Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm

Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns

CK1 und Lymphome:
Analyse der Aktivität von CK1δ in verschiedenen Lymphomzelllinien sowie die Validierung von CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Franziska Oltmer

geboren in Westerstede

2012

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Uwe Knippschild
2. Berichterstatter:	PD Dr. Frank Leithäuser
Tag der Promotion:	4.7.2013

In Dankbarkeit für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Lymphome 1

1.1.1 Klassifikation der malignen Lymphome 1

1.1.2 Hodgkin-Lymphome 3

1.1.3 Non-Hodgkin-Lymphome 5

1.2 Die Casein Kinase 1 8

1.2.1 Proteinkinasen 8

1.2.2 Die CK1-Familie 9

1.2.3 Beteiligung von CK1 in der Entstehung von Krankheiten 14

1.2.4 CK1-spezifische Inhibitoren 17

1.3 Fragestellung 19

2 Material und Methoden 21

2.1 Material 21

2.1.1 Geräte 21

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits 22

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 22

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien 24

2.1.5 CK1 spezifische Inhibitoren 24

2.1.6 Software und Statistikprogramme 25

2.2 Methoden 25

2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen 25

2.2.2 Protein-analytische Methoden 30

3 Ergebnisse 39

3.1 Expression und Aktivität von CK1δ in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien 39

3.1.1 Expression von CK1δ in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien 39

3.1.2 Bestimmung der CK1δ Aktivität in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien 40

3.2 Einfluss von CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ und auf die Proliferation humaner Tumorzelllinien sowie verschiedener Lymphomzelllinien 43

3.2.1 Einfluss von CK1 spezifischen small molecule Inhibitoren auf das Zellwachstum der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 43

3.2.2 Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 mittels MTT-Zytotoxizitätstest..... 45

3.2.3 Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Kinaseaktivität von CK1δ in den Zelllinien Ramos und KM-H2 48

3.2.4 Charakterisierung der Effekte von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung von verschiedenen humanen Lymphomzelllinien..... 50

4 Diskussion..... 60

4.1 Analyse der Expression und Aktivität von CK1δ in den vier humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2..... 61

4.2 CK1 spezifische „small molecule“ Inhibitoren haben einen Einfluss auf die Aktivität von CK1δ in den verschiedenen Lymphomzelllinien sowie auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung der humanen Tumorzelllinien MCF7 und Colo357 und der Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, DOHH-2 und U-H01. 62

5 Zusammenfassung..... 67

6 Literaturverzeichnis..... 69

7 Abbildungsverzeichnis..... 82

8 Tabellenverzeichnis..... 83

Danksagung 84

Lebenslauf..... 86

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ABC	Activated B-cell-like
ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
AGC	PKA-, PKG-, PKC-Familie enthaltende Kinasegruppe
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
ß	Beta
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-6	B-cell lymphoma 6
BEACOPP	Bleomycin, Etoposide, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin (=Oncovin), Procarbazin, Prednison
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIM	BH3-only protein
BL	Burkitt-Lymphom
CAMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CARD	Caspase recruitment domain
Carma1	CARD (Caspase recruitment domain)-containing MAGUK (Membrane associated guanylate kinase) protein 1
CD	Cluster of differentiation
CEMal	Conditionally essential malignancy
CHL	Klassisches Hodgkin Lymphom
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (=Doxorubicin), Vincristin (=Oncovin), Prednison
CK	Casein Kinase
CK1	Casein Kinase 1
CK2	Casein Kinase 2

Cki1	Cytokinin-independent 1
Cki2	Cytokinin-independent 2
CKI-7	N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide
CKP138	(*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide
CLK	CDC-like kinase
CLK2	CDC-like kinase 2
c-Myc	Zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-myc (Myelocytomatosis)
cpm	Zerfälle (counts) pro Minute
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMGC	CDK, MAPK, GSK3 und CK2
Compound 8	CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde
Compound 17	(*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide
δ	Delta
DD	Dimerisierungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-MEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DISC	Death inducing signaling complex
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
Dvl	Dishevelled
ε	Epsilon
EBV	Ebstein-Barr Virus
ECL	Enhanced Chemo Luminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ePK	Eukaryotische Proteinkinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fas	TNF receptor superfamily member 6

FCS	Fötales Kälberserum
FDG-PET	Fluorodesoxyglucose-Positron emission tomography
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FXXXF	Phe-Xaa-Xaa-Xaa-Phe
γ	Gamma
g	Fallbeschleunigung
G1	Postmitotische Phase
G2	Prämitotische Phase
GSK-3 ß	Glycogen synthase kinase-3ß
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase
HRS	Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen
IC261	3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGH	Schwere Ketten-Gene
JAK/STAT	Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
KHD	Kinesin homologe Domäne
λ	Lambda
L	Leucin
LB	Lysogeny broth
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin-Basisches Protein
Mdm2	Murine double minute 2
M-Phase	Mitose
MSH	ß-Mercaptoethanol
MTS	(-)-Matairenisol
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

MYC	Zelluläres Homolog des viralen Onkogens MYC (Myelocytomatosis)
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NF-kappaB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
NLS	Kernlokalisationssequenz
NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxylethanol
OD_{595}	Optische Dichte bei 595 nm
P	Phosphat
p53	Tumorsuppressor Protein p53
p75	Tumor necrosis factor receptor fusion protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PF-670462	4-[3-cyclohexyl-5-(4-fluoro-phenyl)-3*H*-imidazol-4-yl]-pyrimidin-2-ylamine
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTPN1	Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
R-CHOP	Rituximab/Cyclophosphamid/Hydroxy-Doxorubicin/Vincristin/Prednison
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute (Akronym)
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoidrezeptor X
S	Serin
SB 202190	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole
SB 203580	[4-(4´-fluorophenyl)-2-(4´-methylsulfinylphenyl)-5-(4´-pyridyl) imidazole
SCS	Sulfatid und Cholesterol-3-Sulfat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLS	Serin-Leucin-Serin

S-Phase	Synthesephase
STE	Homologe der Sterile 7, 11, 20 Kinasen der Hefen
SubG1	Fraktion toter Zellen
T	Threonin
TBS	Tris-buffered saline
TCL	T-Zell Lymphom
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK	Tyrosinkinase
TKL	Tyrosin Kinase-like
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	p53 Tumorsuppressor-Gen
TP	Tau Protein
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TTBK1	Tau-Tubulin-Kinase 1
TTBK2	Tau-Tubulin-Kinase 2
V	Volt
VRK1	Vaccinia-related kinase 1
VRK2	Vaccinia-related kinase 2
VRK3	Vaccinia-related kinase 3
WHO	World health organisation
Wnt	Wingless Int-1
wt	Wildtyp
Yck1	Yeast casein kinase 1
Yck2	Yeast casein kinase 2
Yck3	Yeast casein kinase 3

1 Einleitung

1.1 Lymphome

1.1.1 Klassifikation der malignen Lymphome

Die malignen Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems, welche primär die lymphatischen Organe betreffen, aber auch extralymphatisch auftreten können. Die Ausbreitung erfolgt dabei sowohl lymphogen als auch hämatogen [69]. Auf der Grundlage der Morphologie, der Klinik, des Immunphänotyps und der Molekulargenetik werden die Lymphome nach der „2008 World Health Organization (WHO) Klassifikation von Tumoren hämatopoetischer und lymphoider Gewebe“ klassifiziert. Eine Klassifizierung der Lymphome nach der WHO besteht seit dem Jahr 2001, welche 2008 aktualisiert wurde [63]. Umfasst werden alle Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes, wobei die lymphatischen Erkrankungen in Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphome unterteilt werden. Eine weitere Unterteilung findet zwischen Lymphomen der B- oder der T-Zell-Reihe statt und zwischen Lymphomen der Vorläuferzellen der Lymphopoese und der reifzelligen Lymphome [160].

Tabelle 1: Die 2008 WHO Klassifikation der Lymphome [160]

Non-Hodgkin Lymphome
B-Zell-Reihe
Lymphoide Neoplasien der Vorläuferzellen
B-lymphoblastische Leukämie/B-lymphoblastisches Lymphom
Reifzellige B-Zell Neoplasien
Chronisch lymphatische Leukämie/kleinzellig lymphozytisches Lymphom
B-Zell-prolymphozytische Leukämie
Splenisches Marginalzonen-Lymphom
Haarzell-Leukämie
Lymphom/Leukämie der Milz, unklassifizierbar splenisches diffuses B-Zell-Lymphom der roten Pulpa Haarzell-Leukämie Variante
Lymphoplasmozytisches Lymphom Waldenström Makroglobulinämie
Schwerkettenkrankheit mit ihren Unterformen
Plasmazellmyelom
Solitäres Plasmozytom des Knochens
Extraossäres Plasmozytom

Extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom)
Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom Nodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom pädiatrischer Typ
Follikuläres Lymphom Follikuläres Lymphom pädiatrischer Typ
Primäres kutanes follikuläres Keimzentrumslymphom
Mantelzell-Lymphom
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL), nicht andersweitig spezifiziert T-Zell/histiozytenreiches großzelliges B-Zell-Lymphom DLBCL assoziiert mit chronischer Entzündung Epstein-Barr Virus (EBV) positives DLBCL des Älteren
Lymphomatoide Granulomatose
Primäres mediastinales /thymisches großzelliges B-Zell-Lymphom
Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom
Primär kutanes DLBCL des Beines
“Activin receptor-like kinase” (ALK) positives großzelliges B-Zell-Lymphom
Plasmoblastisches Lymphom
Primäres Lymphom der serösen Körperhöhlen
Großzelliges B-Zell-Lymphom bei Humanes Herpesvirus 8 (HHV8)-assoziierter multizentrischer Castleman-Erkrankung
Burkitt-Lymphom
B-Zell-Lymphom, unklassifizierbar, mit Eigenschaften vom diffus großzelligen B-Zell-Lymphom und vom Burkitt-Lymphom
B-Zell-Lymphom, unklassifizierbar, mit Eigenschaften vom diffus großzelligen B-Zell-Lymphom und vom klassischem Hodgkin-Lymphom
T-Zell-Reihe
Lymphoide Neoplasien der Vorläuferzellen
T-lymphoblastische Leukämie/T-lymphoblastisches Lymphom
Reifzellige T-Zell und natürliche Killer (NK)-Zell Neoplasien
T-Zell-Prolymphozyten-Leukämie
T-Zell-Leukämie der granulierten großen Lymphozyten
Chronische lymphoproliferative Erkrankung der NK-Zellen
Aggressive NK-Zell-Leukämie
Systemische EBV-positive T-Zell-lymphoproliferative Erkrankung der Kindheit
Hydra vakziniform-ähnliches Lymphom
T-Zell-Leukämie/Lymphom des Erwachsenen
Extranodales NK/T-Zell-Lymphom vom nasalen Typ
T-Zell-Lymphom vom Enteropathietyp
Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom
Subkutanes Pannikulitis-artiges T-Zell-Lymphom
Mycosis fungoides
Sézary-Syndrom
Primär kutane CD30-positive T-Zell lymphoproliferative Erkrankungen Lymphomatoide Papulose Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom
Primär kutanes CD8-positives zytotoxisches T-Zell-Lymphom
Primar kutanes gamma-delta-T-Zell-Lymphom

Primär kutanes CD4-positives klein/medium T-Zell-Lymphom
Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht andersweitig spezifiziert
Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
Anaplastisches großzelliges Lymphom, ALK positiv
Anaplastisches großzelliges Lymphom, ALK negativ
Hodgkin-Lymphome
Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
Klassisches Hodgkin-Lymphom Nodulär-sklerosierender Typ Lymphozytenreicher Typ Mischtyp Lymphozytenarmer Typ

1.1.2 Hodgkin-Lymphome

Das Hodgkin-Lymphom (HL) wurde 1832 erstmalig durch den britischen Pathologen Thomas Hodgkin als eigenständige Erkrankung beschrieben [73]. Die maligne Neoplasie entsteht meistens im Lymphknoten, vor allem in der zervikalen Region. Von der Krankheit betroffen sind häufig junge Erwachsene. Die Neoplasien enthalten einen geringen Anteil (< 1 %) an charakteristischen Tumorzellen, den Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen). Dies sind vereinzelt große mono- und mehrkernige Tumorzellen, welche von Entzündungszellen und akzessorischen Zellen umgeben sind. Die Tumorzellen werden häufig von T-Lymphozyten rosettenförmig umringt. [130, 153].

Das HL nimmt einen Anteil von ungefähr 30 % aller Lymphome ein [153] und ist eine seltene Erkrankung mit 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr [126]. Eine Veränderung der Inzidenz konnte im Gegensatz zum Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) nicht festgestellt werden [153].

Das HL wird in zwei Entitäten unterteilt, in das nodulär lymphozytenreiche Hodgkin-Lymphom (5% der Fälle) und in das klassische Hodgkin-Lymphom (95% der Fälle). Beide Entitäten unterscheiden sich in der Klinik, der zellulären Zusammensetzung, der Morphologie, den Immunphänotypen sowie dem Vorhandensein oder Fehlen der B-Zell Genexpression. Das klassische Hodgkin-Lymphom gliedert sich nochmals in vier histologische Subtypen: in den nodulär sklerosierenden Typ (70 %), den Mischtyp (20-25 %), den lymphozytenreichen Typ (5 %) und den lymphozytenarmen Typ (< 1 %) [3, 36, 111, 120, 153].

Die Stadieneinteilung des Hodgkin-Lymphoms erfolgt nach dem modifizierten Ann-Arbor Staging-System. Zusammen mit der Klinik der Erkrankung bestimmt das Staging maßgeblich die Therapie des Hodgkin-Lymphoms [98].

Im Folgenden wird die für diese Arbeit relevante Entität des HL, das klassische HL, ausführlicher beschrieben:

1.1.2.1 Das klassische Hodgkin-Lymphom

Das klassische Hodgkin-Lymphom (CHL) ist ein monoklonales B-Zell-Lymphom und besteht aus großen, monokernigen Hodgkin Tumorzellen und mehrkernigen Reed-Sternberg Tumorzellen, auch HRS-Zellen, die sich in einem Infiltrat aus kleinen Lymphozyten, Eosinophilen, Neutrophilen, Histiozyten, Plasmazellen, Fibroblasten und Kollagenfasern einbetten [154]. In 98 % der Fälle stammen die Tumorzellen von B-Lymphozyten der Keimzentren [84], in seltenen Fällen aber auch von peripheren T-Lymphozyten ab [32, 119, 146]. Die vier verschiedenen Subtypen des CHL (siehe oben) ergeben sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung des Infiltrats und der Morphologie der HRS-Zellen. Die immunphänotypischen und genetischen Eigenschaften der HRS-Zellen sind in allen vier Subtypen gleich, sie unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Klinik sowie ihrer Assoziation zum Epstein-Barr Virus (EBV) [154].

Epidemiologisch zeigt das CHL zwei Häufigkeitsgipfel, den ersten im Alter zwischen 15 und 35 Jahren und den zweiten im höheren Alter. Eine infektiöse Mononukleose in der Krankheitgeschichte erhöht die Inzidenz des CHL [118].

Ätiologisch vermutet man, dass der EBV eine Rolle in der Pathogenese des CHL einnimmt [78].

Die Klinik des CHL macht sich durch eine periphere Lymphadenopathie bemerkbar. Bei dem nodulär sklerosierenden Typ zeigt sich auch häufig eine mediastinale Beteiligung und beim mischzelligen Typ häufig eine Beteiligung der Milz und des Abdomens. Ein weiteres Symptom ist die B-Symptomatik mit Fieber, nächtlichem Schwitzen und Gewichtsverlust [154].

Der Immunphänotyp ist in allen Fällen CD30 [144, 155, 156] und in 75-85 % der Fälle CD15 positiv [76, 156, 157]. In selteneren Fällen (30-40 %) ist auch CD20 detektierbar [143, 188].

Die HRS-Zellen zeigen, trotz ihrer Abstammung von B-Lymphozyten der Keimzentren, kaum noch B-Zell spezifischen Expressionsfunktionen [145], und die dysregulierten

Transkriptionsfaktoren führen zu einer Proliferation der Tumorzellen und zu einer Aufhebung der Apoptose der Tumorzellen. Der Transkriptionsfaktor NF-kappaB ist in HRS-Zellen konstitutiv aktiviert und führt zu einer veränderten Aktivität der NF-kappaB Targetgene. Diese regulieren die Proliferation [70, 71, 75], den Activator Protein 1 (AP-1) Komplex [113, 114] und den JAK/STAT Signalweg [150].

1.1.2.2 Therapie und Prognose des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Das CHL ist durch Strahlentherapie und Chemotherapie in 85 % der Fälle heilbar [29, 35]. Die Therapie richtet sich nach dem Krankheitsstadium der Erkrankung [66] und sollte möglichst rasch nach der Diagnosestellung begonnen werden, um ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Ein gängiges Therapieverfahren ist eine Chemotherapie mit einer anschließenden Strahlentherapie. Die Chemotherapie besteht aus einer Kombination von Zytostatika, die nach anerkannten Therpieprotokollen in einer bestimmten Dosierung und in Zyklen verabreicht wird. Zur Anwendung kommen vor allem das ABVD- und das BEACOPP-Schema. Die Strahlentherapie erfolgt durch eine „involved field“ Radiotherapie mit einer Standard-Strahlendosis von 30 Gray [43]. Der wichtigste prognostische Faktor ist das im FDG-PET sichtbare Ansprechen auf zwei Zyklen ABVD [50].

1.1.3 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) lassen sich vom HL durch den fehlenden Nachweis von Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen abgrenzen. Sie sind eine heterogene Gruppe lymphatischer Neoplasien und die maligne Entartung kann aus unterschiedlich reifen und differenzierten Lymphozyten des B-Zell- oder des T-Zellsystems entstehen [44]. Nach der WHO-Klassifikation (siehe oben) werden sie in Lymphome der B- und T-Zellreihe klassifiziert, wobei 90 % der NHL zu den B-Zell-Lymphomen gezählt werden. Am häufigsten treten hier das follikuläre Lymphom und das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom auf [5]. In den letzten Dekaden hat die Inzidenz des NHL deutlich zugenommen [74, 153]. Jährlich erkranken 13,9 pro 100.000 Einwohner an einem NHL, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen der 5. und 7. Lebensdekade und ist somit eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters [44, 74]. Die stark erhöhte Inzidenz für die durch das humane

Immundefizienz Virus (HIV)-assoziierten Lymphome [62] ist seit den effektiven HIV-Therapien rückläufig [24].

Die Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome erfolgt wie bei dem HL nach der Ann-Arbor-Klassifikation [19]. Für manche Subtypen existieren jedoch noch weitere klinische Einteilungen.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Subtypen der NHL ausführlicher beschrieben:

1.1.3.1 Diffus großzelliges B-Zell Lymphom

Das diffus großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) ist eine Neoplasie großer B-Lymphozyten mit großen Kernen und einem diffusen Wachstum. Es hat einen Anteil von 25-30 % aller NHL und betrifft vorwiegend ältere Menschen. Die Ätiologie des DLBCL ist noch unbekannt. Das DLBCL entsteht meistens *de novo*, kann sich aber auch sekundär aus einem follikulären Lymphom, einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), einem Marginalzonen-Lymphom oder einem nodulär lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom transformieren. Klinisch fallen die Patienten mit einem sich rasch vergrößernden Tumor auf, welcher sich auch extranodal, meistens im Gastrointestinaltrakt, manifestieren kann. Morphologisch unterscheidet man zwischen einer zentroblastischen, einer immunoblastischen und einer anaplastischen Variante [158].

Im DLBCL sind mehrere chromosomale Translokationen bekannt. Am häufigsten ist die Translokation im BCL-6 Gen (30 %) [7, 121, 122] und die Translokation im BCL-2 Gen t(14;18) (20-30 %) [79, 97, 176]. In 10 % der Fälle lässt sich eine Mutation im MYC Gen nachweisen [184]. Tritt diese Mutation zusammen mit einer IGH/BCL-2 Translokation oder einem BCL-6 Bruch auf, haben diese Lymphome meist eine hohe Proliferation [158].

1.1.3.2 Therapie und Prognose des DLBCL

Die Therapie des aggressiven DLBCL erfolgt mit der Multiagens Chemotherapie nach dem CHOP-Schema und ist potentiell kurativ. Die langfristige Remissionsrate liegt hier bei 50-60 % [158]. Eine Verbesserung der Überlebensrate zeigte sich durch die Zugabe des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers Rituximab (R-CHOP) [28]. Des Weiteren beeinflussen auch immunhistochemische und genetische Faktoren die Prognose, so ist

z.B. die Expression von Bcl-2 und die Mutation im MYC Gen mit einer schlechteren und die Expression von Bcl-6 mit einer besseren Prognose verknüpft [79, 158].

1.1.3.3 Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom (BL) ist ein sehr schnell wachsendes B-Zell-Lymphom mit monomorphen, mittelgroßen Zellen. Morphologisch charakteristisch ist das Sternenhimmelbild, welches durch die in zahlreichen Makrophagen aufgenommenen apoptotischen Tumorzellen entsteht. Es wird zwischen drei verschiedenen Varianten unterschieden: Endemischer Typ, Sporadischer Typ und Immundefizienz-assoziierter Typ [95]. Der Endemische Typ kommt vor allem bei Kindern zwsichen 4 und 7 Jahren im äquatorialen Afrika vor [17, 178] und ist immer mit EBV assoziiert [163, 178]. Der Sporadische Typ tritt weltweit vor allem bei Kindern und jüngeren Erwachsenen auf [17, 105, 178] und ist in 30 % der Fälle mit EBV assoziiert [95]. Der Immundefizienz-assoziierte Typ ist vor allem mit HIV assoziiert [134] und EBV kann in 24-40 % der Fälle nachgewiesen werden [59, 134].

Das BL hat eine geringe Inzidenz von 1-2 % aller Lymphome, zählt jedoch zu 30-50 % der Lymphome, die bei Kindern auftreten [64].

Das BL tritt vor allem extranodal auf, und es besteht die Gefahr einer Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS). Im Endemischem Typ sind in 50 % der Fälle der Kiefer oder andere Gesichtsknochen betroffen [17, 178]. Der sporadische Typ betrifft vor allem das Abdomen [105] und der Immundefizienz-assoziierte Typ die Lymphknoten und das Knochenmark [59, 134]. Klinisch erscheinen die Patienten meist mit einer „bulky disease“ und einer hohen Tumorlast aufgrund des schnellen Wachstums des Tumors [95].

Hoch charakteristisch, aber nicht spezifisch, ist für das BL die MYC Translokation [95]. Mutationen in MYC fördern die Tumorigenität, und manche dieser Mutationen können zu einer geringeren Expression des „BH3-only protein“ (Bim) führen, welches Bcl-2 bindet und inaktiviert [67, 182].

1.1.3.4 Therapie und Prognose des Burkitt Lymphoms

Im endemischen und sporadischen Typ des BL ist der Tumor sehr aggressiv aber potentiell kurabel [95]. Eine Beteiligung des Knochenmarks und des ZNS, ein Tumor über 10 cm im Durchmesser sowie ein hohe Lactatdehydrogenase im Serum weisen vor allem im sporadischen BL auf eine schlechte Prognose hin. Bei Patienten in einem niedrigen

Stadium führt eine intensive kombinierte Chemotherapie zu einer Heilungsrate von 90 % [127], bei Patienten in einem fortgeschritten Stadium zu 60-80 % [104, 152]. Bei Kindern sind die Ergebnisse besser [37]. Ein Rezidiv entsteht meist innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnose [104]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Rituximab für die Therapie nützlich ist [33, 164].

Die verschiedenen Lymphomentitäten unterscheiden sich somit hinsichtlich ihrer Malignität und ihrer Ansprechbarkeit auf gängige Therapiekonzepte wie die Chemotherapie. Ein Schwerpunkt in der Forschung ist es daher, neue Zielmoleküle zu identifizieren, gegen die neue Substanzen, wie z.B. Inhibitoren entwickelt werden können, die sich dann zur Behandlung von hochmalignen sowie auch Chemotherapie resistenten Lymphomen eignen. Solche neuen Zielmoleküle stellen die Proteinkinasen dar [39], unter denen sich unter anderem auch die Mitglieder der Casein Kinase 1 (CK1) Familie befinden.

1.2 Die Casein Kinase 1

1.2.1 Proteinkinasen

Die Proteinkinasen gehören zu eine der größten und wichtigsten Gruppe innerhalb der Proteinfamilie und machen insgesamt knapp 2 % aller Gene des eukaryotischen Genoms aus [106]. Die Katalysierung der ATP-abhängigen, reversiblen Phosphorylierung von Proteinen ermöglicht den Proteinkinasen die Regulation einer Vielzahl von Schlüsselfunktionen in eukaryotischen Zellen [26, 60] sowie die Regulation zellulärer Prozesse in Signaltransduktionswegen [106]. Die eukaryotischen Proteinkinasen (ePK) werden in sieben Hauptgruppen (AGC-, CAMK-, CMGC-, CK1-, STE-, TKL- und TK-Gruppe) und ihre Subgruppen unterteilt [61]. Casein Kinasen (CK) sind heterologe Serin/Threonin-Kinasen, wobei CK-1 eine unabhängige Subfamilie der Proteinkinasen ist und CK-2 sich in die CMGC-Hauptgruppe der ePK einordnen lässt. Eher unüblich für Serin/Threonin-Kinasen weisen diese eine Bevorzugung des Phosphoproteins Casein als Substrat *in vitro* auf. Da Casein nicht zu den physiologischen Substraten dieser Kinasen zählt, verdeutlicht diese spezifische Eigenschaft die Fähigkeit der Casein Kinasen, eher saure und/oder phosphorylierte Seitenketten als basische Reste oder Prolyl-Seitenketten zu erkennen [16, 58, 131].

Die Abbildung 1 zeigt die CK1 Familie innerhalb des Stammbaumes der ePK und die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den humanen CK1-Isoformen (CK1α, γ1-3, δ und ε) und anderen Mitgliedern der CK1-Familie (TTBK1, 2 und VRK1-3) [60, 61, 107] (siehe Abb. 1).

