankreas- und kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien höhere Werte beobachtet (80nM–50 μM) (Elliot et al., 2002; Jacob et al., 2001; Kraus et al., 2002; Yamamoto et al., 1999). Die Chemosensitivität war dabei, ähnlich wie bei Dacarbazin und Doxorubicin, u.a. von verschiedenen zellulären Resistenzmechanismen, wie z.B. dem Mismatch repair System und dem p53-Status abhängig.

Bei der Behandlung von BON I Zellen mit Irinotecan (CPT-11) fiel eine geringere Chemosensitivität anhand des MTT-Tests gegenüber der Auszählmethode auf. Eine Erklärung hierfür könnte ein zu hoher Umsatz von MTT-Substrat zu löslichen Formazankristallen in den behandelten Zellen sein. Normalerweise findet diese Reduktion mit Hilfe des mitochondrialen Enzyms Succinat-Dehydrogenase in lebenden Zellen statt (Slater et al., 1963). Wenn die Verabreichung eines Zytostatikums lediglich zum Verlust der Zellmembranintegrität führt und die zellulären Mitochondrien zunächst erhalten bleiben, würde dies zu erhöht gemessenen Überlebensraten im MTT-Test führen, wohingegen die Zellen durch Trypanblau gefärbt werden und somit „abgestorben“ erscheinen. In diesem Zusammenhang konnten Jabbar et al., 1989 eine

Zellvergrößerung mit 30%-50% vermehrter mitochondrialer Aktivität in Interferon-behandelten Bronchialkarzinomzellen nachweisen, wodurch der wachstumshemmende Effekt von Interferon im MTT-Test unterschätzt wurde. Diese Beobachtung wurde bei Verwendung von Dacarbazin und 5-Aza-2-Deoxycytidin (DAC) in BON I Zellen nicht beobachtet, so dass der Effekt vermutlich substanzspezifisch ist. Zur Vergleichbarkeit der Messungen wurde daher in dieser Arbeit der MTT-Test zur Chemosensitivitätsbestimmung in BON I Zellen eingesetzt. Die Nützlichkeit des MTT-Test bezüglich Therapieansprechen und Überleben von Patienten konnte bereits bei einigen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Furukawa et al., 1991; Saikawa et al., 1994; Tsai et al., 1990; Yamaue et al., 1996). Die in dieser Arbeit ermittelte 50%-ige Hemmkonzentration für Irinotecan in BON I Zellen wurde mit der Trypanblau-Auszählmethode bei weniger als 1 μM gemessen und lag damit im Konzentrationsbereich der in verschiedenen Bronchialkarzinomzelllinien gemessenen IC_{50} -Konzentration (van Ark-Otte et al., 1998). In weiteren *in vitro* Studien an Kolonkarzinomzelllinien lagen diese Konzentrationen für Irinotecan jedoch deutlich höher und entsprachen damit eher der mit dem MTT-Test in BON I Zellen gemessenen IC_{50} -Konzentration (ca. 10 μM) (Jansen et al., 1997; Pavillard et al., 2002). Während bei fortgeschrittenen neuroendokrinen GEP-Tumoren die Kombination aus Etoposid mit Cisplatin bei schlecht differenzierten anaplastischen Tumoren empfohlen wird (Moertel et al., 1991), gibt es für den Einsatz von Irinotecan bisher keine Studien.

4.1.4. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Antimetaboliten und demethylierenden Substanzen

BON I Zellen erwiesen sich gegenüber 5-FU im untersuchten Konzentrationsbereich resistent. Verschiedene Studien haben als mögliche Erklärungen u.a. eine alterierte Expression von p53 und anderer Resistenzgene, z.B. des Mismatch Repair-Systems, vermehrter Thymidilatsynthase-Expression oder Veränderungen in der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine (Bax, Bcl-2, Bcl-xL) gezeigt (Arnold et al., 2003; Elliot et al., 2002; Gansauge et al., 1999; Mirjolet et al., 2000; Nita et al., 1998; Peters et al., 1995; van Triest et al., 1999; Xu et al., 2002). Die in zahlreichen *in vitro*-Studien bestimmten IC_{50} -Konzentrationen weisen eine zelltypabhängige Variationsbreite auf, wobei diese z.T. über der in dieser Arbeit in BON I Zellen maximal eingesetzten Konzentration von 1000 μM lagen (Kornmann et al., 1999; Mirjolet et al., 2002; Park et al., 1987). Interessanterweise war auch *in vivo* die Kombination von 5-FU mit

Streptozotocin einer Kombination Streptozotocin mit Doxorubicin bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren unterlegen (Moertel et al., 1992), was im Einklang mit der niedrigen *in vitro* Chemosensitivität von 5-FU behandelten BON I Zellen ist. In weiteren Polychemotherapieprotokollen wurde 5-FU in verschiedenen Kombinationen mit wechselhaftem Erfolg bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren eingesetzt (Bajetta et al., 2002 und 1998; Di Bartholomeo et al., 1995; Hughes et al., 1996; Ollivier et al., 1998; Rougier et al., 1991; Saltz et al., 1994).

Im Gegensatz zu 5-FU zeigte die Demethylierungssubstanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) eine signifikante Wachstumshemmung in BON I Zellen. Mögliche Erklärungen könnten in einer DAC-bedingten Reexpression hypermethylierter und damit stillgelegter Tumorsuppressor- oder weiterer zellzyklusregulatorischer Gene liegen, was bereits in einer Vielzahl von Tumoren gezeigt werden konnte (Bender et al., 1998; Baylin and Herman, 2000; Jones und Laird, 1999). Auch in neuroendokrinen gastroenteropankreatischen (GEP)-Tumorzellen sind epigenetische und genetische Veränderungen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A/p16* und *CDKN2B/p15* durch *de novo* Methylierung bzw. homozygote Deletion des *CDKN2*-Genortes bekannt und es wurde gezeigt, dass die reversible Aufhebung der Promotor-Hypermethylierung durch DAC zur Reexpression dieser Gene bei gleichzeitig vermindertem Zellwachstum führte (Lubomierski et al., 2001). Eine weitere Ursache für die Proliferationshemmung könnte auch eine durch DAC ausgelöste Aktivierung DNA-schadensassoziierter Signalwege mit p53 Protein Induktion und Zellzyklusarrest sein (Karpf et al., 2001). Studien mit demethylierenden Substanzen zur Behandlung von Patienten mit neuroendokrinen GEP Tumoren liegen bisher nicht vor.

4.1.5. Chemosensitivität von BON I Zellen gegenüber Biotherapeutika

In Therapiestudien konnten sowohl für Interferon- α als auch für Somatostatinanaloga antiproliferative Effekte mit Wachstumsstillstand und teilweise partieller Regression von GEP Tumoren beobachtet werden (Arnold et al., 1996a,b; Di Bartolomeo et al., 1996; Eriksson et al., 1997; Faiss et al., 1999; Öberg, 2000 und 2001; Saltz et al., 1993a). *In vitro* Studien und Tierexperimenten zeigten eine antiproliferative Wirkung von Interferon auf gastrointestinale neuroendokrine Tumorzellen (Grander et al., 1997; Öberg, 2000). Die Kombination von Interferon- α und Somatostatinanaloga zeigte darüberhinaus neben höheren biochemischen Ansprechraten signifikante

antiproliferative Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Öberg, 2001; Arnold, 1999; Frank et al., 1999; Tiensuu et al., 1992; Imam et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen kein signifikanter wachstumshemmender Effekt von Octreotid auf BON I Zellen gezeigt werden. Arbeiten von Ishizuka et al., 1992 und Imam et al., 1997 bestätigten diese Beobachtung in BON I Zellen bzw. im Tiermodell. Ursache könnte eine mangelnde Expression oder Signaltransduktion der Somatostatinrezeptoren SSTR2 und 5 in BON I Zellen sein, welche für die Vermittlung des antiproliferativen Effekts von Octreotid verantwortlich gemacht wurden (Benali et al., 2000; Bousquet et al., 2001; Kubota et al., 1994) oder indirekte wachstumshemmende Mechanismen (Lamberts et al., 1991). Versuchsbedingt könnte auch eine zu niedrig gewählte Octreotid-Dosierung ursächlich sein, da *in vitro*-Untersuchungen und Therapiestudien an Patienten auf einen dosisabhängigen antiproliferativen Effekt von Octreotid hinweisen (Eriksson und Öberg, 1999; Taylor et al., 1988; Weckbecker et al., 1992). Im Unterschied zu den genannten Arbeiten konnten bei Zelllinien anderer Tumorentitäten eine proliferationshemmende Wirkung von Somatostatinanaloga *in vitro* beobachtet werden (Buscail et al., 1996; Bousquet et al., 2001; Liebow et al., 1989).

Behandlung von BON I Zellen mit Interferon- α -2a zeigte in der vorliegenden Arbeit sowohl mit Trypanblau-Auszählung als auch im MTT-Test eine signifikante Proliferationshemmung auf ca. 70%. Diese Ergebnisse entsprechen weitgehend der in der Arbeit von Detjen et al., 2000 in BON I Zellen ermittelten Interferon- α Sensitivität. Die in einer anderen Arbeit beobachtete verminderte Sensitivität des MTT-Tests in Interferon-behandelten Zellen (Jabbar et al., 1989) ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Der fast vollständige Proliferationsverlust der BON I Zellen unter einer Kombinationsbehandlung mit Dacarbazin in einer Konzentration vergleichend zu anderen *in vitro* Studien (Delaney et al., 2000; Rimmelink et al., 1997; Prigano et al., 2002; Bowman et al., 1998) war vermutlich auf die Wirkung von Dacarbazin und nicht auf Interferon- α -2a zurückzuführen.

4.2. Chemotherapeutika-assoziierte Veränderungen der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion in BON I Zellen

4.2.1. Zellzyklusverteilung in kultivierten BON I Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Tumorzelllinie BON I im Vergleich zu humanen Lymphozyten einen ca. 1,3-1,4-fachen hyperploiden DNA-Gehalt aufweist. Wie in vielen Tumorzellen war der proliferierende Zellanteil (S und G2/M) in BON I Zellen in Kultur größer (ca. 55%) als in normalen Zellen (Lymphozyten ca. 3%). Die Abnahme des S-Phase-Anteils mit entsprechendem Anstieg des G0/1-Zellzyklusanteils während 96-stündiger Kultivierung war höchstwahrscheinlich durch den Verbrauch wichtiger Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, sowie durch Kontaktinhibition der Zellen bei begrenztem Platzangebot bedingt, so dass der Restriktionspunkt nicht mehr überschritten wurde und die Zellen in G1 verharrten, bzw. in den Ruhezustand G0 übergingen. Die Daten der Arbeit von Detjen et al., 2000 an einer neuroendokrinen pankreatischen Tumorzelllinie unter Serum-Depletion bestätigen diese Ergebnisse.

4.2.2. Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von Mitoseinhibitoren

In dieser Arbeit konnte ein zeit- und konzentrationsabhängiger Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und eine zeitabhängige Apoptoseinduktion in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen nachgewiesen werden. Zahlreiche Studien haben einen zeit- und konzentrationsabhängigen G2/M-Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion in anderen Tumorzelltypen nach Paclitaxelbehandlung beschrieben (Bhalla et al., 1993; Jordan et al., 1993; Lieu et al., 1997; Wang, L.G. et al., 1999, Wang, T. H. et al., 2000). Niedrige Paclitaxel-Konzentrationen (10 nM) zeigten keinen G2/M-Arrest in Tumorzellen (Chang et al., 1996; Jordan et al., 1996; Torres und Horwitz, 1998 und Wang et al., 2000), wobei Apoptose auch ohne begleitenden Zellzyklusblock nach Austritt aus der Mitose und z. T. unter Bildung von atypischen mehrkernigen Zellen mit vierfachem DNA-Gehalt nachzuweisen war. Erst bei höheren Konzentrationen (ab 100 nM) kam es, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, zu irreversiblen Block in der G2/M-Phase mit begleitender Induktion von Apoptose (Chang et al., 1996; Wang et al., 2000).

Als mögliche Erklärungen werden unterschiedliche zelluläre und zellzyklusspezifische Wirkungsmechanismen verschiedener Paclitaxel-Konzentrationen diskutiert (Chang et al., 1996; Donaldson et al., 1994; Trielli et al., 1996; Wang et al., 2000). Viele *in vitro* und *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass Paclitaxel-induzierte Apoptose p53-unabhängig ist (Blagosklonny und Fojo, 1999; Safran et al., 1996; Wang et al., 2000; Woods et al., 1995). Andererseits zeigten Arbeiten eine höhere Paclitaxel-Sensitivität in Tumorzellen mit mutiertem p53 Protein und besseres Therapieansprechen bei Patienten mit Tumoren, bei denen ein p53-Verlust vorhanden war (Wang et al., 2000; Wahl et al., 1996; Vikhanskaya et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit bleibt die Rolle von p53-abhängiger Apoptose in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen unklar. Ein möglicherweise p53-bedingter G1-Arrest wurde im gewählten Konzentrationsbereich nicht nachgewiesen. Eine weitere Möglichkeit für den fehlenden Nachweis eines G1-Arrests könnte im Verlust der G0/1-Checkpoint-Funktion durch homozygote Deletion des *CDKN2*-Genortes auf Chromosom *9q21* mit den Tumorsuppressorgenen *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* und *p14^{ARF}* in BON I Zellen begründet sein (Lubomierski et al., 2001).

Im Unterschied zu den Paclitaxel-behandelten BON I Zellen deuten die Vinblastin-behandelten Zellen auf einen frühen reversiblen G2/M-Arrest mit folgender Apoptoseinduktion und verzögerten sekundären G1-Zellzyklusblock hin, der innerhalb der 72-stündigen Behandlung nicht reversibel war. Alternativ könnte es zu einem irreversiblen G2/M-Arrest mit selektiver Apoptoseinduktion aus G2/M gekommen sein. Da es sich bei den gemessenen Zellzyklusverteilungen um prozentuale Verhältnisse und nicht absolute Werte handelt würde der G1-Anteil im selben Maße reaktiv ansteigen. Dieser Annahme widerspricht allerdings die Tatsache, daß sich die Einleitung von Apoptose bereits nach 24h, zur Zeit des höchsten G2/M-Arrests, ohne einen weiteren Anstieg der Apoptoserate nach 72h nachweisen ließ. Zudem konnte kein Anstieg des S-Phase Anteils nach 72h, wie man es analog zum G1-Anteil erwarten würde, beobachten. Umso wahrscheinlicher ist es, daß die Vinblastin-Behandlung im Unterschied zur Paclitaxel-Behandlung zu einer verzögerten G2/M-Progression der BON I Zellen mit partieller Apoptoseinduktion nach 24h und nachfolgendem G1-Arrest führte. Ob es hieraus ebenfalls zur Einleitung von Apoptose kam, lassen die gewonnenen Daten nicht erkennen. G2/M-Phasenarrest mit folgender Apoptoseinduktion unter Vinblastin-Behandlung von verschiedenen Tumorzellen wurde in anderen Arbeiten bestätigt (Galmarini et al., 2001; Tashiro et al., 1998). Ein partiell reversibler G2/M-Arrest mit folgendem G1-Arrest und Apoptoseinduktion wurde ebenso berichtet (Comín-Anduix et

al., 2001). Weiterhin war das Ausmaß der Apoptoseinduktion unter Vinblastin von einem intaktem p53-Status abhängig (Galmarini et al., 2001), wobei jedoch auch gegenteilige Beobachtungen mit Mikrotubuli-hemmenden Stoffen gezeigt wurden (Steward et al., 1999; Blagosklonny et al., 2000). Die Reversibilität des beobachteten G2/M-Blocks könnte durch eine intakte p53-Funktion mit folgendem Austritt der Zellen aus dem mitotischem Arrest und folgendem G1-Arrest bedingt sein. Möglicherweise nimmt dadurch auch der apoptotische Zellanteil nach 72h wieder leicht ab (Bissonnette und Hunting, 1998; Gorospe et al., 1997; Yang et al., 2003). Ein weiterer Unterschied zu Paclitaxel liegt in der niedrigeren Konzentration, bei der die Vinblastin-induzierten Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen auftraten. Mögliche Erklärungen könnten in einem unterschiedlichen Wirkmechanismus beider Substanzen an den Mikrotubuli liegen (Downing et al., 2000; Jordan et al., 1991 und 1992). Andere Arbeiten wiesen eine erschwerte Umkehrbarkeit der Wirkung von Paclitaxel auf Mikrotubuli gegenüber Vinblastin nach (Giannakakou et al., 1997 und 1998), so dass der reversible mitotische Arrest in den BON I Zellen möglicherweise auf eine leichtere Dissoziation des Vinblastins von den Mikrotubuli zurückgeführt werden kann. Denkbar ist auch, dass die verwendete Vinblastin-Konzentration zu niedrig war, um die Zellen dauerhaft in der mitotischen Phase zu halten. In Übereinstimmung zu Paclitaxel-behandelten BON I Zellen, scheint der nekrotische Zelltod in Vinblastin-behandelten BON I Zellen, zumindest im verwendeten Niedrigdosisbereich, kein Mechanismus Vinblastin-vermittelter Zytotoxizität zu sein (Comín-Anduix et al., 2001; Inoue et al., 2001).

