

Aus dem Lehrstuhl für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Prof. Dr. med. Olaf Ortmann
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Bedeutung des *icb-1*-Gens für die Apoptose von
Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Derya Belgutay
2015

Aus dem Lehrstuhl für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Prof. Dr. med. Olaf Ortmann
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Bedeutung des *icb-1*-Gens für die Apoptose von
Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Derya Belgutay
2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2015

Andy, meiner Familie, meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Gynäkologische Tumore: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie.....	1
1.1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.1.2 Das Ovarialkarzinom.....	4
1.1.3 Das Endometriumkarzinom.....	6
1.2 Die Apoptose.....	9
1.2.1 Allgemeines.....	9
1.2.2 Signaltransduktionswege.....	10
1.2.2.1 Überblick.....	10
1.2.2.2 Extrinsischer Signalweg.....	10
1.2.2.3 Mitochondrialer intrinsischer Signalweg.....	10
1.2.2.4 Caspase-Signalkaskade.....	12
1.2.3 Apoptoseregulation.....	13
1.2.3.1 Das Caspase-8-Homologon cFLIP.....	13
1.2.3.2 IAPs: Hemmung der Caspase-3, -7 und -9 durch direkte Interaktion.....	13
1.2.3.3 Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie.....	14
1.2.4 Rolle der Apoptose in Tumorgenese und -therapie.....	15
1.3 Das humane Gen <i>icb-1</i>	16
1.3.1 Allgemeines zu <i>icb-1</i>	16
1.3.2 Erkenntnisse über Rolle und Funktion von <i>icb-1</i>	18
1.4 Verwendete Krebszelllinien.....	19
1.4.1 Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	19
1.4.2 Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3.....	19
1.4.3 Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B.....	20
1.5 Verwendete Apoptoseinduktoren.....	20
1.5.1 Staurosporin.....	20
1.5.2 Actinomycin D.....	20
1.5.3 Camptothecin.....	21

1.5.4	Cycloheximid	21
1.5.5	Dexamethason	22
1.5.6	Etoposid.....	22
1.5.7	Tamoxifen	22
1.6	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Krebszelllinien	25
2.1.2	Chemische Komponenten	25
2.1.2.1	Zellkultur	25
2.1.2.2	Molekulargenetische Verfahren	26
2.1.2.2.1	Transfektion	26
2.1.2.2.2	Real-Time qPCR	27
2.1.2.3	Stimulanzen.....	28
2.1.3	Hilfsmittel und Geräte	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Zellkultur.....	30
2.2.1.1	Standardbedingungen	30
2.2.1.2	Mediumwechsel	31
2.2.1.3	“Herunterhungern“ der Zellen im 6-Well	31
2.2.1.4	Zellernte	31
2.2.1.5	Aussaat	32
2.2.1.6	Stimulation	32
2.2.1.7	Messungen.....	33
2.2.1.8	Auswertung	34
2.2.2	Molekulargenetische Methoden	34
2.2.2.1	Herstellung der Zellklone mittels Transfektion	34
2.2.2.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	34
2.2.2.3	Real-Time qPCR im LightCycler.....	35
2.2.2.4	Auswertung der Real-Time qPCR.....	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Stabiler <i>icb-1</i> -Knockdown bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen.....	37
3.2	Apoptose und Proliferation der MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B- Klone nach Stimulation	38

3.2.1	Überblick.....	38
3.2.2	Apoptose und Proliferation der MCF-7-Klone nach Stimulation	39
3.2.3	Apoptose und Proliferation der SK-OV-3-Klone nach Stimulation	48
3.2.4	Apoptose und Proliferation der HEC-1B-Klone nach Stimulation.....	53
3.3	mRNA-Level Apoptose-assoziiertes Gene bei stimulierten MCF-7-Klonen.....	60
3.3.1	Überblick.....	60
3.3.2	Proapoptotische Gene.....	61
3.3.2.1	Bax	61
3.3.2.2	Bak	61
3.3.2.3	XAF1	62
3.3.2.4	AIF	63
3.3.3	Antiapoptotische Gene	65
3.3.3.1	Bcl-2.....	65
3.3.3.2	c-IAP1	65
3.3.3.3	c-IAP2	65
3.3.3.4	XIAP.....	66
4	Diskussion	68
4.1	Kurze Zusammenfassung	68
4.2	Apoptoseinduktion und antiproliferative Wirkung der Stimulanzen bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen.....	68
4.3	Expression Apoptose-assoziiertes Gene bei stimulierten MCF-7-Klonen.....	73
4.4	Proapoptotische Wirkung von <i>icb-1</i> bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen... ..	77
4.5	Rolle von XAF1 und XIAP in der proapoptotischen Wirkung von <i>icb-1</i> bei stimulierten MCF-7-Klonen	79
4.6	Einfluss von <i>icb-1</i> auf die Expression von AIF bei stimulierten MCF-7-Klonen.....	81
4.7	Klinische Relevanz der Ergebnisse	81
4.8	Ausblick	83
5	Zusammenfassung.....	84
	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung.....	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vereinfachte schematische Darstellung der 2 Signalwege der Apoptose in Säugetierzellen.....	11
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Struktur der Apoptosecaspasen bei Säugetieren, Drosophila und C.elegans.....	12
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Struktur der IAPs bei Säugetieren und Fruchtfliegen.....	14
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Struktur pro- und antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie.....	15
Abbildung 5	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des humanen Gens <i>icb-1</i>	17
Abbildung 6	Graphische Darstellung des stabilen <i>icb-1</i> -Knockdowns bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen.....	37
Abbildung 7	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Cycloheximid. 42	
Abbildung 8	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Etoposid....	46
Abbildung 9	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber dem Apoptose-induzierenden SERM Tamoxifen.....	47
Abbildung 10	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin und Actinomycin D.....	49
Abbildung 11	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Camptothecin.....	51
Abbildung 12	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Cycloheximid.....	52

Abbildung 13	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin und Actinomycin D	55
Abbildung 14	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Camptothecin.....	57
Abbildung 15	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Cycloheximid.....	58
Abbildung 16	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Etoposid .	59
Abbildung 17	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die XAF1-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika	63
Abbildung 18	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die AIF-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika	64
Abbildung 19	Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1</i> -Knockdowns auf die XIAP-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika	67
Abbildung 20	Schematische Darstellung der Proteininteraktionen von XIAP.....	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Eingesetzte Stimulanzkonzentrationen.....	38
Tabelle 2	Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Staurosporin	40
Tabelle 3	Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Actinomycin D	41
Tabelle 4	Apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Camptothecin ..	43
Tabelle 5	Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Camptothecin ..	44
Tabelle 6	Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Cycloheximid ..	45
Tabelle 7	Apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Tamoxifen	47
Tabelle 8	Apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach Stimulation mit Staurosporin.	48
Tabelle 9	Apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach Stimulation mit Camptothecin	50
Tabelle 10	Proliferationsverhalten der HEC-1B-Klone nach Stimulation mit Staurosporin ..	54
Tabelle 11	Apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone nach Stimulation mit Cycloheximid	58
Tabelle 12	Primer und deren Zielgene	60
Tabelle 13	AIF-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation	64
Tabelle 14	XIAP-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation	66

Abkürzungsverzeichnis

Speziell in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

.../con	Kontrollklone der jeweiligen Zelllinie
.../icbKD	<i>icb-1</i> -downgeknockte Klone der jeweiligen Zelllinie
LMK	Lösungsmittelkontrolle (=unstimulierte Zellklone)

Medizinische Fachausdrücke und -gesellschaften, (bio)chemische Verbindungen und Substanzen, Gene

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AIF	apoptosis-inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
ATRA	all-trans retinoic acid
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Allgemeinzustand
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated x-protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BH	Bcl-2 homology
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIR	Baclovirus IAP repeat
BP	binding protein
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
CA	carbohydrate antigen
CABIT	cysteine-containing, all- β in Themis
CARD	caspase recruitment domain
cDNA	complementary DNA
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
CD95	cluster of differentiation 95/
c-IAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1
c-IAP2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2

C1ORF38	chromosome 1 open reading frame 38
CTB	CellTiter-Blue
CT	Computertomographie
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidine triphosphate
DD	death domain
DED	death-effector domain
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.
DIMDI	German Institute of Medical Documentation and Information
DISC	death-inducing signaling complex
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DKH	Deutsche Krebshilfe
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12 Ham
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide
DR3	death-receptor 3
DR6	death-receptor 6
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group
EC	endometrial cancer
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ER	estrogen receptor
ER α	estrogen receptor α
ER β	estrogen receptor β
ERE	estrogen responsive element
ESTs	expressed sequence tags
ETOH	Ethanol
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	fetal bovine serum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2

HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
icb-1	induced by contact to basement membrane 1
ICD-10-GM	International Classification of Diseases, 10th Revision, German Modification
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IFN γ	Interferon- γ
ILP2	IAP-like protein-2
ML-IAP/Livin	melanoma IAP/Livin
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
ORF	open reading frame
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PBSO	prophylaktische beidseitige Salpingoovarektomie
PCO	polycystic ovary
PCR	polymerase chain reaction
PR	progesteron receptor
pTNM	pathologisch, Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen
R0	kein Residualtumor
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SCLC	small cell lung cancer
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low Pi
SR2	serum replacement 2
STS	Staurosporine
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-R1	TNF-receptor 1
TNM	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen

TRADD	TNF-receptor type 1-associated death domain protein
TRAIL-R1	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase-type plasminogen-activator
vFLIP	viral FLICE-like inhibitory protein
XAF1	Xiap-associated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

Konzentrations-, Massen-, Mengen-, Längen- und Zeitangaben

mM	Millimolar
μM	Mikromolar
kDa	Kilodalton
ml	Milliliter
mm	Millimeter
cm	Zentimeter
sec	second
min	minute
h	hora

Gängige Abkürzungen

z.B.	zum Beispiel
vgl.	vergleiche
Syn.	Synonym

1 Einleitung

1.1 Gynäkologische Tumore: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie

1.1.1 Das Mammakarzinom

Das Karzinom der Brustdrüse (ICD-10-GM: C50 [DIMDI 2014]) ist mit einer Inzidenz von etwa 70000 (2010) das häufigste Malignom der Frau [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Es kommt aber auch – in ungefähr einem von hundert Fällen – bei Männern vor [Haag et al. 2014]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (2010), wobei etwa jeder zehnte Erkrankungsfall junge Frauen unter 45 Jahren betrifft. Während die Anzahl der Neuerkrankungen in den letzten 20 Jahren – vor allem nach Einführung des Mammographie-Screenings im Jahr 2005 – zugenommen hat, konnten die relativen Sterbefälle durch die Verbesserung der adjuvanten Therapie reduziert werden [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Neben der Selbstuntersuchung der Brust einmal im Monat wird ab dem 30. Lebensjahr auch die alljährliche Abtastung durch einen Arzt und zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr die regelmäßige Mammographie (alle 2 Jahre) empfohlen [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Diese Maßnahmen ermöglichen in vielen Fällen die Früherkennung des Karzinoms, was einen wesentlichen Faktor für die gute Gesamtprognose des Mammakarzinoms (relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Mammakarzinome im Jahr 2010: 87%) darstellt [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Als Prognosefaktoren gelten in erster Linie pTNM-Status, R-Klassifikation und Sicherheitsabstände, histologischer Tumortyp, Grading, Blut- und Lymphgefäßinvasion, Alter und uPA- und PAI-1-Konzentration [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013i].

Histologisch unterscheidet man vor allem duktales (65-80%) und lobuläres (~10%) Karzinome. Zudem existieren noch etwa 20 weitere Subtypen [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014].

In der Mehrzahl der Fälle (~55%) ist der Tumor im äußeren oberen Quadranten der Brust lokalisiert. Er metastasiert früh lymphogen vor allem in die ipsilaterale Axilla, hämatogen vor allem in Skelett, Lunge, Leber, ZNS und Nebennieren [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014].

Frauen hohen Alters, mit Adipositas oder in der Postmenopause sowie Frauen mit früher Menarche, später Menopause, Nullipara oder Hormonersatztherapie tragen ein erhöhtes

Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken [Petru et al. 2011]. Wie beim Ovarialkarzinom erkrankten Frauen mit einer BRCA1- beziehungsweise BRCA2-Genmutation auch deutlich häufiger an einem Mammakarzinom als Frauen ohne diese Mutation. Das Lebenszeitrisiko beträgt bei Mutationsnachweis bis zu 80%. Die prophylaktische beidseitige Mastektomie wird in diesen Fällen nach abgeschlossener Familienplanung beziehungsweise ab dem 35.-40. Lebensjahr als Primärprävention empfohlen, da sie das Erkrankungsrisiko um 90-95% senkt [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013d].

Ein auffälliger Tastbefund ist häufig das erste Symptom des Mammakarzinoms. Ferner sollten vor allem Hauteinziehung, Einziehung der Mamille, Orangenhautphänomen und axilläre Lymphknotenvergrößerung weiter abgeklärt werden [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014].

Die Diagnose des Mammakarzinoms erfolgt im Wesentlichen in 3 Schritten: Zunächst wird eine ausführliche körperliche Untersuchung mit Abtastung der Mammae im Seitenvergleich inklusive Palpation der relevanten Lymphknotenstationen durchgeführt, gefolgt von Bildgebung mit Sonographie, Mammographie und gegebenenfalls MRT mit Kontrastmittel. Zuletzt wird eine Biopsie – entweder als Stanz-, Vakuum- oder offene Exzisionsbiopsie – zur histologischen Sicherung inklusive Grading nach Elston und Ellis sowie zur immunhistochemischen Bestimmung des Hormonrezeptor- und HER2/neu-Rezeptorstatus entnommen [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013f; Haag et al. 2014].

Im Anschluss an die Diagnosestellung wird ein Staging durchgeführt. Die Bildgebung sollte hier eine Abdomensonographie, einen Röntgen-Thorax und eine Skelettszintigraphie, bei entsprechender Klinik auch ein Schädel-CT umfassen [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013f; Haag et al. 2014].

Die Operation dient ebenfalls als Staging im Sinne der Bestimmung der Tumorgöße und des Lymphknotenstatus, gilt aber vor allem als erster obligater Therapieschritt des lokoregional begrenzten Mammakarzinoms. Die Entnahme des Tumors erfolgt wenn möglich brusterhaltend mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1mm, ansonsten als modifiziert radikale Mastektomie mit nachfolgender plastischer Rekonstruktion der Brust. Eine Axilladisektion (mindestens 10 Lymphknoten aus Level I und II) wird nur bei positivem oder nicht auffindbarem Sentinellymphknoten durchgeführt [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013h].

Anhand der erhobenen Befunde aus Bildgebung, Operation und histologischer Untersuchung erfolgt die Stadieneinteilung mittels TNM-Klassifikation nach UICC (Stadien I-IV) und der

St.Gallen-Risikoeinteilung (Low-risk, Medium-risk, High-risk) [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014]. Nach ihnen wird die Planung der weiteren Therapieschritte ausgerichtet.

Für die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms kommen Radiatio und Systemtherapie – im Sinne einer Chemo- und/oder Hormon- und/oder Antikörpertherapie – in Frage.

Die adjuvante Radiatio der Brustwand sollte nach brusterhaltender Operation immer und nach Mastektomie bei bestimmten Indikationen möglichst innerhalb von 6-8 Wochen nach der Operation erfolgen. Auch eine Bestrahlung des Lymphabflusses axillär und/oder supra-, infraklavikulär kann indiziert sein [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013b].

Die adjuvante Systemtherapie ist sehr individuell und richtet sich nach der St.Gallen-Risikoeinteilung von 2007, wobei Tumorgroße, Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und Patientinnenalter berücksichtigt werden. Die adjuvante Chemotherapie sollte anthracyclin- und taxanhaltig sein. Auch Cyclophosphamid wird verwendet. Als Antikörper kommt Trastuzumab zum Einsatz, das simultan zur Taxanphase der Chemotherapie verabreicht wird. Für die endokrine Therapie werden Tamoxifen und Aromataseinhibitoren der 3. Generation – einzeln oder sequenziell kombiniert – eingesetzt. Sie wird nach Beendigung der Chemotherapie begonnen und für eine Dauer von 5-10 Jahren durchgeführt [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013a+c].

Eine neoadjuvante Chemotherapie – in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus mit oder ohne Antikörpertherapie – sollte bei großem, nicht brusterhaltend operablem, bei primär inoperablem, bei inflammatorischem Karzinom sowie bei tastbar beziehungsweise sonographisch vergrößerten axillären Lymphknoten durchgeführt werden und dient neben dem präoperativen Downstaging der Testung der Chemotherapiewirkung. Eine neoadjuvante endokrine Therapie kann bei postmenopausalen Frauen mit hormonrezeptorpositivem und HER2/neu-negativem Karzinom mit dem Ziel einer brusterhaltenden Operation oder Kontraindikationen gegen eine Operation beziehungsweise deren Ablehnung erwogen werden [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013g].

Die Therapie bei Fernmetastasen oder Rezidiv erfolgt individuell unter Berücksichtigung von Befund und Begleitfaktoren [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012].

Die Nachsorge des Mammakarzinoms umfasst Anamnese, körperliche Untersuchung, ärztliche Beratung, Betreuung und Begleitung sowie bildgebende Diagnostik zur Erkennung

eines lokoregionären Rezidivs. Sie sollte in den ersten 3 Jahren nach abgeschlossener Primärtherapie vierteljährlich, im 4. und 5. Jahr halbjährlich und ab dem 6. Jahr jährlich erfolgen [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013e].

1.1.2 Das Ovarialkarzinom

Mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 7790 (2010) und einem Gesamtanteil von 3,5% ist das Ovarialkarzinom (ICD-10-GM: C56 [DIMDI 2014]) das sechsthäufigste weibliche Malignom insgesamt und das dritthäufigste Genitalmalignom. Während die Neuerkankungsrate rückläufig ist, blieb die Sterberate in den letzten Jahren in etwa konstant. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, wobei 5-10% aller Ovarialkarzinome – vor allem Keimzelltumore – bereits bei unter 45-Jährigen auftreten [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Die Diagnose des Ovarialkarzinoms wird durch das Fehlen valider Screeningmethoden und spezifischer Symptome erschwert, so dass es in 70% der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien (FIGO IIB-IV) diagnostiziert wird [Burges et al. 2011; Petru et al. 2011]. Es hat somit eine schlechte Prognose, die relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Ovarialkarzinome beträgt 40% [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013].

Im Einzelfall prognostisch entscheidend sind vor allem „das Tumorstadium bei Erstdiagnose und die Therapiequalität“ [Burges et al. 2011]. Der histologische Tumortyp spielt ebenfalls eine Rolle. Über 90% der Ovarialkarzinome gehen vom Epithel aus und sind Adenokarzinome, von denen der muzinöse Typ eine signifikant schlechtere Prognose als der serös-papilläre und der endometrioiden Typ aufweist [Burges et al. 2011; Petru et al. 2011].

Zu den Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom zählen hohes Lebensalter, Adipositas, Nullipara, frühe Menarche, späte Menopause, Östrogensubstitution und PCO-Syndrom [Morch et al. 2009; Petru et al. 2011; RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Auch Frauen mit einer BRCA1- beziehungsweise BRCA2- Mutation haben ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko (36-46% beziehungsweise 10-27%) [Burges et al. 2011; Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2013]. Betroffene Frauen sollten nach abgeschlossener Familienplanung eine PBSO in Erwägung ziehen, da diese zu einer signifikanten Risikoreduktion führt [Rebbeck et al. 2009; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2013].

Wie bereits erwähnt verursacht das Ovarialkarzinom keine charakteristischen Symptome sondern manifestiert sich in unspezifischen Beschwerden wie diffusen abdominellen Schmerzen, Meteorismus, Veränderung der Stuhlgewohnheiten, Zyklusstörungen, Bauchumfangvermehrung und unklarer Gewichtsabnahme [Burges et al. 2011; Petru et al. 2011; Haag et al. 2014].

Bei klinischem Verdacht auf ein Ovarialkarzinom sollte ein transvaginaler Ultraschall durchgeführt werden, da dieser bezüglich der Beurteilung der Ovarien die größte Aussagekraft besitzt [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2013]. Bei speziellen Fragestellungen kann auch ein CT oder ein MRT indiziert sein, wird allerdings nicht grundsätzlich empfohlen [Burges et al. 2011; Petru et al. 2011].

Wie beim Mamma- und Endometriumkarzinom kann auch beim Ovarialkarzinom kein bildgebendes Verfahren das operative Staging ersetzen. Es dient hier sowohl der Diagnosesicherung mittels Schnellschnitt als auch der Stadieneinteilung nach der UICC und der FIGO und erfolgt in Längslaparotomie. Unabhängig vom Stadium gilt die Operation immer auch als primärer obligater Therapieschritt. Das Ausmaß der operativen Maßnahmen wird vom jeweiligen Tumorstadium (FIGO I-IV) bestimmt. Ziel ist idealerweise die komplette Tumoresektion (R0-Resektion) oder, falls dies nicht möglich ist, eine Reduktion der Tumormasse auf einen Tumorrest <1cm. Nur im Stadium IA kann ein fertilitätserhaltendes Vorgehen versucht werden [Petru et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2013].

Die zweite Therapiesäule neben der Operation ist die adjuvante Chemotherapie. Außer bei FIGO IA Grad 1 ist sie in allen Stadien vorgesehen. Standard bei frühem Ovarialkarzinom (FIGO I-IIA) ist eine platinreiche Chemotherapie, bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO IIB-IV) eine Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel. In den Stadien FIGO IIIB-IV kommt seit Dezember 2011 zusätzlich die Gabe von Bevacizumab in Frage.

Im Falle eines Tumorrezidivs können Rezidivoperation – vor allem bei positivem AGO-Score (Komplettresektion bei Primär-OP, guter AZ (ECOG Performance Status 0), Aszites <500ml) – oder Chemotherapie erwogen werden.

Die regelmäßige Tumornachsorge sollte eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung sowie einen transvaginalen Ultraschall umfassen. Auch der Verlauf des Tumormarkers CA-125 kann hier hilfreich sein [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2013].

1.1.3 Das Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom (ICD-10-GM: C54.1 [DIMDI 2014]) ist mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 11550 (2010) und einem Anteil von 5,1% an allen Malignomen nach Mamma-, kolorektalem und Bronchialkarzinom das vierthäufigste Malignom der Frau insgesamt und das häufigste weibliche Genitalmalignom. Allerdings folgen sowohl altersstandardisierte Neuerkrankungsrate als auch Sterblichkeit in den letzten Jahren einem Negativtrend [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren (2010) [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013; Haag et al. 2014], „allerdings können Endometriumkarzinome auch prämenopausal (bis zu 20%) sogar bei unter 45-jährigen Frauen auftreten (bis zu 5%)“ [Denschlag et al. 2011]. Der überwiegende Anteil der Endometriumkarzinome (78%) wird bereits im Frühstadium (T1) diagnostiziert. Das Endometriumkarzinom gehört deshalb zu den prognostisch günstigen Malignomen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Endometriumkarzinome beträgt 79% (2010) [RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013].

Die Einzelprognose des Endometriumkarzinoms wird vor allem von seinem histopathologischen Typ bestimmt. Man unterscheidet prognostisch günstige Typ-I-Karzinome und Typ-II-Karzinome mit deutlich schlechterer Prognose.

75-80% der Endometriumkarzinome sind Typ-I-Karzinome und entsprechen histologisch einem endometrioiden Adenokarzinom [Denschlag et al. 2011]. Sie entwickeln sich östrogenabhängig über eine atypische Endometriumhyperplasie [Lacey et al. 2010; Petru et al. 2011]. Als gesicherte Risikofaktoren gelten deshalb Faktoren, die zu einem relativen Überschuss an Östrogenen führen. Dazu gehören metabolisches Syndrom mit Adipositas, Nulliparität, frühe Menarche und späte Menopause, PCO-Syndrom, Langzeiteinnahme von Östrogenen ohne Gestagenschutz und Tamoxifeneinnahme [Petru et al. 2011; RKI und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013].

Die östrogenunabhängigen Typ-II-Karzinome sind mit 10-15% aller Endometriumkarzinome deutlich seltener als Typ-I-Karzinome [Denschlag et al. 2011]. Histologisch unterscheidet man vor allem das seröse und das klarzellige Karzinom [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014], die beide „per definitionem als gering differenziert klassifiziert werden“ [Denschlag et al. 2011]. Als Vorstufe gilt das endometriale intraepitheliale Karzinom [Petru et al. 2011]. Typ-II-Karzinome sind altersabhängig und treten gehäuft nach einer Bestrahlung des Uterus auf [Denschlag et al. 2011; Petru et al. 2011].

Auch das HNPCC-Syndrom gilt als Risikofaktor für das Auftreten eines Endometriumkarzinoms (bis zu 60%) [Herold et al. 2013].

Obwohl bislang keine zuverlässigen Screeningmethoden für das Endometriumkarzinom ermittelt werden konnten [Kommission Uterus der AGO 2013], so gelingt dennoch in vielen Fällen eine frühe Diagnose aufgrund der klassischen Frühsymptome: Die postmenopausale Blutung und die prämenopausale Meno- oder Metrorrhagie. Auch ein abnormer Fluor sollte stets an ein Endometriumkarzinom denken lassen [Petru et al. 2011; Haag et al. 2014].

Die Diagnose des Endometriumkarzinoms erfolgt in 3 Schritten. Zunächst wird eine ausführliche gynäkologische Untersuchung durchgeführt, um die Blutungsquelle zu identifizieren und die Tumorausbreitung zu erfassen. Der anschließende transvaginale Ultraschall dient primär der Bestimmung der Endometriumdicke, die bei postmenopausaler Blutung ab >5mm als verdächtig gilt [Petru et al. 2011]. Hier zeigt der transvaginale Ultraschall eine sehr hohe Sensitivität (95% ohne Hormontherapie, 91% mit Hormontherapie) bezüglich der Detektion einer endometrialen Pathologie [Smith-Bindman et al. 1998]. Außerdem können „die Infiltrationstiefe ins Myometrium und evtl. auch ein Zervixbefall abgeschätzt sowie Adnextumoren oder Aszites [...] festgestellt werden“ [Petru et al. 2011]. Zur Diagnosesicherung erfolgen zuletzt Hysteroskopie mit Biopsieentnahme und fraktionierte Abrasio mit histopathologischer Untersuchung [Petru et al. 2011].

Das operative Staging ist allen apparativen Stagingmethoden überlegen und ist deshalb seit 1988 Standard [Petru et al. 2011; Kommission Uterus der AGO 2013]. Sie umfasst obligat die Exploration des Abdomens mit Entnahme einer Zytologie, die Hysterektomie und die beidseitige Adnexektomie. Fakultativ wird zusätzlich eine pelvine (15) und paraaortale (10) Lymphonodektomie durchgeführt. Bei serösem oder klarzelligem Karzinom sollten zudem die Entnahme multipler peritonealer Biopsien und die Omentektomie erfolgen. In fortgeschrittenen Stadien profitieren die Patientinnen zudem von einer maximalen Resektion uterusferner Tumormanifestationen. Bei nachgewiesenem Cervixbefall sollte eine radikale Hysterektomie durchgeführt werden. Das laparoskopische Vorgehen ist hierbei in frühen Stadien der Laparotomie gleichwertig und birgt sogar Vorteile während und nach der Operation [Petru et al. 2011; Kommission Uterus der AGO 2013]. Ergänzend werden Röntgen-Thorax, Abdomensonographie und fakultativ Zystoskopie und Rektoskopie empfohlen [Petru et al. 2011].

Die daraus hervorgehende Stadieneinteilung erfolgt – seit 01.01.2010 modifiziert – nach der UICC und der FIGO [Kommission Uterus der AGO 2013]. Nach ihr wird die weitere Therapieplanung ausgerichtet.

Die Therapie des Endometriumkarzinoms wird interdisziplinär und für jede Patientin individuell unter Berücksichtigung des Tumorbefundes und der Risikofaktoren, aber auch des Alters und Allgemeinzustandes sowie der persönlichen Wünsche der Patientin durchgeführt.

Die Indikation zur Operation in oben beschriebenem Umfang ist beim primären Endometriumkarzinom grundsätzlich gegeben. Bei jungen Frauen mit Kinderwunsch und einem frühen Tumorstadium (gut differenziertes endometrioides Adenokarzinom im Stadium T1a) können eine zunächst rein konservative Therapie mit Gestagenen und eine sekundäre Hysterektomie nach abgeschlossener Familienplanung erwogen werden.

Die Radiotherapie kann entweder in Form einer externen Teletherapie und/oder als weniger toxische intrakavitäre Brachytherapie erfolgen. Sie ist im Falle der Inoperabilität primär indiziert. Eine adjuvante Radiatio sollte bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko durchgeführt werden.

Alternativ oder ergänzend wird im Stadium IB G3, II G3, III und IVa sowie bei serösem oder klarzelligem Karzinom eine adjuvante Chemotherapie mit Adriamycin plus Cisplatin empfohlen.

In der Palliativsituation kommen eine Hormontherapie mit Gestagen und eine systemische Chemotherapie mit Anthrazyklinen, Platinderivaten oder Taxanen in Frage. Im Falle eines Rezidivs gelten Operation, Radiatio und palliative Systemtherapie als Therapieoptionen [Kommission Uterus der AGO 2013].

Die Therapieprinzipien für das Endometriumkarzinom basieren auf aktuellen Empfehlungen renommierter Forschungsstellen (AGO, DGGG, DKG). Einige Aspekte sind allerdings nur unzureichend untersucht oder in Studien kontrovers bewertet worden, so dass diesbezüglich in Zukunft weitere Studien folgen müssen.

Eine Nachsorge mit ausführlicher körperlicher Untersuchung und persönlichem Gespräch sollte in den ersten 2-3 Jahren alle 3 Monate erfolgen, um eine bestmögliche Begleitung der Patientin – ihren Bedürfnissen entsprechend – zu etablieren und Rezidive früh zu erkennen [Kommission Uterus der AGO 2013].

1.2 Die Apoptose

“Life is pleasant. Death is peaceful. It’s the transition that’s troublesome.”

Isaac Asimov (Biochemiker, Schriftsteller 1920-1992)

1.2.1 Allgemeines

Die Apoptose (Syn.: Programmierter Zelltod) beschreibt die gezielte Beseitigung überflüssiger, geschädigter oder infizierter Zellen nach einem genetisch determinierten Programm [Adams 2003].

Der Begriff stammt aus dem Griechischen und leitet sich von den Worten apo “ab” und ptosis “fallen” ab und steht sinnbildlich für das Herabfallen welker Blätter im Herbst. In der zellbiologischen Terminologie tauchte er erstmals 1972 auf [Kerr et al. 1972]. Grundlegende Untersuchungen an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigten, dass der ursprüngliche Zellbestand von 1090 Zellen im Laufe der Entwicklung immer um 131 Zellen reduziert wurde [Sulston & Horvitz 1977].

Die Apoptose muss von einer weiteren Form des Zelltods, der Nekrose, unterschieden werden. Bei der Nekrose wird die Zellintegrität durch pathologische äußere Einflüsse – beispielsweise Sauerstoffmangel, hohe Temperaturen oder Noxen – irreversibel geschädigt. Es kommt zur Schwellung der Zellorganellen und Zellyse mit der Folge einer lokalen Entzündungsreaktion. Bei der Apoptose hingegen kommt es physiologisch auf einen Stimulus hin zu strikt regulierten, ATP-abhängigen biochemischen Prozessen. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und die DNA fragmentiert unter Aufrechterhaltung der Membranintegrität. Die anschließend abgeschnürten Membranvesikel (*apoptotic bodies*) werden durch Makrophagen eliminiert ohne eine inflammatorische Reaktion zu provozieren [Majno & Joris 1995].

Die Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für eine gesunde Embryonalentwicklung, die Aufrechterhaltung der Homöostase [Vaux & Korsmeyer 1999] und ein potentes Immunsystem [Hildemann et al. 2002]. Sie spielt eine Rolle bei degenerativen und autoimmunen Prozessen [Bouillet et al. 1999] sowie in der Tumorgenese [Cory & Adams 2002; Cory et al. 2003].

1.2.2 Signaltransduktionswege

1.2.2.1 Überblick

Die Apoptose kann auf zweierlei Weise ablaufen. Man unterscheidet den über sogenannte Todesrezeptoren (*death-receptors*) vermittelten extrinsischen und den mitochondrialen intrinsischen Signalweg. Deren gemeinsame Endstrecke ist eine Caspase-Signalkaskade, die letztendlich die bereits beschriebenen morphologischen Veränderungen bis hin zum Tod der Zelle bewirkt [Hengartner 2000; Abbildung 1]. Untersuchungen weisen auf einen dritten, Caspase-unabhängigen Apoptosesignalweg hin, bei dem AIF (*apoptosis-inducing factor*), eine mitochondriale Oxidoreduktase, eine zentrale Rolle spielt [Lorenzo et al. 1999; Susin et al. 1999].