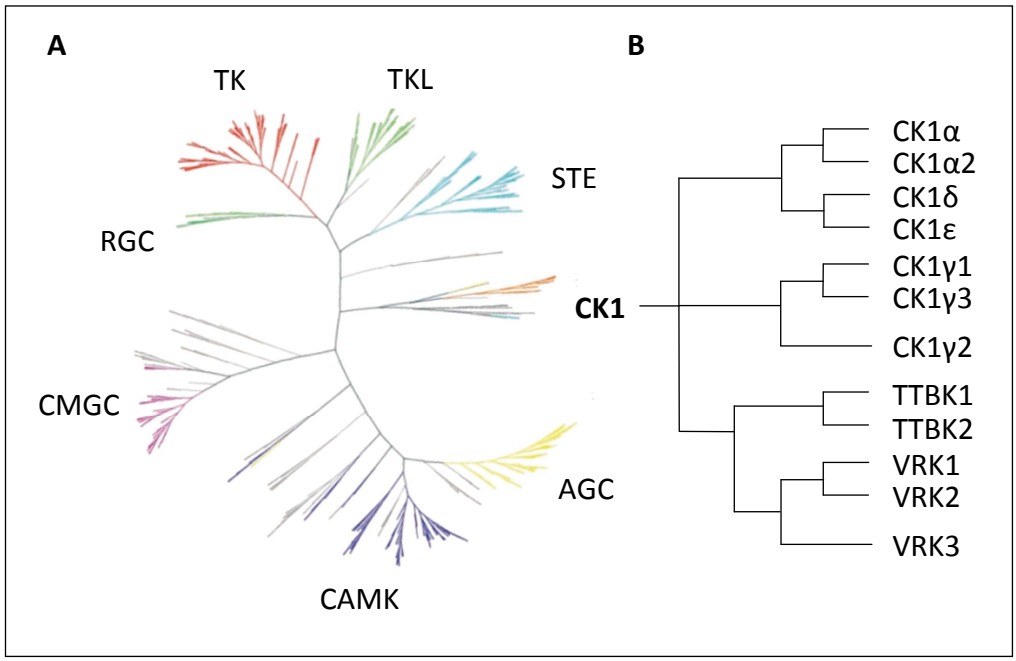

Abbildung 1: Casein Kinase 1 (CK1) Familie: Phylogenetische Beziehung
(A) Die Abbildung zeigt ein Dendrogramm der verschiedenen Hauptgruppen der eukaryotischen Proteinkinasen; Abb. modifiziert nach [107] ***(B)*** Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft humaner CK1 Isoformen (CK1α, γ1-3, δ und ε) und anderen Mitgliedern der CK1-Familie (*TTBK1, 2*: Tau-Tubulin-Kinase 1,2 und *VRK1-3*: Vaccinia-related kinase 1-3); Abb. modifiziert nach [107]. Abkürzungen: *CK1:* Casein Kinase 1; *AGC*: PKA- (Proteinkinase A-), PKG- (Proteinkinase G-), PKC- (Proteinkinase C-) Familie enthaltende Kinasegruppe; *CAMK:* Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen; *CMGC:* CDK- (Cyklin-abhängige Kinase-), MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-), GSK3- (Glykogensynthasekinase 3-), CLK- (CDC-Kinase-ähnliche Kinase-) Familie enthaltende Kinasegruppe; *RGC*: Rezeptorguanylatzyklasen; *TK*: Tyrosinkinasen; *TKL:* Tyrosin Kinase-like; *STE*: Homologe der Sterile 7, 11, 20 Kinasen der Hefen

1.2.2 Die CK1-Familie

Die CK1 Familie ist eine eigenständige phylogenetische Familie von hochkonservierten, monomeren, second messenger unabhängigen Serin/Threonin-spezifischen Kinasen, welche in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und ATP als Kosubstrat für die Phosphorylierung verwendet [55]. In Säugetierzellen konnten bisher sieben CK1 Isoformen (α, β, $\gamma_{1\text{-}3}$, δ, und ε) [45, 54, 140, 142, 185] sowie mehrere Splicevarianten von CK1 identifiziert werden [18, 140, 162]. Diese weisen alle eine hohe Homologie in ihren Kinasedomänen auf, unterscheiden sich aber in ihren regulatorischen C-terminalen Domänen [60, 61, 107] (zur Übersicht: [90]). Einander am ähnlichsten sind sich CK1δ und

CK1ε, hier besteht eine über 98 % identische Aminosäuresequenz innerhalb der katalytischen Domäne [45]. Unterschiede innerhalb der CK1-Isoformen gibt es besonders in ihren terminalen Sequenzbereichen. Die Länge der aminoterminalen Domäne beträgt zwischen 9 bis 76 Aminosäuren. Die carboxyterminale Domäne variiert wesentlich stärker zwischen 24 bis 200 Aminosäuren. CK1δ und ε sind durch kurze aminoterminale und relativ lange carboxyterminale Domänen gekennzeichnet [21, 45].

Innerhalb der hochkonservierten katalytischen Domäne wurde neben der ATP-Bindungsdomäne noch eine Kinesin homologe Domäne (KHD) [139, 179], eine putative Kernlokalisationssequenz (NLS) [140, 167, 185] sowie eine putative Dimerisierungsdomäne (DD) [102] nachgewiesen. Die KHD hat eine funktionelle Bedeutung bei der Interaktion der Motorproteine der Kinesin Familie mit dem Mikrotubulinetzwerk der Zelle [139, 179]. Die KHD könnte somit die Interaktion der CK1 mit dem Zytoskelett ermöglichen [10] (siehe Abb. 2).

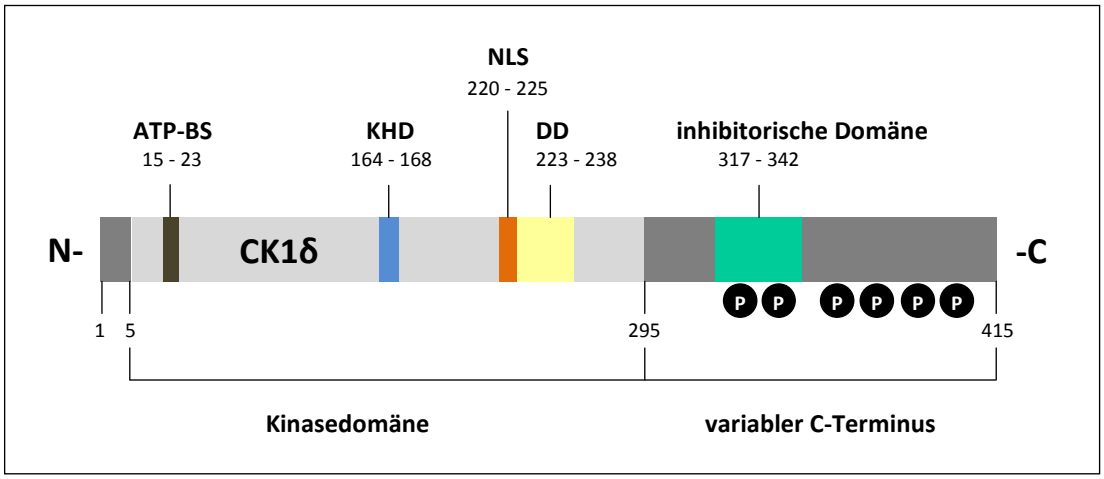

Abbildung 2: Domänenstruktur der humanen Casein Kinase 1δ
Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur der humanen CK1δ. Die Zahlen geben die jeweilige Aminosäureposition an. Die Kinasedomäne ist in hellgrau, die KHD in blau, die NLS in orange, die DD in gelb und die inhibitorische Domäne in grün dargestellt. Die C- und N-terminalen Domänen sind in dunkelgrau und die ATP-BS und Phosphate in schwarz dargestellt. Abkürzungen: *CK*: Casein Kinase; *ATP-BS*: ATP-Bindungsstelle; *KHD:* Kinesin homologe Domäne; *NLS:* putative Kernlokalisationssequenz; *DD:* putative Dimerisierungsdomäne; *P:* Phosphat; *N*: N-terminale Domäne; *C*: C-terminale Domäne

1.2.2.1 Konsensussequenz und Substratspezifität

Die Casein Kinase 1 lässt sich in die kleine Gruppe der azidotropen Proteinkinasen einordnen, da die Substraterkennung vor allem durch saure Aminosäuren definiert ist [47] und sie ist eine der wenigen Proteinkinasen, die bereits phosphorylierte Substrate erkennt [46, 138]. Eine Erklärung für diese Substratspezifität liefert das Vorliegen einer

Konzentration positiver Ladungen um die Substratbindungsstelle der Kinasedomäne [101]. Ein wichtiges Erkennungsmotiv für Substrate der CK1 ist -S(P)/T(P)-Xn-S/T-, welches die kanonische Konsensussequenz bildet. S(P)/T(P) steht dabei für einen phosphorylierten Serin- oder Threoninrest, X für jede beliebige Aminosäure. Um in einer wiederkehrenden Sequenz eine progressive Phosphorylierung zu ermöglichen, wird der erste Serinrest phosphoryliert, um dann eine Erkennungssequenz für die nächste Phosphorylierungsstelle zu schaffen. Die Aktivität der CK1 wird somit über den Phosphorylierungsstatus der Substrate kontrolliert. Für eine effiziente Phosphorylierung mittels CK1 kann auch eine Ansammlung negativ geladener Aminosäurereste an der Position n-3 oder n-4, bezogen auf den zu phosphorylierenden Aminosäurerest, das Phosphoserin oder Phosphothreonin in diesem Motiv ersetzen [1, 46, 47, 54]. CK1 erkennt auch nicht-kanonische Konsensusmotive. Dazu zählt das Motiv S*LS (Ser-Leu-Ser), welches in ß-Catenin und im Transkriptionsfaktor NF-AT (nuclear factor for activated T-cells) enthalten ist. SLS wird, in Kombination mit einer Agglomeration saurer Aminosäurereste C-terminal von der Phosphoakzeptor-Stelle, von CK1 erkannt [108]. Ein weiteres Motiv für die CK1 vermittelte Phosphorylierung ist –FXXXF- (Phe-Xaa-Xaa-Xaa-Phe), welches sich in verschiedenen CK1 Substraten befindet [123, 177]. In Sulfatid und Cholesterol-3-Sulfat (SCS) Bindungsproteinen wurde für CK1α, δ und ε eine weitere Konsensussequenz mit dem Phosphorylierungsmotiv -K/R-X-K/R-X-X-S/T- beschrieben. Bindet SCS an die Gehirnproteine Myelin-Basisches Protein (MBP) oder tau Protein (TP), werden diese durch CK1 phosphoryliert [85]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung durch CK1 auch von der dreidimensionalen Struktur des Substrates abhängig ist und nicht allein der kanonischen Konsensussequenz oder der lokalen Struktur der Phosphoakzeptorstelle unterliegt [21].

In der vergangenen Zeit konnten eine Vielzahl von CK1 Substraten entdeckt werden und ihre Anzahl steigt stetig. Dies sind verschiedene Proteine, vor allem aber intrazelluläre Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Darunter befinden sich virale Onkogene, Transkriptions- und Translationsfaktoren, Proteine des Zellzyklus, Tumorsuppressoren, virale Proteine und Rezeptoren. Daraus ergibt sich, dass Mitglieder der CK1 Familie an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt sind. So sind sie an der Regulation des zirkadianen Rhythmus, des Kerntransports, der DNA-Reparatur und der Chromosomensegregation beteiligt. Zudem spielen CK1 Isoformen eine wichtige Rolle für

die Regulation von Differenzierungsprozessen, apoptotischen Signaltransduktionswegen und proliferativen Prozessen (zur Übersicht: [55, 82, 90, 133]).

1.2.2.2 Regulation der CK1 Expression und Aktivität

Die Mitglieder der CK1-Familie werden als konstitutiv aktive Enzyme charakterisiert. Sie können als aktive Enzyme aus diversen Organismen, Geweben und Zelllinien isoliert werden [167].

Da CK1 an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt ist, inkludiert dies eine sorgfältige Regulierung ihrer Aktivität. Eine Reihe von Regulationsmechanismen der CK1 sind bereits *in vitro* und *in vivo* bekannt.

Die Regulation der CK1 Aktivität durch posttranslationale Modifikationen wird überwiegend durch reversible Phosphorylierungen vermittelt. Ein wesentlicher Mechanismus der Aktivitätsregulierung ist die inhibitorische Autophosphorylierung innerhalb der C-terminalen Domäne. Hier entstehen nach der Autophosphorylierung Sequenzen mit dem Motiv T(P)/S(P)-XXJ, in der X jede Aminosäure außer Serin oder Threonin darstellt. Diese phosphorylierten Bereiche können möglicherweise als Pseudosubstrate wirken, welche das katalytische Zentrum blockieren und somit die Kinaseaktivität inhibieren. *In vitro* findet diese Autophosphorylierung sehr schnell statt und führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität. Durch eine Dephosphorylierung der Kinasen lässt sich die Aktivität um das zwanzigfache steigern. Unter physiologischen Bedingungen werden die CK1 Isoformen durch endogene Proteinphosphatasen im dephosphorylierten, aktiven Zustand gehalten und überwinden somit den inhibitorischen Effekt der Autophosphorylierung [53, 137]. Eine weitere Umgehung dieses Mechnismus ist die proteolytische Abspaltung der C-terminalen Domäne. Hierbei konnte *in vitro* eine zwei- bis dreifache Aktivitätssteigerung der Kinasen festgestellt werden, da durch die Abspaltung auch die autoinhibitorische Domäne entfernt wird. Dies hat zudem Auswirkungen auf die Wirkung von Phosphatasen, da diese eine rekombinante, C-terminal verkürzte Mutante nicht weiter in ihrer Aktivität beeinflussen können. Behandelt man CK1ε mit Phosphatasen, führt dies zu einer fünf- bis zwanzigfachen Aktivitätssteigerung dieser Kinase, eine Behandlung von CK1ε mit dem trunktierten C-Terminus bewirkt lediglich nur eine zweifache Aktivitätssteigerung [21].

Veränderungen des Aktivitätszustandes von CK1 Isoformen können auch durch ortsspezifische Phosphorylierung durch andere zelluläre Kinasen erreicht werden. So

konnte gezeigt werden, dass CK1δ durch die Proteinkinase A (PKA), die Protein Kinase B (Akt), die „CDC-like kinase 1“ (CLK2) und die Protein kinase C (PKC) in der C-terminalen Domäne phosphoryliert wird, wodurch die Aktivität von CK1δ beeinflusst wird [52].

In vivo konnte gezeigt werden, dass auch der „Wingless Int-1” (Wnt)-Signalweg Einfluss auf die Aktivität von CK1ε haben kann. Die Wnt-induzierte Stimulation der transienten Dephosphorylierung der autoinhibitorischen Domäne von CK1ε führt über eine Aktivierung einer Serin/Threonin Phosphatase, wie beispielswiese Protein Phosphatase 1 (PP1), Protein Phosphatase 2A (PP2A) oder Calcineurin, zu einer Aktivierung von CK1ε [161]. Diesem Vorgang ähnlich, führt die Stimulation metabotropischer Glutamat Rezeptoren über einen intrazellulären Calciumanstieg mit resultierender Aktivierung der Calcium-regulierten Phosphatase Calcineurin zu einer subsequenten Dephosphorylierung C-terminaler Phosphorylierungsstellen von CK1ε und somit zu einer Aktivierung von CK1ε in neostriatalen Neuronen [100].

Die Regulation der Kinase-Substrat Interaktion sowie die Erreichbarkeit von Substraten kann auch durch subzelluläre Lokalisation und Kompartimentierung der CK1 Isoformen gesteuert werden. Für CK1-homologe Kinasen in Hefen konnte gezeigt werden, dass die Funktion der CK1 eng mit ihrer intrazellulären Lokalisation zusammenhängt. Dort befindet sich die CK1-Homologe Hrr25 im Zellkern, während die CK1-Homologen Yck1, Yck2, Yck3, Cki1, Cki2 über einen Isoprenylrest in der inneren Zytoplasmamembran verankert sind. Mutationen im Bereich des nukleären Lokalisationssignals von Hrr25 oder in dem Bereich des Isoprenylrestes führen somit zu einem Lokalisations- und Funktionsverlust der Kinasen [72, 169, 173, 175]. Bei den höheren Eukaryonten ist die subzelluläre Lokalisation der CK1 Isoformen α und δ gut untersucht. Die Lokalisation verändert sich Zellzyklus-abhängig und befindet sich bei Zellen der Interphase in vesikulären cytosolischen Strukturen, Teilen des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums. In der Mitose sind beide Isoformen mit dem Spindelapparat und den Zentrosomen assoziiert [10, 14, 56, 115, 148]. Zudem ergaben Untersuchungen zum zirkadianen Rhythmus in Mäusen, dass die Lokalisation von CK1δ und CK1ε im Nukleus tageszeitlich reguliert ist [93].

Ebenso können verschiedene Effektoren mit ihren Regulationsmechanismen die *in vitro* und die *in vivo* Aktivität der CK1 beeinflussen. Eine Steigerung der CK1 Aktivität erfolgt beispielsweise durch die direkte Stimulation der Zellen mit dem Hormon Insulin [25],

durch die Behandlung der Zellen mit Topoisomerase-Inhibitoren [91] sowie durch virale Transformation [41]. In neuronalen Zellen und in Erythrozyten zeigt sich durch eine Steigerung der intrinsischen Membrankonzentration von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) eine reduzierte CK1α Aktivität [9, 13, 56].

1.2.3 Beteiligung von CK1 in der Entstehung von Krankheiten

Mutationen und/oder eine Deregulation von CK1 Isoformen tragen zur Entstehung verschiedener Kranheitsbilder bei. Hierzu zählen unter anderem neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Alzheimer und Parkinson), Schlafrhythmusstörungen und Tumorerkrankungen (zur Übersicht: [90, 92]).

1.2.3.1 CK1 und verschiedene Tumore

In mehreren Malignonem konnte man inzwischen Veränderungen in der Expression von CK1 Isoformen nachweisen. So wurde im Nierenzellkarzinom eine Steigerung der Expression von CK1γ3 beobachtet [112].

Im Mammakarzinom sowie im duktalen Pankreaskarzinom konnte eine erhöhte Expression von CK1ε und δ nachgewiesen werden [15, 49, 57, 92] und auch im Chorionkarzinom wurde eine erhöhte CK1δ Expression beobachtet [90, 159]. Des Weiteren konnte eine Veränderung der CK1ε Expression in hyperproliferierendem Colonepithel nachgewiesen werden [168].

Neben einer deregulierten Expression finden sich in Tumoren auch Mutationen von CK1 Isoformen. Beispielsweise wurden im Mammakarzinom verschiedene Mutationen in der kodierenden Region von CK1ε nachgewiesen [48, 49]. Einige dieser Mutationen führen zu einem erhöhten onkogenen Potential, indem sie die Zelladhäsion stören und die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen steigern [48]. In der Darmschleimhaut begünstigt eine Mutation von Arginin zu Histidin an der Position 342 in der C-terminalen regulatorischen Domäne von CK1δ die Entwicklung von Adenomen [165].

Des Weiteren führt die konditionelle Ausschaltung von CK1α im Darmepithel von Mäusen zu einer Aktivierung Wnt-abhängiger Signalwege, zu „DNA-Damage Response“ und zu einer Aktivierung von p53. Mäuse, die nur ein funktionelles CK1α Gen und kein p53 im Darmepithel exprimieren, entwickeln innerhalb kürzester Zeit invasive Tumoren. Diese Ergebnisse zeigen, dass CK1α durch die Inhibition Wnt-induzierter Proliferation

tumorsuppressive Wirkungen entfaltet und zudem p53 aktivieren kann, wodurch eine Konvertierung zum invasiven Tumorwachstum unterdrückt wird [42].

1.2.3.2 CK1 und Lymphome

Eine Korrelation zwischen CK1 und Lymphomen wurde schon in mehreren Studien beschrieben:

In Zellen hyperplastischer B-Follikel und in fortgeschrittenen B-Zell Lymphomen p53 defizienter Mäuse konnte man eine erhöhte Immunfärbung von CK1δ nachweisen [109]. Eine weitere Assoziation zwischen CK1 und Lymphomen zeigt sich in der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms. Hier konnte man eine Beteiligung der CK1 zusammen mit weiteren Kinasen an Signaltransduktionswegen dieser Lymphomentität nachweisen [20].

Im „activated B-cell-like“ (ABC) Subtyp des DLBCL konnte man nachweisen, dass CK1α den Transkriptionsfaktor NF-kappaB bifunktional reguliert. Während CK1α sich mit Carma1 verbindet und den Antigenrezeptor-induzierten Transkriptionsfaktor NF-kappaB fördert, phosphoryliert es Carma1 auch und dämpft das Signal. NF-kappaB wird für die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten sowie für das Überleben von verschiedenen Lymphomentitäten benötigt. ABC-DLBCL Zellen benötigen CK1α für eine konstitutive NF-kappaB Aktivität und CK1α fungiert somit als ein CEMal- (conditionally essential malignancy) Gen, welches Ziel neuer Therapieansätze sein könnte [12].

Eine weitere Verbindung konnte man zwischen dem Retinoidrezeptor X (RXR) und CK1α feststellen. Agonisten des RXR, wie z.B. natural9-cis-retinoic acid, induzieren in einigen Tumorzellen Wachstumsarrest und Apoptose und werden z.B. für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms eingesetzt. CK1α wirkt sich negativ auf den pro-apoptotischen Signalweg aus, der durch RXR Agonisten induziert wird, indem es RXR phosphoryliert. Eine Hemmung der CK1α könnte somit die Wirkung von RXR Agonisten verstärken [187]. Zudem konnte man in den Zellen von Patienten mit einer akuten myeloblastischen Leukämie eine erhöhte Aktivität von CK1 im Nukleus nachweisen [41].

1.2.3.3 CK1 in der Tumorgenese

CK1 Isoformen können durch „site“-spezifische Phosphorylierung die Eigenschaften von p53 sowie dessen Wechselwirkungen mit dem Onkogen Mdm2 modulieren [30, 40, 77, 91, 170, 177]. Dies unterstützt die Annahme, dass Änderungen in den Wechselwirkungen von CK1 Isoformen mit Tumorsuppressoren und Onkogenen zur Tumorentstehung und

Tumorprogression beitragen. So stellt u.a. auch das Onkogen Mdm2 ein Substrat für CK1 Isoformen dar [177]. Ein Funktionsverlust von CK1 trägt zu erhöhten Mdm2 Expressionsraten bei, die in vielen Tumorentitäten gefunden werden [80]. Mehrere Studien belegen zudem, dass eine Deregulation von CK1 Isoformen zu einem erhöhten Metastasierungspotential führen [51, 116, 149, 180].

Zusätzlich spielen auch antiapoptotische Wirkungen von CK1 eine Rolle in der Tumorgenese. So wird durch die CK1 vermittelte Phosphorylierung des Tumornekroserezeptors p75 der über diesen Rezeptor vermittelte Apoptosesignalweg inhibiert [11]. Die Resistenz gegenüber einer durch den Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) induzierten Apoptose scheint durch die CK1 abhängige Phosphorylierung von Proteinen des „death inducing signaling complexes“ (DISC) zurückzuführen sein [81]. In der Fas-vermittelten Apoptose ist in Typ II Zellen die Resistenz darauf zurückzuführen, dass CK1 das proapoptotische Protein „BH3 interacting domain death agonist” (Bid) phosphoryliert und dadurch die proteolytische Spaltung von Bid inhibiert. Dies hat zur Folge, dass die Aktivierung des apoptotischen Mitochondrien-abhängigen Signalweges verhindert wird [34].

Bei Differenzierungsprozessen, insbesondere bei der Regulation Wnt-vermittelter Signaltransduktionswege (kanonischer Wnt/ß-Catenin-Signaltransduktionsweg und nicht kanonische Wnt-Signaltransduktionswege) besitzen CK1 Isoformen (CK1α, δ und γ) zahlreiche positive und negative regulatorische Funktionen [133].

Im kanonischen Signalweg ist CK1α eine Komponente des ß-Catenin Destruktionskomplexes [99] und phosphoryliert mitunter ß-Catenin [2, 99, 129, 141, 181], welches somit für die Ubiquitinylierung mit nachfolgender Degradation durch Proteasomen markiert wird. In Anwesenheit eines Wnt-Signals wird das zytoplasmatische Protein Dishevelled (Dvl) aktiviert, welches wiederum die ß-Catenin Phosphorylierung inhibiert. ß-Catenin wird somit stabilisiert, es akkumuliert und transloziert in den Zellkern, bindet an Transkriptionsfaktoren und induziert schließlich die Expression von Zielgenen [96, 174].

Mutationen oder eine veränderte Expression der Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges, somit auch von CK1 Isoformen, können ebenfalls einen Einfluss auf die Onkogenese haben [86].

1.2.4 CK1-spezifische Inhibitoren

Mitglieder der CK1 Familie sind aufgrund ihrer Beteiligung an der Genese und der Progression maligner Tumoren potentielle Zielproteine einer pharmakologischen Inhibition. Dies führte zur Entwicklung mehrerer ATP-Analoga:

Einer der ersten CK1 spezifischen Inhibitoren ist CKI-7 (N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide), der bereits 1989 beschrieben wurde [23]. IC261 (3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl) methylidenyl]-indolin-2-one) ist ein selektiver ATP-kompetitiver CK1 spezifischer Inhibitor, der die Isoformen CK1δ und ε bereits in sehr geringen Konzentrationen (1μM) hemmt [110]. IC261 bindet an die ATP-Bindungsstelle, wobei es dann zu einer Konformationsänderung der Kinase und zu einer Reduktion der Dissoziationsrate des Kinase-Inhibitor-Komlexes kommt. Da IC261 bei physiologischem pH ungeladen vorliegt, kann er die Zellmembran gut penetrieren [10, 110]. D4476 (4-[4-(2,3-dihydro-benzo[1,4]dioxin-6-yl)-5-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2yl] benzamide) ist ein weiterer ATP kompetitiver CK1 Inhibitor, der ursprünglich für die Inhibition der „activin receptor-like kinase 5“ (ALK5) entwickelt wurde und eine noch geringere IC_{50} als IC261 aufweist. Bei einer Konzentration von 10 μM hemmt D4476 über 90% der CK1δ [136].

Das Imidazol PF-670462 (4-[3-cyclohexyl-5-(4-fluoro-phenyl)-3*H*-imidazol-4-yl]-pyrimidin-2-ylamine) ist ein weiterer potenter CK1 spezifischer Inhibitor, der CK1δ und CK1ε in etwa gleichem Maße inhibiert [6]. Dahingegen weist der CK1 spezifische Inhibitor PF-4800567 (3-(3-chloro-phenoxymethyl)-1-(tetrahydro-pyran-4-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ylamine) eine deutlich höhere Affinität zu CK1ε (IC_{50}: 32 nM) auf als zu CK1δ (IC_{50}: 711nM) [171].

Anhand einer in silico Studie konnten von Cozza und Mitarbeiter zwei Anthraquinon Analoga als neue CK1δ Inhibitoren identifiziert werden. Mit Werten von einer IC_{50} von 0,3 bzw. 0,6 μM gelten diese als sehr potente und selektive CK1δ Inhibitoren [31].