Die Auswertung des apoptotischen Zellanteils sollte immer im Zusammenhang mit der Zellproliferation interpretiert werden, weil jedes Zellwachstum das natürliche Verhältnis zwischen Zellteilungs- und Absterberate innerhalb einer Zellpopulation widerspiegelt. Einschränkungen im Zellwachstum können daher sowohl auf eine verminderte Zellteilungsfähigkeit oder auf eine im Verhältnis zur Zellteilung zu hohe Absterberate zurückzuführen sein. Eine therapieinduzierte zeitliche Verlängerung der Apoptose würde ebenfalls zu einem insgesamt erhöht gemessenen Apoptoseanteil führen, ohne dass jedoch eine wesentlicher Wachstumsrückgang vorläge, solange die Zellteilungsrate von der Therapie unbeeinträchtigt bleibt. Insgesamt spiegelt also der gemessene apoptotische Zellanteil nicht den wirklichen prozentualen Zellverlust wieder (Darzynkiewicz, 1997*a,b*).

4.2.3. Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von DNA-alkylierenden Substanzen

Dacarbazin-behandelte BON I Zellen zeigten im Gegensatz zur Paclitaxel- und Vinblastinbehandlung nur eine unwesentlich erhöhte Apoptoserate. Dagegen war früh ein deutlicher Anstieg des nekrotischen Zellanteils nachweisbar, so dass der apoptotische Zelltod, zumindest im gewählten Konzentrationsbereich, kein relevanter Mechanismus der Dacarbazin-vermittelten Zytotoxizität zu sein schien. Im Gegensatz dazu zeigten andere Tumorzelllinien, die mit der Dacarbazin-verwandten Substanz Temozolomid behandelt wurden, vornehmlich Apoptoseinduktion (Günther et al., 2003; Hirose et al., 2001). Allerdings waren die eingesetzten Stoffkonzentrationen weitaus niedriger, so dass die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Stoffkonzentration durch eine direkte Beeinträchtigung der Zellintegrität vorzugsweise zu nekrotischem Zelltod führte. Der Zellzyklusverlauf in BON I Zellen weist auf einen reversiblen Arrest oder verzögerte G2/M-Progression der Dacarbazin-behandelten Zellen hin. Analog dazu konnte in Temozolomid-behandelten unterschiedlichen Tumorzelllinien ebenfalls ein G2/M-Arrest gezeigt werden (D'Atri et al., 1998; Liu et al., 1999; Tentori et al., 1998). Das Ausmaß der Zytotoxizität, Eintritt von Zellzyklusarrest und die Induktion von Apoptose waren dabei neben dem p53-Status (Tentori et al., 1998) insbesondere auch von einem intaktem DNA-Mismatch-Repair-System (MRS) abhängig (D'Atri et al., 1998; Liu et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lassen jedoch keinen Rückschluss auf die p53-Funktion in BON I Zellen zu. Unklar bleibt auch, in welcher Zellzyklusphase Nekrose ausgelöst wurde.

Das Zellzyklusprofil der mit niedrigen Doxorubicin-Konzentrationen behandelten BON I Zellen deutet auf einen frühzeitigen G2/M-Arrest innerhalb von 24h mit sekundärem G0/1-Zellzyklusblock nach 72h hin. Ebenso wurde in zahlreichen Tumorzellen ein G2/M-Arrest nach Doxorubicinbehandlung beobachtet (Wahl et al., 2001; Tewey et al., 1984; Krishan und Frei, 1976; Barlogie et al., 1976). Genaue Analysen konnten die vornehmliche Arretierung der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus zeigen (Blagosklonny et al., 2000). Die in der Hoechst-Fluoreszenzfärbung vergrößerten Zellkerne von Doxorubicin-behandelten BON I Zellen könnten somit Hinweis auf eine Arretierung in der G2-Zellzyklusphase mit doppelten DNA-Gehalt sein. Daneben konnte auch die Induktion eines G1-Arrests in Doxorubicin-behandelten Zellen

beobachtet werden (Blagosklonny et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass das jeweilige Ausmaß von G2 und/oder G1-Arrest nach DNA-Schädigung vom Zelltyp und p53/p21^{WAF1} Status abhängt (Blagosklonny et al., 2000; Bunz et al., 1998; Agarwal et al., 1995). Höhere Doxorubicin-Konzentrationen führten in den BON I Zellen demgegenüber zu einem passageren Anstieg des S-Phaseanteils mit folgendem G2/M-Arrest nach 72h ohne G1-Arrest. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Tumorzelltypen bei höheren Doxorubicin-Konzentrationen beschrieben (Nakata et al., 1992; Yamamoto et al., 1999). Neben den konzentrationsabhängigen Zellzyklusveränderungen wurden auch konzentrationsabhängige Unterschiede bei der Apoptoseinduktion in Doxorubicin-behandelten Zellen beobachtet, wobei niedrige Doxorubicin-Konzentrationen trotz G2/M-Arrest nicht oder kaum zur Apoptoseeinleitung führten (Petak et al., 2000; Supino et al., 1992; Yamamoto et al., 1999). Entsprechend kam es erst nach 72-stündiger Inkubationszeit mit niedriger Doxorubicinkonzentration (0,1µM) zu einem nur unwesentlichen Anstieg der Apoptoserate in BON I Zellen (ca. 4%). Obwohl die Apoptoserate bei höherer Doxorubicin-Konzentration nicht mit der Hoechstfärbung bestimmt wurde, kam es zu einem starken Anstieg des Sub-G1-Zellanteils in den Zellzyklusanalysen von BON I Zellen, was als ein Zeichen von Apoptoseeinleitung gilt (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei niedriger Doxorubicin-Konzentration zytostatische- statt zytotoxische Effekte im Vordergrund stehen, da keine wesentliche Erhöhung apoptotischer oder nekrotischer Zellen im Behandlungszeitraum beobachtet wurde. Die Frage, ob es jedoch bei längerer Inkubationszeit mit niedrigeren Doxorubicinkonzentrationen zu einer späteren Aufhebung des G2/M-Arrests in BON I Zellen mit Apoptoseinduktion kommt, wie die Arbeit von Petak et al., 2000 an Kolonkarzinomzellen zeigte, lässt sich aufgrund des Beobachtungszeitraums (72h) in dieser Arbeit nicht beantworten.

Die Cisplatin-Behandlung der BON I Zellen weist auf einen reversiblen S-Phase Arrest oder eine Verlängerung der S-Phase Progression mit anschließendem verzögerten G2/M-Zellzyklusblock hin. Der parallele Anstieg der apoptotischen Zellfraktion (ca. 10%) zeigt, dass die Zellen vermutlich aus dem G2/M-Arrest heraus den apoptotischen Zelltod unterliefen. In diesem Zusammenhang konnten zahlreiche vorausgegangene Arbeiten eine Wirkung von Cisplatin in der S-Phase des Zellzyklus durch Hemmung der DNA-Replikation und RNA-Transkription mit folgendem Arrest in der G2-Phase und Apoptoseinduktion zeigen (Kartalou und Essigman, 2001; Mello et al., 1995;

Sorenson, et al., 1990; Sorenson und Eastman, 1988*a,b*). Weitere Studien berichteten über eine verzögerte S-Phase-Progression vor dem G2/M-Zellzyklusblock (Sorenson und Eastman, 1988*a,b*; Sun et al., 2002; Vanhoefer et al., 1995). Wie die Doxorubicin-behandelten Zellen zeigten auch Cisplatin-behandelte BON I Zellen keine erhöhte Nekroserate, was auch Raffo et al., 2000 in Melanomzellen beobachtete. Das Auftreten vergrößerter Zellkerne in der Hoechst-Fluoreszenzfärbung ist wie in den Doxorubicin-behandelten Zellen vermutlich auf eine Akkumulation von Zellen mit repliziertem DNA-Gehalt in der G2-Phase des Zellzyklus zurückzuführen. Weitere Arbeiten zeigten uneinheitliche Beziehungen zwischen p53-Status und Chemosensitivität von Tumorzellen (Bunz et al., 1999; Kartalou und Essigmann, 2001; Niedner et al., 2001; Pestell et al., 2000). Ebenso kann der Verlust des Mismatch-Repair-Systems (MRS) zu einer Resistenzentstehung gegenüber Cisplatin führen (Aebi et al., 1996; Fink et al., 1996; Kartalou und Essigmann, 2001; Vaisman et al., 1998). Verschiedene Beobachtungen sprechen für eine Interaktion von p53 und des MRS bei der Begrenzung von Cisplatin bedingter Zytotoxizität und Mutagenität (Lin et al., 2001; Vikhanskaya et al., 1999). Rückschlüsse auf die Funktion des Mismatch Repair Systems oder von p53 in BON I Zellen lassen die vorliegenden Untersuchungen nicht zu.

4.2.4. Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion in BON I Zellen nach Applikation von Topoisomerase-Inhibitoren

Irinotecan-behandelte BON I zeigten ähnlich der Doxorubicin-behandelten Zellen eine konzentrationsabhängige Prolongation oder einen reversiblen Arrest der S-Phase mit nachfolgendem G2/M-Zellzyklusblock und Apoptose in BON I Zellen. Der vergrößerte Zellkerndurchmesser ohne vermehrte Mitosen weist, wie nach Doxorubicin und Cisplatinbehandlung, auf den Arrest der Zellen in der G2-Zellzyklusphase hin. Diesen Beobachtungen in BON I Zellen entspricht, dass Irinotecan durch Stabilisierung von DNA-Topoisomerase-I-Komplexen („cleavable complexes“) mit Hemmung von Transkription und Replikation unter Bildung von zytotoxischen Doppelstrangbrüchen S-Phasen-spezifisch wirkt (Arnould et al., 2002; Hsiang und Liu, 1988; Ryan et al., 1994). In der Folge kommt es zu einem G2/M-Arrest mit der Induktion von apoptotischem Zelltod (Arnould et al., 2002; Magrini et al., 2002; Whitacre et al., 1999). In einer weiteren Arbeit konnte die in BON I Zellen konzentrationsabhängige Verzögerung der S-Phase mit anschließender G2/M-Phase-Akkumulation auch in

Kolonkarzinomzellen bei ähnlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten bestätigt werden (Arnould et al., 2002). Der G2/M-Arrest erwies sich wie in BON I Zellen bei vergleichbaren höheren Konzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraumes als irreversibel. Der apoptotische Zellanteil war nach der Akkumulation der Zellen in G2/M am stärksten und weist auf eine Apoptoseinduktion innerhalb des G2/M-Arrests hin (Arnould et al., 2002). Über den Zusammenhang zwischen MRS, p53-Status und Chemosensitivität gegenüber Topoisomerase-I-Inhibitoren wird widersprüchlich berichtet (Bras-Goncalves et al., 2000; Fallik et al., 2000; Fedier et al., 2001; Jacob et al., 2001; Lansiaux et al., 2001; Magrini et al., 2002).

Im Unterschied zur verzögerten S-Phase-Progression mit G2/M-Zellzyklusarrest in Irinotecan-behandelten BON I Zellen deutet der Zellzyklusverlauf in Etoposid-behandelten Zellen auf eine verzögerte G2/M-Progression oder reversiblen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase mit entsprechend verminderter G0/1-Akkumulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nach 72h hin. Diese G0/1-Akkumulation der unbehandelten Zellen entspricht der zeitlichen Depletion des Nährmediums bei voranschreitendem Zellwachstum unter *in vitro* Bedingungen. Ob dieses Phänomen auch bei den Etoposid-behandelten Zellen vorliegt, erscheint wegen der starken Zellproliferationshemmung fraglich. Ein synchronisierter G1-Übergang der in der G2/M-Phase akkumulierten Zellen oder ein zusätzlicher Arrest, bzw. Verzögerung der G1-Phase in Etoposid-behandelten Zellen, lässt sich daher nicht ausschließen. Damit übereinstimmend wurde in verschiedenen Zellen bei intaktem p53-Status ein Arrest in der G1 und G2-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit Topoisomerase-Inhibitoren nachgewiesen (Bozko et al., 2002; Fritsche et al., 1993; Nelson und Kastan, 1994; Milczarek et al., 1997; Scott und Kaufmann, 1998; Steegenga et al., 1996; Tishler et al., 1993). Ebenso ist der Einfluss von p53-Status auf Chemosensitivität und Induktion von apoptotischem Zelltod nach Exposition mit Etoposid und anderen Topoisomerase-Inhibitoren in verschiedenen Zellen uneinheitlich gezeigt worden (Jacob et al., 2001; Lowe et al., 1993; Lowe, 1994; Scott und Kaufmann, 1998; Slichenmyer et al., 1993; Thomas et al., 1996; Waldman et al., 1996). Der fehlende Apoptose- und Nekrosenachweis trotz starker Proliferationshemmung deutet, wie in Doxorubicin-behandelten Zellen, auf zytostatische- und nicht zytotoxische Wirkungsmechanismen von Etoposid in BON I Zellen hin. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Arbeiten von Bozko et al., 2002 und Petak et al., 2000.

4.2.5. Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen nach Applikation des Antimetaboliten 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC)

Die DAC-behandelten Zellen wiesen auf eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase durch eine verzögerte G2/M-Progression gegenüber den Kontrollzellen hin. Alternativ könnte auch ein kompletter G2/M-Block bei gleichzeitiger Verzögerung der G1-S- und S-G2 vorliegen, was jedoch aufgrund der nur mittelgradig eingeschränkten Zellproliferation von DAC-behandelten BON I Zellen unwahrscheinlich erscheint. Der geringfügig erhöhte Sub-G1-Zellanteil in den Zellzyklusanalysen von DAC-behandelten Zellen (nicht gezeigt), ist vermutlich nach Arrest in der G2/M-Phase auf eine erhöhte Bereitschaft der Zellen zum apoptotischen Zelltod zurückzuführen. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu anderen Arbeiten, welche vornehmlich einen G0/1-Arrest durch p16^{INK4a} Reexpression nach DAC Behandlung (Bender et al., 1998; Suh et al., 2000; Liu et al., 2001) und Apoptoseinduktion (Liu et al., 2001) berichten. Allerdings ergaben genomische Analysen eine homozygote Deletion des *CDKN2*-Locus in BON I Zellen (Lubomierski et al., 2001), so dass möglicherweise der Verlust des G1/S-Checkpoints für das Ausbleiben des G1-Arrests nach DAC-Behandlung verantwortlich ist. Demgegenüber sind die Beobachtungen in dieser Arbeit vereinbar mit den Ergebnissen von Rogers et al., 1994 und Davidson et al., 1992, welche eine teilweise verzögerte und konzentrationsabhängige G2/M-Akkumulation mit Apoptoseinduktion in DAC-behandelten Mäuse- und Hamsterzellen zeigten. Ein kompletter früher G2/M-Arrest konnte dabei ebenfalls nicht gezeigt werden. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine verzögerte Wirkung von DAC auf den Zellzyklus und die Vermittlung von Zytotoxizität. Vermutlich kommt es entweder durch ein verändertes Genexpressionsmuster nach DAC-bedingter Demethylierung oder durch direkte S-Phase-spezifische Zytotoxizität mit Aktivierung DNA-schadensassoziierter Gene zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, was die Frage nach einer intakten G2-Checkpoint-Funktion in BON I Zellen aufwirft.

4.3. Sensitivität von BON I Zellen gegenüber Telekobaltbestrahlung und Paclitaxel

Verschiedene Studien haben bei anderen Tumorzellen eine radiosensibilisierende Wirkung von Paclitaxel nachweisen können (Geard et al., 1993; Tishler et al., 1992;

Wang et al., 2000). Die toxisitätssteigernde Wirkung von Paclitaxel wird dadurch erklärt, dass die Zellen durch das Spindelgift in der strahlenempfindlichen G2/M-Phase des Zellzyklus festgehalten werden und die Bestrahlung eine zellschädigendere Wirkung vor allem auf zelluläre DNA entfaltet. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten nach 6-stündiger Paclitaxel-Vorbehandlung (0,01 μM) und anschließender Bestrahlung mit 10 Gy einen signifikanten synergistischen zytotoxischen Effekt in BON I Zellen. Bei geringeren Strahlendosen war dieser Effekt bei gleicher Paclitaxelkonzentration jedoch nicht ausgeprägt. Offensichtlich ist ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase nicht für den strahlensensibilisierenden Effekt verantwortlich, da es bei der eingesetzten Paclitaxel-Konzentration nicht zu einem Arrest in dieser Zellzyklusphase kam. Außerdem führte die Vorbehandlung mit höheren Paclitaxel-Konzentrationen, welche einen G2/M-Arrest in BON I Zellen bewirkten, und die anschließende Bestrahlung lediglich zu einem subadditiven Effekt. Das Ausmaß der Strahlensensibilisierung in BON I Zellen war demnach von der eingesetzten Stoffkonzentration abhängig. Weiterhin deutet der nur bei einer hohen Strahlendosis synergistische strahlensensibilisierende Effekt auf eine Abhängigkeit von der Strahlendosis in BON I Zellen hin. Viele vorausgegangene Arbeiten konnten ebenfalls eine Zellzyklusblock-unabhängige Strahlensensibilisierung von Paclitaxel in verschiedenen Zellen zeigen (Hei und Hall, 1993; Liebmann et al., 1994a; Niero et al., 1999). Weitere Studien legen eine starke Abhängigkeit des radiosensibilisierenden Effektes von der Vorbehandlungszeit, der gewählten Paclitaxelkonzentration und von den gewählten Zellkulturen nahe (Geard et al., 1993; Liebmann et al., 1994c; Milas et al., 1994 und 1995; Niero et al., 1999; Steren et al., 1993; Stromberg et al., 1995; Tishler et al., 1992; Wang et al., 2000), so dass wahrscheinlich multiple zelluläre Mechanismen interagieren. Offen bleibt, ob es bei Paclitaxel-Konzentrationen unter 0,01 μM in der Vorbehandlung oder bei einer Verlängerung der Vorbehandlungszeit zu einem synergistischen Bestrahlungseffekt in BON I Zellen gekommen wäre. Analog wurde bei nur sehr niedrigen Paclitaxel-Konzentrationen (1-10 nM) und mindestens 18-stündiger Vorbehandlungszeit ein bestrahlungsverstärkender Effekt in bestimmten Melanom- und Bronchialkarzinom-zellen ermittelt (Zanelli et al., 1997). Auch hier war die Strahlensensibilisierung nicht von einem G2/M-Zellzyklusarrest begleitet sondern von der Paclitaxelkonzentration abhängig.

