



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7217

Identifizierung des molekularen Targets bei der Apoptose-Induktion durch Alkylphosphocholine

C. Oberle

Institut für Toxikologie und Genetik

Dezember 2006

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7217

Identifizierung des molekularen Targets bei der
Apoptose-Induktion durch Alkylphosphocholine

Carolin Oberle

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2006

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072176

Identifizierung des molekularen Targets bei der Apoptose-Induktion durch Alkylphosphocholine

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte

DISSERTATION

von

Carolin Oberle
aus Karlsruhe

2006

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta

Referent: Prof. Dr. H.F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. D. Wedlich

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2006

ZUSAMMENFASSUNG

Alkylphosphocholine (APC) repräsentieren eine neue Klasse anti-tumoraler Wirkstoffe, die im Gegensatz zu konventionellen anti-Krebs Medikamenten nicht in die zelluläre Replikationsmaschinerie eingreifen, sondern an der Plasmamembran der Zellen wirken. Es handelt sich bei diesen Verbindungen um synthetische Phospholipide, die durch spezifische Modifikationen nur schlechte Substrateigenschaften für phospholipidmetabolisierende Enzyme besitzen und somit gegenüber dem Abbau durch zelluläre Phospholipasen resistent sind. APC sind daher wesentlich stabiler, reichern sich in der Plasmamembran der Zellen an und führen dort zu Ereignissen, die den Tod der entarteten Zelle bewirken.

Einer der bedeutendsten Mechanismen, durch welchen APC die Zerstörung von Tumorzellen hervorruft, ist die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose). In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose-induzierende Wirkung einer speziellen APC-Verbindung, dem S-NC-2, an *in vitro* Zellkultursystemen humaner Krebszelllinien eingehend untersucht.

Mit Hilfe verschiedener mikroskopischer und biochemischer Methoden konnte die zytotoxische Wirkung von S-NC-2 deutlich auf die Induktion der Apoptose zurückgeführt werden. Die Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen sowie die Spaltung spezifischer Todessubstrate erwiesen sich als deutliche Merkmale des programmierten Zelltods.

Als wichtiges regulatorisches Element bei der S-NC-2 induzierten Apoptose konnte der CD95-Todesrezeptor identifiziert werden. Immunhistochemische Studien demonstrierten ein durch S-NC-2 induziertes *Clustering* der Rezeptormoleküle sowie deren Translokation in bestimmte Mikrodomänen der Plasmamembran (*Lipid Rafts*). Die Behandlung genetisch veränderter Zelllinien, denen wichtige Bestandteile der CD95-Signalweiterleitung oder der Rezeptor selbst fehlen, zeigten eine drastische Reduktion der Apoptose-induzierenden Wirkung von S-NC-2.

Zusätzlich zum CD95-Todesrezeptor konnte eine Beteiligung der Mitochondrien und der Lysosomen am S-NC-2 induzierten Zelltod beobachtet werden. Der Verlust der Membranintegrität sowie die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine, wie Cytochrom c oder Cathepsin B, erwiesen sich als deutliche Marker für die Beteiligung dieser Organellen. In Abhängigkeit vom Zelltyp konnte die Apoptose durch eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 verhindert werden. Eine weitere Besonderheit der APC ist deren Selektivität gegenüber Tumorzellen. Dies trifft auch für die Substanz S-NC-2 zu. Im Gegensatz zu Krebszellen konnte bei vergleichbaren Konzentrationen und Inkubationszeiten keine zytotoxische Wirkung der Substanz in primären Blutzellen beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkungsweise synthetischer Phospholipide, im Speziellen S-NC-2, kann als interessanter Grundbaustein für die Entwicklung neuer, zielgerichteter Krebsmedikamente dienen.

Identification of the molecular target of Alkylphosphocholine-induced apoptosis**A B S T R A C T**

Alkylphosphocholines (APCs) represent a new class of anti-tumour agents. In contrast to most of the conventional anti-cancer drugs, these compounds do not act on the cellular DNA but operate on the level of the plasma membrane. APCs are synthetic phospholipids, which show only marginal substrate features to phospholipid metabolising enzymes. Due to small chemical alterations they are stable compounds and exhibit a strongly increased resistance to phospholipase degradation. As a result APCs accumulate in the plasma membrane of the target cells and lead to dramatic alterations, which finally result in death. One of the most significant mechanisms of APC induced tumour cell death is via the initiation of apoptosis (programmed cell death). In the present study, the focus was set on the investigation of the apoptosis-inducing potency of one special APC-compound, the S-NC-2. The induction of apoptosis in neoplastic cells was clearly demonstrated by the use of different microscopic and biochemical methods, the investigation of initiator- and effector-caspases-activation as well as the cleavage of specific death substrates that were shown to be specific markers of programmed cell death.

One important regulatory element of S-NC-2 induced apoptosis could be identified as the CD95 death receptor. Immunohistochemical studies demonstrated a clustering of the death receptor molecules upon S-NC-2 treatment as well as a translocation of the receptors to specific microdomains of the plasma membrane – the so called lipid rafts. The use of genetically modified cell lines, which were deficient in important molecules of the CD95 signal transduction pathway, or even in the death receptor itself, demonstrated a dramatic reduction of the apoptosis inducing potency of S-NC-2. Furthermore, the participation of the mitochondrial and the lysosomal pathway could be identified in the signalling pathway. The loss of the mitochondrial/lysosomal membrane integrity as well as the release of pro-apoptotic molecules like cytochrome c and cathepsin B, were obvious markers for the participation of these organelles in S-NC-2 induced cell death. Moreover, depending on the cell type, apoptosis could be blocked by the overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2.

An additional particular feature of APCs is their selectivity towards tumour cells that could also be demonstrated for the compound S-NC-2. The comparison of primary peripheral blood lymphocytes and leukaemia cells on their sensitivity to S-NC-2 treatment showed a strong cytotoxic effect in neoplastic cells, whereas normal cells were spared.

As the majority of anti-cancer agents damage besides tumour cells also fast growing healthy tissue, it is of great importance to find new strategies of chemotherapeutic application. Promising candidates are the APCs and the knowledge about the mode of action of one special APC, the S-NC-2, which was achieved in this study, can be accounted as an interesting and helpful tool for the development of new targeted anti-cancer drugs.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Krebs.....</i>	1
1.2	<i>Therapieansätze</i>	1
1.3	<i>Alkylphosphocholine und Krebs – ein neuer Therapieansatz</i>	2
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	4
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1	<i>Alkylphosphocholine</i>	5
2.2	<i>Apoptose – die regulierte Zerstörung der Zelle.....</i>	14
2.3	<i>Todesrezeptoren – die Initiatoren des Zelltods.....</i>	17
2.4	<i>Caspasen – die zentrale ausführende Gewalt.....</i>	19
2.5	<i>Das Mitochondrium – eine zentrale Schaltstelle der Apoptose.....</i>	22
2.6	<i>Beteiligung weiterer Zellorganellen am apoptotischen Zelltod.....</i>	27
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	<i>Chemikalien</i>	30
3.2	<i>Laborgeräte und Programmsoftware</i>	31
3.3	<i>Zellkultur</i>	32
3.3.1	<i>Die Jurkat T Zelllinien</i>	33
3.3.2	<i>Die B-Zelllinie BJAB.....</i>	34
3.3.3	<i>Die SKW 6.4 Zellen.....</i>	35
3.3.4	<i>K562 Zellen.....</i>	36
3.3.5	<i>HL-60 Zellen</i>	37
3.3.6	<i>HeLa Zellen.....</i>	37
3.3.7	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	38
3.3.8	<i>Langzeitkonservierung und in-Kulturnahme von Zellen.....</i>	38
3.4	<i>Isolierung von Blutlymphozyten aus Vollblut.....</i>	39
3.5	<i>Vitalitäts-Tests</i>	40
3.5.1	<i>Trypanblau-Färbung</i>	40

3.5.2	MTT-Assay.....	40
3.6	<i>Proteinanalytik</i>	42
3.6.1	Proteinbestimmung	42
3.6.2	Herstellung von Ganzzelextrakten	42
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.6.4	Das Blotting	44
3.6.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	45
3.7	<i>Isolierung apoptotischer DNA-Fragmente</i>	47
3.8	<i>Durchflusszytometrie</i>	49
3.8.1	Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin V-FITC/Propidiumiodid Färbung	49
3.8.2	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$)	50
3.8.3	Bestimmung der lysosomalen Membranintegrität.....	50
3.9	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	52
3.9.1	Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen.....	52
3.9.2	Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342).....	53
3.10	<i>Caspase-Assay</i>	53
3.11	<i>Co-Immunopräzipitation</i>	54
3.12	<i>Isolierung von Lipid Rafts</i>	55
3.13	<i>Zytosolisolierung</i>	56
3.14	<i>Aufnahme und Metabolismus radioaktiv markierter Lipide</i>	57
3.14.1	Aufnahmekinetik der radioaktiven Lipide	57
3.14.2	Extraktion zellulärer Lipide	58
3.14.3	Dünnschichtchromatographie und Visualisierung der Lipidbanden	58
3.14.4	Autoradiographie.....	59
3.15	<i>Plasmidklonierung und Transfektion von pKEX-2-XR-APO-1</i>	59
3.15.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	59
3.15.2	Amplifizierung und Isolation von Plasmiden	60
3.15.3	Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen.....	61
3.16	<i>Bestimmung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies</i>	61
3.17	<i>Elektronenmikroskopie</i>	62

4	ERGEBNISSE	64
4.1	<i>Morphologische Veränderungen durch Einwirkung von APC</i>	64
4.1.1	APC beeinträchtigen das Zellwachstum	64
4.1.2	Beobachtung der morphologischen Veränderungen	65
4.2	<i>Aufnahme und Metabolismus von APC</i>	67
4.2.1	Aufnahmekinetik	68
4.2.2	Stoffwechsel und Metabolismus von [¹⁴ C]-R-NC-2	69
4.2.3	Mögliche Hemmung der Aufnahme durch Suramin?	72
4.3	<i>S-NC-2 induziert Apoptose in leukämischen Zellen.....</i>	74
4.3.1	S-NC-2 induziert eine Externalisierung von Phosphatidylserin.....	74
4.3.2	Aktivierung der Caspasen-Kaskade.....	79
4.3.3	Behandlung mit S-NC-2 führt zu nuklearen Veränderungen	85
4.3.4	Suramin besitzt keine Apoptose-inhibierende Eigenschaft.....	88
4.4	<i>Aktivierung der Todesrezeptoren.....</i>	89
4.4.1	Immunhistochemische Untersuchungen zum Rezeptorclustering	89
4.4.2	FADDdn Zellen erweisen sich als wenig sensitiv gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose.....	93
4.4.3	Co-Immunpräzipitation.....	94
4.4.4	Die S-NC-2 induzierte Aktivierung des CD95 Rezeptors resultiert nicht aus autokrinen oder parakrinen Effekten.....	95
4.5	<i>Die resistente Zelllinie K562</i>	96
4.6	<i>Die mitochondriale Beteiligung</i>	100
4.6.1	Hemmung der Apoptose durch Bcl-2.....	101
4.6.2	Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials	107
4.6.3	Induziert S-NC-2 eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies?.....	113
4.6.4	Bid – eine Möglichkeit der mitochondrialen Permeabilisierung?.....	114
4.6.5	Die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine	117
4.7	<i>Beteiligung zellulärer Organellen am programmierten Zelltod.....</i>	120
4.7.1	Lysosomen.....	120
4.7.2	Mögliche Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums?	126
4.8	<i>Resistenz primärer Lymphozyten</i>	127
4.9	<i>APC und LPC.....</i>	130

5	DISKUSSION	133
5.1	<i>Aufnahme und zelluläre Veränderung</i>	134
5.2	<i>S-NC-2 und Apoptose.....</i>	137
5.2.1	Einfluss auf das Wachstumsverhalten	137
5.2.2	Morphologische Veränderungen	138
5.2.3	Beteiligung der Todesrezeptoren	139
5.2.4	Aktivierung der Caspase-Kaskade: Typ I und Typ II Zellen im Vergleich	142
5.3	<i>Intrazellulärer Crosstalk</i>	145
5.3.1	Der Verlust des MMP geht ohne die Freisetzung von ROS einher.....	145
5.3.2	Die Rolle von Bid während des apoptotischen Signalwegs	146
5.3.3	Die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO.....	149
5.3.4	Lysosomen als Verstärker der Apoptose?	151
5.3.5	Das endoplasmatische Retikulum – ein weiterer Mitspieler?	152
5.4	<i>Resistenz primärer Blutzellen und Reduktion der Zytotoxizität durch LPC.....</i>	152
5.5	<i>Zeitlicher Ablauf der S-NC-2 induzierten Apoptose</i>	154
5.6	<i>Möglicher Verlauf der S-NC-2-induzierten Apoptose: eine Arbeitshypothese</i>	155
6	LITERATUR	158
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	170
8	ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS	173

1 EINLEITUNG

1.1 *Krebs*

Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern der Oberbegriff für mehr als hundert verschiedener Formen bösartiger maligner Erkrankungen. Die allgemeine Bezeichnung „Krebs“ beschreibt eine unkontrollierte Zellvermehrung. Die hemmungslose Teilung von Zellen eines Organs oder Gewebes führt zur Entstehung eines Tumors. Bösartige (maligne) Tumore zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich der normalen Wachstumskontrolle des Organismus entzogen haben. Sie vermehren sich rasant und ungebremst. Normale Zellen des Körpers sind wohl organisiert. Jede Zelle hat ihren Platz und erfüllt eine spezifische Aufgabe. Krebszellen jedoch sind Vagabunden, die aggressiv in andere Gewebe eindringen, sie besiedeln und diese letztendlich zerstören. Auch die Blutbahn und Lymphgefäße stellen kein Hindernis für sie da, sondern dienen als Transportweg, um in entfernte Organe zu gelangen. Dort sind sie in der Lage, sich erneut anzusiedeln und Metastasen auszubilden.

Krebs ist in Deutschland, nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache. Jährlich erkranken nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts 400.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs. Im Jahr 2003 starben knapp 210.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung.

Die häufigste Krebsart des Mannes mit rund 40.600 Neuerkrankungen im Jahr ist das Prostatakarzinom, 1/5 aller männlichen Krebspatienten leiden daran. Frauen erkranken besonders häufig an Brustkrebs. In Deutschland und in anderen Industrieländern wird bei jeder 10. Frau im Lauf ihres Lebens Brustkrebs diagnostiziert. Etwa 1/4 aller Krebspatientinnen sind davon betroffen. Darmkrebs folgt diesen beiden geschlechtstypischen Krebsarten auf Platz zwei, gefolgt von Lungenkrebs auf dem dritten Platz (www.krebshilfe.de; www.krebsinformation.de; www.rki.de).

Das Ausmaß dieser Krankheit und die Menge der betroffenen Personen macht deutlich, wie wichtig erfolgreiche Therapieansätze sind.

1.2 *Therapieansätze*

Bislang gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie Krebserkrankungen behandelt werden. Dies ist abhängig von der Art, Größe und der Lage des Tumors. Zu den herkömmlichen Methoden zählen die operative Entfernung des entarteten Gewebes sowie die Strahlen- und Chemotherapie. Allerdings bringt jede der Methoden Limitationen mit sich und ist somit nur bis zu einem gewissen Grad einsetzbar. Bei einem chirurgischen Eingriff erfolgt die Entfernung des gesamten bösartigen

Gewebes und soviel des eventuell befallenen Gewebes wie möglich, einschließlich angrenzender Gewebe. Dies birgt zum einen das Risiko gewaltiger Kollateralschäden, zum anderen sind viele Erkrankungen zu weit fortgeschritten, um operativ geheilt zu werden. Hat sich der Tumor bereits im Organismus ausgebreitet, Metastasen gebildet oder ist in weitere Gewebe eingedrungen, welche nicht entfernt werden können, stößt diese Methode an ihre Grenze.

Mit Hilfe der Strahlentherapie können Tumore in abgelegenen oder schlecht erreichbaren Teilen des Organismus behandelt werden. Hierbei wird ionisierende Strahlung in Form elektromagnetischer Wellen- oder Teilchenstrahlung eingesetzt, die eine wirksame Gewebszerstörung hervorrufen. Aufgrund der vergleichsweise akzeptablen Wirkung auf normale Zellen, erweist sich die Strahlentherapie als geeigneter Ersatz, bzw. als Ergänzung, zur chirurgischen Behandlung.

In der Chemotherapie erfolgt der Einsatz von Medikamenten zur Krebsbehandlung. Diese Medikamente eignen sich zur Therapie von Tumoren, die sich bereits weit im Organismus ausgebreitet haben und für eine Strahlentherapie oder operative Entfernung nicht zugänglich sind. Die Verteilung im Körper erfolgt über den Blutkreislauf. Im Rahmen der Chemotherapie wurde eine Vielzahl verschiedener Arten von Medikamenten getestet und eingesetzt. Ihre Wirkungsweise ist jedoch meistens gleich: sie greifen in die DNA-Synthese oder –funktion ein. Daher sind sich rasant vermehrende Zellen um ein vielfaches anfälliger als die „ruhenden“ Zellen des Körpers. Allerdings birgt diese Therapie auch ein hohes toxisches Potenzial, denn es sind nicht nur Krebszellen, die sich schnell vermehren. Die Zellen des Knochenmarks und der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes gehören ebenfalls der schnell wachsenden Zellpopulation an und reagieren sehr stark auf die toxische Wirkung der Substanzen. Es beginnt somit ein Wettlauf der gesunden und kranken Zellen um die schnellere Erholung nach erfolgter Behandlung. Da sich die Zellen des Knochenmarks normalerweise schneller vermehren als entartete Zellen, kann ein erneuter Behandlungszyklus erfolgen, bevor der Tumor wieder wesentlich gewachsen ist. Die größten Probleme der Chemotherapie sind jedoch die starken toxischen Nebenwirkungen, die Ausbildung von Resistenzen sowie die Induktion eines Sekundärtumors (Microsoft Encarta Enzyklopädie, 2004).

1.3 Alkylphosphocholine und Krebs – ein neuer Therapieansatz

Die Mehrheit der anti-Krebs Medikamente schädigt nicht nur die schnell wachsenden Tumorzellen, sondern verursachen auch erhebliche Schäden in schnell wachsendem gesunden Gewebe. Ein neuer Ansatz in der Chemotherapie konnte durch die Verwendung synthetischer Phospholipide, den Alkylphosphocholinen (APC), erbracht werden (Unger *et al.*, 1988; Eibl *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 1990; Berger *et al.*, 1993a; Berger *et al.*, 1993b; Terwogt *et al.*, 1999). Im Vergleich zu

natürlich vorkommenden Phospholipiden sind diese Moleküle leicht verändert. Sie besitzen Modifikationen, die sie gegen den Abbau durch Phospholipasen in der Zelle resistent machen (Unger *et al.*, 1989; Massing *et al.*, 1994). Dadurch sind diese Verbindungen wesentlich stabiler, verweilen länger in der Zelle und reichern sich in der zellulären Membran an (van Blitterswijk *et al.*, 1987). APC stammen ursprünglich von Ether-Phospholipiden ab, doch sie haben im Lauf der Zeit bei unterschiedlichen Synthesen einige Veränderungen durchlaufen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Glycerin-Grundgerüst für die Wirkungsweise dieser Moleküle nicht notwendig war und deshalb entfernt wurde. Die neuen Verbindungen bestehen somit aus einem Cholin Kopf, einem Phosphat als Verbindungsstück und einer langen Kohlenstoffkette.

Die Strukturverwandten der Ether-Phospholipide erwiesen sich als membrangerichtete Substanzen, d. h. aufgrund ihrer Akkumulation in diesem Kompartiment ist die Plasmamembran der primäre Wirkungsort, von wo aus sie ihre anti-neoplastische Wirkung entfalten. Sie sind weder mutagen noch kanzerogen (King *et al.*, 1981; Andreesen, 1988).

Einer der bedeutendsten Mechanismen, durch welche APC die Zerstörung von Tumorzellen hervorrufen, ist die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) (Mollinedo *et al.*, 1997; Gajate *et al.*, 2002; Jendrossek *et al.*, 2003; Krug *et al.*, 2003). Der wichtigste Teilnehmer an diesem Vorgang ist der CD95-Todesrezeptor (Mollinedo *et al.*, 1997; Matzke *et al.*, 2001; Gajate *et al.*, 2002; Mollinedo *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2004). Viele Daten demonstrierten, dass eine Aktivierung des Rezeptors durch die Behandlung der Zellen mit APC, unabhängig von einer Rezeptor–Ligand Interaktion erfolgt (Mollinedo *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2004). Hierbei handelt es sich um einen neuen Mechanismus der Todesrezeptor-Aktivierung, der zusätzlich einen interessanten Wirkungsmechanismus anti-tumoraler Medikamente beschreibt und somit einen modernen Weg der gezielten Zerstörung von Tumorzellen in der Krebstherapie ebnet. Ein weiterer, spannender Aspekt ist eine spezifische Selektivität dieser Substanzen. Es wurde in einer Reihe von Studien erwiesen, dass APC sich in entarteten Zellen anreichern und gesunde Zellen verschonen (Eibl *et al.*, 1990; Konstantinov *et al.*, 1998; Berkovic *et al.*, 2001; Gajate *et al.*, 2002). Diese gezielte Wirkungsweise konnte bis heute noch nicht im Detail geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die starke Wachstumsrate der entarteten Zellen zu einem erhöhten Bedarf an Lipiden führt. Die Lipide werden aus der Umgebung aufgenommen und dabei auch eine erhebliche Menge der angebotenen APC inkorporiert. Aufgrund deren Akkumulation führen sie, durch die Aktivierung des Apoptose-Programms, zur einer selektiven Zerstörung der Krebszellen. Die Zelle wird dabei kontrolliert abgebaut und vom umgebendem Gewebe recycelt, ohne dass große Schäden verursacht werden. Diese grundlegende Erkenntnis über die Wirkungsweise synthetischer Phospholipide in der Chemotherapie kann als interessanter Grundbaustein für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente dienen (Gajate *et al.*, 2002).

Allerdings entstehen auch bei diesen Substanzen einige Nachteile. Aufgrund der starken gastrointestinalen Nebeneffekte der bisher synthetisierten APC-Derivate werden immer wieder neue Substanzen mit dem Ziel der geringeren Nebenwirkungen, im Vergleich zu bisherigen APC, entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere neue Substanz getestet, das S-NC-2, welches aufgrund seiner starken Apoptose-induzierenden Eigenschaft aus acht enantiomerenreinen Strukturen ausgewählt wurde (Massing *et al.*, 1994; Matzke *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2003). Dieses Lipid ist in der Grundstruktur einem Prototyp der APC nachempfunden, dem Hexadecylphosphocholin (HePC). Durch das Einfügen eines Essigsäurerests an der Position sn-2 sollte die anti-neoplastische Eigenschaft dieses Moleküls bei gleichbleibenden, oder sogar reduzierten Nebeneffekten, erhöht werden. Die bisherigen Ergebnisse des S-NC-2-induzierten Zelltods sind sehr vielversprechend und wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Alkylphosphocholine (APC) repräsentieren eine neue Klasse anti-tumoraler Mittel, die ihre Wirkungsweise in der Plasmamembran der entarteten Zelle entfalten. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch die molekularen Wirkungsmechanismen der APC nicht genau aufgeklärt.

Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise der APC zu erhalten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine genaue Charakterisierung der apoptotischen Wirkung einer speziellen APC-Verbindung erfolgen, dem S-NC-2. Dieses Molekül wurde aus einer Reihe von acht enantiomerenreinen Verbindungen ausgewählt, die im Zusammenhang einer bereits abgeschlossenen Arbeit synthetisiert wurden. Als ein mögliches Target wurde, auf Basis vorhandener Erkenntnisse, der Todesrezeptor CD95 identifiziert.

Dieses Projekt zielt auf die Untersuchung des S-NC-2 induzierten Apoptose-Signalwegs, da der programmierte Zelltod einer der bedeutendsten Mechanismen darstellt, durch welchen APC die Zerstörung von Tumorzellen hervorrufen. Hierbei soll eine genaue Analyse Aufschluss über die Beteiligung von Todesrezeptoren, wie z. B. CD95, erbringen. Zu diesem Zweck muss zunächst eine umfassende Ermittlung und Charakterisierung geeigneter Zellmodelle erfolgen und Unterschiede in resistenten und sensiblen Zellen aufgeklärt werden. Weiterhin soll das Augenmerk auf eine detaillierte Aufklärung des apoptotischen Signalwegs bei der S-NC-2 induzierten Apoptose gerichtet sein, unter Berücksichtigung möglicher weiterer intrazellulärer Mitspieler.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 *Alkylphosphocholine*

Die Entdeckung der Alkylphosphocholine

Synthetische Phospholipide werden bereits seit über 20 Jahren auf ihre anti-tumorale Wirkung untersucht. Die Wege, welche zur Entdeckung dieser außerordentlichen Substanzen führten, waren verschlungen. Zum einen gab es die Gruppe um Brohult, die im Jahr 1970 durch die Verabreichung von Lebertran aus Grönlandhaien einen Rückgang der Mortalität an Krebspatienten feststellen konnte. Dieser Lebertran enthielt große Mengen an Glycerol-Ether (Brohult *et al.*, 1970). Bereits ein Jahr später wurde durch eine Methoxy-Substitution dieser Lipide (3% der Gesamtlipide) eine gesteigerte zytotoxische Aktivität gegenüber metastasierenden sowie wachsenden Tumoren erreicht (Boeryd *et al.*, 1971).

Unabhängig von diesen Ergebnissen beobachtete die Gruppe um Snyder *et al.* eine Abnormalität der synthetisierenden und metabolisierenden Enzyme in neoplastischen Geweben. Zusätzlich erwies sich eine gesteigerte Menge an Ether-Lipiden als charakteristisch für diese entarteten Zellen (Snyder, 1972).

Ferner bestätigte auch die Arbeit von Munder über das 2-Lysophosphatidylcholin (LPC), durch den Einsatz von chemisch definierten, reinen, synthetischen Substanzen, die anti-tumorale Aktivität der Ether-Lipide. Hierbei wurden Analoga des LPC synthetisiert, welche resistent gegenüber dem enzymatischen Abbau sind und dadurch stärkere und länger andauernde biologische Effekte verursachen (Andreesen, 1988).

Bereits in den 60er Jahren beschäftigte sich Brudzy *et al.* mit der Aktivierung peritonealer Makrophagen *in vivo* sowie *in vitro* und entdeckte dabei, dass eine kleine Menge exogenes Lysolecithin die Phagozytose-Aktivität dieser Zellen erheblich verstärkte (Brudzy *et al.*, 1967). Da allerdings die Halbwertszeit dieser Substanzen sehr kurz war, wurden in einer Reihe von Arbeiten Ether-Analoga zur Studie von Makrophagen-Aktivierungsprozessen synthetisiert. Überraschenderweise besaßen diese Substanzen in einer Reihe von verschiedenen Tumorzellen erhebliche zytolytische Effekte.

All diese sehr frühen Experimente, in denen strukturell genau definierte Moleküle verwendet wurden, beschreiben den Beginn der Ära von Ether-Lipiden in der Krebstherapie, ein Gebiet, das bis in die 80er Jahre zum größten Teil von Ether-Analoga des LPC, den sog. Alkyl-Lysophospholipiden (ALP) dominiert wurde (Andreesen, 1988). Eine Reihe von Untersuchungen an einer Vielzahl synthetischer ALP führte allerdings zu der Erkenntnis, dass eine lange Alkyl-Kette

sowie ein Phosphocholin-Rest ausreichend für die anti-neoplastischen Effekte der Ether-Lipide sind und somit die minimalen strukturellen Anforderungen darstellen (Unger *et al.*, 1989). Dieses Wissen führte zur Synthese einer neuen Strukturklasse – den Alkylphosphocholinen (APC).

Wirkungsweisen synthetischer Phospholipide

Erste Hinweise zur anti-neoplastischen Wirkung der synthetischen Phospholipide ergaben sich bei Studien über die Transformation von Lymphozyten. Die Transformation erfolgt nach einer Stimulierung der Zielzelle mit bestimmten Substanzen und geht mit der Aktivierung der LPC-Acetyltransferase sowie einem Einbau von hauptsächlich ungesättigten Fettsäuren in die Membranphospholipide einher. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Membranfluidität und somit auch zu einer erhöhten Permeabilität für Ionen. Dies ist ein notwendiger Schritt für die Transformation und die darauf folgenden mitotischen Prozesse. Während dieser Studie zeigte sich, dass Alkyl-Analoga des LPC potentielle Inhibitoren des acylierenden-deacylierenden Lands-Zyklus und somit der Phospholipidsynthese darstellen. Zudem erwiesen sich diese Substanzen als metabolisch stabil, da sie nicht durch Lysophospholipasen oder LPC-Acyltransferasen abgebaut werden konnten. Diese Ereignisse führten zu einer vollständigen Hemmung der Lymphozyten-Transformation. Zusätzlich erwiesen sich diese Produkte als zytotoxisch gegenüber transformierten Zellen, nicht aber gegenüber ruhenden Zellen. Als effektivstes Molekül erwies sich Et-18-OCH₃ (Andreesen *et al.*, 1979).

Es wurde vermutet, dass die zytotoxische Aktivität des ALP auf dessen Resistenz gegenüber seinem metabolischen Abbau in malignen Zellen zurückzuführen sei. Zudem könnten maligne Zellen einen Mangel an wichtigen Proteinen aufweisen, wie etwa das 1-O-alkyl schneidende Enzym, was bereits im Jahre 1970 von der Gruppe um Snyder beschrieben wurde (Soodma *et al.*, 1970). Zusätzlich wurde im Vergleich zu ruhenden Lymphozyten eine erhöhte Akkumulation der ALP in Lymphoblasten beobachtet. Es stellte sich heraus, dass die angereicherten ALP in den Phospholipid-Stoffwechsel eingreifen und daher die kontinuierliche Erneuerung der zellulären Phospholipide stören. ALP induzierten somit eine selektive Zerstörung in humanen neoplastischen Zellen *in vitro* (Andreesen *et al.*, 1979; Modolell *et al.*, 1979).

Die Wirkungen von ALP wurde in vielen verschiedenen Tumor-Zelllinien demonstriert, so z. B. in permanenten Zelllinien von Mäusen, Ratten und Menschen sowie an frisch isolierten Zellen aus einer Vielzahl leukämischer, lymphatischer und solider Tumore. Aufgrund der Störung des kontinuierlichen Phospholipid-Metabolismus kommt es zu einer starken Veränderung der Membranfluidität, die bis zu deren Permeabilisierung führen kann (Jimenez-Lopez *et al.*, 2002; Berkovic *et al.*, 2002). Dies wird durch verschiedene Parameter, wie die Hemmung der Synthese von Phosphatidylcholin als auch der Phosphatidylcholin-Cytidyltransferase und des Einbaus von

Cholin in Phosphatidylcholin ausgelöst. Weiterhin wurde eine ALP-induzierte Aktivierung von Tumor-zerstörenden Makrophagen *in vivo* und *in vitro* beschrieben sowie die Auslösung der Differenzierung unreifer maligner Zellen, eine Hemmung der Tumorzell-Invasion, der Tumormetastasierung und -entwicklung bis hin zur Schrumpfung des Tumors. Zusätzlich konnte eine Veränderung der Genexpression, eine Störung der Calcium-Homeostase und Veränderungen in Proteinkinasen und Phospholipasen beobachtet werden. Allerdings ist unklar, ob diese Effekte den Zelltod auslösen oder aus ihm resultieren (Boggs *et al.*, 1998). Umstritten ist ebenfalls die oftmals beschriebene Hemmung der Protein Kinase C (PKC). Studien, die eine Inhibition von PKC befürworten, wurden meist unter *in vitro* Bedingungen durchgeführt, bei welchen die PKC in künstlichen, aus Phosphatidylserin und Diolein bestehenden Membranstrukturen vorlag. Rijkse's Gruppe erbrachte jedoch den Beweis, dass Et-18-OCH₃ in HL-60 Zellen zu einer Stimulation der PKC führt, allerdings sind die physiologischen Konsequenzen dieser Untersuchung noch unklar (Heesbeen *et al.*, 1991; Konstantinov *et al.*, 1998).

Tatsache ist jedoch, dass die Behandlung von Tumorzellen mit geringen Konzentrationen an ALP diese gegenüber dem Angriff von normalen, nicht aktivierten Makrophagen sensibilisieren. Dieses Ereignis ist auf ALP beschränkt und wurde darauf zurückgeführt, dass die Anreicherung dieser Lipide ein Erkennungssignal maligner Zellen für Makrophagen darstellt. Während der Initiation der leukämischen Zellzerstörung durch ALP können *in vitro* drei Schritte unterschieden werden:

1. Absorption der ALP in Lipoproteine des Serums
2. Austausch der ALP von Serumprotein an die Zelloberfläche
3. Aufnahme in die Plasmamembran und den Phospholipid-Metabolismus.

Jeder dieser Schritte kann durch unterschiedliche Parameter wie die Konzentration des Serums, die Inkubations-Temperatur und den pH-Wert des Mediums beeinflusst werden (Andreesen *et al.*, 1982).

Die Gruppe um Unger war die erste, welche eine Beziehung zwischen chemischer Struktur, anti-tumoralem Effekt und der Selektivität der synthetischen Ether-Lysolecithine gegenüber Tumorzellen darlegte. Strukturen mit langen Alkyl-Ketten (>C₁₆) lösten eine Immunstimulierung aus, während eine Kettenlänge unter 15 Kohlenstoffatomen zur Immunsuppression führte (Eibl *et al.*, 1990). Weiterhin wurde gezeigt, dass in Zellen hämatopoetischen Ursprungs die zytotoxische Aktivität der Substanzen von der Länge der Alkyl-Kette abhängig ist. Im allgemeinen wurde ein Anstieg der zytotoxischen Wirkung (abnehmende LD₅₀ Werte) mit einer zunehmenden Kettenlänge beobachtet. APC mit einer Kettenlänge von mehr als 16 Kohlenstoffatomen induzieren z. B. Apoptose in Blasenkrebszellen (Konstantinov *et al.*, 1999). Eine Einführung von Doppelbindungen in die Alkyl-Kette ging mit einer Verminderung der zytotoxischen Eigenschaften einher. Der Austausch des Cholin-Kopfes mit einer Ringstruktur erzielte im Vergleich zu APC mit gleicher Kettenlänge keine Änderung der anti-neoplastischen Eigenschaft.

Im Gegensatz zu den meisten konventionellen anti-neoplastischen Substanzen interagieren ALP/APC nicht mit der zellulären DNA. Ihr primärer Wirkungsort ist die Plasmamembran der Zellen. Die Entdeckung der Zellmembran als neues Ziel der experimentellen Krebstherapie bringt einen wichtigen Vorteil gegenüber herkömmlicher Chemotherapeutika mit sich: das System ist unabhängig vom Proliferations-Status der Zielzelle (Mollinedo *et al.*, 2004). ALP sind weder mutagen noch kanzerogen (King *et al.*, 1981; Andreesen, 1988).

Bemerkenswerterweise offenbaren bestimmte APC bei Konzentrationen unter dem zytotoxischen Bereich zusätzliche mitogene Effekte. Dies konnte an Knochenmarkszellen aus Mensch und Ratte sowie in neoplastischen und normalen Zellen demonstriert werden (Vehmeier *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 1993b; Konstantinov *et al.*, 1998; Ergezinger *et al.*, 1999). Bei der klinischen Anwendung von Hexadecylphosphocholin (HePC) wurde in diesem Zusammenhang eine Leukozytose sowie eine Thrombozytose beobachtet (Pronk *et al.*, 1994; Berkovic *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass dieser Effekt auf die Produktion, wie auch auf die Freisetzung von löslichen Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist. Es wurde bereits eine Zytokin-freisetzende Rolle für HePC in normalen peripheren Blutzellen beschrieben (Vehmeier *et al.*, 1991; Konstantinov *et al.*, 1998; Berkovic *et al.*, 2001).

Die weitreichenden anti-proliferativen Eigenschaften der synthetischen ALP sind beachtlich. Sie erstrecken sich von Prostata- und Blasenkarzinomen, über eine Vielzahl von humanen und murinen Leukämien, Gehirntumoren von Ratten und Menschen, Lungen-, Ovarien-, Darm- und Brustkrebs bis hin zu Gallenblasen-, Uterus-, Zervix- und Fibrosarkomen (Arthur *et al.*, 1998). Kinetische Untersuchungen zeigten nach intravenöser, subkutaner oder oraler Verabreichung eine rasche Verbreitung der ALP im Körper, wobei eine Konzentration dieser Substanzen in Tumorgewebe festgestellt werden konnte (Arnold *et al.*, 1978). Versuche bei Mäusen und Ratten zeigten allerdings bei einer einzigen intravenösen Verabreichung der synthetischen Phospholipide einen LD₅₀-Wert von 55 mg/kg. Die Hauptursache für die akute Toxizität lässt sich auf die Lysolipid-Eigenschaften dieser Substanzen zurückführen. Sie führen zu intravaskulärer Hämolyse und akutem Nierenversagen. Bei oraler Verabreichung von ALP ergab sich ein LD₅₀-Wert von 200 mg/kg. Als hervorstechende Merkmale einer subakuten Toxizität erwiesen sich Übelkeit, Erbrechen, Durchfall sowie leichte Hämolyse und Gewichtsverlust.

Bedeutende Vertreter der synthetischen Phospholipide – ALP und APC

Der prominenteste Vertreter der synthetischen ALP ist das Et-18-OCH₃ (Edelfosine®; 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, siehe Abb. 1A), dessen erste klinische Pilotstudie bereits im Jahre 1980 durchgeführt wurde (Andreesen, 1988). Et-18-OCH₃ ging schließlich 1987 in die Phase I der klinischen Studie über (Berdel *et al.*, 1987). Aufgrund seiner Struktur repräsentiert dieses Lipid ein synthetisches Analog zu LPC. Nach einer Vielzahl von

Experimenten mit den unterschiedlichsten chemischen Strukturen kristallisierte sich heraus, dass Substanzen wie etwa das Et-18-OCH₃, mit einer langen aliphatischen Seitenkette an Position sn-1 des Glycerols und einer metabolisch stabilen Substitution an Position sn-2, sich als die effektivsten therapeutischen und prophylaktischen Substanzen erwiesen (Berdel *et al.*, 1990). Die Wirkungsweise von Et-18-OCH₃ ist stark strukturabhängig, da Substitutionen in Position sn-2 und sn-3 einen vollständigen Verlust der anti-neoplastischen und apoptotischen Wirkung nach sich ziehen (Mollinedo *et al.*, 1997). Die weitere Tatsache, dass normale Knochenmarkszellen resistent und leukämisches Knochenmark hoch empfänglich für die Apoptose-induzierende Eigenschaft des Et-18-OCH₃ sind, brachte dieses Lipid in eine zusätzliche klinische Studie und wird zur *ex-vivo* Reinigung von leukämischem Knochenmark vor der Knochenmarkstransplantation eingesetzt (Vogler *et al.*, 1993). Ferner deuten weitere *in vivo* Daten auf eine mögliche erfolgreiche Behandlung experimenteller Autoimmunkrankheiten hin (Mollinedo *et al.*, 1997).

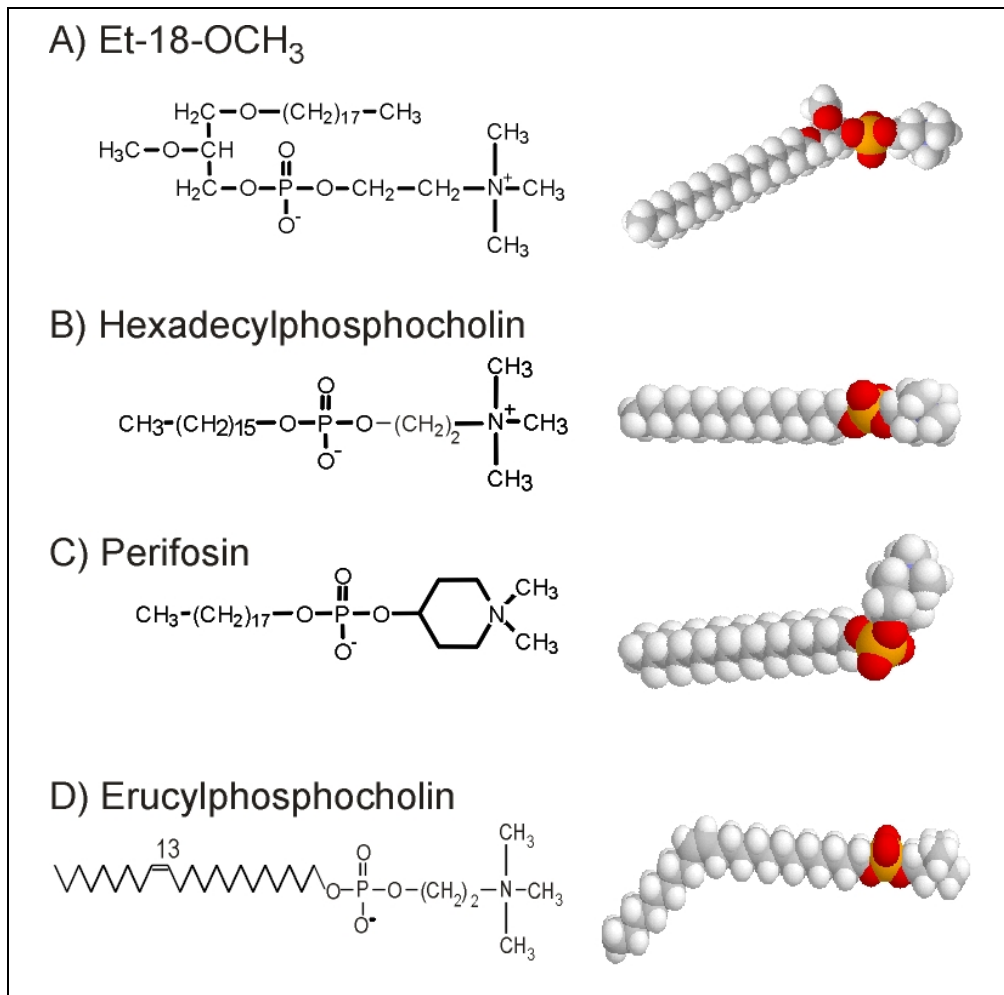


Abb. 1: Prototypen und die wichtigsten Vertreter der synthetischen Lipide

Die wichtigsten Vertreter der synthetischen Phospholipide sind in ihrer Strukturformel (linke Hälfte) sowie als 3D-Kalottenmodell (rechte Hälfte) dargestellt. Zu den ALP zählt das Et-18-OCH₃, die restlichen Verbindungen (HePC, Perifosine und ErPC) zählen zur Klasse des APC. (A) Edelfosine[®] (1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine); (B) Miltefosine[®] (Hexadecylphosphocholin); (C) Perifosin (D-21226, Octadecyl-(1,1-dimethylpiperidinio-4-yl)-phosphat); (D) Erucylphosphocholin.

Der Prototyp und eines der ersten künstlich hergestellten Lipide unter den Alkylphosphocholinen ist das Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosine[®], D-18506, Abb. 1B). Sehr vielversprechende Ergebnisse, die HePC bei chemisch induzierten Mammakarzinomen in Ratten erzielte, veranlassten die Untersuchung des anti-tumoralen Effekts von HePC bei Hautmetastasen in Brustkrebspatientinnen. Brustkrebs ist, vor allem nach wiederholtem Auftreten, nur sehr schwer einzudämmen. Ebenso ist die Handhabung kritisch, da gerade konventionelle Methoden, wie die chirurgische Entfernung des Gewebes und Strahlen- oder systemische Therapien, ihre Grenzen haben. Miltefosine[®] wird hierbei als eine alternative Behandlungsmethode angesehen (Clive *et al.*, 1999). Für den Einsatz in der Therapie wurde HePC in einer Mischung aus kurzkettigen Alkyl-Glycerolen gelöst, weil diese Substanzen die Penetration der Arznei durch biologische Membranen verstärken (Unger *et al.*, 1984). Es zeigte sich, dass diese Art der Behandlung von den Patienten sehr gut toleriert wurde (Unger *et al.*, 1989). Die topische Behandlung von neoplastischem Gewebe ist eine attraktive Methode, zumal die Behandlung auch vom Patienten selbst durchgeführt werden kann und sie zudem keine größeren systemischen Komplikationen mit sich bringt. HePC durchlief bereits Phase I und II der klinischen Studie für die topische Behandlung von Hautmetastasen und metastasierenden Mammakarzinomen bei Brustkrebspatientinnen (Terwogt *et al.*, 1999; Smorenborg *et al.*, 2000) sowie die Phase I für eine orale Formulierung (Unger *et al.*, 1988; Unger *et al.*, 1989; Unger *et al.*, 1990). Pharmakokinetische Studien zeigten, dass die Verteilung von HePC nach der oralen Verabreichung über den gesamten Organismus verläuft. Hohe Absorptionsraten wurden im Magen-Darm-Trakt detektiert. Die höchste Akkumulation erfolgte in der Leber, den Nieren und im Gehirn (Unger *et al.*, 1989). HePC erweist sich *in vitro* als ein Substrat für die Phospholipasen C und D und wird innerhalb von 72 Stunden zu Cholin, Phosphocholin und 1,2-Diacylglycerol-phosphocholin umgebaut. Im Jahre 1992 wurde HePC als Medikament in Deutschland eingeführt.

Einige Zeit später kam es zur Synthese eines neuen Vertreters der APC, dem Perifosin (D-21226, Octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidinio-4-yl)-phosphat, Abb. 1C). Es ist strukturell sehr stark an das HePC angelehnt, allerdings wurde die Cholin-Kopfgruppe mit einem zyklischen aliphatischen Piperidyl-Rest ersetzt. Perifosin erwies sich in vorklinischen Modellen als aktiver und besser verträglich im Vergleich zu HePC (Crul *et al.*, 2002).

Kürzlich wurde ein weiteres, neues APC, das Erucylphosphocholin (ErPC, Abb. 1D) entwickelt. Es ist das erste Derivat der APC-Familie, welches insbesondere für die intravenöse Verabreichung geeignet ist. Dies ist möglich, da durch die ungesättigte Alkyl-Kette, im Gegensatz zu gesättigten APC-Molekülen, eine erhöhte Wasserlöslichkeit erzielt wird (Konstantinov *et al.*, 1999). Eine weitere Besonderheit dieser Substanz ist die auffallend hohe Akkumulation im Gehirn. Sie wird daher als eine mögliche Chemotherapie für maligne Gehirntumore angesehen (Erdlenbruch *et al.*, 1999; Jendrossek *et al.*, 1999). Pharmakokinetische Untersuchungen gesunder und Tumor-

tragender Ratten machten deutlich, dass ErPC die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, somit im Gehirn verstärkt akkumuliert und dabei Konzentrationen erreicht, die *in vitro* für die Zerstörung von humanem Glioblastom multiformer Zelllinien (einer der häufigsten bösartigen Tumore) ausreichend ist (Jendrossek *et al.*, 2002). ErPC erwies sich als eine effektive chemotherapeutische Substanz, die eine stärkere Aktivität gegenüber Krebszellen demonstrierte als HePC.

Synthese neuer APC-Verbindungen

Aufgrund der starken gastrointestinalen Nebeneffekte der bisher synthetisierten APC-Derivate werden immer wieder neue Substanzen mit dem Ziel der geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu bisherigen APC entwickelt. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen einer früheren Arbeit acht enantiomerenreine Strukturen synthetisiert. Diese sind in Abb. 2 zusammenfassend dargestellt (Massing *et al.*, 1994).

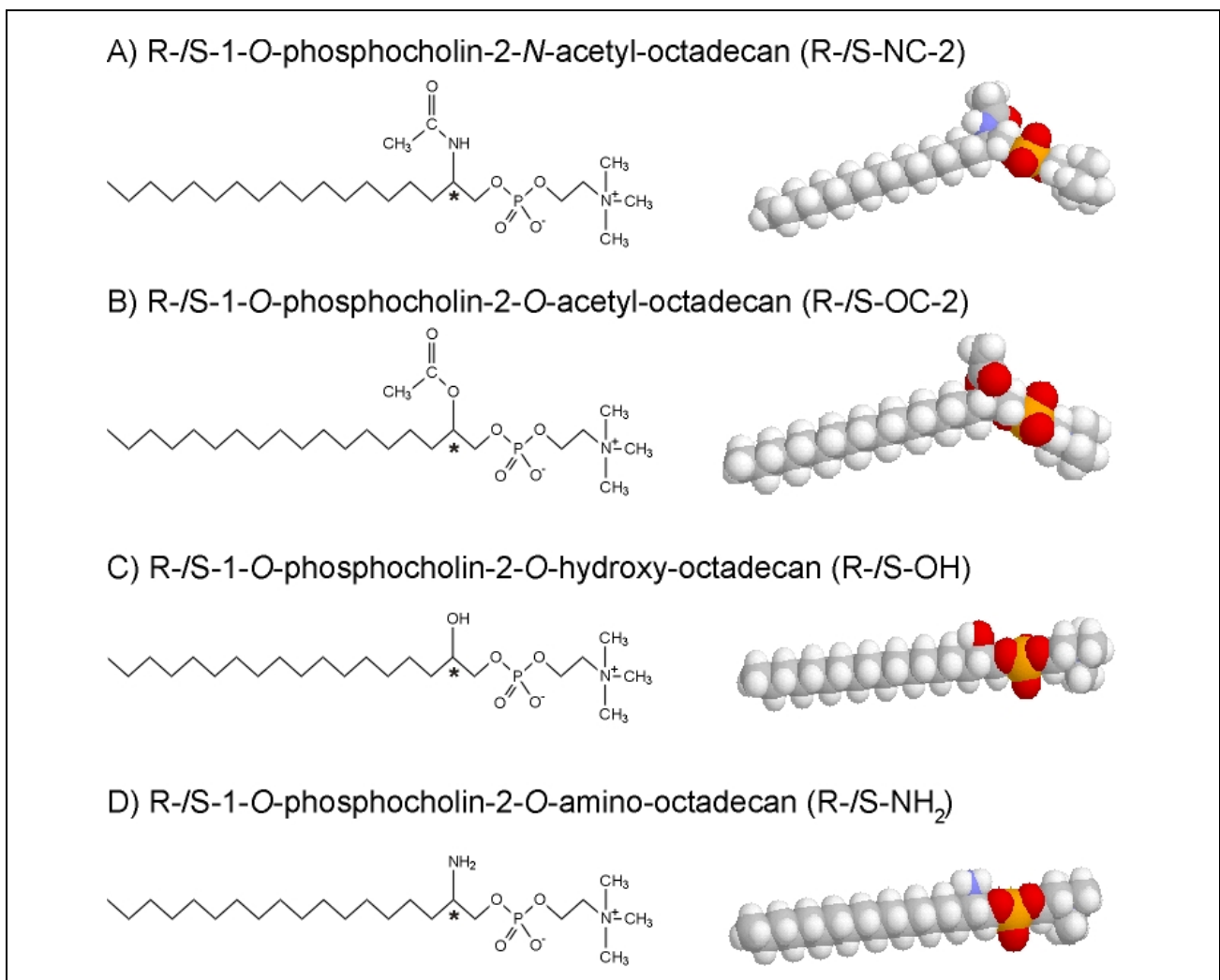


Abb. 2: Strukturen der neuen enantiomerenreinen APC

Die Strukturformeln der neuen Verbindungen sind in der linken Hälfte dargestellt, während das entsprechende 3D-Modell in der rechten Hälfte sichtbar ist. Die Sterne zeigen das Chiralitätszentrum der jeweiligen Struktur. Das in dieser Arbeit verwendete Lipid (S-NC-2) ist in der ersten Reihe dargestellt.

Diese Lipide wurden in der Grundstruktur dem HePC nachempfunden. Durch das Einfügen unterschiedlicher funktioneller Gruppen sollte die anti-neoplastische Eigenschaft dieser Moleküle bei gleichbleibenden oder sogar reduzierten Nebeneffekten erhöht werden. Allerdings bestand das alleinige Synthese-Ziel der neuen Verbindungen nicht nur in der Reduktion der Nebenwirkungen und der Steigerung der anti-neoplastischen Eigenschaften. Durch eine Annäherung an die Struktur des natürlich vorkommenden LPC könnte eventuell auch eine Wechselwirkung der neuen APCs mit zellulären, „lipidabhängigen“ Systemen, wie etwa Rezeptoren, Transportproteinen, Kanälen, Adhäsionsproteinen etc., zustande kommen und dadurch eine spezifischere Aktivität als mit HePC ausgeübt werden. Zusätzlich sollte aufgrund der unterschiedlichen Konfigurationen der Lipide eine Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Ereignissen getätigt werden können. Da die R-Konfiguration die natürlich vorkommende Konfiguration von Molekülen wiedergibt, besteht die Annahme, dass diese Substanzen eher von zellulären Systemen „weiterverarbeitet“ werden. APCs mit S-Konfiguration könnten sich daher durch eine längere Halbwertszeit auszeichnen, zumal sie nur schlecht von Enzymen erkannt werden.

Weitere Einsatzgebiete der APC

ALP scheinen die zytotoxischen Effekte der „klassischen“ Krebstherapie, wie etwa der Strahlentherapie, zu verstärken, indem sie mit verschiedenen Signalwegen in Wechselwirkung treten (Berkovic *et al.*, 1997; Ruiter *et al.*, 1999). Hierbei wurde eine Beteiligung des SAPK/JNK- und des MAPK-Signalwegs beobachtet. Während die SAPK/JNK bei der Apoptose-Induktion von Bedeutung zu sein scheint, beschreibt der MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zellwachstum, sowie der Proliferation, und wirkt somit dem potentiellen Apoptose-Stimulus von SAPK/JNK entgegen. Bisher wurde für drei der synthetischen Phospholipide (HePC, Et-18-OCH₃ und Perifosine) eine hemmende Wirkung des MAPK-Signalwegs mit einer gleichzeitigen Verstärkung der c-Jun Genexpression in Jurkat T Zellen beschrieben. Da c-Jun ein stromabwärts gelegenes Ziel von SAPK/JNK darstellt, könnte dieser Effekt der ALP positiv zur Apoptose-Induktion beitragen. Somit wurde deutlich, dass ALP den MAPK-Signalweg inhibieren, SAPK/JNK aktivieren und somit die durch Strahlentherapie induzierte Apoptose verstärken (Ruiter *et al.*, 1999; Ruiter *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Akt/PKB Signalwegs beobachtet werden, dessen Hemmung ebenfalls mit der Aktivierung von SAPK/JNK einher geht und somit eine neue Möglichkeit repräsentiert, die Apoptose-Induktion auszulösen (Ruiter *et al.*, 2003).

Die potenziellen Einsatzgebiete der APC weiten sich mehr und mehr aus. Auch außerhalb der Krebstherapie weisen sie bemerkenswerte Effekte auf, wie etwa bei der Behandlung parasitärer Erkrankungen. Sehr bedeutende Erfolge wurden mit verschiedenen synthetischen Phospholipiden bei der Behandlung von Leishmaniose, Trypanosomen, *Entamoeba histolytica* und

Acanthamoeba spp. erzielt. Der bekannteste Vertreter unter diesen, sich im Einsatz befindenden APC, ist das Miltefosine® (Konstantinov *et al.*, 1997; Schmidt-Ott *et al.*, 1999; Santa-Rita *et al.*, 2000; Seifert *et al.*, 2001; Walochnik *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 2003; Berman, 2005).

In jüngerer Zeit wurde auch eine Hemmung der Proliferation und Migration humaner Zapfen-Fibroblasten dokumentiert, welche im Zusammenhang der Glaukom-Behandlung eine wichtige Rolle spielt (Eibl *et al.*, 2004).

APC und Apoptose

Obwohl bereits deutlich gezeigt wurde, dass synthetische Phospholipide die Abwehrmechanismen des Wirts gegenüber Tumoren verstärkt, liegt die Hauptaktivität ihrer anti-tumoralen Wirkung in einem direkten Effekt gegenüber Krebszellen. Hierbei spielen die Hemmung der Phosphatidylcholin-Biosynthese sowie die Initiation des programmierten Zelltods eine wichtige Rolle. Auch bei der Apoptose-Induktion konnte eine selektive Wirkung der synthetischen Phospholipide festgestellt werden – entartete Zellen sind empfänglich für die Einleitung des programmierten Zelltodes, während primäre Zellen (normale Knochenmarkszellen, hämatopoetische Vorläuferzellen, periphere Blutlymphozyten und Neutrophile) nicht beeinträchtigt sind. Der molekulare Mechanismus der Apoptose-Induktion setzt sich aus einer selektiven Aufnahme des Lipids in Tumorzellen und der Initiation des Apoptose Programms durch die intrazelluläre Aktivierung des CD95-Todesrezeptors zusammen. Et-18-OCH₃ hat sich als Prototyp zur Untersuchung apoptotischer Prozesse etabliert. Seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften gehen mit einem „Clustering“ und dem „Capping“ des CD95-Rezeptors einher, welches unabhängig von seinem natürlichen Liganden geschieht (Gajate *et al.*, 2000a; Matzke *et al.*, 2001). Auch die Mitochondrien scheinen an der Et-18-OCH₃-induzierten Apoptose beteiligt zu sein, da eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine, wie etwa Bcl-2 und Bcl-x_L den programmierten Zelltod verhindern kann (Mollinedo *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte die Beteiligung apoptotischer Proteasen (Caspasen), vor allem die Aktivierung der Caspase-3, nachgewiesen werden (Gajate *et al.*, 2000b).

Die durch synthetische Phospholipide ausgelöste, von natürlichen Liganden unabhängige Aktivierung der Todesrezeptoren beschreibt einen neuen Wirkungsmechanismus anti-tumoraler Medikamente und einen modernen Weg der gezielten Zerstörung von Tumorzellen in der Krebstherapie. ALP/APC akkumulieren beinahe ausschließlich in Krebszellen und führen diese durch selektive Zerstörung in den programmierten Zelltod. Hierbei erfolgt ein Recycling der betroffenen Zelle, ohne dass weitreichende Kollateralschäden verursacht werden. Diese grundlegende Erkenntnis kann als interessanter Grundbaustein für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente dienen (Gajate *et al.*, 2002).

2.2 Apoptose – die regulierte Zerstörung der Zelle

Der programmierte Zelltod (Apoptose) beschreibt einen komplizierten Prozess, schließlich darf die Entscheidung zu sterben, nicht leichtfertig getroffen werden. Eine Vielzahl von Genen beeinflusst die Zelle in ihrer Wahl, zu Grunde zu gehen oder weiter zu leben. Neigt sich die Waage in Richtung Tod kommt es zur koordinierten Aktivierung und Ausführung verschiedener Unterprogramme, welche die tödliche Mission leiten.

Geschichte der Apoptose

Die Apoptose repräsentiert einen essentiellen physiologischen Vorgang, welcher sowohl bei der Gewebshomöostase im erwachsenen Organismus, als auch bei Entwicklungsvorgängen oder der Immunantwort eine wichtige Rolle spielt (Hengartner, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001).