Die Isoxazole 1 und 2, welche ursprünglich für die Inhibition der p38α Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) entwickelt wurden, konnten anhand von *in vitro* Kinase Assays als duale Inhibitoren mit einer IC_{50} von 0,23 μM für Isoxazole 1 und einer schwächeren Wirkung für Isoxazole 2 gegen CK1δ festgestellt werden. [128]. Auch klassische p38α MAPK Inhibitoren, wie die Imidazole SB 203580 und SB 202190, zeigen eine Inhibierung von CK1δ (IC_{50} von 0,12 μM für SB 2035809) [128, 147]. Durch molekulares Modeling wurden auf der Grundlage von Isoxazole 1 weitere Komponenten entwickelt und

getestet, die eine höhere Affinität zu CK1δ besitzen als zu p38α. Der Inhibitor Compound 17 oder CKP138 ((*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide) stellte sich dabei mit einer IC_{50} von 5 nM als der bisher wirksamste CK1δ spezifische Inhibitor heraus.

Neben den bisher genannten Beispielen existieren noch weitere CK1 spezifische Inhibitoren, unter anderem das (-)-Matairenisol (MTS) [183], die Lamellarine [8], das Purin Roscovitin (CYC202, Seliciclib) [124] sowie Polyhalogenbenzimidazole [4].

1.3 Fragestellung

Auf dem Gebiet der malignen Lymphome konnten in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte in der Therapie dieser Tumorentität erzielt werden. Neben der konventionellen Chemotherapie, der autologen Stammzell-Transplantation sowie immuntherapeutischen Strategien, rücken spezifische molekulare Strategien wie z.B. die die Nutzung von Proteinkinase-Inhibitoren in den Vordergrund und stellen eine weitere Verbesserung der Lymphomtherapie in Aussicht [39]. Solche „small molecule“ Substanzen könnten sich alleine oder auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zur Therapie verschiedener Tumorentitäten eignen.

Die Dysregulation von Kinasen ist ein onkogener Faktor, welcher zu unphysiologischem Wachstum und Überleben von Krebszellen führen kann [186]. Die Kinasen gehören somit zu wichtigen Zielmolekülen neuer medikamentöser Behandlungsstrategien [27]. Die Casein Kinase 1δ, welche unter anderem wichtige Funktionen in der Zellzyklusprogression, Chromosomensegregation, Apoptose sowie Differenzierungsprozessen der Zelle hat [90], stellt ein solches Zielmolekül dar. Die Inhibition dieses Zielmoleküls durch Proteinkinase-Inhibitoren könnte somit einen neuen Ansatz in der Therapie maligner Lymphome darstellen und zur Verbesserung der Lymphomtherapie beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Expression der CK1 Isoform δ in lymphatischen Tumorzelllinien nachzuweisen, ihre Aktivität zu bestimmen, sowie die Wirkungen von CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ und auf die Proliferation dieser Lymphomzelllinien zu bestimmen. Zum Vergleich und zur Dosisfindung sollen die Wirkungen der CK1 spezifischen Inhibitoren zunächst an adhärent wachsenden Tumorzelllinien getestet werden. Zur Bestimmung der Expressionsrate von CK1δ sollen Western Blot Analysen und zur Bestimmung der CK1δ Aktivität Kinasierungsreaktionen durchgeführt werden. Um die Effekte CK1 spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ zu untersuchen, wurden ebenfalls Kinasierungsreaktionen durchgeführt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollen die Effekte der CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Proliferation der lymphatischen Tumorzelllinien bestimmt werden und Veränderungen in der Zellzyklusverteilung aufgezeigt werden.

Die durchgeführten Experimente werden dazu beitragen, neue Informationen über molekulare Therapiestrategien, speziell in Bezug auf das Zielmolekül CK1δ, zu gewinnen und somit neue Behandlungsmöglichkeiten der malignen Lymphomentitäten und anderen Tumorerkrankungen zur weiteren Therapieoptimierung aufzuzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank HeraCell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Chemix Modul	Agfa, Mortsel, Belgien
ClinBench HeraSafe Typ HS 18/2	Heraeus, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Druckball	Deutsch u. Neumann, Berlin, Deutschland
ETTAN Anlage	Amersham, Freiburg, Deutschland
FACS-Gerät FACScan	BD, San Jose, Californien, USA
Filmentwicklungsmaschine X OMAT M35	Kodak, New York, USA
Ganzglas-Vakuumfiltrationsgerät	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Geltrockner SGD2000 Gel dryer	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Heidolph Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Hypercassette	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mini-Proteon System	Biorad, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetboy acu, VACUSAFE comfort IBS	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power-supply PAC200	Biorad, München, Deutschland
Szintillationszähler LS6000IC	Beckman, Unterschleissheim-Lohhof, Deutschland
Tecan Spectra II	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vacuum-Pumpe	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Vacuum-Pumpe VLP80 Valupump	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland

Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

6-Wellplatten	Nunc, Roksilde, Dänemark
96-Microwellplatten	Nunc, Roksilde, Dänemark
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Chromatography paper 3MM Chr	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Cryogefäße	Nunc, Roksilde, Dänemark
Cycle Test™ Plus DNA Reagent Kit	BD, San Jose, Californien, USA
Dialyseschläuche	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen, 2-teilig	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventum, Belgien
High performance autoradiography film	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Medical X-Ray Film Cronex5	Agfa, Mortsel, Belgien
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystryene Round-Bottom Tube (5 ml)	BD Bioscience, Bedford, USA
Prot/Elec Pipet Tips	Biorad, München, Deutschland
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotilab-Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen BD Plastipak™	BD Bioscience, Bedford, USA
Szintillationsgefäße	Merck Eurolab, Bruchsal, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunclon™(25 ml, 80 ml)	Nunc, Roksilde, Dänemark
Zellkulturschaber	Corning Costar, Bodenheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Anionen Austaschsäule Resource Q 1 ml	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Antigoat IgG	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
Antikörper CK1δ goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotchnology, Santa Cruz, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ß-Mercaptoethanol (MSH)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Brij 35 solution 30 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250	Waldeck/Chroma, Münster, Deutschland
Cumarsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
D-MEM (high glucose, L-Glutamine)	Invitrogen (Gibco), Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Dual Color	Biorad, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure 100 %	VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethanol	Fluka, Seelzen, Deutschland
FCS (fötales Kälberserum)	Invitrogen (Gibco), Darmstadt, Deutschland
G 334i Fixierer	Röntgen Bender, Baden-Baden, Deutschland
G 138i Entwickler	Röntgen Bender, Baden-Baden, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H_2O_2	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Hybond P (PVDF Transfermembran)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Isopropanol	Fluka, Seelzen, Deutschland
Leupeptin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland
Luminol	Fluka, Seelzen, Deutschland
Methanol	Fluka, Seelzen, Deutschland

Milchpulver (Blotting grade)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Fluka, Seelzen, Deutschland
NP-40	Fluka, Seelzen, Deutschland
PBS	Invitrogen (Gibco), Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
RBS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 (L-Glutamine, Phenol Red)	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Sigma Aldrich, München, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tris	USB Affymetrix, Santa Clara, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma Aldrich, München, Deutschland
[γ-^{32}P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Colo357	humane Pankreas Adenokarzinom Zelllinie [117]
DOHH-2	humane B-Zell Lymphomzelllinie [88]
KM-H2	humane Hodgkin Lymphomzelllinie [83]
MCF7	humane Brust Adenokarzinom Zelllinie [151]
Ramos	humane Burkitt Lymphomzelllinie [87]
SW620	humane kolorektale Adenocarzinom Zelllinie [94]
U-H01	humane Hodgkin Lymphomzelllinie [103]

2.1.5 CK1 spezifische Inhibitoren

Compound 8	CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde
Compound 17	(*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide [128]
IC261	3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one [110]

2.1.6 Software und Statistikprogramme

CELL QUEST	BD Bioscience, Bedford, USA
CorelDraw12	Corel, Unterschleißheim, Deutschland
Endnote X1	Adept Scientific GmbH, Frankfurt, Deutschland
Excel 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Magellan 3	Tecan, Männedorf, Schweiz
TINE 2.0	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Word 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Arbeit mit eukaryotischen Zelllinien wurde ausschließlich unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien

Die adhärent wachsenden Zelllinien MCF7, Colo357 und SW620 wurden in oberflächenbehandelten Zellkulturschalen mit jeweils 10 ml des für jede Zelllinie spezifischen Zellkulturmediums bei 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung von MCF7 Zellen und SW620 Zellen erfolgte in Dulbecco`s modifiziertem Eagle`s Medium (D-MEM) und diejenige von Colo357 Zellen in einem 1:1 Verhältnis von D-MEM und RPMI 1640 Medium. Die verwendeten Medien wurden jeweils zusätzlich mit 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Für optimale Wachstumsbedingungen der Zellen wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage erneuert. Dieser Vorgang implizierte zunächst die Absaugung des alten Mediums, eine Waschung der Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und anschließend die Zugabe von 10 ml frischem Medium. Für eine ausreichende Substrat- und Nährbodenversorgung der Zellen wurden die subkonfluent gewachsenen Kulturen regelmäßig passagiert. Dabei wurden die adhärenten Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin behandelt und im Brutschrank inkubiert. Die sich vom Boden der Zellkulturschale abgelösten Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und in einer entsprechenden Verdünnung auf neue Zellkulturschalen verteilt.

2.2.1.2 Kultivierung von in Suspension wachsenden Zelllinien

Die Zelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wurden in Zellkulturflaschen mit dem für die Zelllinie spezifischen Medium ebenfalls bei 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien Ramos, KM-H2 und DOHH-2 erfolgte in RPMI 1640 Medium und die Kultivierung der Zelllinie U-HO1 in einem 4:1 Verhältnis von D-MEM und RPMI 1640 Medium. Beide Medien wurden zusätzlich mit 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 10 % hitzeinaktivierten FCS versetzt. Für optimale Wachstumsbedingungen der Zellen erfolgte ca. alle 2-3 Tage ein Austausch der Hälfte des Mediums mit frischem Medium. Durch die Ablagerung der Suspensionszellen am Boden der Flasche konnte altes Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt werden. Ab einer erreichten Zelldichte von ca. 1,5 x 10^6 Zellen pro ml wurde das Volumen des Mediums entsprechend erhöht. Nach dem Erreichen des maximalen Volumens einer Zellkulturflasche wurden die Zellen 1:2 auf neue Zellkulturflaschen gesplittet.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum Einfrieren der Zellen wurden etwa 1 x 10^6 Zellen durch zwei minütiges Zentrifugieren bei 800 rpm Raumtemperatur sedimentiert und in 1 ml des entsprechenden, vorgekühlten Mediums, versetzt mit 10 % DMSO, aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. DMSO verhindert dabei die Ausbildung von Eiskristallen aus der intrazellulären Flüssigkeit der Zellen beim Einfrieren. Um toxische Effekte von DMSO vorzubeugen, wurden alle Arbeitsschritte zeitnah auf Eis durchgeführt. Bei den adhärent wachsenden Zelllinien wurden die Zellen einer subkonfluent bewachsenen Zellkulturschale vor der Zentrifugation zunächst abtrypsinisiert. Die Einfrierröhrchen wurden anschließend sukzessiv in flüssigem Stickstoff abgesenkt und somit bei -196 °C (flüssiger Stickstoff) gelagert.

Eine Rekultivierung der Zellen erfolgte zunächst über eine kurze Erwärmung der Zellen bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml des entsprechenden vorgewärmten Mediums gewaschen und abzentrifugiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit 10 ml des entsprechenden frischen Mediums je nach Zelllinie entweder auf Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen.

Einfriermedium: D-MEM
10 % (v/v) FCS
10 % DMSO

2.2.1.4 Wachstumskurven

Das Wachstum der Zelllinien Colo357 und MCF7 wurde unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren mittels Auszählung mit der Neubauer Zählkammer untersucht.

Dazu wurden zunächst 3 ml des entsprechenden Mediums mit 2 x 10^5 Zellen/ml der Zelllinien Colo357 und MCF7 auf jede Platte der jeweils insgesamt acht 6-Wellplatten ausgesät und für 24 h kultiviert. In dieser Zeit wachsen die Zellen adhärent an die Platte und sind bereit für eine Behandlung. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h, 48 h und 72 h mit folgenden Inhibitoren sowie den jeweiligen Konzentrationen:

IC261: 0,8 und 1,6 µM

Compound 17: 1 µM

Compound 8: 4 µM

Als Kontrolle dienten für jede Zelllinie neun Platten, die ebenso für 24 h, 48 h und 72 h mit einer DMSO-Konzentration von 0,008 % kultiviert wurden. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die behandelten Zellen sowie die jeweiligen Kontrollen mit der Neubauer Zählkammer ausgezählt und ausgewertet. Dazu wurde zunächst das Medium in den Platten abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, sodass sich die adhärent wachsenden Zellen vom Boden ablösten. Danach wurden die abgelösten Zellen erneut in 2,5 ml des entsprechenden frischen Mediums aufgenommen, mit der Pipette mechanisch getrennt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Daraus konnte mit einer Pasteurpipette eine geringe Menge der Zellsuspension entnommen werden und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt werden.

2.2.1.5 MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Zytotoxizitätstest ist ein quantitativ colorimetrischer Test, der den Anteil lebensfähiger Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen, beispielsweise nach Testung einer auf die Zellen einwirkenden Substanz, misst. Das den Zellen angebotene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, wird in den Mitochondrien von vitalen und biologisch aktiven

Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion zu blau-violetten, wasserunlöslichen Formazanen reduziert. Dabei ist die Farbintensität direkt proportional zur Vitalität der Zellen.

Für den MTT-Versuch mit den Zelllinien Colo357 und MCF7 werden pro Zelllinie jeweils drei 96er Mikrowellplatten vorbereitet. Für die Zelllinie Colo357 werden pro well 1,2 x 10^4 Zellen und für die Zelllinie MCF7 pro well 1,6 x 10^4 Zellen in 100 µl des entsprechenden Mediums ausgesät und für 24 h kultiviert. In dieser Zeit wachsen die Zellen adhärent an die Plastik der Platte und sind somit bereit für eine Behandlung. Es wurde der Einfluss von drei verschiedenen Inhibitoren in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum der beiden Zelllinien untersucht und deren Vitalität mit DMSO behandelten sowie unbehandelten Zellen verglichen. Die Zellen wurden mit folgenden Inhibitoren und deren Konzentrationen behandelt:

IC261:	0,4,	0,8	und	1,6 µM
Compound 17:	0,5,	1	und	2 µM
Compound 8:	2,	4	und	8 µM

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde das Medium abgesaugt und durch je 20 µl MTT Lösung (5 mg/ml PBS) ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation der MTT-Lösung über 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Durch die anschließende Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,04N HCl und 20 % Isopropanol) pro well wurden die Zellen lysiert und die gebildeten Formazane gelöst. Die Bestimmung der optischen Dichte der gelösten Formazane erfolgte in einem „Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA) Mikrotiterplatten Lesegerät bei 570 nm, wobei die Menge der produzierten Formazane proportional zu der Anzahl vitaler Zellen ist. Als Referenzwert diente eine Extinktion mit den jeweiligen Lösungen ohne Zellen. Das Experiment wurde dreimal ausgeführt mit jeweils drei Wiederholungen pro Experiment. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Magellan 3.

2.2.1.6 Durchflusszytometrie („Fluorescence activated cell sorting" (FACS)-Analyse)

Bei dem Messverfahren der Durchflusszytometrie werden die in einer Zellsuspension vorliegenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Anhand der Interkalierung des Farbstoffes Propidiumiodid mit der DNA der Zellen entstehen Streulichtsignale, die Rückschlüsse über den DNA Gehalt der Zellen

ermöglichen und eine Zuordnung zu den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und M) erlaubt. Der Nachweis von toten Zellen und Zellfragmenten ist ebenfalls möglich.

Anhand der Durchflusszytometrie wurde der Einfluss der CK1 spezifischen Inhibitoren IC261, Compound 17 und Compound 18 auf den Zellzyklusverlauf der Zelllinien Ramos, KM-H2, U-HO1 und DOHH-2 getestet. Für diese Untersuchungen wurde der Cycle Test Plus Kit der Firma BD (USA) verwendet.

Pro Inhibitor und Zelllinie wurden zwölf Zellkulturschalen mit 5 x 10^5 Zellen pro ml in Suspension vorbereitet. Fünf Schalen wurden jeweils für 24 h und 48 h mit vier verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors und mit DMSO als Kontrolle behandelt. In den anderen zwei Schalen wurden unbehandelte Zellen zusätzlich als Kontrolle mitgeführt. Folgende Konzentrationen der Inhibitoren sowie der DMSO Kontrolle wurden verwendet:

IC261:	1,6 µM, 0,8 µM, 0,4 µM und 0,2 µM	DMSO:	1,6 µM
Compound 17:	2 µM, 1 µM, 0,5 µM und 0,25 µM	DMSO:	2 µM
Compound 8:	8 µM, 4 µM, 2 µM und 1 µM	DMSO:	8 µM

Nach der Inkubation wurden die Zellen im Medium jeweils in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mittels Zentrifugation sedimentiert (700 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das resultierende Zellpellet vorsichtig in 1 ml Cycle Test Buffer Solution resuspendiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentfrifugationsschritt bei 400 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Das resultierende Zellpellet wurde in 250 µl Lösung A (Trypsin-Puffer) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung B (Trypsin-Inhibitor und RNAse) und anschließend die Zugabe von 200 µl Lösung C (Propidiumiodid Lösung). Die Zellsuspension wurde daraufhin erneut für mindestens 10 Minuten bis maximal drei Stunden bei 2-8 °C im Dunkeln inkubiert. Bevor die Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer (BD Bioscience, USA) bestimmt werden konnte, wurden die mit Propidiumiodid angefärbten Zellen noch durch ein Metallnetz (50 µm) filtriert. Für jede Probe erfolgte die Messung von 20.000 Zellen. Mit der Software CELL QUEST (BD Bioscience, USA) erfolgte schließlich die Auswertung der Daten.

2.2.2 Protein-analytische Methoden

2.2.2.1 Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein

Für die Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden 50 ml LB-Medium (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien) mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt, mit der entsprechenden *E. coli* DH5α Stammkonserve angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 400 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin hinzugegeben und bis zu einer OD_{595} von 0,700-0,900 inkubiert. Die Expression der Proteine erfolgte durch die Induktion mit 0,1 mM IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) für 2 h bei 37 °C und 180 rpm. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde danach auf Eis in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein 30 ml Sorvall-Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 2,5 mg Lysozym gelöst in 1 ml Lysispuffer mit der anschließenden Inkubation für 30 min auf Eis. Nach der Zugabe von 10 ml Lysispuffer wurde die bakterielle DNA mittels Ultraschall für 2 sek fragmentiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 min bei 10000 rpm und 4 °C, wobei anschließend das Zellpellet mit den unlöslichen Bakterienbestandteilen verworfen wurde und der Überstand mit 300 µl aufgeschwemmter Glutathion-Sepharose 1:1 (50 % (v/v) Glutathion-Sepharose) versetzt und für 2 h bei 4 °C inkubiert wurde. Die Glutathion-Sepharose mit den gebundenen Fusionsproteinen wurde dann 2 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen. Danach wurde das Pellet noch zweimal mit 1 ml Waschpuffer 2 gewaschen und der Überstand wieder verworfen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte anschließend durch die Inkubation der Sepharose mit 200-500 µl Elutionspuffer. Nach der Elution wurden die Proteine über Nacht in Dialyseschläuche dialysiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin eingefroren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C.

Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
10 % Glycerin
0,5 % NP40

1 mM DTT
1 mM EDTA
1 mM Benzamidin
50 µM Leupeptin
Trasylol 1:100

Waschpuffer 1: 20 ml Lysispuffer (s.o.)
0,18 M NaCl

Waschpuffer 2: 20 mM Tris pH 7,6
50 mM NaCl
10 % Glycerin
1:100 Trasylol
1 mM EDTA
H_20

Elutionspuffer: 50 mM Tris HCl pH 7,5
150 mM NaCl
10 % Glycerin
5 mM reduziertes Glutathion

Dialyselösung: 50 mM Tris oH 7,0
1 mM EDTA
H_2O

2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten und Quantifizierung von Proteinmengen

Die Herstellung von Proteinlysaten diente zum Einen für die Western Blot Analyse und zum Anderen für die Proteinfraktionierung durch die „Fast protein liquid chromatography" (FPLC). Die Suspensionszellen wurden zunächst im Medium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, 5 min). Im nächsten Schritt wurde das überstehende Medium abgesaugt. Um Proteine für die Proteinfraktionierung durch die FPLC zu gewinnen, wurden die Zellpellets mit 500 µl Sucrose Lysispuffer resuspendiert. Die Proteingewinnung für die Western Blot Analyse

erfolgte mit einer Resuspendierung der Zellpellets in 500 µl NP40 Lysispuffer. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für die Lysierung der Zellen wurden die Reaktionsgefäße 30 min auf Eis gekühlt und alle 5 min mit dem Vortex durchmischt. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4 °C, 15 min). Die Proteine befanden sich nun im Überstand, wurden folglich abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das entstandene Zellpellet enthielt die unlöslichen Zellbestandteile und wurde verworfen.

Sucrose Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,0
0,27 M Sucrose
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 % Triton X-100
1 mM Benzamidin
1 : 1000 Aprotinin
1 : 100 DTT

NP40 Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
120 mM NaCl
10 % (v/v) Glycerin
0,5 % NP40
Frisch dazu:
1 mM EDTA
1 mM EGTA
5 mM DTT
50 µM Leupeptin
30 µM Aprotinin
1 mM Benzamidin

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinmengen

Zur Quantifizierung der jeweiligen Proteinmengen wurde der „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce Technology) verwendet. Dabei werden die Proben auf eine 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen, mit der Messlösung versetzt und anschließend gegen BSA-

Verdünnungen über ein Spektral-Photometer gemessen. Die Proteinlysate werden zunächst 1:8 mit H_2O verdünnt. Davon werden je 10 µl mit 200 µl Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anschließend anhand eines ELISA Mikrotiterplatten Lesegerät mit dem dazugehörigen Programm „Magellan 3“.

2.2.2.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Die verwendeten Gele hatten eine Abmessung von 90 x 80 x 1 mm und bestanden aus einem Trenngel mit einem darüber gegossenen Sammelgel. Die zu analysierenden Proben wurden zuvor mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden zunächst mit einer Spannung von 80 V im Sammelgel konzentriert und schließlich bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteingele wurden anschließend entweder geblottet (siehe 2.2.2.6.) oder mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt (siehe 2.2.2.5.).

SDS-Sammelgelpuffer:
0,1 % (w/v) SDS
4 % (w/v) Acrylamid
130 mM Tris HCl pH 6,8
Unmittelbar vor dem Gießen der Gele Hinzugabe von:
0,09 % (w/v) APS
0,3 % (v/v) TEMED

SDS-Trenngelpuffer:
0,1 % (w/v) SDS
10-15 % (w/v) Acrylamid
130 mM Tris HCl pH 8,8
Unmittelbar vor dem Gießen der Gele Hinzugabe von:
0,05 % (w/v) APS
0,12 % (v/v) TEMED

SDS-PAGE-Laufpuffer:
250 mM Tris-HCl pH 6,8
1,9 M Glycin

1 % (w/v) SDS

5 x SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris-HCl pH 6,8
25 % (v/v) ß-Mercaptoethanol
50 % (v/v) Glycerin
10 % (w/v) SDS
0,5 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.2.5 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Für die Kontrolle der Proteinbestimmung wurden die Proteine im Polyacrylamidgel mit der Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Dafür wurden die Polyacrylamidgele nach der Gelelektrophorese 15 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung unter Schwenken gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund durch die Inkubation in Entfärber-Lösung entfärbt, wodurch die Proteine dann als blaue Banden im Gel sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurden die gefärbten und getrockneten Gele am Computer eingescannt.

Coomassie-Färbelösung: 1,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
In 1 L Methanol/ddH_2O/Eisessig (5:5:1)

Coomassie-Entfärber: 10 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure in ddH_2O

2.2.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer der im SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Nassblotapparatur. Dazu wurden eine Nitrozellulosemembran sowie drei Whatman-Papiere in Größe des Gels in Transferpuffer getränkt und übereinander auf die Anode der Transferkammer platziert. Auf die Nitrozellulosemembran wurden dann das Gel und drei weitere Lagen getränktes Whatman-Papier gelegt. Darüber wurde die Kathode platziert. Der Proteintranfer aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran wurde dann bei 75 V im Eisbad für 90 min in Richtung Anode durchgeführt.

Transferpuffer: 192 mM Glycin
50 mM Tris-HCl pH 8,3

2.2.2.7 Detektion mit Antikörpern (Western Blot Analyse)

Mit spezifischen und markierten Antikörpern wurden in der Western Blot Analyse die Proteine auf der Nitrozellulosemembran detektiert. Zunächst wurden die transferierten Proteine auf die Nitrozellulosemembran mit einem Blockpuffer für 1 h bei RT abgesättigt, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper (CK1δ von Santa Cruz; 1:1000 verdünnt in Blockpuffer) über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer. Am nächsten Tag wurde die Membran viermal für je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (anti-Goat IgG an HRP gekoppelt; 1:5000 verdünnt in Blockpuffer) für 1 h RT inkubiert und dann wiederum dreimal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion der an den Proteinen gebundenen Antikörpern erfolgte mittels dem „Enhanced Chemo Luminiscence" (ECL)-Systems. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid, katalysiert von der durch Antikörper-gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP) in alkalischer Lösung. Es entsteht ein angeregtes Luminolmolekül, welches Licht mit der Wellenlänge λ=428 nm aussendet, das mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Dazu wurden je 10 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 gemischt und die Membranen darin für 1-2 Minuten inkubiert. Im Dunkeln wurden daraufhin die Röntgenfilme in verschiedenen Zeitintervallen belichtet.

TBS: 10 mM Tris HCl ph 8,0
150 mM NaCl

Waschpuffer: 0,05 % (v/v) Tween-20 in TBS

Blockpuffer: 5 % (w/v) Milchpulver in Waschpuffer

ECL-Lösung 1: 2,5 mM Luminol
400 µM p-Coumarinsäure
100 mM Tris-HCl pH 8,5

ECL-Lösung 2: 13 mM H_2O_2

100 mM Tris-HCl pH 8,5

2.2.2.8 Proteinfraktionierung durch FPLC

Für die Bestimmung der *in vitro* Kinaseaktivität von CK1δ in zellulären Extrakten, wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.2. beschrieben, Proteinlysate von Ramos, KM-H2, U-HO1 und DOHH-2 in Sucrose Lysispuffer hergestellt. Die relevanten Proteinmengen der Extrakte wurden nach Bradford bestimmt. Nach einer Filtrierung der Proteinlysate durch einen 0,4 µm Filter wurden die äquivalenten Mengen an Proteinen mit FPLC-Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und anschließend auf eine Anionenaustauschsäule (Resource Q) geladen. Diese war an einer ETTAN Anlage (GE Healthcare, München) angebracht, welches die Proteine mittels eines linearen NaCl-Gradienten mit aufsteigender Konzentration im Bereich von 0 bis 1000 mM eluierte und jeweils 250 µl Fraktionen auf einer 96-Well- Platte sammelte. In den Versuchen zur *in vitro* Kinasierung von Substraten durch CK1δ wurden 2 µl Aliquots der verschiedenen eluierten Fraktionen eingesetzt.