Die Zellzyklusanalysen von Paclitaxel-vorbehandelten und bestrahlten BON I Zellen zeigen deutlich, dass der gemessene G2/M-Arrest nicht von der Paclitaxel-

Vorbehandlung induziert wurde, sondern wahrscheinlich ein strahlungsbedingter Mechanismus ist, da der G2/M-Arrest bei alleiniger Paclitaxel-Behandlung nicht vorhanden war. Im Zusammenhang mit den lichtmikroskopisch vergrößerten Zellen in den Proliferationsuntersuchungen könnte dies für einen Arrest der Zellen in der G2-Phase mit Verlust der mitotischen Progression mit zunehmender Strahlendosis sprechen, wie es auch in der Arbeit von Bunnak et al., 1994 gezeigt wurde. Dagegen lassen die gewonnenen Zellzyklusanalysen keine Aussagen darüber zu, ob die Paclitaxel-Vorbehandlung einen Einfluss auf die veränderte Zellzyklusverteilung in den, insbesondere mit der hohen Dosis, bestrahlten Zellen hat, weil keine Zellzyklusanalyse von den nur bestrahlten Zellen ohne Paclitaxel-Vorbehandlung durchgeführt wurde und die Zellzyklusverteilungen zum Bestrahlungsbeginn unbekannt sind.

Bei der Bestimmung des antiproliferativen Bestrahlungseffekts wies der MTT-Test eine geringere Sensitivität im Vergleich zu der Trypanblau-Färbung auf. Diese Beobachtung wurde auch in der Arbeit von Bunnak et al., 1994 in strahlenbehandelten Zervixkarzinomzellen berichtet. Nach der Bestrahlung wurden viele vergrößerte Zellen nachgewiesen, welche mehr MTT-Substrat reduzierten als die unbestrahlten Zellen. Auch die bestrahlten BON I Zellen waren lichtmikroskopisch vergrößert. Möglicherweise verlieren die bestrahlten Zellen ab einer bestimmten Strahlendosis die Teilungsfähigkeit ohne dass die Funktion und Synthese der übrigen Zellorganellen, z.B. der Mitochondrien beeinträchtigt wird. Dadurch wird im Verhältnis zur eigentlichen Zellzahl zu viel MTT-Substrat umgesetzt und die Überlebensrate zu hoch gemessen. Die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau ist dagegen von der Zellmembranintegrität abhängig.

4.4. Paclitaxel-modulierte Alteration zellzyklus- und apoptosespezifischer Gen- und Proteinexpression in BON I Zellen

Von der Identifizierung von Zielgenen der Zellzyklusregulation oder Apoptose, die an der Chemoresistenz beteiligt sind, verspricht man sich ein besseres Verstehen der dem Zellwachstum zugrunde liegenden Kontrollmechanismen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Paclitaxel-induzierten Zellzyklusveränderungen von Änderungen in der Genexpression von *Zyklin B* bzw. *Zyklin D1* in Kombination mit

CDK4 und *-6* begleitet sind. Der *Zyklin-A/CDK2*-Komplex wurde nicht induziert. Die transkriptionelle Heraufregulation der die G1/S-Transition einleitenden Zyklin-abhängigen Kinasen *CDK4* und *-6* mit ihren regulatorischen Zyklin D1- und D3 Untereinheiten könnte auf einen Verlust oder eine fehlende Beteiligung des G1-„Damage-Checkpoints“ in BON I Zellen hinweisen, so dass die Zellen ungehindert in die S-Phase übertreten können. Normalerweise verhindert dieser Checkpoint eine Replikation geschädigter DNA durch einen Zellarrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Funk 1999; Zhou und Elledge, 2000; Johnson und Walker, 1999; Taylor und Stark, 2001 Waldmann et al., 1996). Verschiedene Arbeiten zeigen unterschiedliche Veränderungen der *Zyklin D1*- und *CDK4* Transkription in Tumorzellen nach Paclitaxel-Behandlung (Michalides et al., 2002; Yoo et al., 1998; Yoshizaki et al., 1998), so dass wahrscheinlich zell- und konzentrationspezifische Ursachen der veränderten Genexpression zugrundeliegen. Die mRNA-Expression von *Zyklin D2* konnte dagegen in BON I Zellen nicht nachgewiesen werden. Eine weitere mögliche Erklärung für einen fehlenden G1-Arrest in BON I Zellen nach Paclitaxel-Behandlung könnte die homozygote Deletion des *CDKN2* Genlocus auf Chromosom *9q21* in BON I Zellen sein (Lubomierski et al., 2001), dessen Genprodukte (p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p14^{ARF}) die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinasen *CDK4* und *-6* hemmen und somit die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindern.

Die Überexpression von *p21^{WAF1/CIP1}* ohne *p53*-Induktion in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen deutet auf eine *p53*-unabhängige Regulation hin (Blagosklonny et al., 1995; Levine, 1997; Macleod et al., 1995; Michalides et al., 2002; Wang et al., 2000). Nicht auszuschließen sind posttranslationelle Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, was in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Die niedrige *p53*-Gentranskription in BON I Zellen wird von der Arbeit von Arany et al., 1994 bestätigt, welche eine Herabregulation in BON I Zellen finden konnte. Ein *p21^{WAF1/CIP1}* vermittelter G1-Zellarrest (Johnson und Walker, 1999; Taylor und Stark, 2001; Waldmann et al., 1996) scheint bei den Paclitaxel-vermittelten Zellzyklusveränderungen in BON I Zellen nicht beteiligt zu sein.

Unklar bleibt, ob die beobachtete Überexpression des Zyklin-abhängige Kinase Inhibitors *p27^{KIP1}* Gens bei verminderter *Zyklin E*- und unveränderter *CDK2* Genexpression in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen in einem Zusammenhang steht, da gezeigt wurde, dass *p27^{KIP1}* *CDK2/Zyklin E*- und *CDK2/Zyklin A*-Komplexe inhibiert (Polyak et al., 1994). Allerdings wurde dieser Mechanismus auf Proteinebene

gezeigt. In diesem Zusammenhang zeigte die Arbeit von Michalides et al., 2002 eine verminderte Zyklin E-Proteinexpression nach Paclitaxel-Behandlung, welche allerdings nicht auf eine verstärkte Interaktion mit $p27^{KIP1}$ zurückgeführt werden konnte. Ebenfalls nicht auszuschließen sind sekundäre Genregulationsmechanismen von $p27^{KIP1}$ und $p21^{WAF1/CIP1}$ als Folge der *Zyklin D1*, *CDK4* und *CDK6* Überexpression in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen, was in anderen Zellen auf Proteinebene gezeigt wurde (Hiyama et al., 1997 und 1998; Macleod et al., 1995; Michalides et al., 2002). Beim Vergleich der Genexpression von $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, *Zyklin E* und *Zyklin B* mit der jeweiligen Proteinexpression in BON I Zellen wurden nur für Zyklin E und fraglich für Zyklin B nach 24h eine Übereinstimmung gefunden, so dass vermutlich posttranslationelle Mechanismen, Degradation von Proteinen und andere Interaktionsmechanismen eine Rolle spielen können (Gervais et al., 1998; Jeffrey et al., 2002; Park et al., 1998; Yang et al., 2003). In einer Arbeit an Paclitaxel-behandelten Mammakarzinomzellen konnte ein ähnliches Expressionsmuster von Zyklin B1 auf mRNA und Proteinebene gezeigt werden (Michalides et al., 2002) und weitere zahlreiche Arbeiten weisen eine Überexpression von Zyklin B1 Protein in Tumorzelllinien unter Paclitaxel-Behandlung nach (Blagosklonny und Fojo, 1999; Chadebech et al., 2000; Donaldson et al., 1994; Ling et al., 1998a). Da für die Einleitung von Mitose Zyklin B1 durch CDC2 aktiviert werden muss und die Paclitaxel-Behandlung zu einem mitotischen Arrest der Zellen führt, ist es naheliegend, dass es auch in BON I Zellen zu einem Anstieg der Zyklin B1-Expression kam. Auffälligerweise kam es zu keiner vermehrten Transkription von *CDC25Hs*, einem CDC25C-Homolog aus der Spalthefe, welches den Zyklin B1/CDC2 Komplex aktiviert, was für eine vorzeitige Aktivierung oder posttranslationelle Mechanismen spricht.

Sowohl zahlreiche Arbeiten an anderen Tumorzellen als auch die in der vorliegenden Arbeit an BON I Zellen gewonnenen Ergebnisse haben eine zeit- und konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion nach Paclitaxel-Behandlung gezeigt (Abal et al., 2003; Blagosklonny und Fojo, 1999; Ganansia-Levymarie et al., 2003; Torres und Horwitz, 1998; Wang et al., 2000). Weiterhin konnte eine Herabregulation der antiapoptotischen Bcl-Mitglieder Bcl-2 und Bcl-xL, bzw. eine Überexpression von proapoptotischem Bax als ein Mechanismus der Taxane-induzierten Apoptose gezeigt werden (Ganansia-Levymarie et al., 2003; Liu und Stein, 1997; Srivastava et al., 1998; Wang et al., 2000). Bei der Untersuchung von BON I Zellen war anhand der Multiplex-

PCR keine veränderte Transkription von *Bcl-2*, *Bax* und *Bcl-xL* bei der Paclitaxel-induzierten Apoptose in BON I Zellen nachweisbar. Die mRNA-Expression von *Caspase-3* (*LICE*) und proapoptotischem *Bcl-xS* erwies sich zur Auswertung zu schwach exprimiert. Analog zu den Transkriptionsergebnissen von *Bcl-2* und *Bax* in BON I Zellen wurde in der Arbeit von Michalides et al., 2002 eine unveränderte Proteinexpression gezeigt. Nicht auszuschließen sind jedoch Veränderungen der Proteinexpression oder posttranslationale Veränderungen, was in zahlreichen Arbeiten mit Paclitaxel-induzierten mitotischen Arrest und Apoptoseinduktion in Zusammenhang gebracht werden konnte (Blagosklonny und Fojo, 1999; Wang et al., 1999; Wang et al., 2000).

Mit der Hilfe der cDNA-Array Analyse wurden in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen 18 Gene identifiziert (*gadd45*, *egr-1*, *pig8*, *ATF-2*, *CDC2*, *CDK5*, *NEDD5 protein homolog*, *CDC37 homolog*, *JNK3A2*, *E2F-3*, *E2F-5*, *DP1*, *GRB-IR/GRB10*, *pig6*, *Caspase-9*, *IGF-1*, *FAST*, *CD27 binding protein*), die signifikant überexprimiert waren. Von den 16 mit RT-PCR überprüften Genen konnten 6 Gene (*CDC2*, *CDK5*, *NEDD5 protein homolog*, *DP1*, *Caspase-9*, *CD27 binding protein*) sicher überexprimiert in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen bestätigt werden. Somit können unspezifische Bindungsverhältnisse auf den Arrays nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde anhand der cDNA-Arrays in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen trotz fehlendem *p53*-Transkript eine verstärkte mRNA-Expression der *p53*-induzierbaren Gene *pig6*, *pig8*, *gadd45* nachgewiesen, wobei *pig6* und *gadd45* jedoch nicht mit RT-PCR bestätigt werden konnten. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sind insofern neu, als dass in den zur Verfügung stehenden Arbeiten bisher keine *pig8*-Induktion nach Paclitaxel-Behandlung gezeigt werden konnte (Brachat et al., 2002). *Pig8* ist ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom *11q23-q24* und „downstream“-Vermittler der *p53*-induzierten Apoptose (Gu et al., 2000; Lehar et al., 1996; Polyak et al., 1997, Gentile et al., 2001). Auf welchem Weg *pig8* zur Apoptoseeinleitung führt ist weitgehend unbekannt.

Die transkriptionelle *ATF-2*-Aktivierung legt eine Beteiligung des sog. mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signal-Systems an der Paclitaxel-Wirkung nahe. *ATF-2* ist ein Teil des AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexes, welcher infolge c-Jun N-terminal protein kinase (JNK)-Aktivierung, einem Mitglied der MAPK-Familie,

induziert wird (Ip und Davis, 1998; Karin, 1995; Lewis et al., 1998; Stone und Chambers, 2000).

Interessant ist auch die *egr-1*-Überexpression in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen. Egr-1 ist ein Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der durch Mitglieder des MAPK-Signaltransduktionsweges (JNK und ERK- extracellular signal-regulated protein kinase) (Kaufmann et al., 2001; Thiel und Cibelli, 2002; Whitmarsh, 1995), bzw. infolge verschiedener Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen und Neurotransmittern, aber auch zytotoxischen Metaboliten frühzeitig induziert werden kann (Thiel und Cibelli, 2002). Neben Wachstum-, Regeneration- und Reproduktion-regulierenden Funktionen wurde *egr-1* u.a. p53-abhängige Apoptose-induzierende Eigenschaften zugeschrieben (Harada et al., 2001; Jones et al., 2001; Kaufmann und Thiel, 2002; Kaufmann et al., 2001; Khachigian et al., 1996; Liu et al., 1998; Thiel und Cibelli, 2002, de Belle et al., 1999; Bartholomä et al., 2002; Hallahan et al., 1995; Huang et al., 1998). Die proapoptotische Wirkung von Egr-1 scheint zellspezifisch und abhängig vom auslösenden Faktor zu sein. Die verstärkte *egr-1* Expression in Kombination mit dem starken Apoptosenachweis in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen spricht für eine Beteiligung von *egr-1* bei der Apoptoseinduktion. Die transkriptionelle *egr-1*-Überexpression in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen wurde bisher nicht beschrieben (Gubits et al., 1993).

Wie nach dem RT-PCR-Nachweis einer vermehrten *Zyklin-B1* Transkription in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen zu erwarten war, konnte mit dem cDNA-Array eine verstärkte *CDC2*-Transkription nachgewiesen werden. CDC2 fördert im Komplex mit Zyklin-B1 die G2-M-Progression der Zellen (Smits und Medema 2001). Zahlreiche Arbeiten legen einen Zusammenhang zwischen Paclitaxel-induzierter Apoptose und CDC2-Aktivierung nahe (Chadebech et al., 2000; Donaldson et al., 1994; Huang et al., 1997; Ibrado et al., 1998; Shen et al., 1998; Wang et al., 2000). Ob allerdings aktiviertes CDC2 die Ursache oder eine Konsequenz des mitotischen Arrests ist, ist noch unklar (Ling et al., 1998b; Wang et al., 2000; Yu et al., 1998). Es konnte jedoch keine *Zyklin B1* Expression mit dem cDNA Array in BON I Zellen gefunden werden, so dass von einer zu geringen Sensitivität gegenüber der RT-PCR auszugehen ist.