Das Phänomen der Apoptose wurde erstmals 1842 von C. Vogt (Vogt, 1842) beschrieben. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde die Apoptose von einer Anzahl Entwicklungsbiologen und Zytologen entdeckt und wieder entdeckt, und erhielt dadurch viele Namen. Die Bezeichnung Apoptose, welche sich nun endgültig durchgesetzt hat, wurde von der Gruppe um Currie und Kerr im Jahre 1972 (Kerr *et al.*, 1972) geprägt. Das Wort Apoptose leitet sich aus dem Griechischen ab (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung) und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst.

In früheren Zeiten wurden die Anzeichen des apoptotischen Zelltodes durch rein morphologische Charakteristika wie das „Blebben“ der Membran, Chromatin-Kondensation oder die Fragmentierung der Zelle in sog. „apoptotische Körperchen“ beschrieben, jedoch hat sich das molekulare Verständnis der Apoptose in den vergangenen Jahren hochgradig verbessert. Mittlerweile sorgen biochemische Marker für Ersatz und somit wird nun der Verlauf der Apoptose als eine Kaskade von Protease- und Endonuklease-Aktivierungen beschrieben, welche spezifische Substrate schneiden und somit zu den modernen „Gold-Standards“ der neuen Zeit zählen (McGill *et al.*, 1997).

Vom Fadenwurm zum Säuger

Der Fadenwurm *C. elegans* repräsentiert das Standard-Studienobjekt der Apoptose. Durch die charakteristische Beseitigung von genau 131 Zellen durch Apoptose während seiner Embryonalentwicklung erwies sich *C. elegans* als ein geeignetes Studienobjekt, um die Schlüssel-Signalwege des apoptotischen Zelltodes genauer zu studieren. Auf der Suche nach dem zugrundeliegenden genetischen Mechanismus entdeckten Forscher eine Anzahl von Todesgenen und bezeichneten diese als CED (*C. elegans death genes*). Eine Reihe von Studien demonstrierten, dass Mutationen im CED-9 Genprodukt die Apoptose der 131 Zellen während der Entwicklungsphase beeinträchtigten. Im Verlauf der detaillierten Untersuchung des apoptotischen

Signalweges von *C. elegans* kam es zur Entdeckung von weiteren CED-Genen, von welchen sich CED-3 und CED-4 als die wichtigsten in der Apoptose-Regulierung der Vertebraten erwiesen (siehe Abb. 3). Wechselwirkungen zwischen CED-3 und CED-4 führen zur proteolytischen Aktivierung von CED-3. Diese Aktivierung kann jedoch durch eine Interaktion zwischen CED-4 und CED-9 verhindert und die Auslösung des programmierten Zelltods gehemmt werden. EGL-1 kann unterdessen CED-9 komplexieren und dadurch dessen anti-apoptotische Funktion unterbinden. Auf der Suche nach homologen Proteinen in Säugern zeigte sich, dass die Caspase der höheren Vertebraten dem CED-3 Gen von *C. elegans* entsprechen. Weiterhin erwies sich CED-4 homolog zum humanen Apaf-1, Egl-1 zu Bid, Bad und Noxa, sowie CED-9 zu Bcl-2 (siehe Abb. 3). Die Studien an *C. elegans* erbrachten ein vereinfachtes Modell des Apoptose-Signalwegs, welcher sich zu einem hoch komplexen Apoptose-Modell in Vertebraten entwickelte (Belka *et al.*, 2002; Penninger *et al.*, 2003). Im Jahre 2002 wurde für die Entschlüsselung des apoptotischen Signalwegs in *C. elegans* der Nobelpreis an Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston verliehen.

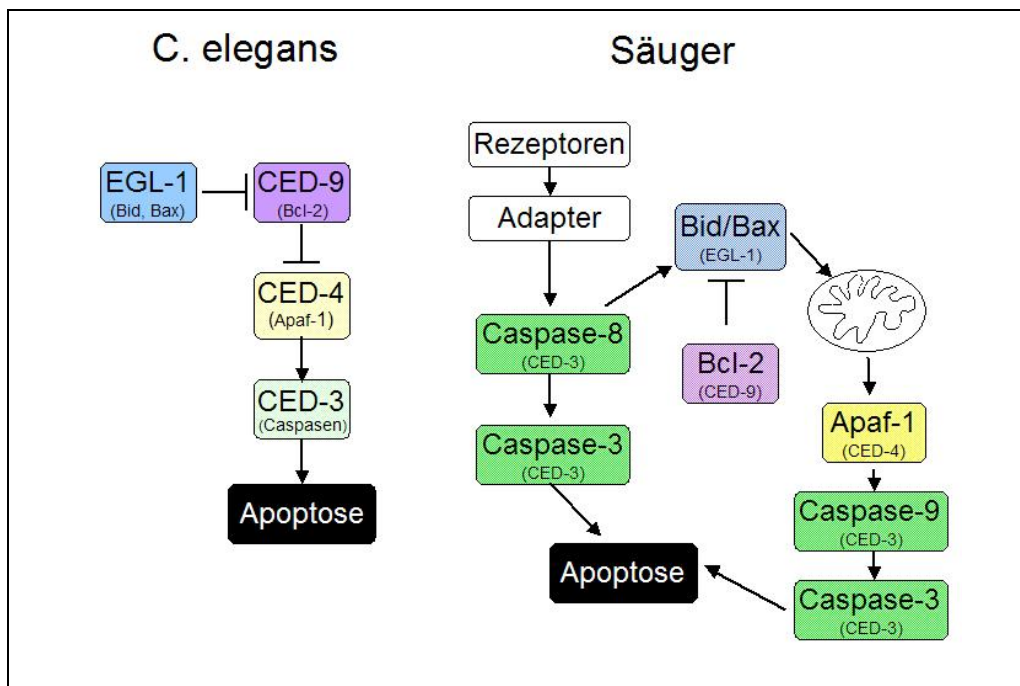


Abb. 3: C. elegans als Modellsystem des apoptotischen Signalwegs

Darstellung eines vereinfachten Apoptose-Netzwerks des Nematoden *C. elegans* mit den korrespondierenden Analoga höherer Vertebraten (verändert nach Belka *et al.*, 2002).

Apoptose vs. Nekrose

Allgemein kann zwischen zwei Arten des Zelltodes unterschieden werden. Zum einen gibt es den hoch regulierten programmierten Zelltod, welcher mit der aktiven Bereitstellung von Energie und endogenen Enzymen einher geht. Auf der anderen Seite kann auch der „passive“ Zelltod erfolgen,

welcher als Nekrose bezeichnet wird. Der nekrotische Zelltod erfolgt oft auf starke Umwelttraumata, wie etwa Vergiftungen, Sauerstoffmangel, Strahlung, Verletzungen oder zu hohe Temperaturen. Diese negativen Einflüsse haben häufig eine starke Anschwellung des Gewebes bzw. der Zellen zur Folge, was zur irreversiblen Schädigung der Plasmamembran, Organellen sowie des Chromatins führt. Die Zelle platzt am Ende auf und leert ihren Inhalt in das umgebende Gewebe (siehe Abb. 4, rechte Hälfte). Substanzen im Zytoplasma locken Fresszellen des Organismus an und rufen dadurch entzündliche Reaktionen hervor, welche ebenso das umgebende Gewebe betreffen.

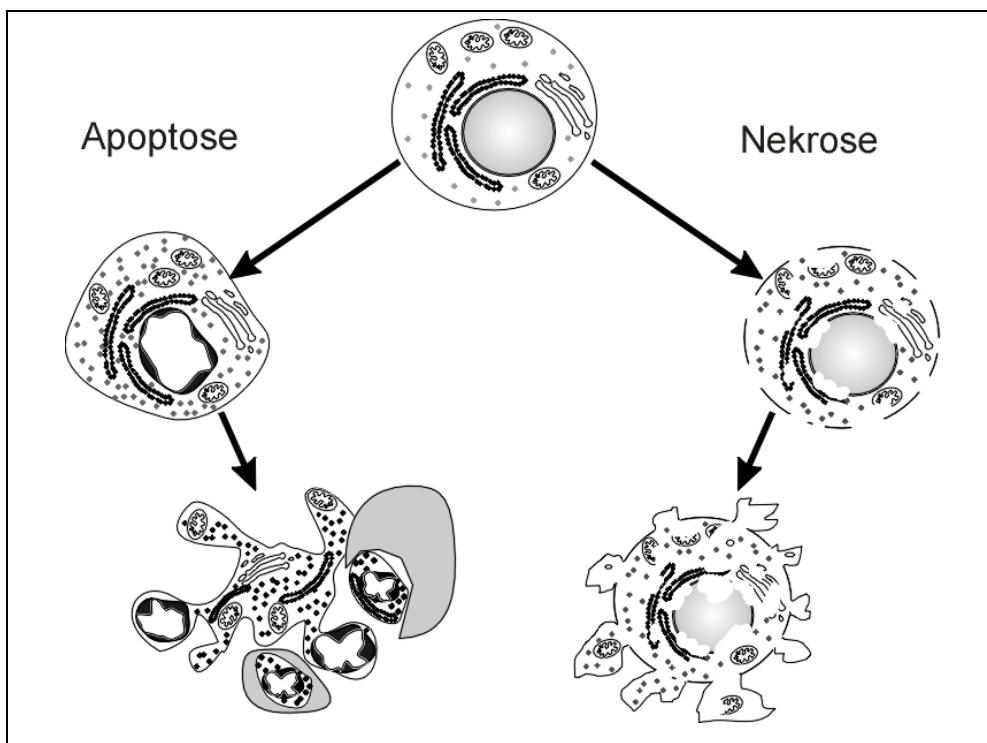


Abb. 4: Schematische Darstellung des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes

Die Apoptose beschreibt den kontrollierten Abbau der Zelle (siehe linke Hälfte der Abbildung). Hierbei schrumpft die Zelle, deren Inhalt zerstückelt und vorsichtig verpackt wird, um anschließend von den umgebenden Zellen bzw. Makrophagen (in hellgrau dargestellt) aufgenommen und recycelt zu werden. Im Gegensatz dazu steht der nekrotische Zelltod (siehe rechte Hälfte der Abbildung). Hierbei schwillt die Zelle bis zum Platzen an, sie leert ihren Inhalt in die Umgebung und fördert somit Entzündungsprozesse im betroffenen Gewebe.

Der „aktive“ apoptotische Zelltod ist durch spezifische morphologische Veränderungen charakterisiert (Abb. 4, linke Hälfte). Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und die genomische DNA wird in Fragmente spezifischer Größe zerlegt. Allerdings bleiben die Organellen sowie die umgebende Plasmamembran intakt. Die Auflösung der Zelle erfolgt mit der Verpackung des Zellinhaltes in sog. „apoptotische Körperchen“, welche im Organismus von umliegenden Zellen bzw. Makrophagen aufgenommen, verdaut und recycelt werden. Es kommt zu keiner entzündlichen Reaktion, da dieser Zelltod keinerlei Spuren hinterlässt.

2.3 Todesrezeptoren – die Initiatoren des Zelltods

Der programmierte Zelltod ist eine einheitliche Eigenschaft multizellulärer Organismen. Als Auslöser gelten eine Anzahl von Faktoren, wie etwa UV- oder γ -Strahlung, chemotherapeutische Substanzen oder die Aktivierung von Todesrezeptoren. Todesrezeptoren detektieren extrazelluläre Todessignale und leiten daraufhin die Aktivierung der zellulären intrinsischen Apoptose-Maschinerie ein (Ashkenazi *et al.*, 1998; Lavrik *et al.*, 2005a).

Die Familienmitglieder der Todesrezeptoren

Todesrezeptoren gehören zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Superfamilie, welche durch cysteinreiche extrazelluläre Domänen charakterisiert sind (Ashkenazi *et al.*, 1998). Bis heute wurden acht Mitglieder dieser Familie beschrieben (Lavrik *et al.*, 2005a):

- TNF-R1 (DR1, CD120a, p55, p60)
- CD95 (DR2, APO-1, Fas)
- DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1)
- TRAIL-R1 (DR4, APO-2)
- TRAIL-R2 (DR5, KILLER, TRICK2)
- DR6
- Ectosyplasin A Rezeptor (EDAR)
- Nerven-Wachstums-Faktor-Rezeptor (NGFR)

Da Todesrezeptoren weder katalytische Kinase- noch Phosphatasedomänen besitzen, erfolgt die Signalweiterleitung über Adapterproteine. Hierfür ist die TNFR-Familie mit einer 80 Aminosäuren großen Todesdomäne (DD; **death domain**) in der zytoplasmatischen Region ausgestattet, welche als Rekrutierungsfläche für bestimmte Proteine dient. Eines dieser Proteine ist FADD (**fas associated death domain**). Wird der Rezeptor aktiviert, so folgt die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes an der Plasmamembran.

Der am besten charakterisierte Rezeptor dieser Familie ist der CD95-Todesrezeptor, dessen Hauptfunktion in der Einleitung der extrinsischen Apoptose besteht (Peter *et al.*, 2003). Das Protein hat eine Größe von 317-319 Aminosäuren und gehört zu den Typ I Transmembran-Glykoproteinen, ausgestattet mit den für diese Familie typischen drei extrazellulären cysteinreichen Domänen (Siegel *et al.*, 2000a; Siegel *et al.*, 2000b). Der CD95-Rezeptor wird an der Oberfläche von Zellen als vorvereinigt Homotrimer exprimiert, wahrscheinlich hervorgerufen durch die Interaktion einer Domäne im N-Terminus. Obwohl die genaue molekulare Funktion noch unbekannt ist, konnte die physiologische Wichtigkeit dieser Vorvereinigung deutlich gezeigt werden, da Mutationen in dieser Region zu autoimmunen Störungen, wie etwa dem Autoimmun-Lymphproliferativen Syndrom führte. Zur Aktivierung sowie für die Signalweiterleitung lagern sich

diese Rezeptoren zu sog. Superaggregaten zusammen. Der genaue Mechanismus der Rezeptoraktivierung bleibt jedoch auch gegenwärtig noch ein wichtiger Bestandteil der Forschung (Siegel *et al.*, 2000a; Peter *et al.*, 2003).

Der CD95- und die TRAIL-Rezeptoren

Erfolgt eine Aktivierung von CD95, TRAIL-R1 bzw. TRAIL-R2, so kommt es zur Ausbildung eines großen Proteinkomplexes an der Plasmamembran, dem sog. DISC (*death inducing signaling complex*, Abb. 5). Dies beinhaltet die Rekrutierung des Adapterproteins FADD an die Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) des Rezeptors, gefolgt von zwei Isoformen der Caspase-8 (Pro-Caspase-8/a und Pro-Caspase-8/b) sowie der Pro-Caspase-10 (Scaffidi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Hierbei interagiert die Todesdomäne (DD, *death domain*) des Rezeptors mit der DD von FADD, während die Todeseffektordomäne von FADD mit den DEDs der Pro-Caspasen in Wechselwirkung tritt.

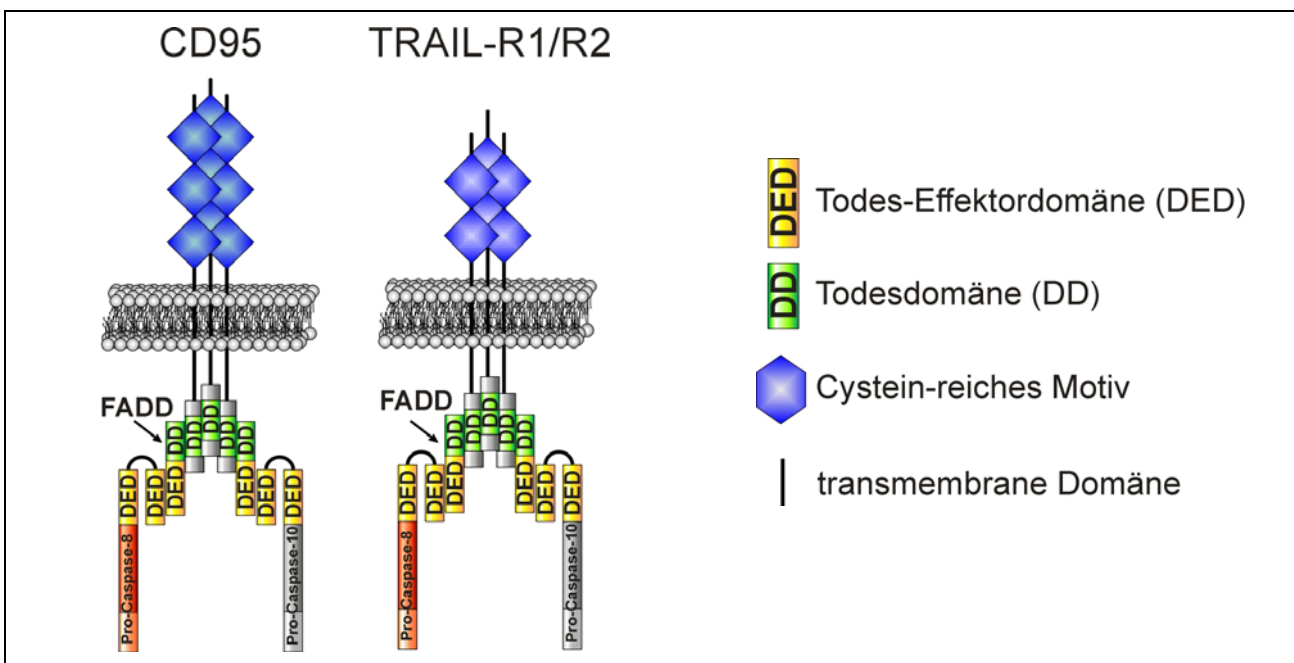


Abb. 5: Schematische Darstellung des DISC der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R1/R2

Die Aktivierung der Todesrezeptoren an der Plasmamembran beinhaltet die Zusammenlagerung verschiedener Proteine zu einem großen Komplex. Hierbei wird das Adapter-Protein FADD an die Todesdomäne des Rezeptors gebunden, was zur Anlagerung von Pro-Caspasen führt. Aufgrund der räumlich hohen Konzentration der Pro-Caspasen kommt es zur auto-proteolytischen Spaltung der Proteasen und somit zur Initiierung der Apoptose (verändert nach Lavrik *et al.*, 2005a).

Die weitere Aktivierung der Caspasen ist auf das sog. „Induced Proximity“-Modell zurückzuführen. Dieses Modell beschreibt einen in mehreren Schritten vollzogenen Spaltungsprozess, welcher eine Selbstaktivierung dieser Proteasen aufgrund ihrer lokalen hohen Konzentration initiiert. Am Ende steht die aktive Caspase-8, ein Heterotetramer, welches sich aus zwei großen (p18) und zwei

kleinen Untereinheiten (p10) zusammensetzt. Diese aktive Protease wird nun aus dem Komplex freigesetzt und trägt das Apoptose-Signal ins Innere der Zelle weiter. Caspase-10 wird ebenfalls am DISC aktiviert, aber ob sie unabhängig von Caspase-8 das Apoptose-Signal weiterleiten kann, wird bis heute noch intensiv diskutiert - ihre Rolle ist bislang noch schwer zu definieren (Salvesen *et al.*, 1999; Sprick *et al.*, 2000; Bodmer *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2001; Sprick *et al.*, 2002; Lavrik *et al.*, 2003).

2.4 Caspasen – die zentrale ausführende Gewalt

Als Vollstrecker der Apoptose kommen Caspasen (**C**ystein-abhängige **A**spartat-spezifische **P**roteasen) in beinahe jeder Zelle vor, um auf Kommando eines extrinsischen bzw. intrinsischen Signals den zellulären Selbstmord einzuleiten.

Da eine Vielfalt von Beweisen auf die essentielle Rolle der Apoptose in der tierischen Entwicklung hindeutet, ist es nicht verwunderlich, dass Caspasen in beinahe jedem vielzelligen Organismus, d. h. von dem wohlbekanntem Nematoden *C. elegans* über Athropoden bis hin zu phylogenetisch sehr alten Gruppen, wie etwa den Cnidarien, gefunden werden (Cikala *et al.*, 1999). Die strukturellen und biochemischen Gemeinsamkeiten unter den Caspasen der verschiedenen Phyla demonstrieren deutlich die Wichtigkeit dieser Enzyme, sowie die Bedeutung des Zelltodes an sich, als einen grundlegenden biologischen Prozess (Boyce *et al.*, 2004).

Im Jahre 1993 entdeckten Forscher eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen CED-3, das Produkt eines Todesgens von *C. elegans* und dem Interleukin-1 β -converting Enzym (ICE oder Caspase-1) einer tierischen Protease, die für die Reifung von pro-Interleukin-1 β verantwortlich ist (Cerretti *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Dies war der Zeitpunkt, an dem die Verbindung zwischen den Caspasen und der Apoptose aufgezeigt werden konnte (Thornberry *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1999). Obwohl die Caspase-1 keine offensichtliche Rolle bei der Apoptose spielt, repräsentiert sie das erste identifizierte Mitglied einer großen Familie von Proteasen, deren Angehörige bestimmte Aufgaben sowohl bei Entzündungsreaktionen (Inflammation), als auch beim programmierten Zelltod erfüllen. Caspasen dienen bei der Apoptose zum einen dem Abbau der Zelle (Effektor-Caspase), zum anderen als Initiatoren dieses Abbaus (Initiator-Caspasen) und werden als Antwort auf pro-apoptische Signale aktiviert. Bis heute wurden 14 Caspasen identifiziert und mit verschiedenen Aspekten des Zelltodes in Zusammenhang gebracht (zur Übersicht siehe Abb. 6). Die genauen Funktionen jeder einzelnen Caspase sind allerdings noch weitgehend unbekannt (Los *et al.*, 2001).

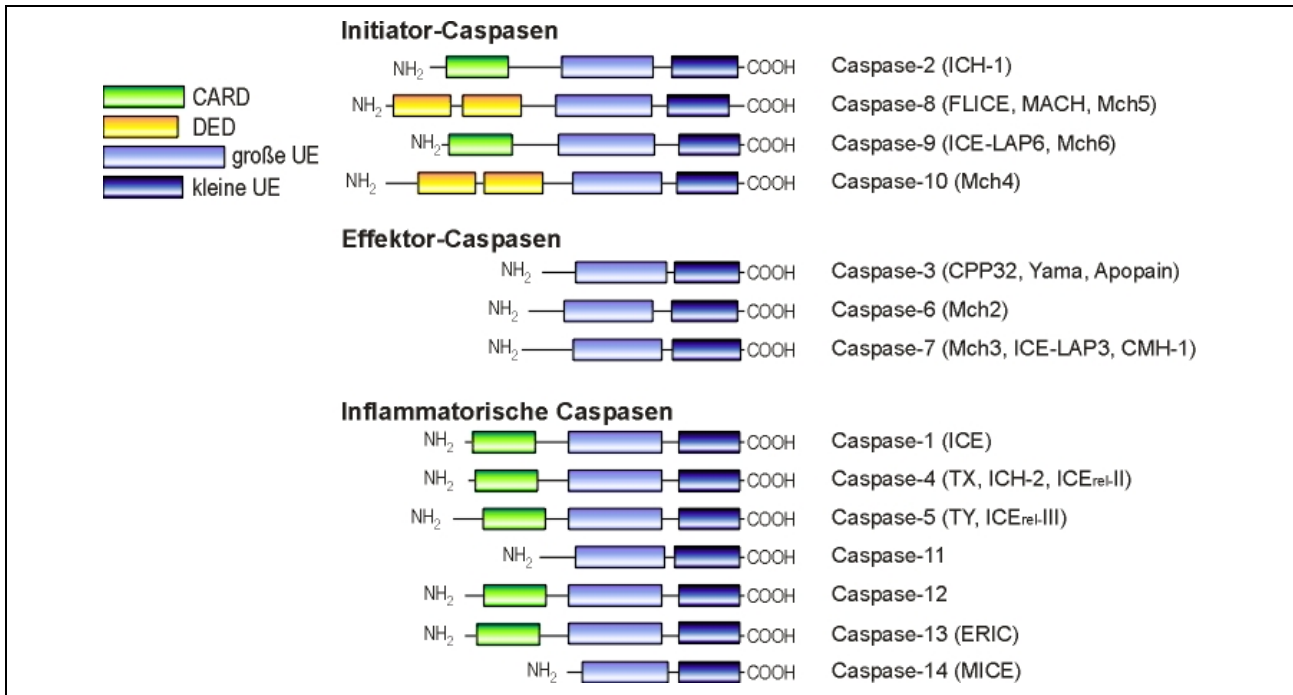


Abb. 6: Schematische Darstellung der Caspase-Familie

Die 14 beschriebenen Caspasen können aufgrund ihrer Funktion in drei Gruppen untergliedert werden: Initiator-, Effektor- und Inflammatorische-Caspasen. Der charakteristische Aufbau aus großer und kleiner Untereinheit sowie zusätzlichen Domänen (CARD, DED) ist in der Abbildung wiedergegeben (verändert nach Lavrik *et al.*, 2005b). CARD: *caspase recruitment domain*; DED: *death effector domain*; UE: Untereinheit

Der Mechanismus der Caspase-Aktivierung und Substratspaltung

Caspasen besitzen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität. Dies konnte aufgrund von Sequenz- und Röntgenstrukturanalysen demonstriert werden. Sie liegen als 30-50 kDa große Proenzyme in der Zelle vor und sind aus drei Domänen aufgebaut: einer NH₂-terminale Pro-Domäne, einer großen (~20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (~10 kDa, siehe Abb. 7A). Eine Aspartat-Schnittstelle trennt die Pro-Domäne von der großen Untereinheit. Die Verbindung zwischen den beiden anderen Domänen enthält ein bis zwei Aspartat-Schnittstellen, welche die große von der kleinen Untereinheit trennen (Wolf *et al.*, 1999). Bislang wurden drei Möglichkeiten der Caspase-Aktivierung beschrieben, die ebenfalls in Abb. 7 zusammenfassend dargestellt sind:

- Die proteolytische Spaltung durch übergeordnete Caspasen - diese Aktivierung erfolgt meist in der Caspase-Kaskade.
- Autoaktivierung durch das „*induced proximity*“ Modell - eine Methode die vor allem bei Rezeptor-aktivierten Caspasen von Bedeutung ist.
- Aktivierung durch Komplexbildung – ein Vorgang der bei der Aktivierung von Caspase-9 beobachtet wurde.

Eine Caspase-Aktivierung erfolgt durch die proteolytische Spaltung der Domänenverbindungen und resultiert üblicherweise in der Entfernung der Pro-Domäne, gefolgt von der

Zusammenlagerung einer großen und einer kleinen Untereinheit, die jeweils ein Heterodimer bilden. Aktive Caspasen arbeiten in Form eines Tetramers, welches aus zwei Heterodimeren besteht. Jede aktive Stelle bindet ein negativ geladenes Aspartat des Substrats. Diese Bindungsstelle ist hoch konserviert, daher schneiden alle Caspasen ausschließlich nach einem Aspartatrest. Die Erkennung von mindestens vier weiteren Aminosäuren links der Schnittstelle ist ebenfalls eine notwendige Anforderung und unerlässlich für eine effektive Katalyse des Substrats (Garcia-Calvo *et al.*, 1998; Thornberry *et al.*, 1998). Aufgrund der Vorlieben ihrer Schnittstellen können Caspasen in drei große Gruppen eingeteilt werden. Gruppe I (Caspase-1, -4 und -5) bevorzugt die Sequenz WHED, schneidet aber ihre Substrate im Vergleich zu anderen Caspasen eher wahllos. Das optimale Erkennungsmotiv der Gruppe II (Caspase-2, -3 und -7) ist DEXD. Diese Enzyme sind hoch selektiv mit einer beinahe ausnahmslosen Spezifität für Aspartat. Gruppe III (Caspase-6, -8, -9 und -10) bevorzugt die Sequenz (LV)EXD. Weiterhin können Gruppe-I-Caspasen als Vermittler von Entzündungen angesehen werden, während Gruppe II und III wichtige Rollen als Effektoren (Gruppe II) und Initiatoren (Gruppe III) bei der Apoptose spielen (Garcia-Calvo *et al.*, 1998).

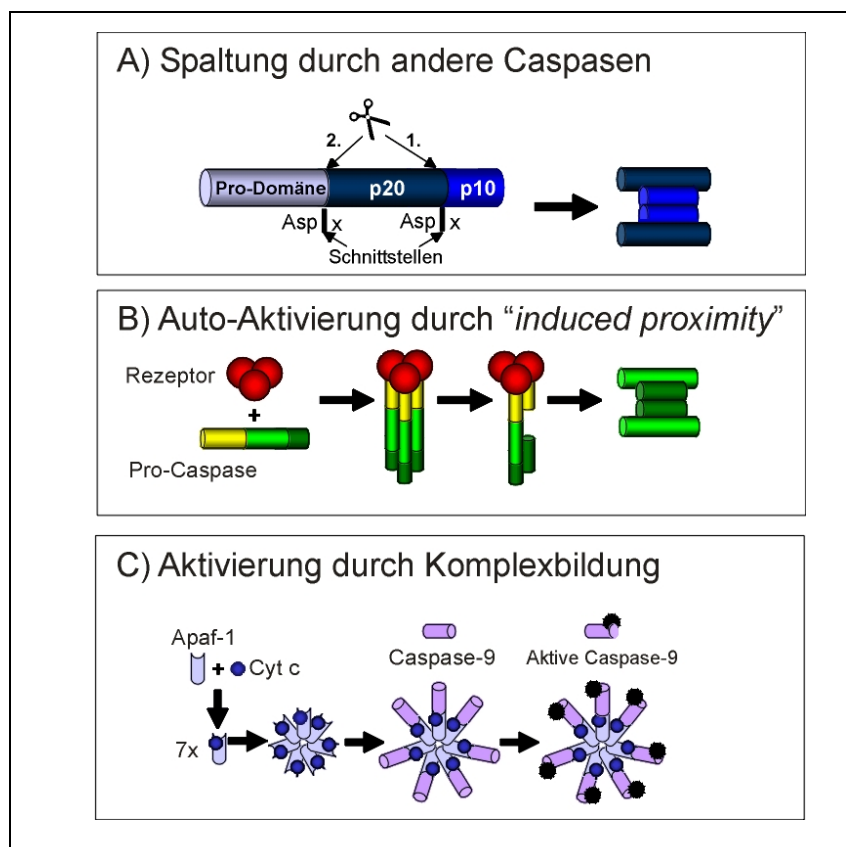


Abb. 7: Darstellung der möglichen Mechanismen der Caspase-Aktivierung

Bis heute werden drei unterschiedliche Mechanismen der Caspase-Aktivierung beschrieben. Zum einen die proteolytische Spaltung von Caspasen innerhalb der Caspase-Kaskade (A), die Auto-Aktivierung am Rezeptor, wo aufgrund der starken räumlichen Konzentration der Pro-Caspasen sich diese selbst aktivieren können (B) und zuletzt die Aktivierung durch Komplexbildung (C), wie es bereits für die intrinsische Initiator-Caspase-9 beschrieben wurde (verändert nach Hengartner, 2000).

2.5 **Das Mitochondrium – eine zentrale Schaltstelle der Apoptose**

Intrazelluläre Organellen repräsentieren sich als wichtige Teilnehmer in der Apoptose. Hierbei sind die Mitochondrien am besten dokumentiert. Die mannigfaltigen Aspekte der mitochondrialen Beteiligung am apoptotischen Signalweg in der Zelle beinhalten zwei wichtige Ereignisse: zum einen die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c, welche unter normalen Umständen sicher im Intermembranraum verwahrt werden, zum anderen den Beginn multipler Parameter der mitochondrialen Dysfunktion (Scorrano *et al.*, 2003a).

Das Wissen um den programmierten Zelltod hat sich in den letzten Jahren mit der Entdeckung von „zellulären Todesgenen“ drastisch erhöht. Diese Gene kodieren pro- und anti-apoptotische Proteine, welche die Initiation sowie die Ausführung des Zelltodes regulieren. Zusätzlich zur Rezeptor-vermittelten Apoptose, bei der die Todessignale durch extrazelluläre Liganden direkt auf Caspasen übertragen werden, führt auch die Freisetzung mitochondrialer Proteine aus dem Intermembranraum zum programmierten Zelltod. Ein entscheidender Schritt zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Apoptose wurde von der Gruppe um Xiadong Wang erbracht. Sie konnte beobachten, dass mitochondriale Faktoren zur Aktivierung von Caspasen als auch zur nachfolgenden internukleosomalen DNA-Degradierung beitragen (Li *et al.*, 1997).

Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien bestehen aus einer äußeren Membran, die für Moleküle bis zu einer Größe von ~1.5 kDa permeabel ist, und einer inneren impermeablen Membran (siehe Abb. 8). Die Integrität der inneren Mitochondrienmembran ist entscheidend für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Potentials ($\Delta\Psi_m$), das für die oxidative Phosphorylierung und somit für die Synthese von ATP benötigt wird. Wie in Abb. 8 dargestellt, teilen die beiden Membranen das Mitochondrium in zwei submitochondriale Kompartimente: der Intermembranraum (IMR), welcher sich zwischen den beiden Membranen befindet, und das innere Kompartiment, die Mitochondrienmatrix. Der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC), eines der am häufigsten vorkommenden Proteine, macht die äußere Membran für Moleküle bis zu einer Größe von < 5 kDa durchlässig, was einen freien Austausch der Substrate der Atmungskette gewährleistet (Crompton, 1999). Ein wichtiger Bestandteil der inneren Membran ist Cardiolipin, ein Lipid welches für die Impermeabilität der Membran verantwortlich ist (Kroemer *et al.*, 2000; Van Gurp *et al.*, 2003).

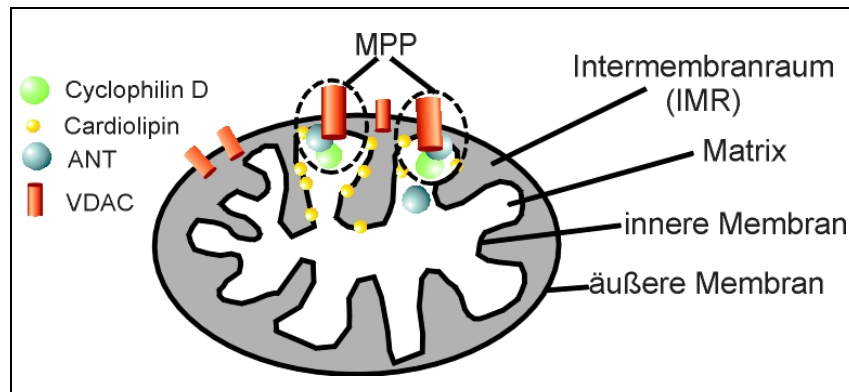


Abb. 8: Aufbau des Mitochondriums

Das Mitochondrium gliedert sich in zwei Kompartimente: die Matrix sowie den Intermembranraum. Diese Räume sind durch die äußere und die innere mitochondriale Membran voneinander getrennt. Weiterhin befinden sich unterschiedliche Proteine in den Membranen. Der VDAC kann mit ANT sowie Cyclophilin D eine sog. mitochondriale Permeabilitätspore (MPP) bilden, welche zur Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum führen kann. ANT: Adenin-Nukleotid-Austauscher, *adenine nucleotide exchanger*; VDAC: spannungsabhängige Anionenkanal, *voltage dependent anion channel*.

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien besteht in der ATP-Produktion. Ein bedeutender Teilnehmer dieses Vorgangs ist das (Holo)Cytochrom c, welches erstmals im Jahre 1925 von Keilin beschrieben wurde (Keilin, 1925). Dieses Protein besitzt eine sehr wichtige Rolle als Elektronenshuttle zwischen Komplex III (Cytochrom c Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) während der oxidativen Phosphorylierung. In den 90ern Jahren wurde jedoch klar, dass Cytochrom c noch eine weitere Rolle spielt: beim programmierten Zelltod. Normalerweise befindet sich das Cytochrom c im IMR des Mitochondriums, wo es durch eine Interaktion mit Cardiolipin an der inneren Mitochondrienmembran gebunden vorliegt (Iverson *et al.*, 2004). Erhält die Zelle einem apoptotischen Stimulus, wird dieses Protein freigesetzt und initiiert die Bildung des Apoptosoms und somit die Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9. Die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem IMR geht meist mit dem Verlust des Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) einher.

Die mitochondriale Beteiligung an apoptotischen Prozessen

Eine Freisetzung mitochondrialer Proteine kann durch die sog. Permeabilitätspore erfolgen (MPP, siehe Abb. 8). Allerdings beschreibt dies nur eine Möglichkeit von vielen. Bei dieser Pore handelt es sich um einen transmembranen Kanal, der sich an Kontaktstellen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran ausbilden kann. Die Hauptkomponenten der Pore sind der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC, *voltage dependent anion channel*), welcher die äußere mitochondriale Membran durchspannt, sowie der Adenin-Nukleotid-Austauscher (ANT, *adenine nucleotide exchanger*) und Cyclophilin D, beides Proteine der inneren Mitochondrienmembran. Wird diese Pore aktiviert, kommt es zu einer Störung der Permeabilitätsbarriere und zur Unterbrechung der normalen mitochondrialen Aktivität. Unter diesen Umständen können Elektronen der Elektronentransportkette, wie auch Proteine des IMR

entkommen. Es erfolgt somit die Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Van Gurp *et al.*, 2003).

Im besonderen wurde die Freisetzung verschiedener apoptogener Proteine, wie etwa der Apoptose-induzierende Faktor (AIF), Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, Endonuklease G (Endo G), Pro-Caspasen und Cytochrom c (Li *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1999; Goldstein *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001) während der frühen Phase des programmierten Zelltodes beobachtet (siehe Abb. 9). Diese Proteine liegen normalerweise in gesunden Zellen sicher verschlossen im IMR vor, werden aber unter apoptotischen Bedingungen freigesetzt (Wolf *et al.*, 2002b). Einmal im Zytosol interagiert z. B. Cytochrom c mit seinem Adapter Apaf-1 und induziert somit im Beisein von dATP die Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9 (siehe Abb. 7C & Abb. 9). Caspase-9 kann nun wiederum weitere Effektor-Caspasen aktivieren, wie etwa Caspase-3, -6 und -7. Die Freisetzung von Cytochrom c wird daher als Schlüsselschritt im apoptotischen Prozess angesehen, obwohl der genaue Mechanismus, der zur Freisetzung dieses Proteins führt, noch weitgehend unbekannt ist (Robertson *et al.*, 2002b).

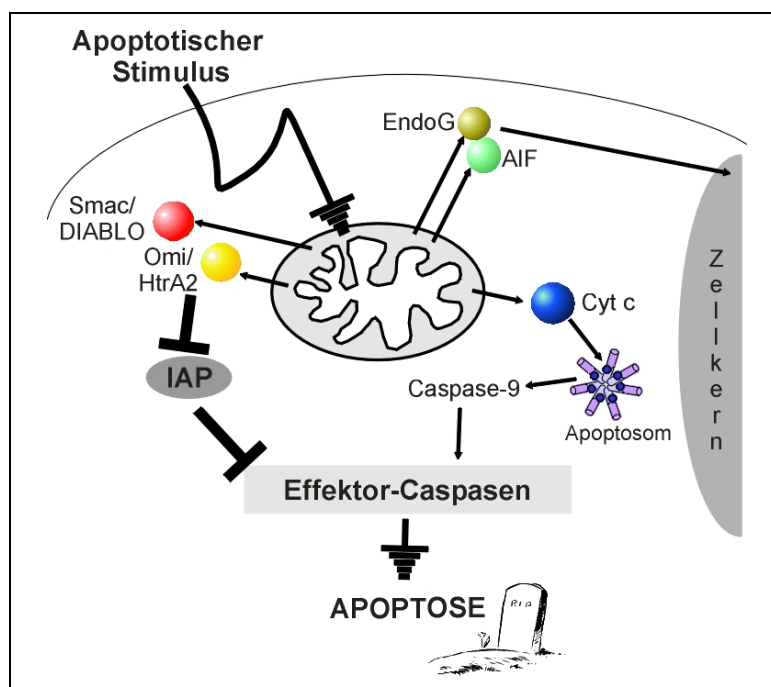


Abb. 9: Zusammenfassung der pro-apoptotischen, mitochondrialen Proteine

Unterschiedliche apoptotische Stimuli können zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum führen. Hierbei führt die Freisetzung von Cytochrom c über die Bildung des Apoptosoms zur Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9. AIF und Endo G wandern nach ihrer Freisetzung in den Zellkern und sind wahrscheinlich am Abbau der zellulären DNA beteiligt. Smac/DIABLO sowie HtrA2/Omi tragen indirekt zur Caspase-Aktivierung bei, indem sie Inhibitoren apoptotischer Proteine (IAPs) binden

Cytochrom c ist somit direkt in den apoptotischen Ablauf der Zelle integriert, während Smac/DIABLO und HtrA2/Omi indirekt die Caspase-Aktivierung fördern, indem sie Proteine der IAP-Familie, das sind Caspase-Inhibitoren, hemmen (Tsujimoto, 2003). Zellen besitzen bestimmte

Proteine, die als Inhibitoren der apoptotischen Proteine (IAP) fungieren. Ihre Aufgabe besteht zum einen in der Hemmung von Pro-Caspasen und zum anderen in der „Kontrolle“ der Aktivität reifer Caspasen, da diese Proteasen nur nach einem apoptotischen Stimulus und nicht durch zufällige Faktoren ihre tödliche Wirkung entfalten sollen. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi agieren als Dimere und befreien die aktiven Caspasen von IAP-Proteinen. Bei diesem Prozess sind sie in der Lage, verschiedene Mitglieder der IAP-Familie zu binden und vereiteln somit ihre Caspase-inhibitorischen Eigenschaften.

Weitere apoptogene Faktoren, wie etwa AIF oder EndoG, können ebenfalls nach einem apoptotischen Stimulus ins Zytosol freigesetzt werden. Es wurde beschrieben, dass diese Proteine daraufhin in den Zellkern einwandern und wahrscheinlich am Abbau der zellulären DNA beteiligt sind (Gurbuxani *et al.*, 2003).

Da die Größe dieser Faktoren die Permeabilitätsbarriere normaler Mitochondrien weit überschreitet, müssen die Membranen dieser Organellen zuvor permeabilisiert werden. Hierbei kann zwischen der apoptotischen Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Proteinen des Intermembranraums führt, und der inneren Mitochondrienmembran unterschieden werden. Letztere ist selektiv und resultiert nicht in einem massiven Ausstrom der Matrix-Proteine, ist allerdings durch den Verlust des mitochondrialen Potenzials ($\Delta\psi_m$) charakterisiert (Kroemer *et al.*, 2000).

Die Regulatoren der mitochondrialen Beteiligung: die Bcl-2 Familie

Die Freisetzung der todbringenden Moleküle aus dem mitochondrialen IMR wird streng durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie kontrolliert (siehe Abb. 9), welche ihre Funktion hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, an der äußeren Membran der Mitochondrien ausüben (Scorrano *et al.*, 2003a; Terrones *et al.*, 2004). Die Mitglieder dieser Familie besitzen charakteristische α -Helices mit bis zu vier konservierten Regionen, die sog. Bcl-2 Homologie-Domänen (BH). Diese können entweder pro- oder anti-apoptotische Funktionen ausüben. Basierend auf diesen Kriterien, werden Bcl-2 Familienmitglieder in drei Untergruppen eingeteilt (siehe Abb. 10). Die erste Untergruppe besitzt alle vier BH-Domänen und fungiert hauptsächlich als Inhibitor der Apoptose. Typische Vertreter dieser Klasse sind z. B. Bcl-2 oder Bcl-X_L. Anti-apoptotische Bcl-2 Proteine können ihre Funktion entweder durch das Abfangen von *BH3-only* Proteinen oder durch die Unterbindung von Bax/Bak Oligomeren ausüben. Die inaktivierende Wirkung von Bcl-2 und Bcl-X_L kann allerdings auch unterbunden werden, indem bestimmte *BH3-only* Proteine an Bcl-2 binden, dieses inaktivieren, dadurch gebundene Proteine freigesetzt werden und somit positiv zum Verlauf der Apoptose beitragen (Breckenridge *et al.*, 2004). Die Untergruppe II ist durch die Domänen BH1 - BH3 charakterisiert (Bsp.: Bax, Bak). Ihre Mitglieder fördern meist die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Die Mitglieder der Untergruppe III weisen

nur in der amphipatischen α -Helix der BH3-Domäne Sequenzhomologien auf (*BH3-only* Proteine: z. B. Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma). Ihre Aufgabe besteht in der Förderung der pro-apoptotischen Funktion von Bax und Bak. Zwei der am besten untersuchten und wichtigsten Vertreter diese Gruppe sind Bid und Bad (Hengartner, 2000; Tsujimoto, 2003; Scorrano *et al.*, 2003a; Orrenius, 2004; Terrones *et al.*, 2004). Bid induziert die Oligomerisierung von Bax und Bak und trägt somit zur Freisetzung mitochondrialer pro-apoptotischer Proteine, wie etwa Cytochrom c, bei. Diese Funktion kann durch eine Bindung an Bcl-2 verhindert werden. Bad besitzt eine höhere Affinität zu Bcl-2 als Bid und ist dadurch für die Inaktivierung des anti-apoptotischen Effekts von Bcl-2 verantwortlich (Terrones *et al.*, 2004). Es zeigte sich ebenfalls, dass die Mitglieder der Untergruppe III ihre Funktion stromaufwärts von Bax und Bak ausüben, da die Expression dieser Proteine in Abwesenheit von Bax und Bak keine Freisetzung von Cytochrom c hervorrufen konnte (Breckenridge *et al.*, 2004).

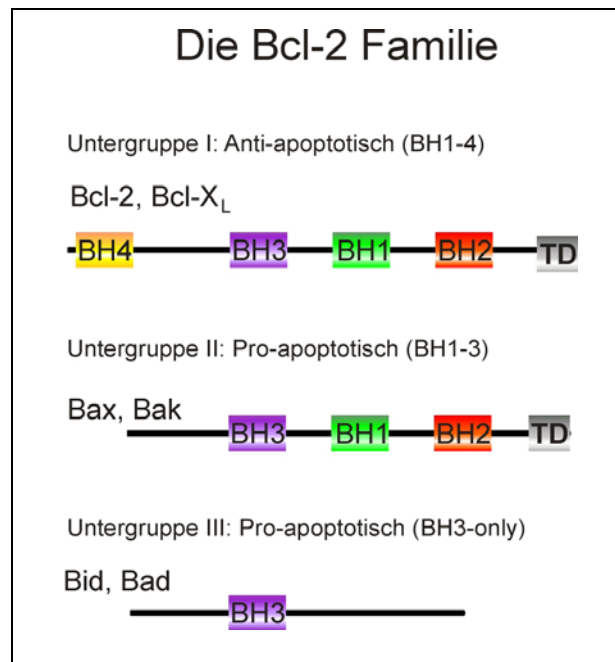


Abb. 10: Mitglieder der Bcl-2 Familie

Die Bcl-2 Familienmitglieder können anhand der Anzahl ihrer BH-Domänen in drei Gruppen untergliedert werden. Gruppe I besitzt alle vier Domänen und wirkt meist anti-apoptotisch. Untergruppe II und III beherbergen meist pro-apoptotische Mitglieder, wobei Gruppe II durch den Besitz von BH1-3 und Gruppe III nur durch BH3 charakterisiert ist. (verändert nach Tsujimoto, 2003)

Bislang wurden mindestens vier verschiedene Modelle postuliert, wie *BH3-only* Proteine ihre biologische Funktion ausüben (Scorrano *et al.*, 2003a):

- I. Autonome Freisetzung von Cytochrom c, d. h. ohne die Mithilfe von weiteren Bcl-2 Familienmitgliedern wie etwa Bax oder Bak. Allerdings sind *BH3-only* Proteine in diesem Fall auf die Beteiligung zusätzlicher Faktoren angewiesen, wie etwa auf das Lipid Cardiolipin.

- II. Interaktion mit anti-apoptischen Bcl-2 Familienmitgliedern und deren Hemmung. Somit stehen Bax und Bak ungehindert für die Porenbildung bereit.
- III. *BH3-only* Proteine, wie z. B. Bid, können auch direkt zur Aktivierung von Bax und Bak beitragen und somit zur Freisetzung von Cytochrom c führen.
- IV. Interaktion mit Proteinen der mitochondrialen Permeabilitätspore: Somit könnten sie zur Induktion der mitochondrialen Dysfunktion sowie zur Freisetzung von Cytochrom c beitragen.

2.6 Beteiligung weiterer Zellorganellen am apoptotischen Zelltod

Allerdings sind die Mitochondrien nicht die einzigen Organellen der Zelle, welche zur Induktion der Apoptose bzw. zu deren Verstärkung beitragen. Die immens wachsende Literatur auf dem Gebiet der Apoptose-Forschung bringt immer wieder neue Interaktionspartner mit ins Spiel. Seit jüngster Zeit werden den Lysosomen sowie dem endoplasmatischen Retikulum immer bedeutendere Aufgaben im apoptotischen Prozess zugesprochen.

Der Verlauf der Apoptose wird momentan als eine alleinige explosionsartige Aktivierung der Caspase-Kaskade angesehen. Allerdings besteht die Regulierung der Apoptose aus einem riesigen multidimensionalen Netzwerk von Aktivatoren, Inhibitoren und sogar Inhibitoren der Inhibitoren. Die Idee, dass der programmierte Zelltod auch durch Caspase-unabhängige Prozesse initiiert und ausgeführt werden kann, ist seit einiger Zeit eine Streitfrage, da es bislang nicht möglich war, den kompletten Signalweg mit all seinen molekularen Mitspielern darzustellen. Einer dieser neuen Mitspieler stellt das Lysosom dar. Lysosomen sind in der Zelle für das kontrollierte Recycling von zellulären Organellen sowie Makromolekülen verantwortlich. Lysosomale Proteine sind besonders aktiv in einem sauren Milieu (pH 4-5), zeigen allerdings auch bei neutralem pH-Wert außerhalb der Lysosomen eine Aktivität (Jaattela *et al.*, 2004; Fehrenbacher *et al.*, 2005). Lysosomale Proteine wie Cathepsin B, D und L translozieren nach einer Vielzahl von Signalen (z. B. die Aktivierung von TNFR, p53 und oxidativem Stress) aus dem Lumen der Lysosomen ins Zytoplasma (Jaattela *et al.*, 2004). Besonders den beiden Cathepsinen B und D wird eine Rolle bei der Freisetzung mitochondrialer Proteine zugeschrieben und schlagen somit eine Brücke zur mitochondrialen Apoptose (Yin *et al.*, 2005). Weiterhin konnte die lysosomale Permeabilisierung während der Apoptose mit einer Aktivierung des CD95-Todesrezeptors, dem Verlust von Wachstumsfaktoren sowie mit speziellen lysosomalen Photooxidantien in Zusammenhang gebracht werden (Brunk *et al.*, 2001). Hierbei spielt die Aktivierung der Caspase-8 eine wichtige Rolle, durch deren Aktivierung eine lysosomale Permeabilisierung erfolgt und somit die Freisetzung von Cathepsin B hervorgerufen werden kann. Cathepsin B ist in der Lage, das pro-apoptotische Protein Bid zu schneiden, welches wiederum eine Verbindung zu den Mitochondrien und der Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht (Ferri *et al.*, 2001; Brunk *et al.*, 2001).

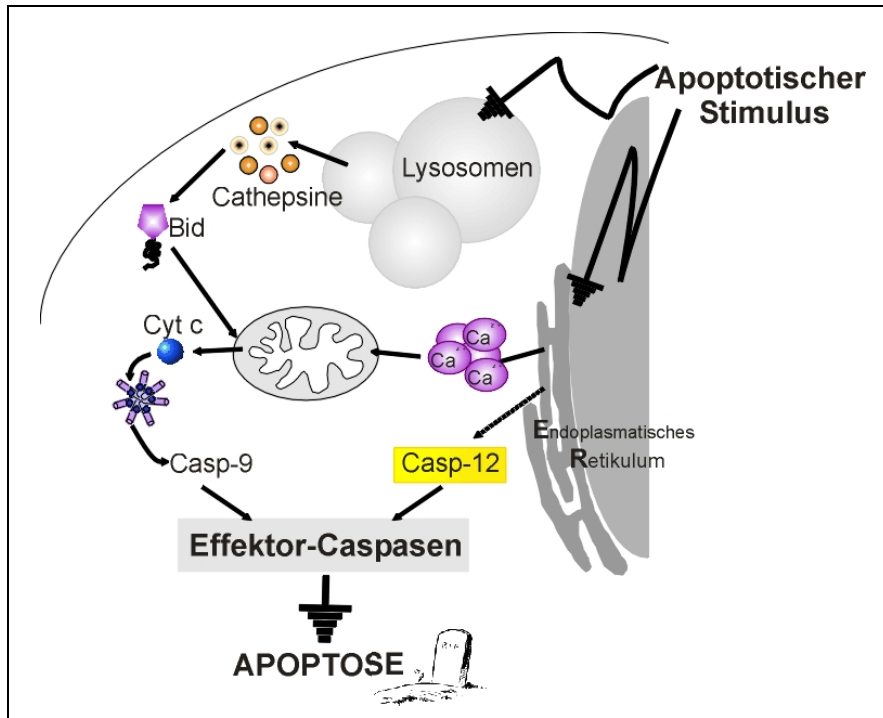


Abb. 11: Darstellung einer möglichen Beteiligung von Lysosomen und ER während der Apoptose

Lysosomen setzen nach einem apoptotischen Stimulus Cathepsin frei, die über die Spaltung von Bid eine Freisetzung von Cytochrom c induzieren. Das ER kann über die Freisetzung von Ca^{2+} sowie der Aktivierung von Caspase-12 in das apoptotische Geschehen eingreifen.

Auch die Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) wird mehr und mehr in Betracht gezogen, da das ER physiologisch mit den Mitochondrien verbunden ist. Mitochondrien modulieren und synchronisieren Ca^{2+} -Signale und können sehr schnell aus dem ER freigesetztes Ca^{2+} aufnehmen und zwischenlagern. Dies kann zu einer Beeinflussung des mitochondrialen Metabolismus sowie zu komplexeren zellulären Prozessen führen. Außerdem wurden Mitglieder der Bcl-2 Familie auf dem ER vorgefunden (Gajkowska *et al.*, 2001; Nutt *et al.*, 2002). Weiterhin stellte sich heraus, dass das ER durch mindestens zwei Mechanismen an der Initiation der Apoptose teilnehmen kann, nämlich durch den *unfolded protein response* und durch die Freisetzung von Ca^{2+} . Ferner wurde eine mögliche lokale Regulierung der Apoptose durch eine ER-assoziierte Caspase (Caspase-12) und Bcl-2 Proteine beschrieben (Ferri *et al.*, 2001). Caspase-12 ist spezifisch an der zytoplasmatischen Seite des ER lokalisiert und wird durch ER-Stress sowie die Mobilisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Lager aktiviert. Hierbei wird Caspase-12 durch m-Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige zytoplasmatische Cystein-Protease, proteolytisch aktiviert, kann dadurch weitere Caspasen spalten und somit die Caspase-Kaskade in Gang setzen. Störungen im Fließgleichgewicht des Ca^{2+} -Levels im ER, sowie die spontane Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, können zur Apoptose führen (Ferri *et al.*, 2001). Ca^{2+} erwies sich als wichtiger Regler der mitochondrialen Permeabilitätspore. Mit Hilfe von Immun-Elektronenmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung konnte gezeigt werden, dass sich ~10% Bax und ~15% Bak an der ER-Membran

befinden (Scorrano *et al.*, 2003b). Weitere Versuche ergaben, dass die Überexpression von Bax und Bak zu einer spontanen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER-Lumen führt. Dieses wird von den Mitochondrien aufgenommen, wodurch es zur Beeinflussung der Permeabilitätspore kommt. Jetzt kann Cytochrom c freigesetzt werden. Dies beschreibt einen möglichen Zusammenhang zwischen ER-Stress und dem mitochondrialen Signalweg.

Die Initiation der Apoptose sowie deren ausführenden Signalwege stellen einen sehr komplexen Prozess dar. Dass auch spezielle Lipide, wie z. B. die APC, in diesen Signalweg eingreifen können, erweist sich als ein neuer und sehr interessanter Aspekt. Hierbei ist besonders ihre Fähigkeit zur Aktivierung von Todesrezeptoren hervorzuheben, die ohne die Beteiligung der natürlichen Liganden verläuft. Auch die fehlende Interaktion mit der zellulären DNA, deren Selektivität gegenüber Tumorzellen sowie eine gezielte Zerstörung durch die Aktivierung des apoptotischen Signalweges machen die synthetischen Phospholipide zu einer vielversprechenden Waffe im Kampf gegen den Krebs.

Wie jedoch genau die APC in den apoptotischen Prozess eingreifen, ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise der synthetischen Phospholipide zu erlangen, soll im Rahmen dieser Arbeit die genauere Aufklärung des APC-induzierten apoptotischen Signalwegs erfolgen. Die Untersuchungen wurden mit einer neuen Substanz, dem S-NC-2, durchgeführt, dessen Entwicklung und Synthese aus einer früheren Arbeit resultierte.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Vertrieb
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat	Molecular Probes Inc., Leiden, Niederlande
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diophenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
3-Morpholinosydnonimine hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Acridine Orange	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Annexin-V-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Casyton [®]	Schärfe Systems, Reutlingen
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ECL Plus [™] Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Fas-Ligand, Fas- <i>Enhancer</i>	Alexis – AXXORA Deutschland GmbH, Grünberg
Geneticin (G418)	GIBCO [®] Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
NP-40 Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Polymethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen

Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Rotiphores [®] Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Saccharose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sucrose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tri-n-Butylzinnchlorid (TBT)	Merck – VWR International GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen

Die in dieser Arbeit im Rahmen der Proteindiagnostik eingesetzten Antikörper sind in Kapitel 3.6.5, die im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Antikörper in Kapitel 3.9.1 aufgelistet. Die synthetischen Lipide wurden von Dr. U. Massing, Klinik für Tumorbologie (Freiburg) synthetisiert und liegen in Ethanol gelöst bei –20°C vor.

Die Herstellung der Natrium-Orthovanadatlösung erfolgte nach Kypta (Kypta *et al.*, 1988). Hierbei wird die entsprechende Menge Natriumvanadat in destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit HCl auf pH 10 eingestellt. Dabei erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Lösung wird anschließend so lange erhitzt, bis sie wieder farblos wird. Diese Vorgehensweise garantiert die entsprechende Oxidationsstufe des Vanadats und somit eine optimale Hemmung.