Verwendete Puffer:

Lösung A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
5 % Glycerol
0,04 % Brij
1mM Benzamidin
4 µg/ml Leupeptin
0,1 % ß-Mercaptoethanol

Lösung B: wie Lösung A
Zusätzlich 1 M NaCl

2.2.2.9 *In vitro* Kinasierung von Proteinen

Zur Bestimmung der CK1δ Aktivität in den Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wurden *in vitro* Kinasierungen in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Pro Reaktion wurden die verschiedenen Komponenten wie folgt zusammengefügt:

2 µl	Enzyme aus der jeweiligen Fraktion	
2 µl	10 x Kinasepuffer:	1 mM ATP
		250 mM Tris-HCl, ph 7,5
		100 mM $MgCl_2$
		1 mM EDTA
0,2 µl	10 µM ATP	
0,2 µl	[γ-^{32}P]-ATP (2 µCi)	
4 µl	GST-p53$^{1-64}$ Fusionsprotein FP267 (AS 1-64 von murinen p53)	
11,6 µl	H_2O	

Das GST-p53$^{1-64}$ Fusionsprotein FP267 (AS 1-64 von murinen p53) diente hierbei als Sustrat und die jeweils sechszehn Fraktionen der fraktionierten Proteinlysate von Ramos, KM-H2, U-HO1 und DOHH-2 als Enzyme. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 30 °C wurden die Reaktionen jeweils mit 5 µl 5 x SDS-Probenpuffer abgestoppt und in der SDS-PAGE (siehe 2.2.2.4.) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue (siehe 2.2.2.5.) gefärbt, getrocknet und für 24 h auf einem Röntgenfilm exponiert. Um die Intensität der Phosphorylierung in den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurden die Proteinbanden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und anschließend der Phosphateinbau mit Hilfe der Cherenkov Messung im Szintillationszähler in Zerfälle pro Minute („counts per minute, cpm“) gemessen.

2.2.2.10 Hemmung der CK1 Aktivität durch CK1 spezifische Inhibitoren

Um den Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die Kinase Aktivität der CK1δ der Zelllinien Ramos und KM-H2 zu testen, wurden aus den fraktionierten Proteinen der beiden Zelllinien jeweils 2 µl der Peakfraktion B2 zugleich mit 18 µl des Kinase-Mix versetzt. Pro Reaktion wurden die verschiedenen Komponenten wie folgt zusammengefügt:

2 µl	Enzyme aus der Fraktion B2	
2 µl	10 x Kinasepuffer:	1 mM ATP
		250 mM Tris-HCl, ph 7,5
		100 mM $MgCl_2$
		1 mM EDTA

0,2 µl	10 µM ATP
0,2 µl	[γ-^{32}P]-ATP (2µCi)
5 µl	GST-p53$^{1-64}$ Fusionsprotein FP267 (AS 1-64 von murinen p53)
8,6 µl	H_2O
2 µl	Inhibitor (verdünnt in der jeweiligen Konzentration)

Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden wie folgt gewählt:

IC261:	1 und 3 µM
RN4267:	20 und 60 nM
SC81939:	50 und 200 nM

Um die jeweilige Konzentration des Inhibitors für 2 µl zu erhalten, wurden die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen mit DMSO verdünnt. Für jede Zelllinie wurde eine Kontrolle mit DMSO mitgeführt.

Anschließend wurden die Proben wie in Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.11 Statistische Methoden

Die Statistik in dieser Arbeit wurde auf deskriptive Analysen beschränkt. In den Wachstumskurven (Abb. 5), im MTT-Zytotoxizitätstest (Abb. 6) und in den Kinaseinhibitor-Versuchen (Abb. 7 und Abb. 8) stellt ein Balken jeweils den Mittelwert aus drei gemessenen Stichproben dar. Der dargestellte Fehlerindikator in den Wachstumskurven und in den Kinaseinhibitor-Versuchen ist die Standardabweichung. Als Fehlerindikator in den MTT-Zytotoxizitätstests wurde der Standardfehler des Mittelwertes gewählt. Die Darstellung der Ergebnisse der Wachstumskurven, der Kinaseinhibitor-Versuche und der MTT-Zytotoxizitätstests wurde mittels Excel erstellt. Des Weiteren wurden die Veränderungen in den Diagrammen sowie die Veränderungen der Zellzyklusverteilung in den Ergebnissen der FACS-Analysen (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14) mittels Prozentangaben und Prozentpunkten beschrieben. Da es sich in dieser Arbeit um Grundlagenforschung mit geringen Fallzahlen und überwiegend wackeligen Mittelwerten handelt, wurde auf statistische Tests bewusst verzichtet.

3 Ergebnisse

Mitglieder der CK1 Familie stellen interessante Ziele für die Entwicklung neuer „small molecule“ Inhibitoren dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung CK1 spezifischer Inhibitoren durch zelluläre Faktoren beeinflusst wird und zu einem Zellzyklusarrest, der Einleitung apoptotischer Prozesse oder auch zu Endoreduplikation führen kann [10, 15, 159]. In den nachfolgenden Abschnitten wird die CK1δ Expression und Aktivität in verschiedenen Lymphomzelllinien dargestellt sowie die Auswirkungen von bekannten und neuen CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren auf adhärente und in Suspension wachsende Tumorzelllinien beschrieben.

3.1 Expression und Aktivität von CK1δ in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien

3.1.1 Expression von CK1δ in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien

Zur Untersuchung der Expressionsrate der CK1δ in den humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wurden übereinstimmende Proteinmengen von Zelllysaten elektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von CK1δ erfolgte unter Verwendung eines CK1δ (Santa Cruz, USA) spezifischen Antikörpers anhand der Durchführung eines Western Blots. Dabei diente die Detektion von ß-Actin dem Nachweis der Auftragung gleicher Proteinmengen. Die durchgeführten Western Blot Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Winkler aus der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Leithäuser des Institutes für Pathologie der Universität Ulm.

Die Western Blot Analyse sowie die jeweilige Detektion von ß-Actin ist in Abbildung 3 unter *(A)* dargestellt. Die anschließend durchgeführte quantitative densitrometrische Auswertung des Western Blots mit dem TINE-Programm diente zur Standardisierung, dabei wurde der höchste Wert mit 100 % gleichgesetzt und ermöglichte somit einen Vergleich der CK1δ Expression in den verschiedenen Zelllinien. Es zeigte sich, dass CK1δ in allen untersuchten lymphatischen Zelllinien in etwa gleich stark exprimiert wird wie in der Colontumorzelllinie SW620 (Kontrollzelllinie) (siehe Abb. 3 unter *(B)*).

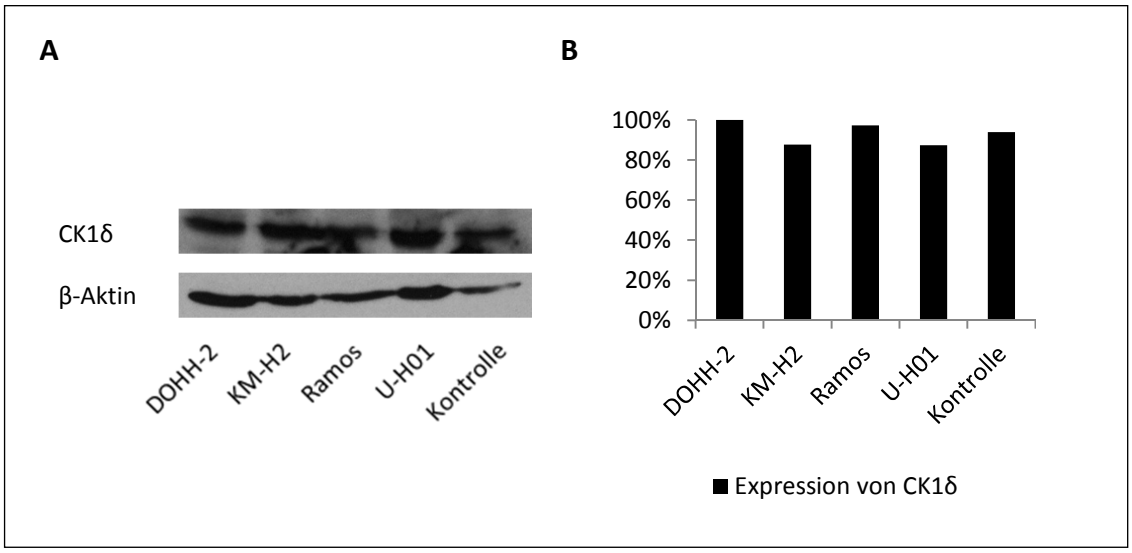

Abbildung 3: Bestimmung der CK1δ Expression in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien mittels Western Blot Analyse

Es wurden übereinstimmende Proteinmengen der Zellextrakte der verschiedenen Zelllinien in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. ***(A)*** Im Western Blot erfolgte der Nachweis von CK1δ unter Verwendung eines CK1δ (Santa Cruz, USA) spezifischen Antikörpers. Die Detektion von ß-Actin diente dem Nachweis der Auftragung gleicher Proteinmengen. ***(B)*** Das Diagramm stellt die quantitative densitrometrische Auswertung des Western Blots mit dem TINE-Programm dar. Die gemessenen Werte wurden anhand der Gleichsetzung des höchsten gemessenen Wertes mit 100 % standardisiert und ermöglichten somit einen Vergleich der Expression von CK1δ in den verschiedenen Zelllinien. Es zeigte sich, dass CK1δ in den humanen Lymphomzelllinien DOHH-2, KM-H2, Ramos und U-H01 sowie einer Colontumorzelllinie SW-620 als Kontrolle in etwa gleich stark exprimiert wird. Abkürzungen: *CK1*: Casein Kinase 1

3.1.2 Bestimmung der CK1δ Aktivität in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien

Zur Untersuchung der spezifischen Kinaseaktivität von CK1δ in den Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wurden jeweils gleiche Mengen der jeweiligen Proteinlysate mittels Ionenaustauschchromatographie über eine RESOURCE Q Anionenaustauschsäule fraktioniert. Anschließend wurden 16 Fraktionen als Enzyme in *in vitro* Kinasierungen eingesetzt. Das GST-Fusionsprotein GST-p53$^{1\text{-}64}$ diente dabei als Substrat. Die Reaktionsansätze wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele mit Coomassie gefärbt und das in das Substrat eingebaute ^{32}P-γATP durch Autographie dargestellt und durch Cherenkov Messung im Szintillationszähler quantifiziert. Wie in Abbildung 4 sichtbar, eluierte die CK1δ spezifische Kinaseaktivität der Zelllinien zwischen 75 und 262,5 mM NaCl. Die vier verschiedenen Zelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wiesen dabei deutliche Unterschiede in Bezug auf die Menge des eingebauten Phosphats auf. In fraktionierten KM-H2 Zelllysaten konnte die größte CK1δ Kinaseaktivität

von 1177,3 cpm bei 162,5 mM NaCl nachgewiesen werden. Eine ebenfalls starke CK1δ Kinaseaktivität zeigte die fraktionierte Zelllinie Ramos mit 909 cpm ebenfalls bei 162,5 mM NaCl. Geringe CK1δ Kinaseaktivitäten zeigten im Gegensatz dazu die anderen beiden fraktionierten Lymphomzelllinien (siehe Abb. 4).

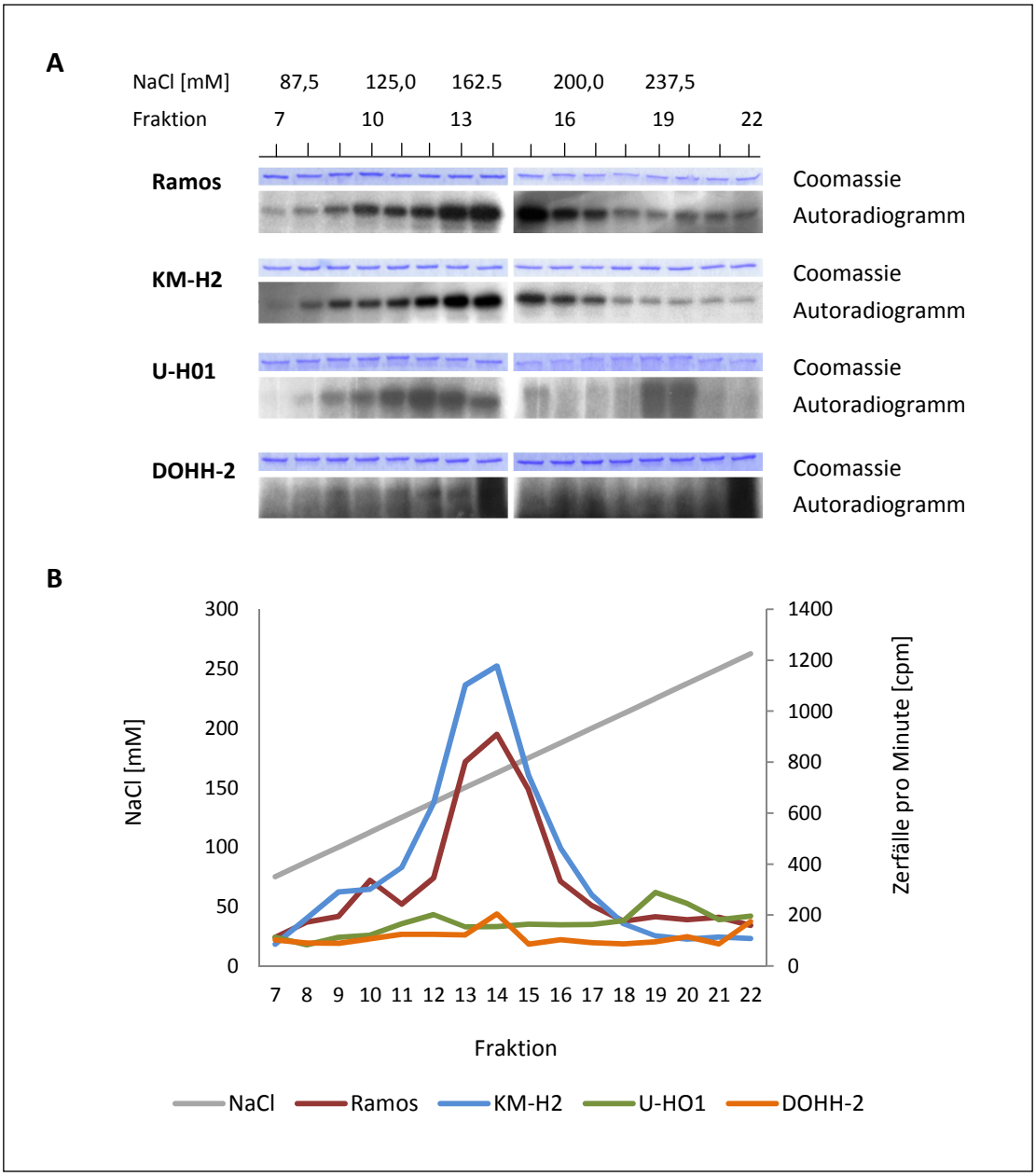

Abbildung 4: Kinaseaktivität von CK1δ in den humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2

In der Abbildung ist die Kinaseaktivität von 16 Fraktionen der fraktionierten Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 dargestellt. Es wurden gleiche Proteinmengen der Proteinlysate aus den Zelllinien mittels Ionenaustauschchromatographie über eine RESOURCE Q Anionenaustauschsäule fraktioniert. Die Eluierung erfolgte über einen linearen Gradienten ansteigender NaCl-Konzentration. Die gesammelten Fraktionen wurden in *in vitro* Kinasierungen zur Bestimmung der Kinaseaktivität von CK1δ mit dem Fusionsprotein GST-p53$^{1\text{-}64}$ als Substrat verwendet. Die phosphorylierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele mit Coomassie gefärbt und der Phosphateinbau anhand der Cherenkov Messung im Szintillationszähler in cpm ausgewertet. Die Zelllinie KM-H2 wies im Vergleich zu den anderen Zelllinien die höchste CK1δ Kinaseaktivität auf. Eine hohe Kinaseaktivität konnte auch in der Zelllinie Ramos detektiert werden. Fraktionierte U-H01 und DOHH-2 Zelllysate zeigten dagegen nur eine geringe Kinaseaktivität. Die Coomassie Färbung sowie das Autoradigramm des Versuchs ist unter ***(A)*** gezeigt, die quantitative Auswertung des Phosphateinbaus in ***(B)***. Abkürzungen: *cpm*: „counts per minute“; *CK1*: Casein Kinase 1; *NaCl*: Natriumchlorid

3.2 Einfluss von CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ und auf die Proliferation humaner Tumorzelllinien sowie verschiedener Lymphomzelllinien

3.2.1 Einfluss von CK1 spezifischen small molecule Inhibitoren auf das Zellwachstum der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7

Um die Effekte von verschiedenen CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren auf das Zellwachstum der humanen Pankreas Adenokarzinom Zelllinie Colo357 und der humanen Brust Adenokarzinom Zelllinie MCF7 zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumskurven erstellt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 2 x 10^5 Zellen/ml der Zelllinien Colo357 und MCF7 ausgesät und entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit den CK1-spezifischen Inhibitoren IC261 (0,8 µM und 1,6 µM) [110], Compound 17 (1 µM) [128] oder Compound 8 (4 µM) kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde jeweils nach 24, 48 und 72 h bestimmt.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, zeigten sich abhängig von der Zelllinie, vom Inhibitor und von der Behandlungsdauer deutliche Unterschiede im Zellwachstum. Die Zellen unter alleiniger Behandlung mit DMSO dienten dabei als Kontrollen. Bei einer Anfangsdichte von 2 x 10^5 Zellen/ml beider Zelllinien stieg die Zelldichte von Colo357 nach fünf Tagen auf 1,38 x 10^6 Zellen/ml und bei MCF7 auf knapp 7 x 10^5 Zellen/ml. Die Behandlung beider Zelllinien mit dem Inhibitor IC261 in den Konzentrationen 0,8 µM und 1,6 µM führte zu einer Inhibition des Zellwachstums. Das Wachstum von Colo357 Zellen stagnierte bei beiden Inhibitorkonzentrationen nach 24 h Inkubationszeit. Nach 72 h sank die Zelldichte auf weniger als die Hälfte der Ausgangssdichte. Bei der Zelllinie MCF7 zeigte sich nach 24 h zunächst eine stärkere Wirkung der niedrigeren Konzentration des Inhibitors IC261, nach 48 h dominierte dann aber die höhere Konzentration und es ließ sich ebenfalls eine Verminderung der Zelldichte um 50 % nach 72 h beobachten. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 förderte das Wachstum von Colo357 Zellen, inhibierte aber deutlich das Wachstum von MCF7 Zellen nach 72 h Behandlungdauer im Vergleich zu dem Wachstum der Kontrollzellen. Auch Compound 8 führte zu einer Wachstumshinhibition von Colo357 und MCF7 Zellen. Während die wachstumsinhibierenden Effekte von Compound 8 in Colo357 Zellen ähnlich stark ausgeprägt waren wie diejenigen von IC261, waren die antiproliferativen Wirkungen von Compound 8 in MCF Zellen deutlich schwächer (siehe Abb. 5).

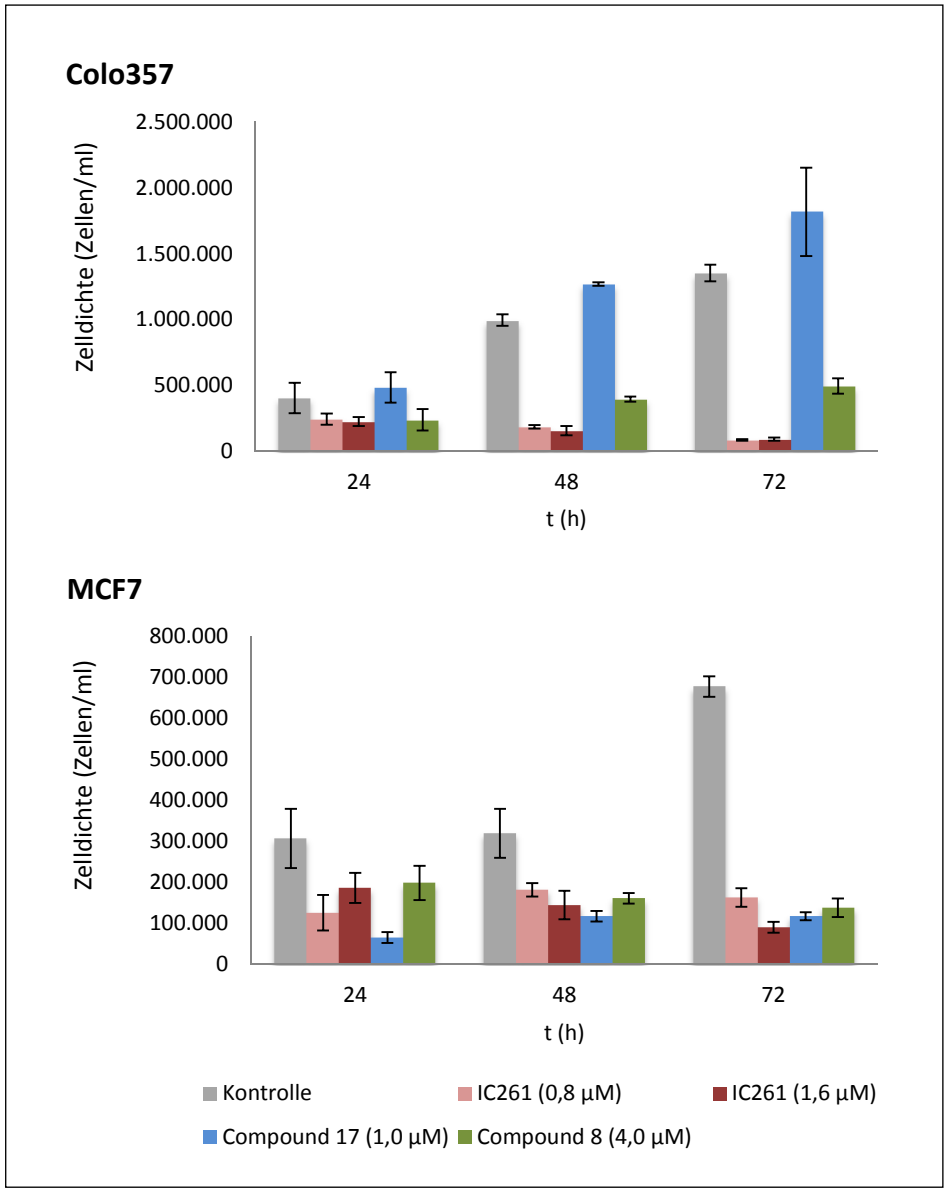

Abbildung 5: Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf das Wachstum der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7

Jeweils 2 x 10^5 Colo357 und MCF7 Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit DMSO, IC261 (0,8 µM und 1,6 µM), Compound 17 (1 µM) und Compound 8 (4 µM) für 24, 48 und 72 h behandelt. Die mit DMSO behandelten Zellen dienten dabei als Kontrollen. Die Inhibitoren IC261, Compound 17 und Compound 8 beeinflussten je nach Konzentration, Zelllinie und Behandlungsdauer das Zellwachstum unterschiedlich. Die Behandlung beider Zelllinien mit IC261 führte zu einer Wachstumshemmung. Während die Behandlung der Zellen mit Compound 17 das Wachstum von Colo357 Zellen förderte, wurde das Wachstum von MCF7 Zellen durch Compound 17 ähnlich stark gehemmt wie durch IC261. Die Behandlung von Colo357 und MCF7 Zellen mit dem Inhibitor 8 führte ebenfalls zur Wachstumshemmung. Die Abbildung wurde mittels Excel erstellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Stichproben und die Standardabweichung. Abkürzungen: *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one; *Compound 17*: (*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *h*: Stunden

3.2.2 Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 mittels MTT-Zytotoxizitätstest

Um den Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 48 h mit folgenden Inhibitoren und den jeweiligen Konzentrationen behandelt: IC261 (1,6 µM, 0,8 µM und 0,4 µM), Compound 17 (2 µM, 1 µM und 0,5 µM) und Compound 8 (8 µM, 4 µM und 2 µM). Anschließend wurde mit dem MTT-Zytotoxizitätstest die Anzahl vitaler Zellen nach der Behandlung quantitativ colorimetrisch bestimmt. Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, zeigten sich bei allen Inhibitoren konzentrationsabhängige Effekte auf die Viabilität der Zelllinien Colo357 und MCF7.

Eine kontinuierliche Abnahme vitaler Zellen konnte vor allem in der Zelllinie Colo357 beobachtet werden. Der Inhibitor IC261 zeigte dabei die stärksten zytotoxischen Effekte. Schon in der geringsten Konzentration (0,4 µM) des Inhibitors sank die Viabilität der behandelten Zellen auf knapp die Hälfte der Kontrollzellen (52 %). Bei einer Konzentration von 0,8 µM lebten noch 46,4 % der Zellen und bei einer Konzentration von 1,6 µM nur noch 41 %. Die Effekte des Inhibitors Compound 8 waren nur geringfügig schwächer als die von IC261. In der geringsten Konzentration von 2 µM zeigte sich eine Viabilität der Zellen von 57 %, bei 4 µM lebten noch 51,6 % der Zellen und bei der höchsten Konzentration von 8 µM nur noch 49,6 % der Zellen. Die Behandlung von Colo357 Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 führte zu einer Reduktion der viablen Zellen. Während nach Behandlung der Zellen mit 1 µM die Viablität derZellen 77,9 % betrug, lag sie nach Behandlung der Zellen mit Compound 17 in einer Konzentration von 2 µM bei 57,8 %.

In der Zelllinie MCF7 waren die Effekte der Inhibitoren nicht so stark ausgeprägt wie in der Zelllinie Colo357. Der größte Einfluss auf die Viabilität der Zellen wurde ebenfalls durch die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor IC261 erzielt. Der Inhibitor Compound 8 beeinträchtigte in der Konzentration von 4 µM die Viabilität der Zellen am stärksten (71,6 %). Die geringste Wirkung ließ sich bei dem Inhibitor Compound 17 in der Zelllinie MCF7 beobachten. Hier lag die stärkste Wirkung mit noch 79,4 % lebenden Zellen bei einer Konzentration von 2 µM. Die Inhibitoren IC261 und Compound 8 zeigten zwar einen Einfluss auf die Viabilität der MCF7-Zellen, jedoch nicht im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse in beiden Zelllinien eine zytotoxische Wirkung der drei Inhibitoren, die den Anteil der aktiv am Stoffwechsel beteiligten Zellen reduziert (siehe Abb. 6).