1.2.2.2 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch Ligandenbindung an sogenannte “Todesrezeptoren” der TNF-Rezeptorfamilie (TNF-R1, CD95/Fas, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6) aktiviert [Hengartner 2000]. In der Folge wird der zytoplasmatische Anteil des Rezeptors, die sogenannte Todesdomäne DD (*death domain*), durch Trimesierung des Rezeptors so umstrukturiert, dass intrazelluläre Proteine mit eigener DD (z.B. TRADD, FADD) binden können [Hsu et al. 1995; Kischkel et al. 1995; Hsu et al. 1996]. FADD besitzt neben der Todesdomäne eine Todeseffektordomäne DED (*death-effector domain*), an die die Procaspase-8 seinerseits mit seiner DED bindet [Boldin et al. 1996]. Der dadurch gebildete Komplex wird als DISC (*death-inducing signaling complex*) bezeichnet [Kischkel et al. 1995]. Nach autokatalytischer Aktivierung der Procaspase-8 gelangt die aktive Caspase-8 in das Zytosol und aktiviert rasch die Effektorcaspase-3, -6 und -7. Diese direkte Aktivierung findet aber nur statt, wenn aktive Caspase-8 in ausreichender Menge freigesetzt wird (Typ I-Zellen). Bei zu langsamer oder schwacher DISC-Bildung (Typ II-Zellen) wird die Aktivierung der Effektorcaspasen indirekt über die Induktion des mitochondrialen intrinsischen Signalwegs durch Proteine der Bcl-2 Familie (Bid, Bax, Bak) vermittelt [Li et al. 1998; Scaffidi et al. 1998; Eskes et al. 2000].

1.2.2.3 Mitochondrialer intrinsischer Signalweg

Beim intrinsischen Apoptosesignalweg spielt die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium – auf einen externen oder internen Stimulus hin – eine zentrale Rolle. So

kommt es beispielsweise über p53-Aktivierung durch DNA-Schädigung zur Integration proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bax, Bak) in die mitochondriale Membran und in der Folge zur Freisetzung verschiedener Moleküle wie Cytochrom C, AIF und Smac/DIABLO [Hengartner 2000]. Das freie Cytochrom C bildet mit mehreren Apaf-1- und Procaspase-9-Molekülen ATP-abhängig einen Multimerkomplex, das sogenannte Apoptosom. Die Bindung zwischen Apaf-1 und Procaspase-9 erfolgt über eine spezielle Formation, die sogenannte CARD (*caspase recruitment domain*), die beide Proteine besitzen. Das Apoptosom induziert die autokatalytische Aktivierung der Procaspase-9 zur Caspase-9, die daraufhin ihrerseits die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) aktiviert [Srinivasula et al. 1998; Rodriguez & Lazebnik 1999; Zörnig et al. 2001]. Wie bereits beschrieben induziert AIF einen Caspase-unabhängigen Apoptosesignalweg [vgl. 1.2.2.1], Smac/DIABLO wiederum wirkt proapoptotisch über Hemmung der IAPs, die ihrerseits als Apoptoseinhibitoren fungieren [Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000].

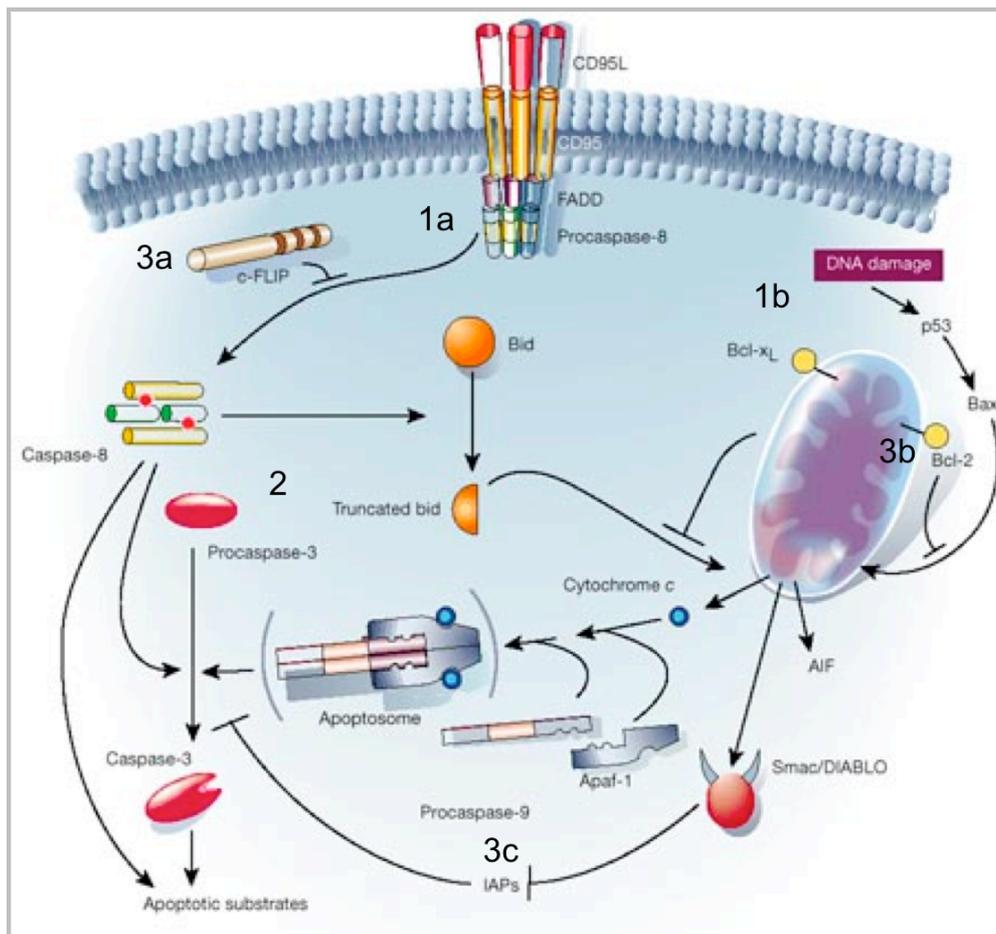


Abbildung 1 Vereinfachte schematische Darstellung der 2 Signalwege der Apoptose in Säugetierzellen. Sowohl der extrinsische (1a) als auch der mitochondriale intrinsische (1b) Signalweg führt nach Ablauf der jeweiligen Reaktionskaskade zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 (2). Diese löst eine Caspase-Signalkaskade aus, die letztendlich zur Degradierung der Zelle führt. Der Reaktionsablauf kann an verschiedenen Stellen durch Proteine wie c-Flip (3a), Bcl-2 (3b) oder IAPs (3c) inhibiert werden [Hengartner 2000; modifiziert].

1.2.2.4 Caspase-Signalkaskade

Caspasen (*cysteinyl-aspartate specific protease*) sind Cysteinproteasen. Neben ihrer zentralen signalvermittelnden Rolle in der Apoptose sind sie vor allem an inflammatorischen Prozessen beteiligt [Chowdhury et al. 2008]. Sie werden als inaktives Zymogen mit N-terminaler Prodomäne und C-terminaler Proteasedomäne synthetisiert. Ihre Aktivierung erfolgt durch Dimerisierung und/oder proteolytische Spaltung zwischen sogenannter kleiner und großer Untereinheit [Earnshaw et al. 1999]. Im Rahmen der Apoptose werden 2 Subtypen von Caspasen unterschieden, Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) [Thornberry 1997; Abbildung 2]. Die autokatalytische Aktivierung der Initiatorcaspasen wird durch ihre Einlagerung in einen Multimerkomplex (z.B. DISC, Apoptosom) über spezifische Proteindomänen (DED, CARD) initiiert [vgl. 1.2.2.2 und 1.2.2.3; Abbildung 2]. In aktiver Form aktivieren sie ihrerseits die Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung (Caspase-Signalkaskade). Die Effektorcaspasen sind die Apoptoseausführenden Enzyme. Sie hydrolysieren in aktiviertem Zustand zelluläre Substrate, was zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen und schließlich zum Zelltod führt [Nicholson 1999].

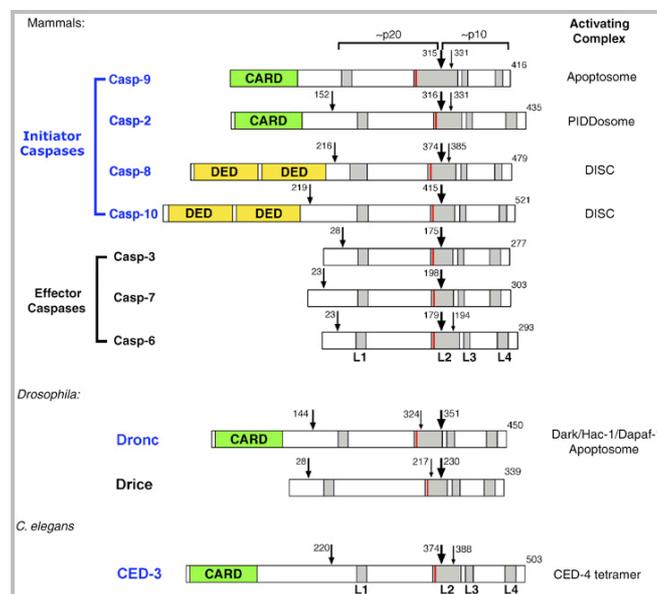


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Struktur der Apoptosecaspasen bei Säugetieren, Drosophila und C.elegans

Die Apoptosecaspasen der Säugetiere werden in Initiator- (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt und bestehen aus einer großen (p20) und einer kleinen Untereinheit (p10). Die Position der ersten Spaltstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit ist mit einem dicken Pfeil, weitere Schnittstellen mit dünnen Pfeilen gekennzeichnet. Die Prodomäne der Initiatorcaspasen am N-terminalen Ende enthält die spezifischen Proteindomänen CARD (*caspase recruitment domain*) oder DED (*death effector domain*), mit denen sie sich in einen Multimerkomplex (Apoptosom, DISC) einlagern können. Eingezeichnet sind die Oberflächenloops (L1-4) sowie rot markiert die katalytisch aktiven Cysteinreste. Die Caspasen von Drosophila (Dronc) und C.elegans (CED-3) gelten als Homologe der Caspase-9 [Bao & Shi 2007].

1.2.3 Apoptoseregulation

1.2.3.1 Das Caspase-8-Homologon cFLIP

FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) ist ein inhibitorisch wirksames Caspase-8-Homologon. Es wurde erstmals in Viren (vFLIP) nachgewiesen [Thome et al. 1997]. Von der zellulären Form cFLIP existieren verschiedene Splicevarianten. Es konnten bisher zwei Proteine nachgewiesen werden [Irmeler et al. 1997], das 55kDa schwere cFLIP_L und das 24 kDa schwere cFLIP_S. Beiden Proteinen gemein ist die DED (*death-effector domain*), über die sie anstelle von Caspase-8 an FADD binden und somit die Apoptose hemmen [Krueger et al. 2001]. Das Verhältnis von cFLIP_L zu Caspase-8 entscheidet darüber, ob eine Apoptosehemmung stattfindet oder nicht [Scaffidi et al. 1999]. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass cFLIP_L in Abhängigkeit von seinem Expressionsniveau auch proapoptotisch wirken kann [Micheau et al. 2002]. Für cFLIP_S ist bisher nur seine antiapoptotische Wirkung beschrieben worden.

1.2.3.2 IAPs: Hemmung der Caspase-3, -7 und -9 durch direkte Interaktion

Eine weitere Gruppe von Apoptoseinhibitoren sind die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Sie wurden erstmals im Genom von Baculoviren identifiziert [Crook et al. 1993]. Mittlerweile sind auch mehrere humane Vertreter bekannt [Salvesen & Duckett 2002]. Allen IAPs gemein ist die sogenannte BIR-Domäne (*baculovirus IAP repeat domain*), von der jedes IAP mindestens eine der drei bekannten besitzt. Über sie wird die antiapoptotische Wirkung vermittelt, indem Caspasen gebunden und inaktiviert werden. Zudem besitzen die meisten IAPs noch eine RING-Domäne, die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität zeigt und den eigenen Abbau beziehungsweise den Abbau auserwählter Zielproteine ermöglicht [Yang & Li 2000]. Beispiele für beim Menschen vorkommende IAPs sind XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 [Abbildung 3]. Sie inhibieren direkt die Caspase-3, -7 und -9. Am Besten untersucht ist der Wirkungsmechanismus von XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Es bindet mit der BIR2-Domäne direkt an die Caspase-3 und -7, mit der BIR3-Domäne direkt an die kleine Untereinheit der Caspase-9 [Deveraux & Reed 1999]. Die antiapoptotische Wirkung der IAPs kann unter anderem durch die Proteine Smac/DIABLO aufgehoben werden [vgl. 1.2.2.2]. XAF1 (*XIAP-associated factor 1*) gilt als direkter Inhibitor von XIAP [Liston et al. 2001].

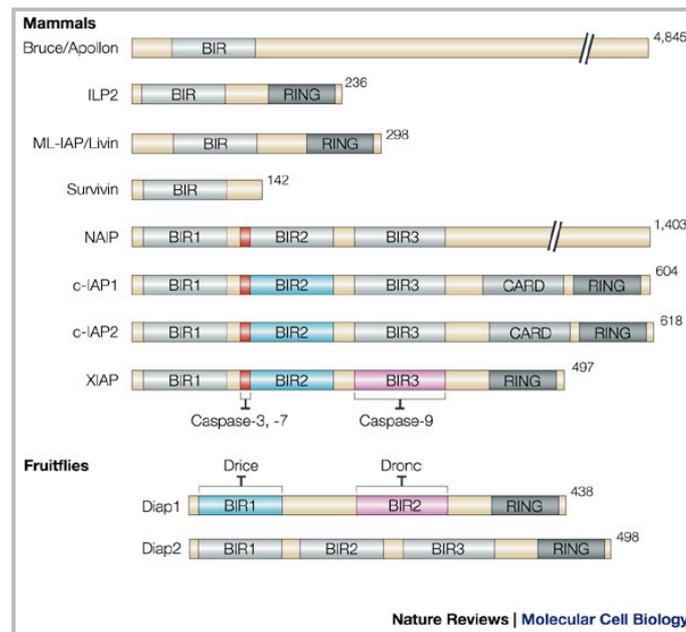


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Struktur der IAPs bei Säugetieren und Fruchtliegen

Zu den Proteinen der IAP-Familie gehören XIAP (*X-linked IAP*), c-IAP1 (*cellular IAP1*), c-IAP2 (*cellular IAP2*), ILP2 (*IAP-like protein-2*), ML-IAP/Livin (*melanoma IAP/Livin*), NAIP (*neuronal apoptosis-inhibitory protein*) und Survivin. Ein Peptid der BIR2-Domäne von XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 – hier in rot gekennzeichnet – ist für die Hemmung der humanen Caspase-3 und -7 verantwortlich. Auch in der BIR2-Domäne von NAIP existiert ein strukturell ähnliches Peptid, deshalb ebenfalls rot markiert. Nur XIAP kann über seine BIR3-Domäne die humane Caspase-9 hemmen. Bei Fruchtliegen erfolgt die Hemmung der Caspase-3- und -9-Homologen über die BIR1- und BIR2-Domänen von Diap1. BIR-Domänen mit bekannter Funktion sind farblich hervorgehoben [Riedl & Shi 2004].

1.2.3.3 Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie

Nach der Erstbeschreibung von Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) [Tsujimoto et al. 1985] konnte eine Reihe von Proteinen aufgrund strukturell ähnlicher Bereiche, den sogenannten BH-Domänen (*Bcl-2-homology domains*) und aufgrund von Wechselwirkungen mit Bcl-2 identifiziert und klassifiziert werden. Proteine der Bcl-2-Familie besitzen mindestens eine der vier bekannten BH-Domänen (BH1-BH4), über die Protein-Protein-Interaktionen stattfinden können [Reed 1997]. Es werden 2 Hauptgruppen unterschieden, proapoptotisch (z.B. Bax, Bak, Bid) und antiapoptotisch (z.B. Bcl-2) wirkende Bcl-2-Proteine [Abbildung 4]. Sie nehmen Einfluss auf den mitochondrialen intrinsischen Apoptosesignalweg, wobei das molare Verhältnis der beiden Gruppen über die Empfänglichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen entscheidet. Bei Übergewicht proapoptotischer Bcl-2-Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung selbiger und in der Folge zum Zusammenbruch des Membranpotentials mit anschließender Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie dem Cytochrom C [Kirkin et al. 2004]. Über diese kommt es zur Aktivierung der Caspase-Signalkaskade und letztendlich zum Untergang der Zelle [vgl. 1.2.2.3].

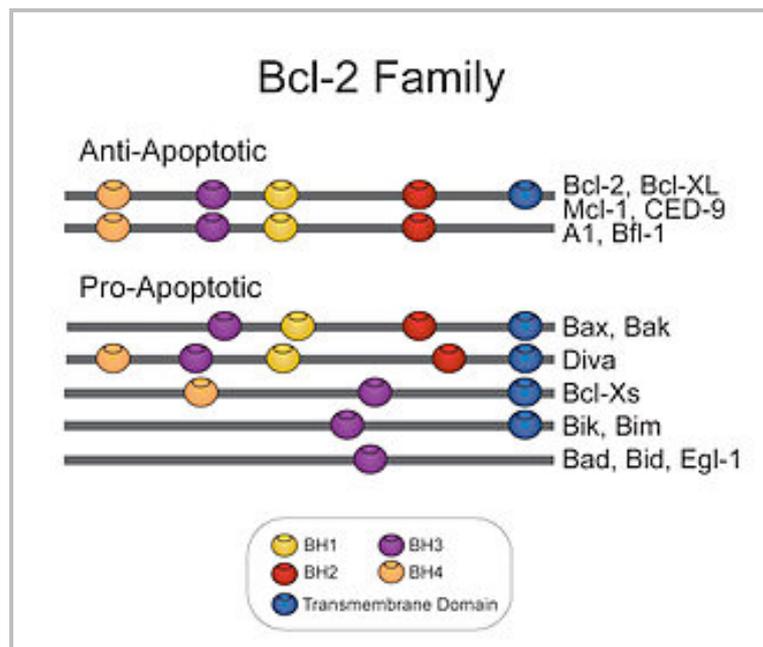


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Struktur pro- und antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie unterscheiden sich durch unterschiedliche Kombination von sogenannten BH-Domänen (BH1-BH4). Während die antiapoptotisch wirksamen Proteine alle 4 Domänen aufweisen, besitzen die proapoptotisch wirksamen Proteine höchstens 3 Domänen [Chao & Korsmeyer 1998].

1.2.4 Rolle der Apoptose in Tumorgenese und -therapie

Intensive Forschungen zur Tumorgenese haben gezeigt, dass neben einer fehlgesteuerten Zellproliferation und -differenzierung primär auch Störungen der Induktion und des Ablaufs der Apoptose in der Pathogenese maligner Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sind [Reed 1999a+b]. So prädispositioniert beispielsweise eine Überexpression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2-Onkogens infolge einer t(14;18) chromosomalen Translokation für die Entwicklung follikulärer B-Zell-Lymphome [Limpens et al. 1995]. Ferner liegt das Tumorsuppressorgen p53, welches in gesunden Zellen je nach Schwere der DNA-Schädigung Wachstumsstopp oder Apoptose induziert, in den meisten humanen Tumorzellen mutiert beziehungsweise deletiert vor [Ko & Prives 1996].

Das steigende Verständnis der Mechanismen und der Bedeutung der Apoptose macht sie zu einem wirksamen Ziel der Tumorthherapie. So induzieren viele Zytostatika über DNA-Schädigung die Apoptose maligner Zellen. Beispiele für Apoptose-modifizierende Therapeutika sind BH3-only-protein-Mimetics [Cory & Adams 2002], TRAIL(Apo2L)-Liganden [Huang & Sheikh 2007] oder Substanzen, die Einfluss auf die Mitochondrien nehmen [Green & Kroemer 2004]. Gegenstand vieler moderner Studien ist die Identifizierung

von Genen, die Einfluss auf die Apoptose von Krebszellen nehmen und somit potentiell Ziel einer gerichteten Tumorthherapie darstellen.

1.3 Das humane Gen *icb-1*

1.3.1 Allgemeines zu *icb-1*

Die Arbeitsgruppe um Oliver Treeck legt den Fokus ihrer Forschungsarbeiten seit Jahren unter anderem auf die Identifizierung von Genen, die aufgrund spezieller Eigenschaften als Angriffspunkt für eine gerichtete Tumorthherapie dienen könnten. Zudem sollen neue prädiktive Parameter ermittelt werden, um die Therapie des Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinoms zu optimieren [Caritas-Krankenhaus St. Josef 2013a].

Im Rahmen dieses Forschungsschwerpunktes wurde 1998 das humane Gen *icb-1* entschlüsselt. Die Bezeichnung *icb-1* steht für "induced by contact to basement membrane" und rührt von der Erkenntnis her, dass *icb-1* bei in-vitro Differenzierungsprozessen von HEC-1B endometrialen Adenokarzinomzellen, ausgelöst durch deren Kontakt mit einer künstlichen Basalmembran, vermehrt exprimiert wurde [Treeck et al. 1998]. *Icb-1* befindet sich als Open Reading Frame 38 auf Chromosom 1 und trägt deshalb auch den Namen *CIORF38* [Caritas-Krankenhaus St. Josef 2013b].

Der signifikante ORF beinhaltet 7 potentielle Translations-Initiations-Codons. Die mRNA beziehungsweise die generierte cDNA von *icb-1* umfasst 2366 Basenpaare mit einem Startcodon an Position 129 und einem Stopcodon an Position 981. Es kodiert ein 31.7kDa schweres Protein, das aufgrund seiner Eigenschaften vermutlich im Zellkern lokalisiert ist [Treeck et al. 1998].

Im Jahr 2002 gelang es der Forschungsgruppe um Treeck zu zeigen, dass *icb-1* in weiteren endometrialen Adenokarzinomzelllinien sowie in vielen anderen onkologischen Zelllinien und humanen Geweben exprimiert wird [Treeck et al. 1998; Treeck et al. 2002]. Außerdem konnten neben dem primär identifizierten Transkript *icb-1a* noch 2 weitere Splicevarianten, *icb-1β* und *icb-1γ* sowie die Milz-spezifische Isoform *icb-1δ* identifiziert werden. Bei letzterem handelt es sich nicht um eine weitere Splicevariante, sondern vermutlich um das Transkript eines *icb-1*-verwandten Gens [Treeck et al. 2002].

Die Einordnung von *icb-1* in einen größeren funktionellen Gesamtzusammenhang erwies sich zunächst als schwierig, da weder zur Protein kodierenden Region noch zum Protein selbst Homologien existierten. Einzig die starke Ähnlichkeit (>95%) von 3' nicht-translatierter Region des cDNA-Klons von *icb-1* und 24 kurzen cDNA-Sequenzen, sogenannten ESTs,

vornehmlich aus Tumoren und fetalen Geweben, ließ eine Rolle von *icb-1* in Zellproliferation und -differenzierung vermuten [Trecek et al. 1998].

Erst 2009 konnten Johnson und Kollegen *icb-1* einer aus 5 Genen bestehenden Genfamilie zuordnen, deren gemeinsames Merkmal die globuläre Domäne CABIT ist. Zudem gelang ihnen die Identifizierung eines *icb-1* sehr ähnlichen Gens, *C6ORF190* oder *Themis* [Johnson et al. 2009].

5'		
GACCACGCGTATCGATGTCGACCCACAGGATTGTCACAGAGGGCAGGGTGGTACTGAGGACCAG	65	
CTCCTCATGCTTGGAGCTGTGGTGTACACCTCGGGATCCGCTCTGCCCGCTGTGTCTGGGCAT	130	
GGAGGGTCAGCAGGTTCATCCTGCACCTGCCCTATCCCAGAAGGGGCCCTTCTGGACATGGGAGC	195	M
E G Q Q V I L H L P L S Q K G P F W T W E		
CTAGTGCCCCCGAACTCTGCTCCAGGTCCTACAGGATCCAGCCCTGAAAGACCTCGTCTCACC	260	
P S A P R T L L Q V L Q D P A L K D L V L T		◆
TGCCCCACCTGCCCTGGCATTCCTGATCCTGCGGCCCCAGTATGAGATCCAAGCCATCATGCA	325	
C P T L P W H S L I L R P Q Y E I Q A I M H		
CATGCGCAGGACCATTGTCAAGATCCCTTCTACCTGGAGGTCGACGTGGAGGACGTCACCGCCT	390	
M R R T I V K I P S T L E V D V E D V T A		▲
CCTCCCGGCACGTCCACTTTATCAAACCGCTGCTGCTGAGCGAGGTCCTGGCCTGGGAAGGCCCT	455	
S S R H V H F I K P L L L S E V L A W E G P		◆
TTCCCCCTGTCCATGGAGATCCTGGAGGTCCTGAGGGCCGCCCATCTTCTCAGCCCGTGGGT	520	
F P L S M E I L E V P E G R P I F L S P W V		
GGGCTCCTTGCAAAAAGGCCAGAGGCTTTGCGTCTATGGCCTAGCCTCACCACCCTGGCGGGTCC	585	
G S L Q K G Q R L C V Y G L A S P P W R V		□
TGGCCTCAAGCAAGGGCCGCAAGGTGCCAGGCACCTCCTGGTGTGAGGGGGTACCAAGGCAAG	650	
L A S S K G R K V P R H F L V S G G Y Q G K		◆
CTGGCGGGCGGCCAAGGGAGTTCCCCACGGCCTATGACCTCCTAGGTGCTTCCAGCCAGGCCG	715	
L R R R P R E F P T A Y D L L G A F Q P G R		○
GCCACTCCGGGTGGTGGCCACAAGGACTGTGAGGGCGAGAGGGAGGAGAATCCCGAGTTCACGT	780	
P L R V V A T K D C E G E R E E N P E F T		
CCCTGGCTGTGGGTGACCGGCTGGAGGTGCTGGGGCCTGGCCAGGCCCATGGGGCCAGGGCAGT	845	
S L A V G D R L E V L G P G Q A H G A Q G S		□
GACGTGGATGTCTTGGTTTGTGACGGCTGAGTGACCAGGCTGGGGAAGATGAGGAGGAAGAGTG	910	
D V D V L V C Q R L S D Q A G E D E E E E C		▲
CAAAGAGGAGGCAGAGACCCAGAGCGGGTCTGCTGCCCTTCCACTTCCCTGGCAGTTTCGTGGA	975	
K E E A E T Q S G S C C P S T S L A V S W		◆
GGAGATGAGTGACAGCCGGCGTACAGCCTGGCAGATCTGACTGCCAGTTTTCATGCCTTGTG	1040	
R R *		
AGGTCAAGGTGGTGGCCAAGGACACCAGCCACCCCAATGACCCTCAGAACCCTCCTTCTGGGCCCT	1105	
GCGGCTGGAGGAGAAGATCACAGAGCCATTCTTGGTGGTGGAGCCTGGACTCTGAGCTGGGATGTG	1170	
CFTTGGATCCCTCCCGGAGGCTGGACCTGACTGTCGTGGAGGCCAAGGGGCAGCCAGACTTGC	1235	
CAGAGGGTCTTCCCATAGCCACAGTGGAGGAAGCTGGAACAGACACCTTTTATTATTGTCTT	1300	
CGGAAGTTACCAGCCTGTGAGATCCAAGCCCCCACCAGGCCCTAAAAATCAGGGCCTCAG	1365	
CAAGCAGAGGAGACACAGCAGTGGAGGGGCGTCAAGTCTTCTCAAGTCTTAGGATTGCAGCAAC	1430	
ACGTTCCGGCTGCCAAAACCCAAAGCCGAGACCTTCCAGAGTTCATCAAGGATGGCTCCAGTACG	1495	
TACAGCAAGATTCTGCCACAGGAAGGGCCACAGGCCCGCTAAGCCCCAAAGGCAGGATCTAGA	1560	
TGATGATGAACATGATTATGAAGAAATACTTGAGCAATTCAGAAAACCATTAAGTCTGGAGG	1625	
AACCACGCTTCCCTAAGTCTGCTTCTCAGGGAATCCGACACCAGCCAACCATTTAAGCCTCTAA	1690	
AAGACCTCGGGCAAGTCTCACAGAAAATGAGCTGCAGACGGGGAGTAGCTTTGTGGAACTGATT	1755	
TGATGGACACTGCACCAGCTTCCCTCAGGTTCTAGATTCCTTGTACTTAGGGCGGGCTGGTTGG	1820	
ACCTAACATCTCGCAGCTGACTCCCTCAGCCTCAGAGCCTGGGATGCAGAGCAGCTGGCAGGGT	1885	
TCCTCTCAATCTGCAACCCAGCTGTCCACCGGTGGATGCAGAGGGGAATCCGAGGCCATCAA	1950	
CCTTGGTGACAGCAGCGCAGTGCCTAATGCTGATCACACTGCATGGGAGATTTGTAAACGCTGC	2015	
CACCCCACTCTCACCCCAAGCTTAAGCCCCGGGAGGCCCTGGACTGCTTCCCTCATCTCTGT	2080	
AGCACCAGCCTGATAGATCTGTATATGGTAACAGGGGTTAACCACATGTGGTTAACATGGAT	2145	
TAATGTGGGAATTTGGCTTCAAGAACAACCTTAGGACCTTGGGCCCAAAAGCTGGTGGTGAA	2210	
ATGAGAGGAGCCAAATTTAAGAAGACCCTTATGGAGACCTGAGGCTGCAGAACTGGTAGGTTTCA	2275	
TCAGGTGGTTAAAGTCTCAAAGTTGTAAGTGACTAACCAAGATTATTTCAATTTAAACCACAG	2340	
AAATAAATGACACCTGAGCTTCTCC poly A 3'		

Abbildung 5 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des humanen Gens *icb-1*

Raute: Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C, Dreieck: Phosphorylierungsstelle für die Caseinkinase II, Quadrat: N-Myristoylierungsstelle, Kreis: Amidierungsstelle, Kasten: Zwei 4-gliedrige Nuclear-Targeting-Patterns, Fett: Polyadenylierungssignal [Trecek et al. 1998].

1.3.2 Erkenntnisse über Rolle und Funktion von *icb-1*

Die initiale Erkenntnis, dass *icb-1* bei in-vitro Differenzierungsprozessen von endometrialen Adenokarzinomzellen vermehrt exprimiert wurde, postulierte die Rolle von *icb-1* als neuen Differenzierungsmarker [Treeck et al. 1998]. Um die Frage zu klären, ob sich diese Hypothese auch in anders als durch eine künstliche Basalmembran stimulierten in-vitro Differenzierungsprozessen stützen lässt, wurde im Jahr 2002 die Expression von *icb-1* in HL-60 Leukämiezellen untersucht. Sowohl in durch 1,25-Dihydroxyvitamin D3 monozytär als auch durch ATRA oder DMSO granulozytär in-vitro differenzierten HL-60 Zellen zeigte sich ein signifikant erhöhtes mRNA-Level von *icb-1 α* und *icb-1 β* [Treeck et al. 2002]. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss von *icb-1* seinerseits auf Differenzierungsvorgänge maligner Zellen untersucht. So bewirkte der Knockdown von *icb-1* eine signifikante Reduktion der Expression von Differenzierungs-assoziierten Genen bei Mamma- und Endometriumkarzinomzellen [Haselberger et al. 2011]. Somit scheint *icb-1* als Differenzierungsmarker und Mediator in in-vitro Differenzierungsprozesse von gynäkologischen Tumorzellen involviert zu sein.

Im Jahr 2005 konnte zudem gezeigt werden, dass *icb-1* in Wechselwirkung mit dem Zytokin Interferon- γ steht. So induzierte die Behandlung von verschiedenen Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien mit Interferon- γ eine signifikante Steigerung der Transkripte von *icb-1 α* und *icb-1 β* . Der Knockdown von *icb-1 α* und *icb-1 β* durch RNA-Interferenz wiederum verstärkte die antiproliferative Wirkung von Interferon- γ auf SK-OV-3-Ovarialkarzinomzellen. *Icb-1* gehört also zu den Interferon- γ -responding Genen, gleichzeitig kommt *icb-1* selbst eine Rolle in der zellulären Antwort auf Interferon- γ bei gynäkologischen Tumorzellen zu [Treeck et al. 2005].

Weiterhin spielt *icb-1* eine Rolle im Östrogensystem. So wurde im Jahr 2008 ein verändertes Estrogen-Responsive-Element (ERE) in seiner Promotorregion nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 17- β -Östradiol – in Abhängigkeit von ER α – zu einem signifikanten Anstieg des *icb-1* mRNA-Levels in Mammakarzinomzellen führt [Bollmann et al. 2008]. In weiteren Untersuchungen verstärkte wiederum der Knockdown von *icb-1* die Wirkung von 17- β -Östradiol auf Genexpression und Proliferation und überführte sogar hormonunabhängige Ovarialkarzinomzellen in einen östrogenabhängigen Zustand [Konwisorz et al. 2010]. *Icb-1* ist also selbst östrogensensitiv und beeinflusst seinerseits die Östrogensensitivität von gynäkologischen Tumorzellen.

Ferner fanden Treeck und Kollegen im Jahr 2012 heraus, dass der *icb-1*-Knockdown bei Mammakarzinomzellen mit einer Steigerung der Expression von Genen, die mit schlechter

Prognose, Infiltration und Metastasierung in Verbindung stehen, einhergeht [Treeck et al. 2012]. In neueren Untersuchungen aus dem Jahr 2013 ergab sich zudem, dass *icb-1* inhibitorisch auf Wachstum und Progression von Ovarialkarzinomzellen wirkt [Treeck et al. 2013], Diese Erkenntnisse postulieren eine Rolle von *icb-1* als Prognosemarker für das Mamma- und Ovarialkarzinom.