3.2 Laborgeräte und Programmsoftware

Gerät	Vertrieb
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Christ
Casy [®] 1	Schärfe Systems, Reutlingen
Digifuge ^{GL}	Heraeus, Fellbach
Durchflusszytometer <i>Flow Cytometer BD LRS</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Multiporator	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena
Power Pac Basic TM	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Automatic TLC Sampler III	CAMAG, Schweiz
Win Cats	CAMAG, Schweiz
Orbit Filter	Improvision

Absorptionsreader	VersaMax, Molecular Device
Fluoreszenzreader	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT
Elektrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Guardian 1414 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Win Spectral V1.1, 1994	Wallac
Bild-Dokumentationengerät GelPrint 2000i	MWG-Biotech, Ebersberg
Sterilbank Lamin Air® HB 2460	Heraeus Christ, Fellbach
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf AG, Hamburg

3.3 Zellkultur

Zellkulturen werden in speziellen „Grundmedien“ kultiviert, welche die nötigen Aminosäuren, Salze und Vitamine für ein optimales Wachstum der Zellen bereit stellen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Suspensionszellen wurde RPMI 1640 Medium verwendet, während adhärent wachsende Kulturen sowie SKW 6.4 Zellen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kultiviert wurden. Zusätzlich erfolgte eine Anreicherung der entsprechenden Medien mit spezifischen Komponenten, wie etwa der essentiellen Aminosäure L-Glutamin, Antibiotika zur Vermeidung von Kontaminationen und Selektionssubstanzen, um bestimmte Klone zu erhalten. Eine der wichtigsten Komponenten jedoch ist das Serum. Seren liefern Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme, z. B. Albumin oder Immunglobuline. Fötale Kälberserum (FKS) wird aus Blut von Rinderföten zwischen dem 3. und 7. Trächtigkeitsmonat nach der Schlachtung meist keimarm gewonnen. Die Hitzeinaktivierung, also die Erwärmung des Serums auf 56°C für 30 min, verändert die Eigenschaften des Serums. Es vermindert oder beseitigt ganz allgemein störende Einflüsse verschiedenster Art oder inaktiviert bestimmte Wachstumsfaktoren. Suspensionszellen erhielten stets hitzeinaktiviertes FKS (FKS-hi), um ein übermäßiges Wachstum zu vermindern, während adhärent wachsenden Zellen kein hitzebehandeltes Serum verabreicht wurde. Die Kulturmedien wurden stets steril filtriert (Bottle Top Filter, 0.22µM Porenweite, Millipore USA) und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ B5061 EK/CO₂) der Firma Heraeus Christ kultiviert.

Soweit nicht anders erwähnt, stammen alle Zellkulturgefäße von der Firma Greiner, Frickenhausen. Die Grundmedien sowie alle Medienzusätze und Antibiotika wurden von Gibco Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

3.3.1 Die Jurkat T Zelllinien

Die Jurkat Zellen repräsentieren humane T Lymphozyten, welche im Jahre 1977 aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter T-Zell-Leukämie isoliert wurden. Der Subklon A3 stammt aus dem Labor von Gerald R. Crabtree (Stanford Universität) und wurde über einen längeren Zeitraum mit geringen Mengen Fas-Antikörper kultiviert. Daraus resultierten Zellen mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Fas-induzierter Apoptose. Darüber hinaus kam es zur Herstellung zweier weiterer Subklone, zum einen Zellen, welche ein funktionell defektes FADD-Adapterprotein besitzen (FADD^{-/-}) und zum anderen eine Caspase-8 defiziente Zelllinie, welche eine Mutation in der Cystein-Protease Caspase-8/FLICE trägt (Juo *et al.*, 1998; Juo *et al.*, 1999). Beide Zelllinien erweisen sich als resistent gegenüber Fas-induzierter Apoptose. Diese drei Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. John Blenis (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

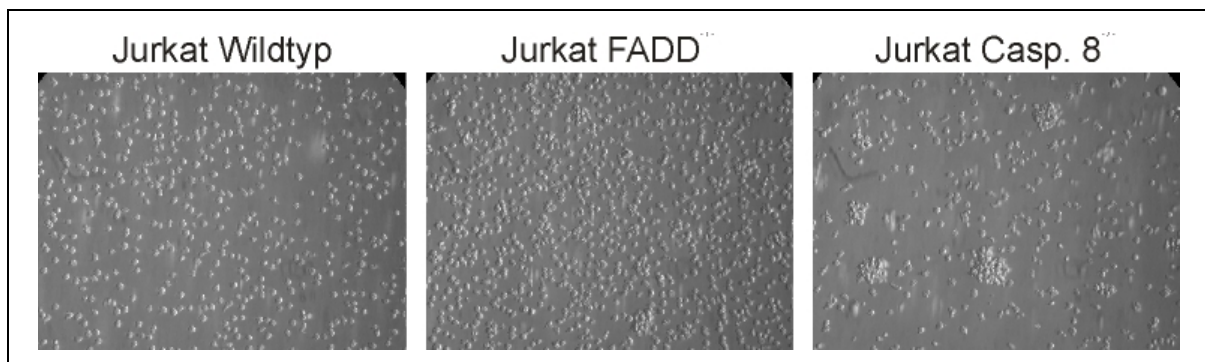


Abb. 12: Bildaufnahmen der Jurkat A3 Zellkulturen

Jurkat A3 Wildtyp, FADD^{-/-} und Caspase-8^{-/-} Zellen wurden mit Hilfe einer Digitalkamera bei 200-facher Vergrößerung direkt aus der Zellkulturflasche fotografiert. Hierbei lässt sich deutlich das Verhalten der Zellen beobachten, da Wildtyp sowie FADD^{-/-} Zellen vereinzelt wachsen, Caspase-8 defiziente allerdings zur Aggregatbildung neigen.

Zusätzlich wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei weitere Jurkat Zelllinien, bezogen von Prof. Stanely J. Korsmeyer (Harvard Medical School, Bosten, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um Zellen, welche stabil mit dem Expressionsvektor Bcl-2 (Jurkat Bcl-2) bzw. einem Kontrollvektor (Jurkat Neo) transfiziert wurden. Die Zugabe von Geneticin (G418) ins Kulturmedium garantiert die Selektion der Transfektanten.

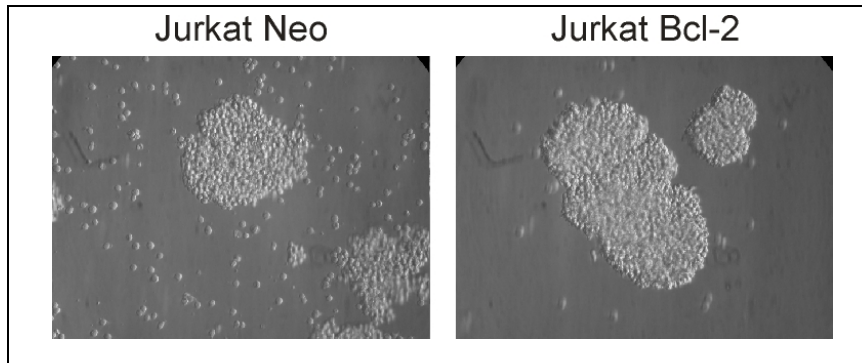


Abb. 13: Jurkat Neo und Bcl-2 Zellkultur

Die fotografischen Aufnahmen dieser Zellkulturen zeigen deutlich die starke Ausbildung von Zellkonglomeraten. Gerade in diesem Fall ist es besonders notwendig, die Zellen durch vorsichtiges und gründliches Auf- und Abpipettieren zu vereinzeln.

Da alle Jurkat T Zellen, besonders aber Jurkat Neo bzw. Jurkat Bcl-2 zur Bildung von Zellkonglomeraten neigen (siehe Abb. 12 & 13), müssen sie vor jeder Verwendung durch sanftes Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden. Die Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdoppelungszeit von ca. 24 Stunden. Sie wurden zwei mal pro Woche passagiert und jeweils 3×10^6 Zellen mit 20 ml Kulturmedium in eine neue Flasche überführt.

Tab. 1: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Jurkat A3 T Zelllinien (500 ml)

- RPMI 1640
- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 10 mM HEPES
- 15 mM L-Glutamin
- 50.000 U Penicillin G Sodium
- 50 mg Streptomycin Sulfate
Zusätzlich nur bei Jurkat Neo und Jurkat Bcl-2:
- 100 mg Geneticin (G418)

3.3.2 Die B-Zelllinie BJAB

Die BJAB Zelllinie repräsentiert eine B-lymphoblastoide Zelllinie humanen Ursprungs. Diese wurde im Labor von Vishva M. Dixit (Genetec. Inc., South San Francisco, USA) stabil mit dem Expressionsvektor einer dominant negativen Version des *fas associated death domain* Proteins (FADDdn) transfiziert. Transfektanten werden durch die Zugabe von Geneticin (G418) zum Kulturmedium selektioniert. Als Kontrollen dienen BJAB Wildtyp Zellen (BJAB WT), welche im Medium ohne G418 kultiviert werden.

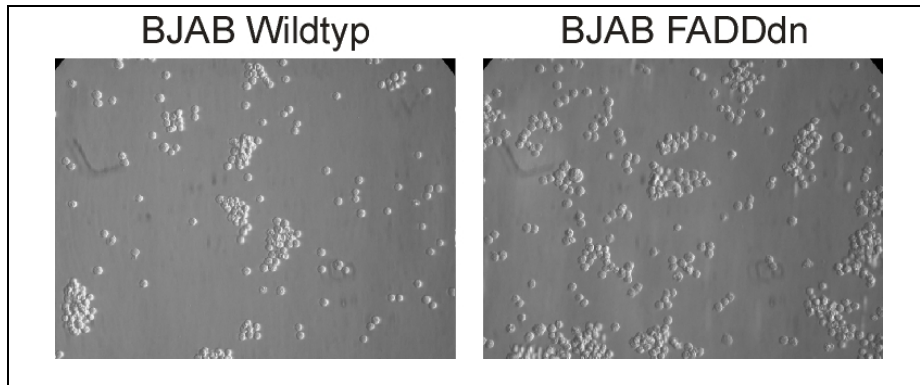


Abb. 14: Die BJAB Zellen

BJAB Zellen haben im Vergleich zu Jurkat Zellen ein größeres Zellvolumen. Sie wachsen ebenfalls in Suspension, haben eine Verdoppelungszeit von 24 Stunden und neigen zur leichten Aggregation. Durch sanftes Resuspendieren der Kultur kann auch hier eine Vereinzelung der Zellen gewährleistet werden.

BJAB wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdoppelungszeit von 24 Stunden. Sie werden zwei mal pro Woche passagiert und jeweils mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen in 20 ml Medium angesetzt.

Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums für BJAB Zellen (500 ml)

- RPMI 1640
- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 25.000 U Penicillin G Sodium
- 25 mg Streptomycin Sulfate
- Zusätzlich bei BJAB FADDdn:
- 100 mg Geneticin (G418)

3.3.3 Die SKW 6.4 Zellen

SKW Zellen repräsentieren eine B-lymphoblastoide Linie humanen Ursprungs, welche von Dr. Andreas Strasser (Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australien) bezogen wurde. Diese Zellen sind stabil mit einem Bcl-2 (SKW Bcl-2) Expressions- bzw. einem Kontrollvektor (SKW Neo) transfiziert. Die Selektion der Bcl-2 sowie der Neo Transfektanten erfolgt durch die Zugabe von Geneticin (G418) zum Kulturmedium.

SKW Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdoppelungszeit von 24 Stunden. Sie werden zwei mal die Woche passagiert und jeweils mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen in 20 ml Medium angesetzt. Da diese Zelllinien dazu neigen, große Zellaggregate zu bilden (siehe Abb. 15), müssen sie vor jeder Verwendung durch sanftes Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden.

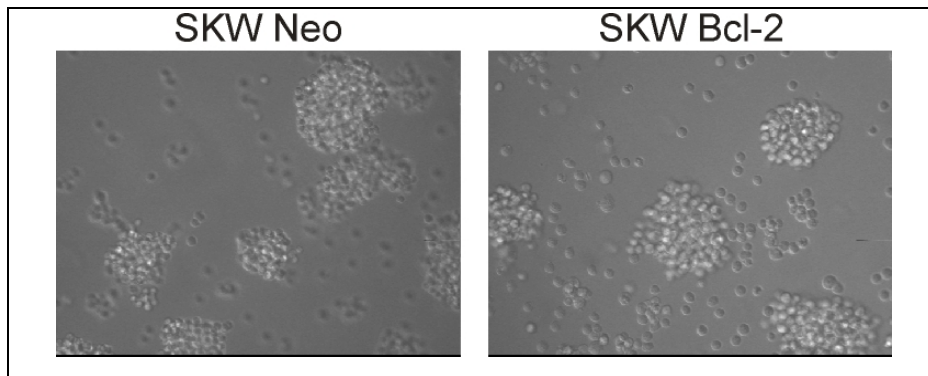


Abb. 15: SKW Zellen

SKW Zellen wurden direkt aus der Zellkulturflasche bei einer 200-fachen Vergrößerung fotografiert. Die Zellen wachsen in Suspensionskultur und neigen zur starken Konglomeratbildung.

Tab. 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für SKW6.4 Zellen (500 ml)

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 25.000 U Penicillin G Sodium
- 25 mg Streptomycin Sulfate
- 100 mg Geneticin (G418)
- 50 μ M 2-Mercaptoethanol

3.3.4 K562 Zellen

Die K562 Zelllinie wurden im Jahre 1975 bei einer 53-jährige Frau mit chronischer myelogener Leukämie (CML) isoliert und von Lozzio und Lozzio etabliert (Lozzio *et al.*, 1975). Die Zellpopulation erwies sich als hochgradig undifferenziert und zur Serie der Granulozyten zugehörig. Studien von Anderson *et al.* über die oberflächliche Membraneigenschaft dieser Zellen erbrachte die Schlussfolgerung, dass K562 Zellen eine humane erythroleukämische Zelllinie repräsentiert. Auch diese Zellen wachsen in Suspensionskultur und werden 2 mal pro Woche mit einer Zellzahl von 3×10^6 in 20 ml Kulturmedium ausgesät.

Tab. 4: Zusammensetzung des Kulturmediums für K562 Zellen (500 ml)

- RPMI 1640
- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 50.000 U Penicillin G Sodium
- 50 mg Streptomycin Sulfate

3.3.5 HL-60 Zellen

HL-60 Zellen wurden ursprünglich aus einer 36-jährigen Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie isoliert. Diese Zelllinie steht am Beginn ihrer Ausdifferenzierung und kann mit spezifischen Induktoren, wie die Zugabe von 1,3% DMSO im Kulturmedium, in monozyten- oder granulozyten-ähnliche Zellen differenziert werden.

Tab. 5: Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen (500 ml)

- RPMI 1640
- 15% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 5 mM Natrium-Pyruvat
- 5 ml MEM non essential amino acids
- 25.000 U Penicillin G Sodium
- 25 mg Streptomycin Sulfate

Undifferenzierte Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur und mit einer Verdoppelungszeit von 24 Stunden. Die Zellen werden daher zwei mal pro Woche mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen in neues Kulturmedium überführt. Diese Zelllinie wird maximal bis zur 15. Passage für Versuche verwendet.

3.3.6 HeLa Zellen

Bei HeLa Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Zervix-Karzinom-Zellen, welche ursprünglich von einer 31-jährigen Frau namens Henrietta Lacks (Baltimore) isoliert wurden.

Die Kultivierung der HeLa Zellen erfolgt bei 37°C und 5%CO₂. Die Zellen wurden einmal die Woche, kurz vor Erreichen der Konfluenz, passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 10 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Dabei lösen sich die Zellen vom Untergrund ab. Dieser Vorgang wird durch die Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen können nun gezählt und anschließend mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen in eine neue Kulturflasche überführt werden.

Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen (500 ml)

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- DMEM- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)- 15 mM L-Glutamin- 25.000 U Penicillin G Natrium- 25 mg Streptomycin Sulfate |
|---|

3.3.7 Bestimmung der Zellzahl

Da Suspensionszellen in Kultur häufig dazu neigen, starke Aggregate auszubilden, ist es notwendig, sie vor jeder Passage durch sanftes Auf- und Abpipettieren zu vereinzeln.

Zur Bestimmung der Zellzahl wird die Zellsuspension aus der entsprechenden Kulturflasche entnommen und 1:100 bzw. 1:1000 (BJAB und HL-60) mit Casyton® (Schärfe Systems, Reutlingen) verdünnt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Casy®1 Cell Counters.

3.3.8 Langzeitkonservierung und in-Kulturnahme von Zellen

Ist eine Zelllinie für einen längeren Zeitraum nicht in Gebrauch, so kann sie durch Einfrieren konserviert werden. Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C ist auch eine bewährte Methode zur Lagerung von Zellkulturreserven. Zusätzlich bietet diese Art der Aufbewahrung Schutz vor Verlust der Zellkultur durch Kontamination sowie vor genetischen Veränderungen. Durch die extrem niedrige Temperatur des Stickstoffs kommen Stoffwechselaktivitäten sowie Zellvermehrung vollständig zum Erliegen. Der Vorgang ist jedoch reversibel und die Zellen können nach Bedarf wieder aufgetaut werden.

Das Einfrieren von Zellen ist ein langsamer Prozess, die Einfriereschwindigkeit beträgt 1°C pro Minute. Um die Problematik der Kristallbildung zu unterbinden, welche zur Schädigung der Zelle führen würde, wird der Zellkultur 10% DMSO oder Glycerin beigemischt. Zusätzlich kann über die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses der Entstehung von Kristallen in der Zelle entgegengewirkt werden. Zur Optimierung dieses Prozesses wird das Gefriergefäß *Cryo 1°C Freezing Container* (Nalgene™, Labware, USA) eingesetzt. Dieses wird mit Isopropanol gefüllt und bei 4°C bis zu seiner Verwendung vorgekühlt.

Bevor die Zellen eingefroren werden, wird zunächst die Zellzahl ermittelt. Die benötigte Anzahl wird bei $350\times g$ für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Für jedes Kryogefäß werden 5×10^6 Zellen in 1 ml eiskaltem Medium (inkl. 10% DMSO) benötigt. Die Zellen werden zunächst für 2 Stunden bei -20°C und in direktem Anschluss bei -80°C über Nacht gelagert. Für kurzzeitige Konservierung (Tage bis Wochen) ist diese Temperatur ausreichend. Für eine Langzeitkonservierung (Monate bis Jahre) müssen die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

Um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden, muss das Einfrieren sowie das Auftauen von Zellen unter absolut sterilen Bedingungen erfolgen.

Das Auftauen einer Zellkultur ist im Gegensatz zum Einfrieren ein sehr schneller Prozess. Hierbei muss das zu verwendende Kulturmedium bereits auf 37°C vorgewärmt und kurz vor dem Auftauen der Zellen in einem Bluecap bereitgestellt werden. Das eingefrorene Kryoröhrchen wird für den Transport aus dem Stickstoffbehälter auf Eis gebettet und für die schnelle Auftauprozedur in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen werden danach sofort in das bereits vorgelegte Medium pipettiert. Um das zellschädigende DMSO aus der Kultur zu waschen, wird nun die Suspension für 5 Minuten bei 350xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in neuem Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (SARSTEDT AG & Co, Nürnberg) überführt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Da die Zellen beim Auftauprozess großem Stress ausgesetzt sind, werden sie frühestens nach 10 Tagen Kultur für Versuche verwendet.

3.4 Isolierung von Blutlymphozyten aus Vollblut

Zur Isolierung primärer Lymphozyten wurde heparinisiertes menschliches Vollblut verwendet. Nach Verdünnung des Blutes lassen sich Lymphozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque, Amersham Biosciences, Freiburg) isolieren. Lymphozyten sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma und Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Monozyten, welche sich in der selben Phase wie die Lymphozyten befinden, adhären über Nacht an der Zellkulturflasche, die Lymphozyten verbleiben in Suspension und können somit einfach in eine neue Kulturflasche überführt werden.

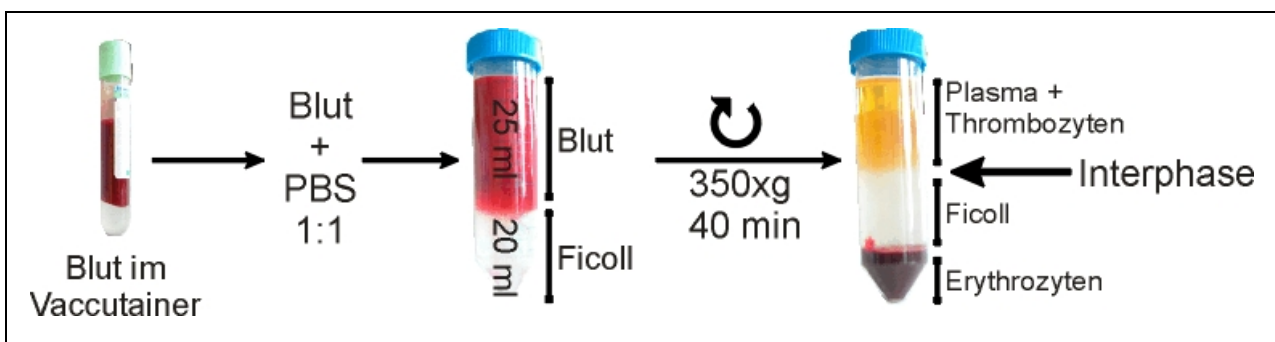


Abb. 16: Prinzip der Lymphozytenisolierung

Vollblut wird 1:1 mit PBS verdünnt und anschließend über einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Die Lymphozyten werden aus der Interphase entnommen, mit PBS gewaschen und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt.

Zunächst werden einem willigen Spender ca. 40 ml Blut in sterilen Heparin-Röhrchen (BD Vacutainer™ LH PST II) entnommen und zur Weiterverarbeitung 1:1 mit sterilem PBS verdünnt. Alle Verarbeitungsschritte erfolgen bei Raumtemperatur. 20 ml Ficoll-Hypaque werden nun mit 25 ml Blut überschichtet und bei 350xg für 40 Minuten mit ausgeschalteter Bremsfunktion zentrifugiert. Währenddessen entstehen drei Phasen: Phase 1, welche aus Thrombozyten und Plasma besteht, Phase 2 besteht hauptsächlich aus Ficoll-Hypaque und in der 3. Phase liegen die Erythrozyten vor. Die mononuklearen Zellen in der Interphase werden nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen, zwei mal mit PBS gewaschen und jeweils bei 300xg für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Ruhephase über Nacht bei 37°C und 5% Atmosphäre im Brutschrank und am darauf folgenden Tag werden die Lymphozyten in ein neues Kulturgefäß überführt.

Tab. 7: Zusammensetzung des Kulturmediums für primäre Lymphozyten (500 ml)

- RPMI 1640
- 10% FKS-hi (fetales Kälberserum)
- 15 mM L-Glutamin
- 50.000 U Penicillin G Sodium
- 50 mg Streptomycin Sulfate

3.5 Vitalitäts-Tests

3.5.1 Trypanblau-Färbung

Die Vitalität von Zellen kann mittels der Trypanblau-Färbung bestimmt werden. Das Grundprinzip dieses Tests beruht darauf, dass Trypanblau nur in Zellen diffundiert, deren Membran stark geschädigt ist. Diese erscheinen im Lichtmikroskop blau. Somit ist die Zahl der blauen Zellen identisch mit dem Anteil toter Zellen.

Zur Versuchsdurchführung werden jeweils 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau-Lösung (0,5%ig in 0,9% NaCl-Lösung) versetzt. Kurz darauf kann bereits die Zählung in einer Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse TS100) bei 200-facher Vergrößerung erfolgen. Die Vitalität wird auf die Gesamtzellzahl bezogen.

3.5.2 MTT-Assay

Einen weiteren Vitalitätstest stellt der von Mossmann beschriebene MTT-Assay dar (Mosmann, 1983). Diese Methode beruht auf der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, bestimmt indirekt die Stoffwechselaktivität und somit die Vitalität der Zellen. Für diesen Test werden Zellen

mit dem gelben 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diophenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Das MTT wird nun in den Mitochondrien mittels NADH in einer Succinat-abhängigen Dehydrogenase-katalysierten Reaktion zu unlöslichen, blauen Formazan-Kristallen reduziert (siehe Abb. 17). Dieser Reaktionsschritt ist irreversibel. Anschließend lassen sich die Formazan-Kristalle mittels eines Isopropanol/HCl-Gemisches aus den Zellen herauslösen und bei einer Absorption von 550 nm im Mikroplattenreader messen. Die Größe der Absorption, d.h. die Stärke der Färbung ist hierbei proportional zur mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Zellen.

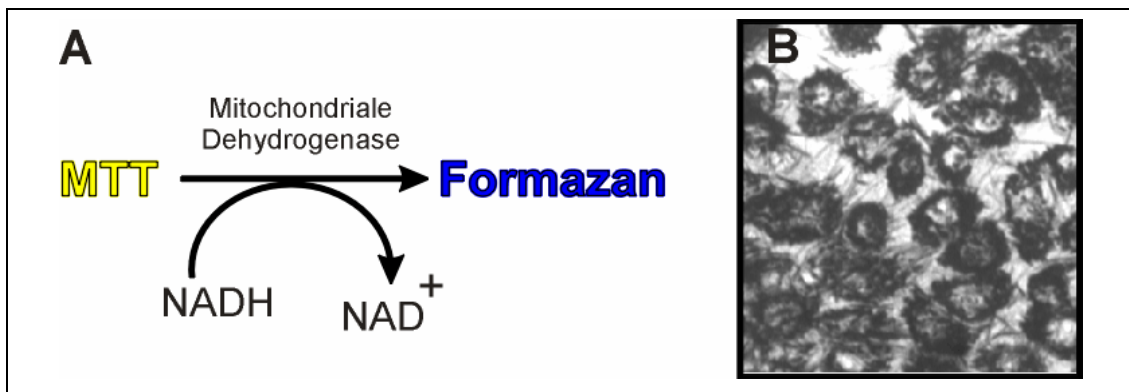


Abb. 17: Reaktion der Formazan-Bildung

Beim MTT-Assay wird in den Mitochondrien der Zellen das gelbe Tetrazoliumbromid zu blauem Formazan reduziert (A). Die Formazan-Nadeln werden aus den Zellen herausgelöst und die Intensität der Blaufärbung im Absorptionsreader gemessen. Je stärker die Lösung Blau gefärbt ist, desto mehr MTT wurde umgesetzt und desto aktiver ist die mitochondriale Dehydrogenase. In (B) sind mit MTT inkubierte MCF-7 Zellen dargestellt. Die Nadeln der Formazan-Kristalle lassen die Zelle schwarz erscheinen.

Nach erfolgter Inkubation werden die Proben durch Zentrifugation geerntet (350xg, 4°C, 5 Minuten), mit PBS gewaschen und anschließend in entsprechender Menge an 10%iger MTT-Lösung (im Medium) aufgenommen. Hierbei sollte eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen pro 200 µl Lösung und Well gewährleistet sein. Die Inkubation mit der MTT-Lösung sowie die darauffolgende Messung erfolgt in 96-Well Platten bei 37°C. Je Probe wird eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit Tetrazoliumbromid erfolgt für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Daraufhin werden die gebildeten Formazan-Kristalle für die anschließende Messung in Lösung gebracht, indem die Platte abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen der einzelnen Wells mittels Isopropanol/HCl permeabilisiert werden. Durch erneute Zentrifugation wird gewährleistet, dass noch vorhandene Zellbruchstücke sich auf dem Boden der Platte befinden und nur der reine Überstand (gelöste Formazan-Kristalle) zur Messung in eine neue Platte überführt wird. Die Proben können nun im Absorptionsreader bei 550 nm gegen einen Leerwert (Isopropanol/HCl) gemessen werden. Hierbei korreliert die gemessene Absorption mit der Menge an gebildetem Formazan, d.h. je niedriger die Absorption, desto weniger Formazan wird gebildet und desto niedriger ist die mitochondriale Aktivität als Index der Vitalität.

3.6 Proteinanalytik

3.6.1 Proteinbestimmung

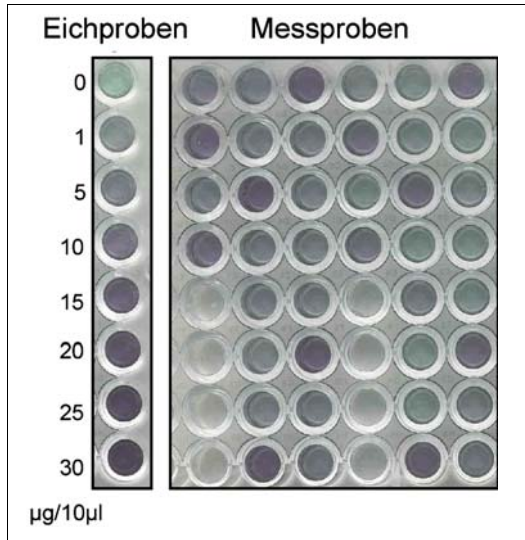


Abb. 18: Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt mittels des BCA-Testsystems. Hierbei bilden sich wasserlösliche, violette Farbkomplexe, welche sich linear zur Proteinmenge dunkler färben. Je dunkler die Lösung, desto mehr Protein ist enthalten.

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde nach der Methode von Smith (Smith *et al.*, 1985) vorgegangen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen werden hierbei zu Cu^+ -Ionen reduziert, welche mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden (siehe Abb. 18). Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche beinahe linear zur ansteigenden Proteinkonzentration ist.

Zunächst werden für eine Standard-Eichgerade genau definierte Proteinlösungen mit ansteigende Mengen (0–1–5–10–15–20–25–30 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) an Rinderserum-albumin (BSA) in destilliertem Wasser gelöst und jeweils 10 μl in eine 96-Well Platte pipettiert. Zusätzlich werden jeweils 10 μl der zu

messenden Proben auf dieselbe Platte pipettiert und anschließend das BCA-Reagenz angesetzt, indem 50 Teile BCA Grundlösung (Pierce, Illinois, USA) mit einem Teil 4%-iger CuSO_4 Lösung gemischt werden. Von dieser Lösung wird nun in jedes Well 190 μl zugegeben und anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer kurzen Phase der Abkühlung werden die Proben in einem Mikroplattenreader bei 562 nm gemessen und die Werte mit Hilfe der SOFTmax®PRO Software (Molecular Devices, USA) mit Werten der Eichgeraden ins Verhältnis gesetzt.

3.6.2 Herstellung von Ganzzellextrakten

Nach Beendigung der Inkubation werden Suspensionszellen durch Zentrifugation bei 350xg und 4°C für 4 Minuten geerntet. In der Regel besteht ein Versuchsansatz für die Western Blot Analyse aus 2 x 10⁶ Zellen. Das Zellpellet wird mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend je nach Weiterverarbeitung in 100 μl 2x Lämmli-Lysispuffer (ohne Proteinbestimmung) oder NP-40 Lysispuffer (mit nachfolgender Proteinbestimmung) resuspendiert. Die Aufarbeitung für Zellen in 2x Lämmli besteht aus einem Erhitzungsschritt für 5 Minuten auf 95°C, anschließendem Vortexen und der Zerstörung der genomischen DNA durch 10-15 Pulse eines Ultraschallgerätes. Das Zell-

Lysat wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das NP-40 Zell-Lysat wird für 30 Minuten bei 4°C lysiert, anschließend mit 3-5 Pulsen beschallt, für 10 Minuten bei $20.800\times g$ (4°C) zentrifugiert und der Überstand für die Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 8: Zusammensetzung des 2x Lämmli sowie des NP-40 Lysispuffers

2x Lämmli Lysispuffer	NP-40 Lysispuffer
- 160 mM Tris/HCl (pH 6,8)	- 150mM NaCl
- 4% SDS (w/v)	- 50 mM Tris
- 22,8% Glycerol (v/v)	- 5 mM EDTA
- 4% 2-Mercaptoethanol (v/v)	- 1% NP-40
- 0,08% Bromphenolblau (w/v)	- pH 8,0
- gelöst in dest. H_2O	- gelöst in dest. H_2O

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse von Proteingemischen und ermöglicht eine schnelle Bestimmungen von Molekulargewichten. Die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen mittels ihres Molekulargewichtes eingesetzt (Laemmli, 1970). Voraussetzung für eine Auftrennung ist die Denaturierung der Proteine, die durch die Zugabe von anionischen Detergenzien wie etwa Sodiumdodecylsulfat (SDS) hervorgerufen wird. SDS unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen und bildet mit Proteinen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Die Komplexe der verschiedenen Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamid-Matrix die SDS-Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf.

Zur Auftrennung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde stets ein 5%-iges Sammelgel verwendet, aber unterschiedlich konzentrierte Trenngele (10-15% Acrylamid). Zur Herstellung der Gele wird eine Acrylamid-Fertiglösung verwendet (Rotiphorese[®] Gel 30, Carl Roth), welche neben 30% Acrylamid bereits mit 0,8% Bisacrylamid versetzt ist. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden gemäß der folgenden Tabelle (Tab. 9) für 5 ml Sammelgel und 10 ml Trenngel angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde Tetramethylethylendiamin (TEMED) zum Start der Polymerisation zugegeben.

Tab. 9: Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels

	Sammelgel		Trenngel	
	5%	10%	12,5%	15%
Rotiphorese® Gel 30	1,70 ml	3,30 ml	2,05 ml	5,00 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,50 ml	1,55 ml	2,50 ml
2 M Tris/HCl (pH 6,8)	0,62 ml	-	-	-
20% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,31 ml	0,05 ml
dest. H ₂ O	7,47 ml	4,00 ml	1,30 ml	4,70 ml
10% APS	0,10 ml	0,10 ml	0,62 ml	0,20 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,06 ml	0,03 ml

Zunächst wird das Trenngel in einer vertikalen Apparatur (BioRad, München) mit 0,75 bzw. 1 mm Spacern gegossen und zum Vermeiden von Blasenbildung sowie zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Oberfläche sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wird das Isopropanol verworfen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem Proben-Kamm versehen. Erneut muss die vollständige Polymerisation abgewartet werden, um den Kamm zu entfernen, die Gele in die Apparatur einzuspannen und die Proben laden zu können. Als Molekularmarker wird der *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (Bio-Rad, München) verwendet. Die Apparatur wird mit Laufpuffer gefüllt und an eine Stromquelle mit 180 V angeschlossen. Nach ca. 30-40 Minuten erreicht die Laufmittelfront das Ende des Gels und der Lauf kann gestoppt werden.

Tab. 10: Zusammensetzung des Laufpuffers

Laufpuffer
- 25 mM Tris-BASE
- 1,2 mM Glycin
- 1% SDS (w/v)
- gelöst in dest. H ₂ O

3.6.4 Das Blotten

Beim Blotten werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach) übertragen, um spezifische Proteine durch Immunfärbungen sichtbar zu machen (Towbin *et al.*, 1979; Gultekin *et al.*, 1988).

Zunächst muss die Membran auf das Blotten vorbereitet werden. Hierzu wird sie mit Methanol gespült, um Verunreinigungen zu beseitigen und die Proteinbindungsstellen zu aktivieren. Anschließend erfolgt ein kurzer Waschschrift in destilliertem Wasser, damit daraufhin die Membran luftblasenfrei mit dem Gel in eine Blot-Halterungskassette eingespannt und in die Blot-Kammer überführt werden kann. Das Blotten geschieht in einem speziellen Puffer, welcher 10% Methanol enthält, um die Aktivierung der Bindungsstellen zu sichern. Zur Gewährleistung eines problemlosen Blot-Vorgangs ist darauf zu achten, dass das Gel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode vorliegt, damit die negativ geladenen Proteine auf die Membran wandern können. Durch die Zugabe eines Kühlakkus sowie durch ständiges Rühren wird eine Erwärmung der Apparatur vermieden. Der Blot-Vorgang dauert ca. 1 Stunde und wird bei einer Stromstärke von 100 V durchgeführt.

Tab. 11: Zusammensetzung des Blotpuffers

Blotpuffer
- 25 mM Tris-BASE
- 192 mM Glycin
- 10% Methanol (v/v)
- gelöst in dest. H ₂ O

3.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach erfolgter Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wird diese für 5 Minuten mit PBS/T (PBS und 0,1% Tween-20, v/v) gewaschen, um das Methanol zu entfernen. Anschließend erfolgt für 1-2 Stunden das Blocken der Membran mit 10% Magermilch in PBS/T (w/v), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wird daraufhin drei Mal mit PBS/T für 8 Minuten gewaschen und mit den entsprechenden, in Tab. 12 aufgelisteten Antikörpern in 5% Magermilch in PBS/T über Nacht bei 6°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Es erfolgt erneut ein dreimaliges Waschen der Membran mit PBT/T für jeweils 8 Minuten, um unspezifisch-bindende Antikörper zu entfernen. Die Membranen werden nun für 2 Stunden mit dem entsprechenden sekundären Meerrettichperoxidase-konjugiertem Antikörper ebenfalls in 5% Magermilch inkubiert.

Tab. 12: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (Western Blot)

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
PRIMÄR:		
- anti Actin	1 : 1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
- anti Bid	1 : 500	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- anti Caspase-3	1 : 3.000	Transduction Laboratories, Lexington, USA
- anti Caspase-6	1 : 1.000	Cell Signaling Techonoly®
- anti Caspase-7	1 : 1.000	Cell Signaling Techonoly®
- anti Caspase-8	1 : 4.000	BD PharMingen, Heidelberg
- anti Caspase-9	1 : 500	Cell Signaling Techonoly®
- anti Caspase-12	1 : 1.000	Cell Signaling Techonoly®
- anti Cathepsin B	1 : 1.000	Calbiochem®/Merck, Darmstadt
- anti Cytochrom c	1 : 1.000	BD PharMingen, Heidelberg
- anti FADD	1 : 200	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
- anti FasR	1 : 1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
- anti PARP	1 : 5.000	Roche Diagnostics, Mannheim
- anti Smac/Diablo	1 : 2.000	Cell Signaling Techonoly®
- anti TRAIL-R2	1 : 1.000	Oncogene Research Products, Boston, USA
- CT-B-HRP	1 : 1.000	Molecular Probes Inc., Niederlande
SEKUNDÄR:		
- anti Maus-HRP	1 : 5.000	Roche Diagnostics, Mannheim
- anti Kanninchen-HRP	1 : 5.000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- anti Ziege-HRP	1 : 5.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

Nach anschließendem dreimaligem Waschen der Membran erfolgt die Visualisierung der Proteine mittels „*Enhanced Chemiluminescence*“ (ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagent, Amersham Biosciences). Die Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht wird über einen Film detektiert. Nach Anleitung werden Lösung A und Lösung B im Verhältnis von 40:1 miteinander vermischt und für 5 Minuten auf die Membranen gegeben. Daraufhin werden die Membranen in Frischhaltefolie verpackt und in eine Filmkassette überführt. Die anschließende Detektion der Proteine erfolgt mit einem speziellen Film (Hyperfilm™-ECL, Amersham Biosciences), welcher durch die entstehende Chemilumineszenz belichtet wird.

Die Entwicklung der Filme findet in der Dunkelkammer statt, indem die belichteten Filme zunächst in einem Entwicklerbad (Developer/Replenisher, G150, AGFA, Mischungsverhältnis 1+5 mit dest. Wasser) eingelegt werden. Die Dauer der Entwicklung ist unterschiedlich, sie wird bis zum sichtbar werden der Banden vollzogen. Anschließend wird der Film in Leitungswasser gewaschen und daraufhin im Fixierbad (Superfix, Tetenal Photowerk, Norderstedt, Mischungsverhältnis 1+7 mit dest. Wasser) fixiert. Zum Schluss wird der Entwickler mit destilliertem Wasser beseitigt, die Filme zum Trocknen aufgehängt und anschließend eingescannt.

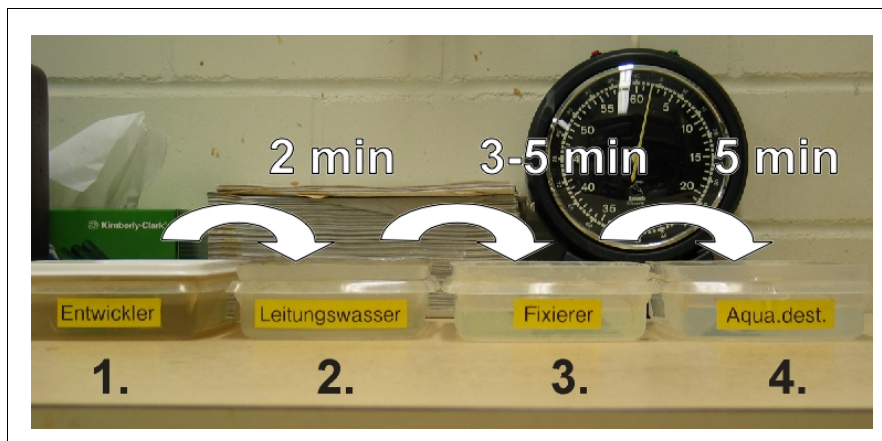


Abb. 19: Schematische Darstellung der Filmentwicklung

Zur Entwicklung der im Rahmen der Protein-Diagnostik verwendeten Filme werden diese zunächst bis zum Erscheinen der Proteinbanden in ein Entwicklerbad eingelegt, in der Regel für 1-3 Minuten. Vor und nach der Fixierung werden die Filme gründlich mit Wasser gewaschen und für anschließende Verwendungen zum Trocknen aufgehängt.

3.7 Isolierung apoptotischer DNA-Fragmente

Mittels dieser Methode kann die für die Apoptose spezifische internukleosomale DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Die Zerstückelung der DNA lässt sich in Form eines als DNA-Apoptoseleiter bezeichneten Bandenmusters darstellen. Hierfür wird die apoptotische DNA extrahiert, gereinigt und durch Agarose-Gel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Ethidiumbromid werden die Banden sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert mit der Doppelhelix der DNA und zeigt eine orange Fluoreszenz bei der Anregung mit UV-Licht.

Zum Nachweis einer Apoptose-Leiter werden 2×10^6 Zellen pro Ansatz benötigt. Nach Beendigung der Inkubation werden diese auf Eis geerntet und für 4 Minuten bei 350xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Anschließend erfolgt der Aufschluss der Zellen, indem das Pellet für 5 Minuten mit 125 µl Lysispuffer resuspendiert und auf Eis inkubiert wird. Danach werden die Zellen für 5 Minuten bei 2.700xg erneut abzentrifugiert. Der Überstand enthält nun die apoptotischen DNA-Fragmente, die restliche DNA sowie Zellfragmente befinden sich im Pellet. Der Überstand wird abgenommen und kann über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Tab. 13: Zusammensetzung der Puffer für die Isolation apoptotischer DNA-Fragmente

Lysispuffer	TBE-Puffer
<ul style="list-style-type: none"> - 50 mM Tris/HCl - 20 mM EDTA - 1% NP-40 (v/v) - pH 7,5 in dest. H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> - 89 mM Tris - 89 mM Borat - 2 mM EDTA - pH 8,0 in dest. H₂O
Probenpuffer	Ladepuffer
<ul style="list-style-type: none"> - 10 mM Tris-BASE - 1 mM EDTA - pH 8,8 in dest. H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> - 40% Saccharose (w/v) - 0,25% Xylencyanol (w/v) - 0,25% Bromphenolblau (w/v)

Zur Weiterverarbeitung der Proben werden diese auf ca. 1% SDS eingestellt, indem 10 µl einer 10%-igen SDS-Lösung zugegeben werden. Daraufhin erfolgt der erste Verdau mit 400 µg RNase A (20 µl aus Stammlösung: 20 mg/ml) für 2 Stunden bei 56°C sowie der zweite Verdau mit 250 µg Proteinkinase K (25 µl aus Stammlösung: 10 mg/ml) bei 37°C, ebenfalls für 2 Stunden. Im Anschluss daran wird den Proben 50 µl einer 50 mM Ammoniumacetat-Lösung zugegeben und anschließend die DNA mit 500 µl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Die DNA wird für 15 Minuten bei 20.800xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wird mit 20 µl Probenpuffer erneut gelöst, zusätzlich mit 5 µl Ladepuffer versetzt, für die folgende Gel-Elektrophorese für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt (Ray *et al.*, 1994).

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einem 1,8%-igen Agarose-Gel in TBE-Puffer inklusive 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Das flüssige Gel wird zum Aushärten luftblasenfrei in eine horizontale Gelkammer (*Horizontal Gel Electrophoresis System H3*, BRL, USA) gegossen und mit einem Kamm versehen. Die Auftrennung erfolgt nach der Beladung der Taschen mit jeweils 20 µl Probevolumen bei einer Spannung von 2-3 Volt/cm.

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarose-Gel kann die DNA sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und durch eine Anregungswellenlänge von 302 nm eine orange Fluoreszenz aufweist. Die Fluoreszenz wird per Bilddokumentation (GelPrint 2000i, MWG-Biotech, Ebersberg) erfasst, gespeichert und digital weiterverarbeitet.

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin V-FITC/Propidiumiodid Färbung

Die Unterscheidung und Quantifizierung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen erfolgt mit Hilfe zweier Fluoreszenzfarbstoffe, dem FITC-gekoppelten Protein Annexin V sowie Propidiumiodid.

Veränderungen der Plasmamembran werden als eines der frühesten Anzeichen apoptotischer Zellen beschrieben. Hierbei kommt es zu einer Umverteilung des zytoplasmaständigen Membranlipids Phosphatidylserin (PS), welches im frühen Stadium der Apoptose auf die Außenseite der Zelle umverteilt wird und somit in den extrazellulären Raum ragt. Annexin V ist ein 35-36 kDa, Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Es bindet an Zellen, welche PS auf der Außenseite tragen und repräsentiert somit einen sensitiven Marker für apoptotische Zellen. Für eine bessere Identifizierung apoptotischer Zellen ist Annexin V an das Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und zeigt nach spezifischer Anregung eine grüne Fluoreszenz.

Da jedoch die Translokation von PS auf die Außenseite der Zelle auch während nekrotischer Prozesse stattfindet sowie durch den Verlust der Membranintegrität Löcher in der Zelle entstehen, kann Annexin V auch nekrotische Zellen färben. Es wird daher mit einem zweiten Farbstoff, dem Propidiumiodid (PI), gegengefärbt. PI ist ein Vitalfarbstoff, der aufgrund seiner Größe intakte Membranen nicht durchqueren kann. Er bindet somit an DNA nekrotischer Zellen, welche durch eine poröse Plasmamembran für den Farbstoff zugänglich werden. Nach dieser Färbemethode können nun drei Populationen unterschieden werden, nämlich ungefärbte (vital), nur Annexin V (apoptotisch), oder PI und Annexin V gefärbte Zellen (nekrotisch).

Für die Messung werden 1×10^6 Zellen je Ansatz benötigt. Alle Schritte der Probenaufarbeitung erfolgen auf Eis. Die Proben werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und $350 \times g$ geerntet und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wird anschließend mit $400 \mu\text{l}$ kaltem Calcium-haltigen Bindungspuffer resuspendiert und $100 \mu\text{l}$ (entspricht ca. 250.000 Zellen) für die Färbung verwendet. Jede Probe wird mit $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC (BD PharMingen) und $1 \mu\text{g}$ PI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und für 15 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Vor der Probenmessung muss das Durchflusszytometer auf die Eigenfluoreszenz der Zellen sowie auf die Rot- bzw. Grünfluoreszenz der Farbstoffe geeicht bzw. kompensiert werden. Dies erfolgt mit einer ungefärbten, nur Annexin V-FITC, nur PI und einer doppelt gefärbten Probe. Im Durchflusszytometer werden die Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Wellenlänge von 488 nm

angeregt, das grün fluoreszierende FITC in Kanal FL-1 (530 nm) und das rot fluoreszierende PI in Kanal FL-6 (610 nm) detektiert. Je Probe werden 10.000 Ereignisse gezählt.

Tab. 14: Zusammensetzung des Calcium-haltigen Bindungspuffers

Calcium-haltiger Bindungspuffer
- 10 mM HEPES (pH7,4)
- 140 mM NaCl
- 5 mM CaCl ₂
- gelöst in dest. H ₂ O

3.8.2 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$)

Ein frühes Anzeichen der Apoptose wird durch eine Veränderung bzw. den Verlust des mitochondrialen Potenzials ($\Delta\Psi_m$) beschrieben. Zur Untersuchung dieses Phänomens werden die zuvor behandelten Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 0,5 μ M des rot fluoreszierenden Farbstoffes Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat (TMRE, Molecular Probes Inc., Leiden, Niederlande) inkubiert. Besitzt eine Zelle ein intaktes Membranpotential, weist sie eine starke Fluoreszenz auf. Kommt es zum Verlust von $\Delta\Psi_m$, so schwindet auch die Intensität der Rotfluoreszenz in der gemessenen Zellpopulation. Die Ermittlung der Fluoreszenzintensität erfolgt per Durchflusszytometrie bei einer Anregung von 488 nm und einer Detektion der Rotfluoreszenz in Kanal FL-2 (575 nm). Je Probe werden 10.000 Ereignisse gezählt.

TMRE färbt im niedermolekularen Bereich ausschließlich Mitochondrien und wird beim Kollaps des mitochondrialen Gradienten nicht in der Zelle zurück gehalten. Als Positivkontrolle wird die Chemikalie Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP, SIGMA, Taufenkirchen) eingesetzt, die bereits bei einer Konzentration von 20 μ M einen maximalen Verlust des Membranpotenzials induziert, indem es die oxidative Phosphorylierung entkoppelt und dadurch den mitochondrialen Protonengradienten eliminiert.

3.8.3 Bestimmung der lysosomalen Membranintegrität

Der Verlust der lysosomalen Membranintegrität lässt sich mit Hilfe des Farbstoffes Acridine Orange bestimmen. Es handelt sich hierbei um einen metachromatischen Fluoreszenzfarbstoff, der in Abhängigkeit des pH-Wertes entweder eine rote (pH > 5) oder eine grüne Fluoreszenz (pH > 7) aufweist. Acridine Orange akkumuliert in sauren Zellkompartimenten, wie etwa den Lysosomen. Hierbei wird der Farbstoff beim Eintritt in die Lysosomen aufgrund des niedrigen pH-Wertes protoniert, wodurch er in diesem Kompartiment gefangen bleibt und einen Fluoreszenzshift von grün nach rot erfährt. Kommt es zur Alkalisierung der Lysosomen, so wird der

Farbstoff deprotoniert, daraufhin freigesetzt und weist aufgrund des höheren pH-Wertes im Zytosol eine grüne Fluoreszenz auf. Der Verlust der Membranintegrität lässt sich somit durch die Abnahme der Rotfluoreszenz oder der Zunahme der Grünfluoreszenz im Verhältnis zu den Kontrollzellen bestimmen.

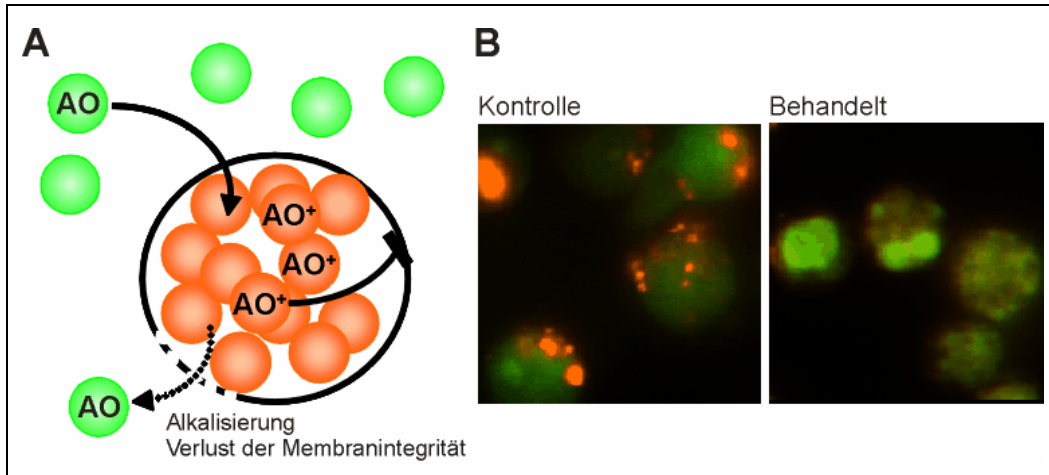


Abb. 20: Bestimmung der lysosomalen Membranintegrität

Acridine Orange (AO) ist ein Farbstoff, der aufgrund des umgebenden pH-Wertes eine grüne (hoher pH) oder eine rote (niederer pH) Fluoreszenz aufweist (A). Er akkumuliert in den Lysosomen der Zellen, welche dadurch im Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen (B, Kontrolle). Der Verlust der Membranintegrität geht mit dem Ausscheiden des Farbstoffes einher. Daher lassen sich geschädigte Lysosomen nicht mehr detektieren (siehe: B, Behandelt).

Nach erfolgter Inkubation werden die Zellen für 15 Minuten mit 10 μ M Acridine Orange bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend 2 bis 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Veränderungen im Verhältnis der Rot-/Grünfluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle können mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Im Durchflusszytometer werden die Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, die Grünfluoreszenz in Kanal FL-1 (530 nm) und die Rotfluoreszenz in Kanal FL-6 (610 nm) detektiert. Je Probe werden 10.000 Ereignisse gezählt.

3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.9.1 Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen

Damit Suspensionszellen sicher auf dem Untergrund haften bleiben und nicht während der Färbeprozedur verloren gehen, müssen die Objektträger zuvor speziell behandelt werden: sie werden mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Stocklösung: 1 mg/ml) beschichtet. Der Objektträger wird zunächst mit Aceton gesäubert und anschließend für 15 Minuten in Poly-L-Lysin-haltigem PBS (1:100) inkubiert. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser werden diese bei 37°C getrocknet. Die beschichteten Objektträger können im Kühlschrank für ca. 2 Wochen gelagert werden.

Tab. 15: Antikörper und Bezugsquelle in der Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
PRIMÄR:		
- anti Caveolin	1 : 200	BD PharMingen, Heidelberg
- anti Fas (C20)	1 : 250	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
- anti TRAIL-R2	1 : 200	Oncogene – VWR International, Bruchsal
SEKUNDÄR:		
- Esel-anti-Maus Cy TM 2-conjugated	1 : 100	DIANOVA, Hamburg
- Esel-anti-Kanninchen Cy TM 3-conjugated	1 : 100	DIANOVA, Hamburg

Suspensionszellen (1×10^6 Zellen/Ansatz) werden nach entsprechend erfolgter Inkubation durch Zentrifugation (350xg, 5 Minuten) geerntet, in 5 µl reinem fetalen Kälberserum aufgenommen und anschließend auf einem zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht. Die Probe wird daraufhin bei 37°C auf einer Wärmeplatte (Thermoplatte S, Desaga) getrocknet, danach auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Für die immunhistochemische Untersuchung intrazellulärer Proteine muss die Zellmembran zusätzlich mit 0,1% Triton (in PBS) für 10 Minuten bei RT permeabilisiert werden. Die Präparate werden daraufhin mit 3% BSA-Lösung (Rinderserumalbumin in PBS) für 1 Stunde (RT) behandelt und anschließend mit dem entsprechenden primären und dem folgenden sekundären Antikörper für je eine Stunde inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgen immer mehrere Waschschrte mit PBS (jeweils 3 x 5 Minuten). Zur Konservierung werden die Proben mit Immu-

Mount (Thermo Shandon, USA) betrauft, mit einem Deckgläschen eingedeckelt und über Nacht, zur Aushärtung des Immu-Mount, bei 4°C gelagert. Daraufhin können die Proben im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Analyse der Proben erfolgt in einem Axiovert S-100 Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Mit Hilfe einer CCD Kamera (Hamamatsu, Japan) können die Bilder digital gespeichert und anschließend im Computer mittels der Software Openlab (V3.0.3) weiterverarbeitet werden.

3.9.2 Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)

Die Zellen werden vor dem Ende der Inkubation mit 10 μ M Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es handelt sich hierbei um einen membrangängigen Farbstoff, der mit der zellulären DNA interkaliert. Somit kommt es zur Färbung des Zellkerns. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, müssen die Zellen anschließend mit PBS gewaschen und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Die Betrachtung der Proben erfolgt in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S-100, Zeiss) bei einer maximalen Anregung im UV-Bereich (360 nm), die Emission im Blau-Bereich (460 nm). Mit Hilfe einer CCD Kamera (Hamamatsu, Japan) konnten die Bilder digital gespeichert und anschließend im Computer mittels der Software Openlab (V3.0.3) weiterverarbeitet werden.

3.10 Caspase-Assay

Zur quantitativen Erfassung der Caspase-Aktivierung unterschiedlicher Initiator- und Effektor-Caspasen wurden die BD ApoAlert™ Caspase Assay Plates (BD Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um immobilisierte, für Caspasen spezifische fluorogene Substrate im 96-Well Format. Wird ein Zell-Lysat mit den entsprechenden aktiven Caspasen auf die Platte aufgebracht, so schneiden die Caspasen ihre spezifischen Substrate und setzen dadurch ein fluorogenes Produkt frei, das mit einem Fluoreszenzplattenleser detektiert werden kann.

Die unterschiedlichen Caspase-Substrate bestehen aus kurzen Peptidsequenzen, welche nur durch spezifische Caspasen erkannt und geschnitten werden. Die Substrate sind zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff (7-amino-4-methyl Coumarin, AMC) verbunden. Das Peptidgebundene AMC emittiert im UV-Bereich ($\lambda_{\text{max}}=380$ nm). Wird jedoch das Substrat mit der aktiven Caspase in Verbindung gebracht, so schneidet diese das AMC von der Peptidsequenz ab. Da der freie Farbstoff nun ein Emissionsmaximum im blauen Bereich bei 460 nm besitzt, ist es möglich, den Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 460 nm mit einer Aktivitatzunahme der entsprechenden Caspase in Korrelation zu setzen.

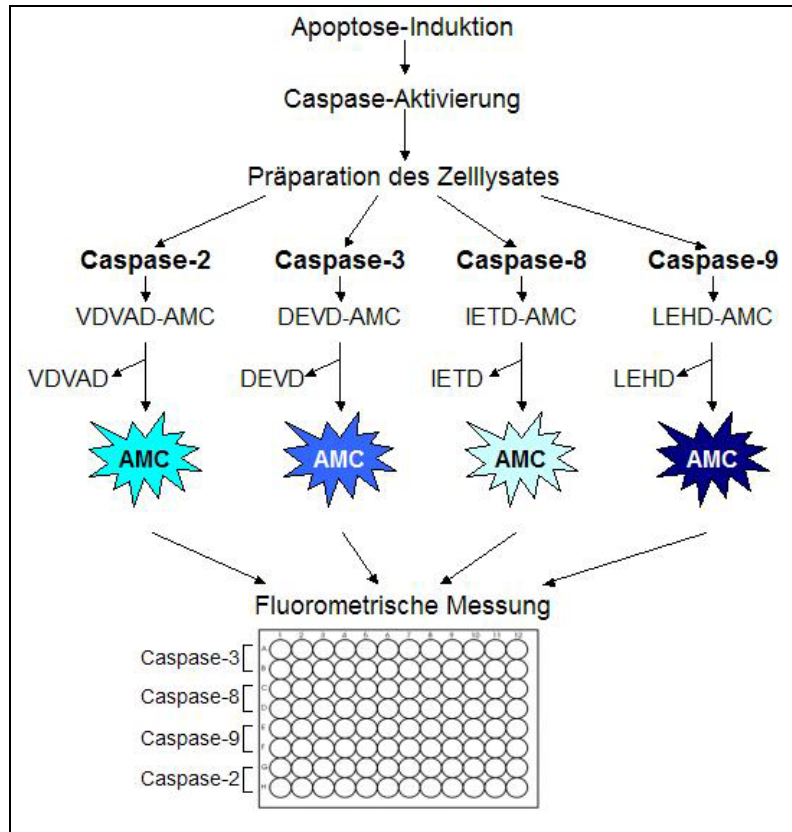


Abb. 21: Prinzip der Caspase-Aktivitäts Messung

Die spezifischen Substrate der Caspasen sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMC gekoppelt. Wird das Substrat nun von einer aktiven Caspase erkannt und geschnitten, erfolgt die Freisetzung von AMC, welches nun bei 460 nm emittiert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 460 nm kann dadurch mit einer Aktivitätszunahme der entsprechenden Caspase in Korrelation gesetzt werden.