Die mRNA-Überexpression von Zyklin-abhängiger Kinase-5 (*CDK5*) in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen war insofern überraschend, da bisher lediglich eine Paclitaxel-bedingte Inaktivierung von *CDK5* in kortikalen Neuronen gezeigt werden konnte (Li et al., 2003). Im Gegensatz zu allen anderen CDKs wirkt *CDK5* nicht in Verbindung mit Zyklinen und scheint für die Zellzyklusregulation keine Rolle zu spielen (Honma et al., 1997; Weishaupt et al., 2003). Durch Aktivierung von zahlreichen Substraten scheint *CDK5* u.a. auch eine Funktion bei der Regulation des Zytoskeletts, neuronaler Migration, Zelladhäsion und axonalem Transport zu haben (Weishaupt et al., 2003). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die *CDK5*-Aktivierung über einen MAPK-Signalweg unter der Vermittlung von *egr-1* erfolgt, also genau jenem Transkriptionsfaktor, welcher in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen eine stärkere Transkription erfuhr. Dabei konnte ein negativer Feedback-Mechanismus von aktiviertem *CDK5* auf *JNK3*-Kinase, einem weiteren Mitglied des MAPK-Signalwegs, gezeigt werden (Harada et al., 2001; Sharma et al., 2002; Weishaupt et al., 2003). Die verstärkte *CDK5*-Transkription in BON I Zellen, ähnlich wie bei *CDC2*, könnte eine Folge des mitotischen Arrests der Zellen durch die Paclitaxel-bedingte Disorganisation von Mikrotubuli und Mitosespindeln sein. *CDK5* besitzt regulatorische Eigenschaften auf den dynamischen Mikrotubuliaufbau und den axonalen Transport (Flaherty et al., 2000; Niethammer et al., 2000; Pigino et al., 1997; Ratner et al., 1998; Smith und Tsai, 2002) und weist eine große Homologie zu *CDC2* auf, welches ebenfalls an den mitotischen Veränderungen des Zytoskeletts, des Mikrotubuli- und Membranaufbaus in der Zelle beteiligt ist (Meyerson et al., 1992; Nigg et al., 1991; Smith und Tsai, 2001). In diesem Zusammenhang ist auch die vermehrte Transkription von *NEDD5*, das ein Septinprotein mit GTPase-Funktion kodiert interessant. *NEDD5* wird v.a. in neuronalem Gewebe exprimiert erfüllt Aufgaben bei der Regulation des Zytoskeletts, neuronaler Differenzierung, Aussprossung von Neuriten und bei der Zytokinese während der Zellteilung (Kinoshita et al., 1997; Sakai et al., 2002; Vega und Hsu, 2003). Zur Erfüllung seiner Funktion assoziiert *NEDD5* mit Mikrotubuli. Die Behandlung mit Mikrotubuli-wirksamen Stoffen führt zur Umverteilung seiner perinukleären Lokalisation (Vega und Hsu, 2003). Dies führt zum maximalen Anstieg der *NEDD5* Transkription und Translation von der S- zur G2/M-Phase (Sakai et al., 2002), was in Verbindung mit den Beobachtungen in BON I Zellen eine Folgeerscheinung des Paclitaxel-bedingten G2/M-Arrests sein könnte. Die Bedeutung

vermehrter Expression von *NEDD5* in Adenokarzinomzellen des Pankreas im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe ist bisher unklar (Crnogorac-Jurcevic, 2001).

Die cDNA-Array Ergebnisse in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen zeigten eine verstärkte Transkription von *CDC37*, einem Hefehomolog vom menschlichen P50^{cdc37} Protein (Perdew et al., 1997; Pratt, 1998; Stepanova et al., 1996). Normalerweise ist p50cdc37 mit dem Heat shock protein hsp90 assoziiert und wirkt in Zusammenhang mit verschiedenen Protein Kinasen als sog. Heterokomplex bei der Signaltransduktion von Hormonen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, z.B. des Glukokortikoidrezeptors (Pratt et al., 1998 und 1999). Dieser Signalkomplex soll dabei insbesondere eine Funktion beim zytoplasmatischen Transport von in Signalwegen involvierten Proteinen an zytoskelettalen Strukturen und Mikrotubuli besitzen. Im Gegensatz zur verstärkten *CDC37*-Transkription wurde keine Überexpression von *hsp90* in BON I Zellen beobachtet. Die Bedeutung des Hsp90/P50^{cdc37} Heterokomplexes bei der Paclitaxel-induzierten Apoptose in BON I Zellen bleibt unklar, zumal dieser Signalkomplex vorzugsweise Proliferations- und Überlebenssignale vermittelt und die Hemmung der hsp90-Funktion zu einer verstärkten Paclitaxel-Sensitivität in Mammakarzinomzellen führt (Solit et al., 2003).

Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellzyklusprogression, indem sie die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren, die für die G1-S-Phasentransition, Replikation, DNA-Reparatur und Mitose benötigt werden (Polager et al., 2002; Sherr et al., 1996; Weinberg, 1995). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen den in der RT-PCR überexprimierten Genen *Zyklin-D*, *CDK4* und *-6* und der Überexpression von *E2F3* in BON I Zellen, da die Phosphorylisation und Inaktivierung von Rb in der späten G1-Phase des Zellzyklus durch Zyklin D/CDK4 u. -6-Komplexe zur Freisetzung von verschiedenen E2F-Transkriptionsfaktoren führt (Moberg et al., 1996; Polager et al., 2002). E2F-1-Induktion konnte nach Applikation von DNA-schädigenden Stoffen nachgewiesen werden (Hsieh et al., 2002; Blattner et al., 1999; O'Connor und Lu, 2000). Auch wurden für E2F-1, -2 und -3 eine Funktion bei der Vermittlung p53-abhängiger Apoptose durch direkte Interaktion mit p53 nach DNA-Schädigung gezeigt (Hsieh et al., 2002). Ob dieser Mechanismus auch für die Paclitaxel-bedingte Apoptose in BON I Zellen in Frage kommt, bleibt offen.

Die Heraufregulation von *Caspase-9* mRNA nach Paclitaxel-Behandlung von BON I Zellen weist auf eine Beteiligung mitochondrial-vermittelter Apoptose hin, welche häufig infolge Chemotherapeutika-induzierter Apoptose beschrrieben wird (Kim et al., 2002b, Green, 1998; Herr und Debatin, 2001; Hu et al., 1998; Li et al., 1997). Überraschenderweise wurde, außer der verstärkten *Caspase-9* Transkription nach Paclitaxel-Behandlung, keine transkriptionelle Heraufregulation der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 beobachtet. Möglicherweise ist dies jedoch auf die zu geringe Sensitivität des cDNA Arrays oder der Multiplex-PCR zurückzuführen. Zudem wurde über Caspasen-unabhängige Apoptosevermittlung nach Paclitaxelbehandlung berichtet (Huisman et al., 2002; Ofir et al., 2002). Auch eine transkriptionelle Regulation der Bcl-2 Genfamilie scheint in BON I Zellen nicht an der Paclitaxel-vermittelten Apoptose beteiligt zu sein und vermutlich stehen posttranslationelle Mechanismen, z.B. durch Phosphorylierung, im Vordergrund (Blagosklonny et al., 1996; Cheng et al., 2001; Haldar et al., 1995; Yuan et al., 2002). Die Expression von *Fas-Rezeptor*, *Fas-Ligand*, bzw. von Fas assoziierter *Initiatorcaspase-8* konnte ebensowenig nachgewiesen werden, wie die Expression von anderen Todesrezeptoren. Diese Daten an BON I könnten zu der Vermutung führen, dass es unter Paclitaxel primär zu mitochondrial-vermittelter Apoptose kommt (Eischen et al., 1997; Kottke et al., 2002; Poruchynsky et al., 1998; Weigel et al., 2000; Yuan et al., 2002), wobei eine primäre Regulation auf Proteinebene in BON I Zellen nicht auszuschließen ist. Im Unterschied zeigen andere Arbeiten eine Beteiligung des Todesrezeptorsignalweges und Caspase-8 Aktivierung bei der Vermittlung Paclitaxel-induzierter Apoptose (Friesen et al., 1996; Gibson et al., 1999; Pucci et al., 1999; Yuan et al., 2002).

Interessant ist die Induktion des CD27-bindenden proapoptotischen Protein *Siva*, da die Expression von CD27 und seinem Liganden, CD70, auf T- und B-Lymphozyten beschränkt sein soll (Prasad et al., 1997). CD27 ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zellwachstum und Differenzierung sowie von Apoptose spielen (Prasad et al., 1997; Smith et al., 1994). Es gibt auch Hinweise auf CD27-unabhängige Apoptoseinduktion durch *Siva*, wobei *Siva-1* durch Interaktion mit Bcl-xL dessen antiapoptotische Funktion und verstärkt dadurch die UV-induzierte Apoptose in HeLa Zellen wirkt (Xue et al., 2002). In einer Cisplatin-behandelten Hepatom-Zelllinie gehörte *Siva* zu den überexprimierten Genen (Qin et al., 2002).

Von den 14 Genen (*Zyklin-B*, *-D1*, *-D2*, *-D3*, *-E*, *CDK2*, *-4*, *-6*, *CDC25*, *p21^{waf1}*, *p53*, *Caspase-3*, *Bcl2* und *Bax*), welche mit RT-PCR in Paclitaxel be- und unbehandelten BON I Zellen untersucht wurden, konnten 3 mit den cDNA Arrays sicher bestätigt werden (fehlende Expression von *Zyklin-D2*, *p53* und *Caspase-3*). Der prozentuale Anteil von denjenigen Genen, die auf dem Array exprimiert waren und mit PCR bestätigt wurden, im Vergleich zum Anteil von solchen Genen, deren Expression in der RT-PCR mit den Arrays bestätigt werden konnte, beträgt 37,5% vs. 21,4%. Dieses Verhältnis und die Tatsache, dass von den mit beiden Methoden untersuchten Genen mehr Gene im Array eine fehlende Expression aufwiesen als in den RT-PCRs, deutet insgesamt auf eine geringere Sensitivität des cDNA-Arrays gegenüber der RT-PCR hin. Vermutlich hat die kurze Hybridisierungszeit des „Atlas-Apoptosis“-Arrays und die anschließende Expositionszeit auf dem Phosphorimager von jeweils 24h zur fehlenden Nachweisbarkeit auf dem Array beigetragen. Auch die beiden verwendeten cDNA-Arrays zeigten Unterschiede in der Expression, wobei von 10 der mit beiden Arrays untersuchten Gene (*NOS*, *mdm2*, *FasL*, *NFkB*, *p57KIP2*, *pig7*, *p21WAF1*, *p19INK4d*, *Bax*, *gadd45*) 6 in beiden Arrays eine fehlende Expression (60%) und 4 ein abweichendes Expressionsmuster (*p21WAF1*, *p19INK4d*, *Bax*, *gadd45*) aufwiesen. Auch hier könnte die kürzere Expositionszeit des Atlas-Arrays auf dem Phosphorimager gegenüber der des „Human Pathway Finder“-Arrays auf dem Röntgenfilm eine Rolle gespielt haben. Möglich ist auch eine unterschiedlich geblottete cDNA-Menge. In beiden cDNA Arrays wurden in den Paclitaxel-behandelten BON I Zellen lediglich über- oder gleichartig exprimierte Gene aber keine herabregulierten Gene beobachtet.

Zusammenfassend weisen die cDNA-Expressionsmuster auf ein Zusammenspiel verschiedener aktivierter Signalwege in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen hin. Die Tatsache, dass für einige der im cDNA-Array überexprimierten Genprodukte eine Assoziation mit einigen MAPK-Mitgliedern gezeigt werden konnte (*CDK5*, *egr-1*, *ATF-2* und *CDC37 homolog*) spricht für eine Beteiligung des MAPK-Signalweges. Ob es sich bei den beobachteten Genexpressionsveränderungen um direkte Paclitaxel-vermittelte transkriptionelle Veränderungen oder indirekte Folgeerscheinungen auf die Paclitaxel-induzierten zellulären und strukturellen Veränderungen handelt, bleibt unklar. Weiterhin deutet die Genexpression von *Caspase-9*, *CDK5* und *CD27BP (Siva)* auf eine mitochondriale Involvierung bei der Paclitaxel-vermittelten Apoptose in BON I Zellen hin, da für die Proteine teilweise eine mitochondriale Lokalisation bzw.

Assoziationen mit mitochondrialen Proteinen gezeigt werden konnte. Eine transkriptionelle Expressionsveränderung von untersuchten mitochondrialen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-Familie konnte nicht einheitlich gefunden werden, so dass posttranslationale Mechanismen, z.B. -Phosphorylierung möglich sind. Die verstärkte Expression der p53-abhängigen Gene *pig6*, *pig8*, *Bax* und *gadd45* im „Human Pathway-Finder“-Array, bzw. von *p21^{WAF1}* in der RT-PCR weisen auf eine mögliche Beteiligung von p53 bei der Vermittlung von Paclitaxel-induzierter Apoptose hin, obwohl sich je nach Nachweismethode abweichende Expressionsmuster ergaben

4.5. Demethylierung-induzierte Alteration zellzyklus- und apoptosespezifischer Gene in BON I Zellen

Demethylierung führte in BON I Zellen zu einer Heraufregulation der *p21^{WAF1/CIP1}* Genexpression. Eine mögliche Erklärung wäre die Aktivierung eines p53-schadensassoziierten Signalweges zur *p21^{WAF1/CIP1}* Heraufregulation (Karpf et al., 2001). Andere Arbeiten haben aber auch eine Inaktivierung der *p21^{WAF1/CIP1}*-Expression durch Pomotormethylierung in Rat-1 Zellen zeigen können, die durch DAC-Behandlung reversibel war (Allan et al., 2000). Überraschenderweise kam es in BON I Zellen infolge der *p21^{WAF1/CIP1}* Überexpression nicht zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, sondern zur G2/M-Akkumulation. Der fehlende G1-Arrest könnte durch die homozygote Deletion von *p16^{INK4a}* und *p15^{INK4b}* in BON I Zellen (Lubomierski et al., 2001) bedingt sein. In der Folge akkumulieren die Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Allerdings scheint, anders als in Paclitaxel-behandelten BON I Zellen, die G2/M-Akkumulation nicht von einer transkriptionellen Heraufregulation von *Zyclin D1*, *D3*, *CDK4* und *CDK6* begleitet zu sein. Alternativ könnte die vermehrte *p21^{WAF1/CIP1}* Expression in DAC-behandelten BON I Zellen auch Ausdruck einer durch DAC-vermittelten Seneszenz der Zellen sein (McGregor et al., 2002; Huschtscha und Reddel, 1999).

Vermutlich ist die beobachtete Proliferationshemmung DAC-behandelter BON I Zellen im MTT-Test und die geringfügig erhöhte Apoptoseeinleitung Folge des G2/M-Arrests. Im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose sind die Gründe für die differentielle Transkription der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL unklar und in der gesichteten Literatur fanden sich keine Hinweise auf eine Alteration von Genen

der Bcl-2-Familie nach DAC-Behandlung. Auch ist unbekannt, ob die veränderte Genexpression auf einer DAC-bedingten Demethylierung, beispielsweise in der Promotorregion der jeweiligen Gene beruht, oder ob diese Veränderung eine davon unabhängige Folge einer Einleitung des mitochondrialen Apoptoseprogramms in DAC-behandelten BON I Zellen ist.

5. Zusammenfassung

Die zur Behandlung maligner neuroendokriner gastroenteropankreatischer Tumoren eingesetzten Chemotherapeutika führen bisher zu keiner deutlich verbesserten Überlebenszeit der Patienten. Vor diesem Hintergrund sollte *in vitro* die Chemosensitivität bzw. Chemoresistenz der neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie BON I gegenüber verschiedenen Substanzklassen von Chemotherapeutika analysiert und die Veränderungen der Zellzyklusregulation, Apoptoseinduktion und Genexpression charakterisiert werden.

Die Mitosehemmstoffe Vinblastin und Vincristin zeigten in äquivalenter Konzentration den stärksten proliferationshemmenden Effekt, den zweitstärksten zeigte Paclitaxel. Paclitaxelbehandlung führte neben Vinblastin zeit- und konzentrationsabhängig zum ausgeprägten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase mit Einleitung der Apoptose. Dagegen erfolgte bei Cisplatin, Doxorubicin, Irinotecan und 5-Aza-2'-Deoxycytidin ein verzögerter schwächerer G2/M-Arrest mit nur geringer Apoptoseinduktion. Vorbehandlung der Zellen mit Paclitaxel und anschließender Bestrahlung führte nur bei hoher Strahlendosis zu einem signifikanten synergistischen Effekt auf die BON I Zellproliferation. BON I Zellen zeigten sich gegenüber 5-Fluorouracil, Carboplatin oder Octreotidacetat nicht sensitiv.

Genexpressionsanalysen in Paclitaxel-behandelten versus unbehandelten BON I Zellen konnten die Heraufregulation verschiedener Zykline und Zyklin-assoziiierter Kinasen und ihrer Inhibitoren, sowie einiger apoptoseregulierender Gene mit RT-PCR, cDNA-Array und Westernblotanalyse nachweisen. Insgesamt ergaben sich anhand der Ergebnisse keine Hinweise auf eine p53-abhängige oder eine Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in Paclitaxel-behandelten BON-1-Zellen. Stattdessen könnte die Paclitaxel-induzierte Heraufregulation von Caspase-9 und eingeschränkt auch von Bax auf einen mitochondrialen Apoptosepathway hinweisen.

In dieser Arbeit wurde erstmals ein durch Paclitaxel ausgelöster G2/M-Arrest, die Induktion von Apoptose und ein synergistischer radiosensitivierender Effekt in einer neuroendokrinen Pankreastumorzelllinie (Karzinoid) nachgewiesen. Aufgrund der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wäre daher ein verbessertes klinisches Ansprechen von neuroendokrinen pankreatischen Tumoren (Karzinoid) unter Paclitaxel-Behandlung *in vivo* denkbar.