1.4 Verwendete Krebszelllinien

1.4.1 Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit metastasiertem Adenokarzinom der Mamma isoliert und 1973 von Herbert Soule und seinem Team erstmals vorgestellt. Die Zellen dieser Linie zeigen noch typische Eigenschaften differenzierter Mammaepithelzellen wie Östradiolsensitivität über zytoplasmatische Östrogenrezeptoren – insbesondere ER α – und haufenförmiges Wachstum [Soule et al. 1973; Brandes & Hermonat 1983]. Sie tragen neben den Östrogen- auch Progesteronrezeptoren [Brandes & Hermonat 1983]. MCF-7-Zellen exprimieren das WNT7B-Onkogen [Huguet et al. 1994] und können in ihrem Wachstum durch TNF α gehemmt werden [Sugarman et al. 1985]. Die Sekretion der IGFBP's (*Insulin-like growth factor binding proteins*) BP-2, BP-4 und BP-5 kann durch die Behandlung mit Antiöstrogenen beeinflusst werden [Pratt & Pollak 1993].

1.4.2 Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3

Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 wurde im Jahr 1973 aus dem Aszites einer 64-jährigen kaukasischen Frau mit einem Adenokarzinom des Ovars isoliert [Fogh 1975; Fogh et al. 1977]. SK-OV-3-Zellen gelten als wachstumsresistent gegenüber Östrogenen und Antiöstrogenen. Sie besitzen zwar einen Östrogenrezeptor, dieser ist aber funktionsunfähig [Hua et al. 1995; Lau et al. 1999]. Trotzdem konnte eine wachstumshemmende Wirkung von Tamoxifen gezeigt werden [Treeck et al. 2006]. SK-OV-3-Zellen sind Progesteronrezeptor-negativ und überexprimieren HER2/neu-Genprodukte [Jones et al. 1994; Hua et al. 1995]. Weiterhin sind SK-OV-3-Zellen resistent gegen TNF und zytotoxische Substanzen wie das Diphtherietoxin, Cisplatin und Adriamycin [Morimoto et al. 1991a+b].

1.4.3 Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B

Als Abkömmling der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A wurde HEC-1B 1968 von H. Kuramoto aus dem Adenokarzinom des Uterus einer 71-jährigen kaukasischen Frau isoliert [Kuramoto 1972; Kuramoto et al. 1972]. Es existieren widersprüchliche Untersuchungen zum Östrogenrezeptorstatus der HEC-1B-Zellen [Gong et al. 1994; Acconcia et al. 2006; Zhang et al. 2006]. Dass Östrogene und der SERM Tamoxifen proliferationsfördernd wirken, gilt dagegen als gesichert [Zhang et al. 2006].

1.5 Verwendete Apoptoseinduktoren

1.5.1 Staurosporin

Staurosporin (STS oder antibiotic AM-2282) wurde erstmals 1977 aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert [Omura et al. 1977]. Es handelt sich hierbei um einen ATP-kompetitiven Proteinkinaseinhibitor, der zwar spezifisch aber unselektiv bindet [Fabian et al. 2005; Karaman et al. 2008]. Staurosporin entfaltet seine Apoptose-induzierende Wirkung zum einen über die rasche Aktivierung des klassischen mitochondrialen Cytochrom C/Apaf-1-Wegs, zum anderen über die Aktivierung eines neuen, intrinsischen Wegs, der unabhängig von Apaf-1 und unbeeinflusst von Bcl-2 abläuft [Manns et al. 2011]. Letztere Wirkung hebt Staurosporin von konventionellen Chemotherapeutika ab und ermöglicht die Auslösung der Apoptose auch in multidrug-resistenten Tumoren [Stepczynska et al. 2001]. Bei beiden Wegen – konventionell und neu – scheint die Caspase-9-Aktivierung eine zentrale Rolle zu spielen. Daran beteiligte Kinasen konnten aber bisher noch nicht identifiziert werden [Manns et al. 2011].

1.5.2 Actinomycin D

Actinomycin D (Syn.: Dactinomycin) wurde erstmals 1940 von Selman Waksman und H.B. Woodruff aus dem Bakterienstamm *Streptomyces parvulus* isoliert [Waksman & Woodruff 1940]. Es handelt sich hierbei um ein cyclisches Dipeptid-Antibiotikum mit zytostatischer Wirkung. Es entfaltet diese durch Interkalation der DNA und daraus resultierend – in Abhängigkeit von der Dosis – Hemmung der RNA- und DNA-Polymerase und damit der Proteinsynthese und DNA-Replikation [Kirk 1960; Goldberg & Rabinowitz 1962; Goldberg et al. 1962; Reich 1964]. Es wird seit vielen Jahren als Chemotherapeutikum

bei verschiedenen Tumorerkrankungen wie dem Ewingsarkom [Bernstein et al. 2006], der malignen hydatiformen Mole [Uberti et al. 2009] oder dem Wilms-Tumor des Kindes [Green 2013] eingesetzt. In höheren Dosen wirkt Actinomycin D bei verschiedenen malignen Zellen Apoptose-induzierend, indem es Caspasen aktiviert, das mitochondriale Membranpotential senkt, die proapoptotisch wirkenden Proteine AIF, p53 und Bax hoch-, das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2 herunterreguliert und Sauerstoffradikale freisetzt [Bock et al. 2002; Fraschini et al. 2005; Wang et al. 2007a; Jin et al. 2012].

1.5.3 Camptothecin

Camptothecin ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid aus dem chinesischen Baum *Camptotheca acuminata*. Es wurde 1966 von M. E. Wall and M. C. Wani im Rahmen eines Screenings auf natürliche Zytostatika entdeckt [Wall et al. 1966]. Es hemmt die Topoisomerase I über Bindung an den Topoisomerase-/DNA-Komplex. In der Folge entstehen in der S-Phase des Zellzyklus Einzel- beziehungsweise Doppelstrangbrüche, die letztendlich Apoptose induzieren [Hertzberg et al. 1989]. Camptothecin selbst ist aufgrund seines breiten Nebenwirkungsspektrums und seiner geringen Löslichkeit nicht von klinischer Bedeutung, seine Derivate Topotecan und Irinotecan hingegen finden in der Tumorthherapie Anwendung [Earle et al. 2004; Zhang et al. 2012].

1.5.4 Cycloheximid

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches von dem Bakterium *Streptomyces griseus* synthetisiert wird [K'ominek 1975]. Es bewirkt eine Translationsinhibition in Eukaryoten [Obrig et al. 1971], was wiederum zu Inhibition der Proteinsynthese an den Ribosomen und in der Folge zu Wachstumshemmung und Zelltod führt. Während es aufgrund starker Nebenwirkungen keine klinische Anwendung findet, so gilt es als häufig verwendete Substanz in der experimentellen Forschung. Es kommt unter anderem als Apoptoseinduktor zum Einsatz [Clemens et al. 1998; Fulda et al. 2000]. Die genauen Wirkungsmechanismen sind noch nicht geklärt, ROS, p53 und cFLIP scheinen aber in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen [Santiago et al. 2004; Jeon et al. 2005; Pajak et al. 2005; Ito et al. 2006; Jin et al. 2008; Fischer-Posovszky et al. 2011; Zhao et al. 2011].

1.5.5 Dexamethason

Dexamethason (9- α -fluoro-16- α -methyl-9 α -Prednisolon) ist ein synthetisches Glukokortikoid und wurde erstmals im Dezember 1957 im klinischen Kontext eingesetzt [Boland 1958]. Es wirkt antiinflammatorisch, immunsuppressiv sowie antiemetisch [Mutschler et al. 2012]. Heute findet es breite klinische Anwendung, zum Beispiel in der Behandlung von entzündlichen Geschehen wie der bakteriellen Meningitis [Brouwer et al. 2013], in der Behandlung von Ödemen [Kostaras et al. 2014], als Antiemetikum [Song et al. 2011] sowie in der Krebstherapie [Roussel et al. 2011]. In der in-vitro Forschung wird es unter anderem als Apoptoseinduktor verwendet, wobei es diese Wirkung in der G0/G1- und G2/M-Phase des Zellzyklus wahrscheinlich über Bindung und Aktivierung eines intrazellulären Glukokortikoidrezeptors entfaltet [Fearnhead et al. 1994].

1.5.6 Etoposid

Etoposid (Syn.: VP-16) – erstmals 1966 synthetisiert – ist ein Glycosid des Podophyllotoxins und wird aus der Wurzel des immergrünen amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*) gewonnen [Arnold & Whitehouse 1981]. Es wirkt zytostatisch, indem es die Topoisomerase II, welche für die gezielte Entwindung der DNA-Helix und die Wiedervereinigung der DNA-Einzelstränge nach der Replikation zuständig ist, hemmt. Dies führt zu DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen, woraus Fehler in der DNA-Synthese (S-Phase des Zellzyklus) resultieren. Diese bewirken Hemmung der Zytokinese und Apoptoseinduktion [van Maanen et al. 1988; Hande 1998; Pommier et al. 2010]. Etoposid findet klinische Anwendung als Chemotherapeutikum bei verschiedenen Tumoren wie dem Hoden- [Calabrò et al. 2012] oder dem kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) [Ganti et al. 2013].

1.5.7 Tamoxifen

Tamoxifen (ICI 46474) – erstmals 1967 entdeckt [Harper & Walpole 1967] – ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM) [Grese & Dodge 1998]. Wie alle Substanzen dieser Gruppe hat es die Eigenschaft, in Abhängigkeit vom betroffenen Gewebe agonistisch oder antagonistisch an Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) zu wirken [Grese & Dodge 1998]. Es verursacht durch kompetitive Blockade der dort gehäuft vorkommenden ER α -Rezeptoren Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion bei Östrogenrezeptor-positiven

Mammakarzinomzellen [Jordan 1974; Jordan & Koerner 1975; Jordan 1976; Jordan & Jaspan 1976]. Dieser klinische Nutzen von Tamoxifen wurde erstmals 1971 beschrieben [Cole et al. 1971]. Heute gehört Tamoxifen zur adjuvanten Standardtherapie bei prämenopausalen Frauen mit hormonrezeptorpositivem (ER- und/oder PR-positiv) Mammakarzinom [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies et al. 2011]. Es kann aber auch bei postmenopausalen Frauen – vor oder nach Therapie mit einem Aromataseinhibitor – erwogen werden [Mouridson et al. & BIG 1-98 Collaborative Group 2009; Cuzick et al. & ATAC/LATTE investigators 2010; van de Velde et al. 2011; Viale et al. & BIG 1-98 Collaborative and International Breast Cancer Study Groups 2011].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Gen *icb-1* wird in malignen Zellen verschiedener Entität exprimiert. In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei in-vitro Proliferations- und Differenzierungs- sowie Wachstums- und Progressionsprozessen von gynäkologischen Tumorzellen eine Rolle spielt. Diese Eigenschaften von *icb-1* könnten im Rahmen einer gezielten Tumorthherapie von Interesse sein. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob *icb-1* auch für die Apoptose gynäkologischer Tumorzellen von Bedeutung ist. Für die Versuchsreihen wurden Krebszelllinien verwendet, die 3 der häufigsten gynäkologischen Tumorentitäten repräsentieren: Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 sowie die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B. Den Experimenten vorausgehend wurden für jede der 3 Krebszelllinien mittels Transfektion eines entsprechenden shRNA-Plasmids Klone mit *icb-1*-Knockdown und damit weitgehend ausgeschalteter *icb-1*-Expression auf der einen und Kontrollklone, die *icb-1* normal exprimierten, auf der anderen Seite hergestellt. Die damit kreierte Zelllinien unterschieden sich somit nur in der Expression von *icb-1*, was die Untersuchung der Rolle des Gens im Kontext der Apoptose ermöglichte. Die Zellklone wurden mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Zytostatika stimuliert und die apoptotische Aktivität von Knockdown- und Kontrollklonen der 3 Krebszelllinien gemessen. Die Messungen erfolgten auf Zellebene direkt durch Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität und indirekt durch Detektion der Anzahl vitaler Zellklone nach Stimulation. Auf mRNA-Ebene wurde – nach Gewinnung der cDNA stimulierter MCF-7-Klone – die Expression Apoptose-assoziiierter Gene mittels Real-Time qPCR aufgezeichnet. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation sollen zeigen, ob *icb-1* neben seiner Rolle in Proliferation, Differenzierung, Wachstum und Progression auch

eine Bedeutung für die Apoptose von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen hat, was einen weiteren Schritt im Kontext der Rolle von *icb-1* als Tumorsuppressorgen und Chemosensitizer im Rahmen einer gerichteten Tumorthherapie darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Krebszelllinien

MCF-7	ATCC® (Manassas, VA, USA)
SK-OV-3	ATCC® (Manassas, VA, USA)
HEC-1B	ATCC® (Manassas, VA, USA)

2.1.2 Chemische Komponenten

2.1.2.1 Zellkultur

Kulturmedien und Supplemente

DMEM/F12

(Dulbecco's Modifiziertes Eagle's
Medium/Nutrient F-12 Ham)

D2906 Ohne Phenolrot und

Natriumbicarbonat

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Mycoplex™ FBS

(Fetal Bovine Serum)

PAA (Pasching, Österreich)

Serum Replacement 2 (50x)

(kurz SR2)

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Insulin

(Insulin solution from bovine pancreas)

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Natriumpyruvat

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

G-418 Sulfate Solution

PAA (Pasching, Österreich)

Reagenzien zur Zellernte

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

(kurz PBS)

PAA (Pasching, Österreich)

Accutase™

PAA (Pasching, Österreich)

Lösungsmittel

Dimethylsulfoxid

(kurz DMSO)

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Ethanol (95%ig)

(kurz ETOH)

J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, USA)

Assays

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay

(kurz CTB-Assay)

Promega (Madison, WI, USA)

Caspase-Glo™ 3/7 Assay

Promega (Madison, WI, USA)

Destilliertes Wasser

2.1.2.2 Molekulargenetische Verfahren

2.1.2.2.1 Transfektion

Plasmide

SureSilencing™ shRNA Plasmid for

Human C1orf38 (= *icb-1*)

SABiosciences, QIAGEN (Frederick, MD, USA)

Silencer™ Negative Control #1/#2

siRNA (Kontrollplasmid)

Ambion® (Austin, TX, USA)

Transfektionsreagenzien

TransFectin™ Lipid Reagent

BioRad (Hercules, CA, USA)

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium Invitrogen™, Life Technologies™
(Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2.2.2 Real-Time qPCR

RNA-Isolierung

SV Total RNA Isolation System Promega (Madison, WI, USA)

cDNA-Synthese

M-MLV Reverse Transcriptase,
RNase H Minus, Point Mutant Promega (Madison, WI, USA)

dNTP Set, molecular biology grade
(mit je 0,25ml 100mM dATP,
dCTP, dGTP, dTTP) Fermentas, Thermo Scientific
(Schwerte, Deutschland)

Random Primers 3µg/µl Invitrogen™, Life Technologies™
(Carlsbad, CA, USA)

RNasin® Plus RNase Inhibitor Promega (Madison, WI, USA)

RNase-freies Wasser QIAGEN (Hilden, Deutschland)

Master-Mix

QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit QIAGEN (Hilden, Deutschland)

PCR-Primer Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland)

2.1.3 Hilfsmittel und Geräte

Pipetten und Pipettenspitzen

Messpipetten

(5ml, 10ml, 25ml)

Armin Baack (Schwerin, Deutschland)

Aspirationspipette

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Pipettierhilfe accu-jet® pro

Brand® (Wertheim, Deutschland)

Manuelle Mikropipetten

(10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)

Eppendorf Reference®, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Biosphere® Quality und Filter Tips

(10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Kapillaren

LightCycler® Capillaries (20µl)

Roche (Indianapolis, IN, USA)

Reaktionsgefäße

Zellkulturflaschen T75

Armin Baack (Schwerin, Deutschland)

PP-Schraubverschlussröhrchen

(15ml, 50ml)

Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Eppendorf Cups (1,6ml)

Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Softstripes mit Deckel (0,2ml)

Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Zellkulturplatten steril (6-Well, 96-Well)

Armin Baack (Schwerin, Deutschland)

Zellkulturtestplatten weiß (96-Well)

Corning (Corning, NY, USA)

Geräte

Zellkultur-Brutschrank

HERACell 150 CO₂ Inkubator Heraeus (Hanau, Deutschland)

Sterile Werkbank

HERAsafe® Type KS12 Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Mixer MS2 Minishaker

IKA® (Staufen, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge® fresco

Heraeus (Hanau, Deutschland)

Victor3™ Multilabel Counter

PerkinElmer® (Waltham, MA, USA)

UV-Photometer GeneRay

Biometra (Göttingen, Deutschland)

LightCycler 2.0 PCR Device

Roche-Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Standardbedingungen

Die 3 Krebszelllinien wuchsen in einem Standardkulturmedium DMEM/F12 mit 10% FBS in 75T-Zellkulturflaschen. Im Falle der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 wurde das Kulturmedium noch um 1000µg/ml G418 ergänzt, bei den Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und HEC-1B (Endometriumkarzinom) kamen noch 500µg/ml G418, 0,01mg/ml Insulin und 1mM-Natriumpyruvat hinzu. Alle 3 Krebszelllinien wurden im Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C in feuchtem Milieu kultiviert.

2.2.1.2 Mediumwechsel

Um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellklone zu gewährleisten, wurde 2-3 mal pro Woche das Kulturmedium gewechselt. Hierzu wurde es abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und wieder frisches, erwärmtes Kulturmedium hinzugegeben.

2.2.1.3 “Herunterhungern“ der Zellen im 6-Well

Die Stimulationsversuche wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, um den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Östrogen zu eliminieren. Hierzu wurden die Zellklone schrittweise von dem 10%FBS- in ein 1fachSR2-Kulturmedium überführt.

Ein Tag vor der Aussaat wurden die Zellklone morgens – wie im Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben – mithilfe des Enzyms Accutase geerntet und 10ml Zellsuspension gewonnen. Je 2ml der Zellsuspension wurden in 2 Wells einer 6-Well Platte gegeben. Anschließend wurden 2ml FBS-freies Kulturmedium hinzugegeben, so dass die Zellklone in 5%FBS-Kulturmedium vorlagen. Am Abend wurde das 5%FBS-Kulturmedium durch ein 1%FBS 0,5fachSR2-Kulturmedium ersetzt und die Zellklone im Inkubator über Nacht bebrütet. Am darauffolgenden Morgen waren die Zellklone ausreichend an die veränderten Bedingungen adaptiert, so dass die Versuchsreihen im Folgenden mit 1fachSR2-Kulturmedium durchgeführt werden konnten.

Von den übrig gebliebenen 6ml Zellsuspension wurden 4ml in eine Kulturflasche überführt, mit 6ml 10%FBS-Kulturmedium ergänzt und für weitere Versuche im Inkubator bereitgestellt. 2ml wurden als Zellvorrat mit 8ml 10%FBS-Kulturmedium in eine Kulturflasche gegeben und inkubiert.

2.2.1.4 Zellernte

Um die Zellklone für die Versuchsreihen nutzbar zu machen, wurden sie unter sterilen Bedingungen in mehreren Einzelschritten von ihrem Untergrund gelöst und in eine 50ml-Schraubverschlussflasche überführt.

Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellklone anschließend mit 5-10ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Zellrasen mit dem Enzym Accutase (0,5

ml/Well) vollständig bedeckt und die Zellklone so lange inkubiert bis sie sich vollständig von ihrem Untergrund gelöst hatten. Durch die Zugabe von 5ml 1fachSR2-Kulturmedium pro Well wurde die Accutasewirkung gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 50ml-Schraubverschlussflasche überführt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 770 Umdrehungen/min flüssige und zelluläre Anteile voneinander getrennt. Im letzten Schritt wurde der Überstand unter Schonung des Zellpellets abgesaugt, 10ml frisches Kulturmedium hinzugegeben und die Zellsuspension durch Vortexen gut durchmischt.

2.2.1.5 Aussaat

Um die Ergebnisse verschiedener Zellpopulationen vergleichbar zu machen, wurden die Zellklone in vorher definierten Mengen ausgesät.

Hierfür wurde die Zellzahl der jeweiligen Zellsuspension in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die zur Einstellung der richtigen Zellzahl benötigte Menge Zellsuspension pro definierte Menge Kulturmedium mithilfe der bekannten Zellzahlen und Volumina berechnet, so dass die Zellsuspensionen mit der richtigen Zellkonzentration hergestellt werden konnten.

Für die Proliferationsversuche (CTB™-Assays) wurden 2500 Zellklone/Well für MCF-7, 1200 Zellklone/Well für SK-OV-3 und 1500 Zellklone/Well für HEC-1B eingesetzt. Für die Apoptoseversuche (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) lag die Zellzahl für alle 3 Krebszelllinien bei 5000 Zellklonen/Well. Für die Versuche mit unstimulierten Zellklonen wurde die jeweilige Zellzahl in 100µl, für die Stimulationsversuche in 70µl Kulturmedium ausgesät. Es wurden 96-Well Platten verwendet, 4 (Tag 0, 1, 2, 3) für die CTB™-Assays, 2 (0h, 4h) für die Caspase-Glo™ 3/7-Assays. Anschließend wurden die Zellklone im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.6 Stimulation

Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Zellklone mit den folgenden Apoptoseinduktoren stimuliert: Staurosporin 1mM und 0,1mM, Actinomycin 10mM, Camptothecin 2mM, Cycloheximid 100mM, Dexamethason 10mM, Etoposid 100mM (als Stocklösung). Es wurden 30µl Stimulationslösung pro Well benötigt, wobei die Stimulanzien 1:1000, teilweise auch 1:10000 und 1:100000 verdünnt verwendet wurden.

Für die Herstellung der korrekt konzentrierten Stimulationslösung wurde zunächst der Volumenbedarf V mithilfe der Anzahl zu bedienender Wells W mit der Formel $V = 30\mu\text{l} \times W$ berechnet. Die benötigte Menge Stimulans pro Volumen, um eine 1:1000-Verdünnung zu erreichen, ergab sich aus der Rechnung $V/1000 \times 3,333$ – hier wurde die 1:3-Verdünnung durch die spätere Zugabe von $30\mu\text{l}$ Stimulationslösung zu $70\mu\text{l}$ Zellsuspension berücksichtigt –, so dass im nächsten Schritt die 7 Stimulationslösungen aus DMSO und jeweiliger Stocklösung hergestellt werden konnten. Aus diesen wurden bedarfsweise über Verdünnungsreihen Stimulationslösungen mit Verdünnungen von 1:10000 und 1:100000 hergestellt. Im letzten Schritt wurden die Stimulationslösungen auf die Zellklone gegeben.

Weiterhin wurden die Zellklone mit dem ebenfalls Apoptose-induzierenden SERM Tamoxifen 1mM, 10mM und 25mM nach gleichem Schema 1:1000 verdünnt stimuliert. Als Lösungsmittel diente hier 95%iges ETOH.

2.2.1.7 Messungen

Caspase-Glo™ 3/7 Assay (Promega) zur Apoptosebestimmung

Die Anzahl der sich in Apoptose befindenden Zellklone wurde durch die indirekte Messung der Caspase-3/7-Aktivität bestimmt. Die Caspase-Glo™ 3/7-Reagenz enthält ein prolumineszierendes Substrat, welches durch Caspase-3/7- und Luciferaseaktivität in ein lumineszierendes Substrat umgewandelt wird. Die gemessene Lumineszenz ist folglich proportional zur Caspase-3/7-Aktivität.

Es wurden $30\mu\text{l}$ der Caspase-Glo™ 3/7-Reagenz in jedes Well gegeben und die Lumineszenz 1h später, nach Umpipetierung in eine weiße Messplatte, im Victor3™ Multilabel Counter (PerkinElmer®) erfasst. Es wurden Messungen nach 0h (unstimulierte Zellklone) und nach 4h (stimulierte Zellklone) durchgeführt.

Um das Proliferationsverhalten der verschiedenen Krebszelllinien zu berücksichtigen und die Werte vergleichbar zu machen wurde die Zellzahl mittels CTB™-Assay (wie oben beschrieben) bestimmt und die Apoptosewerte damit normalisiert.

CellTiter-Blue™ (CTB™-) Cell Viability Assay (Promega) zur Proliferationsbestimmung

Die Anzahl stoffwechselaktiver und damit vitaler Zellklone wurde indirekt durch die Detektion ihrer metabolischen Aktivität bestimmt. Der CTB™-Assay nutzt hierfür die Fluoreszenzänderung bei der Reduktion von Resazurin zu Resorufin.

2h nach Zugabe der CTB™-Reaganz (10µl/Well) wurden die Fluoreszenzmessungen im Victor3™ Multilabel Counter (PerkinElmer®) bei 579 Ex/590Em durchgeführt. Es wurden Messungen an Tag 0 (unstimulierte Zellklone) sowie nach 24, 48 und 72h (stimulierte Zellklone) durchgeführt.

2.2.1.8 Auswertung

Die generierten Werte wurden in Microsoft EXCEL 2009 mithilfe des studentischen t-Tests ausgewertet. Es wurden Mittelwerte aus mindestens 3 Wiederholungen verwendet. Als signifikant galt $p < 0.05$. Die Ergebnisse wurden in % der Lösungsmittelkontrolle LMK (=unstimulierte Zellklone) angegeben.

2.2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.2.1 Herstellung der Zellklone mittels Transfektion

Es wurden für jede der 3 Krebszelllinien Klone mit *icb-1*-Knockdown – das heißt, ohne relevante *icb-1*-Expression – sowie Kontrollklone mit normaler *icb-1*-Expression mittels RNA-Interferenz hergestellt. Die Transfektion mit *icb-1*-shRNA-Plasmid beziehungsweise unspezifischem Kontroll-shRNA-Plasmid wurde von einer MTA nach Herstellerangaben durchgeführt [Lee & Sinko 2006; Konwisorz et al. 2010].

2.2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden von einer MTA nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden stimulierte und unstimulierte MCF-7-Klone verwendet.

2.2.2.3 Real-Time qPCR im LightCycler

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation kurzer, genau definierter DNA-Fragmente. Start- und Endpunkt der abzulesenden DNA-Sequenz werden durch 2 spezifische Primer markiert. Es können große Anzahlen des DNA-Abschnitts generiert werden, da die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen und so eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet. Diese wird durch mehrere Faktoren (begrenzte Enzymmenge, Aktivitätsabnahme durch Denaturierung, Hybridisierung der DNA-Einzelstränge untereinander) entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik limitiert.

Die Messung der DNA-Zunahme erfolgt indirekt durch Detektion der Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich in die DNA-Doppelstränge schieben. Freier Farbstoff emittiert kein Licht. Auf diese Weise ist die Detektion der Amplifikation in Echtzeit (*“Real-Time“*) möglich.

Für die Real-Time qPCR wurde im ersten Schritt der Master-Mix hergestellt. Für eine Kapillare wurden 6µl Master-Mix benötigt, die sich aus 3,4µl Wasser, 0,6µl MgCl₂ (25mM), 1µl SYBR Green-Enzymmix und 1µl spezifischem Primer (alles gekühlt) zusammensetzten. Mit dem Faktor 34 multipliziert ergab sich die benötigte Menge Master-Mix für einen Lauf. Die Bestandteile des Master-Mix wurden in einen Eppendorf Cup pipettiert, die Mischung kurz gevortext und anschließend je 6µl in die 34 Glaskapillaren vorgelegt, die sich bereits in einem Kapillarkblock befanden. Im nächsten Schritt wurden 4µl der jeweiligen, fortwährend gekühlten cDNA (1:5 verdünnt) hinzugefügt und die Kapillaren mit einem Kapillarstopfen verschlossen. Nach der Überführung der Kapillaren in den Kapillarkblock des LightCycler 2.0 PCR Device (Roche-Diagnostics) wurde der Lauf gestartet.

Es erfolgte eine 15-minütige Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen, die wiederum jeweils 3 Einzelschritte umfassten: Denaturierung (10sec bei 95°C), Primer-Annealing (5sec bei 60°C) und Elongation (12sec bei 72°C). Im letzten Schritt wurde die Schmelzkurve generiert, indem die DNA nochmals kurz auf 95°C erhitzt und umgehend wieder auf 65°C abgekühlt wurde. Die Messung erfolgte während der Elongation zum Zeitpunkt des Vorliegens der Maximalmenge an DNA.

Es wurden stets Referenzläufe mit β -Actin durchgeführt, wobei β -Actin 2573 und β -Actin 2876 verwendet wurden.

2.2.2.4 Auswertung der Real-Time qPCR

Die Auswertung erfolgte mittels komparativer $\Delta\Delta C_T$ -Methode im Sinne einer relativen Quantifizierung [Livak & Schmittgen 2001]. Es wurde die Differenz aus den C_T -Werten der spezifischen Zielsequenz und denen der β -Actin-Läufe als Referenz gebildet. Die resultierenden ΔC_T -Werte von *icb-1*-downgeknockten und Kontrollklonen wurden anschließend verglichen. Es wurden Mittelwerte aus mindestens 4 Wiederholungsläufen verwendet. Als signifikant galt $p < 0.05$. Die Ergebnisse wurden in % der Lösungsmittelkontrolle LMK (=unstimulierte Zellklone) und der Kontrollklone angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Stabiler *icb-1*-Knockdown bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen

Um die Bedeutung von *icb-1* für die Apoptose von Klonen der 3 Krebszelllinien MCF-7, SK-OV-3 und HEC-1B valide untersuchen zu können, wurde ein *icb-1*-spezifisches shRNA-Plasmid (*small hairpin RNA*) transfiziert und das Gen mittels RNA-Interferenz downgeknockt. Für die Kontrollklone wurde ein unspezifisches siRNA-Plasmid verwendet. Nach 6-wöchiger Selektion mit G418 wurden 3 Klone jeder Zelllinie ausgewählt [Konwisorz et al. 2010].

Um sicherzustellen, dass der *icb-1*-Knockdown erfolgreich war, wurden die *icb-1*-mRNA-Level von *icb-1*-downgeknockten und Kontrollklonen mittels Real-Time qPCR bestimmt und anschließend verglichen.

Bei den *icb-1*-downgeknockten Klonen aller 3 Krebszelllinien konnte eine signifikante Reduktion der Expression von *icb-1* gegenüber den jeweiligen Kontrollklonen erzielt werden. So betrug das *icb-1*-mRNA-Level der Knockdownklone nur 11% der Kontrollklone bei MCF-7 ($p < 0.0001$), 22% bei SK-OV-3 ($p < 0.001$) und 24% bei HEC-1B ($p < 0.001$), wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klonen der einzelnen Krebszelllinien zeigten [Abbildung 6].

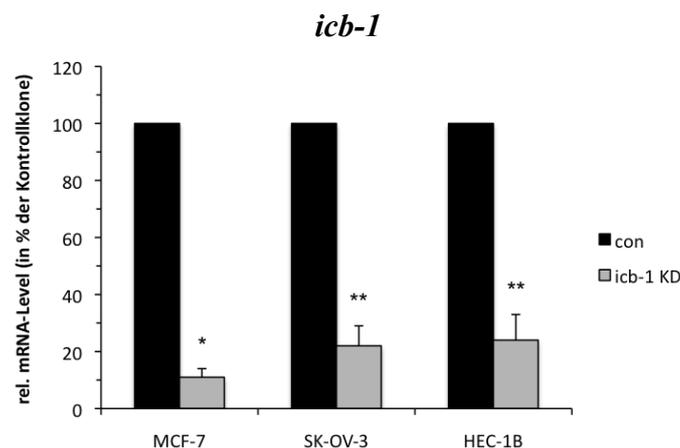


Abbildung 6 Graphische Darstellung des stabilen *icb-1*-Knockdowns bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen

Gezeigt wird die durchschnittliche *icb-1*-Expression der Knockdownklone (icb-1 KD) mit *icb-1*-spezifischer shRNA im Vergleich zu den Kontrollklonen (con) mit unspezifischer siRNA für die 3 Krebszelllinien MCF-7, SK-OV-3 und HEC-1B. Die *icb-1*-mRNA-Level wurden mittels Real-Time qPCR bestimmt. (n=4), * $p < 0.0001$ versus con, ** $p < 0.001$ versus con.

Der erfolgreiche *icb-1*-Knockdown rechtfertigte in der Folge die Durchführung der Versuchsreihen (Zellkultur und Real-Time qPCR) mit dem Ziel der Einordnung der Rolle von *icb-1* in der Apoptose stimulierter Krebszellklone. Die *icb-1*-downgeknockten Zellklone wurden MCF-7/*icb*KD, SK-OV-3/*icb*KD und HEC-1B/*icb*KD genannt, die jeweiligen Kontrollklone wurden mit MCF-7/con, SK-OV-3/con und HEC-1B/con bezeichnet.