Nach Inkubationsablauf werden die Zellen durch Zentrifugation (350xg, 5 Minuten) geerntet und mit entsprechender Menge 1x Zell-Lysispuffer resuspendiert. Hierbei sollte die Zellkonzentration 2×10^5 Zellen pro 50 μ l Lysispuffer entsprechen. Das Lysat wird für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 20.800xg (4°C) zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgt die Aktivierung der 96-Well Platte. Hierzu wird die benötigte Menge an 2x Reaktions-Puffer mit DTT versetzt (10 μ l der 1 M DTT Stammlösung in 1 ml 2x Reaktions-Puffer), jeweils 50 μ l in ein Well pipettiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin werden jeweils 50 μ l der entsprechenden Probe zusätzlich ins Well gegeben, mit Parafilm versiegelt, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität in einem Plattenlesegerät gemessen.

3.11 Co-Immunopräzipitation

Die Fällung und Isolierung bestimmter Proteine aus einem Zelllysate erfolgt mit Hilfe der Immunpräzipitation. Die Versuchsdurchführung in dieser Arbeit erfolgte mit dem μ MACS

Streptavidin System von Miltenyi Biotec, welches für die magnetische Markierung und Isolierung biotinylierter Moleküle entwickelt wurde.

Nach erfolgter Inkubation der Zellen wurden diese durch Zentrifugation geerntet (350xg, 5 Minuten), anschließend in 100 µl DISC-Lysispuffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 45 Minuten bei 4°C lysiert. Die Weiterverarbeitung der Proben verlief im post-nuklearen Überstand, der durch Zentrifugation des Lysats (20.000xg, 10 Minuten, 4°C) erhalten wurde. Die Präzipitation des DISC erfolgte durch einen Biotin-gekoppelten anti-human APO-1/Fas (APO-1-3) Antikörper der Firma Bender MedSystems. Das Lysat wurde für 3 Stunden mit Biotin-APO-1/Fas bei 7°C inkubiert und anschließend der Antikörper/CD95-Rezeptor Komplex sowie weitere eventuell gebundene Interaktionspartner mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten super-paramagnetischer Beads aus dem Lysat isoliert und über Säulen aufgereinigt. Der Komplex wurde mit Hilfe von 95°C heißem 2xLämmli von der Säule gewaschen und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf spezifische Bestandteile des DISC untersucht.

Tab. 16: Zusammensetzung des DISC-Lysispuffers

DISC-Lysispuffer	
- 30 mM Tris pH 7,5	Kurz vor Pufferverwendung:
- 150 mM NaCl	- 10 mg/ml Aprotinin
- 10 mM Glycerol	- 10 mg/ml Leupeptin
- 1% Triton X-100	- 100 mM PMSF

3.12 Isolierung von Lipid Rafts

Das Prinzip der *Lipid Raft* Isolierung basiert auf der Unlöslichkeit dieser Strukturen in 1%iger Triton Lösung bei 4°C sowie auf deren geringen Dichte. Dadurch können sie, nach der Trennung in einem diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten, in den oberen Schichten detektiert werden (Lisanti *et al.*, 1995).

Zur Isolierung von *Lipid Rafts* aus Jurkat Zellen wurden je Ansatz 1×10^7 Zellen benötigt. Diese werden nach erfolgter Inkubation in 500 µl kaltem MBS-Puffer (inkl. 1% Triton X-100) resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend lysiert, indem sie 15-20 mal durch eine 27-G Nadel gezogen wurden. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 20.000xg (4°C) wurden 480 µl des post-nuklearen Überstands mit 80% Sucrose (in MBS) vermischt, so dass eine Endkonzentration von 45% Sucrose entstand. 1 ml dieser Mischung wurde auf den Boden eines Zentrifugenröhrchens platziert und anschließend mit 1,2 ml 35% Sucrose, 1 ml 25% Sucrose und 1 ml 5% Sucrose vorsichtig überschichtet (alle Sucrose-Lösungen werden in MBS-Puffer

hergestellt). Der Gradient wird nun für 18 Stunden bei 4°C und 45.000 rpm zentrifugiert (Rotor: Beckman SW 50.1). Am nächsten Tag werden 12 - 13 Fraktionen mit einer 200 µl Pipette gesammelt (von oben nach unten).

Tab. 17: Zusammensetzung des MBS-Puffers

MBS-Lysispuffer
- 30 mM MES
- 150 mM NaCl
- pH 6,5
- 1% Triton X-100

3.13 Zytosolisierung

Zur Untersuchung freigesetzter pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien bzw. Lysosomen muss das Zytoplasma vom Rest der Zelle getrennt werden, ohne dabei intrazelluläre Organellen zu zerstören. Hierzu wird eine Methode eingesetzt, bei der durch die Erwärmung eines Digitonin-haltigen Puffers auf 37°C die Zellen schonend aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation einzelne Fraktionen gesammelt werden können.

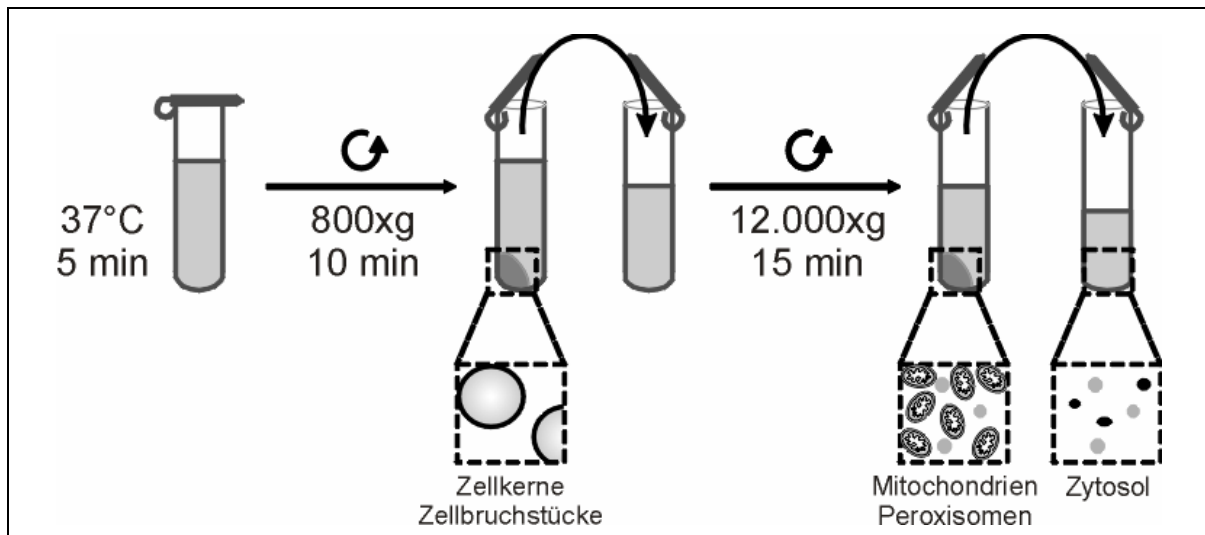


Abb. 22: Schematische Darstellung der Zytosolisierung

Zur Untersuchung freigesetzter pro-apoptotischer Proteine aus zellulären Organellen erfolgt zunächst die Inkubation der Zellen in einem Digitonin-haltigen Lysispuffer. Anschließend werden durch differentielle Zentrifugation unterschiedliche Fraktionen der Zelle sedimentiert, der zytosolische Überstand auf ein Gel aufgetragen und durch Western Blot auf die gewünschten Proteine untersucht.

Für die Zytosolisolierung werden je Ansatz 1×10^7 Zellen benötigt, welche nach erfolgter Inkubation durch Zentrifugation (350xg, 5 Minuten) geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l auf 37°C vorgewärmten Lysispuffer gut resuspendiert werden. Das Lysat wird für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann auf Eis abgeschreckt. Es erfolgen nun zwei Zentrifugationsschritte durch die zunächst bei 800xg (10 Minuten, 4°C) die Zellkerne und größere Zellbruchstücke sedimentiert werden. Eine zweite Zentrifugation bei 12.000xg (15 Minuten, 4°C) ermöglicht die Pelletierung der Mitochondrien. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wird als Zytosol definiert. Die Untersuchung zur Freisetzung mitochondrialer Proteine erfolgt mittels Western Blot, indem nur die Zytosol-Fraktion aufgetragen und die entsprechenden Proteine durch immunologische Methoden sichtbar gemacht werden.

Tab. 18: Zusammensetzung des Zytosol-Lysispuffers

Zytosol-Lysispuffer	
- 70 mM Mannitol	- 1,5 mM MgCl ₂
- 1 mM EDTA	- 10 mM KCl ₂
- 20 mM HEPES	- 1 mM DTT
- 210 mM Sucrose	- 10 μ M Digitonin

Kurz vor der Verwendung des Puffers werden 100 mM PMSF, 10 mg/ml Aprotinin sowie 10 mg/ml Leupeptin dem Puffer zugegeben.

3.14 Aufnahme und Metabolismus radioaktiv markierter Lipide

[¹⁴C]-R-NC-2 wurde von Dr. U. Massing, Klinik für Tumorbologie (Freiburg) synthetisiert. Diese Substanz liegt in Ethanol gelöst vor und wird bei -20°C gelagert. Anhand dieser markierten Verbindung wurde exemplarisch die Aufnahme von Alkylphosphocholinen in die Zellen sowie deren Abbau bzw. Umbau untersucht.

[¹⁴C]-Lyso-3-Phosphatidylcholine, 1-[1-¹⁴C]palmitoyl wurde von der Firma Amersham Biosciences bezogen und liegt als Lösung in einem Toluol-Ethanol Gemisch (1:1 v/v) vor.

3.14.1 Aufnahmekinetik der radioaktiven Lipide

Zur Bestimmung der inkorporierten Menge des [¹⁴C]-R-NC-2 sowie [¹⁴C]-Lyso-PC, werden je Ansatz 2×10^6 Zellen in 1 ml Medium ausplattiert und für definierte Zeiten mit 0,05 μ Ci/ml inkubiert. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation bei 350xg für 5 Minuten geerntet, wobei der Überstand (Medium) für die radioaktive Messung aufbewahrt wird. Es erfolgt eine Waschung des

Pellets mit PBS und daraufhin die Bestimmung der radioaktiven Menge in diesen drei Fraktionen (Medium, Wasch-PBS und Zellpellet). Hierfür wird jede Fraktion in Szintillationsgefäße (Polyvials[®] 20, Zinsser Analytic) überführt, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (*Liquid Scintillator* Quicksafe A, Zinsser Analytic) versehen und durch Schütteln gut miteinander vermischt. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wird nun mit einem Flüssigszintillationszähler (Guardian 1414 *Liquid Scintillation Counter*, Wallac) gemessen. Die Anteile an Radioaktivität im Medium, PBS und im Zellpellet werden immer auf die Gesamtaktivität im Ansatz bezogen.

3.14.2 Extraktion zellulärer Lipide

Die Extraktion zellulärer Lipide erfolgt nach einer Methode modifiziert nach Bligh & Dyer (Bligh *et al.*, 1959). Nach der erfolgten Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5 Minuten, 350xg), in PBS gewaschen und anschließend erneut in 1 ml PBS resuspendiert. Die Lipidextraktion erfolgt auf Eis und alle verwendeten Lösungen sind ebenfalls auf Eis vorgekühlt.

Die Zellsuspension wird zunächst mit 1,25 ml Chloroform und darauf folgend mit 2,5 ml Methanol vermischt. Nach einer kurzen Ruhephase auf Eis werden erneut 1,25 ml Chloroform sowie 1,25 ml 0,2%ige Ameisensäure zugegeben, gut miteinander resuspendiert, ca. 5 Minuten auf Eis ruhen gelassen und anschließend für eine bessere Phasentrennung bei 1.050xg (4°C, 5 Minuten) abzentrifugiert. Daraufhin kommt es zur Entnahme der organischen Phase, welche bei 40°C in einem VapoTherm Heizblock unter Stickstoff eingedampft wird. Die extrahierten Lipide können dann in 100 µl Chloroform aufgenommen und für die dünnschichtchromatographische Analyse eingesetzt werden.

3.14.3 Dünnschichtchromatographie und Visualisierung der Lipidbanden

Am Tag der Extraktauftragung werden die Laufkammern mit den entsprechenden Laufmitteln gesättigt. Die Dünnschichtplatten (SIL G Polygram, Macherey & Nagel) werden nach dem Vorlauf in Chloroform/Methanol (1:2) für 30 Minuten bei 100°C aktiviert.

Die extrahierten Lipide werden nun mit Hilfe eines Auftragegerätes (Automatic TLC Sampler III, CAMAG) und der Software WinCATS (V 1.1.2) auf die Dünnschichtplatten aufgesprüht. Zur Trennung aller zellulärer Lipide wurde eine Kombination aus zwei Laufmitteln verwendet. Der erste Lauf erfolgt mit einem Gemisch aus CHCl₃/MeOH/Essigsäure/H₂O (56/33/9/2 v/v/v/v) für eine Strecke von 13 cm, der zweite Lauf mit einem Gemisch aus Hexan/Ether/Essigsäure (80/20/1 v/v/v) und wurde ca. 5 cm unter dem oberen Plattenrand gestoppt.

Die zellulären Lipide können nach einer Methode von Touchstone (Touchstone *et al.*, 1981) dauerhaft sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Dünnschichtplatten für 30 Sekunden in eine CuSO₄-haltige Färbelösung getaucht, anschließend gut getrocknet und auf einer Wärmeplatte bei 170°C für ca. 10 Minuten entwickelt.

Tab. 19: Die Kupfersulfat-Färbelösung**Kupfersulfat-Färbelösung**

- 90,6 ml dest. H₂O
- 9,6 ml ortho-Phosphosäure (85%)
- 10 g CuSO₄

3.14.4 Autoradiographie

Zur Detektion der radioaktiven Banden wird ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences) auf die Dünnschichtplatte aufgelegt und anschließend für 10-15 Tage ([¹⁴C]-R-NC-2) bei -20°C exponiert und anschließend entwickelt.

3.15 Plasmidklonierung und Transfektion von *pKEX-2-XR-APO-1*

Das Plasmid *pKEX-2-XR-APO-1*, welches den funktionsfähigen Todesrezeptor APO-1 kodiert, wurde von Prof. Dr. Krammer (DKFZ, Heidelberg) bezogen. Zum Versand wurde ein Kreis auf ein Whatman Filterpapier gezeichnet und das Plasmid in die Mitte geträufelt. Um das Plasmid wieder in Lösung zu bekommen, wird der Kreis ausgeschnitten und mit 50 µl 10 mM Tris (pH 7,6) für 5 Minuten rehydriert. Nach gründlichem Vortexen befindet sich das Plasmid wieder in Lösung und kann für die Elektroporation kompetenter Bakterien eingesetzt werden.

3.15.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Bakterien wird zunächst eine 4 ml Vorkultur (LB-Medium) des *E. coli*-Stammes DH5α angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) kultiviert. Am Tag darauf kann die Hauptkultur angesetzt werden, indem 100 ml LB-Medium mit 4 ml der Vorkultur versehen werden. Die Bakterien wachsen nun erneut unter Schütteln bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,5-0,6 vorliegt. Daraufhin wird die Bakterienkultur für 15 Minuten auf Eis abgekühlt, anschließend in vorgekühlte Bluecaps überführt und für 10 Minuten bei 3.200xg (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zwei mal in 5 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen. Zum Schluss wird das Pellet erneut in 2 ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Die somit weitgehend auf der Zelloberfläche von Ionen befreiten Bakterien können nun in einer ebenso Ionenfreien Lösung elektroporiert werden. Die häufigen Waschschrte zur Beseitigung der Ionen werden benötigt, um bei der Elektroporation einen elektrischen Durchschlag und somit die Zerstörung der Bakterien zu vermeiden.

Zur Kryokonservierung dieser Bakterien können 850 µl *E. coli* DH5α mit 15% sterilem Glycerol (v/v) vermischt und in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die elektrokompenten Bakterien können nun aus dem Stock auf Eis aufgetaut werden. Für jeden Transformationsansatz werden 50 µl Bakterien mit 5 µl Plasmid in einer Elektroporations-Küvette (1 mm gap, Eppendorf) gemischt und sofort in den Elektroporator (Multiporator, Eppendorf) überführt. Durch kurz angelegte Hochspannungspulse können nun gezielt Löcher in der Zellmembran verursacht werden, durch welche die Plasmid-DNA aufgenommen werden kann. Die Elektroporation erfolgt mit einem Puls (1700 Volt, Time Constant: 5 ms, 17 kV/cm). Nach erfolgter Elektroporation werden die Bakterien sofort unter Zugabe von 1 ml ψB-Medium in Eppendorf-Gefäße überführt, für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, anschließend 100-500 µl auf Selektions-Agarplatten aufgebracht und bei 37°C kultiviert. Zur Anzucht der Bakterien wird YT-Medium (inkl. 1,5% Agar) verwendet, das durch Autoklavieren sterilisiert und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C in sterile Petrischalen gegossen wird. Zur Selektion wird dem Medium 100 µg/ml Hygromycin (Invitrogen) beigesetzt.

Tab. 20: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienanzucht.

LB-Medium	ψB-Medium (Transformation)	YT-Medium (Anzucht)
- 5% Hefe Extrakt	- 0,5% Hefe Extrakt	- 0,5% Hefe Extrakt
- 10% Bactotrypon	- 2% Pepton	- 0,8% Pepton
- 10% NaCl	- 0,4% MgSO ₄	- 0,25% NaCl
	- 10 mM KCl	- pH 7,0
	- pH 7,6	für Platten + 1,5% Agar

3.15.2 Amplifizierung und Isolation von Plasmiden

Zur Amplifizierung von Plasmiden werden erfolgreich transfizierte Bakterien vermehrt und anschließend die Plasmide mit dem QUIAGEN Plasmid Maxi Kit isoliert. Hierfür muss eine Kolonie vom Selektionsagar gepickt und über Nacht bei 37°C in 5 ml YT-Medium (inkl. Hygromycin 100 µg/ml) kultiviert werden. Tags darauf wird erneut eine Hauptkultur angesetzt und für 5-6 Stunden inkubiert.

Die Bakterien werden durch Zentrifugation geerntet (6.000xg, 4°C, 15 Minuten) und die Plasmide nach QUIAGEN-Vorschrift isoliert. Hierzu werden die Bakterien zunächst lysiert, indem das Pellet mit 10 ml Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von Puffer P2 vorsichtig durchmischt wird. Es erfolgt eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend findet die Neutralisation des Bakterienlysats statt, indem 10 ml des auf 4°C vorgekühlten Puffers P3 zugegeben und vorsichtig resuspendiert wird. Es erfolgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis, um eine vollständige

Fällung genomischer DNA, Proteine, Zelltrümmer und SDS zu gewährleisten. Die unerwünschten Bestandteile werden durch Zentrifugation (15.600xg, 4°C, 30 Minuten) entfernt und der Überstand, welcher die Plasmide enthält, erneut zentrifugiert (15.600xg, 4°C, 15 Minuten), um keine Verstopfung der in den nächsten Schritten verwendeten Säule hervorzurufen.

Die Aufreinigung und Gewinnung der Plasmide erfolgt mit Hilfe der QUIAGEN-tip 500 Säule, die vor Gebrauch mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert werden muss. Anschließend wird der Plasmidhaltige Überstand auf die Säule gegeben und diese zwei mal mit jeweils 30 ml Puffer QC gereinigt. Anschließend erfolgt die Eluierung durch 15 ml Puffer QF sowie die Präzipitation der DNA mittels 10,5 ml Isopropanol. Die DNA wird durch Zentrifugation (15.000xg, 4°C, 30 Minuten) pelletiert, mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000xg für 10 Minuten zentrifugiert (4°C). Der Überstand wird verworfen, die DNA für 10-15 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

3.15.3 Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen

Die transiente Transfektion von Suspensionszellen erfolgt durch LIPOFECTAMINE™ 2000 (LF2000, Invitrogen Life Technologies). Hierbei werden für jeden Transfektionsansatz 8×10^5 Zellen benötigt, die in 500 µl Medium (ohne Antibiotika) in einer 24-Well Platte ausplattiert werden. Für jedes Well werden 1,2 µg DNA in 50 µl OPTI-MEM® I sowie 2 µl LF2000 in ebenfalls 50 µl OPTI-MEM® I resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die DNA-LF2000-Komplexbildung, indem beide Suspensionen miteinander vermischt und für 20 Minuten inkubiert (Raumtemperatur) werden. Dieser Komplex (100 µl) wird nun zur Zellsuspension gegeben, sanft verteilt und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die entsprechenden Versuchsreihen erfolgen 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion.

3.16 Bestimmung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Der Nachweis intrazellulärer reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies erfolgt zum einen mit Hilfe von 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA), durch welches allgemeiner oxidativer Stress gemessen wird, bzw. Dihydrorhodamin 123, der spezifisch •O₂⁻ und NO detektiert. Die Messmethode basiert auf der Umwandlung des entsprechenden nicht fluoreszierenden Farbstoffes zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) bzw. Rhodamin.

H₂DCF-DA wird in die Zellen aufgenommen, das Diacetat durch unspezifische Esterasen deacetyliert und der Farbstoff somit in den Zellen eingeschlossen. In Gegenwart von Peroxidase/H₂O₂, RO₂[·], RO[·], ·OH, HOCl sowie ONOO⁻ wird der Farbstoff in das fluoreszierende DCF umgewandelt. Auch das nicht fluoreszierende Dihydrorhodamin 123 wird in die Zellen

inkorporiert und durch die Anwesenheit von $\bullet\text{O}_2^-$ und NO zu zum fluoreszierenden Rhodamin oxidiert. Beide Fluoreszenzfarbstoffe werden im Fluoreszenzreader bei 530 nm gemessen.

Zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies werden die Zellen mit 50 μM H₂DCF-DA bzw. 10 μM DHR 123 für 40 Minuten vorinkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff aus den Zellen gewaschen. Die Inkubation der Zellen erfolgt in einer 96-Well Platte und je Probe wird eine Vierfach-Messung durchgeführt. Je Well werden 200.000 Zellen in 200 μl Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-CN-2 inkubiert und in definierten Zeitabständen gemessen.

3.17 Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der Zellen im Transelektronenmikroskop werden pro Ansatz 20 x 10⁶ Zellen in 10 ml Kulturmedium angesetzt. Nach der Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugation (350xg, 5 Minuten) geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in einer 1%igen Glutaraldehyl-Lösung (Roth, Karlsruhe) über Nacht bei 4°C fixiert. Die Zellen werden erneut 3 mal für 10 Minuten mit 0,1 M Cacodylatpuffer (mit 0,1 M Sucrose) gewaschen und daraufhin für weitere 2 Stunden auf Eis mit einer 1%igen Osmiumtetroxid-Lösung nachfixiert bzw. kontrastiert. Nach erneutem 2-maligen Waschen mit 0,1 M Sucrose (jeweils für 10 Minuten) werden die Proben zur Blockkontrastierung für 1 Stunde mit 2% wässriger Uranylacetat-Lösung auf Eis inkubiert. Nach der Entfernung des Uranylacetats und anschließender Waschung der Zellen mit 0,1 M Sucrose erfolgt die Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% und noch einmal 100% Ethanolanteil in Wasser. Daraufhin schließt sich die erste Einbettungsstufe mit einer Mischung aus 40% SPURR und 60% Ethanol an. Die Proben werden für 10 Minuten im Exiskator inkubiert. Anschließend erfolgt die 2. Einbettungsstufe mit einer Mischung aus 60% SPURR und 40% Ethanol. Hierbei werden die Proben für 20 Stunden im Exiskator inkubiert. Bei der 3. Einbettungsstufe werden die Proben in 100% SPURR aufgenommen und erneut über Nacht im Exiskator inkubiert. Zur Polymerisation werden die eingebetteten Proben für drei Tage bei 60°C gelagert.

SPURR Einbettungsharz

- 10 g 3,4 Epoxycyclohexylmethyl-34-epoxycyclohexylcarboxylat (ERL 4206)
- 6 g DER
- 26 g Nonenylsuccinic anhydride (NSA)
- 0,2 g Dimethylaminoethanol (DMAE)

Von den Blöckchen werden mit dem Ultramikrotom (Leica UC6) Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70-100 nm angefertigt und auf mit Formvar-beschichtete 75 Mesh Kupfergrids (Plano, Wetzlar) aufgebracht. Die photographische Aufnahme der Proben erfolgte mit Hilfe des Zeiss EM109T-Elektronenmikroskops.

4 E R G E B N I S S E

4.1 *Morphologische Veränderungen durch Einwirkung von APC*

Zur Charakterisierung der Wirkungsweise des synthetischen Phospholipids S-NC-2 wurden in den ersten Versuchsreihen eine Vielzahl von Studien unternommen, welche eine eventuelle Einschränkung der Wachstumsbedingungen, mögliche Veränderungen der Zellmorphologie sowie intrazelluläre Veränderungen aufklären sollten.

4.1.1 APC beeinträchtigen das Zellwachstum

Zunächst stellte sich die Frage, ob das synthetische Phospholipid S-NC-2 einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten von leukämischen Zellen ausübt. Die Klärung dieser Fragestellung sollte mit Hilfe von Wachstumskurven der erythroleukämischen Zelllinie K562 sowie der promyeloischen Zelllinie HL-60 erfolgen (Abb. 23). Hierfür wurden am ersten Tag des Experiments K562 und HL-60 Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 in 1 ml Kulturmedium ausplattiert und für einen definierten Zeitraum beobachtet. Zur genauen Analyse der für die entsprechenden Zellen typischen Wachstumsgeschwindigkeit und als Kontrolle, blieb eine Charge der Proben gänzlich unbehandelt, die restlichen Zellansätze wurden mit steigenden Konzentrationen (1-20 μM) an S-NC-2 kultiviert und für einen Zeitraum von 9 Tagen beobachtet. In einem Abstand von jeweils 24 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in den jeweiligen Ansätzen mit Hilfe des Casy[®]1. Beide Zelllinien zeigten in den Kontrollansätzen ein gesundes, aber unterschiedlich starkes Wachstum (siehe Abb. 23). Während die K562 Zellen bereits nach 7 Tagen ihre Plateau-Phase erreicht hatten, befanden sich die HL-60 Zellen, selbst nach einer Zeit von 9 Tagen in Kultur, immer noch in der Phase des logarithmischen Wachstums. Im allgemeinen konnte jedoch eine Verdoppelungszeit von etwa 24 Stunden dokumentiert werden. Die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 zeigte ebenso offensichtliche Unterschiede in diesen beiden Zelllinien. Deutlich erkennbar ist die hohe Sensitivität der HL-60 Zellen gegenüber der APC-Behandlung. Bereits eine geringe Konzentration von 1 μM zeigte nach 9-tägiger Behandlung eine Wachstumsreduktion um 37%. Höhere Konzentrationen wie 5, 10 oder sogar 20 μM S-NC-2 ließen beinahe keinerlei Wachstum der Zellen zu. Im Vergleich hierzu erwiesen sich die K562 Zellen als weniger sensitiv. Niedrige Konzentrationen im einstelligen Bereich, wie etwa 1 oder 5 μM , führten, im Vergleich zur HL-60 Zelllinie, zu geringen Wachstumseinschränkungen (1 μM : -5%; 5 μM : -23%). Erst eine Konzentration von 10 μM erzielte eine Reduktion der Zellzahl um 44,5% und bei 20 μM S-NC-2 konnte nur noch eine Vervierfachung der K562 Zellkultur nach 9 Tagen Kulturzeit dokumentiert werden.

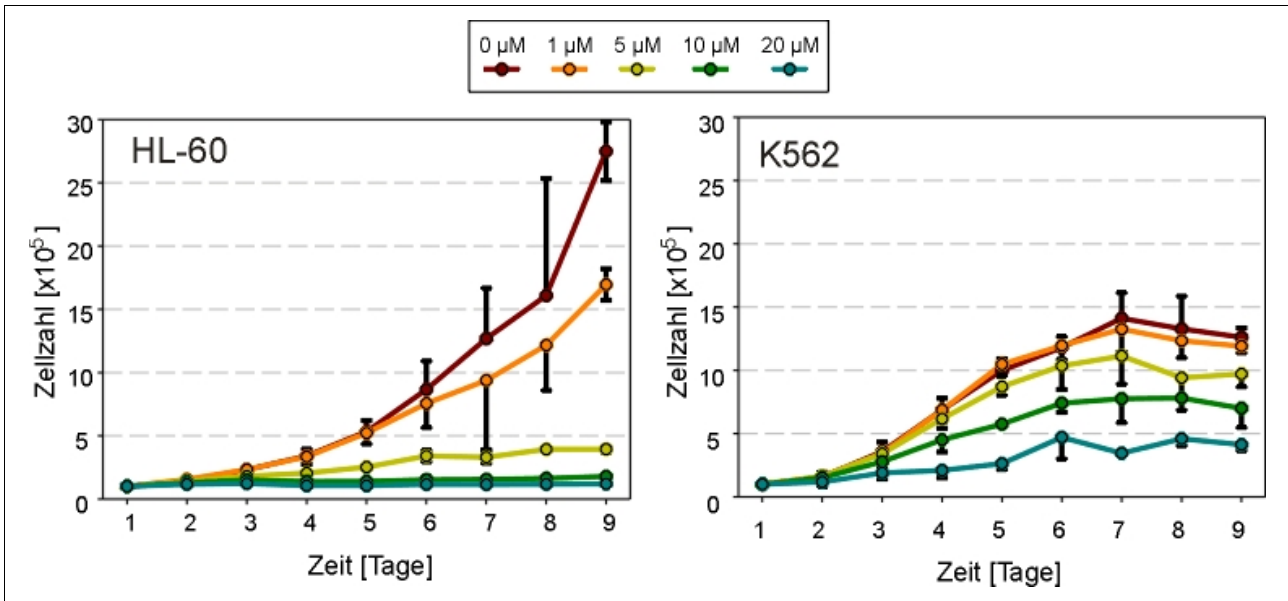


Abb. 23: APC beeinflussen das Wachstum von HL-60 und K562 Zellen

Am Tag 1 wurde je Zelllinie 1×10^5 Zellen mit und ohne S-NC-2 ausplattiert, nach den jeweiligen Zeitpunkten die Zellzahl bestimmt und graphisch aufgetragen. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängige Versuchsreihen.

Im allgemeinen lässt sich anhand der ersten Versuchsreihe zeigen, dass APC, insbesondere S-NC-2, das Zellwachstum leukämischer Zelllinien deutlich beeinträchtigen. Hierbei werden zwei Dinge deutlich sichtbar: zum einen die allgemein stärkere Wachstumsrate der HL-60 Zellen und zum anderen deren hohe Sensitivität gegenüber S-NC-2 Behandlung.

4.1.2 Beobachtung der morphologischen Veränderungen

Da eine deutliche wachstumseinschränkende Wirkung von S-NC-2 demonstriert werden konnte (siehe Abb. 23), war nun interessant herauszufinden, wie sich die Behandlung von Zellen mit dem synthetischem Phospholipid auf deren Zellgestalt auswirkt. Gerade bei den empfindlichen HL-60 Zellen konnte nach der Behandlung mit S-NC-2 eine starke Veränderung der Zelle beobachtet werden. Hierbei demonstrierten die Zellen das für die Apoptose charakteristische „Blebbing“ (Daten nicht gezeigt). Zur genauen Untersuchung der morphologischen Veränderungen, die eine Zelle während 16-stündiger Inkubation mit S-NC-2 durchläuft, wurde HeLa Zellen verwendet. Diese sind aufgrund ihrer Adhärenz für mikroskopische Langzeituntersuchungen besser geeignet als Suspensionszellen. Demnach wurden HeLa Zellen in Chamber-Slides ausplattiert, mit $20 \mu\text{M}$ S-NC-2 behandelt und für einen Zeitraum von 16 Stunden unter dem Mikroskop beobachtet. Alle 10 Minuten erfolgte die photographische Dokumentation des Aussehens der Zelle. In Abb. 24 sind die Veränderungen der Zellen im Stundentakt dargestellt.

Bei HeLa Zellen handelt es sich um eine adhärenz wachsende Zervix-Karzinoma Zellkultur, welche ursprünglich von einer 31-jährigen Frau namens Henrietta Lacks (Baltimore) isoliert wurde. Sie heften sich am Untergrund an und weisen meist eine Spiegellei-ähnliche Struktur auf (Abb. 24, 0h).

Werden diese Zellen nun mit S-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden behandelt, so lassen sich deutliche morphologische Veränderungen beobachten. Zunächst liegt die Zelle noch platt und ausgestreckt vor (Abb. 24, 1h), aber bereits nach einer 2-stündigen Inkubation wird die Zelle schmaler und schmaler, löst ihre Verbindungsstellen am Boden (Abb. 24, 4h), kugelt sich ab (Abb. 24, 5h) und zeigt nach etwa 7 Stunden eine deutliche Blasenbildungen. Nach einem Zeitraum von 16 Stunden Inkubation liegt beinahe jede dritte Zelle abgekugelt und mit Blasen übersät vor. Diese extensive Blasenbildung, das sog. „Membrane Blebbing“, erweist sich als deutliches Anzeichen des programmierten Zelltodes (Apoptose).

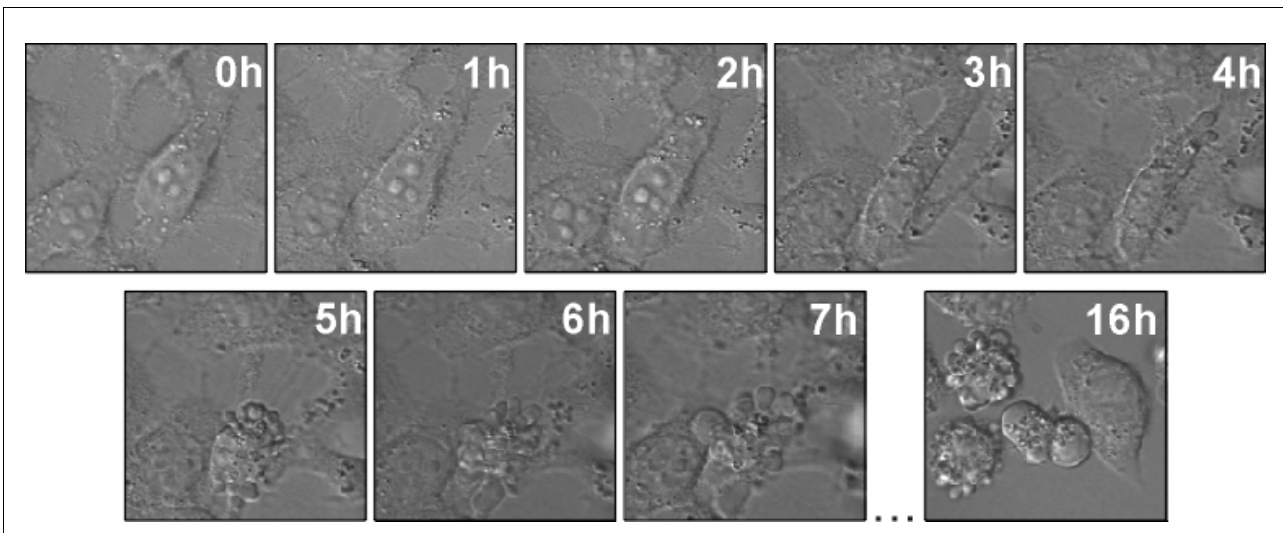


Abb. 24: S-NC-2 induziert morphologische Veränderungen in HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 in Chamber-Slides mit einer Grundfläche von ($1,8 \text{ cm}^2$) ausgesät, am darauffolgenden Tag mit $20 \mu\text{M}$ S-NC-2 behandelt und anschließend auf die vorgeheizte Platte des Zeiss Axiovert S100 Mikroskops platziert. Bei einer 630-fachen Vergrößerung erfolgte alle 10 Minuten die Dokumentation mittels DIC-Bildern. In dieser Abbildung werden jeweils die morphologischen Veränderungen im Stundentakt wiedergegeben. DIC: digitaler Interferenzkontrast

Für eine genauere Beobachtung intrazellulärer Ereignisse nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 wurden Jurkat Wildtyp Zellen für einen Zeitraum von 16 Stunden mit dem synthetischen Phospholipid inkubiert und anschließend mit Hilfe des Elektronenmikroskops studiert (Abb. 25). Unbehandelte Jurkat Zellen weisen eine runde Struktur auf. Auf ihrer Außenseite tragen sie zahlreiche Zellfortsätze, die sog. Filopodien, welche sich wie kleine Ärmchen in alle Richtungen strecken (Abb. 25A). Nach 16-stündiger Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ S-NC-2 konnte eine starke Abkuglung der Zellen sowie ein Verlust der Zellfortsätze beobachtet werden. Weiterhin zeigten die Zellen eine starke Kondensation des Chromatins, was deutlich an den beinahe schwarzen runden Flecken zu erkennen ist (siehe rote Pfeile Abb. 25B). Ein funktioneller Zellkern war in den betroffenen Zellen nicht mehr detektierbar. Ein weiteres, sehr auffälliges Merkmal ist die starke „Vakuolenbildung“ in den Zellen (siehe gelbe Pfeile Abb. 25B). Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ S-NC-2 wurden diese Merkmale jedoch nur bei einem Teil der

Zellen beobachtet. Eine weitere Steigerung der S-NC-2 Konzentration auf 20 μM zeigte eine deutliche Veränderung der Zellform (Abb. 25C). Diese war nicht mehr kugelrund, sondern wies eindeutige Ausstülpungen auf. Auch eine gesteigerte Zahl an Vakuolen konnte beobachtet werden. Bei den elektronenmikroskopischen Bildern handelt es sich um Momentaufnahmen. Es wurde jedoch versucht, möglichst repräsentative Zellen auszuwählen.

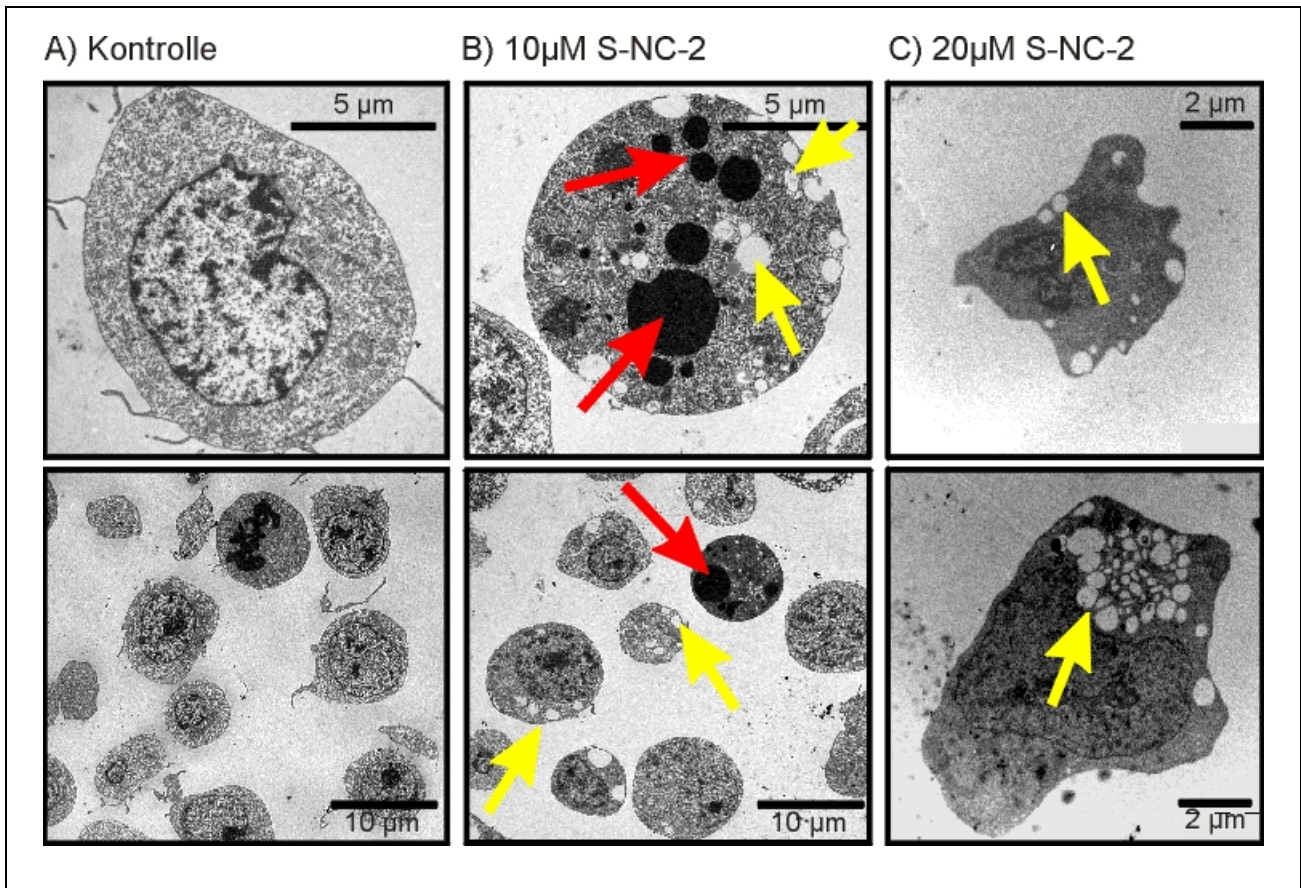


Abb. 25: Elektronenmikroskopische Beobachtung von Jurkat Zellen

Jurkat Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 für 16 Stunden behandelt und anschließend mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. Die genauen Konzentrationen und Vergrößerungen sind in der Abbildung wiedergegeben. Die roten Pfeile deuten auf starke Chromatin-Kondensation, die gelben Pfeile auf die Vakuolisierung der Zelle hin.

4.2 Aufnahme und Metabolismus von APC

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte der negative Einfluss des synthetischen Phospholipids S-NC-2 auf leukämische Zellen mikroskopisch in unterschiedlichen Zelllinien dargestellt werden. Als nächster Schritt sollte die Menge an aufgenommenem Lipid bestimmt werden, um eine mögliche Parallele in Aufnahmemenge und Beeinflussung der Zelle aufklären zu können.

4.2.1 Aufnahmekinetik

Die genaue Ermittlung der aufgenommenen Menge an synthetischem Phospholipid erfolgte mit Hilfe der radioaktiv markierte Verbindung [^{14}C]-R-NC-2, welches das [^{14}C] im Essigsäurerest trägt. Die Aufnahmekinetik erfolgte in den vier Zelllinien BJAB, Jurkat, K562 und SKW6.4, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit immer wieder für die Klärung unterschiedlicher Fragestellungen eingesetzt werden. Das Ziel der Untersuchung bestand zum einen in der Ermittlung von Unterschieden in der Aufnahmemenge und zum anderen in der Bestimmung der zeitlichen Abfolge der Lipid-Inkorporation. Ein Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander sollte einen möglichen Hinweis auf deren unterschiedliche Sensitivität gegenüber des synthetischen Lipids ermöglichen. Für diese Versuchsreihe wurden die vier verschiedenen leukämischen Zelllinien Jurkat, BJAB, K562 und SKW6.4 mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml Medium angesetzt und mit jeweils $0,05 \mu\text{Ci}$ [^{14}C]-R-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert (Abb. 26). Die verwendete Menge von $0,05 \mu\text{Ci}$ [^{14}C]-R-NC-2 entspricht etwa einer Konzentration von $7 \mu\text{M}$ im Versuchsansatz, wodurch keine weitreichende toxische Wirkung auf die Zellen ausgeübt werden sollte.

Zur Ermittlung der in die Zellen aufgenommenen Menge des Lipids wurden diese durch Zentrifugation vom Medium getrennt und ein Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität in den unterschiedlichen Fraktionen Medium, Zellpellet und Wasch-PBS, indem jede separat in Szintillations-Flüssigkeit aufgenommen und anschließend im β -Counter gemessen wurde. Die Summe der drei Fraktionen wurde gleich 100% gesetzt und die jeweiligen Anteile berechnet. Da durch den Wasch-Schritt mit PBS keine signifikanten Mengen des radioaktiven Lipids von den Zellen gewaschen werden konnte, sind in Abb. 26 lediglich die Messergebnisse der Zellen bzw. des Mediums dargestellt.

Die Aufnahme von [^{14}C]-R-NC-2 erfolgte zeit- und zelltyp-abhängig (siehe Abb. 26). Hierbei wird deutlich, dass innerhalb von 16 Stunden die BJAB Zellen die größte Menge des radioaktiven Lipids inkorporierten ($68,1\% \pm 12,5\%$). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Jurkat mit $29\% (\pm 4,9\%)$ und K562 mit $27,4\% (\pm 6,1\%)$ nur etwa ein Drittel der angebotenen Menge an Lipid aufnahmen. Die SKW6.4 Zellen erreichten wiederum eine Aufnahme von $44,3\% (\pm 8,7\%)$.

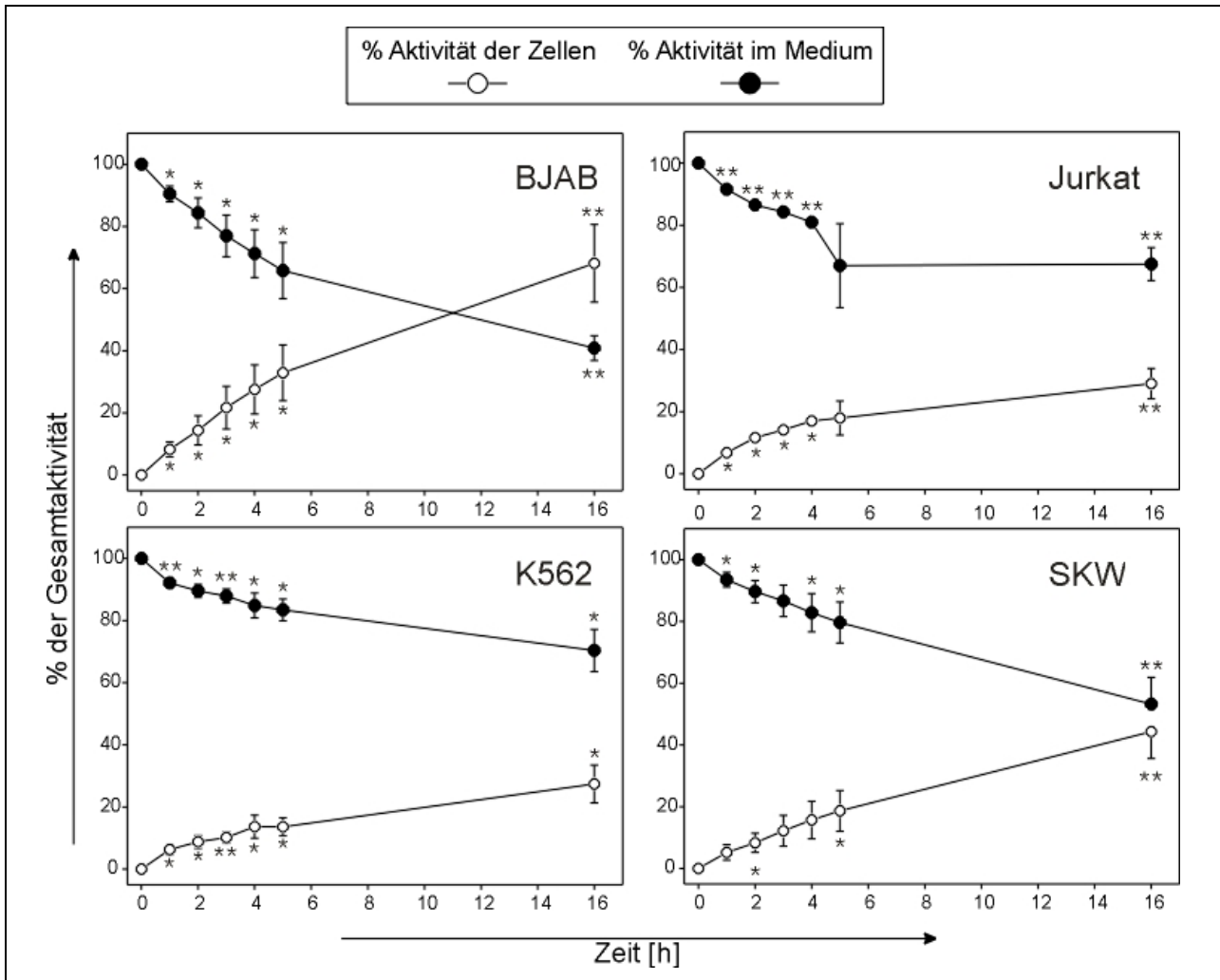


Abb. 26: Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ in unterschiedlichen leukämischen Zelllinien

Zur Ermittlung der inkorporierten Menge an synthetischem Phospholipid wurde standardmäßig jede Probe mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium angesetzt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit $0,05 \mu\text{Ci}$ $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ sowie die Bestimmung der Radioaktivität im Zellpellet, Medium und Wasch-PBS. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen dar, welche jeweils in Doppeltansätzen durchgeführt wurden ($n = 3$, [*] $p < 0,01$; [**] $p < 0,001$). Die statistische Signifikanz der einzelnen Messpunkte ist jeweils auf die Kontrolle bezogen.

4.2.2 Stoffwechsel und Metabolismus von $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$

Ein charakteristisches Merkmal der bisher beschriebenen synthetischen Phospholipide ist ihre Resistenz gegenüber einem metabolischen Abbau. Nach ihrer Aufnahme in die Plasmamembran der Zelle kommt es aufgrund ihrer Persistenz zu einer Akkumulation der Lipide in diesem Kompartiment, welches somit den primären Wirkungsort dieser Substanzen darstellt.

In Zellmembranen liegen eine Reihe phospholipid-metabolisierender Enzyme vor, daher sollte in den folgenden Versuchen die Resistenz des $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ gegenüber diesen Enzymen in den hier verwendeten Zelllinien untersucht werden. Die im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit synthetisierten und in Kap 2.1 (Abb. 2) eingeführten Lipide wurden mit dem Ziel einer höheren Halbwertszeit synthetisiert (Massing *et al.*, 1994; Matzke, 1999). Dies sollte durch den Einbau

unterschiedlicher funktioneller Gruppen erreicht werden, welche den Angriffspunkt für Enzyme wie z. B. Phospholipase A₂ blockieren. Im Vergleich zu normalen Phospholipiden zeigen die hier verwendeten Alkylphosphocholine nur schlechte Substrateigenschaften für Phospholipasen (Massing *et al.*, 1994).

Da bislang der metabolische Umbau nur in HL-60 Zellen untersucht wurde, sollten im Rahmen dieser Versuchsreihe die für diese Arbeit relevanten Zelllinien getestet werden. Um jedoch einen Überblick über die Lipide in der Zelle zu erlangen, wurden zunächst kommerziell erwerbliche Lipidstandards mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit extrahierten Lipiden von Jurkat, BJAB und K562 Zellen verglichen. Durch die Kupfersulfat-Färbung können die unterschiedlichen Lipide auf der Dünnschichtplatte visualisiert werden. Ein Beispiel für diese Färbung ist in Abb. 27 und Abb. 28 dargestellt.

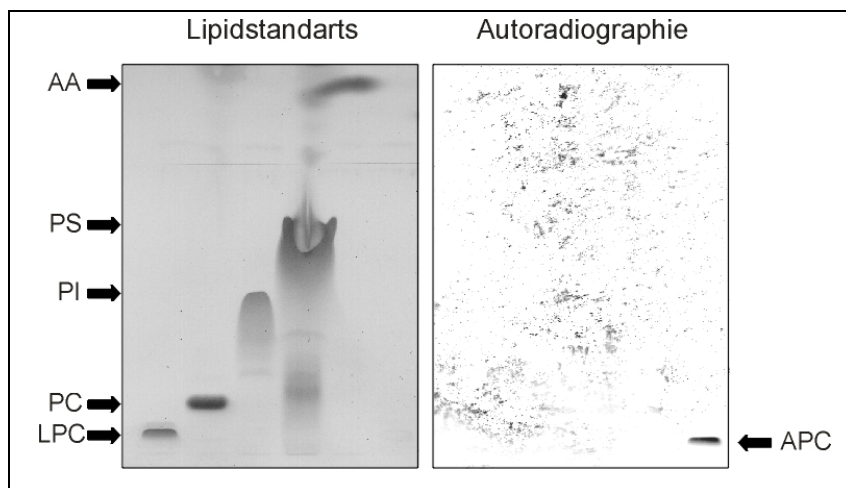


Abb. 27: Lipidstandarts.

Zur Untersuchung des Laufverhaltens der verschiedenen Lipidstandarts wurden jeweils 20 µg der einzelnen Lipide aufgetragen. LPC: Lysophosphatidylcholin, PC: Phosphatidylcholin, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, AA: Arachidonsäure, APC: Alkylphosphocholin (¹⁴C]-R-NC-2).

In Abb. 27 sind die unterschiedlichen Lauffronten der Lipidstandarts dargestellt. Die Bande des Alkylphosphocholins [¹⁴C]-R-NC-2 läuft auf der gleichen Höhe wie Lysophosphatidylcholin (LPC), ist jedoch durch die Kupfersulfat-Färbung nur schwer zu visualisieren. Für die Detektion von [¹⁴C]-R-NC-2 wird nach der Auftrennung eine Autoradiographie der Dünnschichtplatten durchgeführt. An der Stelle der radioaktiven Substanz zeigt der Film eine Schwärzung.

Das Bandenmuster konventioneller Lipidextrakte der unterschiedlichen Zelllinien ist in Abb. 28 dargestellt. Hierfür wurden sämtliche Lipide der Zelle aus 2 x 10⁶ Zellen isoliert, per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und durch Kupfersulfat sichtbar gemacht.

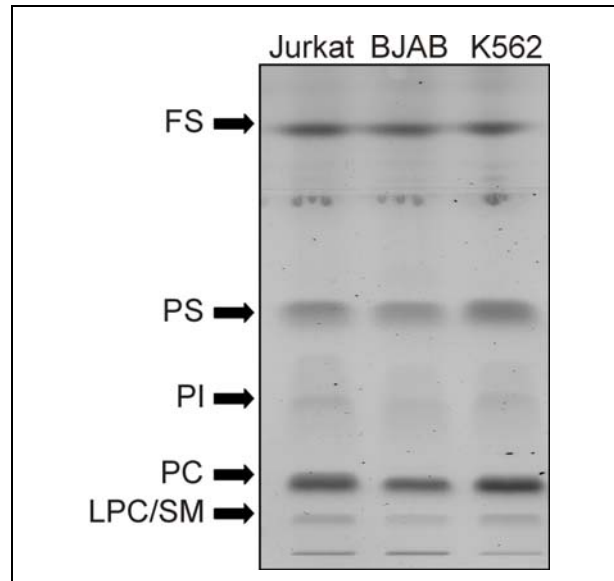


Abb. 28: Darstellung einer typischen Lipidverteilung in unterschiedlichen Zelllinien

Die Lipidextrakte von Jurkat, BJAB und K562 wurden dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und anschließend mit Hilfe von Kupfersulfat sichtbar gemacht (SM: Sphingomyelin).

Ein charakteristisches Merkmal der Struktur von APC-Molekülen ist deren schlechte Verstoffwechslung. Zur genauen Ermittlung, ob das APC [^{14}C]-R-NC-2 in bestimmten Zellen einem Ab- bzw. Umbau unterworfen ist, wurden Jurkat, BJAB, K562 und SKW6.4 Zellen erneut mit $0,05\ \mu\text{Ci}$ [^{14}C]-R-NC-2 für einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert (Abb. 29). Um zu gewährleisten, dass in allen zu untersuchenden Proben die gleiche Anzahl an Zellen vorliegt, wurden je Probe 1×10^6 Zellen in 4 ml Medium angesetzt und der jeweilige Inkubationsstart so gewählt, dass alle Proben gleichzeitig geerntet werden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Extraktion sämtlicher zellulärer Lipide sowie deren dünnenschichtchromatographische Auftrennung und anschließender Visualisierung des radioaktiven [^{14}C]-R-NC-2 mittels Autoradiographie. In Abb. 29 sind nur die Ergebnisse der Autoradiographie dargestellt. Es wurde auf die Darstellung der Lipidverteilung in den einzelnen Zellen mittels Kupfersulfat-Lösung verzichtet, da in keiner der Zelllinien ein Unterschied in den Bandenmustern festgestellt werden konnte.

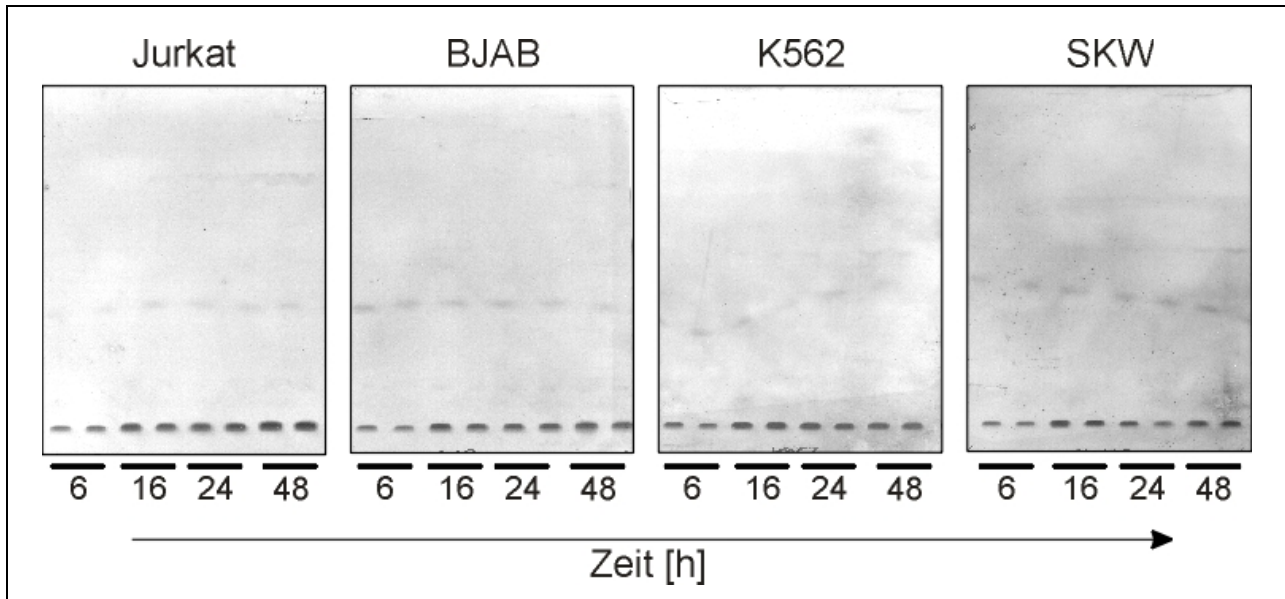


Abb. 29: Untersuchungen zum Stoffwechsel von $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$.

Je Probe werden zu Anfang 1×10^6 Zellen in 4 ml Medium ausplattiert und für die angegebene Zeit mit $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ inkubiert. Anschließend erfolgt die Extraktion der gesamten zellulären Lipide, welche danach dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt werden. Das radioaktiv markierte R-NC-2 wird mit Hilfe der Autoradiographie visualisiert.