6. Literaturverzeichnis

Abal, M., Andreu, J.M., Barasoain, I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3(3):193-203.

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland, C.R., Koi, M., Fishel, R., Howell, S.B. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996; 56:3087-3090.

Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Stark, G.R. P53 controls both the G2/M and the G1 cell-cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8493-8497.

Akamatsu, K., Saito, H., Tsunenari, T., Matsumoto, T., Morikawa, K., Koizumi, M., Mitsui, H., Koizumi, K. In vitro antitumor activity of a new platinum complex, DWA2114R against human tumor cell lines. *Anticancer Res* 1993;13(6A):2261-5.

Akutsu, M., Kano, Y., Tsunoda, S., Suzuki, K., Yazawa, Y., Miura, Y. Schedule-dependent Interaction Between Paclitaxel and Doxorubicin in Human Cancer Cell Lines In Vitro. *Eur J Cancer* 1995 Dec, 31A(13-14):2341-6.

Allan, L.A., Duhig, T., Read, M., Fried, M. The p21 WAF1/CIP1 promotor is methylated in Rat-1 cells: stable restoration of p53-dependent p21 WAF1/CIP1 expression after transfection of a genomic clone containing the p21 WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20(4):1291-1298.

Alnemri ES, Livingston DL, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.

Ansell, S.M., Pitot, H.C., Burch, P.A., Kvols, L.K., Mahoney, M.R., Rubin, J. A Phase II Study of High-Dose Paclitaxel in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors. *Cancer* 2001; 91: 1543-8.

Arany, I., Rady, P., Evers, B.M., Tyring, S.K., Townsend, C.M. Jr. Analysis of multiple molecular changes in human endocrine tumors. *Surg Oncol* 1994; 3:153-159.

Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M. Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol.* 1989;30:417-48. Review.

Arnold, C.N., Goel, A., Boland, C.R. Role of hMLH1 promotor hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;106:66-73.

Arnold, R, Simon, B. Apudome: Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts. *In: Die Onkologie. Teil 2.* Ed. Hiddemann, W., Huber, H., Bartram, C. Springer, Heidelberg. Kap. 67, S. 1630-1651, 2004.

Arnold, R. Antiproliferative treatment of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: effect of combination therapy with octreotide and α -interferon. In M. Mignon, Colombel J.F. (eds): *Recent Advances in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases and Digestive Endocrine Tumors.* Paris: John Libbey 1999; 292-5.

Arnold, R., Frank, M. Control of growth in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Digestion* 1996a; 57:69-71.

Arnold R, Frank M. Gastrointestinal endocrine tumours: medical management. *Bailleres Clin Gastroenterol* 1996b; 10:737-759.

Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeld W et al. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Gut* 1996c; 38: 430-438.

Arnould, S., Guichard, S., Hennebelle, I., Cassar, G., Bugat, R., Canal, P. Contribution of apoptosis in the cytotoxicity of the oxaliplatin-irinotecan combination in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1215-1226.

Bajetta, E., Rimassas, L., Carnaghi, C., Seregni, E., Ferrari, L., Di Bartolomeo, M., Regalia, E., Cassata, A., Procopio, G., Mariani, L. 5-Fluorouracil, Dacarbazine, and Epirubicin in the Treatment of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Cancer* 1998 Jul 15;83(2):372-8.

Bajetta E., Ferrari, L., Procopio G., Catena, L., Ferrario, E., Martinetti, A., Di Bartolomeo, M., Buzzoni, R., Celio, L., Vitali, M., Beretta, E., Seregni, E., Bombardieri, E. Efficacy of a chemotherapy combination for the treatment of metastatic neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 2002; 13:614-21.

Baker S. J., Reddy E. P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17:3261-3270.

Banner D. W., D'Acry A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H. J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993; 73: 431-445.

Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D.A. Freireich, E.J. The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res* 1976; 36:1975-1979.

Bartholomä, P., Erlandsson, N., Kaufmann, K., Rössler, O.G., Baumann, B., Wirth, T., Giehl, K.M., Thiel, G. Neuronal cell death induced by antidepressants: Lack of correlation with Egr-1, NFkB, and extracellular signal-regulated protein kinase activation. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1507-1516.

Baylin, S.B., Herman, J.G. 2000. DNA Hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16:168-174.

Benali, N., Ferjoux, G., Puente, E. et al. Somatostatin receptors. *Digestion* 2000, 62(Suppl 1):27-32.

Bender, C., Pao, M.M., Jones, P.A. Inhibition of DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses the Growth of Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 1998; 58: 95-101

Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukaemia cells. *Leukemia* 1993; 7: 563-8.

Bissonnette, N., Hunting, D.J. P21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 1998; 16:3461-3469.

Blagosklonny, M.V., Schulte, T.W., Nguyen, P., Mimnaugh, E.G., Trepel, J., Neckers, L. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Res* 1995; 55:4623-4626.

Blagosklonny, M.V., Schulte, T.W., Nguyen, P., Trepel, J., Neckers, L.M. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* 1996; 56:1851-4.

Blagosklonny, M.V., Fojo, T. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* 1999; 83:151-156.

Blagosklonny, M.V., Robey, R., Bates, S., Fojo, T. Pretreatment with DNA-damaging agents permits selective killing of checkpoint-deficient cells by microtubule-active drugs. *J Clin Invest* 2000; 105:533-539.

Blattner, C., Sparks, A., Lane, D. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol* 1999;19:3704-3713.

Boise L. H., González-García M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nunez G., Thompson C. B. Bcl-x, a bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptosis. *Cell Death* 1993; 74: 597-608.

Bozko, P., Larsen, A., Raymond, E., Skladanowski, A. Influence of G2 arrest on the cytotoxicity of DNA topoisomerase inhibitors toward human carcinoma cells with different p53 status. *Acta Biochim Pol* 2002; 49:109-119.

Bousquet, C., Puente, E., Buscail, L., et al. Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 2001, 47(Suppl 2):30-39.

Bowman, K.J., White, A., Golding, B.T., Griffin, R.J., Curtin, N.J. Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064. *Br J Cancer* 1998; 78(10):1269-77.

Brachat, A., Pierrat, B., Xynos, A., Brecht, K., Simonen, M., Brünger, A., Heim, J. A microarray-based, integrated approach to identify novel regulators of cancer drug response and apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:8361-8371.

Bras-Goncalves, R.A., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Soulie, P., Dutrillaux, B., Poupon, M.F. Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. *Br J Cancer* 2000; 82:913-923.

Bukowski RM, Tangen C, Lee R, Macdonald JS, Einstein AB Jr, Peterson R, Fleming TR. Phase II trial of chlorozotocin and fluorouracil in islet cell carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992 Dec;10(12):1914-8.

Bunnak, J., Takigami, M., Ito, H., Shinozawa, T. Gamma irradiation effects on cultured cells: investigated by the MTT method. *J Radiat Res (Tokyo)* 1994 Dec; 35(4):205-212.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282:1497-1501.

Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104: 263-269.

Buscail, L., Saint-Laurent, N., Chastre, E., Vaillant, J.C., Gespach, C., Capella, G., Kalthoff, H., Vaysse, N., Susini, C. Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56:1823-1827.

Calender A. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion*. 2000; 62 Suppl 1:3-18. Review.

Capella C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch* 1995; 425: 547.

Carmichael, J., Mitchell, J.B., DeGraff, W.G., Gamson, J., Gazdar, A.F., Johnson, B.E., Glatstein, E., Minna, J.D. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J cancer* 1988 Jun;57(6):540-7.

Chadebech, P., Truchet, I., Bricchese, L., Valette, A. Up-regulation of CDC2 protein during paclitaxel-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2000; 87:779-786.

Chang Y.F., Li LL, Wu CW, Liu TY, Lui WY, P'eng FK, Chi CW. Paclitaxel-induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. *Cancer* 1996; 77: 14-18.

Chao D. T. and Korsmeyer S. J. Bcl-2-Family: Regulators of Cell Death. *Ann Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.

Cheng E., H.-Y., Kirsch D. G., Clem R. J., Ravi R., Kastan M. B., Bedi A., Ueno K., Hardwick J. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997; 278: 1966-1968.

Cheng, S.C., Luo, D., Xie, Y. Taxol induced Bcl-2 protein phosphorylation in human hepatocellular carcinoma QGY-7703 cell line. *Cell Biol Int* 2001; 25:261-265.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512.

Clem R. J., Cheng E., H.-Y., Karp C. L., Kirsch D. G., Ueno K., Takahashi A., Kastan M. B., Griffin D. E., Earnshaw W. C., Veluona M. A., Hardwick J. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *PNAS* 1998; 95: 554-559.

Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16. Review.

Comín-Anduix, B., Agell, N., Bachs, O., Ovádi, J., Cascante, M. A new bis-indole, KARs, induces selective M arrest with specific spindle aberration in neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol* 2001; 60:1235-1242.

Cotran, R.S., Kumer, V., Collins, T. *Pathologic Basis of Disease* 6. Auflage 1999, Kap. 8: Neoplasia. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Capelli, P., Blaveri, E., Baron, A., Terris, B., Jones, M., Tyson, K., Bassi, C., Scarpa, A., Lemoine, N.R. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 2001; 20(50):7437-7446.

Darzynkiewicz, Z. *Methods in analysis of apoptosis and cell necrosis*. Purdue Cytometry CD-ROM series, vol 3 (1997a)

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis an accidental cell death. *Cytometry* 1997b; 27: 1-20.

D'Atri, S., Tentori, L., Lacal, P.M., Graziani, G., Pagani, E., Benincasa, E., Zambruno, G., Bonmassar, E., Jiricny, J. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* 1998; 54:334-341.

Davidson, S., Crowther, P., Radley, J., Woodcock, D. Cytotoxicity of 5-Aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system. *Eur J Cancer* 1992; 28(2-3):362-368.

de Belle, I., Huang, R.-P., Liu, C., Mercola, D., Adamson, E.D. P53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 1999; 18:3633-3642.

Delaney, C.A., Wang, L.Z., Kyle, S., White, A.W., Calvert, H., Curtin, N.J., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Newell, D.R. Potentiation of Temozolomide and Topotecan Growth Inhibition and Cytotoxicity by novel Poly(adenosine Diphosphoribose) Polymerase Inhibitors in a Panel of Human Tumor Cell Lines. *Clin Cancer Res* 2000 Jul; 6(7):2860-7.

DelSal, G., Loda, M., Pagano, M. 1996. Cell cycle and cancer: Critical events at the G1 restriction point. *Crit Rev Oncogenesis* 7: 127-142.

Detjen KM, Welzel M, Farwig K, Brembeck FH, Kaiser A, Riecken EO et al. Molecular mechanism of interferon alfa-mediated growth inhibition in human neuroendocrine tumor cells. *Gastroenterology* 2000; 118(4):735-748.

Di Bartolomeo, M., Bajetta, E., Bochicchio, A.M., Carnaghi, C., Somma, L., Mazzaferro, V., Visini, M., Gebbia, V., Tumolo, S., Ballatore, P. A phase II trial of dacarbazine, fluorouracil and epirubicin in patients with neuroendocrine tumours. A study by the Italian Trials in Medical Oncology (I.T.M.O.) Group. *Ann Oncol* 1995;6(1):77-79.

Di Bartolomeo M, Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Carnaghi C, Somma L et al. Clinical efficacy of octreotide in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. A study by the Italian Trials in Medical Oncology Group. *Cancer* 1996; 77(2):402-408.

Donaldson, K.L., Goolsby, G., Kiener, P.A., Wahl, A.F. Activation of p34cdc2 coincident with Taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* 1994; 5:1041-1050.

Dong, Y.B., Yang, H.L., Elliott, M.J., McMasters, K.M. Adenovirus-mediated E2F-1 Gene Transfer Sensitizes Melanoma Cells to Apoptosis Induced by Topoisomerase II Inhibitors. *Cancer Res* 2002 Mar 15;62:1776-1783.

Donoso RJ, Jordan MA, Farrell KW, Matsumoto B, Wilson L. Kinetic stabilization of the microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry* 1993;32:1285.

Downing, K.H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:89-111.

Dragovich T., Rudin C. M., Thompson C. B. Signal Transduction Pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998; 17: 3207-3213.

Duke RC, Ojcius D. M., and Young J. D. E. Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord, *Spektrum der Wissenschaft* 1997; 2: 26-35.

Eischen, C.M., Kottke, T.J., Martins, L.M., Basi, G.S., Tung, J.S., Earnshaw, W.C., Leibson, P.J., Kaufmann, S.H. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; 90:935-943.

Elliot, M.J., Farmer, M.R., Atienza, C., Stilwell, A., Dong, Y.B., Yang, H.L., Wong, S.L., McMasters, K.M. E2F-1 Gene Therapy Induces Apoptosis and Increases Chemosensitivity in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Tumor Biol* 2002;23:76-86.

Elsässer H. P., Heidtmann H. H., Lehr U., Agricola B., Kern H. F. Structural analysis of a new highly metastatic cell line Patu 8902 from a primary human adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 64: 201-207.

Eriksson B, Skogseid B, Lundqvist G, Wide L, Wilander E, Öberg K. Medical treatment and long-term survival in a prospective study of 84 patients with endocrine pancreatic tumors. *Cancer*. 1990;65(9):1883-90.

Eriksson B, Renstrup J, ImaM H, Öberg K. High-dose treatment with lanreotide of patients with advanced neuroendocrine gastrointestinal tumors: clinical and biological effects. *Ann Oncol* 1997; 8(10):1041-1044.

Eriksson, B., Öberg, K. Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 2:31-38. Review.

Evan GM, Wylie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.

Evers, B.M., Townsend, C.M., Jr, Upp, J.R., Allen, E., Hurlbut, S.C., Kim, S.W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J.C., Thompson, J.C. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth.. *Gastroenterology* 1991 ; 101(2): 303-11.

Faiss S, Rath U, Mansmann U, Caird D, Clemens N, Riecken EO et al. Ultra-high-dose lanreotide treatment in patients with metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Digestion* 1999; 60(5):469-476.

Fallik, D., Sabourin, J.C., Borrini, F., Jacob, S., Boige, V., Praz, F., Ducreux, M. [Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT-11 (irinotecan): implications of the mismatched base repair system]. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24:917-922.

Fan, S., Chang, J.K., Smith, M.L., Duba, D., Fornace A.J. Jr, O'Connor, P.M. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* 1997 May 8;14(18):2127-36.

Fedier, A., Schwarz, V.A., Walt, H., Carpini, R.D., Haller, U., Fink, D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 2001; 93:571-576.

Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7464-9.

Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D., Howell, S.B. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance *Cancer Res* 1996; 56:4881-4886.

Flaherty, D.B., Soria, J.P., Tomasiewicz, H.G., Wood, J.G. Phosphorylation of human Tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3 β and Cdk5 are key participants. *J Neurosci Res* 2000; 62:463-472.

Frank, M., Klose, K.J., Wied, M., Ishaque, N., Schade-Brittinger, C., Arnold, R. Combination therapy with octreotide and alpha-interferon: effect on tumor growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1381-1387.

Friedman, H.S., Averbuch, S. D., and Kurtzberg, J. Nonclassic alkylating agents. In, *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, 2nd ed. (Chabner B.A. and Longo, D. L., eds.) J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1995

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H., Debatin, K.M. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug induced apoptosis in leukaemia cells. *Nat. Med.* 1996, 2: 574-577.

Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8:307-318.

Froelich C.J., Dixit, V.M., Yang, X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today* 1998; 19: 30–36.

Funk, J.O. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 1999; 19:4772-4780.

Furukawa, T., Kubota, T., Suto, A., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Kase, S., Kodaira, S., Ishibiki, K., Kitajima, M. Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay. *J Surg Oncol*. 1991;48(3):188-93.

Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996; 382: 511.

Galmarini, C.M., Falette, N., Tabone, E., Levrat, C., Britten, R., Voorzanger-Rousselot, N., Roesch-Gateau, O., Vanier-Viorner, A., Puisieux, A., Dumontet, C. Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity. *Br J Cancer* 2001; 85(6):902-908.

Ganansia-Leymarie, V., Bischoff, P., Bergerat, J.P., Holl, V. Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003 Jul; 3(4):291-306.

Gansauge, F., Gansauge, S., Link, K.H., Beger, H.G. p53 in relation to therapeutic outcome of locoregional chemotherapy in pancreatic cancer. *Ann NY Acad Sci* 1999;880:281-287.

Geard CR, Jones JM, Schiff PB. Taxol and radiation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*. 1993: 89-94.

Gentile, M., Ahnström, M., Schön, F., Wingren, S. Candidate tumor suppressor genes at 11q23-q24 in breast cancer: evidence of alterations in PIG8, a gene involved in p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20:7753-7760.

Gervais, J.L., Seth, P., Zhang, H. Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273:19207-19212.

Ghoshal K, Jacob ST. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:1569.

Giannakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y.-K., Zhan, Z., Buters, J.T.M., Fojo, T., Poruchynsky, M.S. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant β -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerisation. *J Biol Chem* 1997; 272:17118-17125.