3.2 Apoptose und Proliferation der MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klone nach Stimulation

3.2.1 Überblick

Es wurde die Bedeutung des *icb-1*-Gens für die Apoptose von Klonen der 3 Krebszelllinien MCF-7, SK-OV-3 und HEC-1B direkt mittels Caspase-Glo™ 3/7-Assays untersucht, indem die Aktivität der Effektorcaspase-3 und -7 nach Stimulation bestimmt wurde. Als weiteres, indirektes Untersuchungsverfahren wurden zudem Proliferationsversuche (CTB™-Assays) zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellklone nach Stimulation durchgeführt.

Vor den Messungen wurden die Zellklone mit den Apoptoseinduktoren Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason, Etoposid und Tamoxifen in verschiedenen Konzentrationen stimuliert [Tabelle 1].

Stimulans	Eingesetzte Konzentrationen
Staurosporin	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM
Actinomycin D	0,01µM, 0,1µM, 1µM, 10µM
Camptothecin	20nM, 200nM, 2000nM
Cycloheximid	1µM, 10µM, 100µM
Dexamethason	0,1µM, 1µM, 10µM
Etoposid	1µM, 10µM, 100µM
Tamoxifen	1µM, 10µM, 25µM

Tabelle 1 Eingesetzte Stimulanzkonzentrationen

Aufgeführt sind die in den Zellkulturexperimenten (Caspase-Glo™ 3/7-, CTB™-Assays) eingesetzten Konzentrationen der 7 Apoptoseinduktoren Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason, Etoposid und Tamoxifen.

Die Versuchsreihen wurden in serumfreiem Kulturmedium (1fachSR2) durchgeführt, an das die Zellklone im Voraus – wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben – schrittweise adaptiert wurden.

Für die Apoptoseversuche (Caspase-Glo™ 3/7 Assays) lag die ausgesäte Zellzahl bei 5000 Zellklonen/Well für alle 3 Krebszelllinien. Da sich die Zellen der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 relativ langsam vermehren, wurden für die Proliferationsversuche (CTB™-Assays) mit 2500 Zellklonen/Well initial mehr Zellklone ausgesät als bei den Krebszelllinien SK-OV-3 (1200 Zellklone/Well) und HEC-1B (1500 Zellklone/Well).

Zur Verlaufsdocumentation wurde bei den Caspase-Glo™ 3/7-Assays die Caspaseaktivität nach 0 und 4h bestimmt, bei den CTB™-Assays wurden Messungen 0, 24, 48 und 72h nach Stimulation durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen wurden mindestens 3 Wiederholungen pro Versuchsart und Zelllinie durchgeführt.

3.2.2 Apoptose und Proliferation der MCF-7-Klone nach Stimulation

Staurosporin

Bei den MCF-7-Klonen manifestierte sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) erst bei hohen Staurosporinkonzentrationen (100nM, 1000nM) nach 4h eine Apoptoseinduktion, was sich in einer signifikanten Steigerung der Caspase-7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) widerspiegelte ($p < 0.0001$). Eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der LMK nach 24, 48 und 72h ergab sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nur unter 1000nM-Staurosporin ($p < 0.01$). Bei niedrigeren Staurosporinkonzentrationen (1nM, 10nM, 100nM) vermehrten sich die stimulierten MCF-7-Klone in den CTB™-Assays sogar stärker als die unstimulierten MCF-7-Klone (LMK).

Unter 100- und 1000nM-Staurosporin ergaben sich in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays Unterschiede in der apoptotischen Aktivität zwischen *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/*icb*KD-Klone) und Kontrollklonen (MCF-7/*con*-Klone). So lag die durchschnittliche relative Caspase-7-Aktivität der MCF-7/*icb*KD-Klone 4h nach Stimulation unter derjenigen der MCF-7/*con*-Klone. Der Unterschied war allerdings nur unter 1000nM-Staurosporin mit 593% zu 703% der LMK signifikant ($p = 0.009$).

Weiterhin hatte der *icb-1*-Knockdown Einfluss auf das Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit 100- und 1000nM-Staurosporin. So lag die durchschnittliche relative Zellzahl der MCF-7/*icb*KD-Klone in den CTB™-Assays 24, 48 und 72h nach Stimulation signifikant über derjenigen der MCF-7/*con*-Klone. Am deutlichsten zeigte sich der positive Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die Proliferation unter 100nM-Staurosporin [Tabelle 2; Abbildung 7].

Messzeitpunkt	100nM-Staurosporin			1000nM-Staurosporin		
[h]	<i>icb-1</i> KD [in % der LMK]	<i>con</i> [in % der LMK]	p	<i>icb-1</i> KD [in % der LMK]	<i>con</i> [in % der LMK]	p
24	150	121	0.0005	110	79	0.0006
48	150	110	0.0003	78	52	0.03
72	141	92	0.0004	52	32	0.03

Tabelle 2 Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Staurosporin

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Zellzahlen der MCF-7/*icb*KD- (*icb-1* KD) und MCF-7/*con*-Klone (*con*) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 100- und 1000nM-Staurosporin. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

Actinomycin D

Bei den MCF-7-Klonen bewirkten erst höhere Actinomycin D-Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h eine Apoptoseinduktion im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) ($p < 0.01$). Eine signifikante Proliferationshemmung zeigte sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 48 und 72h bereits unter 0,1 μ M-Actinomycin D ($p < 0.001$).

Der *icb-1*-Knockdown übte unter 0,1-, 1- und 10 μ M-Actinomycin D Einfluss auf apoptotische Aktivität und Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone. So lag in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays 4h nach Stimulation mit 1- und 10 μ M-Actinomycin D die durchschnittliche relative Caspase-7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) unter derjenigen der Kontrollklone (MCF-7/*con*-Klone). Der Unterschied war allerdings nur unter 1 μ M-Actinomycin D mit 153% zu 190% der LMK signifikant ($p = 0.01$). Demgegenüber lag die Anzahl vitaler MCF-7/*icb*KD-Klone in den CTB™-Assays 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 0,1-, 1- und 10 μ M-Actinomycin D über derjenigen der MCF-7/*con*-Klone, wobei die Unterschiede unter 0,1- und 1 μ M-Actinomycin D zum Großteil signifikant waren.

Der *icb-1*-Knockdown bewirkte somit eine Steigerung der Proliferation gegenüber den MCF-7-/con-Klonen [Tabelle 3; Abbildung 7].

Messzeitpunkt	0,1µM-Actinomycin D			1µM-Actinomycin D		
[h]	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p
24	108	80	0.003	97	80	0.1
48	85	55	0.0001	88	64	0.01
72	67	44	0.0002	80	46	0.002

Tabelle 3 Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Actinomycin D

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Zellzahlen der MCF-7/*icb*KD- (*icb-1* KD) und MCF-7/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 0,1- und 1µM-Actinomycin D. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

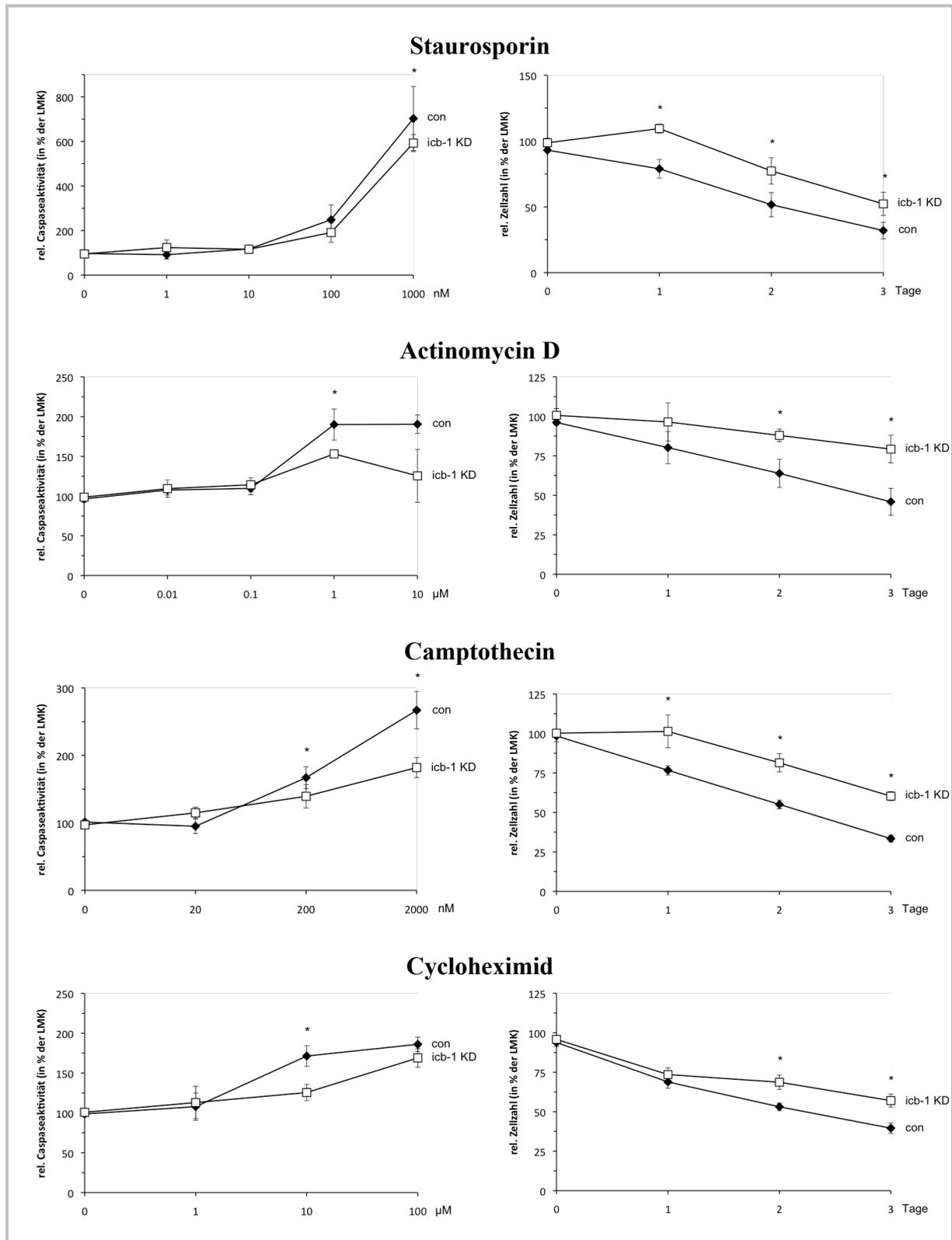


Abbildung 7 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Cycloheximid

Auf der linken Seite wird die durchschnittliche relative Aktivität der Caspase-7 4h nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Cycloheximid in den angegebenen Konzentrationen gezeigt. Auf der rechten Seite sieht man die durchschnittliche relative Anzahl vitaler MCF-7-Klone 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 1000nM-Staurosporin, 1µM-Actinomycin D, 2000nM-Camptothecin und 10µM-Cycloheximid. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Camptothecin

Es ergab sich bei den MCF-7-Klonen in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h unter höheren Camptothecinkonzentrationen (200nM, 2000nM) eine signifikante Steigerung der Caspase-7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) ($p < 0.01$), wobei sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24 und 48h bereits unter niedriger Camptothecinkonzentration (20nM) eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der LMK manifestierte ($p < 0.001$).

Es zeigten sich unter 200- und 2000nM-Camptothecin Unterschiede in der apoptotischen Aktivität von *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/*icb*KD-Klone) und Kontrollklonen (MCF-7/*con*-Klone), wobei der *icb-1*-Knockdown in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays 4h nach Stimulation eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen relativen Caspase-7-Aktivität der MCF-7-Klone hervorrief.

Weiterhin bewirkte der *icb-1*-Knockdown in den CTB™-Assays nach 24, 48 und 72h eine Proliferationssteigerung, was sich in einer signifikant höheren durchschnittlichen relativen Zellzahl der MCF-7/*icb*KD- im Vergleich zu den MCF-7/*con*-Klonen zeigte. Die Signifikanz war unter 2000nM-Camptothecin am Höchsten [Tabellen 4+5; Abbildung 7].

Camptothecin	<i>icb-1</i> KD [in % der LMK]	<i>con</i> [in % der LMK]	p
20nM	115	95	0.06
200nM	140	167	0.02
2000nM	182	267	0.002

Tabelle 4 Apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Camptothecin

Aufgeführt ist die durchschnittliche Caspase-7-Aktivität der MCF-7/*icb*KD- (*icb-1* KD) und MCF-7/*con*-Klone (*con*) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 4h nach Stimulation mit 20-, 200- und 2000nM-Camptothecin. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

Messzeitpunkt [h]	20nM-Camptothecin			200nM-Camptothecin			2000nM-Camptothecin		
	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p
24	88	80	0.007	107	85	0.008	101	77	0.006
48	73	60	0.007	75	55	0.003	81	55	0.0008
72	59	46	0.004	58	38	0.0003	60	33	0.0001

Tabelle 5 Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Camptothecin

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Zellzahlen der MCF-7/icbKD- (icb-1 KD) und MCF-7/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 20-, 200- und 2000nM-Camptothecin. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

Cycloheximid

Cycloheximid entfaltete bei den MCF-7-Klonen in höheren Konzentrationen (10 μ M, 100 μ M) seine Apoptose-induzierende Wirkung, was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) widerspiegelte ($p < 0.01$). In den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) ergab sich nach 24, 48 und 72h bereits unter 1 μ M-Cycloheximid eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der LMK ($p < 0.001$).

Unter 10- und 100 μ M-Cycloheximid manifestierten sich in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays nach 4h Unterschiede in der apoptotischen Aktivität von *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/icbKD-Klone) und Kontrollklonen (MCF-7/con-Klone). So bewirkte der *icb-1*-Knockdown eine Abnahme der durchschnittlichen relativen Caspase-7-Aktivität gegenüber den MCF-7/con-Klonen. Der Unterschied war allerdings nur unter 10 μ M-Cycloheximid mit 126% zu 171% der LMK signifikant ($p = 0.0007$).

Weiterhin bewirkte der *icb-1*-Knockdown in den CTB™-Assays unter allen Cycloheximidkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) eine Steigerung der Proliferation gegenüber den MCF-7/con-Klonen. Signifikanz ergab sich anfangs (nach 24 und 48h) unter 1 μ M-Cycloheximid, mit fortschreitender Zeit (nach 48 und 72h) unter 10- und 100 μ M-Cycloheximid [Tabelle 6; Abbildung 7].

Messzeitpunkt [h]	1µM-Cycloheximid			10µM-Cycloheximid			100µM-Cycloheximid		
	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con	p
24	79	71	0.03	74	69	0.2	79	70	0.003
48	70	55	0.007	69	53	0.003	79	52	0.004
72	57	50	0.2	57	40	0.005	59	39	0.005

Tabelle 6 Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Cycloheximid

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Zellzahlen der MCF-7/icbKD- (icb-1 KD) und MCF-7/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 1-, 10- und 100µM-Cycloheximid. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

Dexamethason

Dexamethason wirkte in keiner der 3 eingesetzten Konzentrationen (0,1µM, 1µM, 10µM) Apoptose-induzierend auf die MCF-7-Klone. So zeigten sich in den Apoptose- (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) und Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) keine signifikanten Unterschiede von Caspase-7-Aktivität und Anzahl vitaler MCF-7-Klone gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) ($p > 0.05$).

Weiterhin manifestierte sich 4h nach Stimulation in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays keine Wirkung des *icb-1*-Knockdowns auf die apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone im Sinne einer signifikanten Veränderung der durchschnittlichen relativen Caspase-7-Aktivität gegenüber den Kontrollklonen (MCF-7/con-Klone) ($p > 0.05$).

In den CTB™-Assays zeigten sich demgegenüber unter 10µM-Dexamethason Unterschiede zwischen MCF-7/icbKD- und MCF-7/con-Klonen. So bewirkte der *icb-1*-Knockdown hier eine Proliferationssteigerung, wobei der Unterschied nur 72h nach Stimulation signifikant war. Die durchschnittliche relative Zellzahl lag zu diesem Zeitpunkt bei 92% der LMK bei den MCF-7/icbKD-Klonen zu 77% der LMK bei den MCF-7/con-Klonen ($p = 0.009$).

Etoposid

Etoposid entfaltete in allen 3 Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) – wenn auch geringfügig – seine Apoptose-induzierende Wirkung bei den MCF-7-Klonen, was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-7-Aktivität ($p < 0.05$) und in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24, 48 und 72h in einer signifikanten Zunahme der Anzahl vitaler Zellklone gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) ($p < 0.03$) zeigte.

Der *icb-1*-Knockdown hatte in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays nach 4h keinen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone im Sinne einer signifikanten Veränderung der

durchschnittlichen relativen Caspase-7-Aktivität gegenüber den Kontrollklonen (MCF-7/con-Klone).

In den CTBTM-Assays bewirkte der *icb-1*-Knockdown demgegenüber unter allen 3 Etoposidkonzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) nach 24, 48 und 72h eine Steigerung der Proliferation gegenüber den MCF-7-/con-Klonen. Die Unterschiede waren allerdings nur unter 10- und 100µM-Etoposid überwiegend signifikant. So lag die durchschnittliche relative Zellzahl der MCF-7/*icb*KD-Klone im Vergleich zu derjenigen der MCF-7-/con-Klone unter 10µM-Etoposid nach 24h bei 84% zu 73% der LMK (p=0.0009), nach 48h bei 80% zu 59% der LMK (p=0.003), nach 72h bei 66% zu 51% der LMK (p=0.001).

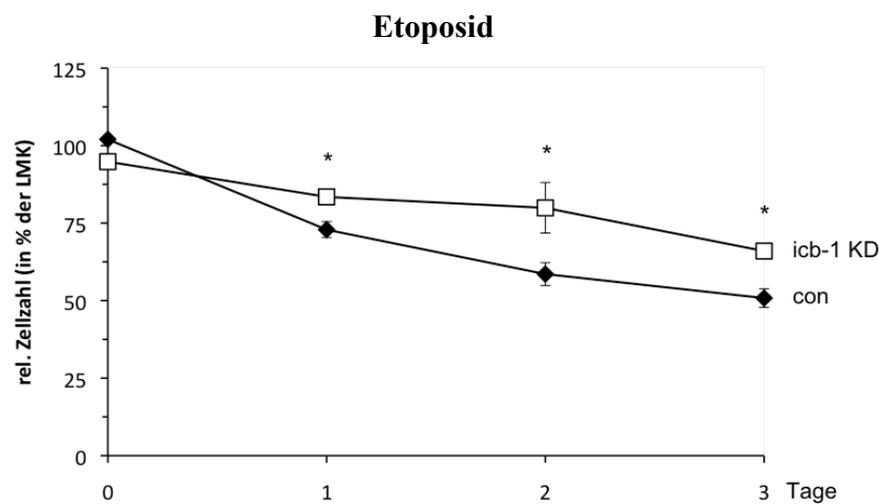


Abbildung 8 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Etoposid

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Zellzahl 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 10µM-Etoposid. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Tamoxifen

Tamoxifen bewirkte in allen 3 Konzentrationen (1µM, 10µM, 25µM) eine Apoptoseinduktion bei den MCF-7-Klonen, was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-GloTM 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) zeigte (p<0.01). In den Proliferationsversuchen (CTBTM-Assays) bewirkte 25µM-Tamoxifen eine massive Abnahme der Anzahl vitaler MCF-7-Klone gegenüber der LMK (p<0.000001).

Der *icb-1*-Knockdown hatte in den Caspase-GloTM 3/7-Assays Einfluss auf die apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone. So lag die durchschnittliche relative Caspase-7-Aktivität der MCF-7/*icb*KD-Klone 4h nach Stimulation mit 1- beziehungsweise 25µM-Tamoxifen

signifikant unter derjenigen der MCF-7/con-Klone. Sie betrug unter 1 μ M-Tamoxifen 97% zu 120% der LMK ($p=0.04$), unter 25 μ M-Tamoxifen 114% zu 163% der LMK ($p=0.007$).

In den CTBTM-Assays zeigten sich demgegenüber nach 24, 48 und 72h keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen MCF-7/icbKD- und MCF-7/con-Klonen [Tabelle 7; Abbildung 9].

Tamoxifen	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p
1 μ M	98	122	0.04
10 μ M	114	137	0.2
25 μ M	117	164	0.007

Tabelle 7 Apoptotische Aktivität der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Tamoxifen

Aufgeführt ist die durchschnittliche Caspase-7-Aktivität der MCF-7/icbKD- (icb-1 KD) und MCF-7/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone) 4h nach Stimulation mit 1-, 10- und 25 μ M-Tamoxifen. Signifikanz wird für $p<0.05$ angenommen.

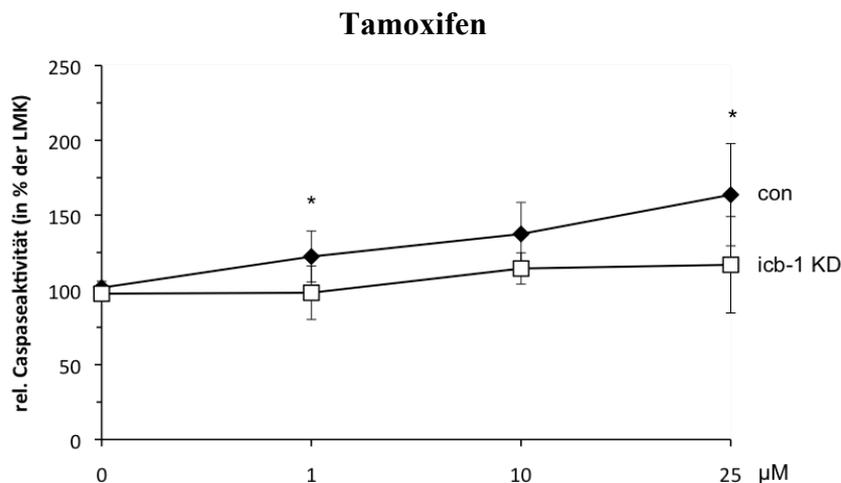


Abbildung 9 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der MCF-7-Klone gegenüber dem Apoptose-induzierenden SERM Tamoxifen

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Caspase-7-Aktivität 4h nach Stimulation mit 1-, 10- und 25 μ M-Tamoxifen. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). ($n=3$), * $p<0.05$ versus LMK.

3.2.3 Apoptose und Proliferation der SK-OV-3-Klone nach Stimulation

Staurosporin

Ähnlich wie bei den MCF-7-Klonen manifestierte sich auch bei den SK-OV-3-Klonen die Apoptose-induzierende Wirkung von Staurosporin in den Apoptose- (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) und Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) erst bei höheren Konzentrationen (100nM, 1000nM) ($p < 0.001$). Es zeigte sich hier insgesamt die stärkste Apoptose-induzierende Wirkung durch Staurosporin innerhalb der 3 Krebszelllinien.

Es ergaben sich unter 100- und 1000nM-Staurosporin in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays signifikante Unterschiede der apoptotischen Aktivität zwischen *icb-1*-downgeknockten (SK-OV-3/*icb*KD-Klone) und Kontrollklonen (SK-OV-3/con-Klone). So bewirkte der *icb-1*-Knockdown 4h nach Stimulation eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen relativen Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den SK-OV-3/con-Klonen.

Unter 100nM-Staurosporin hatte der *icb-1*-Knockdown auch Einfluss auf das Proliferationsverhalten der SK-OV-3-Klone im Sinne einer Proliferationssteigerung. So lag in den CTB™-Assays die durchschnittliche relative Zellzahl der SK-OV-3/*icb*KD-Klone 24, 48 und 72h nach Stimulation über derjenigen der SK-OV-3/con-Klone. Der Unterschied war allerdings nur 48 und 72h nach Stimulation mit 50% zu 30% der LMK ($p = 0.02$) und 28% zu 11% der LMK ($p = 0.03$) signifikant [Tabelle 8; Abbildung 10].

Staurosporin	<i>icb-1</i> KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p
1nM	103	106	0.7
10nM	121	115	0.2
100nM	340	794	0.0003
1000nM	460	800	0.001

Tabelle 8 Apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach Stimulation mit Staurosporin

Aufgeführt ist die durchschnittliche Caspase-3/7-Aktivität der SK-OV-3/*icb*KD- (*icb-1* KD) und SK-OV-3/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte SK-OV-3-Klone) 4h nach Stimulation mit 1-, 10-, 100- und 1000nM-Staurosporin. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

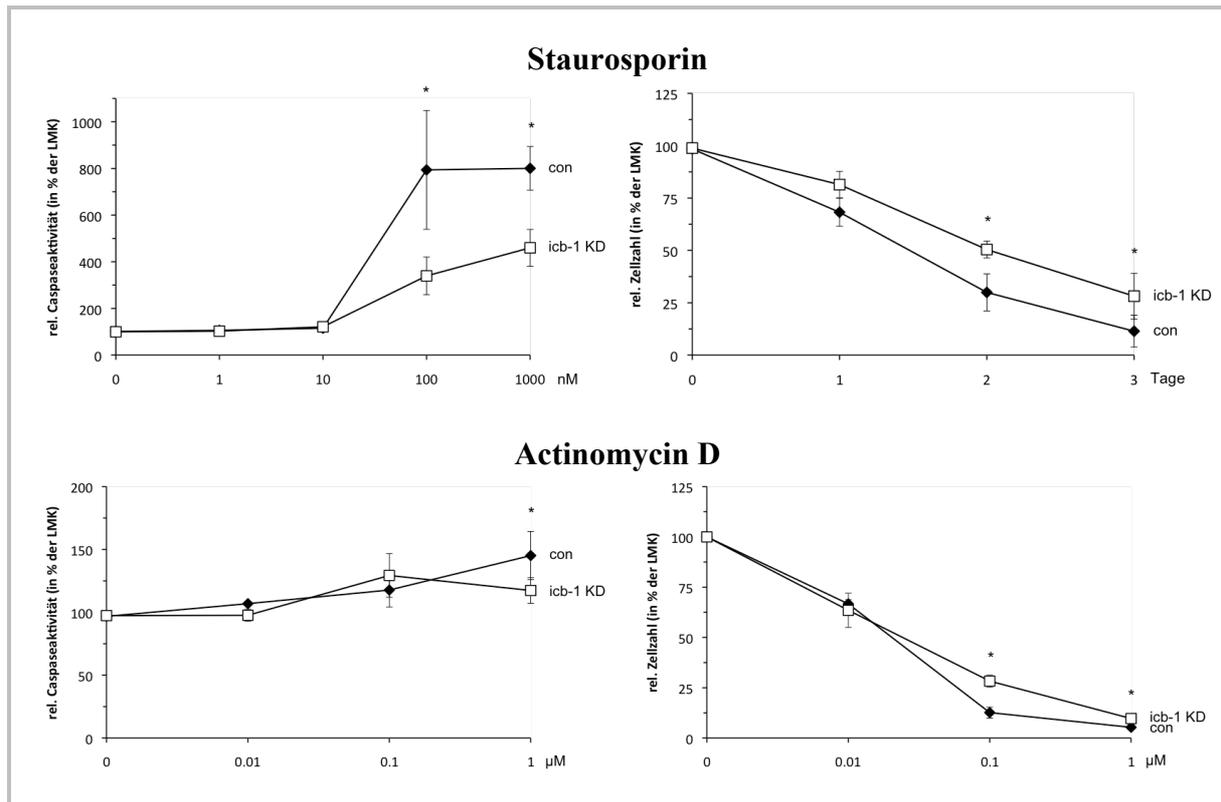


Abbildung 10 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin und Actinomycin D

Auf der linken Seite wird die durchschnittliche relative Aktivität der Caspase-3 und -7 4h nach Stimulation mit Staurosporin und Actinomycin D in den angegebenen Konzentrationen gezeigt. Auf der rechten Seite sieht man die durchschnittliche relative Anzahl vitaler SK-OV-3-Klone 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 100nM-Staurosporin und 48h nach Stimulation mit 0,01-, 0,1- und 1 μ M-Actinomycin D. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte SK-OV-3-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Actinomycin D

Actinomycin D bewirkte bei den SK-OV-3-Klonen in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h erst in höheren Konzentrationen (0,1 μ M, 1 μ M) eine Apoptoseinduktion im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) (p<0.05). Eine signifikante Proliferationshemmung zeigte sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24, 48 und 72h bereits unter 0,01 μ M-Actinomycin D (p<0.001).

Nur unter 1 μ M-Actinomycin D hatte der *icb-1*-Knockdown Einfluss auf die apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone. So lag in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays 4h nach Stimulation mit 1 μ M-Actinomycin D die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (SK-OV-3/*icb*KD-Klone) mit 117% der LMK signifikant unter derjenigen der Kontrollklone (SK-OV-3/*con*-Klone) mit 145% der LMK (p=0.04).

48h nach Stimulation mit 0,1- und 1 μ M-Actinomycin D manifestierte sich in den CTBTM-Assays eine signifikante Steigerung der Proliferation durch den *icb-1*-Knockdown. So lag hier die durchschnittliche relative Zellzahl der SK-OV-3/*icb*KD-Klone signifikant über derjenigen der SK-OV-3/*con*-Klone, unter 0,1 μ M-Actinomycin D bei 28% zu 13% der LMK ($p=0.003$), unter 1 μ M-Actinomycin D bei 10% zu 5% der LMK ($p=0.009$). 72h nach Stimulation ergaben sich unter 0,1- und 1 μ M-Actinomycin D insgesamt sehr niedrige Zellzahlen im Vergleich zu den unstimulierten SK-OV-3-Klonen (LMK) [Abbildung 10].

Camptothecin

Camptothecin hatte in höheren Konzentrationen (200nM, 2000nM) eine Apoptose-induzierende Wirkung auf die SK-OV-3-Klone, was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-GloTM 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) zeigte ($p<0.05$). Eine signifikante Proliferationshemmung manifestierte sich in den Proliferationsversuchen (CTBTM-Assays) nach 48 und 72h bereits unter 20nM-Camptothecin ($p<0.01$).

Es ergab sich in den Caspase-GloTM 3/7-Assays unter 200- und 2000nM-Camptothecin 4h nach Stimulation eine signifikant niedrigere durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität bei den *icb-1*-downgeknockten (SK-OV-3/*icb*KD-Klone) gegenüber den Kontrollklonen (SK-OV-3/*con*-Klone). Der *icb-1*-Knockdown bewirkte also eine Abnahme der apoptotischen Aktivität gegenüber den SK-OV-3/*con*-Klonen.

Demgegenüber hatte der *icb-1*-Knockdown in den CTBTM-Assays nach 24, 48 und 72h keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der SK-OV-3-Klone im Sinne einer signifikanten Veränderung der Anzahl vitaler Zellklone gegenüber den SK-OV-3/*con*-Klonen [Tabelle 9; Abbildung 11].

Camptothecin	<i>icb-1</i> KD [in % der LMK]	<i>con</i> [in % der LMK]	p
20nM	106	115	0.3
200nM	122	168	0.002
2000nM	144	180	0.03

Tabelle 9 Apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach Stimulation mit Camptothecin

Aufgeführt ist die durchschnittliche Caspase-3/7-Aktivität der SK-OV-3/*icb*KD- (*icb-1* KD) und SK-OV-3/*con*-Klone (*con*) in % der LMK (=unstimulierte SK-OV-3-Klone) 4h nach Stimulation mit 20-, 200- und 2000nM-Camptothecin. Signifikanz wird für $p<0.05$ angenommen.

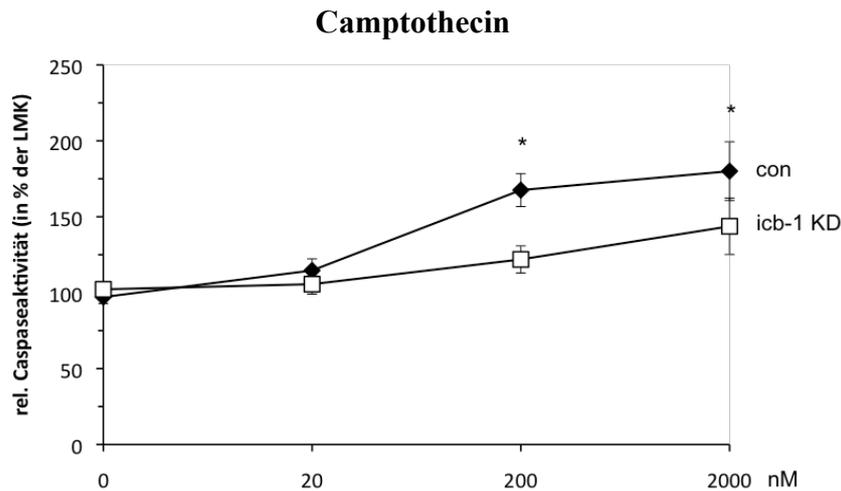


Abbildung 11 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Camptothecin

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Stimulation mit 20-, 200- und 2000nM-Camptothecin. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte SK-OV-3-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Cycloheximid

Cycloheximid wirkte in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h nur in hoher Konzentration (100µM) Apoptose-induzierend auf die SK-OV-3-Klone, was sich in einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) zeigte (p<0.05). In den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) bewirkte Cycloheximid hingegen in allen 3 Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) nach 24, 48 und 72h eine signifikante Proliferationshemmung (p<0.01).