Die Ergebnisse der Abb. 29 zeigen in allen 4 Zelllinien eine zeitabhängige Zunahme der Bandenintensität, was auf die zeitabhängige Einlagerung von $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ in die Zelle zurückzuführen ist, die bereits in Abb. 26 dargestellt wurde. Bei genauer Betrachtung der Autoradiographie konnte kein deutlicher Ab- bzw. Umbau des Lipids beobachtet werden. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen trat allerdings eine zusätzliche, sehr schwache Bande auf, welche auf ein eventuell sehr geringes Maß an Verstoffwechslung deutet. Da jedoch keine weiteren Banden durch Autoradiographie ermittelt wurden, ist anzunehmen, dass $[^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ während der untersuchten 48 Stunden keinem gravierenden Abbau durch zelluläre Phospholipasen ausgesetzt ist – es handelt sich um ein stabiles Lipid.

4.2.3 Mögliche Hemmung der Aufnahme durch Suramin?

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Kap. 4.2.1 - 4.2.2) zeigen eine deutliche Aufnahme des APC in die getesteten Zellsysteme. Hieraus resultiert die interessante Frage, wie APC in die Zellen aufgenommen werden. Dies ist bis zum heutigen Zeitpunkt eine sehr umstrittene Frage, da zum einen die Aufnahme via Endozytose diskutiert, auf der anderen Seite allerdings eine aktive Aufnahme über spezifische Oberflächenproteine nicht ausgeschlossen wird (Bazill *et al.*, 1990; Fleer *et al.*, 1993; Mollinedo *et al.*, 1997). Zur Untersuchung der möglichen Beteiligung spezifischer Oberflächenproteine demonstrierte die Arbeitsgruppe um Mollinedo, dass die Aufnahme sowie die Apoptose-induzierende Wirkung von Et-18-OCH₃ durch gleichzeitige Behandlung mit Suramin verhindert werden kann (Mollinedo *et al.*, 1997). Suramin ist ein polyanionisches

Naphthalensulfonsäure-Derivat, welches als allgemeiner Inhibitor von Ligand-Rezeptor-Interaktionen fungiert. Zusätzlich wirkt es als Entkoppler von G-Protein-Rezeptor-Verbindungen, hemmt die Phospholipase D und inhibiert die Zelloberflächenbindung von EGF, PDGF und TNF- α (www.sigma-aldrich.com).

Um eine mögliche Beteiligung von Oberflächenproteinen im Zusammenhang mit der [^{14}C]-R-NC-2-Aufnahme zu untersuchen, sollten Zellen mit Suramin und [^{14}C]-R-NC-2 co-inkubiert werden. Hierfür erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation der Jurkat und BJAB Zellen mit 70 bzw. 140 μM Suramin und anschließend für 16 Stunden eine Behandlung mit 0,05 μCi [^{14}C]-R-NC-2. Die Zellen wurden daraufhin durch Zentrifugation geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend die Menge an Radioaktivität im Medium, PBS und im Zellpellet durch Szintillations-Messung bestimmt. Die Summe der drei Fraktionen wurde erneut gleich 100% gesetzt und die Verteilung der einzelnen Fraktionen prozentual errechnet (Abb. 30). Die Ergebnisse setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchsreihen zusammen, die jeweils in doppeltem Ansatz bestimmt wurden.

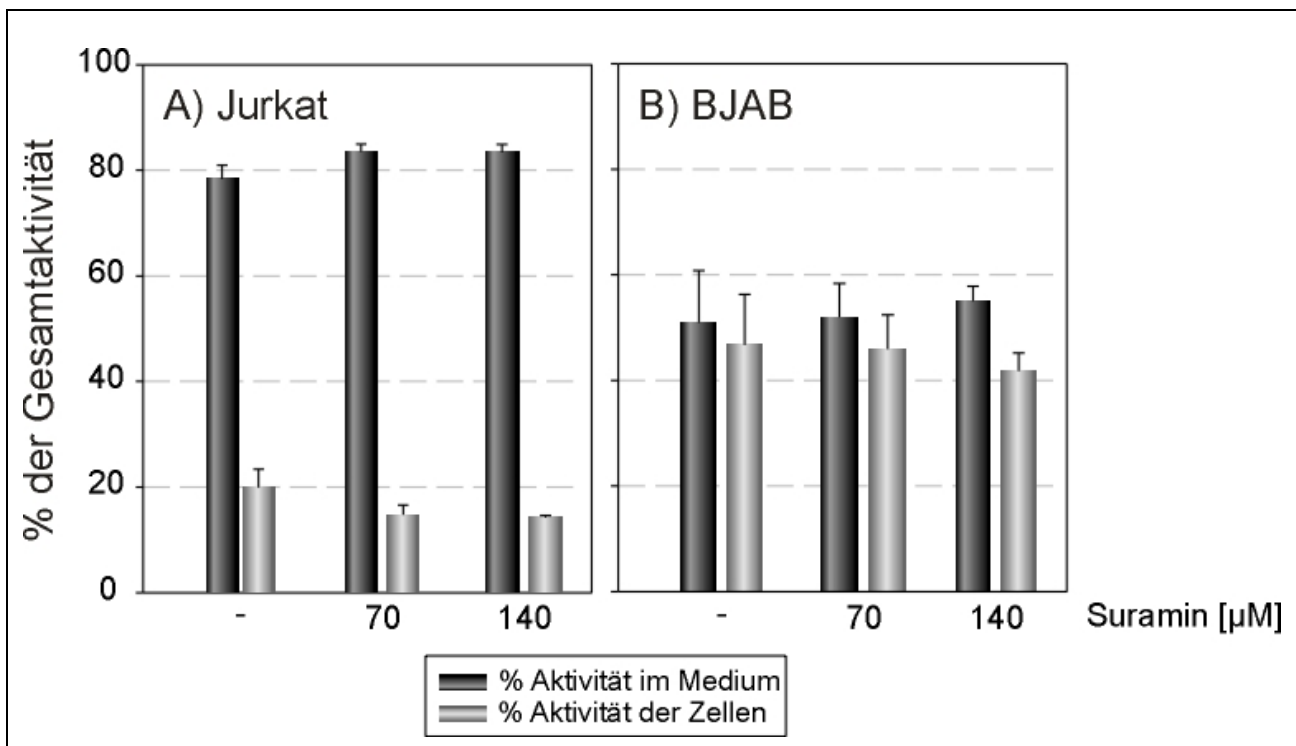


Abb. 30: Suramin führt nicht zur Aufnahmeminderung von [^{14}C]-R-NC-2 in Jurkat und BJAB Zellen

Zur Überprüfung einer möglichen Bindung von [^{14}C]-R-NC-2 an zelluläre Oberflächenproteine wurden je Probe 2×10^6 Zellen mit 70 bzw. 140 μM Suramin für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 16 Stunden mit 0,05 μCi [^{14}C]-R-NC-2 behandelt. Die Graphik zeigt die Menge an Radioaktivität im Medium sowie im Zellpellet in (A) Jurkat und (B) BJAB Zellen.

In Abb. 30 zeigen ohne Suramin vorbehandelte Proben (-) die für Jurkat und BJAB Zellen charakteristische Aufnahmemenge des radioaktiven Lipids, die bereits in Abb. 26 dargestellt wurden. Wiederum inkorporieren Jurkat Zellen deutlich weniger [^{14}C]-R-NC-2 ($19,9\% \pm 3,5\%$) als

die BJAB Zelllinie ($46,7\% \pm 9,6\%$). Eine zusätzliche Behandlung mit 70 bzw. 140 μM Suramin zeigte eine geringe, jedoch keine deutliche Verminderung der Aufnahme des radioaktiven APC. In Jurkat Zellen konnte eine Reduktion der [^{14}C]-R-NC-2-Aufnahme je nach Suramin-Konzentration um 5,2 – 5,7% beobachtet werden. Dies zeigte sich auch teilweise in einem zweiten Zellsystem, den BJAB Zellen. Hier konnte bei einer Konzentration von 70 μM Suramin keine Hemmung der Menge an [^{14}C]-R-NC-2 in den Zellen detektiert werden, nur 140 μM Suramin führte zu einer Verminderung der Radioaktivität im Zellpellet um 4,9%.

4.3 S-NC-2 induziert Apoptose in leukämischen Zellen

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen kristallisierte sich heraus, dass eine Behandlung leukämischer Zellen mit dem APC S-NC-2 zu einer Beeinträchtigung des Wachstumsverhaltens (Abb. 23) sowie zu Veränderungen in der Zellmorphologie führt (siehe Abb. 24 & 25). Diese Ereignisse führen letztendlich zum Tod der Zellen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden drei Arten des Zelltodes beschrieben, der programmierte Zelltod (Apoptose), die Nekrose und die Autophagie. Während apoptotische Prozesse auf die Aktivierung von Caspasen zurückzuführen sind, erweisen sich Signalwege, die zum nekrotischen Zelltod führen, noch als weitgehend ungeklärt (Holler *et al.*, 2000). Bereits in anderen Studien zu synthetischen Lipiden, wie etwa den ALP oder den APC, konnte eine Apoptose-induzierende Wirkung dieser Substanzen festgestellt werden (Mollinedo *et al.*, 1997; Jendrossek *et al.*, 1999; Gajate *et al.*, 2000a; Gajate *et al.*, 2000b; Matzke *et al.*, 2001; Jendrossek *et al.*, 2003).

Die folgenden Versuchsreihen dienten somit zur genauen Charakterisierung der Art des induzierten Zelltods, hervorgerufen durch das synthetische Lipid S-NC-2.

4.3.1 S-NC-2 induziert eine Externalisierung von Phosphatidylserin

Ein charakteristisches Merkmal gesunder, vitaler Zellen ist eine bestimmte Asymmetrie der Membranlipide. Hierbei sind z. B. Phosphatidylcholin (PC) sowie Sphingomyelin vorwiegend auf der Außenseite lokalisiert, während Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) hauptsächlich auf der Innenseite der Zellmembran aufzufinden sind. Die Phospholipid-Asymmetrie ist recht stabil und wird normalerweise durch eine Aminophospholipid-Translokase aufrecht erhalten, die spezifisch und energieabhängig PE und PS von außen nach innen transportiert (Diaz *et al.*, 1996; Gleiss *et al.*, 2002). Durch einen apoptotischen Stimulus wird diese Asymmetrie der zellulären Membran jedoch unterbrochen, wobei weitere Lipid-Transporter, die sog. „Scramblases“, beteiligt sind, indem sie unspezifisch Phospholipide zwischen beiden Monolayern hin und her bewegen (Zwaal *et al.*, 2005). Hierbei „springt“ auch das PS auf die Außenseite der Membran. PS wird von phagozytierenden Zellen mittels des PS-Erkennungs-Rezeptors erfasst,

dient dadurch als „Iss-mich“ Signal und führt somit zur Eliminierung apoptotischer Zellen im Organismus.

Die Externalisierung von PS wird als frühes Anzeichen des apoptotischen Zelltods beschrieben. Zur Ermittlung der Art des induzierten Zelltods via S-NC-2 sollte nun geklärt werden, ob S-NC-2 eine Umverteilung dieses Membranlipids hervorruft. Ragt PS nach der Inkubation in den extrazellulären Raum, so kann es spezifisch mit Annexin V, einem 35-36 kDa großes, Ca^{2+} -abhängigen, Phospholipid-bindenden Protein markiert werden, welches eine sehr hohe Affinität zu PS aufweist. Es bindet an Zellen, die PS auf der Außenseite tragen und repräsentiert somit einen sensitiven Marker für apoptotische Zellen. Zur besseren Identifizierung apoptotischer Zellen ist Annexin V an das Fluorochrom Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und zeigt nach spezifischer Anregung eine grüne Fluoreszenz. Zur Unterscheidung zwischen apoptotisch und nekrotisch werden die Zellen mit einem zweiten Farbstoff, dem Propidiumiodid (PI) gegengefärbt, welcher aufgrund seiner Größe intakte Membranen nicht durchqueren kann. Er bindet somit nur an DNA nekrotischer Zellen, die durch eine poröse Plasmamembran für den Farbstoff zugänglich werden (Abb. 31).

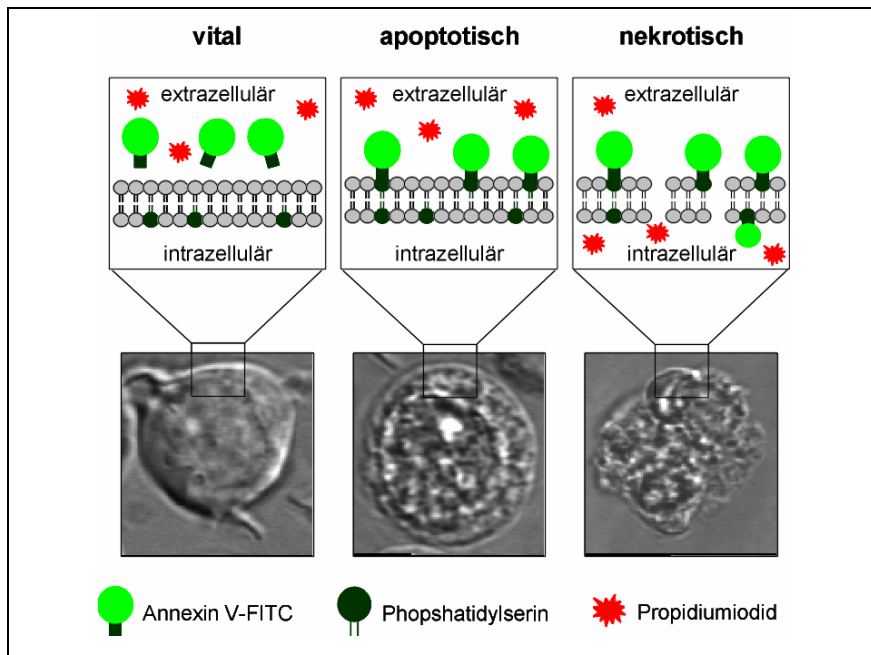


Abb. 31: Schematische Darstellung der Annexin-V/PI-Färbung

Die Unterscheidung apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen erfolgt mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen: Annexin V und PI. Während Annexin V-FITC spezifisch an Phosphatidylserin bindet, färbt PI die zelluläre DNA nekrotischer Zellen. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran und nach innen gerichtetem Phosphatidylserin können von keinem der Farbstoffe angefärbt werden.

Zur Untersuchung der PS-Externalisierung nach S-NC-2 Behandlung wurden Jurkat Zellen für 1 bzw. 16 Stunden mit $20 \mu\text{M}$ S-NC-2 inkubiert, anschließend mit Annexin V sowie PI angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 32

dargestellt und zeigen bereits nach 1-stündiger Inkubation mit 20 μM S-NC-2 eine erhöhte Anzahl an Annexin V positiven (apoptotischen) Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der charakteristische grüne Ring um die Zellen deutet auf die Externalisierung von PS und somit auf eine Initiation der Apoptose hin. Zur besseren Übersicht der Anzahl gefärbter Zellen wurden Aufnahmen mit geringer Vergrößerung (100-fach) anfertigt. Hier kann ebenfalls eine Erhöhung der Anzahl grün-gefärbter Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

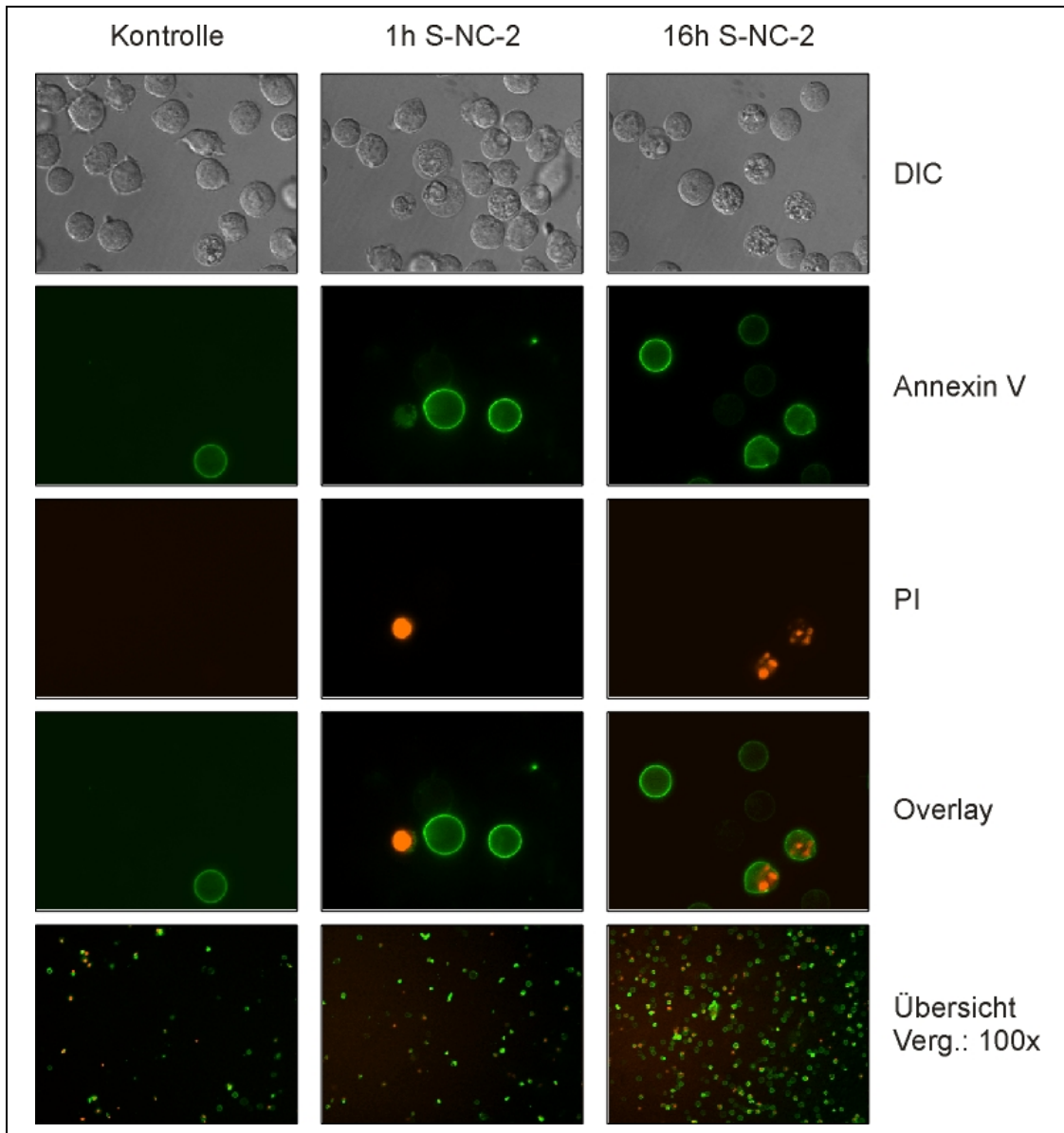


Abb. 32: Externalisierung von Phosphatidylserin

Zur Untersuchung der PS-Externalisierung wurden Jurkat Zellen, in spezifischen Bindungspuffer aufgenommen, mit Annexin V und PI inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bilder ohne Größenbezeichnung stellen eine 630-fache Vergrößerung dar.

Die weitere Steigerung der Inkubationszeit auf 16 Stunden resultiert in einer erneuten Erhöhung Annexin V positiver Zellen. Zusätzlich können auch PI-gefärbte Zellen beobachtet werden, was

teilweise auf Nekrosen schließen lässt. In diesem Fall muss aber beachtet werden, dass es sich bei den Untersuchungen um ein *in vitro* Modell handelt. Dies bedeutet, dass apoptotische Zellen hier nicht durch Makrophagen aus dem System eliminiert werden und es sich somit um eine post-apoptotische Nekrose handeln könnte. Die Ergebnisse zeigen dessen ungeachtet deutlich, dass Jurkat Zellen nach einer Behandlung mit S-NC-2 klare Anzeichen eines apoptotischen Zelltods aufweisen.

Die quantitative Erfassung der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte mit durchflusszytometrischen Analysen. Hierbei wurden die Zellen wiederum nach erfolgter S-NC-2 Behandlung mit Annexin V und PI angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer (FACS: fluoreszenzaktivierter Zellsortierer) gemessen. Mit Hilfe dieser Messung kann eine quantitative Verteilung von 4 Zellpopulationen erstellt werden, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbung, nämlich ungefärbt (vital), Annexin V (apoptotisch), PI (nekrotisch) sowie PI und Annexin (nekrotisch), in 4 Quadranten eingeteilt werden. In Abb. 33 sind unterschiedliche Punktwolken-Auswertungen einer FACS-Analyse von Jurkat Zellen dargestellt. Jeder Punkt des Datenblatts entspricht einer Zelle. Es werden je Messung 10.000 Zellen gezählt.

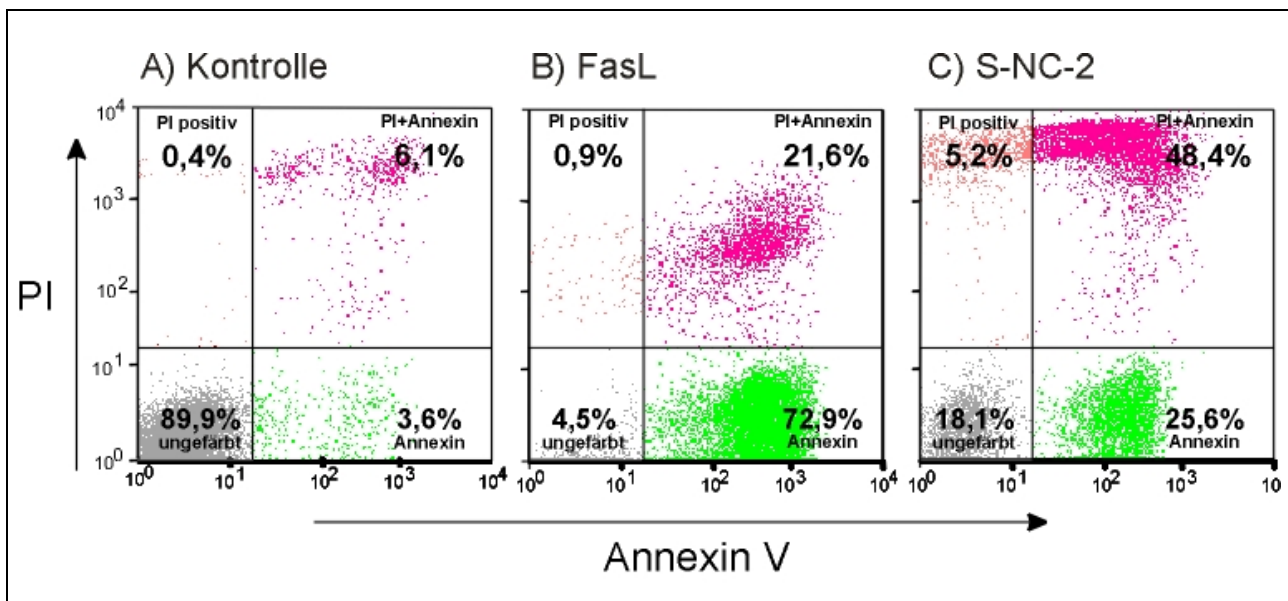


Abb. 33: Darstellung einer Punktwolken-Analyse der Annexin V – PI Messung

Zum besseren Verständnis der Annexin V – PI Auswertung werden in dieser Abbildung typische Dot-Plot Analysen der FACS-Messung dargestellt. Die vier Quadranten geben quantitativ die Verteilung der unterschiedlich gefärbten Zellen wieder. In diesem Fall wurden Jurkat Zellen für 16 Stunden mit Ethanol (A) bzw. 10 μ M S-NC-2 (C), sowie für 1 Stunde mit Fas-Ligand (0,1 μ g/ml) und Fas-Enhancer (1 μ g/ml) (B) behandelt.

Abb. 33A zeigt die Verteilung einer typischen Kontrolle, wobei die meisten Zellen (ca. 90%) ungefärbt, also vital sind. Werden Jurkat Zellen jedoch mit Fas-Ligand (FasL), dem natürlich vorkommenden Liganden des Fas-Todesrezeptors (CD95), also einem sehr starken Initiator der

Apoptose inkubiert, kann innerhalb nur einer Stunde eine sehr große Fraktion (73%) apoptotischen Zellen detektiert werden (Abb. 33B). Durch die Behandlung der Zellen mit 10 μM S-NC-2 zeigt sich ebenfalls, dass ca. ein Viertel der Zellen nach 16-stündiger Inkubation Annexin V positiv, also apoptotisch ist (Abb. 33C). Zusätzlich ist jedoch ein großer Anteil an doppelt gefärbten Zellen erkennbar. Dies ist wahrscheinlich, wie bereits zuvor beschrieben, auf eine post-apoptotische Nekrose zurückzuführen, die sich in einem Zeitraum von 16 Stunden abspielen kann. Zellen, die bereits apoptotisch waren, jedoch aus dem *in vitro* System durch die fehlende Beteiligung phagozytierender Zellen nicht beseitigt werden, verlieren nach einem längeren Zeitraum die Integrität ihrer Plasmamembran und werden löchrig. In diesem Fall kann PI in die Zelle eindringen und deren DNA anfärben.

Die quantitative Analyse der Annexin V – PI Färbung von Jurkat bzw. BJAB Zellen ist in Abb. 34 gezeigt. Hierbei ist die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Quadranten graphisch mit Hilfe eines Balkendiagramms dargestellt, wobei die doppelt sowie die nur PI-gefärbten Zellen unter dem Begriff Nekrose zusammengefasst wurden. Die ausgewählte Inkubationszeit von 16 Stunden ergab sich zum einen aus den Ergebnissen der Aufnahmekinetik (Abb. 26), welche eine maximale Inkorporation der Lipide nach 16 Stunden zeigten. In Abb. 34 wird die Dosis-Wirkungsbeziehung steigender Konzentration an S-NC-2 auf deren PS-externalisierende Wirkung untersucht.

Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass in Jurkat als auch in BJAB Zellen bereits eine Konzentration von 5 μM S-NC-2 eine Fraktion von 10% Annexin V positiven Zellen hervorruft. Eine weitere Steigerung der Lipid-Konzentration auf 10 μM führt in Jurkat Zellen zu einer erneuten Erhöhung der apoptotischen Zellen auf 20%. Die erneute Steigerung der Konzentration auf 20 bzw. 50 μM S-NC-2 bewirkt auch einen deutlichen Anstieg der doppelt gefärbten, nekrotischen Zellen-Population (Abb. 34A).

In BJAB Zellen zeigt der Dosis-Wirkungsverlauf ein etwas anderes Erscheinungsbild (Abb. 34B). Hierbei führt eine Erhöhung der S-NC-2 Konzentration lediglich zu einem deutlichen Anstieg der nekrotischen Zellen, wobei die Zellen weniger sensitiv auf das synthetische Phospholipid reagieren als die Jurkat Zelllinie. Dies geht aus einem höheren Anteil ungefärbter BJAB Zellen hervor.

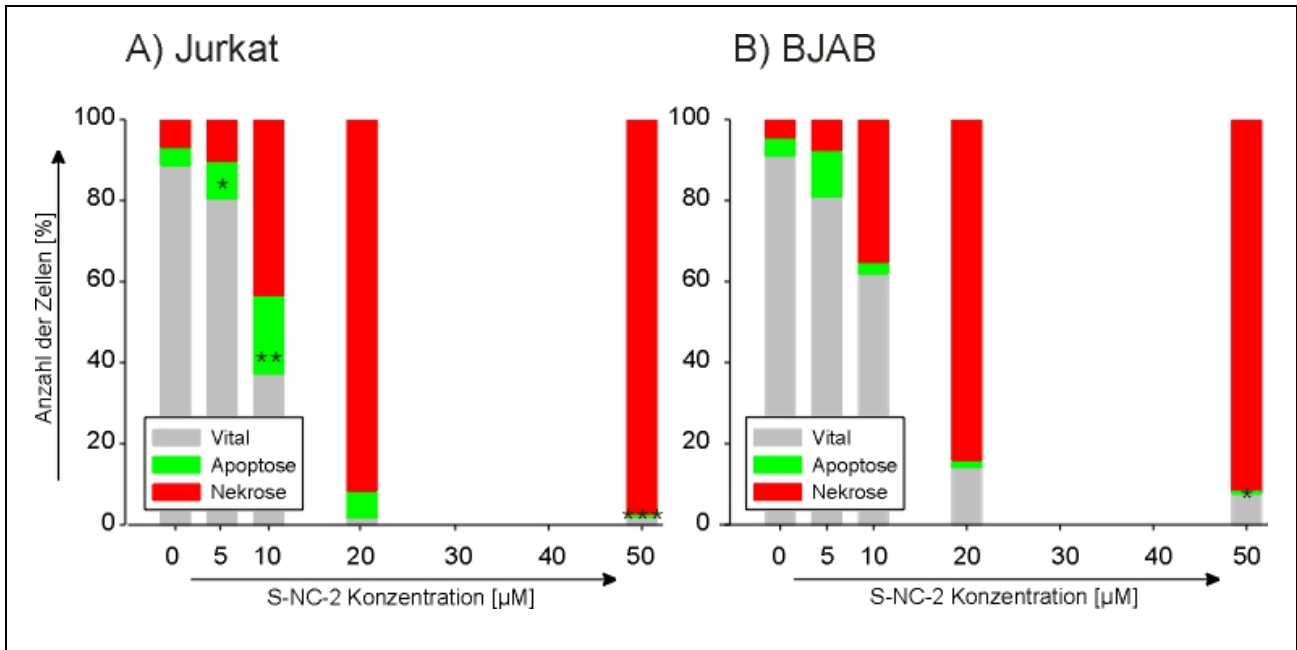


Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse der Annexin V – PI Färbung

Zur quantitativen Erfassung apoptotischer, nekrotischer und vitaler Fraktionen wurden Jurkat (A) und BJAB Zellen (B) für einen Zeitraum von 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 inkubiert und nach erfolgter Färbung mit Annexin V und PI Anteile mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Der Anteil an PI positiven sowie doppelt gefärbten Zellen wird unter dem Begriff Nekrose zusammengefasst. Jeder Messbalken stellt einen Mittelwert aus 4 (Jurkat) bzw. 3 (BJAB) unabhängigen Versuchsreihen dar. Die statistische Signifikanz der apoptotischen Zellen bezieht sich jeweils auf die Kontrolle der jeweiligen Messung ([*] $p < 0,05$; [**] $p < 0,01$; [***] $p < 0,001$).

Die Ergebnisse der Annexin V – PI Analyse zeigen deutlich, dass S-NC-2 eine Externalisierung des Membranlipids PS induziert und somit eine Apoptose-induzierende Eigenschaft besitzt. Wie dieses synthetische Phospholipid jedoch den apoptotischen Prozess in Gang setzt und welche weiteren Signalwege in diesem Verlauf von Wichtigkeit sind, soll in den folgenden Versuchsreihen ermittelt werden.

4.3.2 Aktivierung der Caspasen-Kaskade

Eine zentrale Rolle während der Apoptose spielt ein Netzwerk von Cystein-Proteasen, die sog. Caspasen. Caspasen liegen als inaktive Pro-Formen in der Zelle vor und werden durch einen apoptotischen Stimulus aktiv. Sie stellen die zentrale ausführende Gewalt des apoptotischen Zelltods dar (Thornberry *et al.*, 1998). Caspasen können aufgrund ihres Wirkungsortes in zwei Klassen eingeteilt werden, die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7). Eine weitere Unterteilung erfolgt in der Kategorie der Initiator-Caspasen. Hierbei können extrinsische (Caspase-8 und -10) und intrinsische Caspasen (Caspase-9 und -2) unterschieden werden (Chen *et al.*, 2002).

Da bereits in den vorangegangenen Experimenten eine deutliche Apoptose-induzierende Wirkung des synthetischen Phospholipids S-NC-2 demonstriert werden konnte, galt es nun herauszufinden, ob und welche Caspasen in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Hierzu erfolgte zunächst

die Untersuchung zur Aktivierung der wichtigsten Initiator- und Effektor-Caspasen. Um dies zu bewerkstelligen, wurden Jurkat bzw. BJAB Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an S-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert, anschließend durch Zentrifugation geerntet und die Aktivierung bzw. die proteolytische Spaltung der unterschiedlichen Caspasen mit Hilfe des Western Blots untersucht.

Eine der wichtigsten Initiator-Caspasen wird durch die Caspase-8 (FLICE/MACH/Mch5) repräsentiert. Caspase-8 spielt eine bedeutende Rolle im CD95 Signalweg und wird hierbei am DISC aktiviert, wobei der genaue Mechanismus sich im Fokus intensiver Studien befindet. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist bekannt, dass die Bindung der beiden Isoformen Pro-Caspasen-8/a und -8/b in zwei Schritten zu einer autokatalytischen Aktivierung führt. Hierbei wird die Pro-Caspase-8 (p55/p53) über zwei Zwischenprodukte (p43/41 und p12) zu den Endprodukten p10 und p18 degeneriert. Beide Isoformen unterscheiden sich nur in 15 Aminosäuren, die bei Caspase-8/b nicht vorhanden sind. Der DISC-Komplex bildet somit nicht nur eine Plattform, an welcher sich die Moleküle der Caspase-8 für ihre Autoaktivierung nahe zusammenlagern können, sondern bringt sie auch für ihre Aktivierung in die richtige räumliche Lage (Scaffidi *et al.*, 1997; Lavrik *et al.*, 2003). In Abb. 35 ist die proteolytische Spaltung der Initiator-Caspase-8 in Jurkat und BJAB Zellen dargestellt.

Pro-Caspase-8 weist in unbehandelte Kontrollzellen (-) eine Doppelbande bei 55 und 53 kDa auf. Dies ist auf die beiden Isoformen der Caspase-8 zurückzuführen. Als Positivkontrolle (+) wurde in den folgenden Versuchsreihen die Jurkat Zelllinie mit 1 μM Tri-n-butylzinn (TBT) behandelt. Bei TBT handelt es sich um ein Organometall, das für seine Apoptose-induzierende Wirkung bekannt ist (Zaucke *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 2003). Die Induktion der Apoptose in BJAB Zellen erfolgte mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Ligand, dem natürlichen Liganden des Fas/CD95-Todesrezeptores.

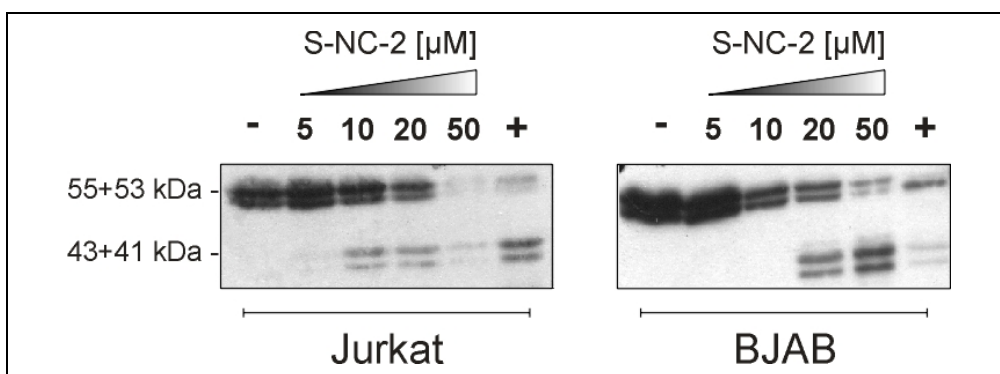


Abb. 35: Spaltung der Initiator-Caspase-8.

Jurkat bzw. BJAB Zellen wurden mit steigender Konzentration an S-NC-2 für 16 Stunden inkubiert und anschließend mit Hilfe des Western Blots auf die Spaltung der Caspase-8 untersucht. Als Negativkontrolle (-) wurden die Zellen mit Ethanol versetzt, was als Lösungsmittel des Lipids dient. Die Positivkontrollen (+) unterscheiden sich bei Jurkat und BJAB Zellen. Während Jurkat Zellen mit 1 μM TBT behandelt wurden, erhielten BJAB Zellen zur Apoptose-Induktion jeweils 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Ligand und 1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Enhancer.

Beide Substanzen führten zu einer deutlichen Abnahme der Pro-Caspase und zum Auftauchen einer Doppelbande bei 43 und 41 kDa. Dies deutet auf die Aktivierung von Caspase-8 hin.

In beiden Zelllinien bewirkte die Inkubation mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 ebenfalls die Spaltung der Pro-Caspase-8. Während 5 μM noch keinen Effekt zeigt, wird bei der Behandlung mit 10 μM S-NC-2 die geschnittene Caspase-8 in Jurkat Zellen bereits deutlich sichtbar. Eine weitere Erhöhung der Konzentration bewirkt eine gesteigerte Abnahme der Pro-Caspase, was auf eine stärkere Spaltung zurückzuführen ist. Im allgemeinen kann angenommen werden, dass Jurkat Zellen, im Vergleich zu BJAB Zellen, sehr viel sensitiver auf die Behandlung mit S-NC-2 reagieren, da in Jurkats bereits bei geringen Konzentrationen eine deutliche Aktivierung der Initiator-Caspase-8 zu erkennen war. Die höchste eingesetzte Konzentration von 50 μM S-NC-2 erwies sich in der Jurkat Zelllinie als äußerst toxisch. Während in BJAB Zellen eine fast vollständige Spaltung der Caspase-8 deutlich wird, konnte in Jurkat Zellen nahezu kein Protein mehr detektiert werden. Anhand dieser Ergebnisse kann eine durch S-NC-2 induzierte Spaltung der Pro-Caspase-8 demonstriert werden.

Eine weitere wichtige Caspase, die Caspase-9 (Mch6/ICE-LAP6), repräsentiert die Initiator-Caspase des intrinsischen apoptotischen Signalwegs. Diese wird durch Komplexierung mit Cytochrom c, Apaf-1 und dATP zum sog. Apoptosom aktiviert. Im Vergleich zu den anderen Caspasen weist sie einen großen Unterschied auf: mit ihrem außergewöhnlichen Pentapeptid QACGG befindet sich, anstatt des sonst für Caspasen typischen Aspartats, ein Glycin im aktiven Zentrum. Sie besitzt auch nicht die lange Pro-Domäne der anderen Initiator-Caspasen. Interessanterweise wurden zwei potentielle Schnittstellen für Caspase-3 und Granzym B zwischen der großen und der kleinen Untereinheit gefunden (Li *et al.*, 1997; Cain *et al.*, 2002).

Zur Überprüfung, ob Caspase-9 während der S-NC-2 induzierten Apoptose geschnitten wird, wurde abermals per Western Blot in einer konzentrationsabhängigen Versuchsreihe die Spaltung der Pro-Caspase-9 untersucht.

Wie in Abb. 36 dargestellt, konnte in Jurkat Zellen bei einer Konzentration von 10 μM S-NC-2 eine Spaltung der Pro-Caspase-9 anhand der Doppelbande bei 35 und 33 kDa detektiert werden. Eine weitere Steigerung der Konzentration führte zu einem Anstieg der Caspase-Spaltung.

Auch in den BJAB Zellen konnte durch die Inkubation mit S-NC-2 eine Spaltung der Pro-Caspase-9 detektiert werden. Allerdings erwiesen sich die BJAB Zellen erneut als weniger sensitiv gegenüber der S-NC-2 Behandlung. Im Vergleich zu den Jurkat Zellen war zur Spaltung der Pro-Caspase im Fall der BJAB die doppelte Menge an S-NC-2 nötig.

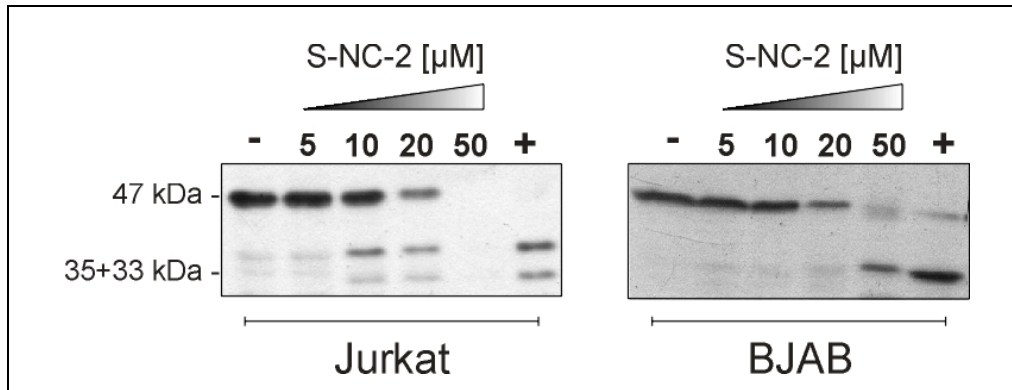


Abb. 36: Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9 durch S-NC-2

Zur Untersuchung der Caspase-9 Aktivierung wurden Jurkat bzw. BJAB Zellen mit steigender Konzentration an S-NC-2 für 16 Stunden inkubiert und anschließend mit Hilfe des Western Blots auf die Spaltung der Caspase-9 untersucht. Als Negativkontrolle (-) wurde Ethanol verwendet, welches als Lösungsmittel des Lipids dient. Zur Positivkontrolle (+) wurden Jurkat Zellen mit 1 μ M TBT und BJAB Zellen mit jeweils 0,1 μ g/ml Fas-Ligand und 1 μ g/ml Fas-Enhancer versetzt.

Weitere wichtige Caspasen im Netzwerk der todbringenden Proteasen werden durch die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 repräsentiert. Die bedeutendste dieser Caspasen ist Caspase-3, auch als CPP32, Yama (Hindu Gott des Todes) und Apopain bekannt. Sie besitzt eine Größe von 32 kDa und ist verantwortlich für die Proteolyse der meisten Schlüsselenzyme der Apoptose (z. B. Poly(ADP)Ribose-Polymerase (PARP), Lamine, etc.). Aufgrund ihrer starken Verbreitung und ihrer hohen Expressionsrate, vor allem in Zelllinien des lymphatischen Systems, wird ihr eine bedeutende Rolle in der Apoptose zugeschrieben. Caspase-6 (Mch2), ein 34 kDa großes, PARP-schneidendes Protein, und Caspase-7 (Mch3/ICE-LAP3/CMH-1), mit einer Größe von 35 kDa, repräsentieren zwei weitere Effektor-Caspasen der apoptotischen Maschinerie.

Abb. 37 demonstriert deutlich die konzentrationsabhängige Spaltung der drei Effektor-Caspasen-3, -6 und -7, hervorgerufen durch die Behandlung mit dem APC S-NC-2. In diesem Fall der Proteindetektion wurden Antikörper verwendet, welche nur die Pro-Form der entsprechenden Caspase erkennen, nicht aber deren Spaltprodukte. Hierbei dient also lediglich die Abnahme der Bandenintensität als Hinweis für eine Caspase-Spaltung.

Jurkat Zellen weisen nach 16-stündiger Inkubation eine deutlich konzentrationsabhängige Spaltung der jeweiligen Effektor-Caspase auf. Erneut war bereits eine Konzentration von 5 - 10 μ M ausreichend, um eine Reduktion der Bandenintensität hervorzurufen. In BJAB erfolgte ein Rückgang der Pro-Caspasen erst ab einer Konzentration von 10 μ M. Konform mit den bisher gezeigten Ergebnisse zur Caspase-Spaltung erwiesen sich BJAB Zellen als weniger sensitiv gegenüber S-NC-2 induzierten apoptotischen Prozessen.

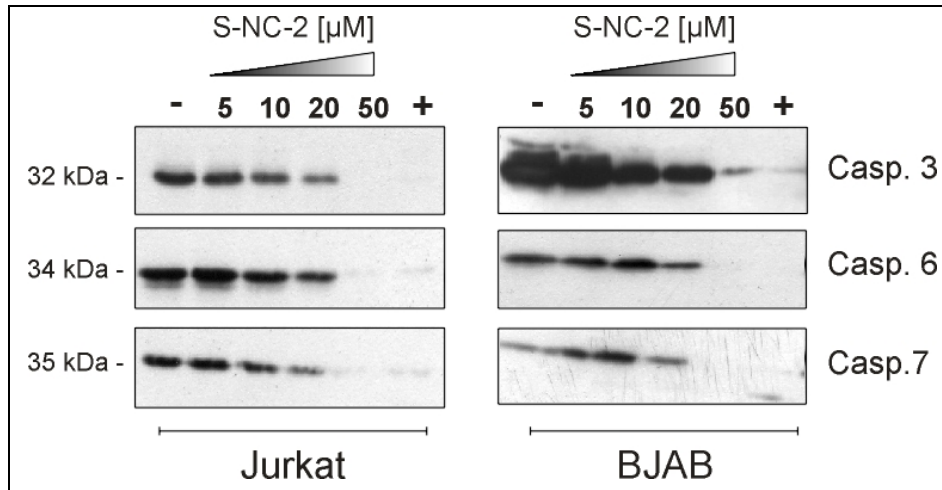


Abb. 37: S-NC-2 induziert die Spaltung von Effektor-Caspasen

Die Detektion der Spaltung von Effektor-Caspasen erfolgte ebenfalls mit der Hilfe des Western Blots. Hierbei wurden wiederum Jurkat und BJAB Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an S-NC-2 für 16 Stunden inkubiert sowie als Positivkontrolle (+) mit 1 µM TBT bzw. 0,1 µg/ml Fas-Ligand und Fas-Enhancer versetzt bzw. nur mit Ethanol (-) behandelt. Die Abnahme der Bandenintensität beschreibt die Spaltung der Pro-Caspase und ist somit ein Zeichen für die Aktivierung der Effektor-Caspasen.

Zur Erfassung der zeitlichen und mengenmäßigen Aktivierung einzelner ausgewählter Caspasen wurden unterschiedliche Zelllinien für einen Zeitraum von 4 bis 16 Stunden mit 20 µM S-NC-2 inkubiert und anschließend die Menge an aktiver Caspase mit Hilfe des Caspase-Assays von Becton Dickinson (BD ApoAlert™) bestimmt (Abb. 38). Die quantitative Erfassung erfolgt mit Hilfe von immobilisierten, für Caspasen spezifischen fluorogenen Substraten, welche von der entsprechenden aktiven Caspase geschnitten werden und dadurch ein fluoreszierendes Produkt freisetzen, das bei 460 nm detektiert werden kann. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 460 nm kann dadurch mit einer Aktivitätszunahme der entsprechenden Caspase in Korrelation gesetzt werden.

Die Behandlung der Zellen mit Fas-Ligand zeigt in Jurkat als auch in BJAB Zellen eine sehr starke Aktivierung der Caspasen-3 und -2 (Abb. 38). Caspase-2 (ICH-1/Nedd-2) weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Caspase-9 auf, jedoch ist ihr Aktivierungsmechanismus noch unbekannt. Wahrscheinlich ist eine Dimerisierung und keine Spaltung der Caspase für deren Aktivierung verantwortlich (Baliga *et al.*, 2004). Die Detektion der Caspasen-8 und -9 erwiesen sich als weniger sensitiv, da in diesem Fall nur eine Erhöhung auf das Doppelte der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden konnte.

Die Behandlung der Jurkat Zellen mit 20 µM S-NC-2 führt in den ersten 4 Stunden ebenfalls zu einer schnellen und starken Aktivierung der Caspasen-3 und -2, die nach 8 Stunden ihr Maximum erreicht und danach nicht mehr weiter ansteigt (Abb. 38). Die Aktivierung von Caspasen-8 und -9 erwies sich als deutlich schwächer. Auch nach 16-stündiger Inkubation konnte kein deutlicher Anstieg der Aktivierung detektiert werden.

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung von BJAB Zellen. Hier erfolgte eine klare Aktivierung der Caspasen-3 und -2 erst nach einem Zeitraum von 8 Stunden, welche mit fortschreitender Zeit noch weiter anstieg. In diesen Zellen konnte ebenfalls eine Verdopplung der Caspase-8- sowie eine Steigerung der Caspase-9-Aktivität um das 1,5-fache festgestellt werden, dies jedoch erst nach 12-stündiger Behandlung mit 20 μM S-NC-2.

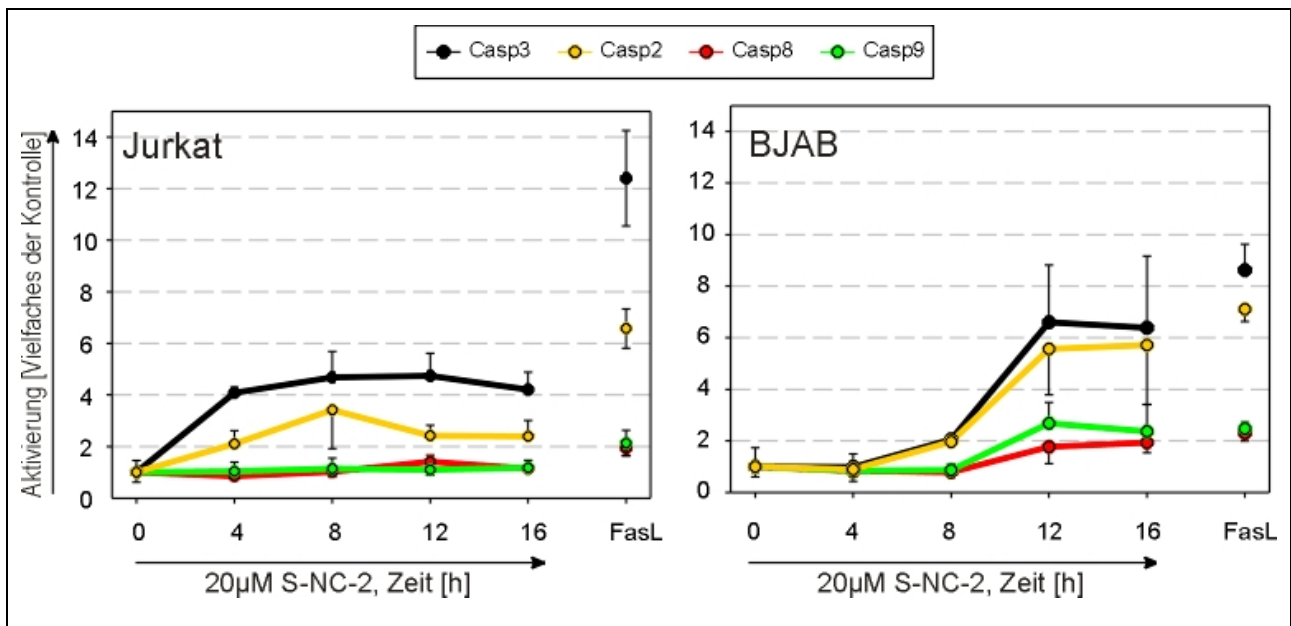


Abb. 38: Caspase-Aktivierungs-Assay

Die Detektion der Menge an Caspase-Aktivierung geschah mit Hilfe fluorogener Substrate, die für die jeweiligen Caspasen spezifisch sind. Erfolgt eine proteolytische Spaltung durch aktive Caspasen, so weisen die daraus entstehenden Produkte eine Fluoreszenz mit einer Emission von 460 nm auf. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität geht mit einer gesteigerten Caspase-Aktivierung einher. Jurkat und BJAB Zellen wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt und alle 4 Stunden die Menge an aktiver Caspase bestimmt. Als Positivkontrolle (FasL) erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Ligand und 1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Enhancer. Jeder Messpunkt entspricht zwei unabhängigen Versuchsreihen, die jeweils im doppelten Ansatz durchgeführt wurden.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Proteine identifiziert worden, welche im Verlauf des apoptotischen Prozesses durch die Aktivierung der Caspasen geschnitten werden. Diese Proteine, unter anderem PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase), dienen somit als Marker für den apoptotischen Zelltod. PARP ist eines der prominentesten Beispiele. Es handelt sich hierbei um ein Zink-abhängiges, DNA-bindendes Protein, welches im Zellkern lokalisiert ist und dort bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen mitwirkt (de Murcia *et al.*, 1997). Während der Apoptose wird PARP von aktiven Caspasen geschnitten und somit inaktiviert. Bei diesem Prozess wird das 116 kDa große Protein in kleinere Bruchstücke von 89 und 24 kDa zerlegt (Kaufmann *et al.*, 1993). Der Verlauf der PARP-Spaltung kann per Western Blot nachgewiesen werden (siehe Abb. 39) und eignet sich somit als Apoptose-Marker.

Die Spaltung von PARP erfolgt, wie in Abb. 39 dargestellt, wiederum in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Während in der Kontrolle nur das 116 kDa Fragment

des nativen Proteins zu erkennen ist, führt die Inkubation mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 zu einem Erscheinen des 89 kDa Bruchstücks, das die Prozessierung des Proteins demonstriert. Erneut kann festgestellt werden, dass Jurkat Zellen das geschnittene Fragment bereits bei einer Konzentration von 10 μM S-NC-2 aufweisen, während in BJAB Zellen wiederum die doppelte Konzentration von Nöten ist, um eine Spaltung des Proteins zu initiieren.

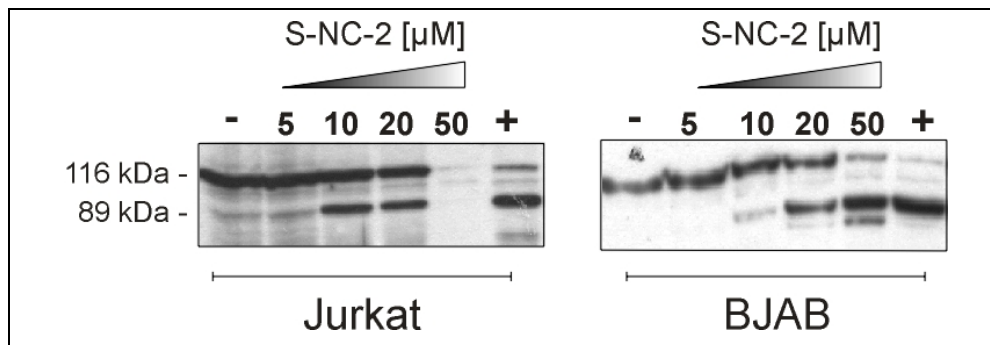


Abb. 39: S-NC-2 induziert PARP-Cleavage

Einer der wichtigsten Marker des apoptotischen Zelltods ist die Spaltung des Proteins PARP. Hierbei wird das native Protein in kleinere Fragmente mit der Größe von 89 und 24 kDa zerlegt. In dieser Abbildung wird die Spaltung von PARP durch die Detektion der Bande bei 89 kDa deutlich. Hierzu wurden Jurkat und BJAB Zellen mit Ethanol (-) und mit den angegebenen Konzentrationen an S-NC-2 für 16 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle (+) wurde 1 μM TBT (Jurkat) bzw. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Ligand und 1 $\mu\text{g/ml}$ Fas-Enhancer (BJAB) verwendet.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse in Abb. 35 bis einschließlich Abb. 39 festgestellt werden, dass S-NC-2 eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Initiator- und Effektor-Caspasen initiiert, sowie zu einer Spaltung des Marker-Proteins PARP führt. Dies gibt einen weiteren Hinweis auf die Apoptose-induzierende Eigenschaft des APC S-NC-2. Weiterhin wurde durch diese Untersuchungen offensichtlich, dass Jurkat Zellen im allgemeinen sensitiver auf die Behandlung mit S-NC-2 reagierten. Für die gleichen Effekte wurde bei BJAB Zellen eine doppelte Konzentration des synthetischen Phospholipids benötigt.

4.3.3 Behandlung mit S-NC-2 führt zu nuklearen Veränderungen

In einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose weisen die betroffenen Zellen typische Veränderungen des Zellkerns sowie der DNA auf. Dies äußert sich z.B. in der Fragmentierung des Zellkerns und in der Kondensation des Chromatins, welche weitere Marker des apoptotischen Zelltods darstellen.

Zur Identifizierung nuklearer Veränderungen wurden BJAB Zellen zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden behandelt und anschließend der Zellkern bzw. die DNA durch Hoechst 33342 angefärbt. Es handelt sich hierbei um einen membrangängigen Farbstoff, der mit der zellulären DNA interkaliert und somit zur Färbung des Zellkerns führt. Die zelluläre Beobachtung erfolgte mit Hilfe des Axiovert S-100

Fluoreszenzmikroskops, wobei die Proben bei einer Anregung von 360 nm betrachtet wurden. Die Ergebnisse dieser Beobachtung sind in Abb. 40 photographisch dargestellt. Abb. 40A zeigt jeweils die mikroskopische Aufnahme der gesamten Zelle, während in Abb. 40B die Zellkerne mit dem fluoreszierenden Farbstoff Hoechst 33342 dargestellt sind.

Kontrollzellen weisen auch nach 16 Stunden Inkubation eine runde, für BJAB typische Zellform auf. Die Behandlung der Zellen mit 20 μM S-NC-2 sowie eine Steigerung der Lipidkonzentration führt zu deutlichen morphologischen Veränderungen. Die Zellen schrumpfen (20 μM) und zeigen bei einer Behandlung mit 50 μM S-NC-2 deutliche Abschnürungen von Membranvesikeln. Im Einklang mit den morphologischen Veränderungen der BJAB Zellen kann auch eine Umstrukturierung des Zellkerns beobachtet werden. Unbehandelte Zellen besitzen in der Regel einen großen, runden Nukleus, der beinahe die ganze Zelle einnimmt. Eine steigende Konzentration an S-NC-2 induziert eine Verdichtung des Chromatins und eine Fragmentierung des Zellkerns (siehe Pfeile in Abb. 40B).

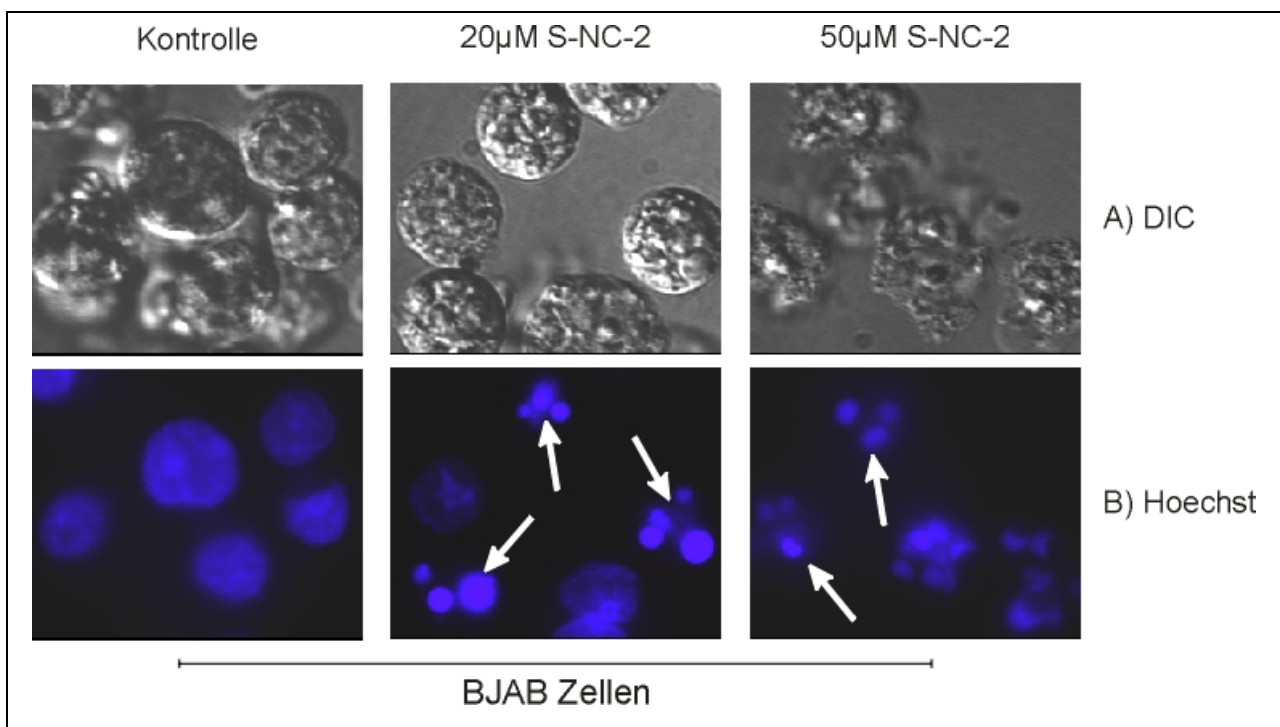


Abb. 40: Nukleare Fragmentierung induziert durch S-NC-2.