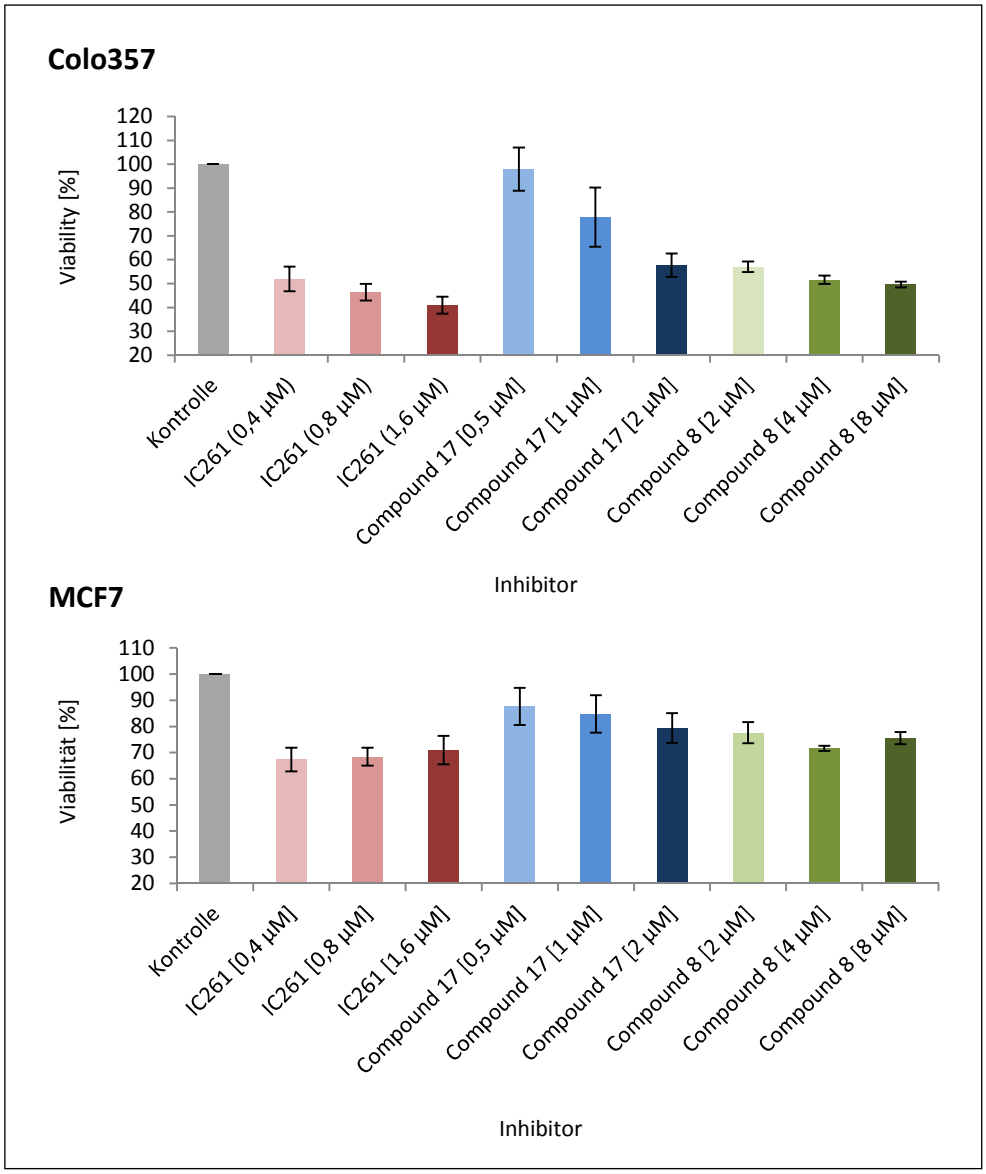

Abbildung 6: Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7

Dargestellt ist der Einfluss von den CK1 spezifischen Inhibitoren IC261, Compound 17 und Compound 8 in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 nach 48 h Inkubationszeit. Die Farbintensität des reduzierten Farbstoffes MTT ist direkt proportional zur Vitalität der Zellen und wird quantitativ colorimetrisch gemessen. In der pankreatischen Tumorzelllinie Colo357 zeigte IC261 starke zytotoxische Effekte, die höchste Konzentration (1,6 µM) senkte die Viabilität der Zellen auf 41 %. Durch die Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer Konzentration von 4 µM starben knapp die Hälfte der Zellen. Inhibitor Compound 17 zeigte in der höchsten Konzentration ebenfalls zytotoxische Effekte und die Viabilität sank bis zu 57,8 %. In MCF7 Zellen waren insgesamt weniger starke Effekte der drei CK1 spezifischen Inhibitoren zu beobachten. Die Behandlung der Zellen mit 0,4 µM IC261 hatte den stärksten Effekt, sie senkte die Viabilität der Zellen auf 67,3 %. Nach Inkubation der Zellen mit Compound 17 (2 µM) sank die Viabilität auf 79,4 %. Inhibitor Compound 8 zeigte die schwächste Wirkung, die Viabilität sank nach Behandlung der Zellen in einer Konzentration von 4 µM auf 71,6 %. Die Abbildung wurde mittels Excel erstellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Stichproben und der Standardfehler des Mittelwertes. Abkürzungen: *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one; *Compound 17*: (*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *MTT*: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

3.2.3 Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Kinaseaktivität von CK1δ in den Zelllinien Ramos und KM-H2

Um zu überprüfen, ob sich die CK1 Aktivität durch die Zugabe von CK1 spezifischen Inhibitoren verändert, wurden *in vitro* Kinaseassays in An- und Abwesenheit von drei CK1 spezifischen Inhibitoren (IC261, Compound 17 und Compound 8) in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Als Enzymaktivität wurde die Kinasepeakfraktion von Ramos bzw. KM-H2 Zellen (siehe Abb. 4) eingesetzt.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, hemmen alle drei CK1 spezifischen Inhibitoren die Kinaseaktivität der Peakfraktion in Ramos Zellen. Die stärkste Inhibition konnte durch Compound 8 erzielt werden. Bei einer Konzentration von 50 nM wurde die Kinaseaktivität um 44,2 Prozentpunkte reduziert. Bei der höheren Inhibitorkonzentration von 200 nM sank diese sogar um 68,4 Prozentpunkte. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 zeigte ebenfalls eine gute Wirkung. Eine Konzentration von 20 nM führte zu einer Reduktion der Aktivität um 39,7 Prozentpunkte und eine Konzentration von 60 nM reduzierte die Aktivität um 56,6 Prozentpunkte. Eine etwas schwächere Wirkung ging vom Inhibitor IC261 aus. Dieser reduzierte die Kinaseaktivität in seiner geringsten Konzentration von 1 µM um 32,7 Prozentpunkte und in der stärksten Konzentration von 3 µM um nur 39,3 Prozentpunkte (siehe Abb. 7).

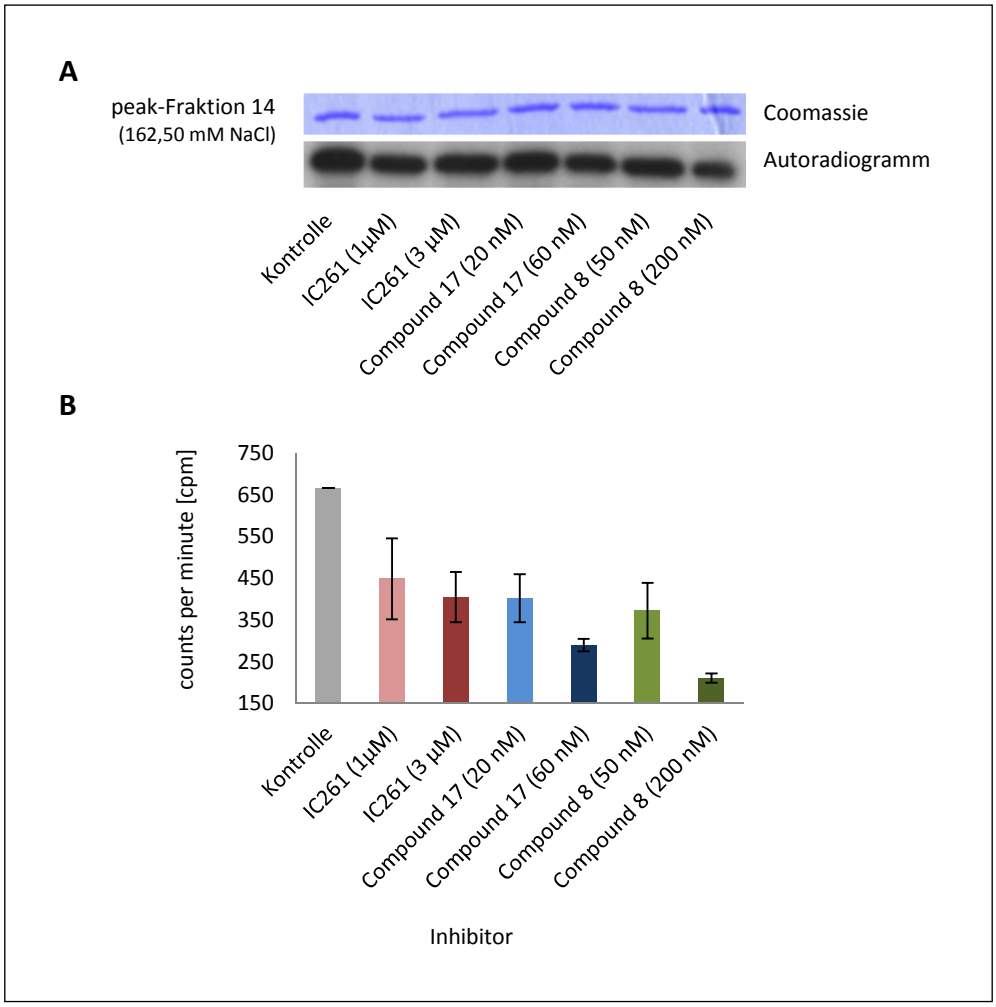

Abbildung 7: Inhibition der Kinasepeakfraktion aus fraktionierten Ramos Zellextrakten durch CK1 spezifische Inhibitoren

In vitro Kinaseassays wurden in An- und Abwesenheit von CK1 spezifischen Inhibitoren (IC261, Compound 17 und Compound 8) durchgeführt, in denen die Kinasepeakfraktion fraktionierter Zellextrakte von Ramos Zellen als Enzym und das GST-Fusionsprotein GFP-p53$^{1\text{-}64}$ als Substrat eingesetzt wurde. Das Autoradigramm des Versuchs ist unter ***(A)*** gezeigt, die quantitative Auswertung des Phosphateinbaus in ***(B)***. Die Untersuchungen zeigen, dass sich die Kinasepeakaktivität durch CK1 spezifische Inhibitoren hemmen läßt. Die Abbildung wurde mittels Excel erstellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Stichproben und die Standardabweichung. Abkürzungen: *cpm*: „counts per minute"; *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one; *Compound 17*: (E)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-N-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *NaCl*: Natriumchlorid

Wie in der Abbildung 8 ersichtlich, konnte die Kinaseaktivität der Kinasepeakfraktion fraktionierter KM-H2 Lysate konzentrationsabhängig am erfolgreichsten durch den Inhibitor Compound 8 (34 – 66,9 Prozentpunkte) und Compound 17 (24,9 - 49,1 Prozentpunkte) inhibiert werden, wohingegen bei der höchsten IC261 Konzentration nur eine geringe Hemmung (15,6 Prozentpunkte) erfolgte (siehe Abb. 8).

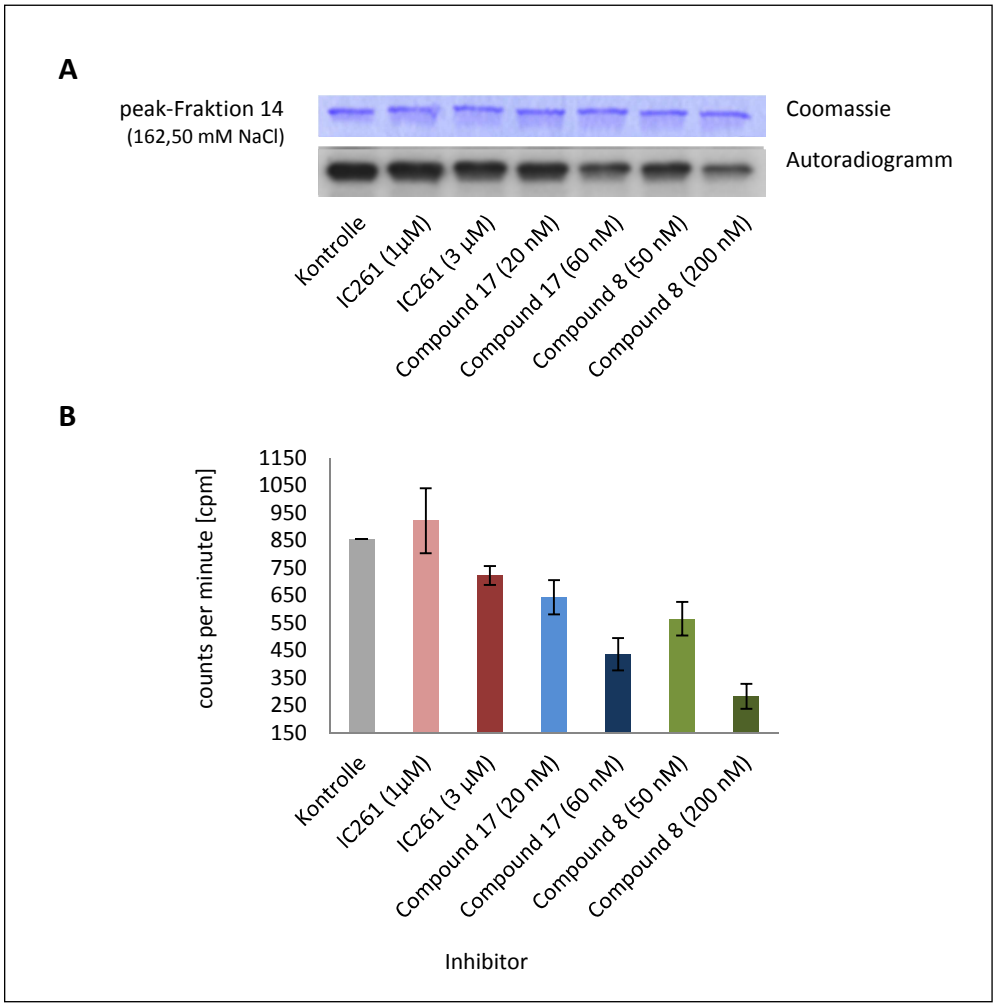

Abbildung 8: Inhibition der Kinasepeakfraktion aus fraktionierten KM-H2 Zellextrakten durch CK1 spezifischen Inhibitoren

In vitro Kinaseassays wurden in An- und Abwesenheit von CK1 spezifischen Inhibitoren (IC261, Compound 17 und Compound 8) durchgeführt, in denen die Kinasepeakfraktion fraktionierter Zellextrakte von KM-H2 Zellen als Enzym und das GST-Fusionsprotein GFP-p53$^{1\text{-}64}$ als Substrat eingesetzt wurde. Das Autoradigramm des Versuchs ist unter ***(A)*** gezeigt, die quantitative Auswertung des Phosphateinbaus in ***(B)***. Hierbei zeigte sich, dass sich die Kinasepeakaktivität durch CK1 spezifische Inhibitoren hemmen läßt. Die Abbildung wurde mittels Excel erstellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Stichproben und die Standardabweichung. Abkürzungen: *cpm*: „counts per minute"; *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one; *Compound 17*: (*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *NaCl*: Natriumchlorid

3.2.4 Charakterisierung der Effekte von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung von verschiedenen humanen Lymphomzelllinien

Die Effekte auf die Zellzyklusverteilung nach der Behandlung von humanen Lymphomzelllinien mit CK1 spezifischen Inhibitoren wurden mit Hilfe von FACS-Analysen

bestimmt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 5 x 10^5 Zellen/ml der Zelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 für 24 h und für 48 h mit drei verschiedenen CK1 spezifischen Inhibitoren in jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen (IC261: 0,2 µM, 0,4 µM, 0,8 µM und 1,6 µM; Compound 17: 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2 µM; Compound 8: 1 µm, 2 µM, 4 µM und 8 µM) inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen sowie mit 0,008 % DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst sind, konnten somit mögliche zytotoxische Effekte des Lösungsmittels erkannt werden. Die Zellen der unbehandelten Gruppe und die Zellen der behandelten Gruppe zeigten annähernd die gleiche Zellzyklusverteilung. Somit konnte im Folgenden als Kontrolle auf die DMSO Kontrolle verwiesen werden. In den folgenden Abbildungen zeigt sich, dass sich abhängig von der Zelllinie, des Inhibitors, der Inhibitorkonzentration sowie von der Behandlungsdauer Unterschiede in der Zellzyklusverteilung beobachten lassen.

Die Zelllinie Ramos reagierte am empfindlichsten auf die Behandlung mit allen drei CK1 spezifischen Inhibitoren. Bei den verwendeten Konzentrationen von IC261 und Compound 8 erhöhte sich die Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen. Durch die IC261 Behandlung der Zellen zeigte sich dieser Effekt bereits nach 24 h und erreichte nach 48 h den maximalen Prozentsatz von 66,3 % (1,6 µM IC261). Des Weiteren zeigte sich ein G2-Arrest in der 24 h Behandlung und erreichte mit 0,8 µM Behandlung den Maximalwert mit einem Anstieg von 18,4 Prozentpunkten im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 9). Nach 48 h Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM stieg der Anteil der Zellen in der SubG1 Fraktion auf 66,9 % und zeigte somit den höchsten Anstieg in der SubG1-Phase von allen drei Inhibitorbehandlungen dieser Zelllinie (s. Abb. 13). Die Behandlung der Ramos Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 in einer Konzentration von 0,5 und 1,0 µM führte zu einem Anstieg der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen um maximal 9 Prozentpunkten (24 h 1 µM Compound 17) im Vergleich zu den DMSO behandelten Kontrollzellen. Hier konnte somit ein leichter G2-Arrest der Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 11).

KM-H2 Zellen zeigten noch eine höhere Sensitivität gegenüber dem Inhibitor IC261 als die Zelllinie Ramos. Auch hier kam es zu einem Anstieg der in der SubG1-Phase befindlichen Zellen von einem Prozentpunktsatz von bis zu 72 % (0,2 µM 48 h). Mit diesem Wert wurde von allen drei Zelllinien sowie allein drei Inhibitoren die stärkste Veränderung in der SubG1-Phase nachgewiesen. Nach 48 h Behandlung der Zellen mit 0,8 µM IC261

zeigte sich eine starke Veränderung in der G1-Phase, hier kam es zu einem Abfall von 43,3 Prozentpunkten im Vergleich zum Kontrollwert (s. Abb. 9). Veränderungen im Zellzyklus konnten auch mit dem Inhibitor Compound 8 nachgewiesen werden, die Effekte waren jedoch schwächer als diejenigen nach IC261 Behandlung. In der SubG1 Fraktion konnte der größte Anstieg mit 28,4 Prozentpunkten nach 48 h Behandlung mit Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM nachgewiesen werden. Ein G2-Arrest zeigte sich vor allem in den niedrigeren Konzentrationen und hatte seinen Maximalwert nach 24 h Behandlung der Zellen mit 1 µM des Inhibitors Compound 8 (s. Abb. 13). Nur geringe Veränderung in der Zellzyklusverteilung zeigte dagegen die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 (s. Abb. 11).

Die Zelllinie U-H01 zeigte im Vergleich zu den anderen drei Zelllinien die geringste Sensitivität auf die Behandlung mit den Inhibitoren. IC261 führte nach einer 48 h Behandlung der Zelllinie in einer Konzentration von 0,8 µM zu dem höchsten Anstieg toter Zellen (SubG1-Fraktion 18 %). Ein G2-Arrest war mit 37,5 % der Zellen in der G2-Phase sichtbar (0,8 µM 24 h) (s. Abb. 10). Die Behandlung mit dem Inhibitor Compound 8 zeigte ähnliche Effekte wie die IC261 Behandlung, es konnte aber ein stärkerer Anstieg in der SubG1-Fraktion (nekrotische und apoptotische Zellen) gezeigt werden. Nach 24 h Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM stieg der Anteil der sich in der SubG1-Phase befindlichen Zellen um 17,8 Prozentpunkte. Des Weiteren war ein G2-Arrest nach 48 h und Behandlung der Zellen mit Compound 8 (8 µM) erkennbar, der Anteil der Zellen in der G2-Phase stieg um 17,43 Prozentpunkte auf 47,6 % (s. Abb. 14). Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 führte wie bei der Zelllinie KM-H2 nur zu geringfügigen Veränderungen in der Zellzyklusverteilung (s. Abb. 12).

In der Zelllinie DOHH-2 konnte mit dem Inhibitor IC261 von allen Zelllinien und Inhibitoren insgesamt der stärkste G2-Arrest nachgewiesen werden. Nach 24 h Behandlung der Zellen mit IC261 in einer Konzentration von 0,8 µM stieg der Anteil der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen auf 60 % und zeigte somit einen Anstieg von 35,9 Prozentpunkten im Vergleich zum Kontrollwert. Nach 24 h Behandlung der Zellen mit IC261 zeigte sich in allen eingesetzten Konzentrationen ein nur sehr geringer Anstieg in der SubG1-Phase. Ein höherer Anteil apoptotischer/nekrotischer Zellen (SubG1-Fraktion) konnte erst nach 48 h Behandlung der Zellen mit 0,8 und 1,6 µM IC261 nachgewiesen

werden und erreichte einen maximalen Prozentsatz von 28,2 % (1,6 µM IC261) (siehe Abb. 10). Die Behandlung der Zellen für 48 h mit dem Inhibitor Compound 8 führte zu einem Anstieg toter Zellen auf 39 % (siehe Abb. 14). Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 17 führte nur zu geringen Veränderungen der Zellzyklusverteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. Abb. 12).

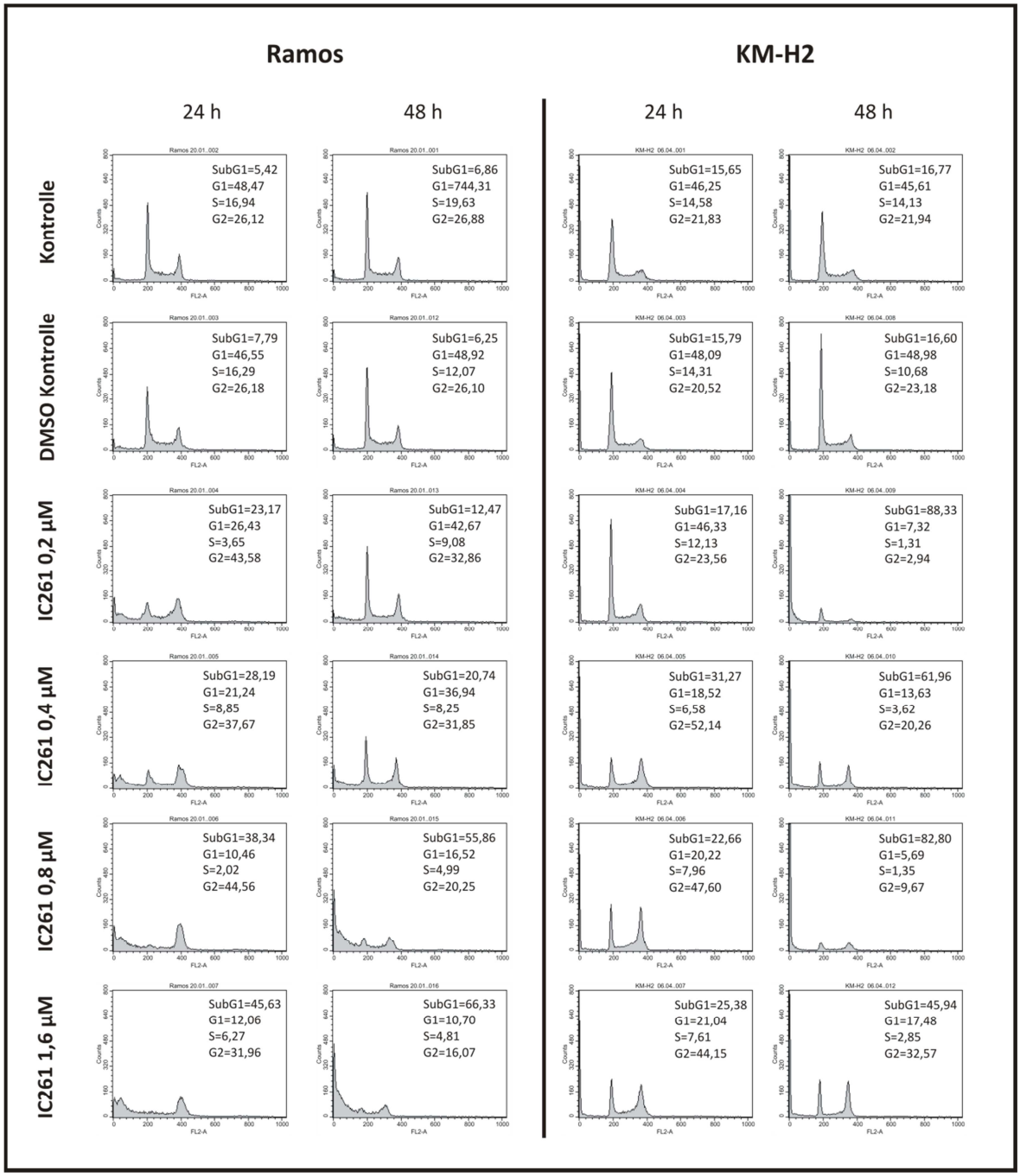

Abbildung 9: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors IC261

Die Abbildung zeigt die Zellzyklusverteilung der Zelllinien Ramos und KM-H2 nach einer 24 und 48 h Behandlung mit verschiedenen IC261 Konzentrationen. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Zytotoxische Effekte konnten in der Zelllinie Ramos nach einer 48 h Behandlung mit 1,6 µM gezeigt werden, der SubG1-Anteil (tote Zellen) stieg auf 66,3 %. Ein G2-Arrest war nach 24 h Behandlung mit IC261 in einer Konzentration von 0,8 µM zu erkennen, der Anteil der G2-Fraktion stieg um 18,4 Prozentpunkte. KM-H2 Zellen zeigten eine noch höhere Sensitivität gegenüber IC261. Nach 48 h Behandlung der Zellen mit IC261 in einer Konzentration von 0,2 µM stieg der Anteil der toten Zellen (SubG1-Fraktion) um knapp 72 Prozentpunkte im Vergleich zur Kontrolle. Des Weiteren sank der Anteil der Zellen in der G1-Fraktion um 43,3 Prozentpunkte (48 h 0,8 µM). Abkürzungen: *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h:* Stunden