Unter 100µM-Cycloheximid bewirkte der *icb-1*-Knockdown in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays eine Steigerung der apoptotischen Aktivität gegenüber den Kontrollklonen (SK-OV-3/con-Klone). So lag 4h nach Stimulation die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (SK-OV-3/icbKD-Klone) mit 108% der LMK signifikant unter derjenigen der SK-OV-3/con-Klone mit 137 % der LMK (p=0.004).

Demgegenüber zeigte sich in den CTB™-Assays unter keiner der 3 Camptothecinkonzentrationen nach 24, 48 und 72h eine signifikante Veränderung des Proliferationsverhaltens der SK-OV-3-Klone durch den *icb-1*-Knockdown [Abbildung 12].

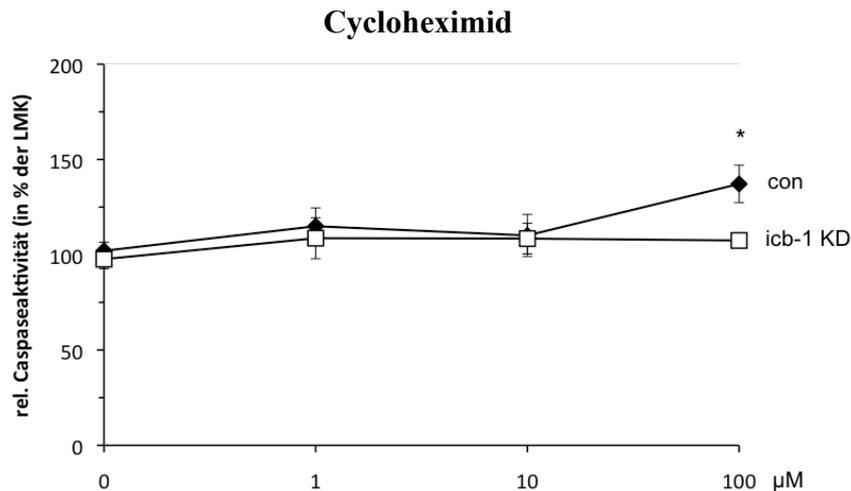


Abbildung 12 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der SK-OV-3-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Cycloheximid

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Stimulation mit 1-, 10- und 100µM-Cycloheximid. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte SK-OV-3-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Dexamethason

Ähnlich wie bei den MCF-7-Klonen bewirkte Dexamethason in keiner der 3 eingesetzten Konzentrationen (0,1µM, 1µM, 10µM) eine Apoptoseinduktion bei den SK-OV-3-Klonen. Es zeigte sich weder in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h eine signifikante Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten SK-OV-3-Klonen (LMK), noch ergab sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24, 48 und 72h eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler SK-OV-3-Klone gegenüber der LMK. 72h nach Stimulation lag die durchschnittliche relative Zellzahl der stimulierten SK-OV-3-Klone sogar leicht über derjenigen der LMK.

Auch hatte der *icb-1*-Knockdown in den Caspase-Glo™ 3/7- und CTB™-Assays keinen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach 4h und das Proliferationsverhalten der SK-OV-3-Klone nach 24, 48 und 72h.

Etoposid

Etoposid hatte – ähnlich wie bei den MCF-7-Klonen – in allen Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) eine Apoptose-induzierende Wirkung auf die SK-OV-3-Klone, was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität und in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24, 48 und 72h in einer signifikanten Abnahme der Anzahl vitaler Zellklone gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) widerspiegelte (p<0.01).

Ein Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach 4h und das Proliferationsverhalten der SK-OV-3-Klone nach 24, 48 und 72h ergab sich in den Caspase-Glo™ 3/7- und CTB™-Assays nicht.

Tamoxifen

Tamoxifen bewirkte bei den SK-OV-3-Klonen in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nur in hoher Konzentration (25µM) nach 4h eine Apoptoseinduktion im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) ($p < 0.05$). Nach 24, 48 und 72h manifestierte sich in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) – ähnlich wie bei den MCF-7-Klonen – unter 10- und insbesondere 25µM-Tamoxifen eine massive Abnahme der Anzahl vitaler Zellklone gegenüber der LMK ($p < 0.00001$).

Es zeigte sich in den Caspase-Glo™ 3/7- und CTB™-Assays kein Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die apoptotische Aktivität der SK-OV-3-Klone nach 4h und auf das Proliferationsverhalten der SK-OV-3-Klone nach 24, 48 und 72h.

3.2.4 Apoptose und Proliferation der HEC-1B-Klone nach Stimulation

Staurosporin

Ähnlich wie bei den anderen beiden Krebszelllinien manifestierte sich die Apoptose-induzierende Wirkung von Staurosporin auch bei den HEC-1B-Klonen erst in höheren Konzentrationen (100nM, 1000nM), was sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) zeigte ($p < 0.01$). In den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) ergab sich unter 100- und 1000nM-Staurosporin nach 48 und 72h eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler HEC-1B-Klone gegenüber der LMK ($p < 0.01$). 24h nach Stimulation manifestierte sich eine Steigerung der Proliferation durch Staurosporin. Insgesamt zeigte Staurosporin bei den HEC-1B-Klonen eine geringere Wirkung als bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen.

Der *icb-1*-Knockdown bewirkte in den CTB™-Assays unabhängig von der Staurosporinkonzentration eine Abnahme der apoptotischen Aktivität gegenüber den Kontrollklonen (HEC-1B/con-Klone). So war 4h nach Stimulation die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (HEC-1B/*icb*KD-Klone) niedriger als diejenige der HEC-1B/con-Klone. Der Unterschied war – im Gegensatz zu den

MCF-7- und SK-OV-3-Klonen – nur unter niedrigen Staurosporinkonzentrationen (1nM, 10nM) signifikant. So ergab sich unter 1nM-Staurosporin eine durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität von 85% der LMK bei den HEC-1B/icbKD-Klonen zu 101% der LMK bei den HEC-1B/con-Klonen ($p=0.02$), unter 10nM-Staurosporin von 94% der LMK zu 114% der LMK ($p=0.004$).

In den CTBTM-Assays zeigte sich eine Proliferationssteigerung durch den *icb-1*-Knockdown. So lag unter allen Staurosporinkonzentrationen die durchschnittliche relative Zellzahl der HEC-1B/icbKD-Klone über derjenigen der HEC-1B/con-Klone. Die Unterschiede waren allerdings nur unter 1-, 10- und 100nM-Staurosporin nach 48 und 72h überwiegend signifikant. Dabei ergab sich mit fortschreitender Zeit eine Verschiebung der Signifikanz von größeren zu kleineren Staurosporinkonzentrationen [Tabelle10; Abbildung 13].

Messzeitpunkt [h]	1nM-Staurosporin			10nM-Staurosporin			100nM-Staurosporin		
	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p
24	110	114	0.4	110	110	0.9	138	128	0.2
48	102	104	0.7	105	93	0.04	118	94	0.02
72	102	87	0.048	91	81	0.04	82	63	0.1

Tabelle 10 Proliferationsverhalten der HEC-1B-Klone nach Stimulation mit Staurosporin

Aufgeführt sind die durchschnittlichen Zellzahlen der HEC-1B/icbKD- (*icb-1* KD) und HEC-1B/con-Klone (*con*) in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone) 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 1-, 10- und 100nM-Staurosporin. Signifikanz wird für $p<0.05$ angenommen.

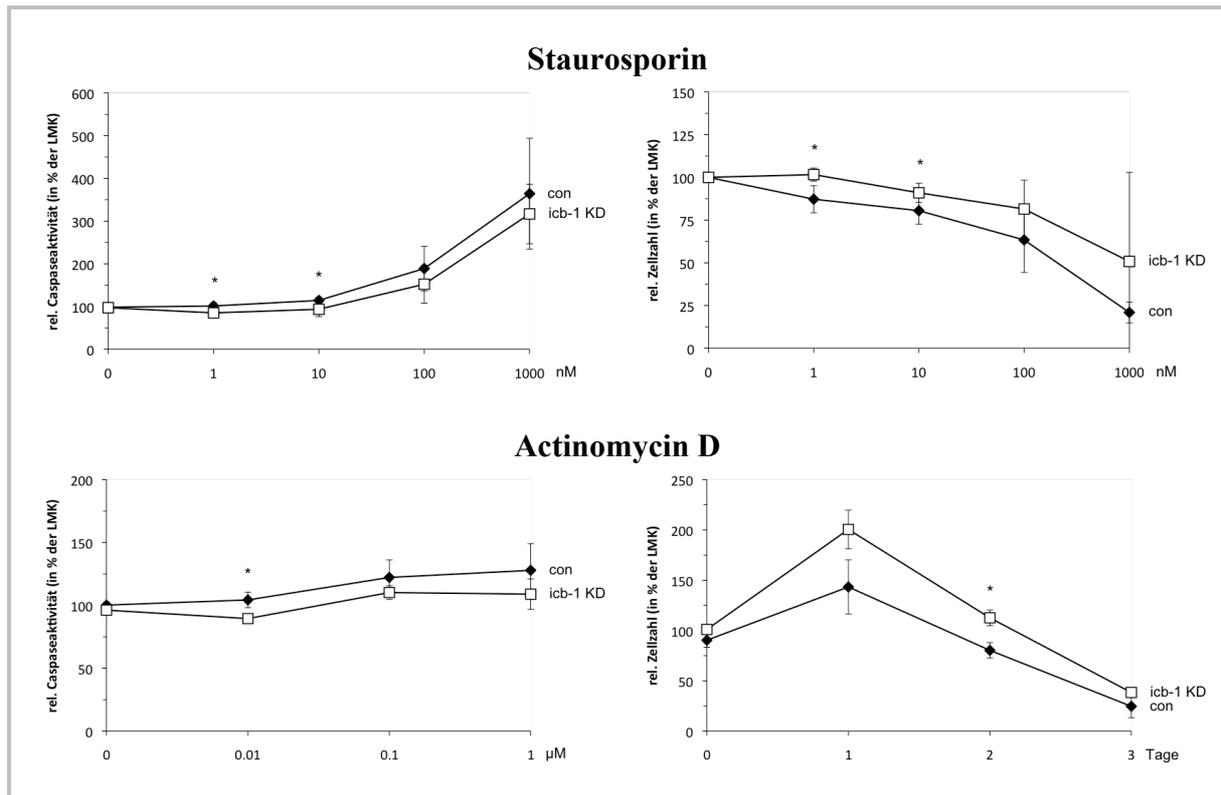


Abbildung 13 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber den Apoptose-induzierenden Zytostatika Staurosporin und Actinomycin D

Auf der linken Seite wird die durchschnittliche relative Aktivität der Caspase-3 und -7 nach Stimulation mit Staurosporin und Actinomycin D in den angegebenen Konzentrationen gezeigt. Auf der rechten Seite sieht man die durchschnittliche relative Anzahl vitaler HEC-1B-Klone 72h nach Stimulation mit 1-, 10-, 100- und 1000nM-Staurosporin und 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 0,1µM-Actinomycin D. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Actinomycin D

Bei den HEC-1B-Klonen bewirkten – ähnlich wie bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen – erst höhere Actinomycin D-Konzentrationen (0,1µM, 1µM) eine Apoptoseinduktion. So zeigte sich in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h eine signifikante Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten HEC-1B-Klonen (LMK) (p<0.05), in den Proliferationsversuchen nach 48 und 72h eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler HEC-1B-Klone gegenüber der LMK. 24h nach Stimulation manifestierte sich unter 0,1- und 1µM-Actinomycin D eine Steigerung der Proliferation gegenüber der LMK.

In den Caspase-Glo™ 3/7-Assays lag unter allen 3 Actinomycin D-Konzentrationen (0,01µM, 0,1µM, 1µM) nach 4h die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (HEC-1B/*icb*KD-Klone) unter derjenigen der Kontrollklone (HEC-1B/*con*-Klone). Der *icb-1*-Knockdown bewirkte also eine Abnahme der apoptotischen Aktivität der HEC-1B-Klone. Der Unterschied war allerdings nur unter 0,01µM-Actinomycin D mit 90% zu 104% der LMK signifikant (p=0.02).

Der *icb-1*-Knockdown wirkte in den CTBTM-Assays unter 0,1- und 1 μ M-Actinomycin D nach 24, 48 und 72h proliferationssteigernd auf die HEC-1B-Klone. So lag die durchschnittliche relative Zellzahl der HEC-1B/*icb*KD-Klone über derjenigen der HEC-1B/con-Klone. Der Unterschied war allerdings nur unter 0,1 μ M-Actinomycin D nach 48h mit 113% zu 80% der LMK signifikant ($p=0.007$) [Abbildung 13].

Camptothecin

Camptothecin entfaltete bei den HEC-1B-Klonen in den Apoptoseversuchen (Caspase-GloTM 3/7-Assays) nur in höheren Konzentrationen (200nM, 2000nM) seine Apoptose-induzierende Wirkung, was sich nach 4h in einer signifikanten Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen zeigte ($p<0.05$). In den Proliferationsversuchen (Caspase-GloTM 3/7-Assays) bewirkte nur hoch konzentriertes Camptothecin (2000nM) nach 48 und 72h eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der LMK ($p<0.001$).

In den Caspase-GloTM 3/7-Assays hatte der *icb-1*-Knockdown hemmenden Einfluss auf die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone. So lag unter allen Camptothecinkonzentrationen (2nM, 20nM, 200nM) nach 4h die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (HEC-1B/*icb*KD-Klone) unter derjenigen der Kontrollklone (HEC-1B/con-Klone). Die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

In den CTBTM-Assays bewirkte der *icb-1*-Knockdown unter hoch konzentriertem Camptothecin (2000nM) eine Proliferationssteigerung bei den HEC-1B-Klonen. So lag 48 und 72h nach Stimulation mit 2000nM-Camptothecin die durchschnittliche relative Zellzahl der HEC-1B/*icb*KD-Klone über derjenigen der Kontrollklone (HEC-1B/con-Klone). Der Unterschied war allerdings nur nach 72h mit 65% zu 35% der LMK signifikant ($p=0.01$) [Abbildung 14].

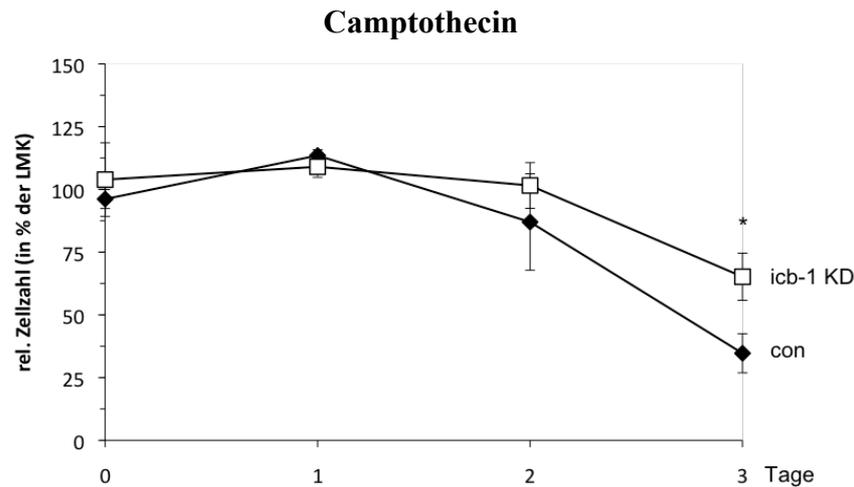


Abbildung 14 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Camptothecin

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Zellzahl 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 200nM-Camptothecin. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone). (n=3), *p<0.05 versus LMK.

Cycloheximid

Cycloheximid wirkte in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in höheren Konzentrationen (10µM, 100µM) Apoptose-induzierend auf die HEC-1B-Klone im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) (p<0.05). In den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) bewirkten alle Cycloheximidkonzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) nach 24, 48 und 72h eine signifikante Proliferationshemmung gegenüber der LMK (p<0.01).

Es zeigte sich in den Caspase-Glo™ 3/7-Assays nach 4h unter 1-, 10- und 100µM-Cycloheximid ein hemmender Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone. So lag die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität der *icb-1*-downgeknockten Klone (HEC-1B/*icb*KD-Klone) unter derjenigen der Kontrollklone (HEC-1B/*con*-Klone). Der Unterschied war allerdings nur unter 1- und 10µM-Cycloheximid signifikant.

In den CTB™-Assays hatte der *icb-1*-Knockdown erst nach 72h unter 1- und 100µM-Cycloheximid einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der HEC-1B-Klone im Sinne einer Proliferationssteigerung. So lag die durchschnittliche relative Zellzahl der HEC-1B/*icb*KD-Klone über derjenigen der HEC-1B/*con*-Klone. Der Unterschied war allerdings nur unter 1µM-Cycloheximid mit 72% zu 59% der LMK signifikant (p=0.005) [Tabelle 11; Abbildung 15].

Cycloheximid	icb-1 KD [in % der LMK]	con [in % der LMK]	p
1 μ M	84	106	0.005
10 μ M	91	144	0.003
100 μ M	135	162	0.2

Tabelle 11 Apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone nach Stimulation mit Cycloheximid
Aufgeführt ist die durchschnittliche Caspase-3/7-Aktivität der HEC-1B/icbKD- (icb-1 KD) und HEC-1B/con-Klone (con) in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone) 4h nach Stimulation mit 1-, 10- und 100 μ M-Cycloheximid. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

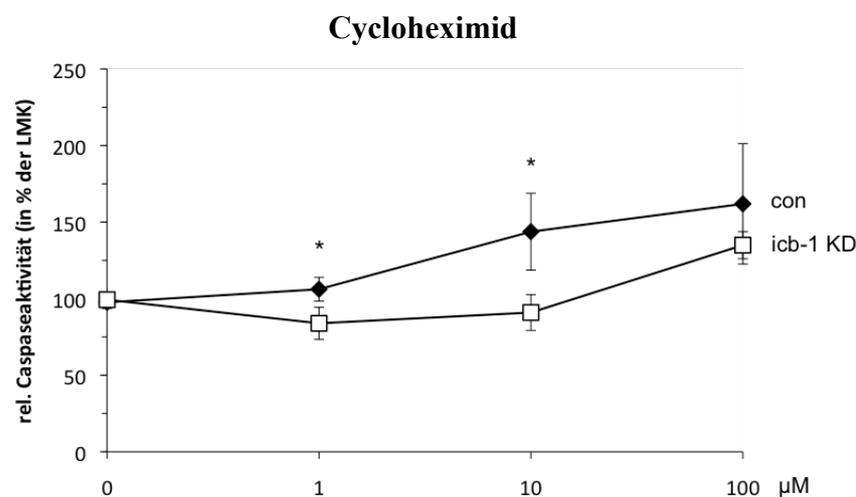


Abbildung 15 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Cycloheximid
Gezeigt wird die durchschnittliche relative Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Stimulation mit 1-, 10- und 100 μ M-Cycloheximid. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone). (n=3), * $p < 0.05$ versus LMK.

Dexamethason

Dexamethason hatte – ähnlich wie bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen – in keiner der 3 eingesetzten Konzentrationen (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) eine Apoptose-induzierende Wirkung auf die HEC-1B-Klone. So zeigte sich weder in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h eine signifikante Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität noch in den Proliferationsversuchen (CTB™-Assays) nach 24, 48 und 72h eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler HEC-1B-Klone gegenüber den unstimulierten HEC-1B-Klonen (LMK).

Es ergab sich weiterhin in den Caspase-Glo™ 3/7- und CTB™-Assays kein Einfluss des *icb-1*-Knockdowns auf die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone nach 4h und das Proliferationsverhalten der HEC-1B-Klone nach 24, 48 und 72h.

Etoposid

Etoposid wirkte in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in keiner der 3 eingesetzten Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) Apoptose-induzierend auf die HEC-1B-Klone im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen. Unter hoch konzentriertem Etoposid (100µM) ergab sich hingegen nach 72h eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler HEC-1B-Klone gegenüber der LMK ($p < 0.05$).

In den Caspase-Glo™ 3/7-Assays hatte der *icb-1*-Knockdown nach 4h unter keiner der 3 Etoposidkonzentrationen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone. Demgegenüber manifestierte sich in den CTB™-Assays unter 100µM-Etoposid nach 48 und 72h eine Proliferationssteigerung durch den *icb-1*-Knockdown. So lag nach Stimulation mit 100µM-Etoposid die durchschnittliche relative Zellzahl der *icb-1*-downgeknockten Klone (HEC-1B/*icb*KD-Klone) signifikant über derjenigen der Kontrollklone (HEC-1B/*con*-Klone). Sie betrug nach 48h 98% zu 85% der LMK ($p = 0.04$), nach 72h 83% zu 60% der LMK ($p = 0.0003$) [Abbildung 16].

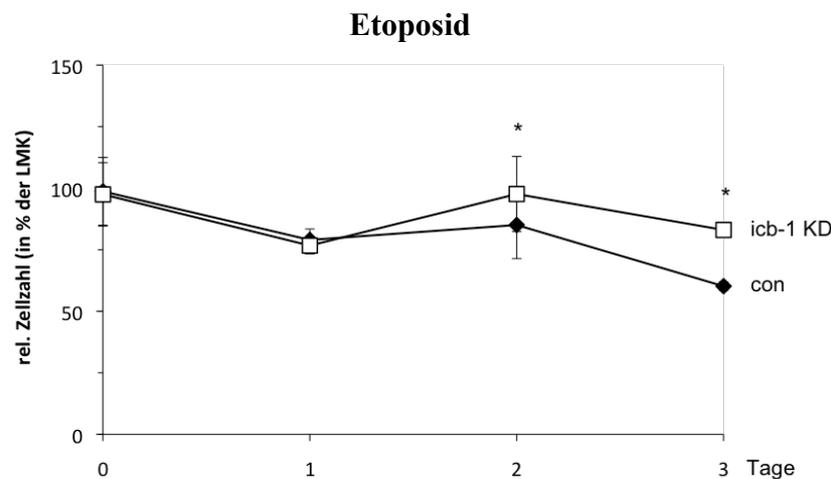


Abbildung 16 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die Sensitivität der HEC-1B-Klone gegenüber dem Apoptoseinduktor Etoposid

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Zellzahl 24, 48 und 72h nach Stimulation mit 100µM-Etoposid. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=unstimulierte HEC-1B-Klone). (n=3), * $p < 0.05$ versus LMK.

Tamoxifen

Tamoxifen wirkte in den Apoptoseversuchen (Caspase-Glo™ 3/7-Assays) nach 4h in keiner der 3 Konzentrationen (1µM, 10µM, 25µM) Apoptose-induzierend auf die HEC-1B-Klone im Sinne einer signifikanten Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK). Ähnlich wie bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen zeigte sich hingegen

in den Proliferationsversuchen (CTBTM-Assays) nach 24, 48 und 72h unter 25µM-Tamoxifen eine massive Abnahme der Anzahl vitaler HEC-1B-Klone gegenüber der LMK ($p < 0.000001$). Der *icb-1*-Knockdown hatte in den Caspase-GloTM 3/7- und CTBTM-Assays keinen Einfluss auf die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone nach 4h und auf das Proliferationsverhalten der HEC-1B-Klone nach 24, 48 und 72h.

3.3 mRNA-Level Apoptose-assoziiierter Gene bei stimulierten MCF-7-Klonen

3.3.1 Überblick

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von *icb-1* auf die Apoptose stimulierter MCF-7-Klone auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurden die mRNA-Level verschiedener pro- und antiapoptotischer Gene nach Apoptoseinduktion mittels Real-Time qPCR bestimmt und zwischen *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/*icb*KD-Klone) und Kontrollklonen (MCF-7/*con*-Klone) verglichen [Tabelle 12].

Gen	Primer
Bcl-2	Bcl2 for/rev
Bax	BAX-1/2
Bak	BAK-A/B
c-IAP1	BIRC-A/B
c-IAP2	IAP-A/B
XIAP	Xiap-1/2
XAF1	XAF-A/B
AIF	AIFM1_for/rev

Tabelle 12 Primer und deren Zielgene

Aufgeführt sind die für die Real-Time qPCR verwendeten Primer und deren Zielgene, die in der Apoptose eine Rolle spielen. Während Bax, Bak, XAF1 und AIF Apoptose induzieren, wirken Bcl-2, c-IAP1, c-IAP2 und XIAP antiapoptotisch. *Rot*: Gene der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma 2). *Blau*: Gene der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis protein). *Grün*: XIAP-associated factor 1. *Lila*: apoptosis-inducing factor.

Als Apoptosestimulanzien kamen Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid zum Einsatz.

Die RNA beziehungsweise cDNA der stimulierten MCF-7-Klone wurde wie im Kapitel 2.2.2.3 beschrieben von einer MTA gewonnen.

Die für den Master-Mix verwendeten spezifischen Primer flankierten die Apoptose-assoziierten Gene [Tabelle 12].

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurden mindestens 4 Läufe pro Primer durchgeführt.

3.3.2 Proapoptotische Gene

3.3.2.1 Bax

Die Expression von Bax (*Bcl-2-associated x-protein*) stieg nach Stimulation mit Camptothecin, Cycloheximid und Etoposid signifikant gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) an ($p < 0.01$). Während sich unter Actinomycin D und Dexamethason keine signifikanten Veränderungen der Bax-Expression zeigten, kam es unter Staurosporin zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Bax gegenüber der LMK ($p = 0.0002$).

Der *icb-1*-Knockdown hatte unter Staurosporin und Cycloheximid positiven Einfluss auf die Bax-Expression. So lag das durchschnittliche relative Bax-mRNA-Level der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) signifikant über demjenigen der Kontrollklone (MCF-7/*con*-Klone). Es betrug unter Staurosporin 123% der MCF-7/*con*-Klone ($p = 0.04$), unter Cycloheximid 256% der MCF-7/*con*-Klone ($p = 0.005$).

3.3.2.2 Bak

Ähnlich wie bei Bax kam es nach Stimulation mit Camptothecin zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0.000001$), unter Staurosporin zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) ($p = 0.00002$). Unter Actinomycin D, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Bak-Expression.

Unter Staurosporin wirkte der *icb-1*-Knockdown hemmend auf die Bak-Expression, was sich in einem signifikant niedrigerem durchschnittlichen relativen Bak-mRNA-Level der *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/*icb*KD-Klone) gegenüber den Kontrollklonen (MCF-7/*con*-Klone) zeigte. Es lag bei 80% der MCF-7/*con*-Klone ($p = 0.04$). Demgegenüber bewirkte der *icb-1*-

Knockdown nach Stimulation mit Cycloheximid eine signifikante Steigerung der Bak-Expression, das durchschnittliche relative Bak-mRNA-Level der MCF-7/icbKD-Klone lag bei 130% der MCF-7/con-Klone ($p=0.04$).

3.3.2.3 XAF1

XAF1 (*XIAP-associated factor 1*) wurde nur nach Stimulation mit Cycloheximid signifikant stärker exprimiert als bei den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) ($p=0.04$). Während sich unter Etoposid keine signifikante Veränderung der Expression zeigte, kam es unter Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Dexamethason zu einer signifikanten Reduktion der XAF1-Expression gegenüber der LMK ($p<0.001$).

Der *icb-1*-Knockdown bewirkte unter allen 6 Stimulanzen eine Abnahme der Expression von XAF1 bei den MCF-7-Klonen. So lag das durchschnittliche relative XAF1-mRNA-Level der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/icbKD-Klone) unter demjenigen der Kontrollklone (MCF-7/con-Klone). Signifikanz ergab sich allerdings nur unter Camptothecin mit 64% der MCF-7/con-Klone ($p=0.04$), unter Cycloheximid mit 54% der MCF-7/con-Klone ($p=0.01$) und unter Dexamethason mit 64% der MCF-7/con-Klone ($p=0.04$) [Abbildung 17].

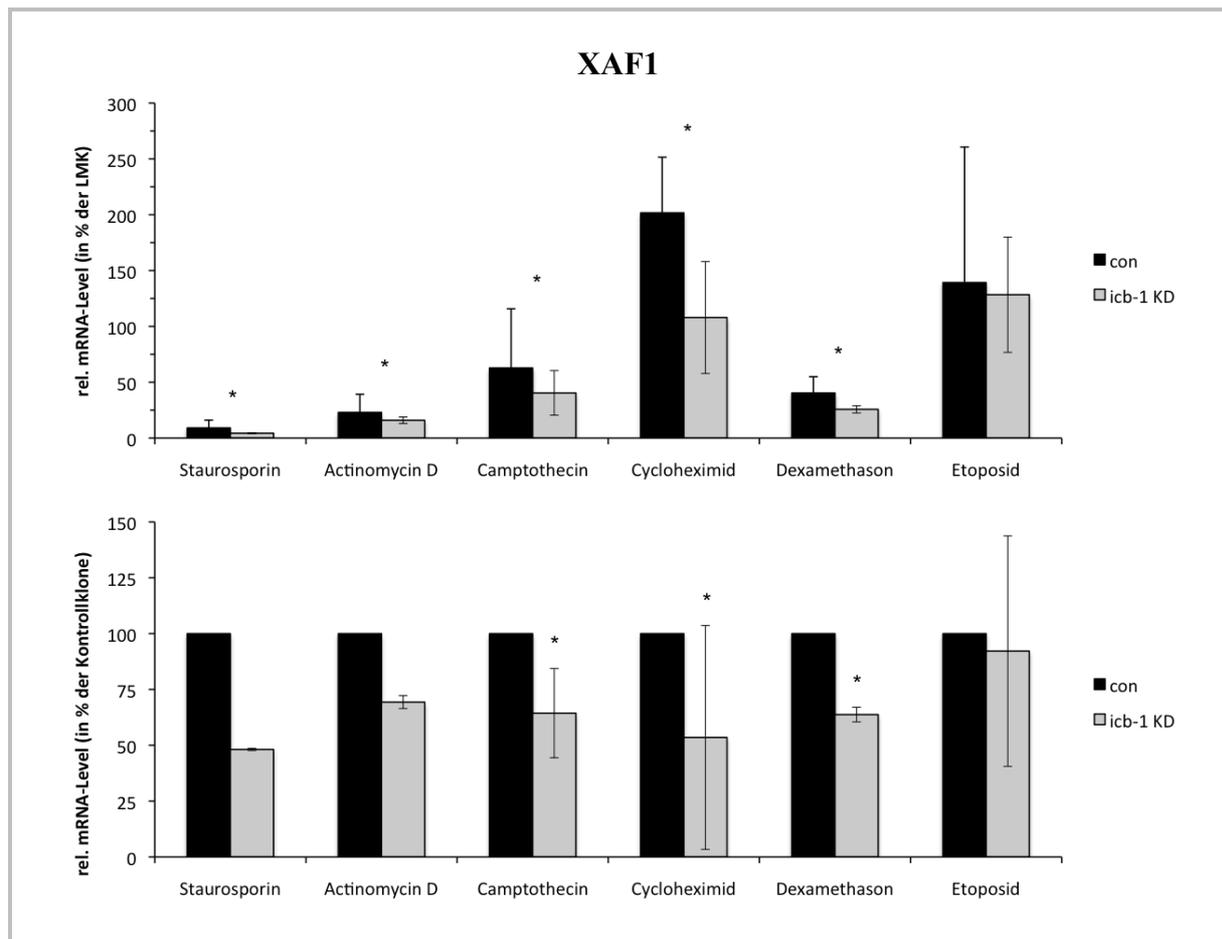


Abbildung 17 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die XAF1-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika

Oben sieht man die durchschnittlichen XAF1-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD-Klone (*icb-1* KD) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). Unten sind die durchschnittlichen XAF1-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD-Klone (*icb-1* KD) in % der MCF-7/*con*-Klone (*con*) dargestellt. Die Werte wurden nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid erhoben. (n=4), oben *p<0.05 versus LMK, unten *p<0.05 versus *con*.

3.3.2.4 AIF

Staurosporin und Camptothecin bewirkten eine signifikante Reduktion der Expression von AIF (*apoptosis-inducing factor*) gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) (p<0.01). Unter Actinomycin D, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen AIF-Expression gegenüber der LMK.

Der *icb-1*-Knockdown hatte unter allen 6 Stimulanzen Einfluss auf die AIF-Expression im Sinne einer Expressionssteigerung. So lag das durchschnittliche relative AIF-mRNA-Level der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) über demjenigen der Kontrollklone (MCF-7/*con*-Klone). Der Unterschied war unter Staurosporin, Camptothecin, Cycloheximid, Etoposid und Dexamethason signifikant [Tabelle 13; Abbildung 18].