Zur Untersuchung nuklearer Veränderungen wurden BJAB Zellen mit 20 bzw. 50 μM S-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit 10 μM Hoechst 33342 angefärbt. Die Beobachtung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert S-100, Zeiss) bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 460 nm. Die Pfeile deuten auf die fragmentierten Zellkerne (DIC: digitaler Interferenzkontrast).

Zusätzlich zur Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung findet in apoptotischen Zellen ein kontrollierter Abbau der DNA statt. Hierbei wird diese in genau definierte Fragmente zerkleinert, wobei die DNA-Stränge zunächst grob durch Endonukleasen zerschnitten und anschließend in kleinere Fragmente mit einer Größe von 180-200 Basenpaaren und Vielfache davon zerlegt

werden. Die genau definierte Größe der DNA Bruchstücke ist auf die Aktivität der Endonukleasen zurückzuführen, welche nur in der Lage sind, DNA zwischen Nukleosomen zu schneiden. Dieser internukleosomale DNA-Abbau kann durch die Isolierung der Fragmente sowie deren Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Das typische Bandenmuster ist in Abb. 41 dargestellt.

Die Untersuchung des internukleosomalen DNA-Abbaus erfolgte mit Jurkat Zellen. Diese wurden für einen Zeitraum von 0 bis 16 Stunden mit 20 μ M S-NC-2 inkubiert, durch Zentrifugation geerntet, die apoptotische DNA aus den Zellen extrahiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 41 zeigt deutlich, dass in den ersten zwei Stunden der Behandlung keine apoptotische DNA aus den Zellen extrahiert werden konnte. Mit steigender Inkubationszeit kann jedoch die für apoptotische DNA typische leiterartige Auftrennung beobachtet werden, welche nach 6 Stunden eindeutig detektierbar und nach 16 Stunden noch deutlicher zu erkennen ist.

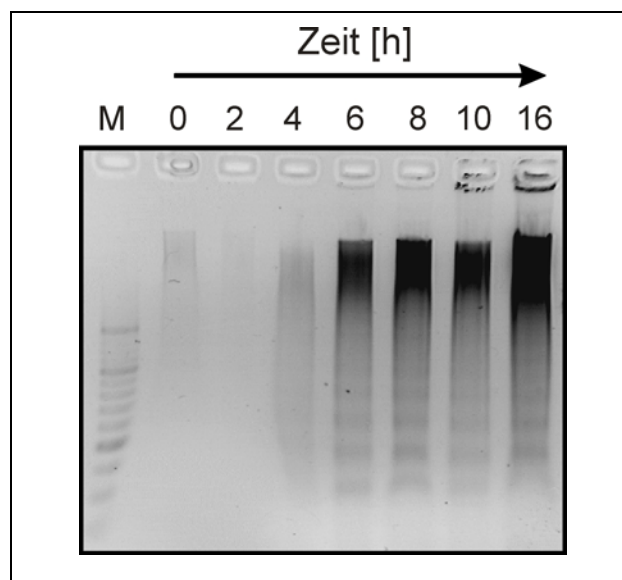


Abb. 41: S-NC-2 induziert eine internukleosomale Zerstückelung der zellulären DNA

Jurkat Zellen wurden mit 20 μ M S-NC-2 für einen Zeitraum von 0 - 16 Stunden inkubiert, anschließend lysiert, die apoptotische DNA extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der positive Hinweis auf einen internukleosomalen DNA-Abbau liefert das typische leiterartige Bandenmuster der extrahierten DNA.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse in Kap. 4.3.1 - 4.3.3 deutlich das Apoptose-induzierende Potenzial des synthetischen Phospholipids S-NC-2 festgestellt werden. Die Versuchsreihen demonstrierten das Erscheinen typischer apoptotischer Marker, wie die Externalisierung von PS, die Aktivierung der Caspase-Kaskade sowie eine deutliche Chromatin-Kondensation, Kernfragmentierungen und eine internukleosomalen Zerstückelung der zellulären DNA.

4.3.4 Suramin besitzt keine Apoptose-inhibierende Eigenschaft

Wie bereits in Kap. 4.2.3 beschrieben, führte die Vorbehandlung mit Suramin zu keiner signifikanten Reduktion der [^{14}C]-R-NC-2 Aufnahme in Jurkat bzw. BJAB Zellen. Mollinedo beschreibt allerdings nicht nur eine Hemmung der Et-18-OCH₃ Inkorporation, sondern beobachtet ebenfalls eine starke Reduktion der durch Et-18-OCH₃ ausgelösten Apoptose (Mollinedo *et al.*, 1997). Da in dieser Arbeit jedoch eine geringe Hemmung der [^{14}C]-R-NC-2-Aufnahme von 5% in Jurkat Zellen beobachtet werden konnte, sollte zusätzlich eine eventuell auftretende Reduktion der Apoptose-induzierenden Eigenschaft der in dieser Arbeit verwendeten APC durch Suramin untersucht werden. Hierfür wurden Jurkat und BJAB Zellen mit 70 bzw. 140 μM Suramin vorbehandelt und anschließend mit und ohne 20 μM R-NC-2 für 16 Stunden inkubiert. Später wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und für die entsprechenden Untersuchungen der apoptotischen Marker aufgearbeitet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 42 zusammengefasst.

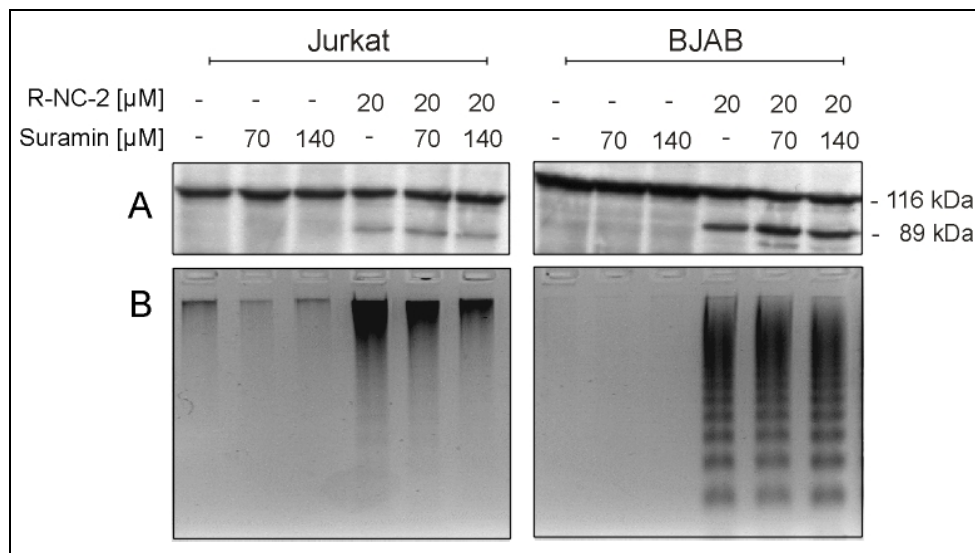


Abb. 42: Suramin hemmt nicht die Apoptose-induzierende Wirkung von R-NC-2

Zur Untersuchung der Apoptose-induzierenden Eigenschaft von R-NC-2 bzw. deren Hemmung durch Suramin wurden die Zellen mit 70 bzw. 140 μM Suramin vorbehandelt und anschließend für 16 Stunden mit 20 μM R-NC-2 inkubiert. Die untersuchten Marker der Apoptose setzen sich aus dem *Cleavage* von PARP (A) sowie der Generierung einer DNA-Apoptose-Leiter (B) zusammen.

Abb. 42 zeigt deutlich, dass eine alleinige Behandlung der Zellen mit Suramin weder zu einer Spaltung des Proteins PARP (A) noch zur Ausbildung einer Apoptose-Leiter (B) führt, während die Inkubation der Zellen mit R-NC-2 deutlich die bereits unter Kap. 4.3 beschriebenen apoptotischen Marker zeigt. Die Behandlung der Zellen mit 20 μM R-NC-2 (Abb. 42A) führt zu einer Spaltung des Proteins PARP, was deutlich an dem Erscheinen der zusätzlichen Bande bei 89 kDa erkennbar ist. Auch die in Abb. 42B dargestellte apoptotische DNA weist die typische leiterartige Struktur auf, ein weiterer Marker für einen apoptotischen Zelltod. Durch die zusätzliche Vorbehandlung mit Suramin

lässt sich die Induktion des programmierten Zelltods jedoch nicht verhindern. Obwohl Suramin zu einer minimalen Hemmung der [¹⁴C]-R-NC-2-Aufnahme führt, können keinerlei zusätzlichen Auswirkungen, noch eine Beeinträchtigung der Apoptose-Induktion durch R-NC-2 detektiert werden.

4.4 Aktivierung der Todesrezeptoren

Im Verlauf der bisher beschriebenen Versuchsreihen konnte deutlich die Apoptose-induzierende Eigenschaft des Lipids S-NC-2 dargestellt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit galt dem Mechanismus der Apoptose-Induktion ein besonderes Augenmerk.

4.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen zum Rezeptorclustering

Todesrezeptoren spielen in verschiedenen physiologischen und pathologischen apoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Der CD95-Todesrezeptor (Fas) ist einer der am besten charakterisierten Rezeptoren der TNF-R Superfamilie. Die Zusammenlagerung der Rezeptormoleküle führt zu einem *Clustering* der Todeseffektordomänen, welche nun in der Lage sind, weitere Proteine, wie etwa Pro-Caspase-8, zu rekrutieren und somit das apoptotische Signal in die Zelle weiterzuleiten (Papoff *et al.*, 1999; Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). Eine Beteiligung dieses Todesrezeptors konnte bereits in anderen Arbeiten über synthetische Phospholipide demonstriert werden (Gajate *et al.*, 2000a; Mollinedo *et al.*, 2004).

Es galt nun zu klären, ob die S-NC-2 induzierte Apoptose ebenfalls über eine Signalvermittlung des CD95-Todesrezeptors verläuft. Hierzu wurden Jurkat Zellen für 1 Stunde mit 20 µM S-NC-2 inkubiert und anschließend mit einem spezifischen anti-CD95 Antikörper behandelt. Zur Visualisierung des CD95 Rezeptors diente ein sekundärer Cy-2 gekoppelter Antikörper, welcher im Mikroskop bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 530 nm sichtbar gemacht werden kann. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung sind in Abb. 43 (A-D) dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass innerhalb der ersten Stunde keinerlei äußerliche Veränderung der Zelle zu erkennen ist, was deutlich in den digitalen Interferenzkontrastbildern (Abb. 43A und B) dargestellt ist. Die Analyse des CD95 Rezeptors zeigt allerdings ein etwas anderes Bild (Abb. 43C und D). In unbehandelten Kontrollzellen liegt der Rezeptor diffus über die Zelloberfläche verteilt vor, erkennbar durch die undeutliche verstreute grüne Fluoreszenz. Eine Behandlung der Zellen mit 20 µM S-NC-2 induziert eine Anreicherung der Fluoreszenz (und somit des CD95 Todesrezeptors) in definierten Bereichen der Zellmembran zu sog. *Clustern*. Das synthetische Lipid S-NC-2 führt also zu einem Umgruppieren der Rezeptormoleküle, die sich an einem Pol der Zelle ansammeln (*Capping*). Dieses Ergebnis liefert den ersten Hinweis für die mögliche Beteiligung des CD95 Todesrezeptors während der S-NC-2 induzierten Apoptose.

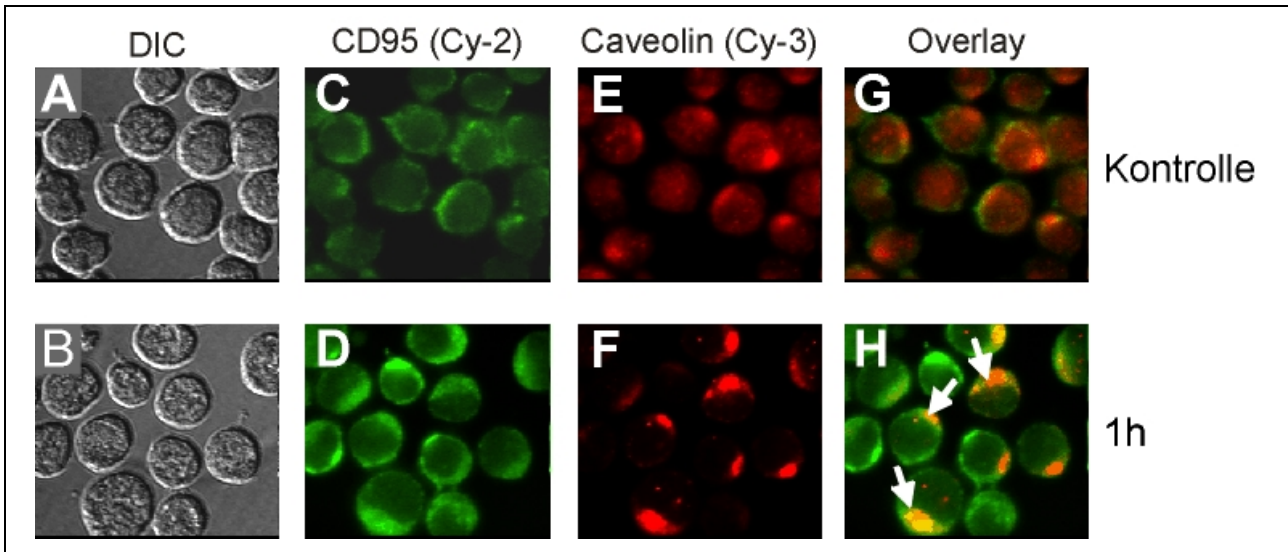


Abb. 43: S-NC-2 induziert ein *Clustering* des CD95 Todesrezeptors sowie eine Co-Lokalisation mit dem Lipid Raft Marker Caveolin

Jurkat Zellen wurden für 1 Stunde mit und ohne 20 μM S-NC-2 inkubiert und anschließend der CD95 Todesrezeptor sowie der *Lipid Raft* Marker Caveolin mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Der primäre Antikörper richtet sich spezifisch gegen die zu untersuchenden Proteine, die sekundären Antikörper, gekoppelt an bsp. Fluorochrome wie Cy-2 (grün) bzw. Cy-3 (rot), ermöglichen die Visualisierung dieser Proteine im Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung: 630-fach).

Ein weiterer Hinweis zur Beteiligung des CD95 Todesrezeptors wird durch die Rekrutierung des Rezeptors in bestimmte Membranbereiche, den sog. *Lipid Rafts*, erbracht. Diese sind durch einen hohen Anteil an Sphingomyelin und Cholesterol gekennzeichnet. *Lipid Rafts* spielen eine immer größer werdende Rolle in Prozessen der Signaltransduktion, da sie als eine Art Plattform zur Rekrutierung der benötigten Proteine beschrieben werden. Auch im Zusammenhang der ALP-induzierten Apoptose konnten bereits erste Beweise erbracht werden, dass CD95 nach seiner Aktivierung in diese Membranbereiche einwandert (Mollinedo *et al.*, 2004; Gajate *et al.*, 2004).

Da es möglich war, ein S-NC-2 induziertes *Clustering* des CD95 Todesrezeptors zu identifizieren, sollten die Zellen zusätzlich auf eine mögliche Co-Lokalisation des Rezeptors mit *Lipid Rafts* untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Hierzu wurden die bereits in Abb. 43 eingeführten Jurkat Zellen zusätzlich mit einem Antikörper gegen den *Lipid Raft* Marker Caveolin behandelt. In diesem Fall dient ein Cy-3 gekoppelter Antikörper (max. Emission: 575 nm) zur Markierung des Caveolins. Zur besseren Detektion von Co-Lokalisationen wurden die Bilder des Cy-3 Antikörpers mit einem „falschen“ Rotton eingefärbt, da ansonsten die Unterscheidung zwischen grünem Cy-2 und dem eigentlich gelblichen Cy-3 schwieriger verlaufen wäre. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Färbung sind in Abb. 43E und F dargestellt. Zur deutlicheren Identifikation von Co-Lokalisationen wurden die jeweiligen Fluoreszenzbilder von CD95 und Caveolin mit Hilfe des OpenLab Programms übereinander gelegt. Die Stellen, an denen sich sowohl CD95 als auch Caveolin befinden, weisen darum eine gelbe Färbung auf. Wie in Abb. 43H deutlich sichtbar, führt die Aktivierung des CD95-

Todesrezeptors durch die Behandlung mit S-NC-2 zu einer Co-Lokalisation des Rezeptors mit dem *Lipid Raft* Marker Caveolin.

Zusätzlich sollte nach erfolgter Behandlung mit S-NC-2 das Einwandern des Todesrezeptors in die Bereiche der *Lipid Rafts* auch auf Ebene der Proteine untersucht werden. Hierzu wurden erneut Jurkat Zellen mit und ohne 20 μM S-NC-2 für 3 Stunden inkubiert, anschließend mit Triton X-100 lysiert, der post-nukleare Überstand auf einen Sucrose-Gradienten aufgebracht und für 18 - 20 Stunden zentrifugiert. Hinterher erfolgte die Entnahme der einzelnen Gradienten-Fractionen in 400 μl Schritten von oben nach unten. Das Volumen wurde mit Hilfe einer Lyophille eingeeengt und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Ergebnisse des Western Blots sind in der folgenden Abb. 44 zusammengefasst.

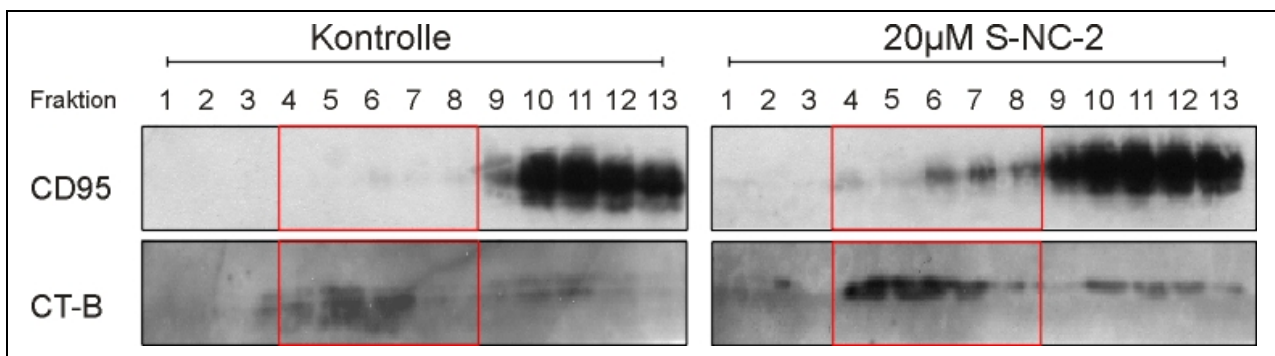


Abb. 44: S-NC-2 induziert die Translokation des CD95 Todesrezeptors in *Lipid Raft* Regionen

Unbehandelte (Kontrolle) sowie für 3 Stunden mit 20 μM S-NC-2 inkubierte Jurkat Zellen wurden in 1% Triton X-100 in MBS-Puffer lysiert und anschließend über einen diskontinuierlichen Sucrose Gradienten aufgetrennt. Es erfolgte die Entnahme von 13 Fraktionen zu jeweils 400 μl . Jeweils 15 μl der einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert. Die Lokalisation des CD95 Todesrezeptors erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, zum Auffinden der G_{M1} -Fraktionen wurde die CT-B Untereinheit eingesetzt.

Als Marker der *Lipid Rafts* wurde im Fall der Western Blot Darstellung die B-Untereinheit des Cholera-Toxins (CT-B) verwendet. Diese bindet an Gangliosid G_{M1} , welches einen häufigen Bestandteil der *Lipid Rafts* darstellt (Schoen *et al.*, 1989; Harder *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2002a). Die Position der *Lipid Rafts* im Sucrose Gradienten konnte mit Hilfe von CT-B detektiert werden (Abb. 44). Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich G_{M1} im oberen Bereich des Gradienten befindet (Fraktion 4-8). Eine zweite Fraktion konnte im unteren Teil des Gradienten detektiert werden (Fraktion 10-13), welche auf eine Teilung der *Lipid Rafts* (Fraktion 4-8) von den Triton X-100 löslichen Membranfragmenten zurückzuführen ist. Dies wurde bereits im Zusammenhang der Et-18-OCH₃ induzierten CD95-Translokation beschrieben (Gajate *et al.*, 2001). Durch die Verwendung eines spezifischen anti-CD95 Antikörpers wird deutlich, dass sich der Rezeptor in unbehandelten Jurkat Zellen in den Triton X-100 löslichen Membranfragmenten (Fraktion 10-13) befindet und somit aus den *Lipid Rafts* ausgeschlossen ist (Abb. 44, links). Die

Behandlung der Zellen mit 20 μM S-NC-2 führt zu einer Wanderung der Rezeptormoleküle in die *Lipid Rafts* Region (Fraktion 4-8) des Sucrose Gradienten (Abb. 44, rechts).

Diese Daten, zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen, zeigen eine durch S-NC-2 induzierte Translokation des CD95 Todesrezeptors in Bereiche von *Lipid Rafts* und das damit einhergehende *Clustering* der Rezeptormoleküle. Hierdurch kann eine Aktivierung von CD95 postuliert werden.

Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit, dass weitere Todesrezeptoren bei der S-NC-2 induzierten Apoptose eine Rolle spielen. Ein möglicher Kandidat wäre der TRAIL-R2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor*), welcher bereits bei der Apoptose-Induktion in Tumorzellen und anderen Zelltypen beschrieben wurde (Ashkenazi *et al.*, 1998). Auch bei diesem Rezeptor kommt es zur Ausbildung des DISC und zur Rekrutierung von FADD und Caspase-8 (Bodmer *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000). Die Untersuchung zur möglichen Beteiligung des TRAIL-R2 bei der S-NC-2 induzierten Apoptose erfolgte erneut durch eine immunhistochemische Analyse der Rezeptor-Aggregation (Abb. 45). Hierbei wurden Jurkat Zellen für einen Zeitraum von 1 - 3 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, anschließend mit einem spezifischen anti-TRAIL-R2 Antikörper behandelt und der Proteinkomplex durch einen Cy-3 gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Abb. 45 zeigt eine diffuse Fluoreszenzverteilung in den unbehandelten Kontrollzellen. Die Inkubation der Zellen mit S-NC-2 führt zu einer deutlichen Aggregation der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren, was auf ein eintretendes *Clustering* und *Capping* des TRAIL-R2 zurückzuführen sein kann. Dieses Phänomen wurde bereits für den CD95-Todesrezeptor in Abb. 43 gezeigt. Mit steigender Inkubationszeit kann dieser Effekt noch deutlicher beobachtet werden und lässt somit eine zusätzliche Beteiligung des TRAIL-R2 an der S-NC-2 induzierten Apoptose vermuten.

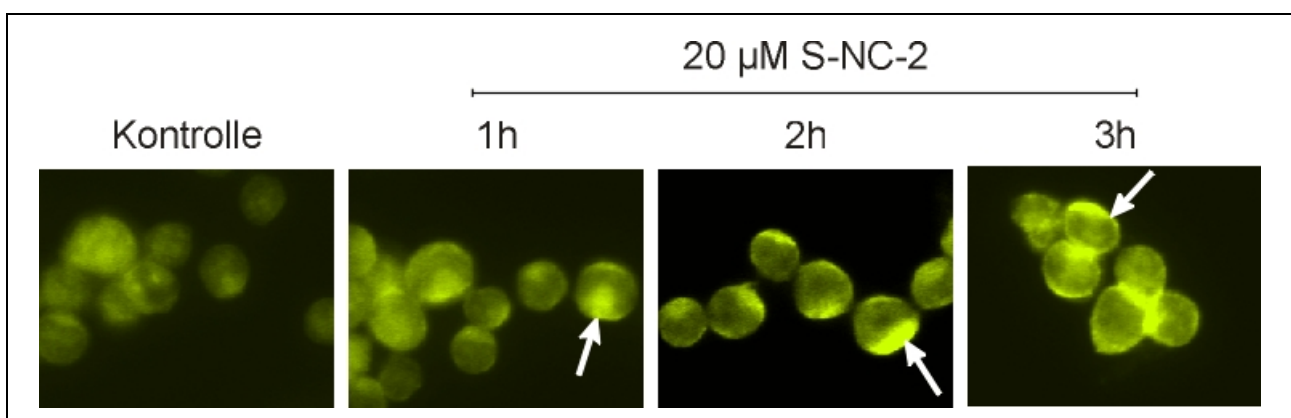
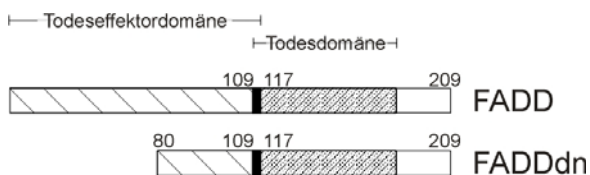


Abb. 45: Capping von TRAIL-R2

Zur Untersuchung von *Clustering* und *Capping* des TRAIL-R2 wurden unbehandelte (Kontrolle) sowie mit 20 μM behandelte Jurkat Zellen mit einem spezifischen anti-TRAIL-R2 Antikörper behandelt und anschließend mit einem Cy-3 gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe des Axiovert S-100 Fluoreszenzmikroskops bei einer 630-fachen Vergrößerung. Die Pfeile deuten auf den Bereich des stark konzentrierten TRAIL-R2.

4.4.2 FADDdn Zellen erweisen sich als wenig sensitiv gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Todesrezeptoren, im besonderen des CD95-Rezeptors, sollte mit Hilfe unterschiedlicher Zelllinien erbracht werden. Hierbei wurden genetisch veränderte Zellen ausgewählt, die einen Defekt in der Signalweiterleitung des CD95-Rezeptors aufweisen. In Abb. 46 ist ein Vergleich von BJAB Wildtyp und einer FADD dominant negativen (FADDdn) Version dieser Zelllinie dargestellt.



Bei FADDdn Zellen handelt es sich um eine Deletionsmutante des FADD-Adapterproteins, der etwa ein 80 Aminosäuren langes Stück am N-Terminus fehlt, aber immer noch eine funktionsfähige Todesdomäne besitzt (siehe

Schema). FADD kann in diesem Fall zwar immer noch mit dem Todesrezeptor interagieren, ist jedoch nicht dazu in der Lage, das Signal auch in die Zelle weiter zu leiten (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Somit eignen sich diese beiden Zelllinien für die Unterscheidung zwischen rezeptorvermittelter und nicht-rezeptorvermittelter Apoptose. Beide BJAB Zelllinien wurden für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 inkubiert und anschließend, zur Untersuchung apoptotischer Marker mittels Western Blot, aufgearbeitet (Abb. 46).

Die Wildtyp Zellen erwiesen sich, wie bereits in Kap. 4.3.2 deutlich dargestellt, erneut als sensitiv gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose. Eine Konzentration von 10 μ M S-NC-2 erscheint ausreichend, um Anfänge der Spaltung von Pro-Caspase-8 sowie Pro-Caspase-3 sichtbar zu machen. Deutlicher wird die Caspase-Aktivierung durch die Erhöhung der Konzentration des synthetischen Phospholipids S-NC-2.

Die Inkubation der Zellen mit dem natürlichen Ligand des CD95 Todesrezeptors (+) führt bereits nach 1-stündiger Inkubation zu einer vollkommenen Spaltung der Pro-Caspasen-8 und -3 sowie des Marker-Proteins PARP (Abb. 46). Anders verhält es sich in den FADDdn Zellen. Hier ist die Wirkung des Liganden vollkommen gehemmt, was auf das funktionsunfähige Adapterprotein FADD zurückzuführen ist.

Dieser Unterschied ist auch deutlich bei der Behandlung mit S-NC-2 zu beobachten. In Wildtyp Zellen kann bereits bei einer Konzentration von 10 μ M S-NC-2 eine deutliche Spaltung der Caspasen und PARP detektiert werden. Im Gegensatz dazu musste in FADDdn BJAB Zellen eine weitaus höhere Konzentration eingesetzt werden, um eine Spaltung der Caspasen zu induzieren. Erst 50 μ M S-NC-2 führten zu einer deutlichen Spaltung der Pro-Caspase-8, -3 und PARP. Der Defekt des FADD-Adapterproteins resultierte in einer gesteigerten Resistenz der Zellen gegenüber S-NC-2-induzierter Apoptose, und lässt somit auf die Beteiligung des CD95-Todesrezeptors in diesem Signalweg schließen.

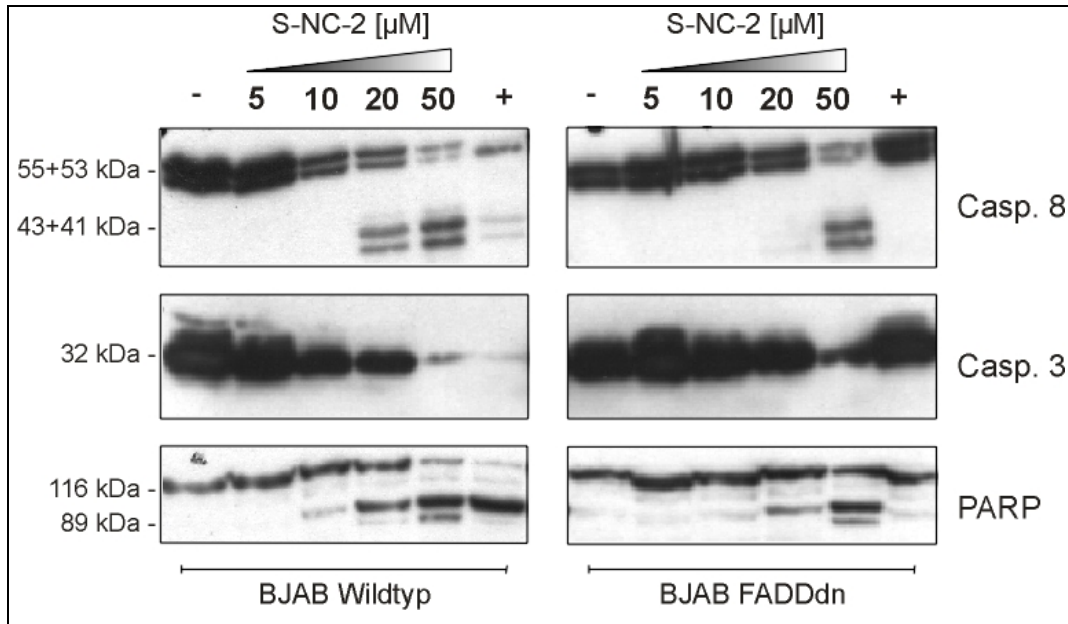


Abb. 46: FADDdn BJAB Zellen sind nahezu resistent gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose
 BJAB Wildtyp und FADDdn Zellen wurden unbehandelt belassen (-), mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 oder mit Fas-Ligand und -Enhancer (+) inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Spaltung der Pro-Caspase-8, -3 und PARP untersucht.

4.4.3 Co-Immunpräzipitation

Zur weiteren Bestätigung der rezeptorvermittelten, durch S-NC-2 ausgelösten Apoptose wurde zusätzlich eine Co-Immunpräzipitation des CD95-Todesrezeptors ausgeführt. Dies bedeutet, dass mit Hilfe von gekoppelten Beads der Todesrezeptor mit möglichen Interaktionspartnern des DISC aus dem Proteinpool der Zelle isoliert und anschließend mittels Western Blot analysiert wird. Können Proteine des DISC, wie z. B. Caspase-8, nachgewiesen werden, so gibt dies einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des CD95 Rezeptors bei der S-NC-2 induzierten Apoptose.

Die Zellen wurden hierzu für 1 bzw. 3 Stunden mit 20 μ M S-NC-2 und zusätzlich mit dem natürlichen Ligand dieses Rezeptors, Fas-Ligand (FasL), behandelt (Abb. 47). Die Immunpräzipitation erfolgte mit Hilfe des μ MACS Streptavidin Kits von Miltenyi Biotec. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und das Zielprotein (CD95-Todesrezeptor) mittels eines biotinylierten Antikörpers im post-nuklearen Überstand markiert, anschließend durch die Hilfe von super-paramagnetischen Streptavidin MicroBeads aus dem Proteinpool gefischt und über Säulen aufgereinigt. Die gereinigten Proben wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot auf mögliche Interaktionspartner des DISC untersucht, in diesem Fall die Caspase-8 (Abb. 47).

Im Präzipitat unbehandelter Kontrollzellen (K) kann keine Caspase-8 detektiert werden, da in diesem Fall keine Ausbildung des DISC induziert wird. Eine Inkubation der Zellen mit FasL bewirkt eine sehr schnelle und effiziente CD95 Aktivierung sowie die Zusammenlagerung des DISC. Dies kann deutlich durch das Erscheinen der Pro-Caspase-8 demonstriert werden. Auch S-NC-2 ist in

der Lage, den DISC zu induzieren, auch wenn dies im Vergleich zu FasL behandelten Zellen erheblich schwächer ausfällt. Nach 1 Stunde konnte die Pro-Caspase-8 per Western Blot detektiert werden. Eine längere Inkubationszeit (3h) führte zu einem stark reduzierten Signal, was möglicherweise durch die Aktivierung der Pro-Caspase-8 zustande kommt.

Eine deutliche Bildung des DISC konnte nach 1-stündiger Behandlung mit S-NC-2 beobachtet werden, was wiederum auf die Aktivierung des CD95-Todesrezeptors in der S-NC-2 induzierten Apoptose zurückzuführen ist.

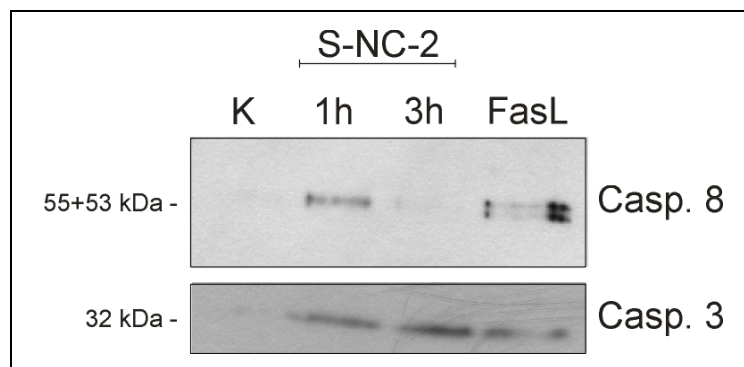


Abb. 47: Nachweis der DISC Bildung durch Co-Immünpräzipitation des CD95 Todesrezeptors

Zum Nachweis der DISC Bildung wurde das Lysat von unbehandelten (K), Fas-Ligand stimulierten (FasL) sowie S-NC-2 behandelten Jurkat Zellen mit einem biotinylierten anti-CD95 Antikörper inkubiert, der Antikörper-Rezeptor Komplex mit Hilfe von magnetischen Streptavidin Beads über eine Säule aufgereinigt und das Präzipitat auf Komponenten (Pro-Caspase-8) des DISC mittels Western Blot untersucht. Zusätzlich erfolgte die Detektion der Pro-Caspase-3.

In jüngster Zeit wurde die alleinige Herrschaft der apikalen Caspase-8 in Frage gestellt, da zum einen aufgrund von CD95-Immünpräzipitationen sich die Caspase-3 als Bestandteil des DISC erwies und zum anderen bei Jurkat Zellen durch die Transfektion mit einer dominant negativen Variante der Caspase-3 die Caspase-8 Aktivierung stark beeinträchtigt war (Aouad *et al.*, 2004). Bei einer zusätzlichen Analyse des Präzipitats auf Caspase-3 konnte diese ebenfalls nach erfolgter S-NC-2 bzw. Fas-Ligand Inkubation in den behandelten Proben gefunden werden.

4.4.4 Die S-NC-2 induzierte Aktivierung des CD95 Rezeptors resultiert nicht aus autokrinen oder parakrinen Effekten

Die Apoptose-induzierende Wirkung von Substanzen wie Doxorubicin wurde in humanen leukämischen T-Zelllinien auf eine erhöhte Aktivierung der CD95L-Expression zurückgeführt. Dadurch soll eine autokrine und/oder parakrine Aktivierung des CD95-Todesrezeptors erfolgen, indem dieser den CD95L bindet. Die CD95/CD95L-induzierte Apoptose könnte eine Erklärung für die, bei der Chemotherapie auftretende Apoptose darstellen (Friesen *et al.*, 1996).

Die Gruppe um Mollinedo untersuchte die potenzielle Möglichkeit der CD95/CD95L-induzierten Apoptose in unterschiedlichen, mit Et-18-OCH₃ behandelten humanen leukämischen B- und

T-Zelllinien. Hierbei konnte jedoch keine Abhängigkeit des CD95/CD95L-Systems festgestellt werden (Gajate *et al.*, 2000a).

Um einen möglichen parakrinen und/oder autokrinen Effekt der CD95-Todesrezeptor Aktivierung während der S-NC-2 induzierten Apoptose auszuschließen, wurden Jurkat Zellen für 30 Minuten mit einem neutralisierenden anti-Fas Antikörper (Klon ZB4) vorinkubiert, welcher die CD95/CD95L-induzierte Apoptose hemmt (Abb. 48). Eine Vorbehandlung der Zellen mit 250 ng/ml ZB4 resultierte in einer deutlichen Hemmung der Apoptose-Induktion in Fas-Ligand (FasL) induzierten Zellen. Mit Hilfe der Annexin-PI Färbung wurde eine deutliche Reduktion der Annexin-positiven Zellen von 44,3% auf 13,6% sowie der Anstieg vitaler Zellen von 12,2% auf 70,3% detektiert. Dieser schützende Effekt erfolgte jedoch nur in Fas-Ligand behandelten Proben. Es konnte kein schützender Effekt des neutralisierenden Antikörpers ZB4 in S-NC-2 behandelten Jurkat Zellen beobachtet werden. Hier zeigten die Ergebnisse mit und ohne ZB4 eine ähnliche Verteilung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen auf.

Dieses Resultat lässt vermuten, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von S-NC-2 nicht auf eine Fas/FasL Interaktion zurückzuführen ist, sondern von S-NC-2 selbst ausgelöst wird.

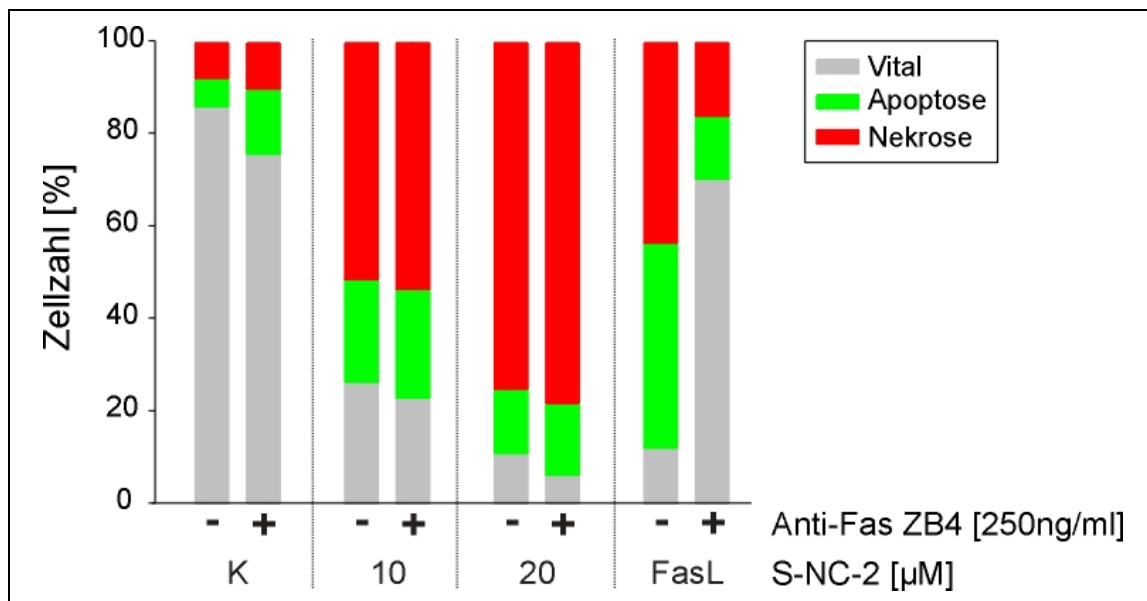


Abb. 48: Keine Hemmung der Apoptose-Induktion durch ZB4

Zum Ausschluss der Fas/FasL Interaktion in der S-NC-2 induzierten Apoptose wurden Jurkat Zellen für 30 Minuten mit 250 ng/ml anti-Fas ZB4 vorbehandelt und anschließend für 16 Stunden mit 10 bzw. 20 μ M S-NC-2 inkubiert. Die Verteilung apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen erfolgte durch die Färbung mit Annexin und PI, die quantitative Auswertung mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

4.5 Die resistente Zelllinie K562

Im Verlauf der Studien zu unterschiedlichen Zelltypen und deren Sensitivität gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose konnte eine resistente Zelllinie ausfindig gemacht werden: die

erythroleukämische Zelllinie K562. Analysen des Zellkerns mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33342 wiesen keinerlei Anzeichen einer Kernfragmentierung auf (Abb. 49A). Selbst die für die meisten anderen Zelllinien zytotoxische Konzentration von 50 μM zeigte nach 16 Stunden Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen weder eine Auswirkung auf das Aussehen der Zelle (siehe Abb. 49A, DIC) noch auf die Form des Zellkerns (Abb. 49A, Hoechst).

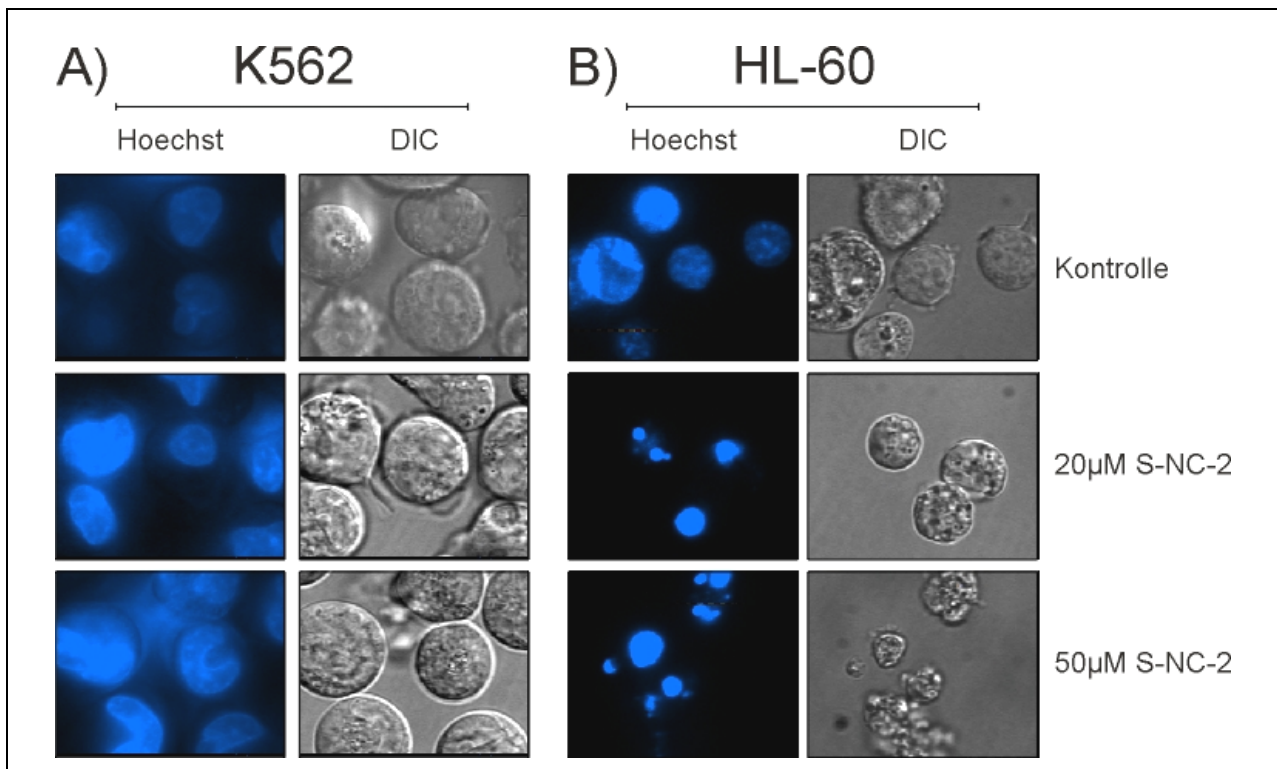


Abb. 49: K562 Zellen weisen keine, durch S-NC-2 induzierte Fragmentierung des Zellkerns auf

K562 und HL-60 Zellen wurden für 16 Stunden mit 20 bzw. 50 μM S-NC-2 inkubiert und anschließend zur Untersuchung der Zellkernmorphologie für 30 Minuten mit 10 μM Hoechst 33342 inkubiert. Die Beobachtung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 460 nm.

Währenddessen erweisen sich HL-60 Zellen als sehr sensitiv gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose (Abb. 49B). Bereits bei einer Konzentration von 20 μM S-NC-2 wurde eine starke Fragmentierung des Zellkerns beobachtet. Eine zusätzliche Erhöhung der Lipidkonzentration resultierte in einer gesteigerten Anzahl fragmentierter Zellkerne (Abb. 49B, Hoechst). Auch das Äußere der Zellen wies starke Unterschiede in den beiden Zelllinien auf. K562 Zellen besaßen auch nach einer Behandlung von 50 μM S-NC-2 eine runde Zellstruktur, obwohl die im Fall von 20 μM noch detektierbaren Filopodien nicht mehr aufzufinden sind. HL-60 Zellen zeigen unterdessen sehr starke Veränderungen in ihrer Erscheinungsform, die vom Schrumpfen (20 μM) in eine offensichtliche Lyse der Zellen übergeht (50 μM) - ein deutliches Anzeichen für die zytotoxische Wirkung von 50 μM S-NC-2 (Abb. 49, DIC).

Zusätzlich zur Untersuchung der Zellkernmorphologie wurde die Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen sowie die Spaltung derer Substrate per SDS-PAGE und Western Blot ermittelt. Hierbei erfolgte erneut die 16-stündige Inkubation der K562 und HL-60 Zellen mit steigender Konzentration an S-NC-2. In Abb. 50 sind exemplarisch die Ergebnisse der Initiator-Caspase-8 sowie die Effektor-Caspase-3 und PARP dargestellt. Wiederum konnte die Resistenz der K562 Zellen gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose bestätigt werden, da im Vergleich zu HL-60 Zellen keine Spaltung der Caspasen oder deren Substrat PARP detektierbar war.

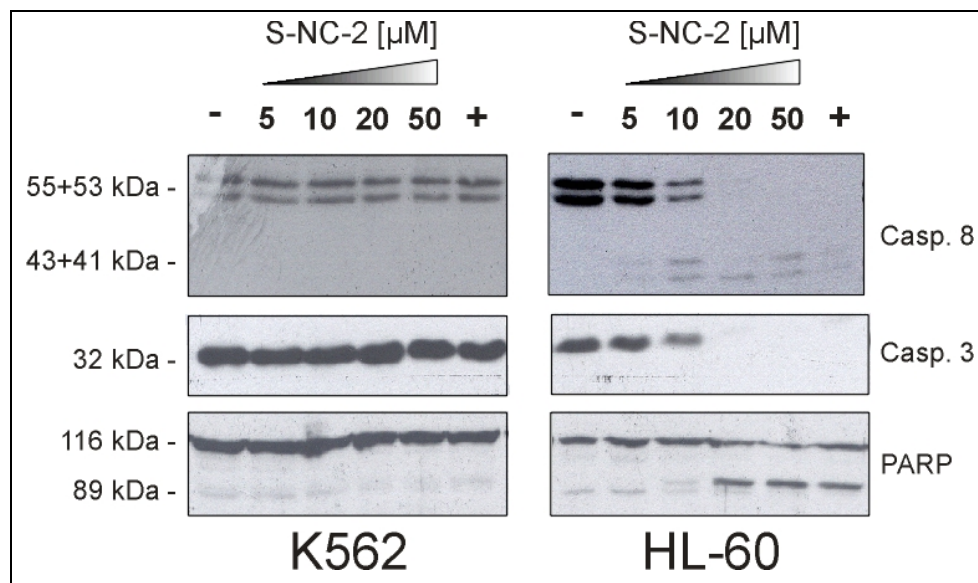


Abb. 50: Keine Spaltung von Caspasen und Caspase-Substraten in K562 Zellen

Zur Untersuchung der Spaltung von Caspasen und deren Substrate wurden K562 und HL-60 Zellen für 16 Stunden mit S-NC-2 behandelt und anschließend per SDS-PAGE und Western Blot die unterschiedlichen Caspasen analysiert. Diese Abbildung zeigt exemplarisch die Caspasen-8 und -3 sowie den Apoptose-Marker PARP.

Es stellte sich nun die Frage, welche Unterschiede zwischen der resistenten K562 und den sensitiven leukämischen Zelllinien bestehen. Daher wurde zunächst eine intensivere Untersuchung der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 durchgeführt. Ein Überblick über die Expression der beiden Todesrezeptoren sowie dem Adapterprotein FADD in unterschiedlichen leukämischen Zelllinien ist in Abb. 51 dargestellt. Bei eingehender Betrachtung kann deutlich festgestellt werden, dass sowohl CD95 als auch TRAIL-R2 in beinahe allen hier aufgeführten Zelllinien vertreten ist. Eine Ausnahme stellt jedoch die Zelllinie K562 dar. In diesen Zellen konnte zwar TRAIL-R2 aber nicht der CD95-Todesrezeptor detektiert werden. Diese Tatsache wurde bereits in der Literatur beschrieben und mittels dieser Versuchsreihe erneut bestätigt (Landowski *et al.*, 1999; Gajate *et al.*, 2000a; Oberle *et al.*, 2005). Zum Ausschluss möglicher Defizite im apoptotischen Signalweg erfolgte eine zusätzliche Analyse der einzelnen Zelllinien auf das Vorhandensein von Caspasen und weiteren pro-apoptischen Proteinen wie Bid oder Cathepsine. Hierbei konnte jedoch kein

Unterschied zwischen den einzelnen Zellen festgestellt werden, die Grundelemente für die Ausführung des apoptotischen Zelltods waren in jeder Zelle vertreten (Daten nicht gezeigt).

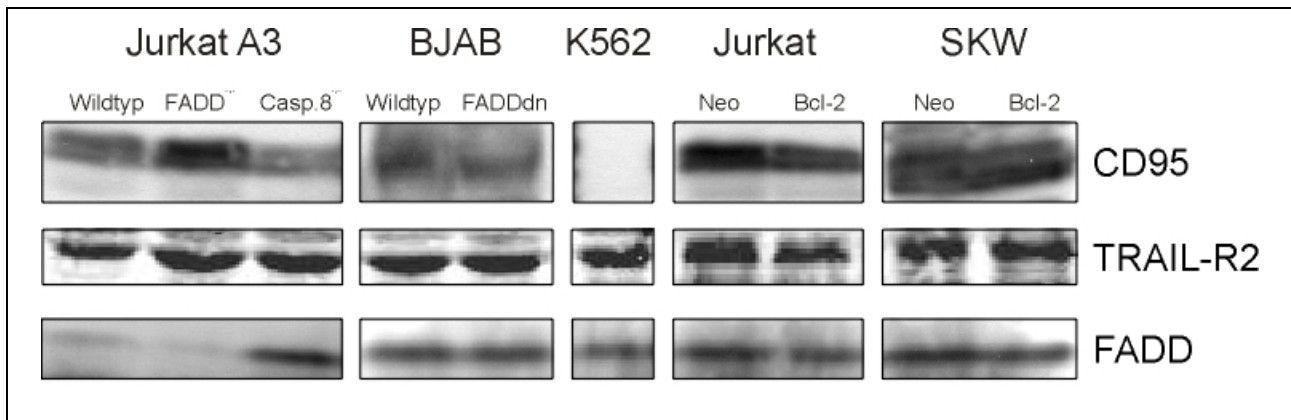


Abb. 51: Untersuchung leukämischer Zelllinien auf das Vorhandensein von CD95 und TRAIL-R2

K562 sowie unterschiedliche Jurkat, BJAB und SKW Zelllinien wurden lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorhandensein von Todesrezeptoren und Adapterproteinen überprüft.

Da auch das FADD-Adapterprotein bereits in den Zellen vorhanden war, stellte sich nun die Frage, ob durch das Wiedereinbringen des CD95 Rezeptors eine Sensibilisierung der K562 Zellen gegenüber S-NC-2 erreicht werden könnte. Hierzu wurde das Plasmid pKEX-2-XR-APO-1 (Prof. Dr. Krammer, DKFZ, Heidelberg), welches das funktionsfähige Protein APO-1 (CD95) enthält, eingesetzt (Munker *et al.*, 1997). K562 Zellen wurden mit 1,2 µg DNA transfiziert und 24 Stunden danach mit 20 bzw. 50 µM S-NC-2 für weitere 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der Proteine sowie deren Analyse mittels Western Blot. Abb. 52 zeigt deutlich einen positiven Verlauf der Transfektion, da das Protein CD95 eindeutig im Zelllysate nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde eine Spaltung des Marker-Proteins PARP sowie der Pro-Caspase-8, -9 und -10 bei einer Konzentration von 50 µM S-NC-2 beobachtet. Caspase-10 (Mch4/FLICE2) ist unter den bislang 14 identifizierten Caspasen die einzige, deren DED eine Ähnlichkeit mit der DED von Caspase-8 aufweist (Ng *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Ebenso konnte die Rekrutierung der Caspase-10 in den DISC demonstriert werden, was auf eine mögliche Funktion bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose schließen lässt. Ob sie funktionell jedoch dazu in der Lage ist, die Caspase-8 zu ersetzen, ist bis zum heutigen Zeitpunkt umstritten (Wang *et al.*, 2001; Kischkel *et al.*, 2001; Milhas *et al.*, 2005).

Die Inkubation der transfizierten K562 Zellen mit Fas-Ligand (+) führte zu keinem Anzeichen der Apoptose-Induktion in diesen Zellen. Allerdings wird die Fas-Ligand induzierte Apoptose nur im Zusammenhang des zellulären Selbstmordes von humanen aktivierten T-Zellen beschrieben. Munker *et al.* demonstrierte im Jahre 1996 eine sehr häufig auftretende Resistenz myeloider leukämischer Zellen gegenüber Fas-induzierter Apoptose, trotz einer induzierten Expression des CD95-Todesrezeptors (Munker *et al.*, 1996; Munker *et al.*, 1997).

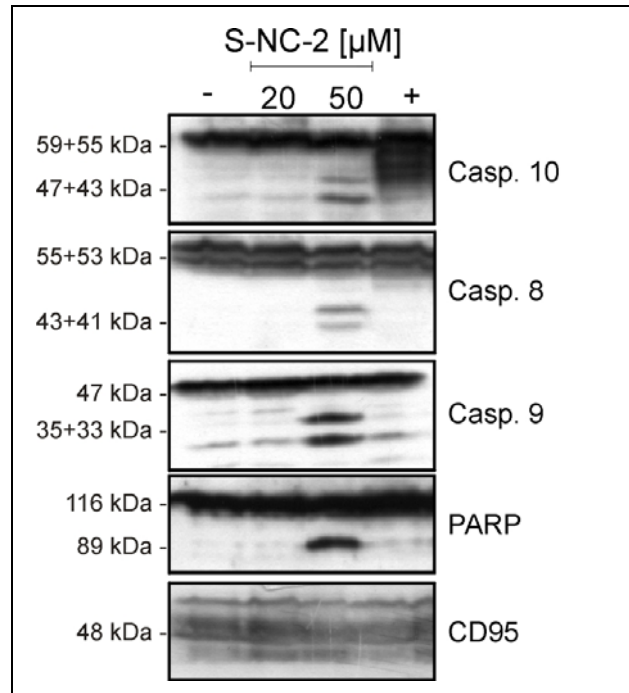


Abb. 52: Transfektion des CD95 Rezeptors führt zur Sensibilisierung der K562 Zellen gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose

K562 Zellen wurden mit 1,2 μg Plasmid-DNA mittels Lipofectamine™ 2000 transfiziert und nach 24 Stunden für weitere 16 Stunden mit 20 bzw. 50 μM S-NC-2 sowie Fas-Ligand (100 ng/ml) und Fas-Enhancer (1 μg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Expression des CD95-Rezeptors sowie Caspase- und PARP-Spaltung mittels Western Blot untersucht.

Das Ergebnis in Abb. 52 lässt jedoch darauf schließen, dass die Transfektion mittels pKEX-2-XR-APO-1 eine Sensibilisierung der K562 Zellen gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose hervorruft und erbringt somit einen weiteren Beweis für die Beteiligung des CD95-Todesrezeptors bei der S-NC-2 induzierten Apoptose.

4.6 Die mitochondriale Beteiligung

Anhand der gebildeten Menge an aktivem DISC können zwei Typen von Zellen unterschieden werden (Abb. 53). Typ I Zellen werden durch eine große Anzahl aktiven DISC charakterisiert, welche eine verstärkte Aktivierung der Caspase-8 nach sich zieht. Die Fülle an Caspase-8 ist ausreichend, um eine direkte Aktivierung weiterer Caspasen in der Kaskade, die sog. Effektor-Caspasen, einzuleiten und die Zerstörung der Zelle zu initiieren.

In Typ II Zellen ist die Menge an gebildetem DISC und somit auch die der aktiven Caspase-8 gering. Die Zellen sind in diesem Fall auf einen Verstärkungsmechanismus angewiesen, welcher über die Mitochondrien führt. Hierbei tritt ein weiteres pro-apoptotisches Protein namens Bid in Kraft, das durch aktive Caspase-8 geschnitten und somit zu tBid (*truncated Bid*) wird. tBid wandert zu den Mitochondrien, induziert dort die Freisetzung von Cytochrom c, was die Aktivierung der

intrinsischen Initiator-Caspase-9 nach sich zieht, die nun wiederum weitere Effektor-Caspasen schneidet. Charakteristisch für Typ II Zellen ist die vollständige Hemmung der Apoptose durch das anti-apoptotische Protein Bcl-2, das die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindert. Bcl-2 ist in der Lage, die Aktivierungsschwelle der Apoptose-Induktion stark herauf zu setzen und somit die Gefahr einer unangebrachten Aktivierung des Zelltods zu reduzieren. Die Signaltransduktion von TRAIL-R1/R2 Rezeptoren verläuft ähnlich wie die der CD95 Aktivierung (Scaffidi *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999; Scaffidi *et al.*, 1999; Lavrik *et al.*, 2005a).