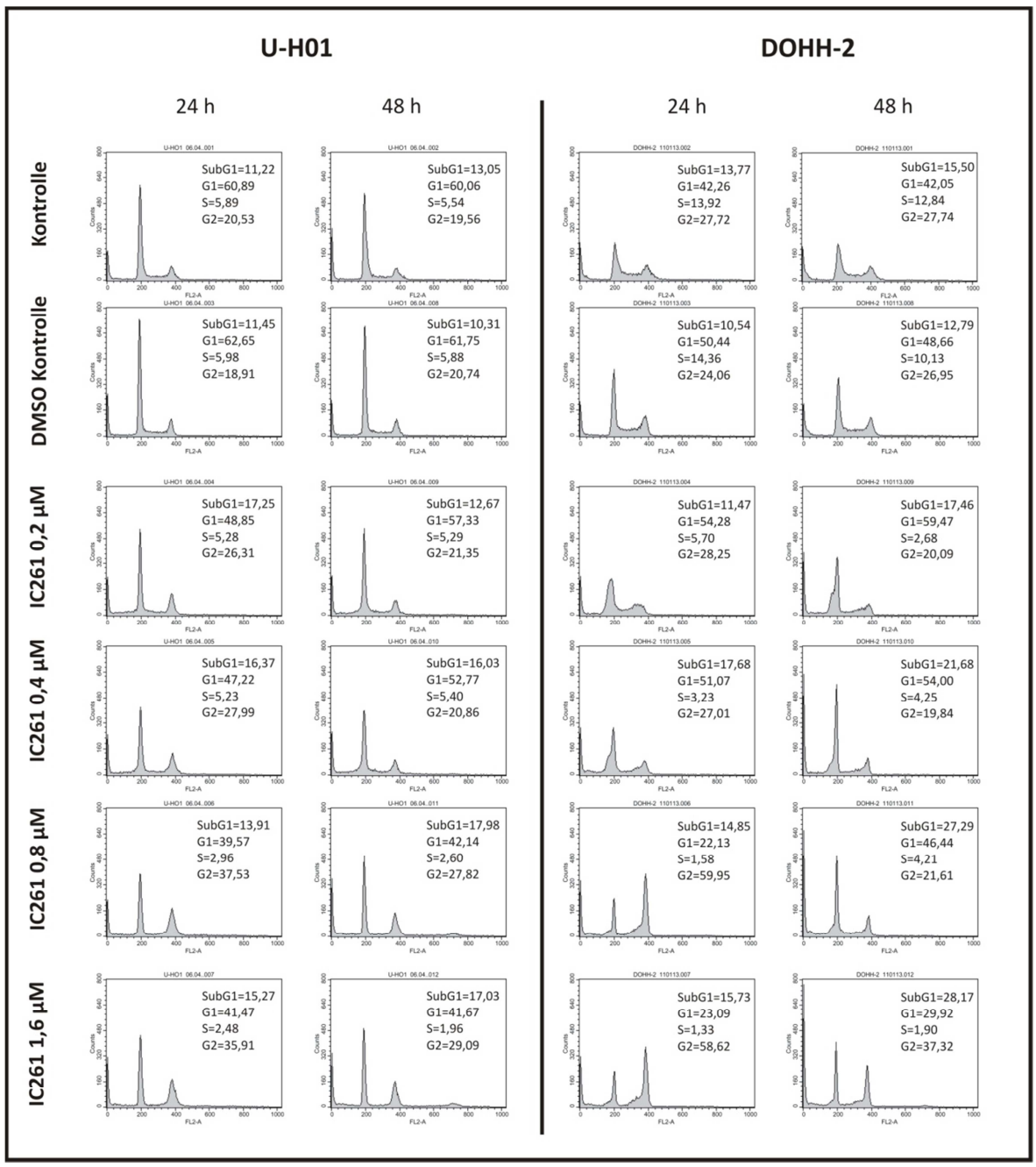

Abbildung 10: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors IC261

Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung der Zelllinien U-H01 und DOHH-2 nach einer 24 h und 48 h Behandlung mit verschiedenen IC261 Konzentrationen. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. U-H01 Zellen reagierten nur mit einem geringen Anstieg toter Zellen (SubG1 Fraktion) nach 48 h Behandlung der Zellen mit IC261 in einer Konzentration von 0,8 µM. Ihr Anteil stieg auf 18 %. Nach 24 h Behandlung der Zellen mit IC261 in einer Konzentration von 0,8 µM konnte ein G2-Arrest nachgewiesen werden, der Anteil der Zellen in der G2-Fraktion stieg auf 37,5 %. Bei DOHH-2 Zellen war der höchste Anstieg toter Zellen nach 48 h Behandlung mit IC261 in einer Konzentration von 1,6 µM zu sehen (28,2 %). Der Anteil der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen stieg auf 60 % 24 h nach Behandlung der Zellen mit 0,8 µM IC261. Der Anstieg um 35,9 Prozentpunkte war somit der stärkste Effekt in der G2-Phase aller behandelten Zelllinien. Abkürzungen: *IC261*: 3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2one; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h*: Stunden

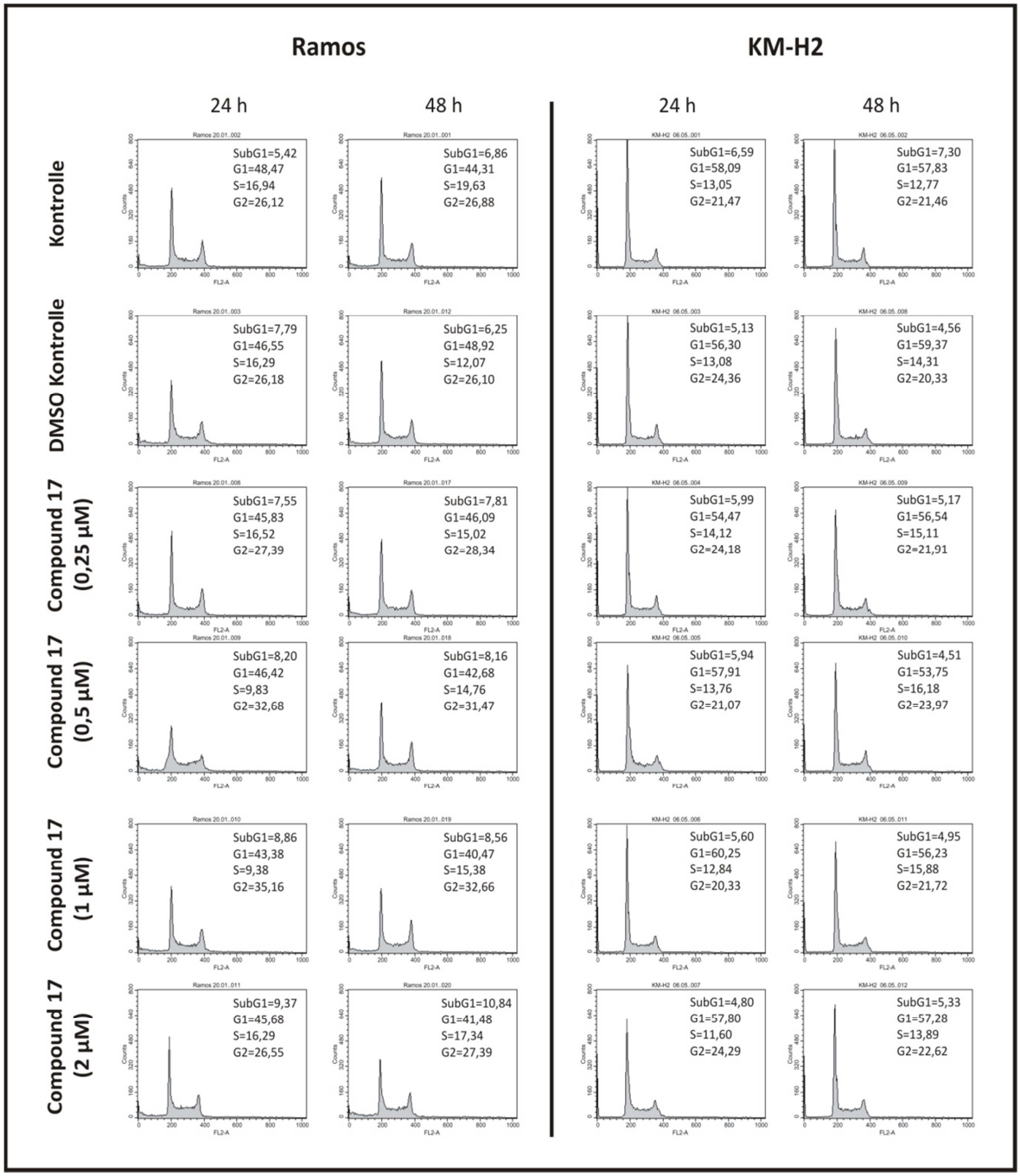

Abbildung 11: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 17

Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung der Zelllinien Ramos und KM-H2 nach einer 24 h und 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Compound 17. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Mit dem Inhibitor Compound 17 konnten nur sehr geringfügige Effekte auf die Zellzyklusverteilung der Zelllinie Ramos beobachtet werden. In den Konzentrationen von 0,5 und 1 µM kam es zu einem geringen Anstieg der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen um maximal 9 Prozentpunkte und zeigten somit einen leichten G2-Arrest. KM-H2 zeigte in allen Konzentrationen eine normale Zellzyklusverteilung. Abkürzungen: *Compound 17*: (*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h:* Stunden

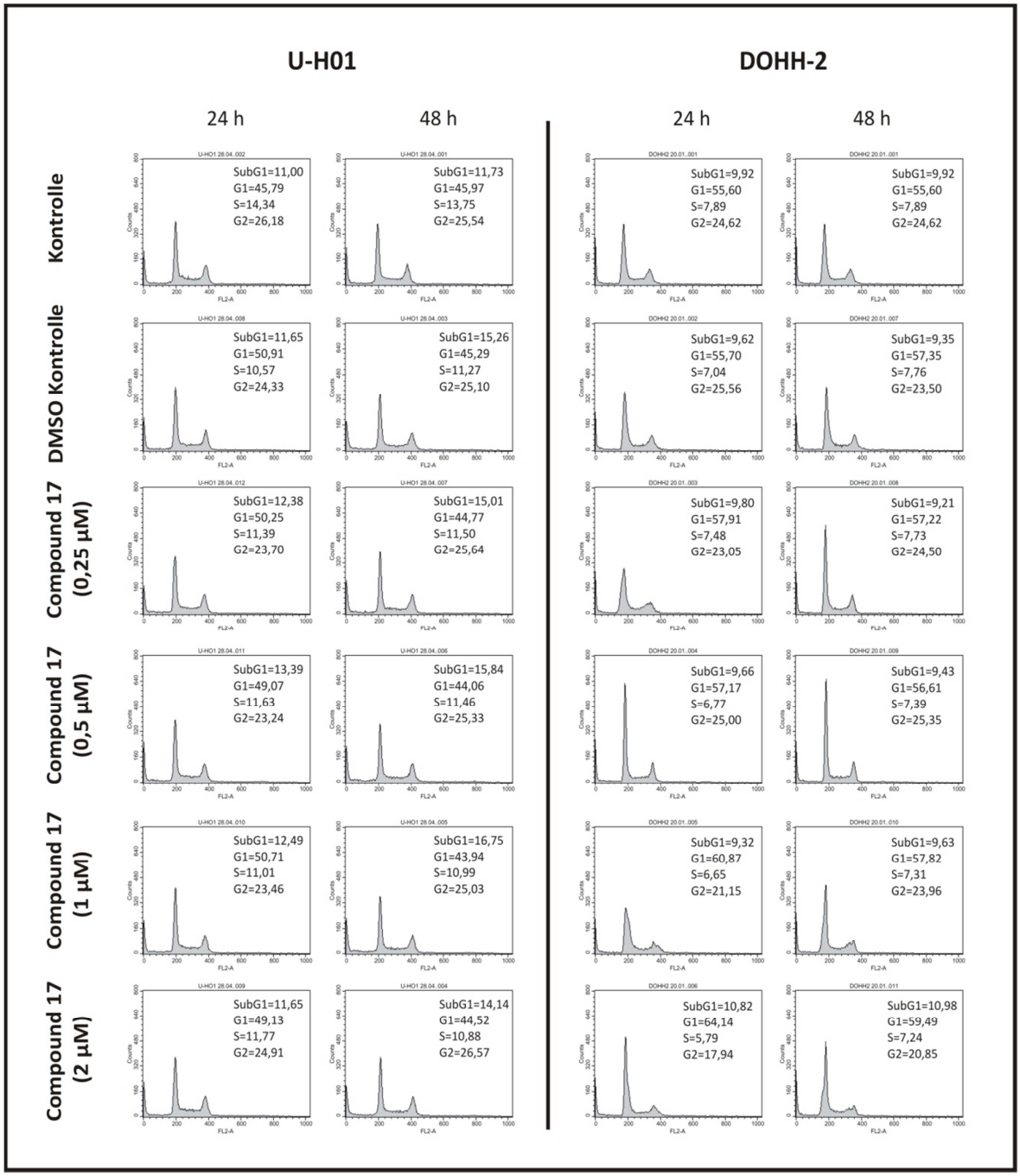

Abbildung 12: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 17

Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung der Zelllinien U-H01 und DOHH-2 nach einer 24 h und 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Compound 17. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Mit dem Inhibitor Compound 17 konnten keine Effekte auf die Zellzyklusverteilung der beiden Zelllinien nachgewiesen werden. U-H01 und DOHH-2 zeigten nach 24 und 48 h Behandlung der Zellen mit allen Inhibitorkonzentrationen eine normale Zellzyklusverteilung. Abkürzungen: *Compound 17*: (*E*)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-*N*-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3*H*-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h:* Stunden

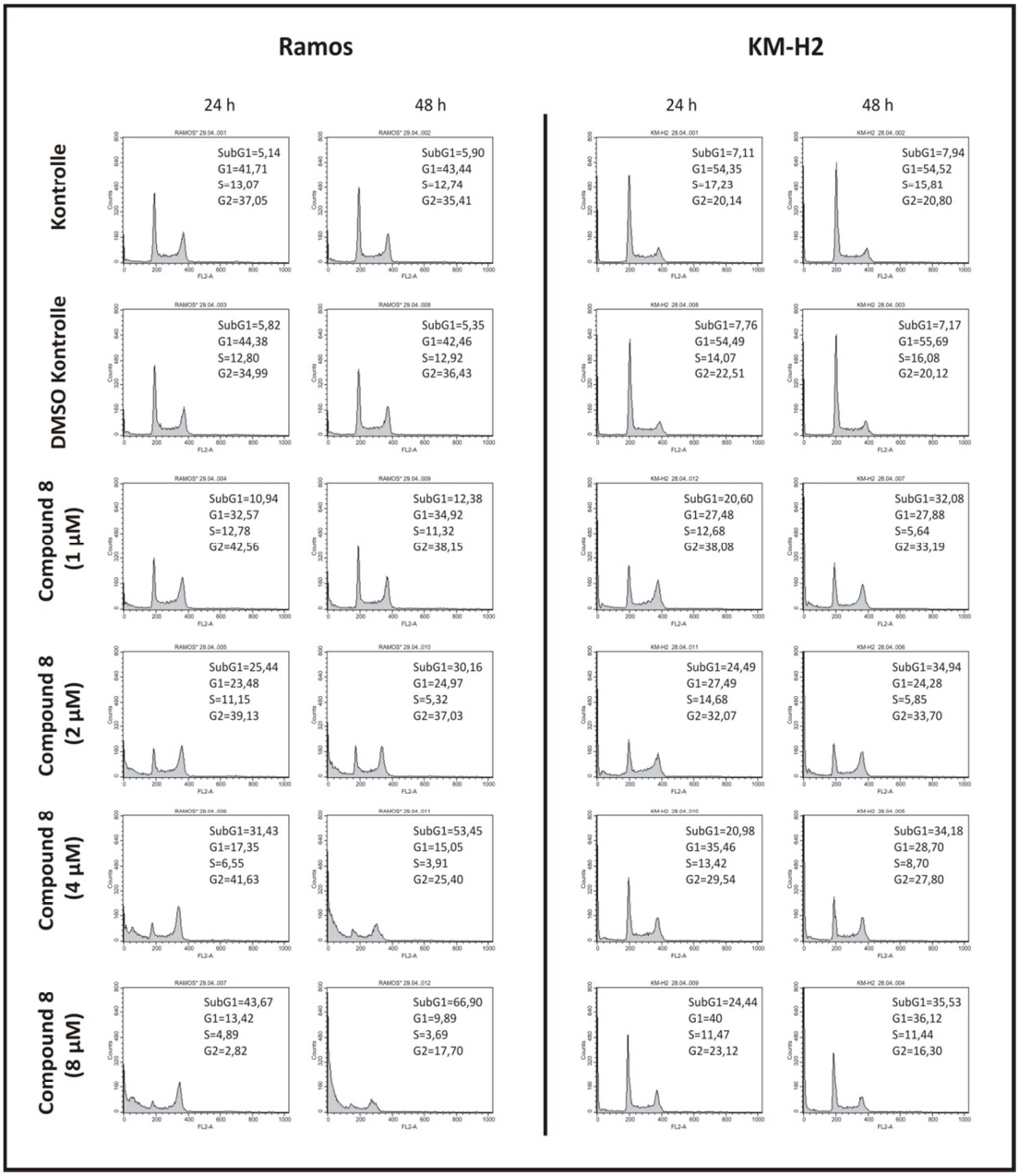

Abbildung 13: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 8

Die Abbildung stellt die Zellzyklusverteilung der Zelllinien Ramos und KM-H2 nach einer 24 h und 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Compound 8 dar. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die Zelllinie Ramos zeigt einen kontinuierlichen, konzentrationsabhängigen Anstieg der Zellen in der SubG1-Fraktion, der höchste Anstieg war mit 66,9 % nach 48 h Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer 8 µM Konzentration erreicht. KM-H2 Zellen hatten nach 48 h Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM ebenfalls den höchsten Anstieg in der SubG1-Phase (28,36 Prozentpunkte). Des Weiteren zeigte sich ein G2-Arrest nach 24 h Behandlung der Zellen mit Compound 8 in einer Konzentration von 1 µM, der Anteil der Zellen in der G2-Fraktion stieg um 15,6 Prozentpunkte. Abkürzungen: *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h:* Stunden

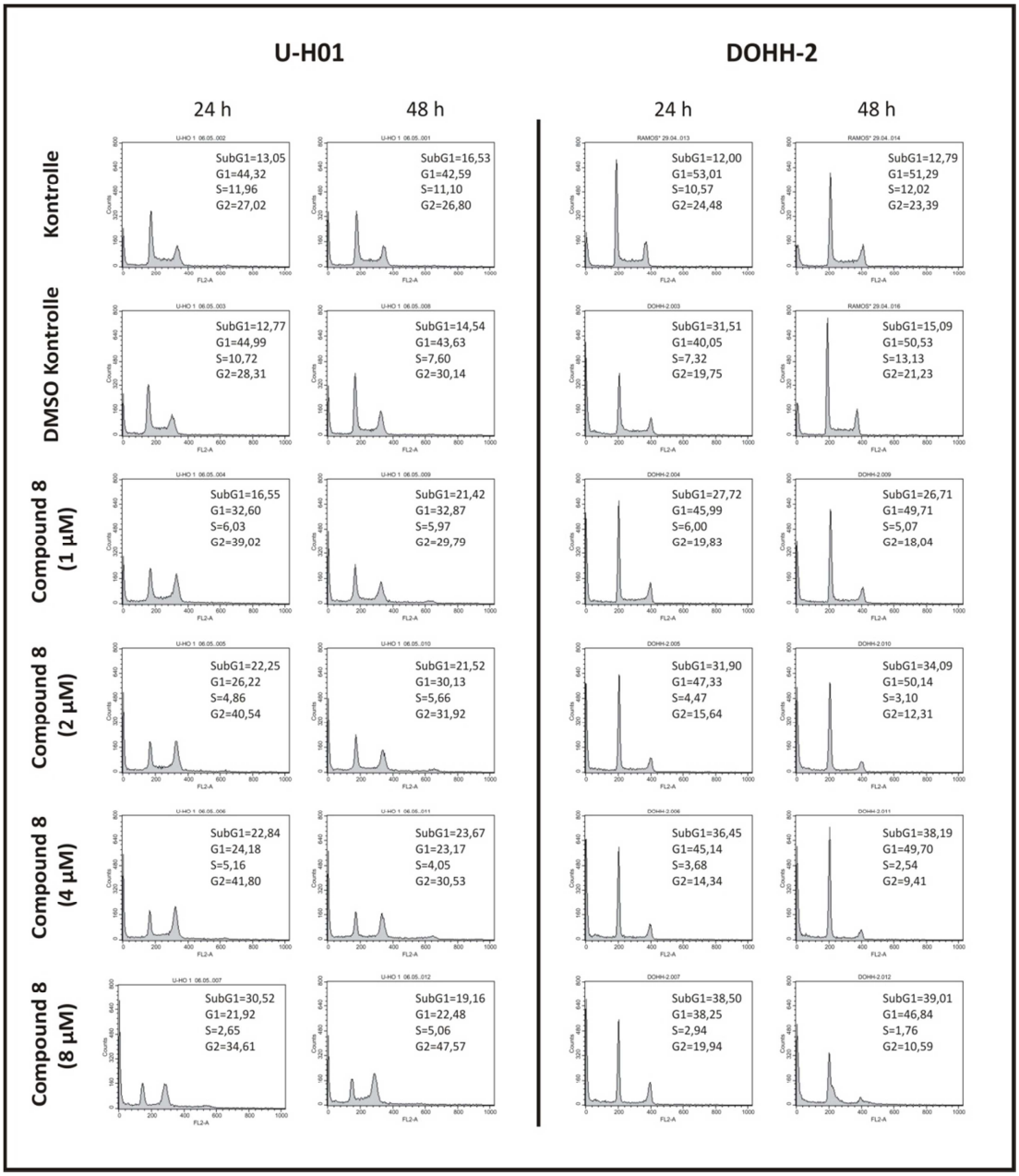

Abbildung 14: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 8

Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung der Zelllinien U-H01 und DOHH-2 nach einer 24 h und 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Compound 8. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen. In der SubG1-Phase waren die höchsten Anstiege bei der Zelllinie U-H01 nach 24 h Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor 8 in einer Konzentration von 8 µM zu sehen (von 12,8 % auf 30,5 %) und bei DOHH-2 nach 48 h Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM (von 15,1 % auf 39 %). Ein G2-Arrest war bei der Zelllinie U-H01 nach 48 h Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Compound 8 in einer Konzentration von 8 µM zu erkennen, der G2-Anteil stieg um 17,4 Prozentpunkte auf 47,6 %. DOHH-2 Zellen zeigten bei fast allen Inhibitorkonzentrationen einen Abfall der sich in der G2-Phase befindlichen Zellen. Abkürzungen: *Compound 8*: CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde; *DMSO*: Dimethylsulfoxid; *FACS*: fluorescence activated cell sorting; *SubG1*: Fraktion toter Zellen; *G1*: postmitotische Phase; *S*: Synthesephase; *G2*: prämitotische Phase; *h:* Stunden

4 Diskussion

Für die Verbesserung der Therapie von Lymphomen sind aktuell unter molekular strategischen Gesichtspunkten unter anderem auch Proteinkinaseinhibitoren in Erprobung. Diese stellen sich vielversprechend für eine Kombinationstherapie mit gängigen Therapiekonzepten, wie z.B. eine Chemotherapie, dar und könnten die Wirkung dieser Therapien, auch im Hinblick auf Tumorresistenzen, verstärken [39]. Da Mitglieder der CK1 Familie neue interessante Zielmoleküle für die Entwicklung neuer „small molecule“ Inhibitoren darstellen, wurde die Expression und Aktivität von CK1δ in den vier Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 sowie die Wirkung von CK1-spezifischen Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ bestimmt. Des Weiteren wurde der Einfluss von CK1-spezifischen Inhibitoren auf das Wachstum und den Zellzyklus der Lymphomzelllinien analysiert. Zum Vergleich mit adhärent wachsenden Tumorzelllinien und zur Dosisfindung der Inhibitorkonzentrationen wurden in Vorversuchen die Wirkungen von CK1-spezifischen Inhibitoren auf die Pankreas Adenokarzinom Zelllinie Colo357 sowie die Brust Adenokarzinom Zelllinie MCF7 untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit stellen dar:

1. CK1δ wird in den vier Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 in etwa gleich stark exprimiert
2. Es konnten Unterschiede in der CK1δ Aktivität zwischen den verschiedenen Lymphomzelllinien festgestellt werden
3. CK1 spezifische „small molecule“ Inhibitoren hemmen die Aktivität von CK1δ in den Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 *in vitro*
4. Wie bei den adhärent wachsenden Zelllinien Colo357 und MCF7 wurde durch die Behandlung mit verschiedenen CK1-spezifischen Inhibitoren auch die Proliferation der Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 gehemmt.

Die einzelnen Ergebnisse werden nun in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

4.1 Analyse der Expression und Aktivität von CK1δ in den vier humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2

Die Expression von CK1δ in den vier Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 wurde mittels Western-Blot Analyse untersucht. Es zeigte sich eine annähernd gleich starke Expression von CK1δ in allen vier Lymphomzelllinien, jedoch traten Unterschiede in der Aktivität von CK1δ in den untersuchten Zelllinien auf. Es wird angenommen, dass die gemessene Hauptaktivität in den Peakfraktionen der Kinasierungsreaktionen auf CK1 zurückzuführen ist, da ein CK1 spezifisches Substrat verwendet wurde (GST-p53$^{1-64}$ Fusionsprotein FP267) [52]. Diese Annahme bestätigte sich nochmals dadurch, dass diese Peakfraktionen durch den schon für seine CK1 Spezifität bekannten Inhibitor Compound 17 [128] nachweislich gehemmt wurden. Mit den Inhibitoren Compound 17 und Compound 8 konnte in den Zelllinien Ramos und KM-H2 eine stärkere Hemmung der CK1δ Aktivität nachgewiesen werden als mit dem Inhibitor IC261. Dieses Ergebnis könnte auf eine höhere CK1δ Spezifität der Inhibitoren Compound 17 und Compound 8 zurückzuführen sein und steht im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen [128]. Peifer und Mitarbeiter zeigten, dass der Inhibitor Compound 17 der bisher wirksamste bekannte Inhibitor gegen CK1δ ist.