Stimulans	icb-1 KD [in % der Kontrollklone]	p
Staurosporin	124	0.01
Actinomycin D	105	0.2
Camptothecin	124	0.03
Cycloheximid	167	0.01
Dexamethason	128	0.02
Etoposid	127	0.01

Tabelle 13 AIF-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika
Aufgeführt sind die durchschnittlichen AIF-mRNA-Level der MCF-7/icbKD-Klone (icb-1 KD) in % der MCF-7/con-Klone (Kontrollklone) nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

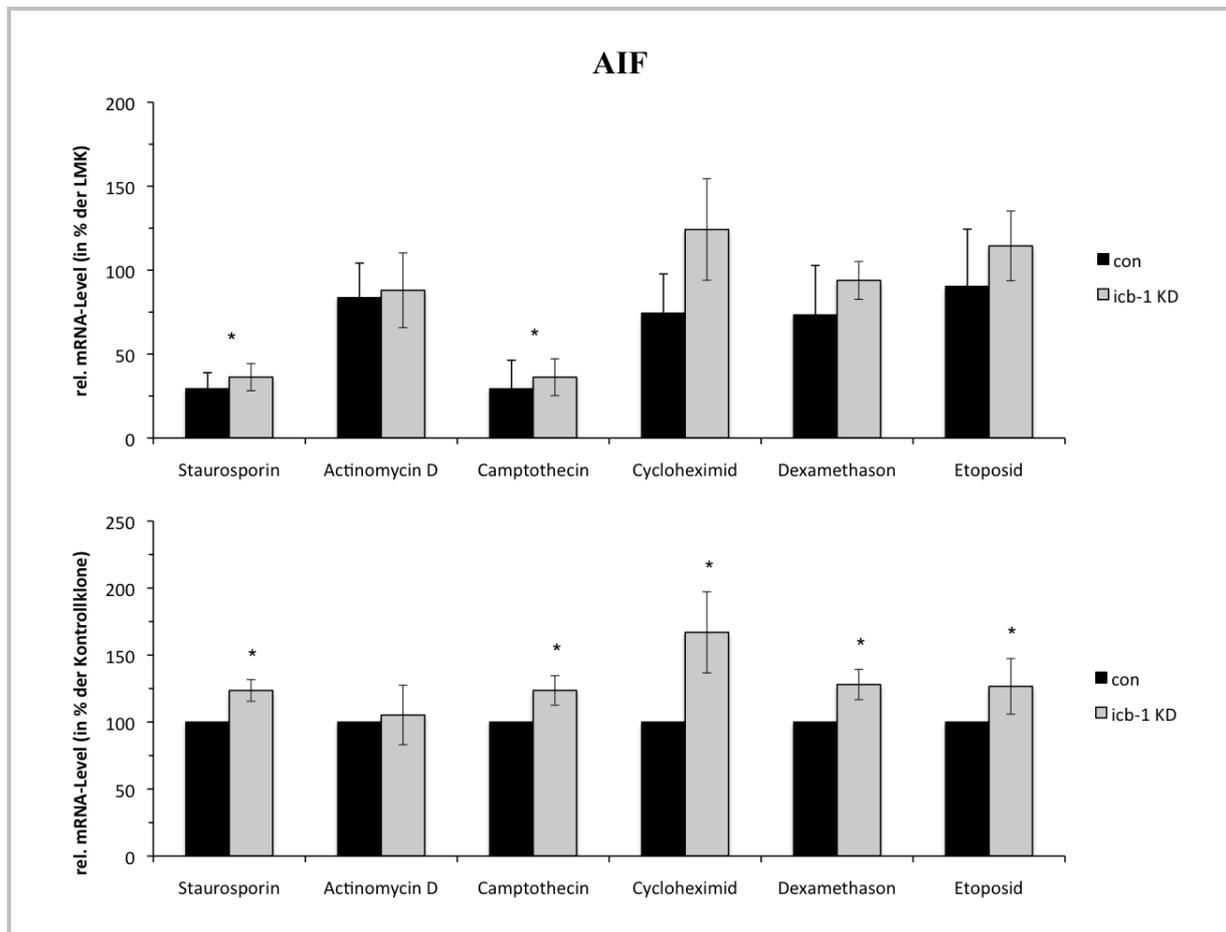


Abbildung 18 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die AIF-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika

Oben sieht man die durchschnittlichen AIF-mRNA-Level der MCF-7/icbKD-Klone (icb-1 KD) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). Unten sind die durchschnittlichen AIF-mRNA-Level der MCF-7/icbKD-Klone (icb-1 KD) in % der MCF-7/con-Klone (con) dargestellt. Die Werte wurden nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid erhoben. (n=4), oben * $p < 0.05$ versus LMK, unten * $p < 0.05$ versus con.

3.3.3 Antiapoptotische Gene

3.3.3.1 Bcl-2

Es kam unter allen Stimulanzen, insbesondere unter Camptothecin, Actinomycin D und Cycloheximid, zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK).

Es ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede des Bcl-2-mRNA-Niveaus zwischen *icb-1*-downgeknockten (MCF-7/*icb*KD-Klone) und Kontrollklonen (MCF-7/con-Klone).

3.3.3.2 c-IAP1

Nach Stimulation mit Cycloheximid und insbesondere mit Staurosporin und Actinomycin D manifestierte sich eine signifikante Reduktion der Expression von c-IAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1*) gegenüber den unstimulierten Zellklonen (LMK) ($p < 0.001$).

Unter Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Cycloheximid zeigte sich ein Einfluss der *icb-1*-Knockdowns auf die c-IAP1-Expression der MCF-7-Klone im Sinne einer Expressionssteigerung. So lag das c-IAP1-mRNA-Niveau der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) über demjenigen der Kontrollklone (MCF-7/con-Klone). Signifikanz ergab sich allerdings nur unter Camptothecin mit 205% der MCF-7/con-Klone ($p = 0.002$) und unter Cycloheximid mit 262% der MCF-7/con-Klone ($p = 0.001$).

3.3.3.3 c-IAP2

Die Expression von c-IAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 2*) wurde nach Stimulation mit Staurosporin und Actinomycin D massiv gesenkt gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) ($p < 0.0001$). Unter Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid kam es hingegen zu einer signifikanten Steigerung der c-IAP2-Expression gegenüber der LMK ($p < 0.01$).

Ähnlich wie bei c-IAP1 bewirkte der *icb-1*-Knockdown unter allen Stimulanzen außer Etoposid eine Steigerung der c-IAP2-Expression. So lag das durchschnittliche relative c-IAP2-mRNA-Niveau der *icb-1*-downgeknockten MCF-7-Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) unter Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid und Dexamethason über demjenigen der Kontrollklone (MCF-7/con-Klone). Der Unterschied war allerdings nur unter Cycloheximid mit 121% der MCF-7/con-Klone ($p = 0.0495$) schwach signifikant.

3.3.3.4 XIAP

Ähnlich wie bei c-IAP1 und c-IAP2 manifestierte sich nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D und Camptothecin eine signifikante Reduktion der Expression von XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen (LMK) ($p < 0.001$). Unter Cycloheximid und Etoposid ergab sich demgegenüber eine signifikante Steigerung der XIAP-Expression gegenüber der LMK ($p < 0.01$).

Der *icb-1*-Knockdown bewirkte unter allen 6 Stimulanzen eine Steigerung der Expression von XIAP bei den MCF-7-Klonen. So lag das durchschnittliche relative XIAP-mRNA-Level der *icb-1*-downgeknockten Klone (MCF-7/*icb*KD-Klone) über demjenigen der Kontrollklone (MCF-/con-Klone). Signifikanz ergab sich unter Staurosporin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid [Tabelle 14; Abbildung 19].

Stimulans	icb-1 KD [in % der Kontrollklone]	p
Staurosporin	131	0.004
Actinomycin D	122	0.07
Camptothecin	109	0.4
Cycloheximid	241	0.02
Dexamethason	131	0.01
Etoposid	176	0.01

Tabelle 14 XIAP-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika. Aufgeführt sind die durchschnittlichen XIAP-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD-Klone (*icb-1* KD) in % der MCF-7/con-Klone (Kontrollklone) nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid. Signifikanz wird für $p < 0.05$ angenommen.

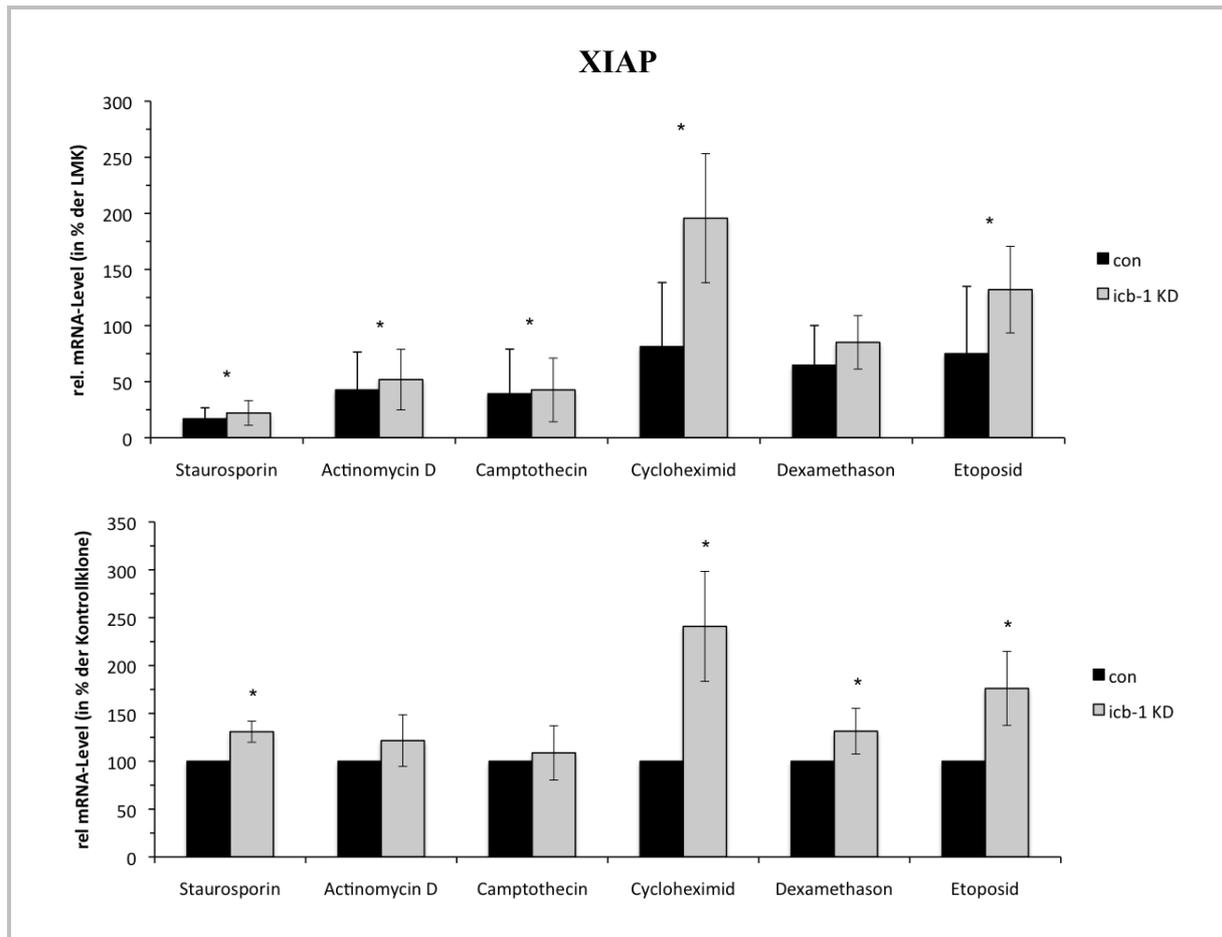


Abbildung 19 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1*-Knockdowns auf die XIAP-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Zytostatika

Oben sieht man die durchschnittlichen XIAP-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD-Klone (*icb-1* KD) in % der LMK (=unstimulierte MCF-7-Klone). Unten sind die durchschnittlichen XIAP-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD-Klone (*icb-1* KD) in % der MCF-7/*con*-Klone (*con*) dargestellt. Die Werte wurden nach Stimulation mit Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason und Etoposid erhoben. (n=4), oben *p<0.05 versus LMK, unten *p<0.05 versus *con*.

4 Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung

Viele Chemotherapeutika entfalten ihre zytostatische Wirkung über die Induktion von Apoptose. Schwerpunkt zahlreicher moderner Studien ist deshalb die Identifizierung von Genen, die Einfluss auf die Apoptose maligner Zellen und damit einhergehend auf deren Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Chemotherapeutika üben, mit dem Ziel, die zytostatische Wirksamkeit dieser Substanzen positiv zu beeinflussen. Im Zuge der vorliegenden Dissertation sollte geklärt werden, ob es sich bei dem humanen Gen *icb-1*, für das bereits eine Rolle in in-vitro Proliferations- und Differenzierungs- sowie Wachstums- und Progressionsprozessen von gynäkologischen Tumorzellen beschrieben wurde, um ein solches Gen handelt.

In der Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse bestätigt sich, dass *icb-1* die Apoptose gynäkologischer Tumorzellen beeinflusst. So bewirkt der Knockdown von *icb-1* insbesondere bei Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine Herabsetzung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Apoptoseinduktoren, was sich auf Zellebene in einer verminderten apoptotischen Aktivität sowie damit einhergehend in einer erhöhten Anzahl vitaler MCF-7-Klone gegenüber MCF-7-Klonen mit normaler *icb-1*-Expression zeigt. Bei den Krebszelllinien SK-OV-3 (Ovarialkarzinom) und HEC-1B (Endometriumkarzinom) bestätigt sich diese proapoptotische Wirkung von *icb-1* teilweise auch. Auf molekularer Ebene scheint bei den MCF-7-Klonen in diesem Zusammenhang eine veränderte Expression der Apoptose-assoziierten Gene XAF1, XIAP und AIF von Bedeutung zu sein.

4.2 Apoptoseinduktion und antiproliferative Wirkung der Stimulanzen bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen

Die in den Versuchsreihen verwendeten Stimulanzen Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin, Cycloheximid, Dexamethason, Etoposid und Tamoxifen gelten als mehr oder weniger potente Apoptoseinduktoren und Proliferationshemmer. Sie entfalteten ihre Wirkung in Abhängigkeit von eingesetzter Konzentration, Messzeitpunkt und behandelter Zellart unterschiedlich stark. Bei verschiedenen Wirkmechanismen ist allen Stimulanzen die Aktivierung der Effektorcaspase-3 und/oder -7 gemein, deren Aktivität als Maß für die

Apoptose detektiert wurde [Mandlekar & Kong 2001; Marchetti et al. 2003; Rodríguez-Hernández et al. 2006; Wang et al. 2007a; Manns et al. 2011; Babu et al. 2012; Zhang & Huang 2013].

Der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin gilt als einer der am häufigsten eingesetzten Apoptoseinduktoren, da er hochpotent bei malignen Zellen unterschiedlicher Entität wirkt [Bernard et al. 2001; Zhang et al. 2004; Sarkar et al. 2009]. Auch bei den in den Versuchsreihen eingesetzten Krebszelllinien MCF-7, SK-OV-3 und HEC-1B induzierte Staurosporin Apoptose und damit einhergehend Proliferationshemmung. Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde Staurosporin bereits mehrfach erfolgreich als Apoptoseinduktor eingesetzt [Tang et al. 2000; Mooney et al. 2002; Xue et al. 2003; Vasaturo et al. 2005]. Für die Krebszelllinien SK-OV-3 (Ovarialkarzinom) und HEC-1B (Endometriumkarzinom) finden sich hingegen in der Literatur keine Studien zur Apoptoseinduktion durch Staurosporin. Lediglich bei anderen ovariellen und endometrialen Krebszelllinien wurde diese Wirkung bereits beschrieben [Cartee et al. 1998; Wan et al. 2002]. Ein signifikanter Effekt auf Apoptose und Proliferation manifestierte sich bei allen 3 Krebszelllinien unter Staurosporinkonzentrationen von 100 und insbesondere 1000nM, in niedrigeren Konzentrationen bewirkte Staurosporin hingegen kaum Veränderungen gegenüber den unstimulierten Zellklonen. In einem Großteil der Studien, in denen Staurosporin als Apoptoseinduktor bei Mamma-, Ovarial- oder Endometriumkarzinomzellen verwendet wurde, waren ähnlich hohe Konzentrationen wirksam. Xue et al. beispielsweise berichten von erfolgreicher Apoptoseinduktion bei MCF-7-Zellen unter Staurosporinkonzentrationen von 150-1000nM [Xue et al. 2003]. Cartee et al. setzten 1000nM-Staurosporin erfolgreich bei Ovarialkarzinomzellen ein [Cartee et al. 1998]. Dies lässt vermuten, dass Staurosporin sein Wirkoptimum als Apoptoseinduktor im Bereich um 1000nM entfaltet. Bereits 4h nach Stimulation mit diesen Staurosporinkonzentrationen zeigte sich bei allen 3 Krebszelllinien – insbesondere bei MCF-7 und SK-OV-3 – eine signifikante Apoptoseinduktion, da Staurosporin bereits nach 1-2h seine Apoptose-induzierende Wirkung entfaltet [Waibel et al. 2007]. Die Zellklone der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B präsentierten sich am wenigsten sensibel gegenüber Staurosporin.

Auch nach Stimulation mit Actinomycin D, einem im klinischen Kontext für verschiedene Malignome eingesetzten Zytostatikum, manifestierte sich 4h nach Stimulation erst unter höheren Konzentrationen (1-10 μ M) eine signifikante Apoptoseinduktion bei den MCF-7-,

SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen. In der Literatur finden sich nur wenige Studien zur Apoptoseinduktion durch Actinomycin D bei Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen insgesamt und bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Zellen im Speziellen. In einer Studie von Huang & Lee mit MCF-7-Zellen wurde Actinomycin D in einer Konzentration von $4\mu\text{M}$ eingesetzt und Messungen nach 5h durchgeführt, wobei sich eine signifikante Steigerung der apoptotischen Aktivität zeigte [Huang & Lee 2008]. Choong et al. fanden zudem heraus, dass niedrigere Actinomycin D-Konzentrationen ($0,001-0,1\mu\text{M}$) nach 16h nur minimalen Einfluss auf die Apoptose maligner Zellen hatten, während die Zellen nach 40h signifikant höhere apoptotische Aktivität als die unbehandelten Zellen zeigten [Choong et al. 2009]. Dies lässt vermuten, dass Actinomycin D in höheren Konzentrationen von $1-5\mu\text{M}$ bereits nach wenigen Stunden Apoptose-induzierend wirkt, sich die apoptotische Aktivität der behandelten Zellen unter geringeren Actinomycin D-Konzentrationen hingegen erst zu einem späteren Zeitpunkt verändert. Anders als beim Apoptoseverhalten wirkten bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen bereits geringere Actinomycin D-Konzentrationen ($0,01-0,1\mu\text{M}$) nach 48 und 72h antiproliferativ. Dies könnte zum einen mit einer verzögerten Apoptose-induzierenden Wirkung, zum anderen mit einem hemmenden Effekt auf verschiedene Stadien des Zellzyklus – wie von Choong et al. beschrieben – zusammenhängen [Choong et al. 2009].

Die Stimulation mit Camptothecin, einem Inhibitor der Topoisomerase I, rief in den Apoptoseversuchen in Konzentrationen von $0,2$ und insbesondere $2\mu\text{M}$ nach 4h eine signifikante Steigerung der apoptotischen Aktivität bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen hervor. Neben Studien zur potenten Apoptose-induzierenden Wirkung von Camptothecin bei nicht-gynäkologischen Tumorzellen wurde diese Wirkung auch mehrfach bei den Mamma- und Ovarialkarzinomzellen MCF-7 und SK-OV-3 beschrieben [Gao & Scott 2003; Arakawa et al. 2009; Zhou et al. 2010]. Zur apoptotischen Aktivität nach Stimulation passte auch das Proliferationsverhalten der MCF-7- und SK-OV-3-Klone. Es manifestierte sich eine signifikante Proliferationshemmung durch die Stimulation mit Camptothecin nach 48 und 72h. Diese Wirkung zeigte sich auch unter niedriger Camptothecinkonzentration ($0,02\mu\text{M}$). Früher Messzeitpunkt der apoptotischen Aktivität und der Einfluss von Camptothecin auf den Zellzyklus könnten in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. Demgegenüber zeigte Camptothecin bei den HEC-1B-Klonen kaum Apoptose-induzierende Wirkung. In einer aktuellen Studie von Lin et al. wurden ähnliche Camptothecinkonzentrationen ($0,05-1\mu\text{M}$) zur Apoptoseinduktion bei HEC-1B-Zellen eingesetzt, allerdings wurde die apoptotische Aktivität

der Zellen erst nach 24 und 48h gemessen [Lin et al. 2014]. Dass sich zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Apoptoseinduktion durch Camptothecin zeigte, lässt vermuten, dass mit 4h nach Stimulation der Messzeitpunkt in den Apoptoseversuchen zu früh gewählt war, um die apoptotische Aktivität der HEC-1B-Klone zu erfassen. Dazu passt auch die signifikante Proliferationshemmung nach 72h unter hochkonzentriertem Camptothecin. Da sich die HEC-1B-Klone auch resistent gegenüber dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid zeigten, könnte auch die Aktivität der Topoisomerasen bei den HEC-1B-Zellen eine Rolle spielen.

Auch für Cycloheximid, einem antibiotischen Translationsinhibitor, ist eine Apoptose-induzierende Wirkung bei verschiedenen benignen und malignen Zellarten nachgewiesen, die sich bereits in verschiedenen Studien zunutze gemacht wurde [Ishii et al. 1995; Baskić et al. 2006; Kumagai et al. 2009; Babu et al. 2012]. Allerdings fanden sich in der Literatur kaum Untersuchungen zur Apoptose-induzierenden Wirkung von Cycloheximid bei den in den Versuchsreihen verwendeten Krebszelllinien MCF-7, SK-OV-3 und HEC-1B oder bei gynäkologischen Tumorzellen gleicher Entität. Cycloheximid induzierte in Konzentrationen von 10 und insbesondere 100 μ M signifikant Apoptose und Proliferationshemmung. Collins et al. nennen in einer Untersuchung mit Lymphozyten Cycloheximidkonzentrationen von 100-10000 μ M als signifikant Apoptose-induzierend [Collins et al. 1991]. Das Wirkoptimum könnte auch bei den gynäkologischen Tumorzellen in diesem Bereich liegen, also etwas höher als die eingesetzten Konzentrationen. Dazu passt, dass die SK-OV-3-Klone erst unter 100 μ M-Cycloheximid eine signifikante Steigerung der apoptotischen Aktivität gegenüber den unstimulierten Zellklonen zeigten. Die signifikanten Veränderungen zeigten sich bereits 4h nach Stimulation mit Cycloheximid. Die Studienlänge zum Messzeitpunkt ist allerdings sehr inkonsistent. So sprechen Ledda-Columbano et al. von signifikanter Apoptoseinduktion bei Leberzellen bereits nach 2h [Ledda-Columbano et al. 1992]. Ishii et al. hingegen nennen 12h nach Stimulation als geeigneten Messzeitpunkt bei Lymphomzellen [Ishii et al. 1995].

Glukokortikoide beeinflussen die Apoptose über Bindung an sogenannte Glukokortikoidrezeptoren [Fearnhead et al. 1994]. Wie vergangene Studien zeigen, kann der in den Versuchsreihen eingesetzte Vertreter dieser Wirkstoffgruppe Dexamethason in Abhängigkeit von Zelltyp und eingesetzter Konzentration pro- oder antiapoptotisch wirken [Kull 1988; Tian & Gazitt 1996; Weller et al. 1997; Messmer et al. 2000; Distelhorst 2002; Cinque et al. 2008]. Die Stimulation der MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klone mit 0,1-, 1- und 10 μ M-Dexamethason führte nur zu einer geringfügigen Steigerung der apoptotischen

Aktivität gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen. Ferner zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das Proliferationsverhalten der MCF-7-Klone. Messmer et al. fanden heraus, dass niedrig-konzentriertes Dexamethason ($0,01\mu\text{M}$) inhibitorisch auf die zuvor durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte Apoptose von MCF-7-Zellen wirkt, diese Wirkung aber mit zunehmender Konzentration ($0,1\mu\text{M}$) abnimmt [Messmer et al. 2001]. Ähnliches scheint für die Dexamethasonwirkung bei SK-OV-3-Zellen zu gelten. So konnten Chen et al. zeigen, dass Dexamethason deren Resistenz gegenüber den Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika Cisplatin und Paclitaxel verstärkt [Chen et al. 2006]. Zur Apoptoseinduktion durch Dexamethason bei HEC-1B- oder anderen Endometriumkarzinomzellen finden sich keine aktuellen Untersuchungen. Da sich die apoptotische Aktivität nach Stimulation aber bei allen 3 Krebszelllinien fast identisch verhielt, bleibt zu vermuten, dass Dexamethason hier ähnlich wie bei den MCF-7- und SK-OV-3-Zellen wirkt.

Der Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid bewirkte nur bei den SK-OV-3-Klonen in hoher Konzentration ($100\mu\text{M}$) nach 4h eine signifikante Apoptoseinduktion gegenüber den unstimulierten Zellklonen. Da die erfolgreiche Apoptoseinduktion durch Etoposid bei MCF-7-Zellen bereits mehrfach beschrieben wurde [Fattmann et al. 2001; Yang et al. 2001; Cosse et al. 2007], ist zu vermuten, dass eingesetzte Konzentrationen und Messzeitpunkt eine Rolle spielten. Cosse et al. setzten beispielsweise mit $50\mu\text{M}$ eine ähnliche Etoposidkonzentration ein, wählten aber mit 16h nach Stimulation einen deutlich späteren Messzeitpunkt [Cosse et al. 2007]. Einen ähnlichen Messzeitpunkt wählten Yang et al. mit 18h nach Stimulation. Zudem setzten sie Etoposidkonzentrationen von bis zu $400\mu\text{M}$ ein [Yang et al. 2001]. Demgegenüber kam es zu einer signifikanten Proliferationshemmung bei den MCF-7- und SK-OV-3-Klonen unter allen Etoposidkonzentrationen ($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$), für die zum einen Apoptoseinduktion, zum anderen Hemmung der Zytokinese durch Etoposid in Frage kommen. Die HEC-1B-Klone waren resistent gegenüber Etoposid, es ergaben sich keine Veränderungen in der apoptotischen Aktivität oder der Anzahl vitaler Zellklone gegenüber den unstimulierten Zellklonen. Da auch der Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin keine Wirkung auf die HEC-1B-Klone zeigte, könnte die Aktivität der Topoisomerasen bei diesem Zelltyp eine Rolle spielen.

Tamoxifen, ein selektiver Östrogenrezeptormodulator, wirkte vor allem in hoher Konzentration ($25\mu\text{M}$) signifikant Apoptose-induzierend. Es entfaltete die stärkste Apoptose-induzierende Wirkung bei den Östrogenrezeptor-positiven MCF-7-Klonen, weniger bei den

SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen. Unter dieser Tamoxifenkonzentration zeigte sich damit einhergehend bei allen 3 Krebszelllinien eine massive Proliferationshemmung, insbesondere 24 und 48h nach Stimulation. 10 μ M-Tamoxifen wirkte nach 72h ebenfalls signifikant antiproliferativ auf alle 3 Krebszelllinien. Studien belegen, dass Tamoxifen auch in einer Konzentration von 10 μ M Apoptose-induzierend wirkt. Allerdings wurde meist ein späterer Messzeitpunkt als in den Apoptoseversuchen beschrieben gewählt, um die Apoptose-induzierende Wirkung von Tamoxifen zu detektieren. Zhang et al. beispielsweise maßen nach 48h eine signifikante Steigerung der apoptotischen Aktivität, ebenso de Medina et al. [Zhang et al. 1999; de Medina et al. 2009]. Dies lässt vermuten, dass der Messzeitpunkt mit 4h nach Stimulation zu früh gewählt war, um die Apoptose-induzierende Wirkung von 10 μ M-Tamoxifen zu erfassen.

4.3 Expression Apoptose-assoziiierter Gene bei stimulierten MCF-7-Klonen

Um die bei den MCF-7-Klonen im Zuge der Apoptose- und Proliferationsversuche detektierte Apoptoseinduktion weiter zu verifizieren, wurde in einem nächsten Schritt die Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Gene nach Stimulation der MCF-7-Klone mittels Real-Time qPCR gemessen.

Während Staurosporin, Actinomycin D, Camptothecin und Cycloheximid in den Zellkulturexperimenten 4h nach Stimulation signifikant Apoptose induzierten, blieb diese Wirkung unter Dexamethason und Etoposid aus [vgl. 4.1]. Es zeigten sich teilweise dazu passende Veränderungen der Genexpression, teilweise wichen die Ergebnisse von den durch die Apoptose- und Proliferationsversuche sowie durch Ergebnisse vergangener Studien geschürten Erwartungen ab.

Staurosporin induziert Apoptose auf zweierlei Weise, zum einen klassisch über die rasche Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, zum anderen über einen neuen intrinsischen Weg, der unabhängig von Apaf-1 und Bcl-2 abläuft [Manns et al. 2011]. Proteine der Bcl-2-Familie wirken auf den mitochondrialen intrinsischen Apoptosesignalweg ein und beeinflussen die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem Mitochondrium, wobei Bcl-2 hemmend, Bax und Bak hingegen stimulierend wirken [Chao & Korsmeyer 1998]. Während Mooney et al. keinen Einfluss von Staurosporin auf die Bcl-2-Expression bei

MCF-7-Zellen detektierten (Mooney et al. 2002), manifestierte sich in den Expressionsversuchen eine signifikante Reduktion der Bcl-2-Expression durch Staurosporin. Dieses Ergebnis postuliert einen Einfluss von Bcl-2 und passt zu einer neueren Studie von Manns et al. [Manns et al. 2011]. Demgegenüber hatte Staurosporin – ähnlich wie in den Untersuchungen von Mooney et al. – bei den MCF-7-Klonen keinen positiven Einfluss auf die Bax- und Bak-Expression [Mooney et al. 2002]. Die Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion durch AIF (*apoptosis-inducing factor*) scheint unter Staurosporin ebenfalls keine Rolle zu spielen [Lorenzo et al. 1999; Susin et al. 1999]. So zeigte sich in den Expressionsversuchen eine signifikante Reduktion der AIF-Expression gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen. Die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 hemmen Apoptose über direkte Interaktion mit der Caspase-3, -7 und -9 [Deveraux & Reed 1999]. Im Unterschied zu einer zurückliegenden Untersuchung mit Neuronen, in der die Stimulation mit Staurosporin zu einer signifikanten Abnahme der c-IAP1- und -2-, nicht aber der XIAP-Expression führte [Maycotte et al. 2008], wurde bei den MCF-7-Klonen die XIAP-Expression signifikant herunterreguliert. Wie bereits erwähnt aktiviert Staurosporin neben dem klassischen mitochondrialen auch über einen Apaf1- und Bcl-2-unabhängigen Signalweg die Caspase-9 [Manns et al. 2011]. Die verminderte Expression von XIAP als direktem Inhibitor der Caspase-9 könnte hier eine Rolle spielen [Shiozaki et al. 2003]. XAF1 (*XIAP-associated factor 1*), der über direkte Hemmung von XIAP Apoptose-induzierend wirkt [Liston et al. 2001], wurde nach Stimulation mit Staurosporin signifikant weniger exprimiert als bei den unstimulierten MCF-7-Klonen. Staurosporin scheint also nicht über die Induktion der XAF1-Expression die XIAP-Expression zu beeinflussen, sondern direkt auf die XIAP-Expression einzuwirken.

Auch Actinomycin D entfaltet seine Apoptose-induzierende Wirkung über den mitochondrialen intrinsischen Signalweg [Bock et al. 2002; Wang et al. 2007a; Jin et al. 2012]. Bei den MCF-7-Klonen manifestierte sich unter Actinomycin D eine signifikante Reduktion der Bcl-2-Expression, nicht jedoch eine signifikante Veränderung der Expression von Bax und Bak. Während sich aktuelle Studien mit anderen Zelltypen einheitlich für einen Einfluss von Actinomycin D auf die Bcl-2-Expression aussprechen, so sind die Ergebnisse zur Bax-Expression uneinheitlich. Jin et al. sprechen beispielsweise von einer gesteigerten Expression von p53 und Bax durch Actinomycin D, wohingegen Merkel et al. eine p53-unabhängige Apoptoseinduktion durch Actinomycin D beschreiben [Jin et al. 2012; Merkel et al. 2012]. Entgegen einer Studie von Wang et al. mit Neuroblastomzellen übte Actinomycin D

in den Expressionsversuchen keinen Einfluss auf die AIF-Expression der MCF-7-Klone [Wang et al. 2007a]. Der Caspase-unabhängige Apoptosesignalweg über AIF scheint also hier nicht von Bedeutung zu sein. Wie bereits in Studien mit anderen Zelltypen beschrieben, wurde auch bei den MCF-7-Klonen die XIAP-Expression durch Actinomycin D signifikant herunterreguliert [Ng et al. 2002; Yoshimura et al. 2006]. XIAP scheint also auch hier von Bedeutung zu sein.