Giannakakou, P., Villalba, L., Li, H., Poruchynsky, M., Fojo, T. Combinations of paclitaxel and vinblastine and their effects on tubulin polymerisation and cellular cytotoxicity: characterization of a synergistic schedule. *Int J Cancer* 1998; 75: 57-63.

Gibson, S., Tu, S., Oyer, R., Anderson, S.M., Johnson, G.L. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999; 274:17612-8.

Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;29:267.

Görtz B, Roth J, Krahenmann A, de Krijger RR, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Speel EJ, Heitz PU, Komminoth P. Mutations and allelic deletions of the MEN1 gene are associated with a subset of sporadic endocrine pancreatic and neuroendocrine tumors and not restricted to foregut neoplasms. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):429-36.

Gore, M., Fryatt, I., Wiltshaw, E., Dawson, T., Robinson, B., Calvert, A. Cisplatin/carboplatin cross resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1989; 60:767-769.

Gorospe M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M.C., Holbrook, N.J. P21 (WAF1/CIP1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 1997; 14:929-935.

Grander, D., Sangfelt, O., Erickson, S. How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *Eur J Haematol* 1997; 59:129-135.

Green, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; 94:695.

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction, and apoptosis. *EMBO J* 1998;17:3878.

Gu, Z., Gilbert, D.J., Valentine, V.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Zambetti, G.P. The p53-inducible gene EI24/PIG8 localizes to human chromosome 11q23 and the proximal region of mouse chromosome 9. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89:230-233.

Gubits, R.M., Geard, C.R., Schiff, P.B. Expression of immediate early genes after treatment of human astrocytoma cells with radiation and taxol. *Int J Radiat Oncol Bioll Phys* 1993 Oct 20; 27(3):637-642.

Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H., Terzis, A.J. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br J Cancer* 2003; 88:463-469.

Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L. E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(APO-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-1366.

Haldar, S., Jena, N., Croce, C.M. Inactivation of Bcl-2 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4507.

Hall, P.A., McKee, P.H., Menage, H.P., Dover, R., Lane, D. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8: 203-207.

Hall, M., G. Peters: Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67.

Hallahan, D.E., Dunphy, E., Virudachalam, S., Sukatme, V.P., Kufe, D.W., Wechselbaum, R.R. c-Jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionising radiation exposure. *J Biol Chem* 1995; 270:30303-30309.

Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S., Nishida, E. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr-1. *Nat Cell Biol* 2001; 3:453-459.

Harrington EA, Fanidi A, Evan GI. Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 120-129. Review.

Hayot, C., Farinelle, S., De Decker, R., Decaestecker, C., Darro, F., Kiss, R., Van Damme, M. In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *Int J Oncol* 2002;21(2):417-25.

Hei, T.K., Hall, E.J. Taxol, radiation, and oncogenic transformation. *Cancer Res* 1993; 53:1368-1372.

Hennes, S., Davey, M.W., Harvie, R.M., Davey, R.A. Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP1, MRP2, and topoisomerase II alpha expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 Nov 1; 54(3):895-902.

Herr, I., Debatin, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001;98(9):2603-14. Review.

Hirose, Y., Berger, M.S., Pieper, R.O. Abrogation of the Chk-1-mediated G2 checkpoint pathway potentiates temozolomid-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2001; 61:5843-5849.

Hiyama, H., Iavarone, A., LaBaer, J., Reeves, S.A. Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering cell cycle progression. *Oncogene* 1997; 14:2533-2542.

Hiyama, H., Iavarone, A., Reeves, S.A. Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F. *Oncogene* 1998; 16:1513-1523.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49.

Honma, N., Hosono, Y., Kishimoto, T., Hisanaga, S. Phosphorylation of retinoblastoma protein at apoptotic cell death in rat neuroblastoma B50 cells. *Neurosci Lett* 1997; 235:45-48.

Hsiang, Y., Liu, L. Identification of DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 1988; 48:1722-1726.

Hsieh, J.-K., Yap, D., O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., Lu, X. Novel function of the cyclin a binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA-damage. *Mol Cell Biol* 2002 Jan 22(1):78-93.

Hu Y., Benedict M. A., Wu D., Inohara N., Nunez G. Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4386-4391.

Huang, D.C., Cory, S., Strasser, A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 1997; 14: 405–414.

Huang, R.-P., Fan, Y., deBelle, I., Ni, Z., Matheny, W., Adamson, E.D. Egr-1 inhibits apoptosis during UV-response: Correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation. *Cell Death Differ* 1998; 5:96-106.

Huang, T.S., Shu, C.H., Yang, W.K., Whang-Peng, J. Activation of CDC25 phosphatase and CDC2 kinase involved in GL331-induced apoptosis. *Cancer Res* 1997; 57:2974-2978.

Hueber AO, Zornig M, Lyon D, et al. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 1997; 278: 1305-1309.

Hughes, M.J., Kerr, D.J., Cassidy, J., Soukop, M., McGregor, K., Blackburn, N., et al. A pilot study of combination therapy with interferon-alpha-2a and 5-fluorouracil in metastatic carcinoid and malignant endocrine pancreatic tumours. *Ann Oncol* 1996; 7(2):208-210.

Huisman, C., Ferreira, C.G., Bröker, L.E., Rodriguez, J.A., Smit, E.F., Postmus, P.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Clin Cancer Res* 2002; 8:596-606.

Huschtscha, L.I., Reddel, R.R. P16INK4a and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis (Lond.)* 1999; 20:921-926.

Ibrado, A.M., Kim, C.N., Bhalla, K. Temporal relationship of CDK1 activation and mitotic arrest to cytosolic accumulation of cytochrome C and caspase-3 activity during Taxol-induced apoptosis of human AML HL-60 cells. *Leukemia* 1998; 12:1930-1936.

Imam, H., Eriksson, B., Lukinius, A., Janson, E.T., Lindgren, P.G., Wilander, E. et al. Induction of apoptosis in neuroendocrine tumors of the digestive system during treatment with somatostatin analogs. *Acta Oncol* 1997; 36(6):607-614.

Inoue, S., Salah-Eldin, A.E., Omoteyama, K. Apoptosis and anticancer drug resistance. *Hum Cell* 2001; 14(3):211-221.

Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):205-19. Review.

Ishizuka, J., Beauchamp, R.D., Evers, B.M., Townsend, C.M. Jr, Thompson, J.C. Unexpected growth-stimulatory effect of somatostatin analogue on cultured human pancreatic carcinoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jun 15; 185(2):577-81.

Ivanchuk, S.M., Rutka, J.T. The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery*. 2004 Mar;54(3):692-9; discussion 699-700. Review.

Jabbar, S.A.B., Twentyman, P.R., Watson J.V. The MTT assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. *Br. J. Cancer* 1989; 60:523-528.

Jacob, S., Aguado, M., Fallik, D., Praz, F. The role of the DNA Mismatch Repair System in the Cytotoxicity of the Topoisomerase Inhibitors Camptothecin and Etoposide to Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res* 2001; 61:6555-6562.

Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273:9357-9360.

Jansen, W.J., Zwart, B., Hulscher, S.T., Giaccone, G., Pinedo, H.M., Boven, E. CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *Int J Cancer* 1997 Jan 27;70(3):335-40.

Jeffrey, I.W., Bushell, M., Tilleray, V.J., Morley, S., Clemens, M.J. Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor α family and DNA-damaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 2002; 62:2272-2280.

Johnson, D.G., Walker, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:295-312.

Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, P.J., Bliss, T.V.P., Garel, S., Charney, P., Bozon, B., Laroche, S., Davis, S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 2001; 4:289-296.

Jones, P.A., Taylor, S.M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980 May;20(1):85-93.

Jones, P.A., Laird, P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 1999; 21,163-167 Review.

Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by the vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991;51:2212.

Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 1992;102:401.

Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 9552-6.

Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., Wilson, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996; 56:816-825.

Kaelin, W.G. Recent insights into the functions of the retinoblastoma susceptibility gene product. *Cancer Invest* 15; 1997: 243-254.

Kaku, M., Nishiyama, T., Yagawa, K., Abe, M. Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gann* Oct 1980; 71(5): 596-601.

Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270:16483-16486.

Karpf, A.R., Moore, B.C., Ririe, T.O., Jones, D.A. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol* 2001, 59(4):751-757.

Kartalou, M., Essigmann, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478:23-43.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R. Participation of the p53 protein in the cellular response to DNA damage: *Cancer Research* 1991; 51: 6304-6311.

Kastan, M.B., Stephen X. Skapek. *Molecular Biology of Cancer: The Cell Cycle. In: Principles and Practice of Oncology, 6th Ed. 2001, Kap. 6. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*

Kaufmann, K., Bach, K., Thiel, G. Extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol Chem* 2001; 382:1077-1081.

Kaufmann, K., Thiel, G. Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem* 2002; 85:381-391.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H., and Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-57.

Khachigian, L.M., Lindner, V., Williams, A.J., Collins, T. Egr-1-induced endothelial gene expression: A common theme in vascular injury. *Science* 1996; 271:1427-1431.

Kim, R., Tanabe, K., Inoue, H., Toge, T. Mechanism(s) of antitumor action in protracted infusion of low dose 5-fluorouracil and cisplatin in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2002a Mar;20(3):549-55.

Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H., Toge, T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002b; 50:343-352.

King, K.L., Cidlowski, J. A. Cell Cycle Regulation and Apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 601-617

Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Noda, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 1997 Jun 15; 11(12):1535-1547.

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.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132–1136.

Kornmann, M., Danenberg, K.D., Arber, N., Beger, H.G., Danenberg, P.V., Korc, Murray. Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. *Cancer Res* 1999;59(14):3505-11.

Kottke, T.J., Blajeski, A.L., Meng, X.W., Svingen, P.A., Ruchaud, S., Mesner, P.W., Boerner, S.A., Samejima, K., Henriquez, N.V., Chilcote, T.J., Lord, J., Salmon, M., Earnshaw, W.C., Kaufmann, S.H. Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277:804-815.

Krammer P. H. Apoptose. Deutsches Ärzteblatt 2000; 97, Heft 25: Seite B-1481-B-1488.

Kraus, A.C., Ferber, I., Bachmann, S.O., Specht, H., Wimmel, A., Gross, M.W., Schlegel, J., Suske, G., Schuermann, M. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002 Dec 12;21(57):8683-95).

Krishan A. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by PI-staining. *J. cell biol.* 1975; 66: 188-193.

Krishan, A., Frei, E., III. Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphocytes. *Cancer Res* 1976; 36:143-150.

Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S et al. Identification of somatostatin receptor subtypes and an implication for the efficacy of somatostatin analogue SMS 201-995 in treatment of human endocrine tumors. *J Clin Invest* 1994; 93:1321-1325.

LaBaer, J., Garrett, M.D., Stvenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11: 847-862.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680-5.

Lage, H., Christman, M., Kern, M.A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B., Schadendorf, D. Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int J Cancer* 1999; 80: 744-750.

Lamberts, S.W.J., Krenning, E.P., Reubi, J.C. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocrinol Rev* 1991; 12:450-82.

Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.

Lansiaux, A., Bras-Goncalves, R.A., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Poupon, M.F., Bailly, C. Topoisomerase I-DNA covalent complexes in human colorectal cancer xenografts with different p53 status and microsatellite instability status: relation with their sensitivity to CPT-11. *Anticancer Res* 2001; 21:471-476.

Launchbury AP, Habboubi N. Epirubicin and doxorubicin: a comparison of their characteristics, therapeutic activity and toxicity. *Cancer Treat Rev* 1993;19:197.

Lazebnik Y. A., Kaufmann S. H., Desnoyers S., Polrler G. G., Earnshaw W. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; 371: 346-347.

Lazebnik Y. A., Takahashi A., Moir R. D., Goldman R. D., Poirier G. G., Kaufmann S. H., Earnshaw W. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9042-9046.

Lee, Y., Shacter, E. Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood*. 1997; 89:4480-92.

Lehar, S.M., Nacht, M., Jacks, T., Vater, C.A., Chittenden, T., Guild, B.C. Identification and cloning of EI24, a gene induced by p53 in etoposide treated cells. *Oncogene* 1996; 12:1181-1187.

Levine, A.J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.

Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74:49-139.

Li, G., Faibushevich, A., Turunen, B.J., Yoon, S.O., Georg, G., Michaelis, M.L., Dobrowsky, R.T. Stabilization of the cyclin-dependent kinase 5 activator, p35, by paclitaxel decreases beta amyloid toxicity in cortical neurons. *J Neurochem* 2003 Jan; 84(2):347-362.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemeri, E.S., Wang, X. Cytochrom c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479.

Liebmann, J., Cook, J.A., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., Mitchell, J.B. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 1993; 68:1104-1109.

Liebmann, J., Cook, J.A., Fisher, J., Teague, D., Mitchell, J.B. *In vitro* studies of taxol as a radiosensitizer in human tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1994a; 86:441-446.

Liebmann, J., Cook, J.A., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., Mitchell, J.B. The influence of cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol®) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994b; 33:331-339.

Liebmann, J., Cook, J.A., Fisher, J., Teague, D., Mitchell, J.B. Changes in radiation survival curve parameters in human tumor and rodent cells exposed to paclitaxel (taxol). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994c; 29:559-564.

Liebow, C., Reilly, C., Serrano, M., Schally, A.V. Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2001-2007.

Lieu CH, Chang YN, Lai YK. Dual cytotoxic mechanisms of submicromolar taxol on human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol.* 1997;53(11):1587-96.

Lin, X., Ramamurthi, K., Mishima, M., Kondo, A., Christen, R.D., Howell, S.B. P53 modulates the effect of loss of DNA Mismatch Repair on the sensitivity of human colon cancer cells to the cytotoxic and mutagenic effect of cisplatin. *Cancer Res* 2001; 61:1508-1516.

Ling, Y.-H., Consoli, U., Tornos, C., Andreeff, M., Perez-Soler, R. Accumulation of cyclin B1, activation of cyclin B1-dependent kinase and induction of programmed cell

death in human epidermoid carcinoma KB cells treated with Taxol. *Int J Cancer* 1998*a*; 75:925-932.

Ling, Y.-H., Tornos, C., Perez-Soler, R. Phosphorylation of bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. *J Biol Chem* 1998*b*; 273:18984-18991.

Liu, C., Rangnekar, V.M., Adamson, E., Mercola, D. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by Egr-1. *Cancer Gene Ther* 1998; 5:3-28.

Liu, L.H., Xiao, W.H., Liu, W.W. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001 Feb; 7(1):131-135.

Liu, L, Taverna, P., Whitacre, C.M., Chatterjee, S., Gerson, S.L. Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2908-2917.

Liu, Q.Y., Stein, C.A. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clin Cancer Res* 1997;3:2039-2046.

Loprevite, M., Favoni, R.E., de Cupis, A., Pirani, P., Merlo, F., Grossi, F., Ardizzoni, A. Pre-clinical evaluation of new antineoplastic agents in NSCLC cell-lines: evidence of histological subtype-dependent cytotoxicity. *Int J Oncol* 1999 Oct; 15(4):787-92.

Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-967.

Lowe, S.W. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266:807-810.

Lubomierski, N., Kersting, M., Bert, T., Muench, K., Wulbrand, U., Schuermann, M., Bartsch, D., Simon, B. Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective

targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Cancer Res* 2001 Jul 1;61(15):5905-10.

Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T. P53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995; 9:935-944.

Magrini, R., Bhonde, M.R., Hanski, M.L., Notter, M., Scherübl, H., Boland, C.R., Zeitz, M. Hanski, C. Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status. *Int J Cancer* 2002; 101:23-31.

Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1982). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J. p57^{**}(KIP2), a structurally distinct member of the p21^{**}(CIP1) CDK inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995;9:650-662.

McGregor, F., Muntoni, A., Fleming, J., Brown, J., Felix, D.H., MacDonald, D.G., Parkinson, E.K., Harrison, P.R. Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality: potential for its reversal by 5-azacytidine. *Cancer Res* 2002; 62:4757-4766.

Mello, J.A., Lippard, S.J., Essigmann, J.M. DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and its *trans* isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* 1995; 34:14783-14791.

Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., Tsai, L.H. A family of human cdc-2 related protein kinases. *EMBO J* 1992; 11:2909-2917.

Michalides, R., Tiemessen, M., Verschoor, T., Balkenende, A., Coco-Martin, J. Overexpression of cyclin-D1 enhances taxol induced mitotic death in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74:55-63.

Milas, L., Hunter, N.R., Mason, K.A., Kurdoglu, B., Peters, L.J. Enhancement of tumor radioresponse of a murine mammary carcinoma by paclitaxel. *Cancer Res* 1994; 54:3506-3510.

Milas, L., Hunter, N.R., Mason, K.A., Milross, C.G., Saito, Y., Peters, L.J. Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel. *Cancer Res* 1995; 55:3564-3568.

Milczarek, G.J., Martinez, J., Bowden, G.T. p53 Phosphorylation: biochemical and functional consequences. *Life Sci* 1997; 60:1-11.