Die höchste CK1δ spezifische Aktivität konnte in der Zelllinie KM-H2 detektiert werden und eine ebenfalls hohe CK1δ spezifische Aktivität zeigte die Zelllinie Ramos. Geringe Kinaseaktivitäten zeigten dagegen die Zelllinien U-H01 und DOHH-2. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Veröffentlichungen. So konnten Unterschiede in der CK1δ Aktivität in verschiedenen Geweben und Organen junger adulter Balb/c Mäuse und in Apoptose resistenten pankreatischen Tumorzelllinien beobachtet werden [52, 109]. Diese Unterschiede sind auf posttranslationale Modifikationen von CK1δ, insbesondere der Phosphorylierung, welche die Aktivität von CK1δ moduliert, zurückzuführen [52, 109]. So wird die Aktivität von CK1δ sowohl durch Autophosphorylierung als auch durch Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen beeinflusst [53, 137]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung der C-terminalen Domäne durch Endoproteasen [21] oder die Dephosphorylierung von Autophosphorylierungsstellen durch zelluläre Kinasen zu einem Anstieg der CK1δ Aktivität führt [53, 137]. Die geringe Aktivität von CK1δ in der Zelllinie U-H01 könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, dass in U-H01 Zellen eine

verkürzte und inaktive PTPN1 (protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 1) nachgewiesen wurde [89].

4.2 CK1 spezifische „small molecule“ Inhibitoren haben einen Einfluss auf die Aktivität von CK1δ in den verschiedenen Lymphomzelllinien sowie auf die Proliferation und Zellzyklusverteilung der humanen Tumorzelllinien MCF7 und Colo357 und der Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, DOHH-2 und U-H01.

Zum Vergleich und zur Dosisfindung wurde die Wirkung der CK1 spezifischen „small molecule“ Inhibitoren IC261, Compound 17 und Compound 8 zunächst auf adhärente Tumorzelllinien (Colo357 und MCF7) mittels Wachstumskurven und MTT-Zytotoxizitätstest überprüft. Die dargestellten Wachstumskurven belegen, dass die Proliferation der Zelllinien durch die Inhibitoren gehemmt wurde, jedoch zeigten sich Unterschiede abhängig von dem Inhibitor und der Zelllinie. Der Inhibitor IC261 hemmte die Proliferation in beiden Zelllinien am stärksten, Effekte zeigten aber auch die Inhibitoren Compound 17 und Compound 8. Im MTT-Zytotoxizitätstest konnte ebenfalls eine Wirkung der drei Inhibitoren nachgewiesen werden. In der Zelllinie Colo357 wurde die Viabilität der Zellen stärker als in der Zelllinie MCF7 beeinflusst, wobei der Inhibitor IC261 in beiden Zelllinien die stärkste Wirkung hatte. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht alle proliferationshemmenden Effekte von IC261 durch eine Hemmung von CK1δ/ε hervorgerufen werden [22, 81].

In allen untersuchten Lymphomzelllinien führte die Behandlung mit den CK1 spezifischen Inhibitoren zur Hemmung der Proliferation. Zudem konnten mittels FACS-Analysen Veränderungen im Zellzyklus nachgewiesen werden. Es zeigte sich, ähnlich wie bei den untersuchten, adhärent wachsenden Tumorzelllinien, Unterschiede abhängig von dem Inhibitor und seiner Konzentration, der Zelllinie und der Behandlungsdauer. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass IC261 den stärksten Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der humanen Lymphomzelllinien hatte. Schon in geringen Konzentrationen zeigte sich vor allem in den Zelllinien Ramos und KM-H2 ein starker Anstieg apoptotischer/nekrotischer Zellen. Dahingegen konnte nach einer IC261

Behandlung der Zelllinie U-H01 kein Anstieg an apoptotischen/nekrotischen Zellen beobachtet werden. In allen Zelllinien kam es zu einer deutlichen Zunahme an Zellen in der G2-Phase. Der Inhibitor Compound 17 hatte kaum eine hemmende Wirkung auf die Proliferation aller untersuchten Lymphomzelllinien. Der Inhibitor Compound 8 zeigte ebenfalls eine antiproliferative Wirkung auf alle vier Zelllinien. Die Apoptoserate der Zellen war in der Zelllinie Ramos am stärksten und vergleichbar mit der Wirkung von IC261 auf die Zelllinie Ramos. In den anderen Zelllinien stieg die Apoptoserate mäßig an, wobei hier ebenfalls die Zelllinie U-H01 den geringsten Anstieg in der SubG1-Phase zeigte, dafür aber mit dem höchsten Arrest in der G2-Phase aller mit Compound 8 behandelten Zellen reagierte.

Die Wirkung der Inhibitoren auf die Proliferation und den Zellzyklus der Zelllinien lässt sich anhand der Funktionen der CK1 Isoformen erklären. CK1δ ist an Prozessen der Zellteilung, wie die Regulation der Mikrotubuli Dynamik sowie der Chromosomensegregation beteiligt [10]. Dies lässt darauf schließen, dass eine Hemmung von CK1δ das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst und hemmt. CK1 Isoformen haben in den Signalwegen der p75-, TRAIL-, Fas- und RXR-vermittelten Apoptose eine antiapoptotische Funktion und tragen somit zur Tumorgenese bei [92]. Eine Hemmung der CK1 durch CK1 spezifische Inhibitoren führt zu einer Aufhebung dieser antiapoptotischen Effekte und begünstigt somit die Apoptose der Zellen. Des Weiteren ist CK1 an der Regulation des Wnt- Signalweges beteiligt und kann hier sowohl als positiver als auch negativer Regulator fungieren [132]. Da der Wnt-Signalweg eine Rolle bei Entwicklungsprozessen spielt und an der Tumorgenese beteiligt ist [86], kann eine Inhibition der CK1 diesen Signaltransduktionsweg und somit die Zellintegrität und die Zellproliferation beeinflussen.

Für die unterschiedliche Wirkung der Inhibitoren auf die vorgestellten Zelllinien kommen mehrere Ursachen in Frage. Zum Einen könnten unterschiedliche molekulare Eigenschaften der Inhibitoren die Wirkung beeinflussen: (i) Der Inhibitor penetriert nicht durch die Zellmembran. (ii) Der Inhibitor wird aktiv wieder aus der Zelle heraustransportiert. (iii) Der Inhibitor liegt nur in geringer Konzentration in der Zelle vor (da es sich um ATP kompetitive Inhibitoren handelt, sind deren Wirkungen bei hohen intrazellularen ATP Konzentrationen gering). (iv) In den untersuchten Zellen kann CK1δ

und/oder ε mutiert sein, was eine geringfügigere Hemmung bewirkt oder sogar zu einem Verlust der Hemmung führt. Der Inhibitor Compound 17 hemmte die CK1δ Aktivität in den Zelllinien Ramos und KM-H2 *in vitro* signifikant, zeigte jedoch nach der Behandlung der verschiedenen Zelllinien *in vivo* kaum eine Wirkung. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Inhibitor Compound 17 zwar stark CK1δ spezifisch ist, jedoch dessen Wirkung *in vivo* durch die vorherigen genannten Mechanismen beeinflusst wird.

Zum Anderen könnte die Ursache der unterschiedlichen Wirkung der Inhibitoren auf die Zelllinien auch auf einen unterschiedlichen zellulären und molekularen Hintergrund der Zelllinien selbst zurückzuführen sein.

Tumorsupressorgene wie z.B. TP53 oder Protoonkogene wie z.B. c-Myc steuern Zellzyklusvorgänge wie die Proliferation, die Apoptose, die genomische und chromosomale Stabilität sowie die Seneszenz [65, 68]. Mutationen in diesen Genen beeinflussen diese Vorgänge und könnten somit auch die Wirkung von Inhibitoren beeinflussen. Für die durch den Inhibitor IC261 induzierten Effekte konnten Behrend und Mitarbeiter [10] und Stöter und Mitarbeiter [159] nachweisen, dass der Status des Tumorsuppressorgens TP53 die Wirkung CK1 spezifischer Inhibitoren beeinflusst. Die Behandlung von wt p53 exprimierenden Zellen mit CK1 spezifischen Inhibitoren führt zu einem postmitotischen Arrest oder zur Apoptose, während Zellen mit mutiertem oder keinem p53 Endoreduplikation durchführen. Diese Beobachtungen stimmen nur bedingt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Die Zelllinie KM-H2 (wt p53 [38]) zeigte nach der Inhibitorbehandlung insgesamt einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen von Behrend und Mitarbeiter [10] und Stöter und Mitarbeiter[159]. Die Zelllinie DOHH-2 zeigte jedoch trotz wt p53 [172] nur einen geringen Anstieg von apoptotischen Zellen und die Zelllinie Ramos trotz mutierten p53 Status [125] einen hohen Anteil von apoptotischen Zellen. Eine Erklärung für diesen geringen Anstieg von apoptotischen Zellen in der Zelllinie DOHH-2 nach Inhibitorbehandlung könnten chromosomale Translokationen dieser Zelllinie bieten. DOHH-2 trägt die chromosomale Translokation t(14:18) [88], welche zu einer Überexpression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 führt [166]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 für eine Chemoresistenz verantwortlich ist [135]. Des Weiteren trägt diese Zelllinie die chromosomale Translokation t(8:14) [125], welche für das Protoonkogen c-Myc kodiert. Mutierte Myc-

Proteine verlieren ihre Fähigkeit zur Apoptoseinduktion durch eine verminderte Expression des Proteins Bim, welches das antiapoptitische Protein Bcl-2 hemmt [67]. Die Tumorigenität dieser Zelllinie wird durch diese Faktoren gefördert und bietet eine mögliche Erklärung für das das geringere Ansprechen dieser Zelllinie auf die Inhibitoren.

Die Zelllinien KM-H2 und U-H01, welche beide dem klasssichen Hodgkin-Lymphom zugeordnet werden, wiesen Unterschiede in der FACS-Analyse nach der Behandlung mit den CK1-spezifischen Inhibitoren auf. Die Zelllinie KM-H2 zeigte ein höheres Ansprechen auf die CK1-spezifischen Inhibitoren als die Zelllinie U-H01. Eine Wirkung der CK1-spezifischen Inhibitoren auf die Zelllinie KM-H2 konnte auch schon in den Kinasierungsreaktionen dargestellt werden. In der FACS-Analyse zeigten sich primär nach der Behandlung mit dem Inhibitor IC261, jedoch auch nach der Behandlung mit dem Inhibitor Compound 8, vermehrt apoptotische und nekrotische Zellen in der SubG1-Phase sowie Zellen im G2-Arrest. Die Zelllinie U-H01 zeigte dagegen ein geringeres Ansprechen auf die Inhibitoren. Nach der Behandlung mit dem Inhibitor IC261 zeigten sich kaum Veränderungen in der SubG1-Fraktion, ein Anstieg von arretierten Zellen in der G2-Phase war jedoch sichtbar. Mit dem Inhibitor Compound 8 zeigte sich auch ein Anstieg der SubG1-Fraktion sowie ein G2-Arrest der Zellen. Das geringere Ansprechen der Zelllinie U-H01 auf die Inhibitoren könnte ebenfalls durch die Mutation der Phosphatase PTPN1 in dieser Zelllinie zu erklären sein, welche vor einer Apoptose schützt und ein Überlebensvorteil für die Zellen bieten könnte [89]. Des Weiteren konnte man allgemein für das klassische Hodgkin-Lymphom eine konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB in HRS Zellen nachweisen, welche zu einer veränderten Aktivität von NFκB Zielgenen (verantwortlich für Regulation von Proliferation und Überleben) [70, 71, 75], des AP-1 Komplexes [113, 114] sowie des JAK/STAT Signalweges [150] führt. Diese Dysregulation von Transkriptionsfaktoren fördert die Proliferation und verhindert eine Apoptose in den neoplastischen Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms und könnte somit auch eine Bedeutung für die Zelllinie U-H01 haben.

Eine weitere Ursache für das insgesamt geringere Ansprechen der CK1-spezifischen Inhibitoren auf die Zelllinien U-H01 und DOHH-2 wäre auch dadurch zu erklären, dass in beiden Zelllinien eine viel geringere Aktivität von CK1δ nachgewiesen werden konnte als in den anderen beiden Zelllinien. Die Hemmung von CK1δ in einer Zelllinie mit einer

niedrigen CK1δ Aktivität scheint somit einen geringeren Einfluss auf den Zellzyklus zu haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Einsatz von CK1 spezifischen Inhibitoren der Zellzyklus von Lymphomzellen beeinflusst wird, indem die Proliferation gehemmt und die Apoptose gefördert wird. Dabei wirken die genannten Inhibitoren Compound 17 und Compound 8 vermutlich gezielt auf CK1δ, da die Aktivität in den Zelllinien Ramos und KM-H2 *in vitro* nachweislich gehemmt wurde. Der unterschiedliche molekulare und zelluläre Hintergrund der verschiedenen Zelllinien sowie verschiedene Eigenschaften der Inhibitoren selbst haben einen Einfluss auf die Wirkung von CK1 spezifischen Inhibitoren. So zeigt sich in manchen Zelllinien eine stärkere, in anderen Zelllinien eine schwächere Wirkung.
Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze für die Lymphomtherapie hat die CK1 mit ihren vielfältigen Funktionen innerhalb der Zelle einen zentralen Stellenwert. Die Inhibition von CK1δ in malignen Lymphomen könnte ein ergänzender Ansatz für die Therapie der malignen Lymphome darstellen. Im Hinblick auf therapieresistente Lymphomentitäten aber auch allgemein können CK1 spezifische Inhibitoren ein Zugewinn gängiger Therapiekonzepte, wie die Chemotherapie, sein und somit die Behandlung von malignen Lymphomen aber auch von anderen malignen Erkrankungen verbessern.

5 Zusammenfassung

Mitglieder der Casein Kinase 1 (CK1) sind hochkonserviert und üben regulatorische Funktionen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen aus. Die Deregulation von CK1 Isoformen, insbesondere von CK1δ, trägt zur Entstehung und Progression verschiedener Tumorentitäten, u.a. auch von Lymphomen, bei. CK1δ stellt somit ein interessantes, neues Zielmolekül für die Entwicklung neuer „small molecule“ Inhibitoren dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die CK1δ Expression und Aktivität in verschiedenen Lymphomzelllinien bestimmt sowie die Auswirkungen mehrerer CK1 spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von CK1δ und die Proliferation von Lymphomzelllinien untersucht werden.

Die zum Vergleich und zur Dosisfindung der proliferationshemmenden Effekte der CK1 spezifischen Inhibitoren IC261 (3-[(2,4,6-trimethoxyphenyl)-methylidenyl]-indolin-2-one), Compound 8 (CK1 spezifischer Inhibitor, der uns von unserem industriellen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde) und Compound 17 ((E)-3-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-N-(4-[5-(4-fluoro-phenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]-pyridin-2-yl)-acrylamide) erstellten Wachstumskurven und durchgeführten MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid)-Zytotoxizitätstests ergaben, dass die Proliferationsrate und Viabilität der adhärent wachsenden humanen Tumorzelllinien Colo357 (humane Pankreas Adenokarzinom Zelllinie) und MCF7 (humane Brust Adenokarzinom Zelllinie) weitgehend durch alle drei Inhibitoren konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Der Inhibitor IC261 zeigte dabei in der Zelllinie Colo357 die stärksten zytotoxischen Effekte.

Bevor die Validierung der CK1 spezifischen small molecule Inhibitoren in den humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 erfolgte, wurde zunächst die Expression von CK1δ mittels Antikörper Detektion und die Aktivität von CK1δ durch Kinasierungsreaktionen charakterisiert. Es zeigte sich, dass, obwohl CK1δ in allen untersuchten Zelllinien etwa gleich stark exprimiert wird, sich ihre Aktivität in den untersuchten Lymphomzelllinien unterscheidet.

Kinasierungsreaktionen in Anwesenheit der CK1 spezifischen Inhibitoren zeigten in allen Zelllinien eine Inhibition der Kinaseaktivität. Der Inhibitor Compound 8 hemmte dabei die Aktivität von CK1δ am stärksten.

Die zur Validierung der drei CK1 spezifischen Inhibitoren durchgeführten Zellzyklusanalysen mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting) in den vier Lymphomzelllinien verdeutlichen die antiproliferativen Wirkungen der eingesetzten Inhibitoren. Sowohl die Behandlung der Ramos Zellen als auch die Behandlung der KM-H2 Zellen mit dem Inhibitor IC261 und Compound 8 führte zu einem starken Anstieg apoptotischer und nekrotischer Zellen (SubG1-Anstieg). IC261 Konzentrationen von 0,4 und 0,8 µM führten vermehrt zu einem G2-Arrest der Zellen, insbesondere bei den DOHH-2 Zellen. Die Zelllinie U-H01 reagierte von allen Zellen am geringfügigsten auf die Inhibitoren, zeigte aber insgesamt von allen mit Compound 8 behandelten Zellen den höchsten Arrest in der G2-Phase. Mit dem Inhibitor Compound 17 ließ sich kaum eine proliferationshemmende Wirkung auf die Lymphomzelllinien nachweisen.

Die Validierung CK1 spezifischer Inhibitoren in den vier verschiedenen Lymphomtumorzelllinien zeigte somit Unterschiede in der Wirksamkeit der drei CK1 spezifischen small molecule Inhibitoren auf und es konnten zelllinien- und dosisabhängige Effekte der eingesetzten Inhibitoren nachgewiesen werden.

Durch zahlreiche Funktionen der CK1δ innerhalb der Zelle beeinflusst eine Inhibition dieser Kinase Prozesse in der Zelle und kann die Zellintegrität beeinflussen. Unterschiedliche molekulare Wirkungen der Inhibitoren sowie unterschiedliche zelluläre und molekulare Hintergründe der Zelllinien selbst bieten eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit der CK1 spezifischen Inhibitoren. Posttranslationale Modifikationen der CK1δ wie Autophosphorylierung, Abspaltung des C-Terminus durch Endoproteasen oder Dephosphorylierung durch andere zelluläre Kinasen könnten einen Einfluss auf die Aktivität von Kinasen und somit auch auf die Proliferation der Lymphomzelllinien haben. Mutationen in Tumorsuppressorgenen, chromosomale Translokationen und dysregulierte Transkriptionsfaktoren könnten ebenfalls die Inhibitorwirkung in den Lymphomzelllinien beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass CK1δ eine Rolle in der Pathogenese von malignen Lymphomen spielen könnte und dass die Inhibition von CK1δ möglicherweise ein ergänzender Ansatz für die Therapie der malignen Lymphome darstellt. Vor allem im Hinblick auf therapieresistente Lymphomentitäten könnten CK1 Inhibitoren nach erfolgreicher Testung ihrer Wirksamkeit in Tiermodellen und klinischen Studien Anwendung in neuartigen Therapiekonzepten finden.

6 Literaturverzeichnis

[1.] Agostinis P, Pinna LA, Meggio F, Marin O, Goris J, Vandenheede JR and Merlevede W: A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I. FEBS Lett 259: 75-78 (1989)

[2.] Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y and Alkalay I: Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. Genes Dev 16: 1066-1076 (2002)

[3.] Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, Han J, van Krieken JM, Poppema S, Marafioti T, Franklin J, Sextro M, Diehl V and Stein H: European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. Blood 96: 1889-1899 (2000)

[4.] Andrzejewska M, Pagano MA, Meggio F, Brunati AM and Kazimierczuk Z: Polyhalogenobenzimidazoles: synthesis and their inhibitory activity against casein kinases. Bioorg Med Chem 11: 3997-4002 (2003)

[5.] Ansell SM and Armitage J: Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 80: 1087-1097 (2005)

[6.] Badura L, Swanson T, Adamowicz W, Adams J, Cianfrogna J, Fisher K, Holland J, Kleiman R, Nelson F, Reynolds L, St Germain K, Schaeffer E, Tate B and Sprouse J: An inhibitor of casein kinase I epsilon induces phase delays in circadian rhythms under free-running and entrained conditions. J Pharmacol Exp Ther 322: 730-738 (2007)

[7.] Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M and Tilly H: LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. Blood 83: 2423-2427 (1994)

[8.] Baunbaek D, Trinkler N, Ferandin Y, Lozach O, Ploypradith P, Rucirawat S, Ishibashi F, Iwao M and Meijer L: Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases. Mar Drugs 6: 514-527 (2008)

[9.] Bazenet CE, Brockman JL, Lewis D, Chan C and Anderson RA: Erythroid membrane-bound protein kinase binds to a membrane component and is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. J Biol Chem 265: 7369-7376 (1990)

[10.] Behrend L, Milne DM, Stoter M, Deppert W, Campbell LE, Meek DW and Knippschild U: IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. Oncogene 19: 5303-5313 (2000)

[11.] Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Declercq W, Van Lint J, Vandenabele P, Agostinis P, Vandenheede JR and Fiers W: Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. J Biol Chem 270: 23293-23299 (1995)

[12.] Bidere N, Ngo VN, Lee J, Collins C, Zheng L, Wan F, Davis RE, Lenz G, Anderson DE, Arnoult D, Vazquez A, Sakai K, Zhang J, Meng Z, Veenstra TD, Staudt LM and Lenardo MJ: Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. Nature 458: 92-96 (2009)

[13.] Brockman JL and Anderson RA: Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in native membranes. J Biol Chem 266: 2508-2512 (1991)

[14.] Brockman JL, Gross SD, Sussman MR and Anderson RA: Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 9454-9458 (1992)

[15.] Brockschmidt C, Hirner H, Huber N, Eismann T, Hillenbrand A, Giamas G, Radunsky B, Ammerpohl O, Bohm B, Henne-Bruns D, Kalthoff H, Leithauser F, Trauzold A and Knippschild U: Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. Gut 57: 799-806 (2008)

[16.] Brunati AM, Marin O, Bisinella A, Salviati A and Pinna LA: Novel consensus sequence for the Golgi apparatus casein kinase, revealed using proline-rich protein-1 (PRP1)-derived peptide substrates. Biochem J 351 Pt 3: 765-768 (2000)

[17.] Burkitt D: A sarcoma involving the jaws in African children. Br J Surg 46: 218-223 (1958)

[18.] Burzio V, Antonelli M, Allende CC and Allende JE: Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1alpha from zebrafish (Danio rerio). J Cell Biochem 86: 805-814 (2002)

[19.] Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW and Tubiana M: Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res 31: 1860-1861 (1971)

[20.] Cecconi D, Zamo A, Bianchi E, Parisi A, Barbi S, Milli A, Rinalducci S, Rosenwald A, Hartmann E, Zolla L and Chilosi M: Signal transduction pathways of mantle cell lymphoma: a phosphoproteome-based study. Proteomics 8: 4495-4506 (2008)

[21.] Cegielska A, Gietzen KF, Rivers A and Virshup DM: Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. J Biol Chem 273: 1357-1364 (1998)

[22.] Cheong JK, Hung NT, Wang H, Tan P, Voorhoeve PM, Lee SH and Virshup DM: IC261 induces cell cycle arrest and apoptosis of human cancer cells via CK1delta/varepsilon and Wnt/beta-catenin independent inhibition of mitotic spindle formation. Oncogene 30: 2558–2569 (2011)

[23.] Chijiwa T, Hagiwara M and Hidaka H: A newly synthesized selective casein kinase I inhibitor, N-(2-aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide, and affinity purification of casein kinase I from bovine testis. J Biol Chem 264: 4924-4927 (1989)

[24.] Clarke CA: Changing incidence of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma among young men in San Francisco. AIDS 15: 1913-1915 (2001)

[25.] Cobb MH and Rosen OM: Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. J Biol Chem 258: 12472-12481 (1983)

[26.] Cohen P: The origins of protein phosphorylation. Nat Cell Biol 4: E127-130 (2002)

[27.] Cohen P: Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? Nat Rev Drug Discov 1: 309-315 (2002)

[28.] Coiffier B: Rituximab therapy in malignant lymphoma. Oncogene 26: 3603-3613 (2007)

[29.] Connors JM: State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 23: 6400-6408 (2005)

[30.] Cordenonsi M, Montagner M, Adorno M, Zacchigna L, Martello G, Mamidi A, Soligo S, Dupont S and Piccolo S: Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation. Science 315: 840-843 (2007)

[31.] Cozza G, Gianoncelli A, Montopoli M, Caparrotta L, Venerando A, Meggio F, Pinna LA, Zagotto G and Moro S: Identification of novel protein kinase CK1 delta (CK1delta) inhibitors through structure-based virtual screening. Bioorg Med Chem Lett 18: 5672-5675 (2008)

[32.] Davis TH, Morton CC, Miller-Cassman R, Balk SP and Kadin ME: Hodgkin's disease, lymphomatoid papulosis, and cutaneous T-cell lymphoma derived from a common T-cell clone. N Engl J Med 326: 1115-1122 (1992)

[33.] de Vries MJ, Veerman AJ and Zwaan CM: Rituximab in three children with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia/Burkitt non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol 125: 414-415 (2004)

[34.] Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B and Martinou JC: Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. Mol Cell 8: 601-611 (2001)

[35.] Diehl V, Engert A and Re D: New strategies for the treatment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am 21: 897-914 (2007)

[36.] Diehl V, Sextro M, Franklin J, Hansmann ML, Harris N, Jaffe E, Poppema S, Harris M, Franssila K, van Krieken J, Marafioti T, Anagnostopoulos I and Stein H: Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. J Clin Oncol 17: 776-783 (1999)

[37.] Divine M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, Le Maignan C, Stamattoulas A, Dupriez B, Raphael M, Pico JL and Ribrag V: Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. Ann Oncol 16: 1928-1935 (2005)

[38.] Drakos E, Thomaides A, Medeiros LJ, Li J, Leventaki V, Konopleva M, Andreeff M and Rassidakis GZ: Inhibition of p53-murine double minute 2 interaction by nutlin-3A stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res 13: 3380-3387 (2007)

[39.] Dreyling M, Hiddemann W, Trümper L and Pfreundschuh M: Vorwort. In: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. (Hrsg) Leitlinien Maligne Lymphome, GMIHO mbH, München, S. 2 (2007)

[40.] Dumaz N, Milne DM and Meek DW: Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. FEBS Lett 463: 312-316 (1999)

[41.] Elias L, Li AP and Longmire J: Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinase in acute myeloblastic leukemia. Cancer Res 41: 2182-2188 (1981)

[42.] Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocaru G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S, Wiener Z, Alitalo K, Oren M, Pikarsky E and Ben-Neriah Y: CKIalpha ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. Nature 470: 409-413 (2011)

[43.] Engert A: http://www.ghsg.org/therapie (08.02.2012)