Camptothecin entfaltet seine Apoptose-induzierende Wirkung über den mitochondrialen intrinsischen Signalweg, wobei die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung von Caspasen von zentraler Bedeutung sind [Sánchez-Alcázar et al. 2000; Yuan et al. 2002]. In diesem Zusammenhang scheinen bei den MCF-7-Zellen – anders als bei Staurosporin und Actinomycin D – neben Bcl-2 auch Bax und Bak eine Rolle zu spielen. So wurde die Bcl-2-Expression der MCF-7-Klone nach Stimulation signifikant herunterreguliert während Bax und Bak signifikant stärker exprimiert wurden. Die Wirkungsentfaltung von Camptothecin bei MCF-7-Zellen über Beeinflussung der Bcl-2- und Bax-Expression wurde bereits in einer Studie von Leung und Wang beschrieben [Leung & Wang 1999]. Zur Bedeutung von Bak für die Camptothecin-induzierte Apoptose bei MCF-7-Zellen finden sich in der Literatur hingegen keine Untersuchungen. Nur bei Leukämiezellen wurde der Einfluss von Camptothecin auf die Bak-Expression bereits gezeigt [Ullmannová & Haskovec 2004]. Die für Camptothecinderivate neben der Cytochrom C-Freisetzung beschriebene Bedeutung von AIF als Caspase-unabhängiger Apoptoseinduktor konnte für Camptothecin bei den MCF-7-Zellen nicht bestätigt werden [Fu et al. 2006; Chu et al. 2014]. So senkte Camptothecin signifikant die AIF-Expression der MCF-7-Klone. Ähnliches zeigte sich für den Apoptoseinhibitor XIAP. Zu dessen Rolle in der Apoptoseinduktion durch Camptothecin bei MCF-7-Zellen finden sich in der Literatur keine Studien. Bei anderen Zelltypen wurde hingegen bereits ein hemmender Einfluss von Camptothecin auf die XIAP-Expression beschrieben [Mizutani et al. 2006]. Ähnliches gilt mutmaßlich auch für MCF-7-Zellen. XAF1, der direkte Inhibitor von XIAP, scheint in diesem Zusammenhang aber keine Rolle zu spielen, da seine Expression durch Camptothecin in den Expressionsversuchen nicht positiv beeinflusst wurde.

Die genauen Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Cycloheximid sind bisher noch unzureichend geklärt. Das Protein cFlip scheint aber neueren Untersuchungen zufolge eine bedeutende Rolle zu spielen. Es hemmt Apoptose, indem es anstelle von Caspase-8 an FADD

bindet [Krueger et al. 2001]. Cycloheximid wirkt inhibitorisch auf dessen Expression und induziert so Apoptose [Santiago et al. 2004; Jeon et al. 2005; Pajak et al. 2005; Fischer-Posovszky et al. 2011]. Zudem scheint Cycloheximid über die Freisetzung von ROS und die Beeinflussung des Tumorsuppressors p53 zu wirken [Ito et al. 2006; Jin et al. 2008; Zhao et al. 2011]. Dass Cycloheximid bei den MCF-7-Klonen die Bcl-2-Expression herunter- und die Bax-Expression heraufregulierte, postuliert zudem eine Bedeutung dieser beiden Proteine, was sich mit einer Studie von Yu et al. mit Astrozyten deckt [Yu et al. 2003]. Weder die Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion durch AIF noch die direkte Beeinflussung der Caspaseaktivität durch XIAP scheinen hingegen bei der Cycloheximid-induzierten Apoptose der MCF-7-Zellen von Bedeutung zu sein, da deren Expression nicht signifikant beeinflusst wurde.

Wie nach den Ergebnissen der Zellkulturexperimente zu erwarten, ergaben sich unter Dexamethason und Etoposid keine signifikanten Veränderungen der Expression der Apoptose-assoziierten Gene Bcl-2, Bax, Bak, AIF und XIAP. Da beide Substanzen – wie in vielen Studien beschrieben – auf den mitochondrialen intrinsischen Signalweg Einfluss üben und im Zuge dessen die Expression der Proteine der Bcl-2-Familie, AIF und IAPs beeinflussen, bestätigt dieses Ergebnis die fehlende Apoptose-induzierende Wirkung von Dexamethason und Etoposid bei den MCF-7-Klonen [Messmer et al. 2001; Jacobs et al. 2006; Thomadaki et al. 2006; Hajji et al. 2008; Zhang & Huang 2013; Zaman et al. 2014]. Da auch die AIF-Expression unbeeinflusst blieb scheint auch die Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion, die in den Zellkulturexperimenten nicht detektiert worden wäre, keine Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese aus den Zellkulturexperimenten und lassen vermuten, dass die eingesetzten Stimulanzienkonzentrationen und der Messzeitpunkt beziehungsweise der Zeitpunkt der RNA-Isolation die entscheidenden Faktoren für die fehlende Apoptoseinduktion durch Dexamethason und Etoposid darstellten.

4.4 Proapoptotische Wirkung von *icb-1* bei MCF-7-, SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen

In den Zellkulturexperimenten konnte die Hypothese, dass *icb-1* eine Rolle in der Apoptose gynäkologischer Tumorzellen spielt, teilweise bestätigt werden.

Insbesondere bei den Klonen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bewirkte der Knockdown von *icb-1* eine Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber der Mehrzahl der eingesetzten Apoptose-induzierenden Stimulanzen. Dies zeigte sich in einer signifikant niedrigeren Caspase-7-Aktivität und damit einhergehend einer signifikant höheren Anzahl vitaler MCF-7-Klone gegenüber den unstimulierten MCF-7-Klonen. Die Krebszelllinie MCF-7 wurde bereits vielfach verwendet, um verschiedene Aspekte im Kontext der Apoptose wie – ähnlich der Fragestellung dieser Arbeit – den Einfluss spezieller Genprodukte zu untersuchen [Shoshani et al. 2002; Boulaiz et al. 2003; Hosokawa et al. 2005; Sadasivam et al. 2005; Xu et al. 2005; Wang et al. 2007b; Wu et al. 2009; Guo et al. 2012; Park et al. 2014a+b; Wang et al. 2014]. Sie scheint also zuverlässig die Darstellung von Wirkmechanismen und Einflussfaktoren der Apoptose zu ermöglichen. Die proapoptotische Wirkung von *icb-1* manifestierte sich unter 100- und 1000nM-Staurosporin, 1µM-Actinomycin D, 20-, 200- und 2000nM-Camptothecin, 10µM-Cycloheximid und 25µM-Tamoxifen, also unter den Stimulanzenkonzentrationen, die signifikant Apoptose-induzierend und antiproliferativ wirkten [vgl. 4.1; Abbildungen 7+8]. Nur bei der Proliferation unter 25µM-Tamoxifen zeigte sich keine signifikante Veränderung durch den *icb-1*-Knockdown, was mit der massiven antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und damit einhergehend sehr geringen Anzahl vitaler MCF-7-Klone (wenige % im Vergleich zu den unstimulierten MCF-7-Klonen) zusammenhängen könnte. Allen 5 Stimulanzen gemein ist, dass sie über Aktivierung des mitochondrialen intrinsischen Signalwegs Apoptose-induzierend wirken [Fulda et al. 2000; Mandlekar & Kong 2001; Manns et al. 2011; Jin et al. 2012; Zhang & Huang 2013]. Dies lässt vermuten, dass *icb-1* hier Einfluss übt. Unter Dexamethason und Etoposid ließ sich die proapoptotische Wirkung von *icb-1* nicht reproduzieren. Auch sie wirken über den mitochondrialen intrinsischen Apoptosesignalweg [Marchetti et al. 2003; Zhang & Huang 2013], hier scheint also nicht die Ursache für die fehlende Wirkung von *icb-1* zu liegen. Vielmehr fiel auf, dass sie in den eingesetzten Konzentrationen nach 4h keine signifikante Apoptose-induzierende Wirkung bei den MCF-7-Klonen entfalteten, wobei Konzentration und Messzeitpunkt hierfür von Bedeutung sein könnten [vgl. 4.1]. Hier liegt mutmaßlich die fehlende Wirkung von *icb-1*

begründet. Dazu passt, dass bei signifikanter Proliferationshemmung durch 10- und 100µM-Etoposid nach 48 und 72h *icb-1* diese Wirkung signifikant verstärkte, was mit einer vermehrten Apoptoseinduktion zusammenhängen könnte [Abbildung 8].

Die durch die Ergebnisse mit den MCF-7-Klonen postulierte Rolle von *icb-1* als Tumorsuppressorgen konnte in den Versuchsreihen mit der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 und der Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1B teilweise bestätigt werden. *Icb-1* entfaltete bei den SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen unter Staurosporin und Actinomycin D eine proapoptotische und damit einhergehend antiproliferative Wirkung. Unter den anderen Stimulanzen ergaben sich hingegen keine signifikanten beziehungsweise inkonsistent signifikante Unterschiede zwischen *icb-1*-downgeknockten Zellklonen und solchen mit normaler *icb-1*-Expression. Im Vergleich zur Mammakarzinomzelllinie MCF-7 finden sich in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Apoptose mit SK-OV-3- und HEC-1B-Zellen. Insbesondere letztere wurden kaum verwendet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sowohl SK-OV-3- als auch HEC-1B-Zellen weniger geeignet sind, spezielle Aspekte der Apoptose zuverlässig zu untersuchen. Dazu passt, dass die SK-OV-3- und insbesondere die HEC-1B-Klone insgesamt weniger sensitiv auf die Stimulation mit den verschiedenen Apoptoseinduktoren reagierten als die MCF-7-Klone. Mutmaßlich könnten eine verminderte Caspasenaktivität oder eine veränderte Expression Apoptose-assoziiierter Gene im Vergleich zu den MCF-7-Zellen dafür ursächlich sein. Unter Tamoxifen könnte zudem der Östrogenrezeptorstatus der Krebszelllinien eine Rolle spielen, da nur die MCF-7-Zellen als uneingeschränkt Östrogenrezeptor-positiv gelten [Brandes & Hermonat 1983; Gong et al. 1994; Hua et al. 1995; Lau et al. 1999; Acconcia et al. 2006; Zhang et al. 2006]. Hierzu finden sich in der Literatur aber keine nützlichen Studien. Es wären also dies bezüglich weiterführende Untersuchungen nötig. Weiterhin könnte der schlechtere *icb-1*-Knockdown der SK-OV-3- und HEC-1B-Klone im Vergleich zu den MCF-7-Klonen eine Rolle spielen [Abbildung 6].

4.5 Rolle von XAF1 und XIAP in der proapoptotischen Wirkung von *icb-1* bei stimulierten MCF-7-Klonen

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, ließ sich in den Versuchsreihen eine proapoptotische Wirkung von *icb-1* insbesondere bei Klonen der Krebszelllinie MCF-7 nachweisen. Weiterführend sollte die Frage geklärt werden, wie *icb-1* auf RNA-Ebene Einfluss übt.

Die Untersuchung der Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Gene mittels Real-Time qPCR ergab, dass nicht etwa Proteine der Bcl-2-Familie sondern der Tumorsuppressor XAF1 (*XIAP-associated factor 1*) und damit einhergehend das antiapoptotisch wirksame XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) von Bedeutung zu sein scheinen. So zeigte sich unter allen 6 eingesetzten Stimulanzen eine Reduktion der XAF1-Expression durch den *icb-1*-Knockdown, wobei die Unterschiede unter Camptothecin, Cycloheximid und Dexamethason signifikant waren. Die fehlende Signifikanz unter Staurosporin und Actinomycin D könnte mit der insgesamt massiven Reduktion der XAF1-Expression zusammenhängen [Abbildung 17]. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von Treeck et al. mit unstimulierten MCF-7-Klonen bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass der *icb-1*-Knockdown eine verminderte Expression verschiedener sogenannter Interferon-responsive-Gene, zu denen auch XAF1 gehört, bewirkt [Treeck et al. 2012]. Die dadurch postulierte positive Beziehung von *icb-1*- und XAF1-Expression wird durch die Erkenntnis gestützt, dass sowohl *icb-1* als auch XAF1 auf die Behandlung mit All-trans-Retinsäure (ATRA) und IFN γ hin vermehrt exprimiert werden [Treeck et al. 2005; Wang et al. 2006; Bai et al. 2008; Haselberger et al. 2011]. XAF1 gilt als Tumorsuppressor und wird in einer Vielzahl von Tumoren vermindert exprimiert [Liston et al. 2001; Lee et al. 2006; Micali et al. 2007; Qi et al. 2007; Yu et al. 2007; Sun et al. 2008; Kempkensteffen et al. 2009; Tu et al. 2009; Wang et al. 2009]. Es wirkt über die indirekte Aktivierung von Caspasen positiv auf die apoptotische Aktivität von Zellen, indem es den Apoptoseinhibitor XIAP hemmt [Liston et al. 2001]. Dies erklärt, warum XIAP in den Expressionsversuchen nach Stimulation mit 4 der 6 eingesetzten Apoptoseinduktoren von den *icb-1*-downgeknockten MCF-7-Klonen signifikant stärker exprimiert wurde als von den Klonen mit normaler *icb-1*-Expression [Abbildung 19]. Dass sich unter Actinomycin D und Camptothecin keine signifikanten Unterschiede ergaben, könnte mit den eingesetzten Stimulanzenkonzentrationen und/oder mit dem Zeitpunkt der RNA-Isolation zusammenhängen. Das Ergebnis der XIAP-Expression wird dadurch gestützt, dass sich eine weniger ausgeprägte aber ähnliche inhibitorische Wirkung von *icb-1* auch bei

den XIAP-Verwandten c-IAP1 und c-IAP2 beobachten ließ. XIAP entfaltet seine antiapoptotische Wirkung über direkte Hemmung insbesondere der Caspase-7 und -9 [Chai et al. 2001; Shiozaki et al. 2003; Scott et al. 2005; Abbildung 20]. MCF-7-Zellen gelten als Caspase-3-defizient, was die Bedeutung der Caspase-7 als Effektorcaspase deutlich erhöht [Blanc et al. 2000; Kagawa et al. 2001]. Das Zytostatikum Staurosporin wirkt über Aktivierung der Initiatorcaspase-9 Apoptose-induzierend, zum einen klassisch über die Freisetzung von Cytochrom C, zum anderen davon unabhängig, möglicherweise über die Hemmung der XIAP-Expression [Manns et al. 2011]. Dies könnte erklären, warum *icb-1* über Induktion der XAF1- und in der Folge Inhibition der XIAP-Expression vor allem bei den MCF-7-Klonen seine proapoptotische Wirkung entfaltete und warum *icb-1* insbesondere die Apoptose-induzierende Wirkung von Staurosporin verstärkte.

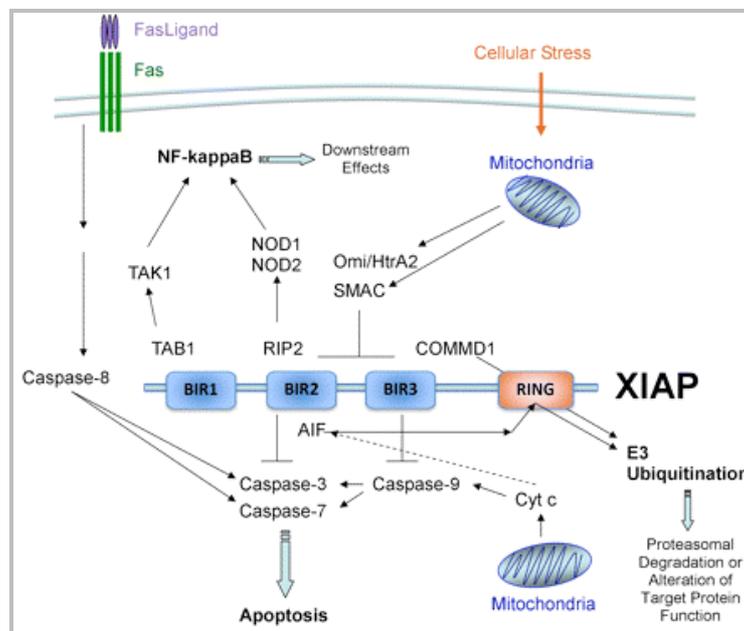


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Proteininteraktionen von XIAP

BIR2 inhibiert die Caspase-3 und -7, BIR3 die Caspase-9. Die Inhibition der Caspasen kann durch SMAC und Omi/HtrA2, die auf proapoptotische Stimuli hin aus dem Mitochondrium freigesetzt werden und mit BIR2 und BIR3 interagieren, aufgehoben werden. BIR1 und BIR2 interagieren außerdem mit TAB1 und RIP2. Die c-terminale RING-Domäne von XIAP hat E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion. Die XIAP-vermittelte Ubiquitination von Proteinen wie COMMD1 bewirkt seine proteosomale Zersetzung. Die Ubiquitination anderer Proteine wie AIF kann dazu dienen, die Funktion des Proteins zu verändern [Filipovich et al. 2010].

4.6 Einfluss von *icb-1* auf die Expression von AIF bei stimulierten MCF-7-Klonen

Neben den Veränderungen der XAF1- und XIAP-Expression fiel in den Versuchsreihen auf, dass der *icb-1*-Knockdown die Expression des Apoptoseinduktors AIF (*apoptosis-inducing factor*) induzierte. So zeigte sich unter 5 der 6 eingesetzten Stimulanzen ein signifikant höheres AIF-mRNA-Level der MCF-7/*icb*KD- gegenüber den MCF-7-/con-Klonen. AIF gilt als Caspase-unabhängiger Apoptoseinduktor [Lorenzo et al. 1999; Susin et al. 1999]. Auf einen proapoptotischen Stimulus hin wandert es von der Mitochondrienmembran in den Nucleus, wo es an die DNA bindet und direkt Apoptose-typische morphologische Veränderungen induziert [Susin et al. 1999; Daugas et al. 2000; Ye et al. 2002]. Da AIF ähnlich wie *icb-1* und XAF-1 auf eine Behandlung mit All-trans-Retinsäure (ATRA) und IFN γ hin vermehrt exprimiert wird, wäre – anders als die Ergebnisse der Versuchsreihen postulieren – eine positive Beziehung von *icb-1*- und AIF-Expression zu erwarten gewesen [Karmakar et al. 2010]. In diesem Zusammenhang könnte die zweite Wirkung von AIF eine Rolle spielen. Denn neben seiner Bedeutung als Apoptoseinduktor wird AIF auch eine zellprotektive Funktion zugeschrieben. Während sein DNA-bindender Anteil die proapoptotische Wirkung vermittelt, scheint der Anteil mit Oxidoreduktaseaktivität in diesem Kontext nicht von Bedeutung zu sein [Miramar et al. 2001; Joza et al. 2001]. Vielmehr scheint er für Überleben und Vermehrung der Zelle sowie Erhaltung der mitochondrialen Membranintegrität verantwortlich zu sein [Klein et al. 2002; Bonni 2003; Porter & Urbano 2006; Joza et al. 2009; Hangen et al. 2010]. Mutmaßlich kommt *icb-1* in diesem Zusammenhang eine Rolle zu. Ob *icb-1* direkt oder indirekt auf die Expression von AIF einwirkt, lässt sich mit den durchgeführten Versuchsreihen nicht klären. Dass XIAP neben seiner direkten Wirkung auf Caspasen auch AIF zu beeinflussen scheint, legt aber nahe, dass *icb-1* die AIF-Expression indirekt über seinen Einfluss auf die XAF1- und XIAP-Expression inhibiert [Wilkinson et al. 2008; Lewis et al. 2011].

4.7 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Maligne Zellen entwickeln immer häufiger Mechanismen, der Apoptoseinduktion durch Zytostatika zu entgehen. (Multi)drug-resistente Malignome stellen die Behandler vor große Probleme. Die Identifizierung von Faktoren beziehungsweise Substanzen, die zur Überwindung der Resistenzen beitragen, ist deshalb Gegenstand zahlreicher aktueller Studien. Der mitochondriale intrinsische Apoptosesignalweg ist für die Wirkungsentfaltung vieler

Zytostatika von entscheidender Bedeutung. Häufig werden Resistenzen über Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 oder in Genen der Bcl-2-Familie entwickelt, die für die Signaltransduktion über das Mitochondrium eine wichtige Rolle spielen [el Rouby et al. 1993; Perego et al. 1996; Thomas et al. 1996; Iwadate et al. 1998; Sturm et al. 2003]. Dadurch gewinnen andere Faktoren der intrinsischen Signalkaskade wie die Caspasen-hemmenden IAPs an Bedeutung für die Empfindlichkeit maligner Zellen gegenüber Zytostatika [Schimmer et al. 2006]. Zudem rücken Caspase-unabhängige Apoptoseinduktoren wie AIF immer mehr in den Fokus [Lorenzo & Susin 2007].

Laut aktueller S3-Leitlinie gelten Taxane (Paclitaxel, Docetaxel) und Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin) sowie Cyclophosphamid als Chemotherapeutika der 1. Wahl für die Behandlung des Mammakarzinoms. Zudem wird der SERM Tamoxifen zur endokrinen Therapie bei prämenopausalen Frauen empfohlen [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG und DKH 2012; Kommission Mamma der AGO 2013a+c]. Alle 4 Wirkstoffgruppen entfalten ihre zytostatische Wirkung unter anderem – vermittelt über den mitochondrialen intrinsischen Signalweg – über die Caspase-abhängige Apoptoseinduktion [Perkins et al. 2000; Schwartz & Waxman 2001; Kallio et al. 2005; Yang et al. 2013]. Doch auch hier wird die Wirksamkeit bereits durch Resistenzen eingeschränkt. Ähnlich wie beim SCLC und beim Ovarialkarzinom könnte im Falle von Paclitaxel auch beim Mammakarzinom die Herunterregulation der XIAP-Expression zu deren Überwindung beitragen [Mao et al. 2007; Liu et al. 2011]. Ferner könnte, wie bereits für Paclitaxel, Doxorubicin und ein Cyclophosphamidderivat bei anderen Malignomen beschrieben, eine Aktivierung der Apoptose über Induktion der AIF-Expression erzielt werden [Strauss et al. 2008; Kim et al. 2010; Hunter et al. 2011]. Ähnliche Studien lassen sich auch zu Resistenzen gegenüber den gängigen Chemotherapeutika des Ovarial- und Endometriumkarzinoms Cisplatin und Adriamycin finden [Ma et al. 2009; Yang et al. 2010; Holt et al. 2011; Lopez et al. 2012; Li et al. 2013; Zhong et al. 2013; Farrand et al. 2014].

In diesem Zusammenhang könnte *icb-1* mit seinem Einfluss auf die XIAP- und AIF-Expression zukünftig eine wichtige Rolle als therapeutisches Zielgen zukommen. Für Tamoxifen konnte bereits gezeigt werden, dass *icb-1* proapoptotisch wirkt und somit dessen zytostatische Wirkung bei Mammakarzinomzellen steigert. Auch bei Tumorzellen anderer Entität und anderen Apoptose-induzierenden Zytostatika zeigt *icb-1* diese Wirkung. Eine zielgerichtete Regulation der *icb-1*-Expression könnte also dazu beitragen, die zytostatische

Wirkung verschiedener Chemotherapeutika zu verstärken und sogar Resistenzen zu überwinden, was einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der Therapie gynäkologischer Malignome darstellt.

4.8 Ausblick

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen geben Anlass zu weiterführenden Untersuchungen.

Zur Reproduktion und Ergänzung der Ergebnisse wäre die Detektion der Apoptose der MCF-7-Klone auf andere Weise zum Beispiel via Gelelektrophorese, Messung des mitochondrialen Membranpotenzials oder der DNA-Fragmentierung sinnvoll. Weiterhin wäre eine Wiederholung der Zellkulturexperimente mit HEC-1B- und SK-OV-3-Klonen mit höheren Stimulanzienkonzentrationen und/oder späterem Messzeitpunkt unter stärkerem *icb-1*-Knockdown von Interesse, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere gynäkologische Tumorentitäten zu bestätigen.

Zudem wäre ein Vergleich der Expression Apoptose-assoziiierter Gene sowie der Aktivität Apoptose-relevanter Caspasen zwischen den 3 Krebszelllinien hilfreich, um eventuelle Unterschiede und damit Zielfaktoren des Apoptoseapparats zu identifizieren.

Um die Auswirkungen der AIF-Expressionshemmung durch *icb-1* auf Apoptose und Proliferation der MCF-7-Zellen beurteilen zu können, wären Apoptoseversuche unter Ausschaltung der Caspasen sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Dem humanen Gen *icb-1* ("induced by contact to basement membrane 1") kommt eine Rolle in in-vitro Proliferations- und Differenzierungs- sowie Wachstums- und Progressionsprozessen von gynäkologischen Tumorzellen zu.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde nun die Bedeutung von *icb-1* für die Apoptose von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen untersucht. Hierfür wurde die apoptotische Aktivität von stimulierten Zellklonen mit *icb-1*-Knockdown und solchen mit normaler *icb-1*-Expression verglichen. Es wurden Krebszelllinien verwendet, die die genannten Tumorentitäten repräsentieren: MCF-7 (Mammakarzinom), SK-OV-3 (Ovarialkarzinom) und HEC-1B (Endometriumkarzinom). Vor Detektion der apoptotischen Aktivität wurden die Zellklone mit potenten Apoptose-induzierenden Zytostatika stimuliert. Die Apoptose wurde auf Zellebene direkt über Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität sowie indirekt über Proliferationsversuche gemessen. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression Apoptose-assoziiierter Gene nach Stimulation mittels Real-Time qPCR bestimmt.

Die Vermutung, dass *icb-1* auch in die apoptotischen Prozesse von gynäkologischen Tumorzellen eingreift, konnte in den Versuchsreihen auf verschiedenen Ebenen bestätigt werden. Insbesondere bei den MCF-7-Klonen steigerte *icb-1* die Empfindlichkeit gegenüber den meisten der eingesetzten Apoptoseinduktoren, es wirkte also proapoptotisch. Dass sich diese Ergebnisse teilweise auch bei den SK-OV-3- und HEC-1B-Klonen widerspiegeln, lässt die Vermutung zu, dass *icb-1* nicht nur bei bestimmten Gewebetypen, sondern generell diese Wirkung entfaltet. Auf molekulargenetischer Ebene scheinen XAF1 (*XIAP-associated factor 1*) und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) bei der Vermittlung der Apoptoseinduktion durch *icb-1* eine zentrale Rolle zu spielen. Möglicherweise kommt in diesem Zusammenhang auch dem Caspase-unabhängigen Apoptoseinduktor AIF (*apoptosis inducing factor*) eine Bedeutung zu.

Mit seiner proapoptotischen Wirkung könnte *icb-1* potentiell zur Verbesserung der Chemotherapiewirkung sowie zur Überwindung von Resistenzen gegenüber Zytostatika beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse geben somit Anlass für weitere Studien bezüglich der Rolle von *icb-1* als Tumorsuppressorgen und Chemosensitizer im Rahmen einer gerichteten Tumorthherapie.

Literaturverzeichnis

- Acconcia F, Barnes CJ, Kumar R (2006). Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology*. 147(3): 1203-12.
- Adams JM (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*. 17(20): 2481-95.
- Arakawa Y, Saito S, Yamada H, Aiba K (2009). Simultaneous treatment with camptothecin and valproic acid suppresses induction of Bcl-X(L) and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 14(9): 1076-85.
- Arnold AM, Whitehouse JM (1981). Etoposide: a new anti-cancer agent. *Lancet*. 2(8252): 912-5.
- Babu D, Soenen SJ, Raemdonck K, Leclercq G, De Backer O, Motterlini R, Lefebvre RA (2012). TNF- α /cycloheximide-induced oxidative stress and apoptosis in murine intestinal epithelial MODE-K cells. *Curr Pharm Des*. 18(28): 4414-25.
- Bai Y, Ahmad U, Wang Y, Li JH, Choy JC, Kim RW, Kirkiles-Smith N, Maher SE, Karras JG, Bennett CF, Bothwell AL, Pober JS, Tellides G (2008). Interferon-gamma induces X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 and Noxa expression and potentiates human vascular smooth muscle cell apoptosis by STAT3 activation. *J Biol Chem*. 283(11): 6832-42.
- Bao Q, Shi Y (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*. 14(1): 56-65.
- Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*. 30(11): 924-32.
- Bernard B, Fest T, Prétet JL, Mougin C (2001). Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ*. 8(3): 234-44.
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H (2006). Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist*. 11(5): 503-19.
- Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Jänicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A (2000). Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. 60(16): 4386-90.

- Bock J, Szabó I, Jekle A, Gulbins E (2002). Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. *Biochem Biophys Res Commun.* 295(2): 526-31.
- Boland EW (1958). 16a-Methyl corticosteroids; a new series of anti-inflammatory compounds; clinical appraisal of their antirheumatic potencies. *Calif Med.* 88(6): 417-22.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 85(6): 803-15.
- Bollmann J, Ortmann O, Treack O (2008). Expression of differentiation-associated gene *icb-1* is estrogen-responsive in ovarian and breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109(1-2): 16-21.
- Bonni A (2003). Neurodegeneration: A non-apoptotic role for AIF in the brain. *Curr Biol.* 13(1): R19-21.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, Adams JM, Strasser A (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 286(5445): 1735-8.
- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, García AM, Marchal JA, Ramos JL, Carrillo E, Vélez C, Aranega A (2003). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *Br J Cancer.* 89(1): 192-8.
- Burges A, Schmalfeldt B (2011). Ovarian cancer – diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 108 (38): 635-41.
- Brandes LJ, Hermonat MW (1983). Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res.* 43(6): 2831-5.
- Brouwer MC, McIntyre P, Prasad K, van de Beek D (2013). Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 6.
- Calabrò F, Albers P, Bokemeyer C, Martin C, Einhorn LH, Horwich A, Krege S, Schmoll HJ, Sternberg CN, Daugaard G (2012). The contemporary role of chemotherapy for advanced testis cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol.* 61(6): 1212-21.
- Caritas-Krankenhaus St. Josef (2013a). Forschung – Molekulare Onkologie [online]. URL: http://www.caritasstjosef.de/forschung/node_3375.htm [Stand: 14.07.2014].
- Caritas-Krankenhaus St. Josef (2013b). Forschungs-Projekte 2: icb-1 [online]. URL: http://www.caritasstjosef.de/forschung/node_3390.htm [Stand: 14.07.2014].

- Cartee L, Kucera GL, Willingham MC (1998). Induction of apoptosis by gemcitabine in BG-1 human ovarian cancer cells compared with induction by staurosporine, paclitaxel and cisplatin. *Apoptosis*. 3(6): 439-49.
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 104(5): 769-80.
- Chao DT, Korsmeyer SJ (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 16: 395-419.
- Chen YX, Wang Y, Fu CC, Diao F, Song LN, Li ZB, Yang R, Lu J (2006). Dexamethasone enhances cell resistance to chemotherapy by increasing adhesion to extracellular matrix in human ovarian cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 17(1): 39-50.
- Choong ML, Yang H, Lee MA, Lane DP (2009). Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle*. 8(17): 2810-8.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008). Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 151(1): 10-27.
- Chu C, Xu J, Cheng D, Li X, Tong S, Yan J, Li Q (2014). Anti-proliferative and apoptosis-inducing effects of camptothecin-20(s)-O-(2-pyrazolyl-1)acetic ester in human breast tumor MCF-7 cells. *Molecules*. 19(4):4941-55.
- Cinque B, Fanini D, Di Marzio L, Palumbo P, La Torre C, Donato V, Velardi E, Bruscoli S, Riccardi C, Cifone MG (2008). Involvement of cPLA2 inhibition in dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 21(3): 539-51.
- Clemens MJ, Bushell M, Morley SJ (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene*. 17(22): 2921-31.
- Cole MP, Jones CT, Todd ID (1971). A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer*. 25(2): 270-5.
- Collins RJ, Harmon BV, Souvlis T, Pope JH, Kerr JF (1991). Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer*. 64(3): 518-22.
- Cory S, Adams JM (2002). The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2(9): 647-56.
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22(53): 8590-607.

- Cosse JP, Sermeus A, Vannuvel K, Ninane N, Raes M, Michiels C (2007). Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines. *Mol Cancer*. 6: 61.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 67(4): 2168-74.
- Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, Forbes JF, ATAC/LATTE investigators (2010). Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 11(12): 1135-41.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 14(5): 729-39.
- de Medina P, Silvente-Poirot S, Poirot M (2009). Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy*. 5(7): 1066-7.
- Denschlag D, Ulrich U, Emons G (2011). The diagnosis and treatment of endometrial cancer - progress and controversies. *Dtsch Arztebl Int*. 108 (34-35): 571-7.
- Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) (Hrsg) (2014). ICD-10-GM Version 2014 [online]. 10. Revision. URL: <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2014/index.htm> [Stand: 13.07.2014].
- Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 13(3): 239-52.
- Distelhorst CW (2002). Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 9(1): 6-19.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102(1): 33-42.
- Earle CC, Kwok A, Gazelle GS, Fuchs CS (2004). Two schedules of second-line irinotecan for metastatic colon carcinoma. *Cancer*. 101(11): 2533-9.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the

- efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 378 (9793): 771-84.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 68: 383-424.
- el Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW (1993). p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 82(11): 3452-9.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*. 20(3): 929-35.
- Fabian MA, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ (2005). A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*. 23(3): 329-36.
- Farrand L, Kim JY, Byun S, Im-aram A, Lee J, Suh JY, Lee KW, Lee HJ, Tsang BK (2014). The diarylheptanoid hirsutenone sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin via modulation of apoptosis-inducing factor and X-linked inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem*. 289(3): 1723-31.
- Fattman CL, Delach SM, Dou QP, Johnson DE (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*. 20(23): 2918-26.
- Fearnhead HO, Chwalinski M, Snowden RT, Ormerod MG, Cohen GM (1994). Dexamethasone and etoposide induce apoptosis in rat thymocytes from different phases of the cell cycle. *Biochem Pharmacol*. 48(6): 1073-9.
- Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA (2010). X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood*. 116(18): 3398-408.
- Fischer-Posovszky P, Keuper M, Nagel S, Hesse D, Schürmann A, Debatin KM, Strauss G, Wabitsch M (2011). Downregulation of FLIP by cycloheximide sensitizes human fat cells to CD95-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 317(15): 2200-9.
- Fogh J (1975). *Human Tumor Cells in Vitro*. Plenum Press, New York.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 59(1): 221-6.