Minn A. J., Vélez P., Schendel S.L., Liang H., Munchmore S. W., Fesik S. W., Fill M., Thompson C. B. Bcl-XL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385: 353-357.

Mirjoleit, J.F., Barberi-Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J.P., Abecassis, J., Millon, R., Merlin, J.-L. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer* 2000; 83(10):1380-1386.

Mirjoleit, J.F., Didelot, C., Barberi-Heyob, M., Merlin, J.-L. G1/S but not G0/G1 cell fraction is related to 5-fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry* 2002; 48:6-13.

Moberg, K., Starz, M.A., Less, J.A. E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 1996; 16:1436-1449.

Moertel, C. G., Hanley, J. A., Johnson, L. A. Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1980 Nov 20;303(21):1189-94.

Moertel, C.G., Kvols, L.K., O'Connell, M.J., Rubin, J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. *Cancer* 1991;68:227-232.

Moertel, C.G., Lefkopoulos, M., Lipsitz, M. Streptozotocin-doxorubicin, streptozotocin-fluorouracil or cholorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1992;326:519-523.

Moertel CG (1993) Gastrointestinal carcinoid tumors and the malignant carcinoid syndrom. In Sleisenger MH & Fordtran JS (eds) *Gastrointestinal Disease*, 5 th edn, pp 1363-1378. Philadelphia, PA: Saunders.

Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13:261.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation an cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 65: 55-63.

Muggia, F. M. Overview of carboplatin: replacing, complementing, an extending the therapeutic horizons of cisplatin. *Semin Oncol* 1989; 16 Suppl 5: 7-13.

Muzio, M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817–827.

Myc, A, Traganos F, Lara J, Melamed MR, Darzynkiewicz. DNA Stainability in aneuploid breast tumors: Comparison of four DNA fluorochromes differeing in binding properties. *Cytometry* 1992, 13:389-394.

Nakata, B., Chung, Y.S., Yokomatsu, H., Sawada, T., Kubo, T., Kondo, Y., Satake, K., Sowa, M. Flow cytometric bromodeoxyuridine/DNA analysis of hyperthermia and/or adriamycin for human pancreatic adenocarcinoma cell line Capan-2. *Jpn J Cancer Res.* 1992;83(5):477-82.

Nan, X., Cross, S., Bird, A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp* 1998; 214: 6-16.

Nelson, W.G., Kastan, M.B. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1815-1823.

Niedner, H., Christen, R., Lin, X., Kondo, A., Howell, S.B. Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol* 2001; 60:1153-1160.

Niero A, Emiliani E, Monti G, Pironi, F., Turci, L., Valenti, A.M., Marangolo, M. Paclitaxel and radiotherapy: sequence-dependent efficacy--a preclinical model. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2213-2222.

Niethammer, M., Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, Morabito M, Tsai LH. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmatic dynein. *Neuron* 2000; 28:697-711.

Nigg, E.A., Krek, W., Peter, M. Vertebrate Cdc2 kinase: its regulation by phosphorylation and its mitotic targets. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1991; 56:539-547.

Nita, M.E., Nagawa, H. Tominaga, O., Tsuno, N., Fujii, S., Sasaki, S., Fu C.G., Takenoue, T., Tsuruo, T., Muto, T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998; 78:986-992.

Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 1994;79:547.

O'Connor, D., Lu, X. Stress signals induce transcriptionally inactive E2F1. *Oncogene* 2000; 19:2369-2376.

O'Dwyer P, Stevenson J, Johnson S. Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum-based antitumor drugs. In: Lippert B, ed. *Cisplatin: chemistry and*

biochemistry of a leading anticancer drug. Zurich, Switzerland: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999:31.

Öberg K. Interferon in the management of neuroendocrine GEP-tumors. *Digestion* 2000; 62 (Suppl 1):92-97.

Öberg, K. Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 2:51-61.

Ofir, R., Seidmann, R., Rabinski, T., Krup, M., Yavelsky, V., Weinstein, Y., Wolfson, M. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ* 2002; 9(6):636-642.

Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:267.

Okano, J., Rustgi, A.K. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* 2001; 276(22):19555-19564.

Ollivier, S., Fonck, M., Becouarn, Y., Brunet, R. Dacarbazine, fluorouracil, and leukovorin in patients with advanced neuroendocrine tumors: a phase II trial. *Am J Clin Oncol* 1998 Jun;21(3):237-40.

Ormerod, M. G., Tribukait, B, Giarretti, W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Anal Cell Pathol* 1998; 17:103-110.

Park, J.A., Kim, K.W., Kim, S.I., Lee, S.K. Caspase-3 specifically cleaves p21WAF1/CIP1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells. *Eur J Biochem* 1998; 257:242-248.

Park, J.G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmichael, J., Collins, J.M., Minna, J.D., Gazdar, A.F. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 1987;47(22):5875-9.

Pavillard, V., Agostoni, C., Richard, S., Charasson, V., Montaudon, D., Robert, J. Determinants of the cytotoxicity of irinotecan in two human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002 Apr;49(4):329-35.

Pearse, A.G. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969 May;17(5):303-13.

Perdew, G.H., Wiegand, H., Vanden Heuvel, J.P., Mitchell, C., Singh, S.S. A 50-kilodalton protein associated with Raf and pp60v-src protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* 1997; 36:3600-3607.

Perren, A., Komminoth, P., Heitz, P.U. Molecular genetics of gastroenteropancreatic endocrine tumors. *Ann. N.Y Acad. Sci.* 2004, 104, 199-208.

Pestell, K.E., Hobbs, S.M., Titley, J.C., Kelland, L.R., Walton, M.I. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol* 2000; 57:503-511.

Petak, I., Tillman, D.M., Harwood, F.G., Mihalik, R., Houghton, J.A. Fas-dependent and independent Mechanisms of Cell Death following DNA-Damage in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 2000, 60, 2643-2650.

Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., Johnston, P.G., van Groeningen, C.J., Pinedo, H.M. Thymidilate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995, 31A:1299-1305.

Pietenpol, J.A., Stewart, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:475-81. Review.

Pigino, G., Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A. Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* 1997; 110:257-270.

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., Ginsberg, D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 2002; 21:437-446.

Pollak, M. N., Schally, A. V. Mechanisms of Antineoplastic Action of Somatostatin Analogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217:143-152.

Polyak, K., J. Y. Kato, M.J. Soomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts, A. Koff: p27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor beta and contact inhibition to cell-cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.A. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305.

Pommier, Y., Fesen, M. R., and Goldwasser, F. Topoisomerase inhibitors: the epipodophyllotoxins, m-AMSA, and the ellipticine derivatives. In, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, ed. (Chabner B.A. and Longo, D. L., eds.), pp.435 –461. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996

Pommier Y. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors. *Biochimie* 1998;80:255-270 Review.

Poruchynsky, M.S., Wang, E.E., Rudin, C.M., Blagosklonny, M.V., Fojo, T. Bcl-XL is phosphorylated in malignant cell following microtubule disruption. *Cancer Res* 1998; 58:3331-8.

Prasad, K.V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M.X., Rizk, M., Jacquot, S., Schlossman, S.F. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6346-6351.

Pratt, W.B. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217(4):420-434.

Pratt, W.B., Silverstein, A.M., Galigniana, M.D. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* 1999 Dec; 11(12):839-851.

Prigano, F., Coronello, M., Pimpinelli, N., Cappugi, P., Mini, E., Giannotti, B. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells. *Cancer Lett* 2002;186(2):183-92.

Pucci, B., Bellincampi, L., Tafani, M., Masciullo, V., Melino, G., Giordano, A. Paclitaxel induces apoptosis in Saos-2 cells with CD95L upregulation and Bcl-2 phosphorylation. *Exp Cell Res* 1999; 252:134-143.

Qin, L.F., Lee, T.K., Ng, I.O. Gene expression profiling by cDNA array in human hepatoma cell line in response to cisplatin treatment. *Life Sci* 2002; 70: 1677-1690.

Raffo, A.J., Kim, A.L., Fine, R.L. Formation of nuclear Bax/p53 complexes is associated with chemotherapy induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19:6216-6228.

Ratner, N., Bloom, G.S., Brady, S.T. A role for cyclin-dependent kinase(s) in the modulation of fast anterograde axonal transport: effects defined by olomoucine and the APC tumor suppressor protein. *J Neurosci* 1998; 18:7717-7726.

Reed J. C., Jurgensmeier J. M., Matsuyama S. Bcl 2 family proteins and mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1366: 127-137.

Rommelink, M., Salmon, I., Delville, J.P., Goldschmidt, D., Capel, P., Gebhart, M., Pasteels, J.L., Kiss, R., Darro, F. In vitro characterisation of soft tissue chemosensitivity. *Anticancer Res* 1997; 17(3C): 2009-17.

Ritzel, U., Leonhard, U., Stöckmann, F., Ramadori, G. Treatment of Metastasized Midgut Carcinoids with Dacarbazine. *Am J Gastroenterol* 1995; 90(4):627-31.

Rivera E, Ajani JA. Doxorubicin, streptozocin, and 5-fluorouracil chemotherapy for patients with metastatic islet-cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1998;21(1):36-8.

Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv* 1993;17:219.

Rogers, J.M., Francis, B.M., Sulik, K.K., Alles, A.J., Massaro, E.J., Zucker, R.M., Elstein, K.H., Rosen, M.B., Chernoff, N. Cell death and cell cycle perturbation in the developmental toxicity of the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine. *Teratology* 1994; 50(5):332-339.

Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on. *In: Lippert B, ed. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zurich, Switzerland: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999:3.*

Rougier, P., Oliveira, J., Ducreux, M., Theodore, C., Kac, J., Droz, J.P. Metastatic carcinoid and islet cell tumours of the pancreas: a phase II trial of the efficacy of combination chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cisplatin. *Eur J Cancer* 1991;27(11):1380-1382.

Rouvier E., Luciani M. F., Golstein P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antineoplastic agent. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1247.

Rowinsky EK, Donehower RC. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacol Ther* 1992;52:35.

Rowinsky EK, Donehower RC. Drug therapy: paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med* 1996;332:1004.

Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L., Evans, A., Johnson, R.T. Different fates of camptothecin-induced replication fork-associated double strand DNA breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1994; 15:823-828.

Safran, H., King, T., Choy, H., Gollerkeri, A., Kwakwa, H., Lopez, F., et al. P53 mutations do not predict response to paclitaxel/radiation for nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1996; 78:1203-10.

Saikawa, Y., Kubota, T., Furukawa, T., Suto, A., Watanabe, M., Kumai, K., Ishibiki, K., Kitajima, M. Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1994 Jul;85(7):762-5.

Sakai, K., Kurimoto, M., Tsugu, A., Hubbard, S.L., Trimble, W.S., Rutka, J.T. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *J Neurooncol* 2002; 57:169-177.

Saltz L, Trochanowski B, Buckley M, Heffernan B, Niedzwiecki D, Tao Y et al. Octreotide as an antineoplastic agent in the treatment of functional and non-functional neuroendocrine tumors. *Cancer* 1993*a*; 72(1):244-248.

Saltz, L., Lauwers, G., Wiseberg, J. Kelsen, D. A Phase II Trial of Carboplatin in Patients with Advanced APUD Tumors. *Cancer* 1993*b*; 72:619-22.

Saltz, L., Kemeny, N., Schwartz, G., Kelsen, D. A phase II trial of alpha-interferon and 5-fluorouracil in patients with advanced carcinoid and islet cell tumors. *Cancer* 1994; 74(3):958-961.

Sark, M.W., Timmer-Bosscha, H., Meijer, C., Uges, D.R., Sluiter, W.J., Peters, W.H., Mulder, N.H., de Vries, E.G. Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1995 Apr;71(4):684-90.

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.

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential Modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 1999; 274(32):22532-8.

Scott H. Kaufmann. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1400: 195-211. Review.

Shapiro, H.M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry* 1981; 2, 143-150.

Sharma, P., Veeranna, Sharma, M., Amin, N.D., Sihag, R.K., Grant, P., Ahn, N., Kulkarni, A.B., Pant, H.C. Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:528-534.

Shen, S.C., Huang, T.S., Jee, S.H., Kuo, M.L. Taxol-induced p34CDC2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9:23-29.

Sherr, C.J. *Cancer Cell Cycles*. *Science* 1996; 274: 1672-1677.

Sidle, A., Palaty, C., Dirks, P., Wiggan, O., Kiess, M., Gill, R.M., Wong, A.K., Hamel, P.A. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130 during cellular proliferation and differentiation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31: 237-271.

Simon, B., Bartsch, D., Rieder, H., Joseph, K., Rothmund, M., Arnold, R. Multiple endokrine Neoplasie Typ 1. Stand der Diagnostik und Tumorprävention. Deutsches Ärzteblatt, 2000, 11, 698-704.

Simon, B., Lubomierski, N. Implication of the *INK4A/ARF* locus in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumorigenesis. Ann. N.Y. Acad Sci. 2004, 104, 284-299.

Simon, B. Therapie neuroendokriner gastroenteropankreatischer (GEP) Tumoren. In: Therapie gastroenterologischer Krankheiten. Ed. Caspary, W., Mössner, J., Stein, J. Kap. 12, 103-110. Springer, Heidelberg 2004

Skipper HE, Schabel FM, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anti-cancer agents: XII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. Cancer Chemother Rep 1964; 35:1.

Slater TF., Sawyer B., Sträuli UD. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochem Biophys Acta 1963; 77: 383.

Slichenmyer, W.J., Nelson, W.G., Slembos, R.J., Kastan, M.B. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. Cancer Res 1993; 53: 4164-4168.

Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 1994; 76:959-962.

Smith, D.S., Tsai, L.-H. Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? Trends Cell Biol 2002; 12(1):28-36.

Smits, V.A., Medema, R.H. Checking out the G2/M-transition. Biochem Biophys Acta 2001; 1519:1-12.

Solit, D.B., Basso, A.D., Olshen, A.B., Scher, H.I., Rosen, N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates akt kinase and sensitises tumors to taxol. *Cancer Res* 2003; 63:2139-2144.

Sorenson, C.M., Eastman, A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1988a; 48:6703-6707.

Sorenson, C.M., Eastman, A. Mechanism of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 1988b; 48:4484-4488.

Sorenson, C.M., Barry, M.A., Eastman, A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:749-755.

Sotos GA, Grogan L, Allegra CJ. Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev* 1994; 20:11.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1 Mediated Oligomerization. *Mol Cell* 1998; 1: 949-957.

Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Korsmeyer, S.J., Nesterova, M., Cho-Chung, Y.S., Longo, D.L. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3509-3517.

Steegenga, W.T., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. How phosphorylation regulates the activity of p53. *J Mol Biol* 1996; 263:103-113. Review

Stepanova, L., Leng, X., Parker, S.B., Harper, J.W. Mammalian p50cdc37 is a protein kinase targeting subunit of hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 1996; 10:1491-1502.

Steren A., Sevin, B., Perras, J., Angioli, R., Nguyen, H., Guerra, L., et al. Taxol sensitizes human ovarian cells to radiation. *Gynecol Oncol* 1993; 48:252-258.

Steward, Z.A., Mays, D., Pietenpol, J.A. Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitises cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59:3831-3837.

Stone, A.A., Chambers, T.C. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signalling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2000; 254:110-119.

Strand S., Hofmann W. J., Hug H., Muller M., Otto G., Strand D., Mariani S. M., Stremmel W., Krammer P. H., Galle P. R. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells- a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2: 1361-1366.

Stromberg, J., Lee, Y.J., Armour, E.P., Martinez, A.A., Corry, P.M. Lack of radiosensitization after paclitaxel treatment of three human carcinoma cell lines. *Cancer* 1995; May 1; 75(9)::2262-2268.

Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.

Suh, S.I., Pyun, H.Y., Cho, J.W., Baek, W.K., Park, J.B., Kwon, T., Park, J.W., Suh, M.H., Carson, D.A. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2000 Nov 10; 160(1):81-88.

Sun, D., Urrabaz, R., Buzello, C., Nguyen, M. Effects of cisplatin on expression of DNA ligases in MiaPaCa human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Nov 8; 298(4):537-44.

Supino, R., Mariani, M., Colombo, A., Prosperi, E., Croce, A.C., Bottroli, G. Comparative studies on the effects of doxorubicin and differentiation inducing agents on B16 melanoma cells. *Eur J Cancer* 1992; 28A, 4/5:778-783.

Tashiro, E., Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., Imoto, M. Caspase-3 activation is not responsible for vinblastine-induced Bcl-2 phosphorylation and G2/M-arrest in human small cell lung carcinoma Ms-1 cells. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89(9):940-946.

Tate, P.H., Bird, A.P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 Apr;3(2):226-31. Review.

Taylor, J.E., Bogden, A.E., Moreau, J.P., Coy, D.H. In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somatostatin analogue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153(1):81-6.

Taylor, W.R., Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20:1803-1815.

Tentori, L., Lacal, P.M., Benincasa, E., Franco, D., Faraoni, I., Bonmassar, E., Graziani, G. Role of wild-type p53 on the antineoplastic activity of temozolomide alone or combined with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285:884-893.