[44.] Engert A and Reiser M: Nodale Non-Hodgkin-Lymphome. In: Böhm M, Hallek M, Schmiegel W (Hrsg) Innere Medizin, Urban und Fischer, München, S. 762-766 (2009)

[45.] Fish KJ, Cegielska A, Getman ME, Landes GM and Virshup DM: Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. J Biol Chem 270: 14875-14883 (1995)

[46.] Flotow H, Graves PR, Wang AQ, Fiol CJ, Roeske RW and Roach PJ: Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. J Biol Chem 265: 14264-14269 (1990)

[47.] Flotow H and Roach PJ: Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. J Biol Chem 266: 3724-3727 (1991)

[48.] Foldynova-Trantirkova S, Sekyrova P, Tmejova K, Brumovska E, Bernatik O, Blankenfeldt W, Krejci P, Kozubik A, Dolezal T, Trantirek L and Bryja V: Breast cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. Breast Cancer Res 12: R30 (2010)

[49.] Fuja TJ, Lin F, Osann KE and Bryant PJ: Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. Cancer Res 64: 942-951 (2004)

[50.] Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, Patti C, Loft A, Di Raimondo F, D'Amore F, Biggi A, Vitolo U, Stelitano C, Sancetta R, Trentin L, Luminari S, Iannitto E, Viviani S, Pierri I and Levis A: Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. J Clin Oncol 25: 3746-3752 (2007)

[51.] Garzia L, D'Angelo A, Amoresano A, Knauer SK, Cirulli C, Campanella C, Stauber RH, Steegborn C, Iolascon A and Zollo M: Phosphorylation of nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility. Oncogene 27: 1853-1864 (2008)

[52.] Giamas G, Hirner H, Shoshiashvili L, Grothey A, Gessert S, Kuhl M, Henne-Bruns D, Vorgias CE and Knippschild U: Phosphorylation of CK1delta: identification of Ser370 as the major phosphorylation site targeted by PKA in vitro and in vivo. Biochem J 406: 389-398 (2007)

[53.] Gietzen KF and Virshup DM: Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. J Biol Chem 274: 32063-32070 (1999)

[54.] Graves PR, Haas DW, Hagedorn CH, DePaoli-Roach AA and Roach PJ: Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. J Biol Chem 268: 6394-6401 (1993)

[55.] Gross SD and Anderson RA: Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. Cell Signal 10: 699-711 (1998)

[56.] Gross SD, Hoffman DP, Fisette PL, Baas P and Anderson RA: A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. J Cell Biol 130: 711-724 (1995)

[57.] Grutzmann R, Boriss H, Ammerpohl O, Luttges J, Kalthoff H, Schackert HK, Kloppel G, Saeger HD and Pilarsky C: Meta-analysis of microarray data on pancreatic cancer defines a set of commonly dysregulated genes. Oncogene 24: 5079-5088 (2005)

[58.] Guerra B and Issinger OG: Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. Electrophoresis 20: 391-408 (1999)

[59.] Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, Diebold J, Lisse I, Pedersen C, Oksenhendler E, Marelle L and Pallesen G: In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. Blood 82: 619-624 (1993)

[60.] Hanks SK: Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. Genome Biol 4: 111 (2003)

[61.] Hanks SK and Hunter T: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J 9: 576-596 (1995)

[62.] Harnly ME, Swan SH, Holly EA, Kelter A and Padian N: Temporal trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma and selected malignancies in a population with a high incidence of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Am J Epidemiol 128: 261-267 (1988)

[63.] Harris NL, Campo E, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Swerdlow SH, Thiele J and Vardiman JW: Introduction to the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, S. 14-15 (2008)

[64.] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC and et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 84: 1361-1392 (1994)

[65.] Harris SL and Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene 24: 2899-2908 (2005)

[66.] Hasenclever D and Diehl V: A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med 339: 1506-1514 (1998)

[67.] Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, Cleveland JL, Tansey WP and Lowe SW: Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. Nature 436: 807-811 (2005)

[68.] Hermeking H and Eick D: Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science 265: 2091-2093 (1994)

[69.] Herrmann-Frank A and Diehl V: [Malignant lymphoma competence network]. Internist (Berl) 45: 429-435 (2004)

[70.] Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H and Scheidereit C: Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. J Exp Med 196: 605-617 (2002)

[71.] Hinz M, Loser P, Mathas S, Krappmann D, Dorken B and Scheidereit C: Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Blood 97: 2798-2807 (2001)

[72.] Ho Y, Mason S, Kobayashi R, Hoekstra M and Andrews B: Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the

transcriptional response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 581-586 (1997)

[73.] Hodgkin: On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. Med Chir Trans 17: 68-114 (1832)

[74.] Hölscher G, Schmidt S and Dreyling M: Epidemiologie maligner Lymphome. In: Dreyling M (Hrsg) MANUAL Maligne Lymphome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, W. Zuckerschwerdt Verlag, München, Wien, New York, S. 1-13 (2008)

[75.] Hopken UE, Foss HD, Meyer D, Hinz M, Leder K, Stein H and Lipp M: Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. Blood 99: 1109-1116 (2002)

[76.] Hsu SM and Jaffe ES: Leu M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. Am J Clin Pathol 82: 29-32 (1984)

[77.] Huart AS, MacLaine NJ, Meek DW and Hupp TR: CK1alpha plays a central role in mediating MDM2 control of p53 and E2F-1 protein stability. J Biol Chem 284: 32384-32394 (2009)

[78.] Hummel M, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Korbjuhn P, Dimmler C and Stein H: EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular localization of EBV gene products. Br J Haematol 82: 689-694 (1992)

[79.] Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd HW, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC, Hansmann ML, Haralambieva E, Harder L, Hasenclever D, Kuhn M, Lenze D, Lichter P, Martin-Subero JI, Moller P, Muller-Hermelink HK, Ott G, Parwaresch RM, Pott C, Rosenwald A, Rosolowski M, Schwaenen C, Sturzenhofecker B, Szczepanowski M, Trautmann H, Wacker HH, Spang R, Loeffler M, Trumper L, Stein H and Siebert R: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. N Engl J Med 354: 2419-2430 (2006)

[80.] Inuzuka H, Tseng A, Gao D, Zhai B, Zhang Q, Shaik S, Wan L, Ang XL, Mock C, Yin H, Stommel JM, Gygi S, Lahav G, Asara J, Xiao ZX, Kaelin WG, Jr., Harper JW and Wei W: Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. Cancer Cell 18: 147-159 (2010)

[81.] Izeradjene K, Douglas L, Delaney AB and Houghton JA: Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. Cancer Res 64: 8036-8044 (2004)

[82.] Kalderon D: Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. Trends Cell Biol 12: 523-531 (2002)

[83.] Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, Uchino H, Yamabe H, Miwa H, Shirakawa S, Hatanaka M and Honjo T: Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. Blood 68: 285-292 (1986)

[84.] Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML and Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J Exp Med 184: 1495-1505 (1996)

[85.] Kawakami F, Suzuki K and Ohtsuki K: A novel consensus phosphorylation motif in sulfatide- and cholesterol-3-sulfate-binding protein substrates for CK1 in vitro. Biol Pharm Bull 31: 193-200 (2008)

[86.] Klaus A and Birchmeier W: Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer 8: 387-398 (2008)

[87.] Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS and Mumford D: An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. Intervirology 5: 319-334 (1975)

[88.] Kluin-Nelemans HC, Limpens J, Meerabux J, Beverstock GC, Jansen JH, de Jong D and Kluin PM: A new non-Hodgkin's B-cell line (DoHH2) with a chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21). Leukemia 5: 221-224 (1991)

[89.] Knecht H, Bruderlein S, Wegener S, Lichtensztejn D, Lichtensztejn Z, Lemieux B, Moller P and Mai S: 3D nuclear organization of telomeres in the Hodgkin cell lines U-HO1 and U-HO1-PTPN1: PTPN1 expression prevents the formation of very short telomeres including "t-stumps". BMC Cell Biol 11: 99 (2010)

[90.] Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J and Stoter M: The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. Cell Signal 17: 675-689 (2005)

[91.] Knippschild U, Milne DM, Campbell LE, DeMaggio AJ, Christenson E, Hoekstra MF and Meek DW: p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. Oncogene 15: 1727-1736 (1997)

[92.] Knippschild U, Wolff S, Giamas G, Brockschmidt C, Wittau M, Wurl PU, Eismann T and Stoter M: The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development. Onkologie 28: 508-514 (2005)

[93.] Lee E, Salic A and Kirschner MW: Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. J Cell Biol 154: 983-993 (2001)

[94.] Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC and Mabry ND: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res 36: 4562-4569 (1976)

[95.] Leoncini L, Raphael M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES and Kluin PM: Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. Thiele J, Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, S. 262-264 (2008)

[96.] Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S and De Robertis EM: Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. Cell 88: 747-756 (1997)

[97.] Lipford E, Wright JJ, Urba W, Whang-Peng J, Kirsch IR, Raffeld M, Cossman J, Longo DL, Bakhshi A and Korsmeyer SJ: Refinement of lymphoma cytogenetics by the chromosome 18q21 major breakpoint region. Blood 70: 1816-1823 (1987)

[98.] Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA and Tubiana M: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol 7: 1630-1636 (1989)

[99.] Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X and He X: Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell 108: 837-847 (2002)

[100.] Liu F, Virshup DM, Nairn AC and Greengard P: Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors. J Biol Chem 277: 45393-45399 (2002)
[101.] Longenecker KL, Roach PJ and Hurley TD: Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. J Mol Biol 257: 618-631 (1996)
[102.] Longenecker KL, Roach PJ and Hurley TD: Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54: 473-475 (1998)
[103.] Mader A, Bruderlein S, Wegener S, Melzner I, Popov S, Muller-Hermelink HK, Barth TF, Viardot A and Moller P: U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. Cytogenet Genome Res 119: 204-210 (2007)
[104.] Magrath IT, Janus C, Edwards BK, Spiegel R, Jaffe ES, Berard CW, Miliauskas J, Morris K and Barnwell R: An effective therapy for both undifferentiated (including Burkitt's) lymphomas and lymphoblastic lymphomas in children and young adults. Blood 63: 1102-1111 (1984)
[105.] Magrath IT and Sariban E: Clinical features of Burkitt's lymphoma in the USA. IARC Sci Publ 119-127 (1985)
[106.] Manning G: Genomic overview of protein kinases. WormBook 1-19 (2005)
[107.] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S: The protein kinase complement of the human genome. Science 298: 1912-1934 (2002)
[108.] Marin O, Bustos VH, Cesaro L, Meggio F, Pagano MA, Antonelli M, Allende CC, Pinna LA and Allende JE: A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 10193-10200 (2003)
[109.] Maritzen T, Lohler J, Deppert W and Knippschild U: Casein kinase I delta (CKIdelta) is involved in lymphocyte physiology. Eur J Cell Biol 82: 369-378 (2003)
[110.] Mashhoon N, DeMaggio AJ, Tereshko V, Bergmeier SC, Egli M, Hoekstra MF and Kuret J: Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. J Biol Chem 275: 20052-20060 (2000)
[111.] Mason DY, Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, de Wolf Peeters C, Falini B, Gatter K, Grogan TM, Harris NL and et al.: Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. Am J Surg Pathol 18: 526-530 (1994)
[112.] Masuda K, Ono M, Okamoto M, Morikawa W, Otsubo M, Migita T, Tsuneyoshi M, Okuda H, Shuin T, Naito S and Kuwano M: Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. Int J Cancer 105: 803-810 (2003)
[113.] Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mechta-Grigoriou F, Stein H, Dorken B and Scheidereit C: Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. EMBO J 21: 4104-4113 (2002)
[114.] Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, Anagnostopoulos I, Lietz A, Sigvardsson M, Jundt F, Johrens K, Bommert K, Stein H and Dorken B: Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. Nat Immunol 7: 207-215 (2006)

[115.] Milne DM, Looby P and Meek DW: Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. Exp Cell Res 263: 43-54 (2001)

[116.] Mishra SK, Yang Z, Mazumdar A, Talukder AH, Larose L and Kumar R: Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates with casein kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. Oncogene 23: 4422-4429 (2004)

[117.] Morgan RT, Woods LK, Moore GE, Quinn LA, McGavran L and Gordon SG: Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. Int J Cancer 25: 591-598 (1980)

[118.] Mueller NE and Grufferman S: Epidemiology. In Mauch P, Armitage J, Diehl V, Hoppe R, Weiss L (Hrsg) Hodgkin`s Disease, Lippincott-Raven, New York, S.61-78 (1999)

[119.] Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML and Kuppers R: Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. J Exp Med 191: 387-394 (2000)

[120.] Nogova L, Reineke T, Brillant C, Sieniawski M, Rudiger T, Josting A, Bredenfeld H, Skripnitchenko R, Muller RP, Muller-Hermelink HK, Diehl V and Engert A: Lymphocyte-predominant and classical Hodgkin's lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin Study Group. J Clin Oncol 26: 434-439 (2008)

[121.] Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A and et al.: Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. N Engl J Med 331: 74-80 (1994)

[122.] Ohno H and Fukuhara S: Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. Leuk Lymphoma 27: 53-63 (1997)

[123.] Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM and Rao A: A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. Mol Cell Biol 24: 4184-4195 (2004)

[124.] Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard ML, Myrianthopoulos V, Mikros E, Flajolet M, Greengard P, Meijer L and Galons H: Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. J Med Chem 51: 5229-5242 (2008)

[125.] Overmann J: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-47.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192 (08.02.2012).

[126.] Parkin DM and Muir CS: Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. IARC Sci Publ 45-173 (1992)

[127.] Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K and Cairo MS: Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. Blood 109: 2773-2780 (2007)

[128.] Peifer C, Abadleh M, Bischof J, Hauser D, Schattel V, Hirner H, Knippschild U and Laufer S: 3,4-Diaryl-isoxazoles and -imidazoles as potent dual inhibitors of p38alpha mitogen activated protein kinase and casein kinase 1delta. J Med Chem 52: 7618-7630 (2009)

[129.] Peters JM, McKay RM, McKay JP and Graff JM: Casein kinase I transduces Wnt signals. Nature 401: 345-350 (1999)

[130.] Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A, Tripodo C, Bacci F, Sabattini E, Sista MT, Mannu C, Sapienza MR, Rossi M, Laginestra MA, Sagramoso-Sacchetti CA, Righi S

and Pileri SA: Pathobiology of hodgkin lymphoma. Adv Hematol 2011: 920898 (2011)

[131.] Pinna LA and Meggio F: Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. Prog Cell Cycle Res 3: 77-97 (1997)

[132.] Polakis P: Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. Curr Biol 12: R499-R501 (2002)

[133.] Price MA: CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. Genes Dev 20: 399-410 (2006)

[134.] Raphael M, Gentilhomme O, Tulliez M, Byron PA and Diebold J: Histopathologic features of high-grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The French Study Group of Pathology for Human Immunodeficiency Virus-Associated Tumors. Arch Pathol Lab Med 115: 15-20 (1991)

[135.] Reed JC: Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. Blood 111: 3322-3330 (2008)

[136.] Rena G, Bain J, Elliott M and Cohen P: D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. EMBO Rep 5: 60-65 (2004)

[137.] Rivers A, Gietzen KF, Vielhaber E and Virshup DM: Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. J Biol Chem 273: 15980-15984 (1998)

[138.] Roach PJ: Multisite and hierarchal protein phosphorylation. J Biol Chem 266: 14139-14142 (1991)

[139.] Roof DM, Meluh PB and Rose MD: Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. J Cell Biol 118: 95-108 (1992)

[140.] Rowles J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J and Cobb MH: Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9548-9552 (1991)

[141.] Sakanaka C, Leong P, Xu L, Harrison SD and Williams LT: Casein kinase iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 12548-12552 (1999)

[142.] Sakurai E, Kurihara T, Kouchi K, Saegusa H, Zong S and Tanabe T: Upregulation of casein kinase 1epsilon in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. Mol Pain 5: 74 (2009)

[143.] Schmid C, Pan L, Diss T and Isaacson PG: Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. Am J Pathol 139: 701-707 (1991)

[144.] Schwarting R, Gerdes J, Durkop H, Falini B, Pileri S and Stein H: BER-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. Blood 74: 1678-1689 (1989)

[145.] Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K and Kuppers R: Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood 101: 1505-1512 (2003)

[146.] Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C and Stein H: Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. Blood 95: 3020-3024 (2000)

[147.] Shanware NP, Williams LM, Bowler MJ and Tibbetts RS: Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190. BMB Rep 42: 142-147 (2009)

[148.] Sillibourne JE, Milne DM, Takahashi M, Ono Y and Meek DW: Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. J Mol Biol 322: 785-797 (2002)

[149.] Sinnberg T, Menzel M, Kaesler S, Biedermann T, Sauer B, Nahnsen S, Schwarz M, Garbe C and Schittek B: Suppression of casein kinase 1alpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis. Cancer Res 70: 6999-7009 (2010)

[150.] Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U and Mak TW: Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood 99: 618-626 (2002)

[151.] Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S and Brennan M: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 51: 1409-1416 (1973)

[152.] Soussain C, Patte C, Ostronoff M, Delmer A, Rigal-Huguet F, Cambier N, Leprise PY, Francois S, Cony-Makhoul P, Harousseau JL and et al.: Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. Blood 85: 664-674 (1995)

[153.] Stein H: Hodgkin Lymphoma - Introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H,Thiele J and Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, S. 322 (2008)

[154.] Stein H, Delsol G, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S and Jaffe ES: Classical Hodgkin lymphoma, introduction. In Swerdlow SH, Campo NL, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, S. 326-329 (2008)

[155.] Stein H, Gerdes J, Kirchner H, Schaadt M and Diehl V: Hodgkin and sternberg-reed cell antigen(s) detected by an antiserum to a cell line (L428) derived from Hodgkin's disease. Int J Cancer 28: 425-429 (1981)

[156.] Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H and et al.: The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. Blood 66: 848-858 (1985)

[157.] Stein H, Uchanska-Ziegler B, Gerdes J, Ziegler A and Wernet P: Hodgkin and Sternberg-Reed cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. Int J Cancer 29: 283-290 (1982)

[158.] Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC and Campo E: Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H,Thiele J and Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, S. 233-237 (2008)

[159.] Stoter M, Bamberger AM, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Loning T, Frank HG, Kaufmann P, Lohler J, Henne-Bruns D, Deppert W and Knippschild U: Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. Oncogene 24: 7964-7975 (2005)

[160.] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J and Vardiman JW: WHO Classification of tumours of haematopoetic and lymphoid tissues. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J

and Vardiman JW (Hrsg) WHO Classification of tumours of haematopoetic and lymphoid tissues, IARC, Lyon S. 10-12 (2008)

[161.] Swiatek W, Tsai IC, Klimowski L, Pepler A, Barnette J, Yost HJ and Virshup DM: Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. J Biol Chem 279: 13011-13017 (2004)

[162.] Takano A, Hoe HS, Isojima Y and Nagai K: Analysis of the expression, localization and activity of rat casein kinase 1epsilon-3. Neuroreport 15: 1461-1464 (2004)

[163.] Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A and Ambinder RF: Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. Blood 91: 1373-1381 (1998)

[164.] Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, Giles FJ, Verstovsek S, Wierda WG, Pierce SA, Shan J, Brandt M, Hagemeister FB, Keating MJ, Cabanillas F and Kantarjian H: Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. Cancer 106: 1569-1580 (2006)

[165.] Tsai IC, Woolf M, Neklason DW, Branford WW, Yost HJ, Burt RW and Virshup DM: Disease-associated casein kinase I delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism. Int J Cancer 120: 1005-1012 (2007)

[166.] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC and Croce CM: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science 226: 1097-1099 (1984)

[167.] Tuazon PT and Traugh JA: Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 23: 123-164 (1991)

[168.] Umar S, Wang Y, Morris AP and Sellin JH: Dual alterations in casein kinase I-epsilon and GSK-3beta modulate beta-catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292: G599-607 (2007)

[169.] Vancura A, Sessler A, Leichus B and Kuret J: A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. J Biol Chem 269: 19271-19278 (1994)

[170.] Venerando A, Marin O, Cozza G, Bustos VH, Sarno S and Pinna LA: Isoform specific phosphorylation of p53 by protein kinase CK1. Cell Mol Life Sci 67: 1105-1118 (2010)

[171.] Walton KM, Fisher K, Rubitski D, Marconi M, Meng QJ, Sladek M, Adams J, Bass M, Chandrasekaran R, Butler T, Griffor M, Rajamohan F, Serpa M, Chen Y, Claffey M, Hastings M, Loudon A, Maywood E, Ohren J, Doran A and Wager TT: Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period. J Pharmacol Exp Ther 330: 430-439 (2009)

[172.] Wang F, Liu J, Robbins D, Morris K, Sit A, Liu YY and Zhao Y: Mutant p53 exhibits trivial effects on mitochondrial functions which can be reactivated by ellipticine in lymphoma cells. Apoptosis 16: 301-310 (2011)

[173.] Wang PC, Vancura A, Mitcheson TG and Kuret J: Two genes in Saccharomyces cerevisiae encode a membrane-bound form of casein kinase-1. Mol Biol Cell 3: 275-286 (1992)

[174.] Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP and Moos M, Jr.: Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. Cell 88: 757-766 (1997)

[175.] Wang X, Hoekstra MF, DeMaggio AJ, Dhillon N, Vancura A, Kuret J, Johnston GC and Singer RA: Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the gcs1 blockage of cell proliferation from stationary phase. Mol Cell Biol 16: 5375-5385 (1996)

[176.] Weiss LM, Warnke RA, Sklar J and Cleary ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. N Engl J Med 317: 1185-1189 (1987)

[177.] Winter M, Milne D, Dias S, Kulikov R, Knippschild U, Blattner C and Meek D: Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. Biochemistry 43: 16356-16364 (2004)

[178.] Wright DH: Burkitt's lymphoma: a review of the pathology, immunology, and possible etiologic factors. Pathol Annu 6: 337-363 (1971)

[179.] Xu RM, Carmel G, Sweet RM, Kuret J and Cheng X: Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. EMBO J 14: 1015-1023 (1995)

[180.] Xu Y, Lee SH, Kim HS, Kim NH, Piao S, Park SH, Jung YS, Yook JI, Park BJ and Ha NC: Role of CK1 in GSK3beta-mediated phosphorylation and degradation of snail. Oncogene 29: 3124-3133 (2010)

[181.] Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T and Ishimoto A: Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila. Embo J 21: 1733-1742 (2002)

[182.] Yano T, Sander CA, Clark HM, Dolezal MV, Jaffe ES and Raffeld M: Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. Oncogene 8: 2741-2748 (1993)

[183.] Yokoyama T, Okano M, Noshita T, Funayama S and Ohtsuki K: Characterization of (-)-matairesinol as a potent inhibitor of casein kinase I in vitro. Biol Pharm Bull 26: 371-374 (2003)

[184.] Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM and Frizzera G: bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. N Engl J Med 320: 1047-1054 (1989)

[185.] Zhai L, Graves PR, Robinson LC, Italiano M, Culbertson MR, Rowles J, Cobb MH, DePaoli-Roach AA and Roach PJ: Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae YCK genes. J Biol Chem 270: 12717-12724 (1995)

[186.] Zhang J, Yang PL and Gray NS: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nat Rev Cancer 9: 28-39 (2009)

[187.] Zhao Y, Qin S, Atangan LI, Molina Y, Okawa Y, Arpawong HT, Ghosn C, Xiao JH, Vuligonda V, Brown G and Chandraratna RA: Casein kinase 1alpha interacts with retinoid X receptor and interferes with agonist-induced apoptosis. J Biol Chem 279: 30844-30849 (2004)

[188.] Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA and Harris NL: Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Am J Pathol 139: 475-483 (1991)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Casein Kinase 1 (CK1) Familie: Phylogenetische Beziehung 9

Abbildung 2: Domänenstruktur der humanen Casein Kinase 1δ 10

Abbildung 3: Bestimmung der CK1δ Expression in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien mittels Western Blot Analyse 40

Abbildung 4: Kinaseaktivität von CK1δ in den humanen Lymphomzelllinien Ramos, KM-H2, U-H01 und DOHH-2 42

Abbildung 5: Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf das Wachstum der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 44

Abbildung 6: Einfluss von CK1 spezifischen Inhibitoren auf die Viabilität der humanen Tumorzelllinien Colo357 und MCF7 47

Abbildung 7: Inhibition der Kinasepeakfraktion aus fraktionierten Ramos Zellextrakten durch CK1 spezifische Inhibitoren 49

Abbildung 8: Inhibition der Kinasepeakfraktion aus fraktionierten KM-H2 Zellextrakten durch CK1 spezifischen Inhibitoren 50

Abbildung 9: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors IC261 54

Abbildung 10: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors IC261 55

Abbildung 11: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 17 56

Abbildung 12: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 17 57

Abbildung 13: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien Ramos und KM-H2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 8 58

Abbildung 14: FACS Analyse der Zellzyklusverteilung nach der Behandlung der humanen Lymphomzelllinien U-H01 und DOHH-2 mit verschiedenen Konzentrationen des CK1 spezifischen Inhibitors Compound 8 59

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die 2008 WHO Klassifikation der Lymphome [160] 1

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Doris Henne-Bruns für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation am Universitätsklinikum Ulm in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantaionschirurgie bedanken.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Knippschild sowie Herrn PD Dr. Frank Leithäuser für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation sowie für die exzellente Betreuung während der gesamten Zeit.

Ein großer Dank geht an das Institut für Pathologie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Möller. Vielen Dank für die Bereitstellung der Lymphomzelllinien. An dieser Stelle möchte ich auch einen Dank an Frau Dr. Silke Brüderlein für die Einführung in die Zellkultur von Suspensionszellen, für die Begutachtung meiner Zellen sowie für die vielen wertvollen Anregungen aussprechen.

Ein ganz großer und besonderer Dank geht an Frau Arnhild Grothey. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung im Labor, für die Hilfe und Ratschläge bei den praktischen Arbeiten, für die Geduld, den Beistand und für die schöne Zeit im Labor.

Vielen Dank an Herrn Joachim Bischof für die Hilfe bei den Proteinfraktionierungen und für den Beistand mit Rat und Tat bei allen Frage- und Problemstellungen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Bernhard Schmidt für die Hilfe bei der Auswertung der FACS-Analysen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Annette Blatz für die Hilfe bei diversen Computerprogrammen, für die Hilfe beim Erstellen des Literaturverzeichnisses und für die vielen netten Stunden im Labor bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht ebenso an alle anderen Mitarbeiter des Forschungslabors von Herrn Prof. Dr. Uwe Knippschild. Vielen Dank an Frau Dr. Heidrun Hirner, Frau Nadine Süßner, Frau Helena Krist, Frau Elena Yasovskaya, Herrn Dr. Kalim Ullah Khan und Herrn Dr. Pengfei Xu für die Hilfe, für die angenehme Atmosphäre und für die humorvollen Stunden.

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes gekürzt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.