- Fraschini A, Bottone MG, Scovassi AI, Denegri M, Risueño MC, Testillano PS, Martin TE, Biggiogera M, Pellicciari C (2005). Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histol Histopathol.* 20(1): 107-17.
- Fu YR, Yi ZJ, Yan YR, Qiu ZY (2006). Hydroxycamptothecin-induced apoptosis in hepatoma SMMC-7721 cells and the role of mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* 6(4): 211-7.
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res.* 60(14): 3947-56.
- Ganti AK, West WW, Zhen W (2013). Current concepts in the management of small cell lung cancer. *Indian J Med Res.* 137(6): 1043-51.
- Gao S, Scott RE (2003). Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 197(3): 445-52.
- Goldberg IH, Rabinowitz M (1962). Actinomycin D inhibition of deoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid. *Science.* 136(3513): 315-6.
- Goldberg IH, Rabinowitz M, Reich E (1962). Basis of Actinomycin action I. DNA binding and inhibition of RNA-Polymerase synthetic reactions by Actinomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 48(12): 2094-101.
- Gong Y, Murphy LC, Murphy LJ (1994). Hormonal regulation of proliferation and transforming growth factors gene expression in human endometrial adenocarcinoma xenografts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 50(1-2): 13-9.
- Green DM (2013). The evolution of treatment for Wilms tumor. *J Pediatr Surg.* 48(1): 14-9.
- Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305(5684): 626-9.
- Grese TA, Dodge JA (1998). Selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Curr Pharm Des.* 4(1): 71-92.
- Guo SY, Liu SG, Liu L, Zhou XJ, Gu Y (2012). RNAi silencing of the MEKK3 gene promotes TRAIL-induced apoptosis in MCF-7 cells and suppresses the transcriptional activity of NF- κ B. *Oncol Rep.* 27(2): 441-6.
- Haag P, Hanhart N, Müller M (2014). *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis 2014/15.* 7. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach am Rhein.

- Hajji N, Wallenborg K, Vlachos P, Nyman U, Hermanson O, Joseph B (2008). Combinatorial action of the HDAC inhibitor trichostatin A and etoposide induces caspase-mediated AIF-dependent apoptotic cell death in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene*. 27(22): 3134-44.
- Hande KR (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*. 34(10): 1514-21.
- Hangen E, Blomgren K, Bénit P, Kroemer G, Modjtahedi N (2010). Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci*. 35(5): 278-87.
- Harper MJ, Walpole AL (1967). A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil*. 13(1): 101-19.
- Haselberger M, Springwald A, Konwisorz A, Lattrich C, Goerse R, Ortmann O, Treeck O (2011). Silencing of the *icb-1* gene inhibits the induction of differentiation-associated genes by vitamin D3 and all-trans retinoic acid in gynecological cancer cells. *Int J Mol Med*. 28(1): 121-7.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407(6805): 770-6.
- Herold, Gerd und Mitarbeiter (2013). *Innere Medizin*. Ausgabe 2014. Gerd (Verlag), Köln.
- Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*. 28(11): 4629-38.
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P (2002). Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol*. 14(3): 354-9.
- Holt SV, Brookes KE, Dive C, Makin GW (2011). Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. *Oncol Rep*. 25(4): 1177-81.
- Hosokawa M, Kadota R, Shichijo S, Itoh K, Dmitriev I, Krasnykh V, Curiel DT, Takue Y, Wakasugi H, Takashima S, Heike Y (2005). Cell cycle arrest and apoptosis induced by SART-1 gene transduction. *Anticancer Res*. 25(3B): 1983-90.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 84(2): 299-308.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 81(4): 495-504.

- Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H, Clinton GM (1995). SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55(3-4): 279-89.
- Huang HS, Lee EY (2008). Protein phosphatase-1 inhibitor-3 is an in vivo target of caspase-3 and participates in the apoptotic response. *J Biol Chem.* 283(26): 18135-46.
- Huang Y, Sheikh MS (2007). TRAIL death receptors and cancer therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 224(3): 284-9.
- Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* 54(10): 2615-21.
- Hunter TB, Manimala NJ, Luddy KA, Catlin T, Antonia SJ (2011). Paclitaxel and TRAIL synergize to kill paclitaxel-resistant small cell lung cancer cells through a caspase-independent mechanism mediated through AIF. *Anticancer Res.* 31(10): 3193-204.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 388(6638): 190-5.
- Ishii HH, Etheridge MR, Gobé GC (1995). Cycloheximide-induced apoptosis in Burkitt lymphoma (BJA-B) cells with and without Epstein-Barr virus infection. *Immunol Cell Biol.* 73(5): 463-8.
- Ito K, Kiyosawa N, Kumagai K, Manabe S, Matsunuma N, Yamoto T (2006). Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocyte apoptosis in rat livers by morphological and microarray analysis. *Toxicology.* 219(1-3): 175-86.
- Iwadate Y, Tagawa M, Fujimoto S, Hirose M, Namba H, Sueyoshi K, Sakiyama S, Yamaura A (1998). Mutation of the p53 gene in human astrocytic tumours correlates with increased resistance to DNA-damaging agents but not to anti-microtubule anti-cancer agents. *Br J Cancer.* 77(4): 547-51.
- Jacobs CM, Trinh MD, Rootwelt T, Lømo J, Paulsen RE (2006). Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg²⁺ in cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1070(1): 116-23.
- Jeon YK, Kim H, Park SO, Choi HY, Kim YA, Park SS, Kim JE, Kim YN, Kim CW (2005). Resistance to Fas-mediated apoptosis is restored by cycloheximide through the downregulation of cellular FLIPL in NK/T-cell lymphoma. *85(7): 874-84.*

- Jin C, Wu S, Lu X, Liu Q, Zhang L, Yang J, Xi Q, Cai Y (2012). Conditioned medium from actinomycin D-treated apoptotic cells induces mitochondria-dependent apoptosis in bystander cells. *Toxicol Lett.* 211(1): 45-53.
- Jin S, Ray RM, Johnson LR (2008). TNF-alpha/cycloheximide-induced apoptosis in intestinal epithelial cells requires Rac1-regulated reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294(4): G928-37.
- Johnson AL, Aravind L, Shulzhenko N, Morgun A, Choi SY, Crockford TL, Lambe T, Domaschensz H, Kucharska EM, Zheng L, Vinuesa CG, Lenardo MJ, Goodnow CC, Cornall RJ, Schwartz RH (2009). Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection. *Nature Immunology.* 10: 831-9.
- Jones J, Lagasse LD, Karlan BY (1994). Steroid hormonal independence of HER-2/neu mRNA expression in four human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol.* 55(3 Pt 1): 421-6.
- Jordan VC (1974). Antitumour activity of the antioestrogen ICI 46,474 (tamoxifen) in the dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced rat mammary carcinoma model. *J. Steroid Biochem.* 5: 354.
- Jordan VC (1976). Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *Eur. J. Cancer.* 12(6): 419-24.
- Jordan VC, Jaspan T (1976). Tamoxifen as an antitumour agent: oestrogen binding as a predictive test for tumour response. *J. Endocrinol.* 68(3): 453-60.
- Jordan VC, Koerner S (1975). Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. *Eur. J. Cancer.* 11(3): 205-6.
- Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, Hanada T, Modjtahedi N, Penninger JM, Kroemer G (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci.* 1171: 2-11.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410(6828): 549-54.
- Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B (2001). Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res.* 7(5): 1474-80.

- Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Härkönen P (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 10(6): 1395-410.
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, Lockhart DJ, Milanov ZV, Morrison MJ, Pallares G, Patel HK, Pritchard S, Wodicka LM, Zarrinkar PP (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 26(1): 127-32.
- Karmakar S, Choudhury SR, Banik NL, Ray SK (2010). Activation of Multiple Molecular Mechanisms for Increasing Apoptosis in Human Glioblastoma T98G Xenograft. *J Cancer Sci Ther*. 2: 107-113.
- Kempkensteffen C, Fritzsche FR, Johannsen M, Weikert S, Hinz S, Dietel M, Riener MO, Moch H, Jung K, Krause H, Miller K, Kristiansen G (2009). Down-regulation of the proapoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer. *BMC Cancer*. 9: 276.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4): 239-57.
- Kim BM, Choi YJ, Lee YH, Joe YA, Hong SH (2010). N,N-Dimethyl phytosphingosine sensitizes HL-60/MX2, a multidrug-resistant variant of HL-60 cells, to doxorubicin-induced cytotoxicity through ROS-mediated release of cytochrome c and AIF. *Apoptosis*. 15(8): 982-93.
- Kirk JM (1960). The mode of action of actinomycin D. *Biochim Biophys Acta*. 42: 167-9.
- Kirkin V, Joos S, Zörnig M (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1644(2-3): 229-49.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 14(22): 5579-88.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419(6905): 367-74.
- Ko LJ, Prives C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 10(9): 1054-72.
- K'ominek LA (1975). Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 7(6): 856-60.
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013a). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome.

- Adjuvante Endokrine Therapie in prä- und postmenopausalen Patientinnen [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2010_Adjuvante%20Endokrine%20Therapie%20in%20pra%CC%88-%20und%20postmenopausalen%20Patientinnen.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013b). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Adjuvante Strahlentherapie [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2013_Adjuvante%20Strahlentherapie.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013c). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Adjuvante zytostatische und zielgerichtete Therapien [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2011_Adjuvante%20zytostatische%20und%20zielgerichtete%20Therapien.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013d). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Brustkrebsrisiko und Prävention [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2002_Brustkrebsrisiko%20und%20Pra%CC%88vention.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013e). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Brustkrebs Nachsorge [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2017%20Brustkrebs%20Nachsorge.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013f). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Früherkennung und Diagnostik [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2003_Fruherkennung%20und%20Diagnostik.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013g). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Neoadjuvante (Primäre) systemische Therapie [online]. URL: <http://www.ago-online.de/>

- fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2012_Neoadjuvante%20%28Primaere%29%20systemische%20Therapie.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013h). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Operative Therapie des Mammakarzinoms unter onkologischen Aspekten [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2008_Operative%20Therapie%20des%20Mammakarzinoms%20unter%20onkologischen%20Aspekten.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) (Hrsg) (2013i). Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Prognostische und prädiktive Faktoren [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2013_02_Februar/pdfs_D/2013D%2005_Prognostische%20und%20pra%CC%88diktive%20Faktoren.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Kommission Uterus der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (Hrsg) (2013). Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms [online]. URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/uterus/empfehlungen_diagnostik_therapie_EC.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Konwisorz A, Springwald A, Haselberger M, Goerse R, Ortman O, Treeck O (2010). Knockdown of icb-1 gene enhanced estrogen responsiveness of ovarian and breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*. 17: 147-57.
- Kostaras X, Cusano F, Kline GA, Roa W, Easaw J (2014). Use of dexamethasone in patients with high-grade glioma: a clinical practice guideline. *Curr Oncol*. 21(3): 493-503.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*. 276(23): 20633-40.
- Kull FC Jr (1988). Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun*. 153(1): 402-9.
- Kumagai K, Ito K, Ando Y, Hakamata S, Teranishi M, Nakayama H, Manabe S (2009). Neutralization of IL-10 exacerbates cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis and necrosis. *Toxicol Pathol*. 37(4): 536-46.
- Kuramoto H (1972). Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta Obstet Gynaecol Jpn*. 19(1): 47-58.

- Kuramoto H, Tamura S, Notake Y (1972). Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 114(8): 1012-9.
- Lacey JV, Sherman ME, Rush BB, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, Glass AG, Richesson DA, Chatterjee N, Langholz B (2010). Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *Journal of Clinical Oncology.* 28(5): 788-92.
- Lau KM, Mok SC, Ho SM (1999). Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10): 5722-7.
- Ledda-Columbano GM, Coni P, Faa G, Manenti G, Columbano A (1992). Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide. *Am J Pathol.* 140(3): 545-9.
- Lee MG, Huh JS, Chung SK, Lee JH, Byun DS, Ryu BK, Kang MJ, Chae KS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG (2006). Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene.* 25(42): 5807-22.
- Lee SH, Sinko PJ (2006). siRNA--getting the message out. *Eur J Pharm Sci.* 27(5): 401-10.
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe e.V. (DKH) (Hrsg) (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion [online]. URL: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/S3-Brustkrebs-v2012-OL-Kurzversion.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe e.V. (DKH) (Hrsg) (2013). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Kurzversion [online]. URL: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_OvCa_OL_Kurzversion.pdf [Stand: 14.07.2014].
- Leung LK, Wang TT (1999). Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res Treat.* 55(1): 73-83.
- Lewis EM, Wilkinson AS, Davis NY, Horita DA, Wilkinson JC (2011). Nondegradative ubiquitination of apoptosis inducing factor (AIF) by X-linked inhibitor of apoptosis at a

- residue critical for AIF-mediated chromatin degradation. *Biochemistry*. 50(51): 11084-96.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94(4): 491-501.
- Li QQ, Lee RX, Liang H, Wang G, Li JM, Zhong Y, Reed E (2013). β -Elemene enhances susceptibility to cisplatin in resistant ovarian carcinoma cells via downregulation of ERCC-1 and XIAP and inactivation of JNK. *Int J Oncol*. 43(3): 721-8.
- Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, Kluin PM (1995). Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*. 85(9): 2528-36.
- Lin CS, Chen PC, Wang CK, Wang CW, Chang YJ, Tai CJ, Tai CJ (2014). Antitumor Effects and Biological Mechanism of Action of the Aqueous Extract of the *Camptotheca acuminata* Fruit in Human Endometrial Carcinoma Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014: 564810.
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*. 3(2): 128-33.
- Liu Y, Wu X, Sun Y, Chen F (2011). Silencing of X-linked inhibitor of apoptosis decreases resistance to cisplatin and paclitaxel but not gemcitabine in non-small cell lung cancer. *J Int Med Res*. 39(5): 1682-92.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 25(4): 402-8.
- Lopez PL, Filippi-Chiela EC, Silva AO, Cordero EA, Garcia-Santos D, Pelegrini AL, Reder GM, Barbieri NL, Lenz G (2012). Sensitization of glioma cells by X-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown. *Oncology*. 83(2): 75-82.
- Lorenzo HK, Susin SA (2007). Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat*. 10(6): 235-55.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 6(6): 516-24.
- Ma JJ, Chen BL, Xin XY (2009). XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 146(2): 222-6.

- Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146(1): 3-15.
- Mandlekar S, Kong AN (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis.* 6(6): 469-77.
- Manns J, Daubrawa M, Driessen S, Paasch F, Hoffmann N, Löffler A, Lauber K, Dieterle A, Alers S, Iftner T, Schulze-Osthoff K, Stork B, Wesselborg S (2011). Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1. *FASEB J.* 25(9): 3250-61.
- Mao HL, Liu PS, Zheng JF, Zhang PH, Zhou LG, Xin G, Liu C (2007). Transfection of Smac/DIABLO sensitizes drug-resistant tumor cells to TRAIL or paclitaxel-induced apoptosis in vitro. *Pharmacol Res.* 56(6): 483-92.
- Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C (2003). Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood.* 101(2): 585-93.
- Maycotte P, Blancas S, Morán J (2008). Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death. *Neurochem Res.* 33(8): 1534-40.
- Merkel O, Wacht N, Sifft E, Melchardt T, Hamacher F, Kocher T, Denk U, Hofbauer JP, Egle A, Scheideler M, Schleder M, Steurer M, Kenner L, Greil R (2012). Actinomycin D induces p53-independent cell death and prolongs survival in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 26(12): 2508-16.
- Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J (2001). Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol.* 133(4): 467-76.
- Messmer UK, Winkel G, Briner VA, Pfeilschifter J (2000). Suppression of apoptosis by glucocorticoids in glomerular endothelial cells: effects on proapoptotic pathways. *Br J Pharmacol.* 129(8): 1673-83.
- Micali OC, Cheung HH, Plenchette S, Hurley SL, Liston P, LaCasse EC, Korneluk RG (2007). Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta. *BMC Cancer.* 7: 52.
- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grütter MG (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 277(47): 45162-71.

- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem.* 276(19): 16391-8.
- Mizutani K, Matsumoto K, Hasegawa N, Deguchi T, Nozawa Y (2006). Expression of clusterin, XIAP and survivin, and their changes by camptothecin (CPT) treatment in CPT-resistant PC-3 and CPT-sensitive LNCaP cells. *Exp Oncol.* 28(3): 209-15.
- Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PR (2002). Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer.* 87(8): 909-17.
- Morch LS, Lokkegaard E, Andreasen AH, Krüger-Kjaer S, Lidegaard O (2009). Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA.* 302(3): 298-305.
- Morimoto H, Broquet C, Principe P, Mencia-Huerta JM, Braquet P, Bonavida B (1991a). Cytotoxic activity of synthetic aza alkyl lysophospholipids against drug sensitive and drug resistant human tumor cell lines. *Anticancer Res.* 11(6): 2223-9.
- Morimoto H, Safrit JT, Bonavida B (1991b). Synergistic effect of tumor necrosis factor- α - and diphtheria toxin-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines. *J Immunol.* 147(8): 2609-16.
- Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thürlimann B, Paridaens R, Smith I, Mauriac L, Forbes J, Price KN, Regan MM, Gelber RD, Coates AS, BIG 1-98 Collaborative Group (2009). Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med.* 361(8): 766-76.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P (2012). Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie – Klinische Pharmakologie – Toxikologie. 10. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Ng CP, Zisman A, Bonavida B (2002). Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance. *Prostate.* 53(4): 286-99.
- Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6(11): 1028-42.
- Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem.* 246(1): 174-81.

- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R (1977). A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 30(4): 275-82.
- Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A (2005). Cycloheximide-mediated sensitization to TNF-alpha-induced apoptosis in human colorectal cancer cell line COLO 205; role of FLIP and metabolic inhibitors. *J Physiol Pharmacol*. 56 Suppl 3: 101-18.
- Park MH, Kim SY, Kim YJ, Chung YH (2014a). ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochem Biophys Res Commun*. 450(1): 129-34.
- Park S, Shim SM, Nam SH, Andera L, Suh N, Kim I (2014b). CGP74514A enhances TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells by reducing X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Anticancer Res*. 34(7): 3557-62.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*. 56(3): 556-62.
- Perkins CL, Fang G, Kim CN, Bhalla KN (2000). The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res*. 60(6): 1645-53.
- Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O (Hrsg) (2011). *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 17(5): 421-33.
- Porter AG, Urbano AG (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays*. 28(8): 834-43.
- Pratt SE, Pollak MN (1993). Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res*. 53(21): 5193-8.
- Qi R, Gu J, Zhang Z, Yang K, Li B, Fan J, Wang C, He Z, Qiao L, Lin Z, Liu XY (2007). Potent antitumor efficacy of XAF1 delivered by conditionally replicative adenovirus vector via caspase-independent apoptosis. *Cancer Gene Ther*. 14(1): 82-90.

- Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM (2009). Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *JNCI*. 101(2): 80-7.
- Reed JC (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 387(6635): 773-6.
- Reed JC (1999a). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 11(1): 68-75.
- Reed JC (1999b). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 17(9): 2941-53.
- Reich E (1964). Actinomycin: Correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA. *Science*. 143(3607): 684-9.
- Riedl SJ, Shi Y (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(11): 897-907.
- Robert-Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010 [online]. 9. Ausgabe. Abgerufen von der Homepage des Zentrums für Krebsregisterdaten. URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile [Stand: 13.07.2014].
- Rodriguez J, Lazebnik Y (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*. 13: 3179-84.
- Rodríguez-Hernández A, Brea-Calvo G, Fernández-Ayala DJ, Cordero M, Navas P, Sánchez-Alcázar JA (2006). Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis*. 11(1): 131-9.
- Roussel M, Facon T, Moreau P, Harousseau JL, Attal M (2011). Firstline treatment and maintenance in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Recent Results Cancer Res*. 183: 189-206.
- Sadasivam S, Gupta S, Radha V, Batta K, Kundu TK, Swarup G (2005). Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. *Oncogene*. 24(4): 627-36.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(6): 401-10.
- Sánchez-Alcázar JA, Ault JG, Khodjakov A, Schneider E (2000). Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell Death Differ*. 7(11): 1090-100.

- Santiago B, Galindo M, Palao G, Pablos JL (2004). Intracellular regulation of Fas-induced apoptosis in human fibroblasts by extracellular factors and cycloheximide. *J Immunol.* 172(1): 560-6.
- Sarkar J, Singh N, Meena S, Sinha S (2009). Staurosporine induces apoptosis in human papillomavirus positive oral cancer cells at G2/M phase by disrupting mitochondrial membrane potential and modulation of cell cytoskeleton. *Oral Oncol.* 45(11): 974-9.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17(6): 1675-87.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274(3):1541-8.
- Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ (2006). Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ.* 13(2): 179-88.
- Schwartz PS, Waxman DJ (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol.* 60(6): 1268-79.
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J.* 24(3): 645-55.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 11(2): 519-27.
- Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R, Feinstein E (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22(7): 2283-93.
- Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA, Subak L, Scheidler J, Segal M, Brand R, Grady D (1998). Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *JAMA.* 280(17): 1510-7.
- Song JW, Park EY, Lee JG, Park YS, Kang BC, Shim YH (2011). The effect of combining dexamethasone with ondansetron for nausea and vomiting associated with fentanyl-based intravenous patient-controlled analgesia. *Anaesthesia.* 66(4): 263-7.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51(5): 1409-16.

- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *J Biol Chem*. 273(1): 949-57.
- Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (2001). Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene*. 20(8): 1193-202.
- Strauss G, Westhoff MA, Fischer-Posovszky P, Fulda S, Schanbacher M, Eckhoff SM, Stahnke K, Vahsen N, Kroemer G, Debatin KM (2008). 4-hydroperoxycyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Cell Death Differ*. 15(2): 332-43.
- Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Güner D, Dörken B, Daniel PT (2003). Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ*. 10(4): 477-84.
- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*. 230(4728): 943-5.
- Sulston JE, Horvitz HR (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 56(1): 110-56.
- Sun Y, Qiao L, Xia HH, Lin MC, Zou B, Yuan Y, Zhu S, Gu Q, Cheung TK, Kung HF, Yuen MF, Chan AO, Wong BC (2008). Regulation of XAF1 expression in human colon cancer cell by interferon beta: activation by the transcription regulator STAT1. *Cancer Lett*. 260(1-2): 62-71.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397(6718): 441-6.
- Tang D, Lahti JM, Kidd VJ (2000). Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 275(13): 9303-7.
- Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A (2006). Treatment of MCF-7 cells with taxol and etoposide induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BCL2L1, BAX, CASPASE-9 and FAS. *Biol Chem*. 387(8): 1081-6.

- Thomas A, El Rouby S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, Potmesil M, Newcomb EW (1996). Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*. 12(5): 1055-62.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 386(6624): 517-21.
- Thornberry NA (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*. 53(3): 478-90.
- Tian E, Gazitt Y (1996). The role of p53, bcl-2 and bax network in dexamethasone induced apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Int J Oncol*. 8(4): 719-26.
- Treack O, Belgutay D, Häring J, Schöler S, Lattrich C, Ortmann O (2012). Network analysis of icb-1 gene function in human breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 113(9): 2979-88.
- Treack O, Kindzorra I, Pauser K, Treack L, Ortmann O (2005). Expression of icb-1 gene is interferon-gamma inducible in breast and ovarian cancer cell lines and effects the IFN γ -response of SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Cytokine*. 32(3-4): 137-42.
- Treack O, Odani T, Itoh N, Imai H, Fujita S, Kohroki J, Nakanishi T, Diedrich K, Ortmann O, Tanaka K, Vollmer G (2002). Detection of increased *icb-1* transcript levels in maturing HL-60 cells: a novel marker for granulocytic and monocytic in vitro differentiation. *Leukemia Research*. 26(8): 765-9.
- Treack O, Schöler S, Häring J, Skrzypczak M, Lattrich C, Ortmann O (2013). *icb-1* Gene counteracts growth of ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett*. 335(2): 441-6.
- Treack O, Strunck E, Vollmer G (1998). A novel basement membrane-induced gene identified in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC1B. *FEBS letters*. 425(3): 426-30.
- Treack O, Wackwitz B, Haus U, Ortmann O (2006). Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells. *Gynecol Oncol*. 102(2): 292-9.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 228(4706): 1440-3.
- Tu SP, Liston P, Cui JT, Lin MC, Jiang XH, Yang Y, Gu Q, Jiang SH, Lum CT, Kung HF, Korneluk RG, Wong BC (2009). Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer. *Int J Cancer*. 125(3): 688-97.

- Uberti EM, Fajardo Mdo C, Ferreira SV, Pereira MV, Seger RC, Moreira MA, Torres MD, de Nápoli G, Schmid H (2009). Reproductive outcome after discharge of patients with high-risk hydatidiform mole with or without use of one bolus dose of actinomycin D, as prophylactic chemotherapy, during the uterine evacuation of molar pregnancy. *Gynecol Oncol.* 115(3): 476-81.
- Ullmannová V, Haskovec C (2004). Gene expression during camptothecin-induced apoptosis in human myeloid leukemia cell line ML-2. *Neoplasma.* 51(3): 175-80.
- van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C, Putter H, Hasenburg A, Vannetzel JM, Paridaens R, Markopoulos C, Hozumi Y, Hille ET, Kieback DG, Asmar L, Smeets J, Nortier JW, Hadji P, Bartlett JM, Jones SE (2011). Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *Lancet.* 377(9762): 321-31.
- van Maanen JM, Retèl J, de Vries J, Pinedo HM (1988). Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst.* 80(19): 1526-33.
- Vasaturo F, Malacrino C, Sallusti E, Coppotelli G, Birarelli P, Giuffrida A, Albonici L, Simonelli L, Modesti A, Modesti M, Scarpa S (2005). Role of extracellular matrix in regulation of staurosporine-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncol Rep.* 13(4): 745-50.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999). Cell death in development. *Cell.* 96(2): 245-54.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102(1): 43-53.
- Viale G, Regan MM, Dell'Orto P, Mastropasqua MG, Maiorano E, Rasmussen BB, MacGrogan G, Forbes JF, Paridaens RJ, Colleoni M, Láng I, Thürlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Gelber RD, Price KN, Goldhirsch A, Gusterson BA, Coates AS, BIG 1-98 Collaborative and International Breast Cancer Study Groups (2011). Which patients benefit most from adjuvant aromatase inhibitors? Results using a composite measure of prognostic risk in the BIG 1-98 randomized trial. *Ann Oncol.* 22(10): 2201-7.
- Waibel M, Kramer S, Lauber K, Lupescu A, Manns J, Schulze-Osthoff K, Lang F, Wesselborg S (2007). Mitochondria are not required for death receptor-mediated cytosolic acidification during apoptosis. *Apoptosis.* 12(3): 623-30.
- Waksman SA, Woodruff HB (1940). Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes. *Proc Soc Exper Biol.* 45: 609-14.

- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1966). Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88(16): 3888-90.
- Wan X, Yokoyama Y, Shinohara A, Takahashi Y, Tamaya T (2002). PTEN augments staurosporine-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells by downregulating PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Differ.* 9(4): 414-20.
- Wang J, Peng Y, Sun YW, He H, Zhu S, An X, Li M, Lin MC, Zou B, Xia HH, Jiang B, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC (2006). All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer. *Gastroenterology.* 130(3): 747-58.
- Wang K, Xu X, Nie Y, Dai L, Wang P, Zhang J (2009). Identification of tumor-associated antigens by using SEREX in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 281(2): 144-50.
- Wang L, Li L, Guo R, Li X, Lu Y, Guan X, Gitau SC, Wang L, Xu C, Yang B, Shan H (2014). miR-101 Promotes Breast Cancer Cell Apoptosis by Targeting Janus Kinase 2. *Cell Physiol Biochem.* 34(2): 413-22.
- Wang MJ, Liu S, Liu Y, Zheng D (2007a). Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res.* 59(1): 40-6.
- Wang N, Lin KK, Lu Z, Lam KS, Newton R, Xu X, Yu Z, Gill GN, Andersen B (2007b). The LIM-only factor LMO4 regulates expression of the BMP7 gene through an HDAC2-dependent mechanism, and controls cell proliferation and apoptosis of mammary epithelial cells. *Oncogene.* 26(44): 6431-41.
- Weller M, Schmidt C, Roth W, Dichgans J (1997). Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? *Neurology.* 48(6): 1704-9.
- Wilkinson JC, Wilkinson AS, Galbán S, Csomos RA, Duckett CS (2008). Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Mol Cell Biol.* 28(1): 237-47.
- Wu XM, Liu X, Bu YQ, Sengupta J, Cui HJ, Yi FP, Liu T, Yuan CF, Shi YY, Song FZ (2009). RNAi-mediated silencing of the Bmi-1 gene causes growth inhibition and enhances doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Genet Mol Biol.* 32(4): 697-703.

- Xu J, Keeton AB, Wu L, Franklin JL, Cao X, Messina JL (2005). Gene 33 inhibits apoptosis of breast cancer cells and increases poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Breast Cancer Res Treat.* 91(3): 207-15.
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL (2003). Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Exp Cell Res.* 283(2): 135-45.
- Yang F, Chen H, Liu Y, Yin K, Wang Y, Li X, Wang G, Wang S, Tan X, Xu C, Lu Y, Cai B (2013). Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. *Cell Physiol Biochem.* 32(4): 1072-82.
- Yang L, Liu X, Lu Z, Yuet-Wa Chan J, Zhou L, Fung KP, Wu P, Wu S (2010). Ursolic acid induces doxorubicin-resistant HepG2 cell death via the release of apoptosis-inducing factor. *Cancer Lett.* 298(1): 128-38.
- Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD (2001). Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61(1): 348-54.
- Yang YL, Li XM (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.* 10(3): 169-77.
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 9(9): 680-4.
- Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, Tajima K, Shimamura T, Sawai T (2006). Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. *Osteoarthritis Cartilage.* 14(5): 435-41.
- Yu AC, Yung HW, Hui MH, Lau LT, Chen XQ, Collins RA (2003). Cycloheximide and actinomycin D delay death and affect bcl-2, bax, and Ice gene expression in astrocytes under in vitro ischemia. *J Neurosci Res.* 74(2): 318-25.
- Yu LF, Wang J, Zou B, Lin MC, Wu YL, Xia HH, Sun YW, Gu Q, He H, Lam SK, Kung HF, Wong BC (2007). XAF1 mediates apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase pathway in colon cancer. *Cancer.* 109(10):1996-2003.
- Yuan Q, Ray RM, Johnson LR (2002). Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome c. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(6): C1290-7.

- Zaman F, Chrysis D, Huntjens K, Chagin A, Takigawa M, Fadeel B, Sävendahl L (2014). Dexamethasone differentially regulates Bcl-2 family proteins in human proliferative chondrocytes: role of pro-apoptotic Bid. *Toxicol Lett.* 224(2): 196-200.
- Zhang H, Jia L, Xu Y, Zhou XC, Kong B, Li D (2012). Topotecan plus carboplatin and paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Chemother.* 24(2): 67-73.
- Zhang Y, Liao Q, Chen C, Yu L, Zhao J (2006). Function of estrogen receptor isoforms alpha and beta in endometrial carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer.* 16(4): 1656-60.
- Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res.* 5(10): 2971-7.
- Zhang SH, Huang Q (2013). Etoposide induces apoptosis via the mitochondrial- and caspase-dependent pathways and in non-cancer stem cells in Panc-1 pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 30(6): 2765-70.
- Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther.* 3(2): 187-97.
- Zhao X, Cao M, Liu JJ, Zhu H, Nelson DR, Liu C (2011). Reactive oxygen species is essential for cycloheximide to sensitize lexatumumab-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 6(2): e16966.
- Zhong YY, Chen HP, Tan BZ, Yu HH, Huang XS (2013). Triptolide avoids cisplatin resistance and induces apoptosis via the reactive oxygen species/nuclear factor- κ B pathway in SKOV3PT platinum-resistant human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 6(4): 1084-1092.
- Zhou L, Du L, Chen X, Li X, Li Z, Wen Y, Li Z, He X, Wei Y, Zhao X, Qian Z (2010). The antitumor and antimetastatic effects of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin on ovarian cancer with minimal side effects. *Oncol Rep.* 24(4): 941-8.
- Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1551(2): F1-37.

Danksagung

“Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken.”

Henry Thomas Buckle
(Kulturhistoriker 1821-1862)

Bei diesem Prozess und der Anfertigung der Dissertation wurde ich von vielen Menschen unterstützt.

Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Themas sowie der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien beim Lehrstuhlinhaber Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortmann.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuchsreihen sowie der Anfertigung der Dissertation mit seinem fachkundigen Rat begleitet und unterstützt hat.

Auch möchte ich Frau Helena Lowack und Herrn Gerhard Piendl für die sehr geduldige und professionelle Einarbeitung in die labortechnischen Methoden danken. Ebenfalls bedanke ich mich bei Anette Stegerer für die kompetente Beantwortung aufkommender Fragen. Vielen Dank an alle Mitglieder des Laborteams für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die mich während der Doktorarbeit stets unterstützt, ermutigt und manchmal auch ertragen haben: Andy, Jule, Mama, Papa, Susl, Eve, Julia.