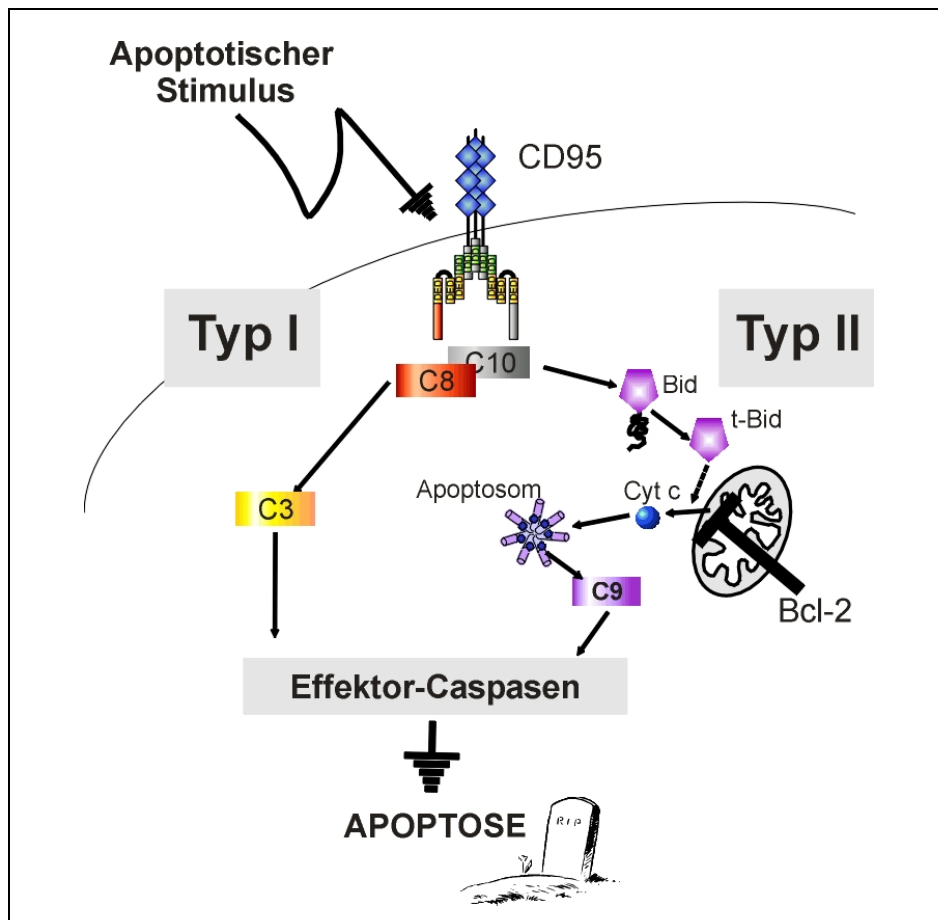


Abb. 53: Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Zellen

In Typ I Zellen ist durch eine starke Aktivierung des DISC, und somit der hohen Anzahl an aktiver Caspase-8, eine direkte Spaltung der Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) möglich. Typ II Zellen benötigen für die Aktivierung der Caspase-Kaskade einen zusätzlichen Verstärkungsschritt über die Mitochondrien. Hierbei wird Cytochrom c freigesetzt und es kommt zur Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9 (C: Caspase).

4.6.1 Hemmung der Apoptose durch Bcl-2

Jurkat Zellen gehören zur Klasse der Typ II Zellen, benötigen somit also eine Amplifizierung des apoptotischen Signals durch die Mitochondrien. Wären die Mitochondrien auch bei der S-NC-2 induzierten Apoptose beteiligt, so könnte die Ausführung des Zelltods laut Definition der Typ II Zellen durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 verhindert werden. Zur

Klärung dieser Hypothese wurde eine Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zelllinie sowie deren Kontroll-Transfektanten (Jurkat Neo), welche nur den leeren Vektor enthalten, für einen Zeitraum von 16 Stunden mit steigender Konzentration an S-NC-2 behandelt und auf typische Marker wie die Externalisierung von PS, der Spaltung von Caspasen und deren Substrat, als auch die internukleosomale DNA-Fragmentierung untersucht.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen sind in Abb. 54 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass S-NC-2 in Jurkat Neo Zellen (heller Farbcode) mit zunehmender Konzentration zu einer Reduktion der vitalen Zellen und zu einem Anstieg der Annexin V positiven Zellen führt. Sie reagieren somit auf eine Behandlung mit S-NC-2 und induzieren die Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin.

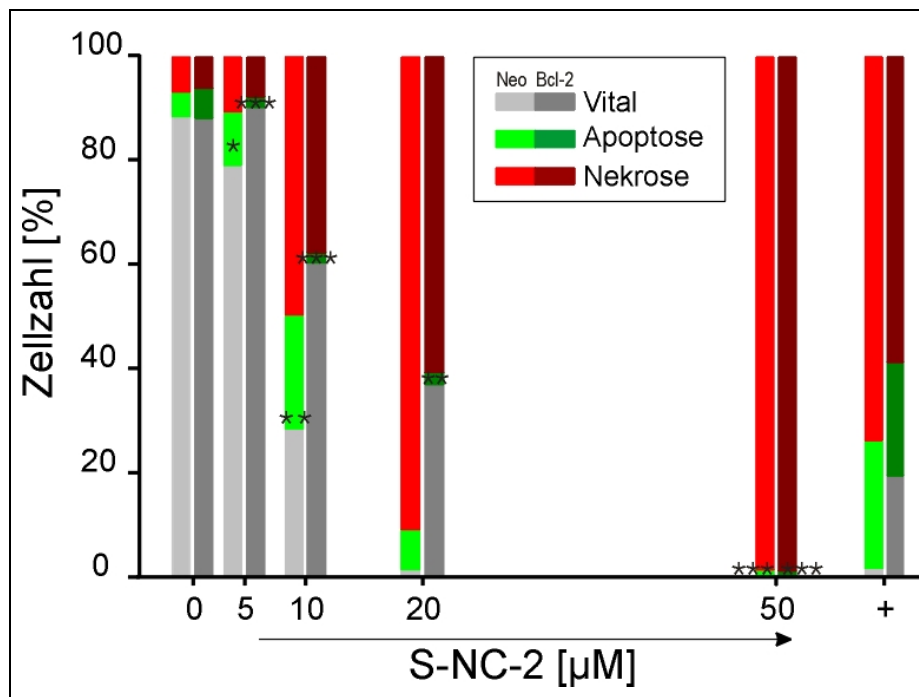


Abb. 54: Bcl-2 Überexpression schützt bis zu einem gewissen Grad Jurkat Zellen vor der Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin

Jurkat Neo (heller Farbcode) und Bcl-2 Zellen (dunkler Farbcode) wurden für 16 Stunden mit S-NC-2 inkubiert, anschließend mittels Annexin V und PI angefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie die unterschiedlich gefärbten Fraktionen quantitativ ausgewertet. Als Positivkontrolle (+) wurde 1 µM TBT eingesetzt. Jeder Messbalken stellt einen Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchsreihen dar. Die statistische Signifikanz der apoptotischen Zellen bezieht sich auf die jeweilige Kontrolle der Messung (n = 4; [*] p < 0,05; [**] p < 0,01; [***] p < 0,001).

Ein Vergleich mit Bcl-2 überexprimierenden Zellen (Abb. 54, dunkler Farbcode) weist eine deutliche Reduktion der Annexin V positiven Zellen sowie eine geringere Sensitivität gegenüber der Behandlung mit S-NC-2 auf. Die Anzahl ungefärbter, vitaler Zellen ist bei gleicher Konzentration in Bcl-2 überexprimierenden Zellen stets deutlich erhöht. Bei 20 µM S-NC-2 macht dies im Vergleich zur Kontrollzelllinie Neo sogar 25% der Zellpopulation aus. Allerdings wird dieser

Effekt bei einer akut toxischen Konzentration von 50 μM wieder relativiert, da in diesem Fall beide Zelllinien durch die lytische Wirkung des Lipids stark in Mitleidenschaft gezogen werden.

Anhand dieser Versuchsreihe zeigt sich bereits eine gewisse Tendenz, die den Schutz der Bcl-2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie Neo erkennen lässt. Zur Bestätigung dieses Sachverhalts erfolgten zusätzliche Untersuchungen, wie etwa zur internukleosomalen DNA-Degradierung. Hierzu wurden Jurkat Neo und Bcl-2 Zellen mit 20 μM S-NC-2 behandelt und alle zwei Stunden, für einen Zeitraum von 16 Stunden, auf ein mögliches Erscheinen der für apoptotische Zellen typische Apoptose-Leiter untersucht. Diese Analysen gaben ein noch deutlicheres Bild wieder als die Ergebnisse der PS-Externalisierung (siehe Abb. 54). Jurkat Neo (Abb. 55A) wiesen eine zeitabhängige DNA-Degradierung auf, die bereits nach 6-stündiger Inkubation detektiert werden konnte. Mit steigender Inkubationszeit nahm die Intensität der Apoptose-Leiter deutlich zu und erreichte nach 16 Stunden ihr Maximum. Im Gegensatz dazu konnte selbst nach 16 Stunden in den Bcl-2 überexprimierenden Zellen kein Anzeichen auf nukleosomale DNA-Degradierung entdeckt werden (Abb. 55B). Das anti-apoptotische Protein scheint die Zellen vor dem typischen DNA-Abbau zu schützen.

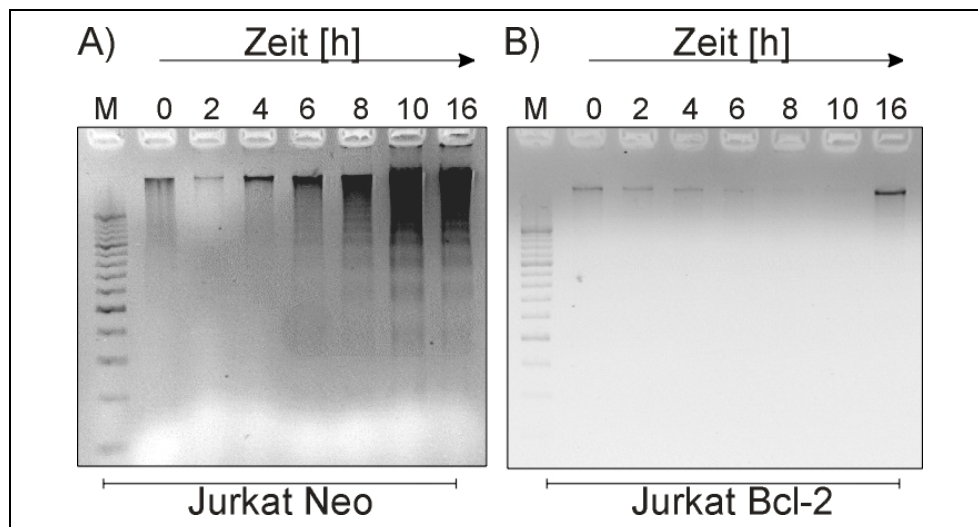


Abb. 55: Bcl-2 überexprimierende Zellen weisen keine DNA-Degradierung auf

Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen (B) sowie deren Kontroll-Transfektante (A) wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, die apoptotischen DNA Fragmente extrahiert, durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die DNA mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese Abbildung zeigt exemplarisch ein Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchsreihen, die alle einen ähnlichen Verlauf aufwiesen.

In Abb. 54 und 55 sind zwei unterschiedliche aber tendenziell in die gleiche Richtung weisende Ergebnisse abgebildet. Zusätzlich sollten nun in einem weiteren Experiment die Differenzen der beiden Zelllinien im Hinblick auf die durch Bcl-2 geschützte DNA-Fragmentierung auf Proteinebene geklärt werden. Hierzu erfolgte erneut für beide Zelllinien eine 16-stündige Inkubation mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 mit anschließender Analyse per SDS-PAGE und Western Blot.

Das Ergebnis zeigt eine deutliche Spaltung des apoptotischen Markerproteins PARP in Jurkat Neo Zellen (Abb. 56A). Im Vergleich hierzu kann in Jurkat Bcl-2 Zellen (Abb. 56B) erst bei der höchsten Konzentration von 50 μM S-NC-2 eine leichte Spaltung des Proteins beobachtet werden. Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 scheint auch in diesem Fall die Degradierung des Proteins PARP zu verhindern. Zusätzlich kann auch eine deutliche Resistenz der Bcl-2 überexprimierenden Zellen sogar bei sehr hohen Konzentrationen des synthetischen Lipids demonstriert werden. Während in der Kontrollzelllinie Neo bei 50 μM S-NC-2 aufgrund der lytischen und zytotoxischen Wirkung beinahe kein Protein mehr vorhanden war, zeigten Jurkat Bcl-2 Zellen keine Verringerung der vorhandenen Proteinmenge.

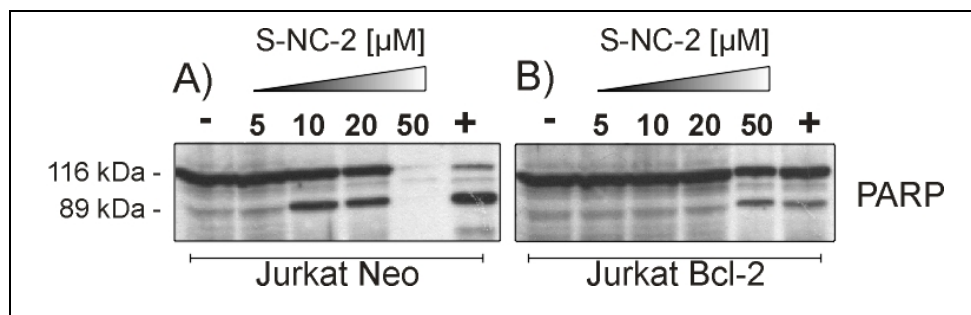


Abb. 56: Die Spaltung von PARP wird durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert

Jurkat Neo (A) und Bcl-2 Zellen (B) wurden für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 sowie 1 μM TBT (+) inkubiert und anschließend auf die Spaltung des apoptotischen Marker Proteins PARP untersucht.

Auch die Untersuchung weiterer wichtiger Vertreter der Caspase-Kaskade, wie etwa der extrinsischen Initiator-Caspase-8 sowie der intrinsischen Initiator-Caspase-9, zeigen eine deutliche Hemmung der Caspase-Aktivierung in Bcl-2 überexprimierenden Zellen (Abb. 57).

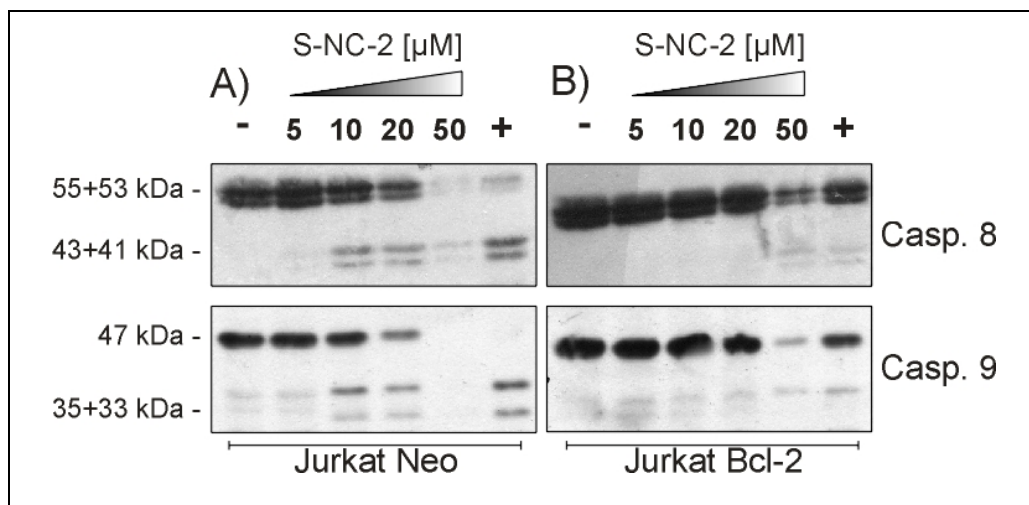


Abb. 57: Bcl-2 verhindert das Cleavage der Initiator-Caspasen-8 und -9

Erneut wurden Jurkat Neo (A) und Bcl-2 überexprimierende Zellen (B) für 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an S-NC-2 bzw. 1 μM TBT (+) inkubiert und anschließend auf die Spaltung der Caspase-8 und -9 untersucht.

Ansteigende Konzentrationen führten in Jurkat Neo Zellen (Abb. 57A) zur Spaltung der Pro-Caspase-8 sowie der Pro-Caspase-9, beides durch die Erscheinung der für die Spaltung spezifischen Doppelbanden zu erkennen. Bcl-2 überexprimierende Zellen zeigten wiederum keine Spaltung und Aktivierung dieser Initiator-Caspasen (Abb. 57B).

Auch die Analyse der Effektor-Caspasen erbrachte die Bestätigung der unter Abb. 54 - 57 dargestellten Ergebnisse. Erneut konnte die Spaltung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 durch die Behandlung mit S-NC-2 ausgelöst werden, wobei die Überexpression von Bcl-2 die Zellen vor der Apoptose-Induktion durch dieses Lipid schützt (Abb. 58).

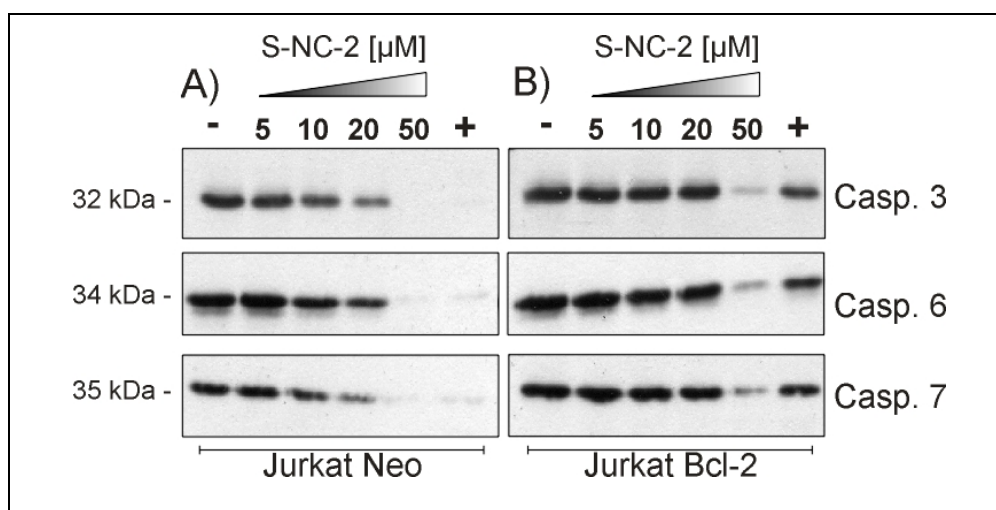


Abb. 58: Kein Cleavage der Effektor-Caspasen in Jurkat Bcl-2 Zellen

Jurkat Neo (A) und Bcl-2 (B) Zellen wurden für 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an S-NC-2 bzw. 1 μM TBT (+) inkubiert und anschließend auf die Spaltung der Caspase-3, -6 und -7 untersucht. Diese Abbildung zeigt exemplarisch ein Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchsreihen, die alle einen ähnlichen Verlauf aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Apoptose-induzierende Wirkung des Phospholipids S-NC-2 durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in Jurkat Zellen sehr stark reduziert ist. Jurkat Zellen gehören zur Gruppe der Typ II Zellen und sind dadurch laut Definition zur Ausübung der Apoptose auf einen mitochondrialen Amplifizierungs-Zyklus angewiesen (Scaffidi *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999). Durch die Überexpression des Proteins Bcl-2, welches eine wichtige Rolle bei dieser Art der Apoptose-Induktion spielt, wird die Verstärkung des Apoptose-Signals über die Mitochondrien gehemmt, die Aktivierung des DISC ist nicht ausreichend und führt somit in Jurkat Zellen nicht zur Apoptose. Abb. 54 - 58 zeigen eine deutliche, durch die Überexpression von Bcl-2 vermittelte Hemmung der Apoptose-induzierenden Wirkung von S-NC-2, was auf eine Beteiligung der Mitochondrien an der Signalweiterleitung schließen lässt.

Um diese Hypothese zu prüfen, sollte der Effekt einer Bcl-2-Überexpression in sog. Typ I Zellen untersucht werden. Diese werden durch eine große Menge an aktivem DISC sowie aktiver Caspase-8 charakterisiert und sind dadurch prinzipiell nicht auf einen Verstärkungsmechanismus

durch die Mitochondrien angewiesen. In Typ I Zellen spielt daher die mitochondriale Beteiligung am apoptotischen Geschehen nur eine untergeordnete Rolle. Zur Klärung, ob die Mitochondrien bei der S-NC-2 induzierten Apoptose eine ausschlaggebende Rolle spielen, erfolgte eine Untersuchung der Apoptose-induzierende Wirkung von S-NC-2 in SKW6.4 Zellen. SKW6.4 gehören zu den sog. Typ I Zellen und es stand zusätzlich eine Bcl-2 überexprimierende Variante zur Verfügung.

Daher wurden SKW6.4 Neo und Bcl-2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden behandelt, lysiert und die Spaltung der Caspasen mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 59). Die Kontroll-Transfektante SKW6.4 Neo reagierte ebenfalls sensitiv auf die Behandlung mit APC, wie durch die Spaltung der Caspasen-8, -10 und -3 deutlich zu erkennen ist (Abb. 59A). Bereits eine Konzentration von 10 μM S-NC-2 war ausreichend, um die ersten Anzeichen der Caspase-Kaskade Aktivierung beobachten zu können, welche mit zunehmender Konzentration weiter anstieg. Die Behandlung der Bcl-2 überexprimierenden Variante dieser Zelllinien sprach ebenfalls auf die Behandlung mit S-NC-2 an, wenn auch für die Spaltung der Caspasen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, eine höhere Konzentration an S-NC-2 nötig war (Abb. 59B). Diese Ergebnisse deuten wiederum auf eine Beteiligung der Mitochondrien hin, da für die Apoptose-Induktion in Bcl-2 überexprimierenden Zellen eine doppelt so hohe Konzentration an S-NC-2 nötig war, wie in der Kontroll-Zelllinie Neo. Allerdings kann die Hemmung der Mitochondrien durch die übermäßig starke Aktivierung der Caspase-8 am DISC überwunden werden. Somit ist keine vollständige Hemmung der Caspase-Kaskade zu detektieren.

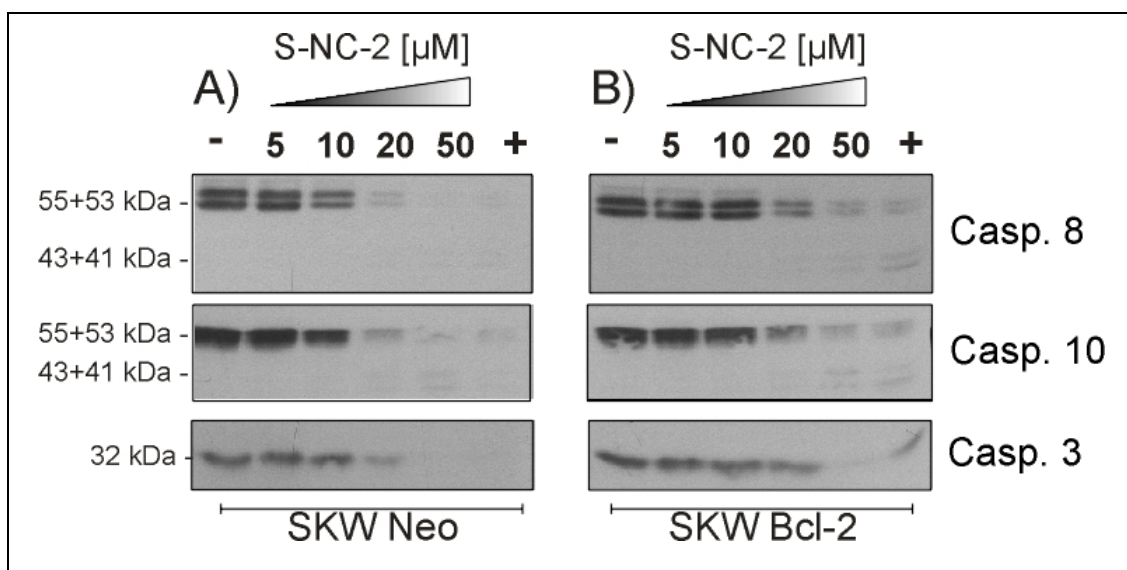


Abb. 59: Bcl-2 Überexpression führt zu keiner vollständigen Hemmung der Apoptose in Typ I Zellen
 Unbehandelte (-), mit 1 μM TBT (+) sowie S-NC-2 behandelte SKW6.4 Neo und Bcl-2 Zellen wurden nach 16 Stunden durch Zentrifugation geerntet, lysiert und anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot auf die Spaltung der Initiator-Caspasen-8 und -10 sowie der Effektor-Caspase-3 untersucht.

Die Sensitivität gegenüber der Bcl-2 Überexpression, welche durch die Untersuchung zur Caspase-Spaltung in Abb. 59 deutlich wurde, konnte allerdings auf Ebene der PARP-Spaltung sowie der nukleosomalen DNA-Fragmentierung nicht im selben Ausmaß bestätigt werden. Abb. 60 zeigt deutlich, dass in beiden Zelllinien eine Konzentration von 10 μM S-NC-2 bereits ausreichend ist um zum einen leichte Spaltung von PARP und zum anderen die typische Leiterbildung apoptotischer DNA hervorzurufen.

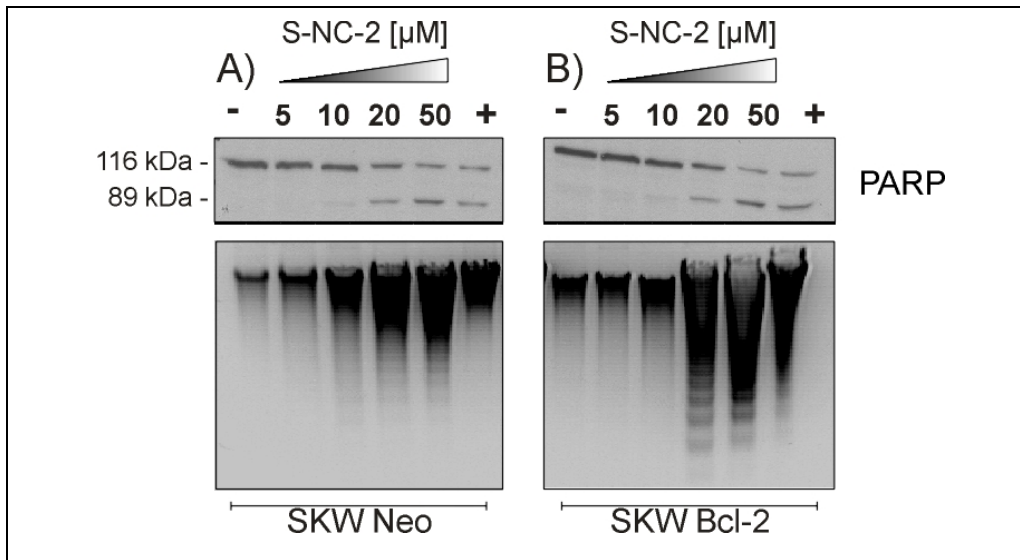


Abb. 60: S-NC-2 induziert die Spaltung von PARP sowie die Fragmentierung der DNA in SKW Zellen
SKW Neo (A) sowie Bcl-2 überexprimierende Zellen (B) wurden für 16 Stunden mit 1 μM TBT (+), Ethanol (-) oder unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 behandelt und anschließend mittels Western Blot auf die Spaltung von PARP sowie via Agarose-Gel-Elektrophorese auf die für apoptotische Zellen typische DNA-Leiter untersucht.

4.6.2 Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 54 - 60, demonstrieren eine mögliche Beteiligung der Mitochondrien in der S-NC-2 induzierten Apoptose. Für einen langen Zeitraum wurde die alleinige Aufgabe der Mitochondrien als zelluläre ATP-Produzenten angesehen. In jüngster Zeit verdichteten sich jedoch mehr und mehr Beweise, dass diese Zellorganellen eine wichtige Rolle als Sensor sowie als ausführende Kraft bei der Entscheidung haben, ob eine Zelle leben oder sterben wird. Weiterhin wird angenommen, dass sie vielleicht sogar den Zelltod in Richtung Apoptose oder Nekrose lenken können (Krohn *et al.*, 1999). Mitochondrien sind zusätzlich in der Lage, pro-apoptotische Proteine aus ihrem Intermembranraum freizusetzen und somit positiv in den Verlauf der apoptotischen Signalkaskade einzugreifen. Doch die Freisetzung dieser Proteine muss mit der Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen einhergehen. Der genaue Mechanismus ist bis heute aber noch nicht bekannt. Allerdings wurde im Zusammenhang der möglichen Theorien zur Freisetzung dieser Proteine auch die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran diskutiert, was zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials

(MMP, $\Delta\Psi_m$) in der betroffenen Zelle führt. Diese Reduktion des MMP wurde in einer Vielzahl von Modellen der Apoptose-Induktion beschrieben und kann mit Hilfe des Farbstoffes Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat (TMRE) gemessen werden (Gottlieb *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 2001; Budinger *et al.*, 2002). TMRE repräsentiert einen kationischen, lipophilen Farbstoff, welcher in die Zellen eindringt und reversibel in der hochgradig negativ geladenen mitochondrialen Matrix akkumuliert. Somit ist es möglich, eine dynamische Messung des Potentials auszuführen (Krohn *et al.*, 1999).

Zur weiteren Analyse der möglichen mitochondrialen Beteiligung in der S-NC-2 induzierten Apoptose wurden die zu untersuchenden Zellen für 30 Minuten mit 0,5 μM TMRE bei 37°C angefärbt und anschließend die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantitativ ausgewertet. In Abb. 61 ist exemplarisch die Färbung von Jurkat Zellen mit TMRE dargestellt. Zur gleichzeitigen Darstellung der Zelle sowie deren Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des OpenLab Programms eine Überlagerung der Fluoreszenz- und DIC-Bilder. Unbehandelte Zellen (Kontrolle, Abb. 61A) besitzen in der Regel intakte Mitochondrien, welche eine große Menge des Farbstoffes inkorporieren können. Somit können in jeder Zelle die gesunden Mitochondrien durch die starke Rotfluoreszenz identifiziert werden. Die Behandlung mit FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon) führt zur Depolarisation der Mitochondrien und somit auch zur Freisetzung von TMRE (Abb. 61B) (Ricci *et al.*, 2003). Bereits nach 30 Minuten kann keine Rotfluoreszenz in den Zellen mehr beobachtet werden. Diese Substanz wurde in allen Versuchen als Positivkontrolle und zur Kalibrierung der durchflusszytometrischen Messung verwendet, ist aber nicht in den quantitativen Messungen wiedergegeben.

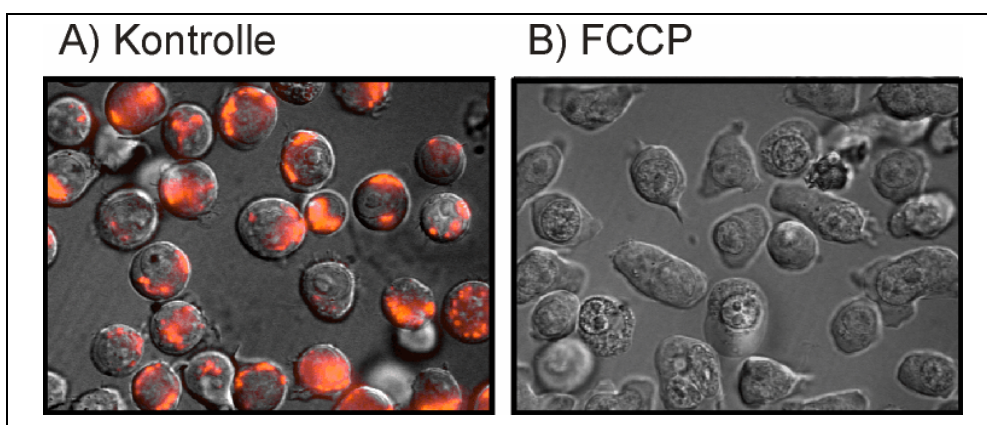


Abb. 61: TMRE-Färbung von Jurkat Zellen zur Ermittlung des Membranpotentials

Zur Bestimmung des Membranpotentials werden die Zellen für 30 Minuten mit 0,5 μM TMRE inkubiert und anschließend die Intensität der Rotfluoreszenz in den Zellen per Durchflusszytometrie ermittelt. Kontrollzellen weisen eine hohe Fluoreszenzintensität auf, da aufgrund des intakten Membranpotentials eine große Menge des Farbstoffes inkorporiert werden kann (A). Eine Behandlung der Zellen mit Substanzen wie FCCP führt zum vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials und zu einem Verlust der Rotfluoreszenz (B). Die gleichzeitige Darstellung von Fluoreszenz und DIC erfolgte durch die Überlagerung beider Bilder mit Hilfe des OpenLab Programms (Vergrößerung: 630-fach).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann der relative Verlust der Rotfluoreszenz einer Zellpopulation bestimmt und somit Rückschlüsse auf deren mitochondriale Membranintegrität gezogen werden. Zur Untersuchung eines möglichen, durch S-NC-2 ausgelösten Verlusts des MMP wurden BJAB bzw. Jurkat Zellen für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, vor Ablauf der Inkubation zusätzlich mit 0,5 μM TMRE angefärbt und anschließend zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz mit PBS gewaschen. Die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abb. 62 dargestellt, in welcher nur Zellen mit einem hohen $\Delta\Psi_m$ (starke Rotfluoreszenz) aufgeführt wurden. Abb. 62A zeigt eine deutliche Abnahme der Zellen mit starker Rotfluoreszenz, was eine Depolarisation bzw. eine Schädigung der mitochondrialen Membranintegrität vermuten lässt. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ konnte in BJAB WT sowie in der FADDdn Variante dieser Zellen beobachtet werden. Die Untersuchung von Jurkat Zellen ergab ein etwas anderes Bild (Abb. 62B). Wiederum konnte ein Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in der Kontroll-Transfektante Neo beobachtet werden. Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 resultierte allerdings in einem Schutz der Zellen vor der Reduktion von $\Delta\Psi_m$, ein Ergebnis, welches mit den in Kap. 4.6.1 durchgeführten Proteinuntersuchungen konform ist.

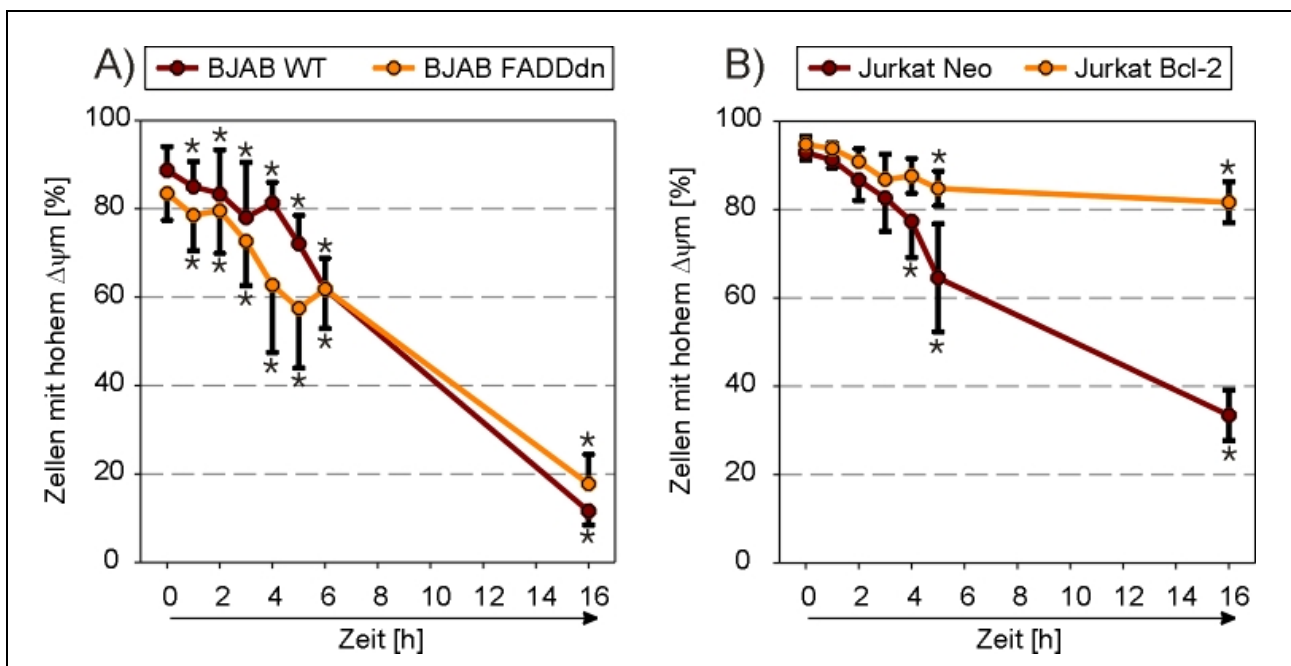


Abb. 62: S-NC-2 induziert einen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials

BJAB Wildtyp (WT) und BJAB FADDdn (A) sowie Jurkat Neo und Bcl-2 Zellen (B) wurden für einen Zeitraum bis zu 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt. Nach Ablauf der Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen mit dem spezifischen, kationischen Mitochondrienfarbstoff TMRE, welcher in Abhängigkeit des mitochondrialen Potenzials in diese Organellen inkorporiert wird. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (BJAB WT + FADDdn: n = 12, Jurkat Neo + Bcl-2: n = 6, [*] p < 0,001).

Da in Abb. 62 eine deutliche Hemmung der Reduktion des MMP durch die Überexpression von Bcl-2 dargestellt ist, wurde eine mögliche Hemmung durch weitere wichtige Komponenten des

apoptotischen Signalwegs untersucht. Hierbei fanden unterschiedliche Jurkat Zelllinien Verwendung, welche eine Defizienz im FADD-Adapterprotein sowie in der Initiator-Caspase-8 aufweisen (Abb. 63A). Erneut erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 20 μM S-N-2 für einen Zeitraum von 16 Stunden sowie die quantitative Auswertung der Zellen mit hoher Rotfluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierbei wird deutlich, dass weder das Fehlen von FADD noch von Caspase-8 die Reduktion von MMP verhindern kann, da alle drei Zelllinien eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber S-NC-2 aufweisen.

Die bereits in Kap. 4.5 eingeführte, gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose resistente K562 Zelllinie wurde ebenfalls genauer auf eventuelle mitochondriale Veränderungen untersucht. Auch in diesem Fall konnte S-NC-2 keinerlei apoptotische Merkmale hervorrufen, da die Mitochondrien dieser Zelllinie nicht auf die Behandlung mit S-NC-2 ansprachen. In Abb. 63B ist deutlich zu erkennen, dass auch nach 16-stündiger Behandlung keine Reduktion der Rotfluoreszenz detektiert werden konnte.

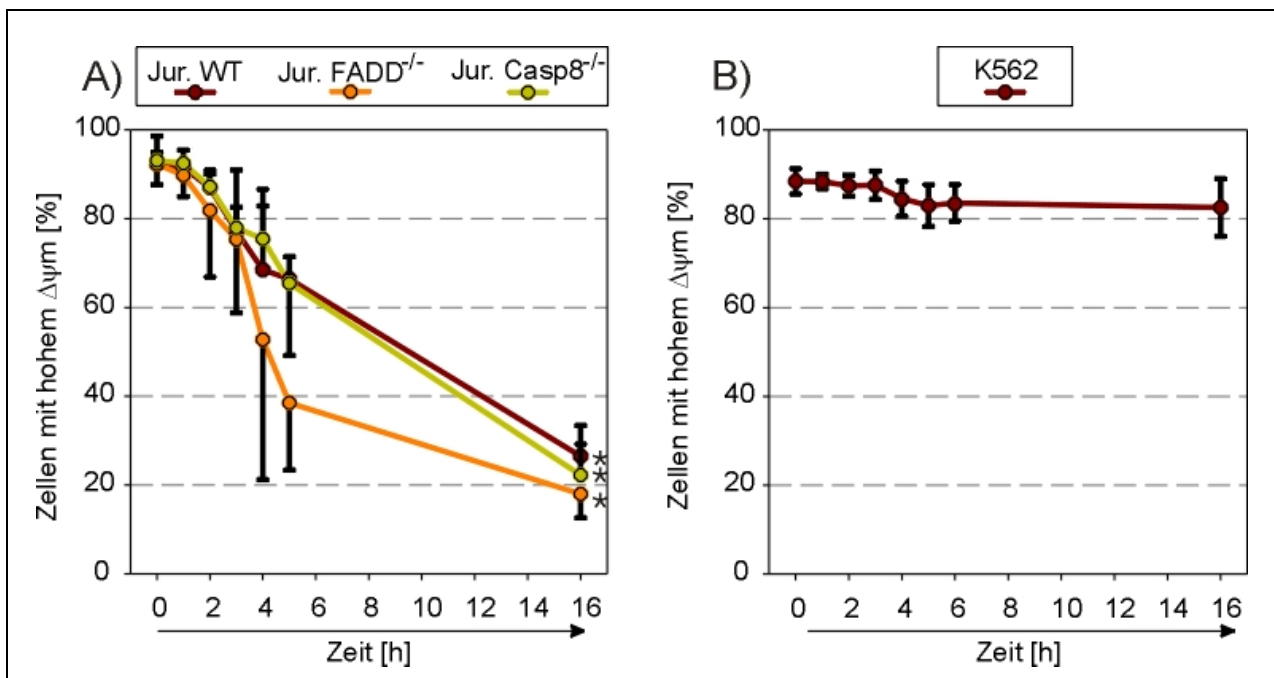


Abb. 63: Untersuchung des MMP in defizienten Zelllinien nach S-NC-2 Behandlung

Jurkat Wildtyp, FADD^{-/-} und Caspase-8^{-/-} (A) sowie K562 Zellen (B) wurden für 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 inkubiert, anschließend mit 0,5 μM TMRE angefärbt und via Durchflusszytometrie die Menge an Zellen mit hoher Rotfluoreszenz ermittelt (Jurkats 0-5 h: n = 3, 16 h: n=6; K562: n= 6, [*] p < 0,001). Die statistische Signifikanz der einzelnen Messpunkte bezieht sich jeweils auf die entsprechende Kontrolle.

Um zu überprüfen, ob der Verlust des mitochondrialen Potenzials auf die Aktivierung bestimmter Caspasen zurückgeführt werden kann, erfolgte eine Vorinkubation der Jurkat und BJAB Zellen mit spezifischen Inhibitoren der Initiator- und Effektor-Caspasen (Abb. 64).

Die Behandlung der Zellen mit 20 μM S-NC-2 induzierte, wie bereits in Abb. 62 und 63 deutlich demonstriert, nach 16-stündiger Inkubationszeit einen drastischen Verlust des MMP. Die

Hemmung der Initiator-Caspasen-8 (L/IETD) und -10 (AEVD) konnte die Reduktion des Membranpotenzials nicht inhibieren (Abb. 64). Auch eine Vorbehandlung mit Inhibitoren der Caspase-3 (DEVD) und -2 (VDVAD) erbrachte keine Hemmung. Allerdings zeigte der spezifische Caspase-9 Inhibitor LEHD einen deutlichen Effekt, da ein Anstieg der Zellen mit hohem $\Delta\Psi_m$ von 31,3% ($\pm 11,8$) auf 69,7% ($\pm 1,9$) in Jurkat und von 7,8% ($\pm 3,4$) auf 60,2% ($\pm 8,9$) in BJAB Zellen verzeichnet werden konnte.

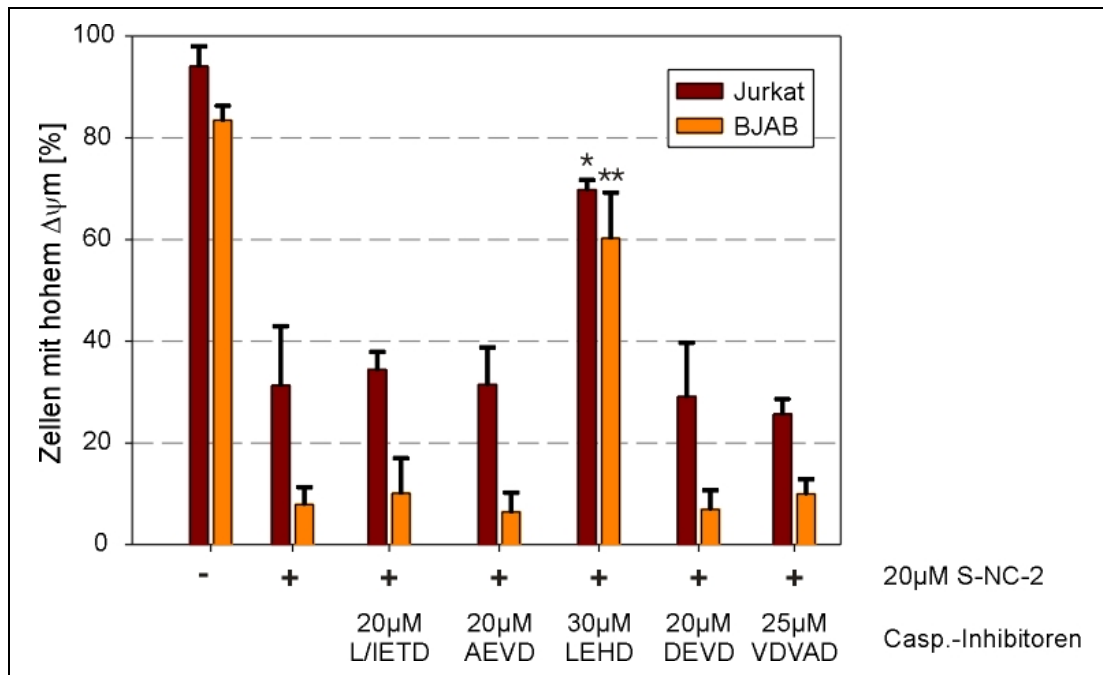


Abb. 64: Nur die Hemmung der Caspase-9 führt zur Reduktion des MMP-Verlusts

Jurkat und BJAB Zellen wurden für 30 Minuten mit spezifischen Caspase-Inhibitoren vorinkubiert, anschließend für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt und zur Detektion des mitochondrialen Potenzials mit 0,5 μM TMRE gefärbt. Jeder Messbalken entspricht dem Mittelwert aus 3 Versuchsreihen ($n = 3$, [*] $p < 0,01$; [**] $p < 0,001$).

Zelllinien, die einen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials aufwiesen, sollten zusätzlich auf mögliche weitere Schädigungen der Mitochondrien untersucht werden. Hierzu eignete sich der MTT-Test, welcher die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen detektiert. Es handelt sich dabei um eine kolorimetrische Analyse, der eine Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes zu blauen unlöslichen Formazan-Kristallen durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zugrunde liegt. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist ein Maß für die Vitalität dieser Organellen. Abb. 65 demonstriert die mitochondriale Vitalität der Jurkat, BJAB und K562 Zellen nach 16-stündiger Behandlung mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2.

Die Zellen wurden für 16 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen an S-NC-2 inkubiert, anschließend durch Zentrifugation geerntet, mit PBS gründlich gewaschen und darauf hin für 2 Stunden mit 0,5 mg/ml MTT inkubiert. Anschließend erfolgte das Herauslösen der Formazan-Kristalle sowie die photometrische Bestimmung der Menge an gebildetem Formazan. Zur

graphischen Darstellung und für einen besseren Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander, wurde die Menge an Formazan und somit die Aktivität der Dehydrogenasen in unbehandelten Kontrollzellen gleich 100% gesetzt und die gemessenen Werte der behandelten Proben im Verhältnis dazu berechnet (siehe Abb. 65).

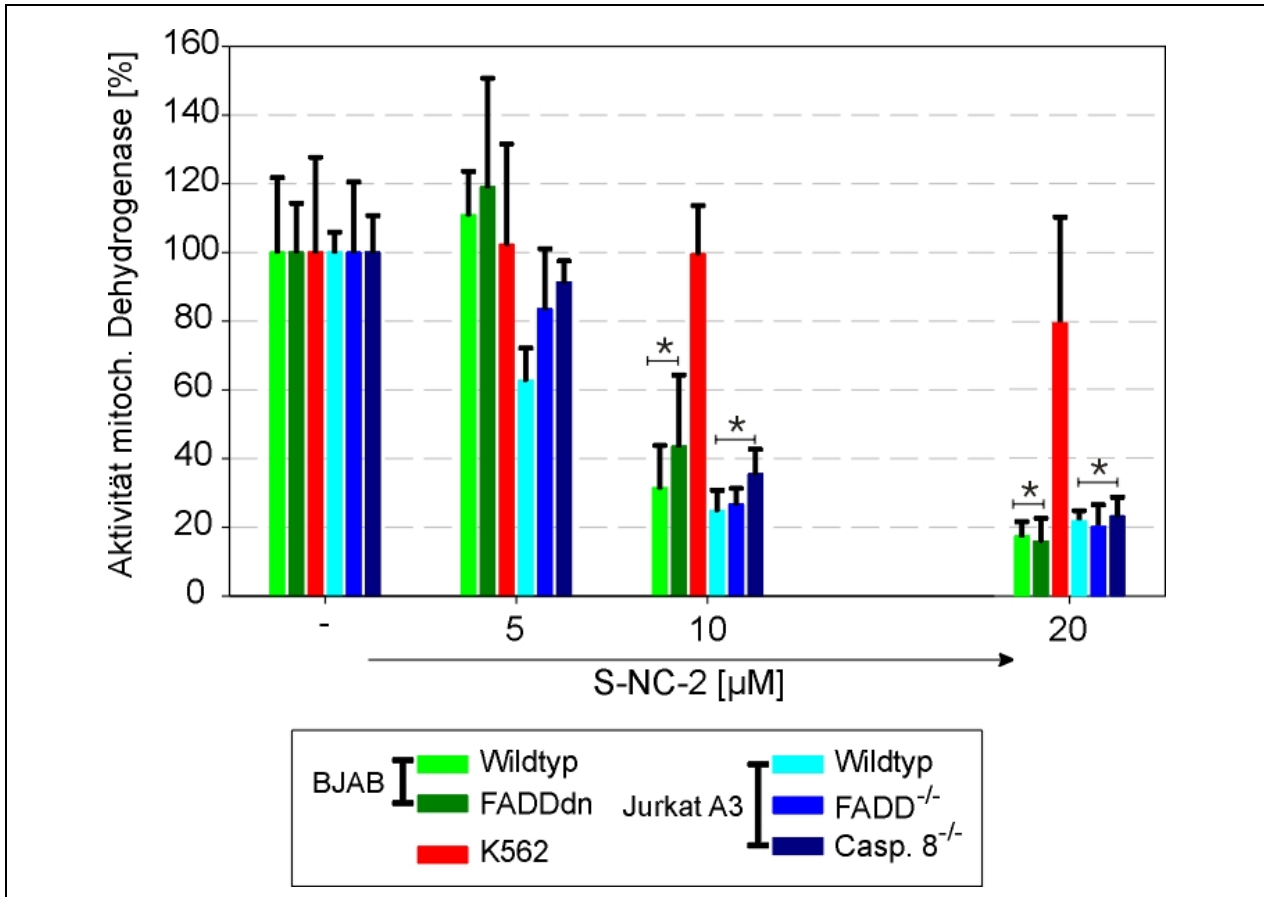


Abb. 65: Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase

Unterschiedliche Varianten der BJAB (grüne Balken), Jurkat (blaue Balken) und K562 Zellen (rote Balken) wurden für 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 behandelt und mit Hilfe des MTT-Assays die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und somit die Vitalität der Mitochondrien bestimmt (BJAB + K562: n = 4; Jurkat: n = 3, [*] p < 0,001). Die statistische Signifikanz der einzelnen Messpunkte ist jeweils auf die Kontrolle bezogen.

Die Ergebnisse in Abb. 65 zeigen in den meisten untersuchten Zelllinien einen deutlichen dosisabhängigen Rückgang der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität. Während eine geringe Konzentration von 5 µM in BJAB Zellen (grüne Balken) zu einer leichten Stimulation führt, zeigen Jurkat Zellen (blaue Balken) bereits eine deutliche Reduktion der mitochondrialen Aktivität, welche durch das Fehlen bestimmter Proteine wie FADD und Caspase-8 jedoch geringfügig verzögert wird. Die in diesen Versuchsreihen eingesetzte höchste Konzentration von 20 µM zeigte jedoch nach 16 Stunden einen eindeutigen Verlust der mitochondrialen Aktivität. Diese Ergebnisse sind konform mit dem in Abb. 62 und 63 dargestellten Verlust des MMP. Die K562 Zelllinie (roter

Balken) zeigte erneut keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Vitalität, auch nicht nach Behandlung mit 20 μM S-NC-2.

4.6.3 Induziert S-NC-2 eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies?

Eine stetig wachsende Anzahl von Daten zeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beim programmierten Zelltod involviert sein könnten. Hierbei wird angenommen, dass ROS für Konformationsänderungen in pro-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-X_L beteiligt sein könnten, oder sogar für den Rückgang des mRNA Levels von Bcl-X_L verantwortlich sind (Herrera *et al.*, 2001; Fleury *et al.*, 2002). Immer häufiger wird beschrieben, dass die Bildung von ROS und die Aktivierung von Caspasen unerlässliche Eigenschaften in CD95-induzierter Apoptose sind. Es wird ebenfalls angenommen, dass ROS die Aktivierung der Caspase-Kaskade beeinflussen, da der Einsatz von Antioxidanzien zu einer Hemmung von Caspasen führte und dass eine alleinige Stimulation von ROS Caspasen aktivieren könne. Wie jedoch diese zellulären Ereignisse in die CD95 vermittelte Apoptose eingegliedert werden können, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend unklar. Allerdings erbrachten neuere Daten, dass ROS für die Bildung des Apoptosoms in Jurkat Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten (Sato *et al.*, 2004). Da bereits ein Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials nach der Inkubation mit S-NC-2 detektiert werden konnte (siehe Abb. 62 & 63), stellte sich nun die Frage, ob auch die Freisetzung von ROS beim apoptotischen Signalweg beteiligt ist.

Zur Bestimmung, ob ROS während der S-NC-2 induzierten Apoptose freigesetzt werden, kamen zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. Mit Hilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) ist es möglich, allgemeinen oxidativen Stress in der Zelle zu bestimmen. Durch das Vorhandensein von ROS findet die Umwandlung des nicht fluoreszierenden H₂DCF-DA zum fluoreszierenden DCF statt. Dihydrorhodamin 123 (DHR) dient der Detektion von spezifischen reaktiven Spezies wie $\bullet\text{O}_2^-$ und Nitritoxid (NO) und wird bei der Freisetzung dieser Radikale zu Rhodamin umgewandelt. Beide Fluoreszenzfarbstoffe können mit Hilfe des Fluoreszenzreaders bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen werden.

BJAB, K562 und Jurkat Zellen wurden mit den entsprechenden Farbstoffen für 40 Minuten beladen, anschließend mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 bzw. 10 μM SIN-1 (3-[4-Morpholinyl]sydnemine hydrochlorid) als NO-Donor (Positivkontrolle) behandelt, in 96-Well Platten überführt und stündlich gemessen. Im Beisein von molekularem Sauerstoff bildet sie Superoxidanionen und Nitritoxid, welche spontan Peroxinitrit bilden.

Die Fluoreszenzmessung der Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der behandelten Proben als Vielfache der Kontrollen dargestellt. Hierbei wurde deutlich, dass die Behandlung der jeweiligen Zellen mit dem synthetischen Lipid S-NC-2 selbst nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden zu keiner Freisetzung von ROS führt (Abb. 66A). Es konnte keine

Zunahme der Fluoreszenzintensität von DCF bestimmt und somit kein allgemeiner oxidativer Stress gemessen werden. Die Behandlung der Zellen mit SIN-1 zeigt bereits nach 1-stündiger Inkubation einen starken Anstieg der Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt), welche nach 10 Stunden Behandlung in BJAB und K562 Zellen um das 2,5-fache der Kontrolle anstieg.

Da mittels des DCF-Tests zwar die Gegenwart von Peroxidase/H₂O₂, RO₂•, RO•, •OH, HOCl und ONOO⁻ bestimmt werden kann, sollte mit Hilfe von DHR eine eventuelle Freisetzung von •O₂⁻ gemessen werden (siehe Abb. 66B). Hierfür wurden wiederum BJAB, K562 und Jurkat Zellen mit 10 bzw. 20 µM S-NC-2 behandelt und anschließend stündlich ein eventueller Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Abb. 66B zeigt jedoch deutlich, dass auch nach 24 Stunden Inkubation keine Freisetzung von •O₂⁻ detektiert werden konnte.

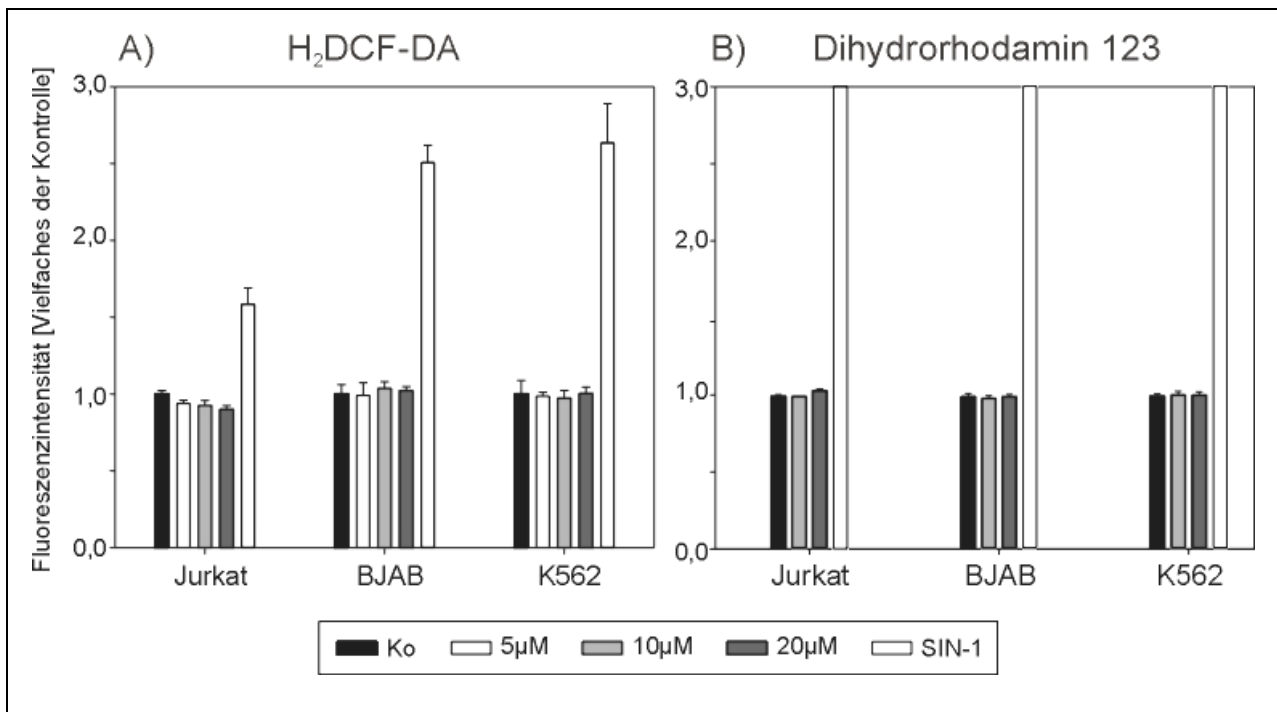


Abb. 66: S-NC-2 induziert keine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

Zur Messung der Freisetzung von ROS wurden BJAB, K562 und Jurkat Zellen mit 50 µM H₂DCF-DA bzw. 10 µM Dihydrorhodamin 123 beladen und nach erfolgter Inkubation mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 die Umsetzung der Farbstoffe in das fluoreszierende DCF bzw. Rhodamin bei 530 nm gemessen. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen. Jeder Messwert wurde aus einer Vierfachbestimmung ermittelt.