Tewey, K.M., Chen, G.L., Nelson, E.M., Liu, L.F. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1984; 259:9182-7.

Thiel, G., Cibelli, G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002; 193:287-292.

Thomas, A., Rouby, S.E., Reed, J.C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M., Newcomb, E.W. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996; 12:1055-1062.

Tiensuu, J.E., Ahlström, H., Andersson, T., Öberg, K.E. Octreotide and interferon alpha: A new combination for the treatment of malignant carcinoid tumors. *Eur J Cancer* 1992; 28:1647a-50a.

Tishler, R.B., Geard, C.R., Hall, E.J., Schiff, P.B. Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res.* 1992; 52: 3495-7.

Tishler, R.B., Calderwood, S.K., Coleman, C.N., Price, B.D. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res* 1993; 53:2212-2216.

Toliat MR, Berger W, Ropers HH, Neuhaus P, Wiedenmann B.

Mutations in the MEN I gene in sporadic neuroendocrine tumours of gastroenteropancreatic system. *Lancet.* 1997 Oct 25;350(9086):1223.

Torres, K., Horwitz, S.B. Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 1998; 58:3620-3626.

Trielli, M.O., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Margolis, R.L. Differential Taxol-dependent arrest of transformed and nontransformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific related mortality of transformed cells. *J Cell Biol* 1996; 135:689-700.

Tsai, C.M., Ihde, D.C., Kadoyama, C., Venzon, D., Gazdar, A.F. Correlation of *in vitro* drug sensitivity testing of long-term small cell lung cancer cell lines with response and survival. *Eur J Cancer* 1990;26(11-12):1148-52.

Tsang, L. L. H., Quarterman, C. P., Gescher, A., and Slack, J. A Comparison of the cytotoxicity *in vitro* of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 27: 342-346.

Twentyman, P.R., Wright, K.A., Mistry, P., Kelland, L.R., Murrer, B.A. Sensitivity to novel platinum compounds of panels of human lung cancer cell lines with acquired and inherent resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1992 Oct 15;52(20):5674-80.

Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C., Chaney, S.G. The role of hMLH1, hMSH3, hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 1998; 58:3579-3585.

Van Ark-Otte, J., Kedde, M.A., van der Vijgh, W.J., Dingemans, A.M., Jansen, W.J., Pinedo, H.M., Boven, E., Giaccone, G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 1998 Jun;77(12):2174-6.

Vanhoefer, U., Harstrick, A., Wilke, H., Schleucher, N., Walles, H., Schröder, J., Seeber, S. Schedule-dependent antagonism of paclitaxel and cisplatin in human gastric and ovarian carcinoma cell lines *in vitro*. *Eur J Cancer* 1995; 31A:92-97.

Van Triest, B., Pinedo, H.M., van Hensbergen, Y., Smid, K., Telleman, F., Schoenmakers, P.S., van der Wilt, C.L., van Laar, J.A., Noordhuis, P., Jansen, G., Peters, G.J. Thymidilate Synthase Level as the Main Predictive Parameter for Sensitivity to 5-Fluorouracil, but not for Folate-based Thymidilate Synthase Inhibitors, in 13 Nonselected Colon Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* 1999;5(3):643-54.

Vega, I.E., Hsu, S.C. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 2003 Jan 20; 14(1):31-37.

Vikhanskaya, F., Vignati, S., Beccaglia, P., Ottoboni, C., Russo, P., D'Incalci, M., et al. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M-arrest and apoptosis. *Exp Cell Res* 1998; 241:96-101.

Vikhanskaya, F., Colella, G., Valenti, M., Parodi, S., D'Incalci, M., Broggin, M. Cooperation between p53 and hMLH1 in a human colocal carcinoma cell line in response to DNA damage. *Clin Cancer Res* 1999; 5:937-941.

Wahl, A.F., Donaldson, K.L., Fairchild, C., Lee, F.Y., Foster, S.A., Demers, G.W. et al. Loss of normal p53 function confers sensitisation to Taxol by increasing G2/M-arrest and apoptosis. *Nat Med* 1996; 2:72-9.

Wahl, A.F., Donaldson, K.L., Mixan, B.J., Trail, P.A., Siegall, C.B. Selective tumor sensitisation to taxanes with the mab-drug conjugate cBR96-Doxorubicin. *Int J Cancer* 2001; 93:590-600.

Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Uncoupling of S-Phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996; 381:713-716.

Wang L.G., Liu X.M., Kreis W., Budman D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:355-361.

Wang, T.H., Wang, H.S., Soong, Y.K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000;88(11):2619-28.

Weckbecker, G., Liu, R., Tolcsvai, L., Bruns, C. Antiproliferative effects of the somatostatin analogue octreotide (SMS 201995) on ZR-75-1 human breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 1992; 52:4973-8.

Weigel, T.L., Lotze, M.T., Kim, P.K., Amoscato, A.A., Luketich, J.D., Odoux, C. Paclitaxel-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines is associated with increased caspase-3 activity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:795-803.

Weinberg, R.A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* 1995; 81: 323-330.

Weishaupt, J.H., Neusch, C., Bähr, M. Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res* 2003; 312:1-8.

Whitacre, C.M., Zborowska, E., Willson, J.K., Berger, N.A. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in response to treatment with topoisomerase I inhibitors: a potential surrogate end point to assess treatment effectiveness. *Clin Cancer Res* 1999; 5:665-672.

Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D., Davis, R.J. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 1995; 269:403-407.

Widmann C., Gibson S., Johnson G. L. Caspase-dependent cleavage of signalling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998; 273: 7141-7147.

Woods, C.M., Zhu, J., McQueney, P.A., Bollag, D., Lazarides, E., Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1995; 1:506-526.

Xu, Z.W., Friess, H., Büchler, M.W., Solioz, M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49:504-510.

Xue, L., Chu, F., Cheng, Y., Sun, X., Borthakur, A., Ramarao, M., Pandey, P., Wu, M., Schlossman, S.F., Prasad, K.V. Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6925-6930.

Yamamoto, M., Maehara, Y., Oda, S., Ichiyoshi, Y., Kusumoto, T., Sugimachi, K. The p53 tumor suppressor gene in anticancer agent-induced apoptosis and chemosensitivity of human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43(1):43-9.

Yamaue, H., Tanimura, H., Nakamori, M., Noguchi, K., Iwahashi, M., Tani, M., Hotta, T., Murakami, K., Ishimoto, K. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Dis Colon Rectum*. 1996;39(4):416-22.

Yang, H.L., Pan, J.X., Sun, L., Yeung, S.C. P21 Waf-1 (Cip-1) enhances apoptosis by manumycin and paclitaxel in anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 2003; 88(2):763-772.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T., Jones, D.P., Wang, X. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129–1132.

Yao R., Cooper G. M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; 267: 2003-2006.

Yoo, Y.D., Park, J.K., Choi, J.Y., Lee, K.H., Kang Y.K., Kim, C.S., Shin, S.W., Kim, Y.H., Kim, Y.S. CDK4 down-regulation induced by paclitaxel is associated with G1 arrest in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 1998 Dec; 4(12):3063-3068.

Yoshizaki, A., Honda, T., Utsugisawa, Y., Nishiya, L. Unscheduled expression of cyclins by anti-cancer drug exposure. *Hum Cell* 1998; 11(1):27-34.

Yu, D., Jing, T., Liu, B., Yao, J., Tan, M., McDonnell, T.J., Hung, M.C. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34CDC2 kinase. *Mol Cell* 1998; 2:581-591.

Yuan, S.Y., Hsu, S.L., Tsai, K.J., Yang, C.R. Involvement of mitochondrial pathway in Taxol-induced apoptosis of human T24 bladder cancer cells. *Urol Res* 2002; 30:282-288.

Zambetti G. P., Levine A. J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 1993; 7: 855-865.

Zanelli, G.D., Quaia, M., Robieux, I., Bujor, L., Santarosa, M., Favaro, D., Spada, A., Caffau, C., Gobitti, C., Trovo, M.G. Paclitaxel as a radiosensitizer: a proposed schedule of administration based on *in vitro* data and pharmacokinetic calculations. *Eur J Cancer* 1997; 33(3):486-492.

Zhou, B.B., Elledge, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408:433-439.

Zoon KC, Bekisz J, Miller D. Human interferon alpha family: protein structure and function. In: Baron S, Coppenhaver DH, Dianzani F, et al., eds. *Interferon: principles and medical applications*, 1st ed. Galveston, TX: The University of Texas Medical Branch, 1992:95.

7. Anhang

7.1. Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AIF	apoptosis inducing factor
APAF	apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternative reading frame
ATF	activating transcription factor
ATP	Adenosin Triphosphat
Bax	BCL2-associated X protein
bp	Basenpaare
BCL-2	B-cell lymphoma/leukemia-2 protein
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CASP	Caspase
Caspase	cysteine-dependent aspartate specific protease
CD27BP	CD27 binding (Siva) protein
CDC	cell division cycle protein
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
chron.	chronisch
Ci	Curie
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor

Co	Kobalt
cpm	counts per minute
CPT-11	Irinotecan
CSF	colony stimulating factor
CV	coefficient of variation
Da	Dalton
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabine)
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DI	DNA-Index
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP-1	s. TFDP-1
DTIC	Dacarbazin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Egr-1	Early growth response gene 1
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
E2F-1, -3, -5	E2F transcription factor 1, -3, -5
f	forward
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FCS	fötales Kälberserum
FADD	Fas-associated death domain

Fas	= tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6)
FasL	Fas-Ligand
FAST	Fas-activated serine/threonine kinase
FLICE	Fas-associated death domain-like Interleukin-1 β converting enzyme (= caspase 8)
FSC	forward light scatter
5-FU	5-Fluorouracil
G0/1/2-Phase	„gap 0/1/2“ bzw. „growth phase 0/1/2“ des Zellzyklus
GADD	growth arrest and DNA-damage-inducible protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEP-Tumoren	gastroenteropankreatische Tumoren
ggf.	gegebenenfalls
GRB-IR/GRB10	growth factor receptor-bound protein 10
Gy	Gray (absorbierte Strahlendosis)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole
HPLC	High Pressure (or Performance) Liquid Chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICE	interleukin-1 β -converting enzyme
ICE-LAP6	ICE-like apoptotic protease 6 (= caspase 9)
IGF-1	Insulin-like growth factor I
IgG	Immunglobulin-G
IFN	Interferon

IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LICE	= caspase 3
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	mouse double minute 2
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MeV	Megaelektronenvolt
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mg	milligramm
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µM	mikro molar
MMLV	molony murine leukemia virus
MORT	mediator of receptor-induced toxicity
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
mRNA	messenger RNA
MRS	Mismatch Repair System
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MW	Molekulargewicht
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEDD5	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5 (Septin 2)

NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
nM	Nano molar
NOS	inducible nitric oxide synthase
NSE	neuronenspezifische Enolase
NW	Nebenwirkung
OD	optische Dichte
<i>p.A.</i>	pro analysi
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P53	tumor protein p53
PI	Propidiumjodid
PIG	p53-induced-gene
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
pRb	retinoblastoma protein
%	Prozent
r	reverse
RAS	rat sarcoma (Onkogen)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSC	side scatter
SSC (Lösung)	saline-sodium citrate
SSTR	Somatostatin-Rezeptor

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TFDP-1	transcription factor dp-1
TGF	tumor growth factor
TNF	tumor necrosis factor
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan/HCl
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) x
TSR	Template Suppression Reagent
u.	und
U	Unit = Einheit enzymatischer Aktivität
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
vs.	versus
w/v	weight by volume
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7.2. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Christian Robbel
Adresse:	Unterlinden 4 79098 Freiburg
Geburtstag:	07. 01. 1977
Geburtsort:	Mönchengladbach
Familienstand:	ledig
Eltern:	Helene Robbel, StR / Dr. Lutz Robbel, Mikrobiologe
Geschwister:	Philipp Robbel / Bernhard Robbel

Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule Marburg/Marbach
1987 – 1996	Stiftsschule St. Johann, Amöneburg, Abitur
01.07.1996 – 30.04.1997	10 monatiger Wehrdienst beim 1./InstBtl 310, Montabaur und Ausbildung zum Helfer im Sanitätsdienst

SS 1997-WS 2002 Studium der Humanmedizin

09.04.1999	Ärztliche Vorprüfung
13.04.2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	<i>Famulaturen:</i>
10.08.2000 – 10.09.2000	Zentrum für Innere Medizin Marburg
01.03.2001 – 01.04.2001	Allgemeinchirurgie Marburg
09.07.2001 – 08.08.2001	Klinik für Viszerale und Transplantationschirurgie, Bern
15.08.2001 – 14.09.2001	Internistische Gemeinschaftspraxis, Marburg
03.04.2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

22.04.2002 – 11.08.2002	Zentrum für Nervenheilkunde, Marburg
12.08.2002 – 01.12.2002	Zentrum für Innere Medizin Marburg
02.12.2002 – 23.03.2003	Chirurgische Klinik des Kantonsspitals Luzern
11.06.2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit 12/2003	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abt. für Hämatologie und Onkologie, Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Freiburg (Direktor: Prof. R. Mertelsmann); seit 10/04 Assistenzarzt
--------------	--

Wissenschaftliche Ausbildung

Promotion bei Frau Prof. Dr. med. B. Simon,
Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Gastroenterologie
und Stoffwechsel, Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

7.3. Schriftenverzeichnis

Originalarbeiten:

1. Bert T., Lubomierski N., Gangsaue S., Munch K., Printz H., Prasnikar N., **Robbel C.**, Simon B. Expression spectrum and methylation-dependent regulation of melanoma antigen-encoding gene family members in pancreatic cancer cells.
Pancreatology 2:146-154 (2002).
2. **Robbel C.**, Bert T., Steigerwald, A., Reckzeh, B., Simon, B. Antiproliferative effect of paclitaxel by G2/M cell cycle arrest and induction of apoptosis in neuroendocrine pancreatic tumor cells.
Mol Cell Endocrinol (Manuskript in Vorbereitung).

Abstracts:

1. **Robbel C.**, Bert T., Steigerwald A., Simon B. Paclitaxel zeigt antiproliferative Wirkung durch G2/M Zellzyklus Arrest und Einleitung von Apoptose in neuroendokrinen Pankreastumorzellen.
Med Klinik 96: P265 (2001).
2. **Robbel C., Bert T., Steigerwald A., Reckzeh B., Simon B. Paclitaxel induziert G2-Arrest und Apoptose in serotoninproduzierenden neuroendokrinen Pankreastumorzellen.**
Z Gastroenterol 38: 733 (2000).
3. **Robbel C.**, Bert T., Steigerwald A., Reckzeh B., Simon B. Molekulare Effekte von Paclitaxel in neuroendokrinen Pankreastumorzellen.
21. Tagung des Deutschen Pankreasclub Rostock (2000).
4. Lubomierski, N., **Robbel, C.**, Bert, T., Münch, K., Simon, B. Rolle der de novo Methylierung in neuroendokrinen Pankreastumoren.
21. Tagung des Deutschen Pankreasclub Rostock (2000).

7.4. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Beato, Beyer, Daut, Engenhardt-Cabillic, Fischer, Fruhstorfer, Geus, Görg, Gotzen, Grimm, Hasilik, Herzum, Kern, Köhler, Kretschmer, Jungclas, Lange, Koolmann, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Richter, Röhm, Rosenow, Rotmund, Schäfer, Schneider, Seitz, Simon, Slenczka, Vogelmeier, Voigt, von Wichert, Weihe, Werner, Westermann.

7.5. Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Untersuchungen zur Chemo- und Radiosensitivität
und deren Auswirkungen auf Zellzyklus, Apoptoseinduktion
und Genexpression in neuroendokrinen
Pankreastumorzellen**

am Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel, unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. B. Simon ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher weder an einem in- und ausländischem medizinischem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Freiburg, 19. Juni 2005

7.6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Babette Simon für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während deren Durchführung. Sie stand stets und in vielfacher Hinsicht als Ansprechpartnerin zur Verfügung und unterstützte mich beim Erstellen der Arbeit und darüber hinaus mehr, als zu verlangen war.

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und das Überlassen des Laborplatzes.

Frau Karin Münch möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die molekularbiologischen Techniken und die Betreuung während der Durchführung der Experimente danken. Frau Dr. med. Barbara Reckzeh und Frau Dr. med. Heike Klaus haben wegen ihrer großzügigen und kompetenten Unterstützung bei der Benutzung des FACS-Zytometers bzw. des Kobalt-Bestrahlungsgerätes meinen großen Dank und Respekt verdient. Ihr Einsatz war für den Fortgang der Arbeit von großem Wert. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Jungclas, Herrn Dr. rer. nat. Vater und Herrn Dr. rer. nat. Martin Stumpf für die Bereitstellung und die Einweisung in die Benutzung des Phosphorimagers.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Werner Joba und den Mitarbeitern des Labors für die hilfsbereite Zusammenarbeit und das angenehme stets produktive Arbeitsklima danken.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern zu größtem Dank verpflichtet. Sie haben mich in jeder Hinsicht unterstützt und es mir ermöglicht, den Weg bis hierher zu gehen.