4.6.4 Bid – eine Möglichkeit der mitochondrialen Permeabilisierung?

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte die Beteiligung der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 sowie die Teilnahme der Mitochondrien am S-NC-2 induzierten Zelltod unabhängig voneinander demonstriert werden. Da beide Angriffspunkte räumlich getrennt voneinander in der Zelle vorliegen, wurde nach einer möglichen Verbindung dieser beiden Signalwege gesucht. Ein wichtiges, bereits gut in der Literatur dokumentiertes Verbindungsprotein stellt das *BH3-only*

Protein Bid (p22) und dessen aktive Form tBid (p15) dar. Bid war eines der ersten entdeckten Mitglieder der *BH3-only* Proteine und wurde ursprünglich als Bindungspartner von Bax und Bcl-2 identifiziert. Die aktive Form von Bid wandert zu den Mitochondrien und ist dort in der Lage, proapoptotische Moleküle, wie z. B. Cytochrom c, aus dem Intermembranraum freizusetzen (Zinkel *et al.*, 2003). Bid kann von Caspase-8, Granzym-B, Cathepsinen und Calpain geschnitten und somit aktiviert werden (Gross *et al.*, 1999; Heibin *et al.*, 2000; Lutter *et al.*, 2001).

Die Untersuchung zur Beteiligung von Bid erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 5, 10 und 20 μM S-NC-2 behandelt, lysiert und die Spaltung mit Hilfe eines Antikörpers untersucht, welcher nur das p22 Bid erkennt. Die Spaltung von Bid zu p15 tBid ist durch eine Reduktion der p22 Bande zu erkennen. In Abb. 67 ist die Spaltung von Bid in Typ I (SKW) und Typ II Zellen (Jurkat) abgebildet.

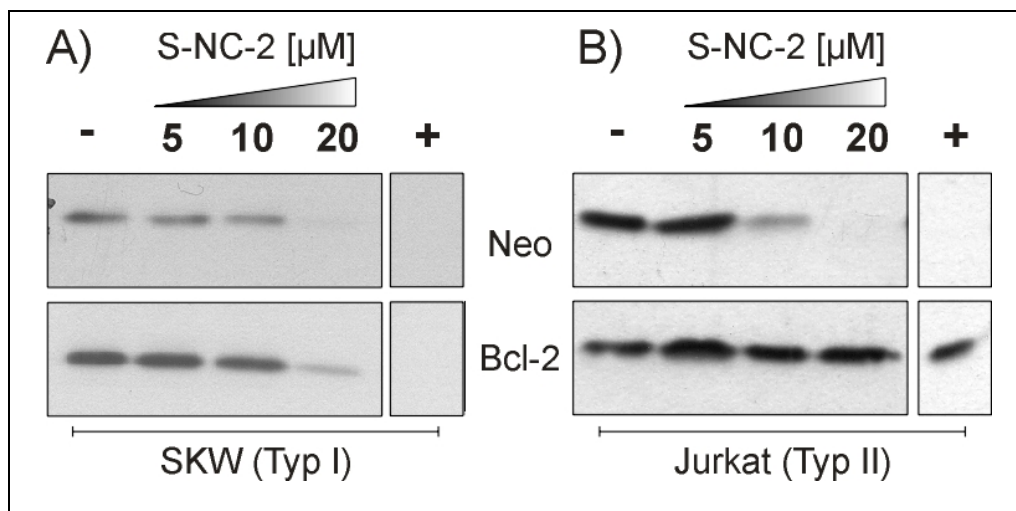


Abb. 67: Spaltung von Bid in Typ I und Typ II Zellen

SKW Neo und Bcl-2 (A) sowie Jurkat Neo und Bcl-2 überexprimierende Zellen (B) wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 behandelt und anschließend auf die Spaltung des p22 Bid untersucht. Die Spaltung von Bid geht mit der Reduktion der sichtbaren Bande einher. Als Positivkontrolle (+) erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 1 μM TBT.

In Typ I SKW Zellen konnte bei einer Konzentration von 20 μM S-NC-2 eine deutliche Reduktion der p22 Bid-Bande detektiert werden, was auf die Spaltung von Bid zurückzuführen ist (Abb. 67A). Die Überexpression von Bcl-2 verursachte in Typ I Zellen eine geringe Hemmung der Bid Spaltung. In Jurkat Zellen erzielte bereits eine Konzentration von 10 μM S-NC-2 die Spaltung von Bid (Abb. 67B). Eine weitere Steigerung der Konzentration führt offensichtlich zu einer Verstärkung der Spaltung, da kaum eine Bande mehr detektierbar ist. Die Überexpression von Bcl-2 in Jurkat Zellen resultiert in einer Hemmung der Bid-Spaltung, auch bei der in diesem Fall eingesetzten höchsten Konzentration von 20 μM S-NC-2. Ebenso wiesen die TBT behandelten Proben (+) eine Spaltung von Bid auf, die durch die Überexpression von Bcl-2 in Typ II Zellen gehemmt wurde.

Das Protein Bid wird als Bindungsmolekül zwischen rezeptorvermittelter und mitochondrialer Apoptose beschrieben. In diesem Zusammenhang war es möglich, eine Rekrutierung von Bid, gemeinsam mit CD95, FADD, Caspas-8 und -10, in *Lipid Rafts* zu demonstrieren und dadurch den CD95 sowie den mitochondrialen Signalweg miteinander zu verbinden (Gajate *et al.*, 2004). Aufgrund dieses Sachverhalts war es interessant zu untersuchen, ob in Zelllinien, denen wichtige Bestandteile des DISC fehlen, die Spaltung von Bid verhindert ist. Um diese Fragestellung zu klären, wurden auf der einen Seite BJAB Wildtyp und FADDdn Zellen verwendet, welche zu den Typ I Zellen zählen, und auf der anderen Seite Jurkat Wildtyp sowie FADD defiziente Zellen als Beispiel für Typ II Zellen (Abb. 68). Zusätzlich wurde die Spaltung von p22 Bid auch in Caspase-8 defizienten Jurkat Zellen untersucht, da Caspase-8 bereits in der Literatur als Bid-spaltendes Protein beschrieben wurde, und somit die Aktivierung zu p15 Bid in diesen Zellen gehemmt sein sollte.

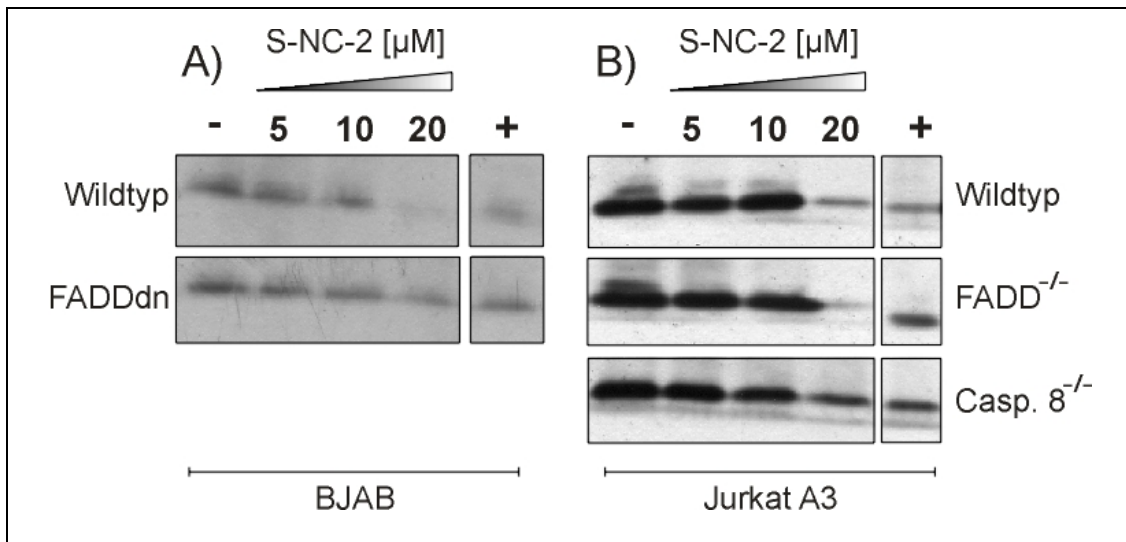


Abb. 68: Das Fehlen von DISC-Komponenten führt zur Reduktion der Bid-Spaltung

BJAB (Wildtyp und FADDdn, A) sowie Jurkat Zellen (Wildtyp, Caspase-8^{-/-} und FADD^{-/-}, B) wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 5, 10 und 20 µM S-NC-2 behandelt und anschließend auf die Spaltung von p22 Bid mittels SDS-PAGE sowie Western Blot untersucht. Die Spaltung von p22 Bid ist durch die Reduktion der Bandenintensität zu detektieren. Als Positivkontrolle (+) erfolgte eine Behandlung der BJAB Zellen mit 0,1 µg/ml Fas-Ligand, Jurkat Zellen wurden mit 1 µM TBT inkubiert.

Abb. 68A zeigt erneut eine deutliche Spaltung von p22 Bid bei einer Konzentration von 20 µM S-NC-2 nach 16-stündiger Inkubation. Auch die Kontrollstimulierung mit Fas-Ligand (+) offenbarte eine deutliche Reduktion der Bande gegenüber der Negativkontrolle (-), wobei diese Reduktion nicht so stark ausfiel wie mit S-NC-2. Die Behandlung der FADDdn BJAB Zellen führte zu einer eindeutigen, wenn auch nicht vollständigen Reduktion der Spaltung von p22 Bid. Auf der anderen Seite wiesen Jurkat Zellen, unabhängig vom FADD-Adapterprotein, eine Spaltung von Bid sowohl in den Wildtyp, als auch in FADD defizienten Zellen (Abb. 68B) auf. Nur in Caspase-8 defizienten Zellen konnte eine Reduktion der p22 Bid Bande beobachtet werden. Als Positivkontrolle (+) wurde

im Fall der Jurkat Zelle 1 μM TBT eingesetzt. Dies führte in Jurkat Wildtyp Zellen zu einer starken Reduktion der p22 Bid Bande, welche allerdings in diesem Fall durch das Fehlen von FADD oder Caspase-8 beinahe vollständig gehemmt wurde.

4.6.5 Die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine

Während der letzten Jahre wurde klar, dass die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum ein wichtiges Ereignis während der Apoptose ist (Ricci *et al.*, 2003). Einige dieser Proteine, wie z. B. Cytochrom c oder Smac/DIABLO besitzen nach ihrer Freisetzung weitreichende Aufgaben im apoptotischen Prozess (Li *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2000). Smac und sein humaner Partner DIABLO sind 29 kDa große mitochondriale Vorläufer-Proteine, welche proteolytisch in den Mitochondrien zu einer 23 kDa großen, reifen Form prozessieren und aus dem intermembranen Raum der Mitochondrien freigesetzt werden. Im besonderen spielt das Cytochrom c durch die Initiation des Apoptosoms eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9 (Li *et al.*, 1997). In gesunden Zellen befindet sich das Cytochrom c im Zwischenraum der äußeren und inneren Membran von Mitochondrien. Der genaue Mechanismus, der zur Freisetzung dieses Proteins führt, wird bis zum heutigen Zeitpunkt noch stark diskutiert.

Die bisher gezeigten Ergebnisse weisen auf eine deutliche Beeinträchtigung der Mitochondrien durch die Behandlung der Zellen mit dem synthetischen Phospholipid S-NC-2. Der Verlust des mitochondrialen Potenzials, sowie die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bid und die Spaltung der Caspase-9 weisen deutlich auf eine Beteiligung der Mitochondrien während der S-NC-2 induzierten Apoptose.

Im weiteren Verlauf der Versuchsreihen erfolgte eine Untersuchung der freigesetzten pro-apoptotischen mitochondrialen Proteine wie Cytochrom c und Smac/DIABLO. Hierzu wurden Jurkat und BJAB Zellen mit 20 μM S-NC-2 für einen Zeitraum von 6 Stunden inkubiert, lysiert und durch differentielle Zentrifugation die unterschiedlichen Kompartimente des Zellaufschlusses aufgetrennt. Der erste Zentrifugationsschritt bei 800xg führt zur Pelletierung von größeren Zellbruchstücken, unaufgebrochenen Zellen und Zellkernen (P1). Die erneute Zentrifugation bei 12.000xg bewirkte die Sedimentation von Mitochondrien und Peroxisomen (P2). Der verbleibende Überstand wird als Zytosol (Z) definiert und sollte frei von mitochondrialen Marker-Proteinen sein. Um dies zu bestätigen, wurden die Proteine aus P1, P2 und Z mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf typische Marker-Proteine untersucht (Abb. 69). Als mitochondriales Marker-Protein diente die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase (CytOX), zur Identifizierung der Zellkern-Fraktion wurde PARP eingesetzt. Abb. 69 zeigt deutlich, dass sich bereits nach der ersten Zentrifugation die meisten Zellkerne sowie viele der Mitochondrien in der Fraktion P1 befinden. Die

erneute Zentrifugation bei 12.000xg pelletierte die restlichen im Überstand befindlichen Mitochondrien und Zellkerne – nur geringe Mengen an PARP konnten in P2 detektiert werden. Der daraus resultierende Überstand Z erwies sich als frei von verunreinigenden Organellen.

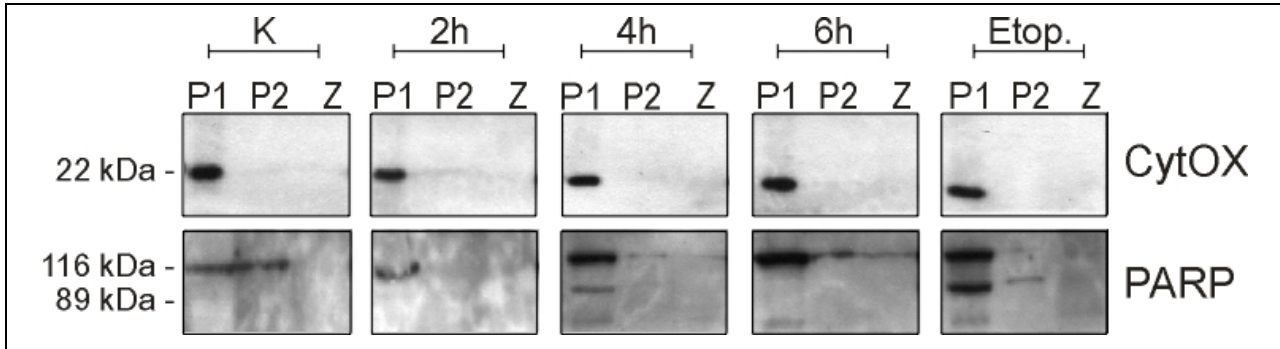


Abb. 69: Darstellung der verschiedenen Fraktionen nach differentieller Zentrifugation

Jurkat Zellen wurden für 0 – 6 Stunden mit 20 μ M S-NC-2 behandelt, lysiert und anschließend durch differentielle Zentrifugation in einzelne Fraktionen (P1, P2, Zytosol) aufgetrennt. Mitochondrien wurden mit Hilfe der Cytochrom c Oxidase und die Lokalisation der Zellkerne mittels PARP bestimmt.

Dieser Überstand Z, welcher weiterhin als Zytosol bezeichnet wird, wurde nun in der folgenden Versuchsreihe wiederum mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf das Auftreten mitochondrialer Proteine wie Cytochrom c und Smac/DIABLO untersucht. Jede Tasche des Gels wurde mit der gleichen Menge an Protein beladen (15 μ g). Zur visuellen Überprüfung der vorhandenen Proteinmenge (Ladekontrolle) erfolgte die zusätzliche Darstellung des Proteins Actin. In Abb. 70 ist das Ergebnis für Jurkat Zellen dargestellt. Diese wurden, wie bereits zuvor beschrieben, für 0 - 6 Stunden mit 20 μ M S-NC-2 inkubiert und anschließend das Zytosol isoliert. Die Analyse des Zytosols auf das Vorhandensein von Cytochrom c und Smac/DIABLO erfolgte mit Hilfe des Western Blots. Hierbei konnte eine deutliche zeitabhängige Freisetzung der pro-apoptischen Proteine aus den Mitochondrien detektiert werden, was durch das Auftreten der Banden bei 15 bzw. 22 kDa demonstriert wird. Nach 4-stündiger Behandlung mit S-NC-2 erfolgte eine geringe Freisetzung von Cytochrom c. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte eine deutliche Steigerung der Menge an freigesetztem Cytochrom c beobachtet werden. Der Austritt von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien ereignete sich, im Vergleich zum Cytochrom c, etwas schneller. Bereits nach 2 Stunden zeigte sich eine klare Bande, welche im Verlauf der Zeit ein wenig an Intensität zunahm. Als Positivkontrolle wurde in diesen Versuchsreihen 50 μ M Etoposide ebenfalls für einen Zeitraum von 6 Stunden verwendet (Robertson *et al.*, 2000). Etoposide ist ein Gift der Topoisomerase II, welches routinemäßig bei der Behandlung von Krebs eingesetzt wird (Kaufmann, 1998). Topoisomerase II ist in unterschiedlichen Aspekten des DNA-Metabolismus involviert. Normalerweise bindet es an DNA und ruft dort transiente Doppelstrangbrüche hervor, durch welche ganze intakte Helices durchgereicht werden können, um eine Interwindung zu verhindern. Etoposide erhöht in diesem Zusammenhang die Frequenz sowie die Dauer der DNA-

Doppelstrangbrüche. Diese permanente Doppelstrangbrüche führen letztendlich zum Tod der Zelle (Froelich-Ammon *et al.*, 1995).

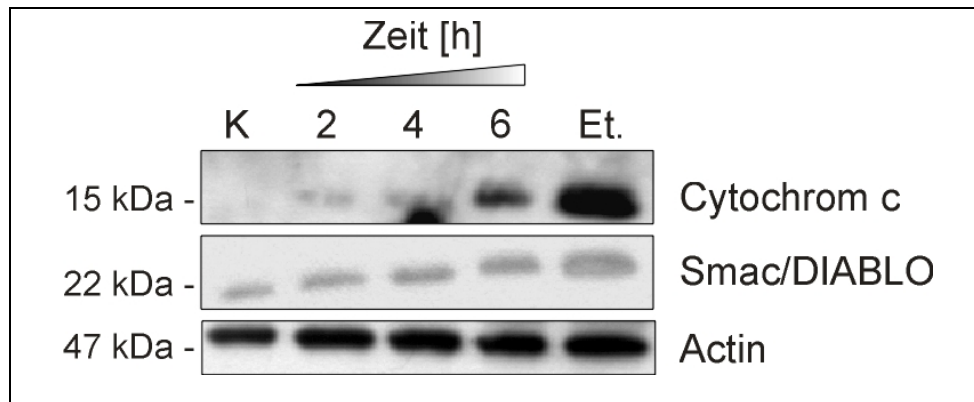


Abb. 70: S-NC-2 induziert die Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine

Jurkat Zellen wurden mit 20 μM S-NC-2 für einen Zeitraum von 0 - 6 Stunden bzw. mit 50 μM Etoposide für 6 Stunden (Et., Positivkontrolle) behandelt, daraufhin das Zytosol isoliert, je Probe 15 μg Protein aufgetragen und mit Hilfe des Western Blots auf die Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom c und Smac/DIABLO untersucht. Als Ladekontrolle wurde das Protein Actin eingesetzt.

In BJAB Zellen erwies sich die Freisetzung von Cytochrom c, im Vergleich zu Jurkat Zellen, als etwas stärker (siehe Abb. 71). Hierbei konnte nach 2-stündiger Inkubation mit 20 μM S-NC-2 bereits ein leichter Anstieg der Bandenintensität beobachtet werden. Nach 4 Stunden kann eine deutliche Bande detektiert werden, deren Intensität im Verlauf der folgenden zwei Stunden weiter zunimmt. Die Freisetzung von Smac/DIABLO erfolgte im selben Zeitraum wie die Freisetzung von Cytochrom c. Eine deutliche Bande bei 22 kDa konnte ebenfalls erst nach 4-stündiger Inkubation mit S-NC-2 beobachtet werden, die nach 6 Stunden Behandlung, durch die Zunahme der Bandenintensität, auf eine eindeutige Freisetzung von Smac/DIABLO hinweist.

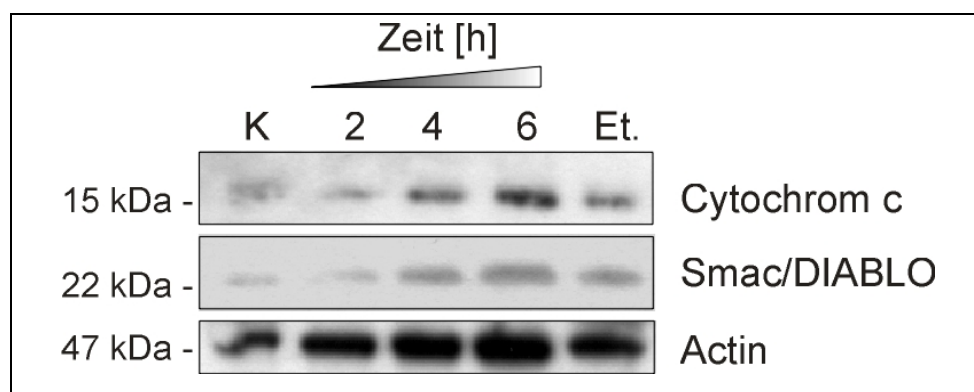


Abb. 71: In BJAB Zellen erfolgt nach S-NC-2 Behandlung nur eine geringe Freisetzung von Cytochrom c

Zur Untersuchung der Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle aus dem mitochondrialen Intermembranraum wurden BJAB Zellen mit 20 μM S-NC-2 bzw. 50 μM Etoposide (Et.) behandelt, anschließend das Zytosol isoliert und auf das Vorhandensein von Cytochrom c und Smac/DIABLO untersucht. Als Ladekontrolle diente das Protein Actin.

4.7 Beteiligung zellulärer Organellen am programmierten Zelltod

Die vorangegangenen Kapitel konnten deutlich die Apoptose-induzierende Eigenschaft des synthetischen Phospholipids S-NC-2 in einer Vielzahl leukämischer Zellarten demonstrieren. Zusätzlich wurde eine Aufnahme des Lipids sowie die Aktivierung von Todesrezeptoren wie CD95 und TRAIL-R2 beobachtet. Im weiteren Verlauf sollten mögliche zusätzliche Interaktionspartner des apoptotischen Signalwegs innerhalb der Zelle definiert werden. Da bereits die Beteiligung der Mitochondrien in diesem apoptotischen Signalweg nachgewiesen werden konnte, sollte die Aufmerksamkeit auf weitere mögliche Teilnehmer ausgedehnt werden. In der Literatur werden immer häufiger Zellorganellen beschrieben, welche ebenso zum Ablauf bzw. zur Initiation der Apoptose beitragen können. Hierbei spielen vor allem die Lysosomen eine wichtige Rolle (Brunk *et al.*, 2001). In den folgenden Versuchsreihen sollte eine mögliche Beteiligung dieser Zellorganellen in der durch S-NC-2 ausgelösten Apoptose geklärt werden.

4.7.1 Lysosomen

Die Hauptfunktion der Lysosomen besteht im kontrollierten Recycling von zellulären Organellen und Makromolekülen. Die hierfür verantwortlichen Proteine sind in einem sauren Milieu (pH 4-5) besonders aktiv, können aber z. T. bei neutralem pH-Wert außerhalb der Lysosomen, mit einer geringeren Aktivität, ihre Wirkung entfalten (Jaattela *et al.*, 2004; Fehrenbacher *et al.*, 2005). Im apoptotischen Verlauf scheinen vor allem die lysosomalen Proteine Cathepsin B, D und L von Bedeutung zu sein. Diese translozieren nach einer Vielzahl von Signalen, wie etwa der Aktivierung von TNFR, p53 sowie oxidativem Stress, aus dem Lumen der Lysosomen ins Zytoplasma (Jaattela *et al.*, 2004). Cathepsin B und D könnten eine besondere Funktion bei der Freisetzung mitochondrialer Proteine haben, da sie in der Lage sind, das pro-apoptische Protein Bid zu spalten (Yin *et al.*, 2005). Weiterhin konnte die lysosomale Permeabilisierung während der Apoptose mit einer Aktivierung des CD95 Todesrezeptors, dem Verlust von Wachstumsfaktoren sowie mit speziellen lysosomalen Photooxidantien in Zusammenhang gebracht werden (Brunk *et al.*, 2001).

Die Beteiligung der Lysosomen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Acridine Orange (AO) untersucht, welcher in Abhängigkeit des pH-Wertes entweder eine rote (pH < 5) oder eine grüne Fluoreszenz (pH > 7) aufweist (Brunk *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2005). AO akkumuliert vorwiegend in sauren Zellkompartimenten, wie etwa in den Lysosomen, wobei es aufgrund des niedrigen pH-Wertes protoniert wird, dadurch in diesem Kompartiment gefangen bleibt und eine rote Fluoreszenz aufweist (Abb. 72). Erste Hinweise auf einen möglichen Verlust der Membranintegrität wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erbracht. Unbehandelte sowie mit 20 µM S-NC-2 inkubierte Jurkat Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 µM AO bei 37°C inkubiert und anschließend

im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Für eine ganzheitliche Betrachtung der Zellen erfolgte zunächst die Dokumentation der grünen Fluoreszenz (GFP495 Longpass-Filter) und anschließend das Bild der Rotfluoreszenz (Q585 Longpass-Filter). Beide Bilder wurden im Computer mittels der Software OpenLab (V 3.0.3) übereinander gelegt.

Die in Abb. 72A dargestellte Zelllinie Neo demonstriert das typische Bild einer mit AO gefärbten Zelle. Da sich der Farbstoff in der gesamten Zelle verteilt, erscheint der größte Teil grün. Dies kommt durch den pH-Wert des Zytoplasmas zustande, in dem der Farbstoff deprotoniert vorliegt und in diesem Zustand grün fluoresziert. Die Akkumulation in den sauren Lysosomen ist deutlich durch die rötlichen Punkte zu erkennen (siehe Abb. 72A, weiße Pfeile). Der Farbstoff wird hierbei aufgrund des niedrigen pH-Werts in diesen Kompartimenten protoniert und weist eine rote Fluoreszenz auf. Durch die Behandlung mit 20 μM S-NC-2 kam es in Jurkat Neo Zellen zu einem Verlust der Rotfluoreszenz, ein Zeichen des Verlusts der Membranintegrität, da der Farbstoff nicht mehr in den Lysosomen gefangen gehalten werden konnte.

Ein etwas anderes Bild zeigte jedoch die Bcl-2 überexprimierende Variante der Jurkat Zellen (Abb. 72B). Während in der Kontrolle wieder die typische Verteilung von grüner Fluoreszenz im Zytoplasma und roter Fluoreszenz in den Lysosomen zu erkennen war, bewirkte die Behandlung mit 20 μM S-NC-2 keine Veränderung dieses Bildes. Auch nach 6-stündiger Inkubation konnte kein Verlust der lysosomalen Färbung detektiert werden.

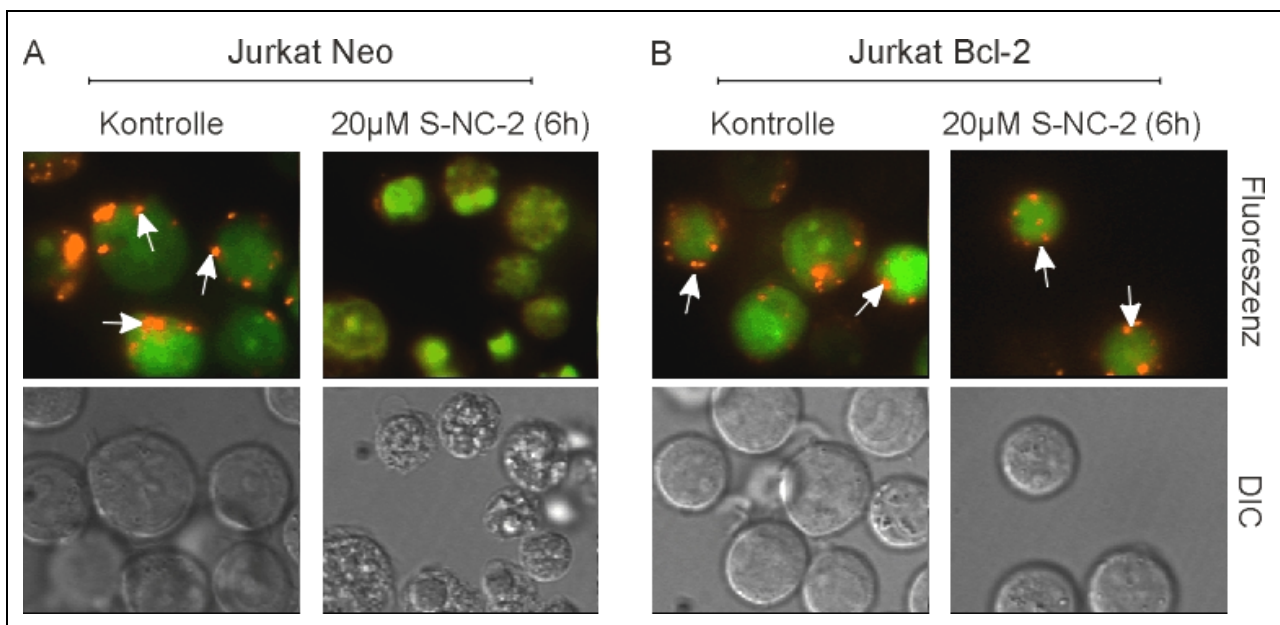


Abb. 72: Fluoreszenzfärbung von Jurkat Zellen mittels Acridine Orange (AO)

Jurkat Neo (A) und Bcl-2 Zellen (B) wurden für einen Zeitraum von 6 Stunden mit und ohne 20 μM S-NC-2 behandelt, und anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes AO angefärbt. Die Pfeile deuten auf die starke Akkumulation des Farbstoffes in den Lysosomen (Vergrößerung: 630-fach).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab einen ersten Hinweis auf einen möglichen, durch S-NC-2 induzierten Verlust der lysosomalen Membranintegrität. Dieser erste Eindruck sollte nun mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert und dadurch bestätigt werden. Zur Darstellung des Fluoreszenzverlustes wären zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen durch die Reduktion der Rotfluoreszenz der Zellen, hervorgerufen durch den Austritt des Farbstoffes aus den Lysosomen, und zum anderen durch eine Zunahme der grünen Fluoreszenz, welche aufgrund der Anreicherung des ausgetretenen Farbstoffes im Zytoplasma zustande kommt. In den folgenden Experimenten wurde die erste Darstellungsform gewählt, welche einen direkten Verlust der Rotfluoreszenz demonstriert. Für eine bessere Einsicht in die Vorgehensweise der Messung ist in Abb. 73 exemplarisch ein typisches Datenblatt der Punktwolken-Analyse dargestellt. Hierbei wird die Intensität der Grünfluoreszenz (Kanal FL-1, 530 nm) gegen die Rotfluoreszenz (Kanal FL-6, 610 nm) gemessen.

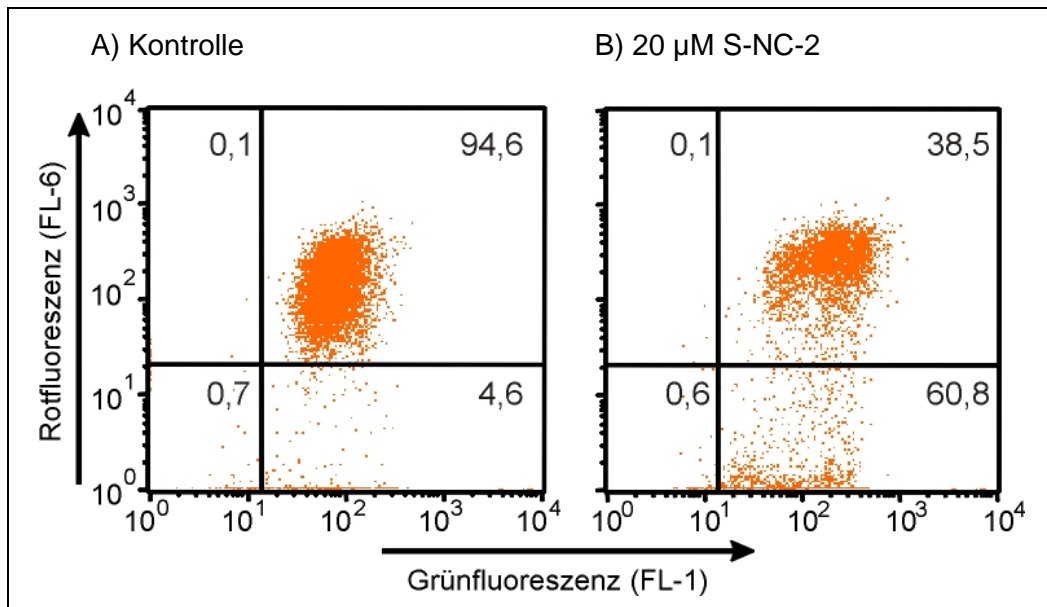


Abb. 73: Punktwolken-Analyse der Acridine Orange Messung

Für eine bessere Orientierung der folgenden Versuchsergebnisse wurde hier die typische Verteilung einer Punktwolke in Kontrollzellen (A) sowie in behandelten Zellen (20 µM S-NC-2, 6 Stunden) dargestellt (B) und die prozentuale Verteilung in den 4 Quadrantenbereichen angegeben.

Unbehandelte Kontrollzellen (Abb. 73A) weisen eine Doppelfärbung auf. Daher befindet sich der Hauptteil der Punktwolke im Quadranten oben rechts (94,6%). Die Behandlung von Zellen mit 20 µM S-NC-2 (6 Stunden) führt zur Freisetzung von AO aus den Lysosomen und somit zu einer Reduktion der Rotfluoreszenz (Abb. 73B), was durch die Verlagerung der Punktwolke in den unteren rechten Quadranten erkennbar wird (nur grün). Hierbei kann durch die Abnahme der roten Fluoreszenzintensität eine nach unten gerichtete Verschiebung der Zellen und somit eine Neuverteilung der Punktwolke beobachtet werden: während im oberen rechten Quadranten nur noch 38,5% der Zellen zu finden sind, reichern sich im rechten unteren Quadranten bereits 60,8%

der Zellen an. Da es in diesem Fall allerdings auch zu einer Zunahme des Farbstoffes im Zytosol der Zelle kommt, und somit die Intensität der Grünfluoreszenz zunimmt, erfährt die Punkt Wolke eine Verlagerung nach rechts.

Die quantitative Auswertung der Versuchsreihen ist in Abb. 74 dargestellt. Hierbei wurden Jurkat, K562 und BJAB Zellen für einen Zeitraum von 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, anschließend für 15 Minuten mit 10 μM AO gefärbt und der Anteil an Zellen mit reduzierter Rotfluoreszenz bestimmt.

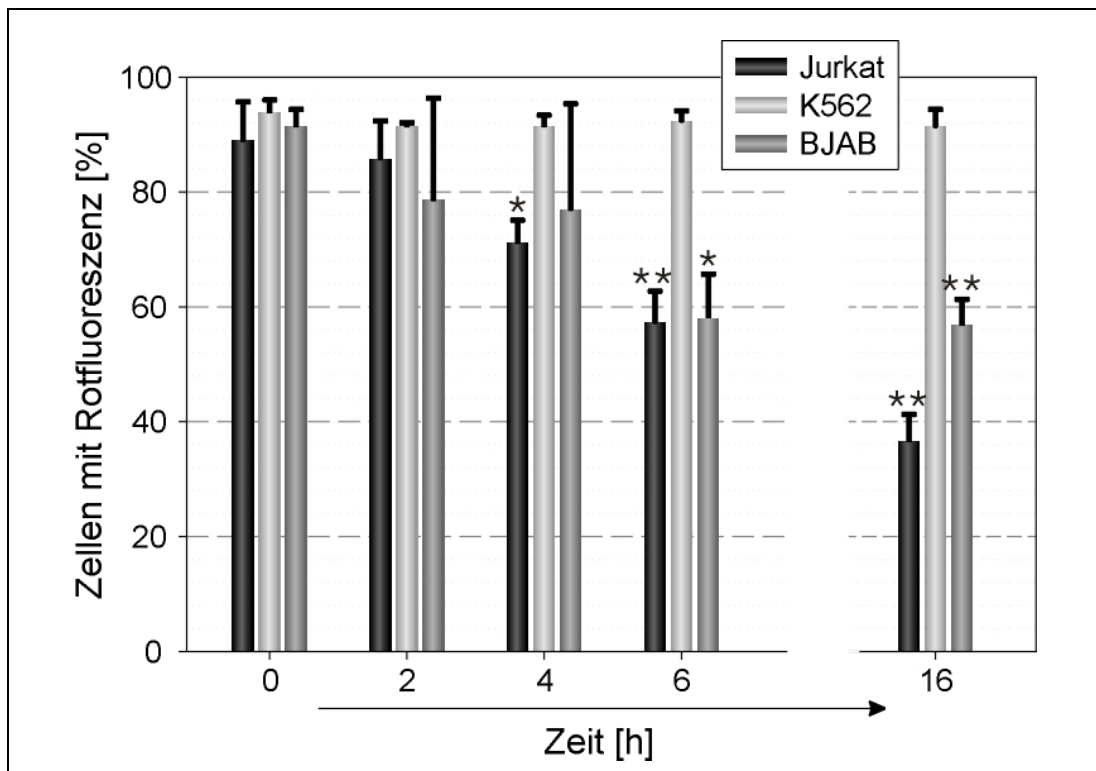


Abb. 74: S-NC-2 induziert einen Verlust der lysosomalen Membranintegrität

Jurkat, K562 und BJAB Zellen wurden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, mit AO angefärbt und nach den angegebenen Zeitpunkten auf den Verlust der Rotfluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht (n = 3 (0-6 Stunden), n = 5 (16 Stunden)); [*] p < 0,01; [**] p < 0,001).

Bereits innerhalb der ersten 6 Stunden konnte in Jurkat Zellen (schwarzer Balken) ein deutlicher Verlust der lysosomalen Färbung von 30% detektiert werden, welcher sich nach 16-stündiger Inkubationszeit noch weiter verstärkt. Zu diesem Zeitpunkt weist nur noch ein Anteil von knapp 37% der Zellen eine rote Fluoreszenz auf. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die K562 Zellen (Abb. 74, hellgrauer Balken) wiederum resistent gegenüber S-NC-2 induzierter Zellveränderungen. Selbst nach 16 Stunden Behandlung mit dem synthetischen Phospholipid konnte keine Reduktion der lysosomalen Membranintegrität detektiert werden. BJAB Zellen zeigten jedoch wieder eine deutliche Sensitivität gegenüber S-NC-2 induzierter lysosomaler Membranpermeabilisierung (Abb. 74, dunkelgrauer Balken). In den ersten 6 Stunden der Behandlung wurde erneut eine

30%ige Reduktion der rot fluoreszierenden Zellen gemessen, welche sich auch nach steigender Inkubationszeit nicht weiter veränderte. Nach 16 Stunden zeigten noch 60% der BJAB-Zellpopulation eine Rotfluoreszenz der Lysosomen.

Die lysosomale Permeabilisierung wird während des apoptotischen Prozesses mit einer Aktivierung des CD95 Todesrezeptors sowie dem mitochondrialen intrinsischen Signalweg in Zusammenhang gebracht (Brunk *et al.*, 2001; Boya *et al.*, 2003). Ob diese Signalwege auch bei der S-NC-2 induzierten Apoptose einen Einfluss auf die Permeabilisierung der Lysosomen ausüben, sollte wiederum mit Hilfe genetisch veränderter Zellen ermittelt werden. Hierfür wurden als Beispiel der gehemmten intrinsischen Apoptose-Initiation erneut die Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Zellen und im Hinblick auf eine gestörte extrinsische Initiation die FADD dominant negative Version der BJAB Zellen gewählt. In Abb. 75A ist abermals die durch S-NC-2 induzierte lysosomale Membranpermeabilisation (LMP) in Jurkat Zellen zu erkennen, welche bereits in Abb. 74 dargestellt wurde. Nach 6 Stunden weisen nur noch 60% der Zellen eine intakte lysosomale Membran auf. Im Gegensatz dazu demonstrierten die Bcl-2 überexprimierenden Zellen eine deutliche Hemmung der LMP, da auch nach 6 Stunden und 20 μ M S-NC-2 kein gravierender Verlust der Rotfluoreszenz zu erkennen war und noch 94% der Zellpopulation eine intakte Lysosomenmembran besaßen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 16 Stunden erbrachte keine Veränderung. Auch nach diesem langen Zeitraum waren die Lysosomen noch intakt.

Da im Zusammenhang der lysosomalen Beteiligung auch der CD95 Todesrezeptor beschrieben wurde, sollte durch die Behandlung von Typ I BJAB Zellen sowie deren FADDdn Mutante eine mögliche Rezeptorbeteiligung untersucht werden. Erneut sind in Abb. 75B der Verlust des LMP in BJAB Wildtyp Zellen und zusätzlich das Ergebnis der FADDdn Zellen dargestellt. Bei einem Vergleich des zeitlichen Verlaufs kann in den ersten 3 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Erst nach einer Langzeitinkubation von 16 Stunden wurde ein deutlicher Verlust des LMP in den Wildtyp Zellen erkennbar, der in FADDdn Zellen jedoch deutlich reduziert war. Nach diesem Zeitraum konnte nur noch in etwa 60% der BJAB Wildtyp Zellen eine starke Rotfluoreszenz detektiert werden, während bis zu 75% der FADDdn BJAB Zellen intakte lysosomale Membranen aufwiesen. Anhand dieser Ergebnisse kann in FADDdn Zellen eine deutliche Hemmung der LMP verzeichnet werden.

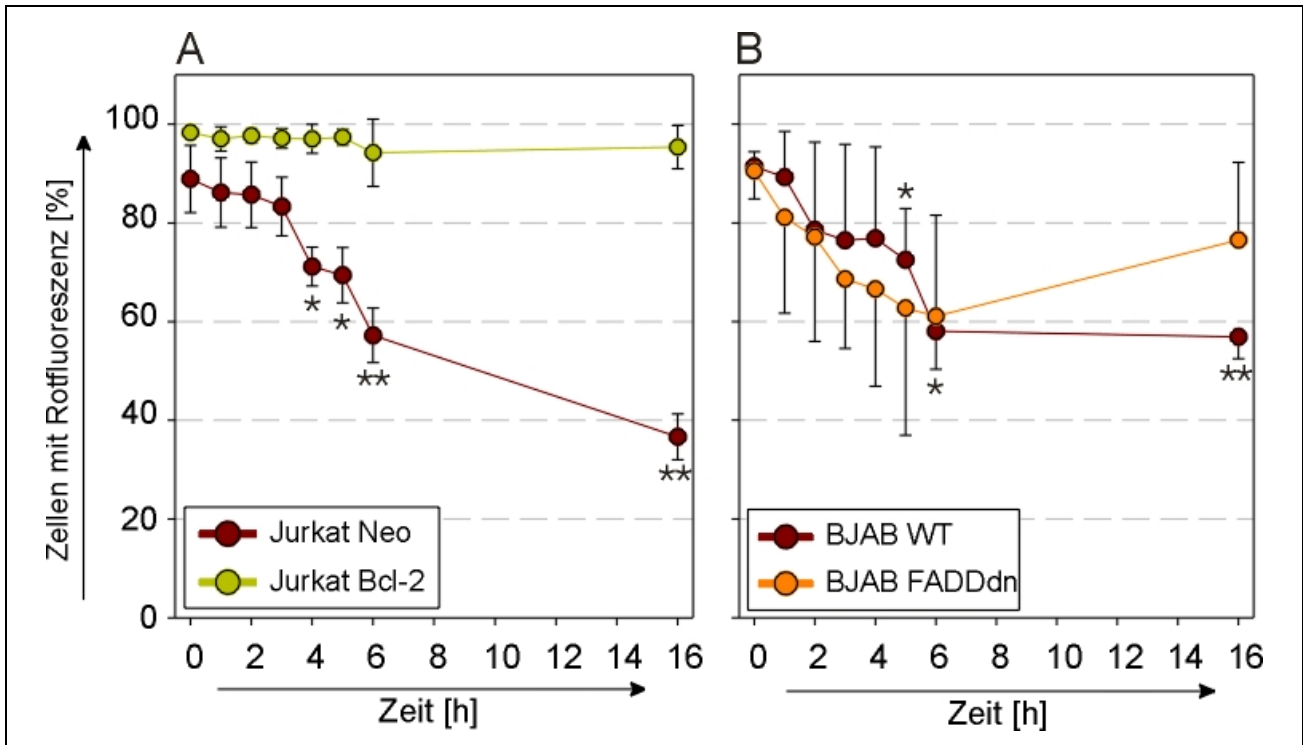


Abb. 75: LMP wird in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat und FADDdn BJAB Zellen gehemmt

Jurkat Neo und Bcl-2 (A) sowie BJAB Wildtyp und FADDdn Zellen (B) wurden für 16 Stunden mit $20 \mu\text{M}$ S-NC-2 behandelt und zur Untersuchung der lysosomalen Membranintegrität mit $10 \mu\text{M}$ AO angefärbt. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels der Durchflusszytometrie ($n=3$ (0-6 Stunden), $n=5$ (16 Stunden); [*] $p < 0,01$; [**] $p < 0,001$). Die statistische Signifikanz der einzelnen Messpunkte bezieht sich auf die jeweilige Kontrolle.

Die Ergebnisse in Abb. 74 und Abb. 75 demonstrieren eine Beteiligung der Lysosomen am S-NC-2 induzierten Zelltod. Durch die Freisetzung des rot fluoreszierenden AO aus den Lysosomen kann auf den Verlust der lysosomalen Membranintegrität geschlossen werden. In der Literatur wird dieser Verlust mit der gleichzeitigen Freisetzung bestimmter lysosomaler Proteine, wie dem Cathepsin B, beschrieben. Cathepsin B spielt eine besondere Rolle bei der Freisetzung von Cytochrom c, da es, einmal im Zytosol, auch die Aktivierung von Caspase-3 und -9 induzieren kann und dadurch den programmierten Zelltod in der entsprechenden Zelle auslöst (Ben-Ari *et al.*, 2005; Lamparska-Przybylsz *et al.*, 2005). Da auch im Zusammenhang der S-NC-2 induzierten Apoptose eine Freisetzung von Cytochrom c sowie die Aktivierung der Caspasen-3 und -9 detektiert wurden, sollten die Zellen auf eine mögliche S-NC-2 induzierte Freisetzung von Cathepsin B untersucht werden. Hierzu wurde erneut nach erfolgter Inkubation eine Zytosolisierung der entsprechenden Zellen durchgeführt. Die Bestandteile der Zytosolfraction wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf das Vorhandensein des lysosomalen Proteins Cathepsin B untersucht. Als Ladekontrolle erfolgte zusätzlich die Detektion des Proteins Aktin. In Abb. 76 ist der zeitliche Verlauf der Cathepsin B Freisetzung von Jurkat und BJAB Zellen dargestellt. Nach 3-stündiger Behandlung der Jurkat Zellen konnte eine schwache Freisetzung dieses Proteins detektiert werden, welche im Verlauf der 6 Stunden Inkubation an Intensität

zunahm. Auch in BJAB Zellen konnte die Freigabe von Cathepsin B aus den Lysosomen beobachtet werden, allerdings erfolgte diese etwas früher als in Jurkat Zellen. Bereits nach 2 Stunden Inkubation mit 20 μM S-NC-2 konnte eine deutliche Freisetzung dieses lysosomalen Proteins beobachtet werden, die im Verlauf der Behandlung weiter anstieg. Die Ergebnisse der Abb. 76 zeigen eine deutliche, durch S-NC-2 induzierte Freisetzung von Cathepsin B.

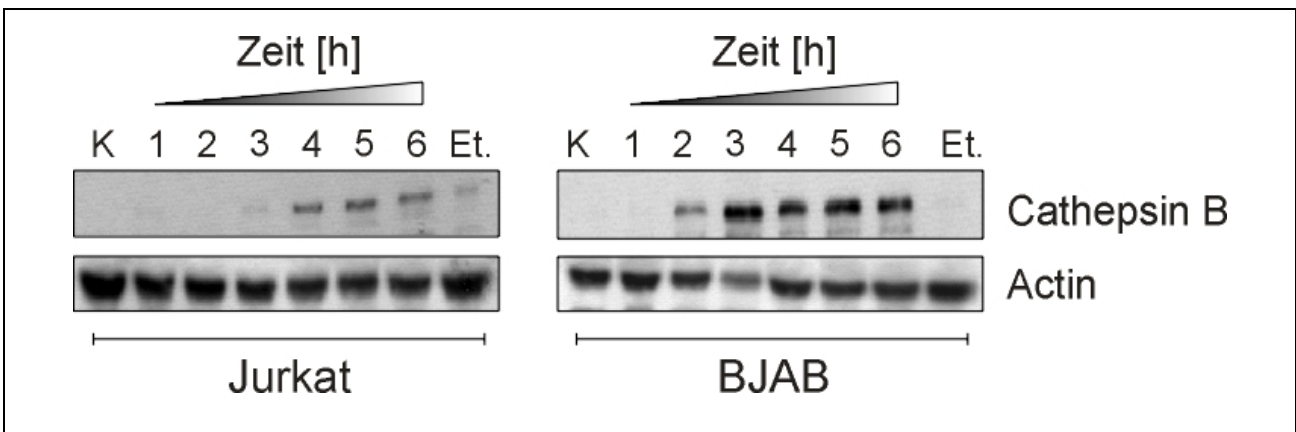


Abb. 76: Untersuchung zur Freisetzung von Cathepsin B nach S-NC-2 Behandlung

Jurkat und BJAB Zellen wurden für 6 Stunden mit 20 μM S-NC-2 behandelt, lysiert, mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation das Zytosol isoliert und dieses mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Freisetzung von Cathepsin B untersucht. Zusätzlich zu S-NC-2 wurden die Zellen mit Etoposide (Et.) behandelt. Als Ladekontrolle erfolgte die Detektion von Actin.

4.7.2 Mögliche Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums?

Eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) an der Apoptose wird in jüngster Zeit mehr und mehr in Betracht gezogen. Eine ER-assoziierte Caspase (Caspase-12), wie auch Bcl-2 Proteine können lokal die Regulation der Apoptose beeinflussen (Ferri *et al.*, 2001). Caspase-12 ist spezifisch an der zytoplasmatischen Seite des ERs lokalisiert und wird durch ER-Stress sowie die Mobilisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert. Hierbei wird Caspase-12 durch m-Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige zytoplasmatische Cystein-Protease, proteolytisch aktiviert, kann dadurch weitere Caspasen spalten und somit die Caspase-Kaskade in Gang setzen.

Die Untersuchung einer möglichen Caspase-12 Aktivierung erfolgte durch einen spezifischen Antikörper, welcher die ungeschnittene Caspase-12 (55 kDa) detektiert und mit keiner weiteren Caspase kreuz-reagiert. In Jurkat Neo Zellen zeigte sich die ungeschnittene Caspase in den mit Ethanol behandelten Kontrollzellen (-) als eine dünne Bande bei 55 kDa (Abb. 77). Durch eine 16-stündige Behandlung mit 20 μM konnte das Verschwinden dieser Bande beobachtet werden, was auf die Spaltung der Pro-Caspase zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigten Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen eine deutliche Hemmung der Caspase-12 Spaltung.

Die Analyse der BJAB Zellen erbrachte ein ähnliches Bild. Die Behandlung der Zellen mit 20 μM S-NC-2 führte zum Verschwinden der Bande bei 55 kDa, was auch durch das defekte

Adapterprotein FADD nicht gehemmt werden konnte. Einzig die K562 Zelllinie erwies sich erneut resistent gegenüber S-NC-2 induzierter Caspase-12 Spaltung. Auch nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden konnte keine signifikante Reduktion der 55 kDa Bande beobachtet werden.

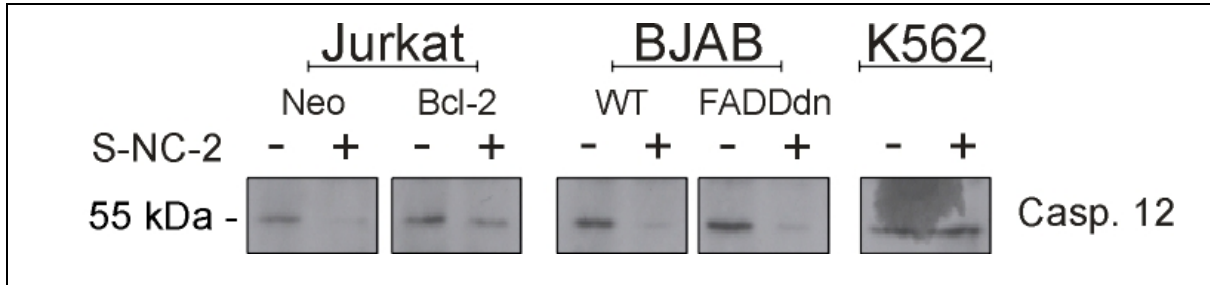


Abb. 77: Spaltung der Caspase-12

Jurkat (Neo und Bcl-2), BJAB (Wildtyp und FADDdn) sowie K562 Zellen wurden für die Untersuchung der Caspase-12 Spaltung für 16 Stunden mit 20 μM S-NC-2 inkubiert. Je Probe wurden 20 μg Protein aufgetragen. Die Detektion der Pro-Caspase-12 erfolgte mit einem spezifischen Antikörper, welcher die 55 kDa Form erkennt. Eine Reduktion der Bandenintensität geht mit der Spaltung von Caspase-12 einher.

4.8 Resistenz primärer Lymphozyten

Für eine Vielzahl synthetischer Phospholipide, unter anderem HePC und Et-18-OCH₃, wurde eine selektive Zerstörung maligner Zellen beschrieben, wobei nicht-maligne Zellen durch den zytotoxischen Effekt der Lipide kaum beeinträchtigt wurden (Andreesen *et al.*, 1979; Eibl *et al.*, 1990; Mollinedo *et al.*, 1997). Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurden Lymphozyten aus Vollblut isoliert und für die folgenden Versuchsreihen verwendet.

Für einen direkten Vergleich der „gesunden“ Blut-Zellen mit den bisherigen Analysen leukämischer Zelllinien, wurden Blut-Lymphozyten ebenfalls für einen Zeitraum von 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2 inkubiert. Abb. 78 zeigt die mikroskopische Analyse der behandelten Blut-Lymphozyten bei 200-facher Vergrößerung.

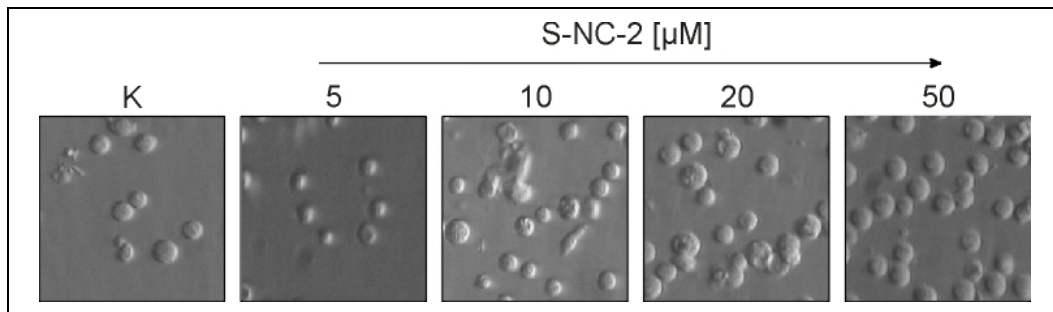


Abb. 78: Mikroskopische Beobachtung von S-NC-2 behandelten Blut-Zellen

Für die mikroskopische Untersuchung eventuell auftretender morphologischer Veränderungen durch die Einwirkung von S-NC-2 wurden Lymphozyten aus Vollblut isoliert und für einen Zeitraum von 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Beobachtung erfolgte mit einem Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung. Die Bilddokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera.

Kontrollzellen, welche mit Ethanol behandelt wurden, weisen eine stark rundliche Zellform auf. Mit zunehmender Lipidkonzentration konnte keine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Selbst bei einer Konzentration von 50 μM , welche in den leukämischen Zellmodellen einen bis zu 100%igen Vitalitätsverlust verursachten, konnte kein Hinweis auf eine zytotoxische Wirkung oder eine auftretende morphologische Veränderung der Blut-Lymphozyten durch die Einwirkung von S-NC-2 beobachtet werden.

Zusätzlich zur mikroskopischen Betrachtung wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe von Trypanblau bestimmt, einem Farbstoff, der nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen kann, dadurch tote Zellen blau anfärbt und somit markiert. Die Zellen werden in eine Neubauer-Kammer pipettiert und die Anzahl der toten und lebenden Zellen ausgezählt.

In unbehandelten Kontrollzellen konnte eine Population von 92% ($\pm 0,7$) lebender Zellen detektiert werden (Abb. 79). Die Behandlung mit dem synthetischen Lipid S-NC-2 zeigte keine Veränderung der Zellvitalität bis zu einer Konzentration von 20 μM . In dieser Konzentrationsspanne konnten stets 92-93% ($\pm 1,36$) vitaler lebender Zellen detektiert werden. Eine zusätzliche Steigerung der Lipidkonzentration, welche sich in leukämischen Zelllinien als höchst toxisch erwies (siehe Abb. 34), zeigte einen leichten Anstieg der Trypanblau positiven Zellen von 8,01% ($\pm 0,7$) in den Kontrollen auf 13% ($\pm 3,8$) in der 50 μM behandelten Probe. Allerdings ist dieser Anstieg auf den lytischen Charakter von S-NC-2 zurückzuführen, welcher bei so hohen Konzentrationen wie 50 μM deutlich zum Tragen kommt und nicht auf eine direkte toxische Wirkung des Lipids hinweist.

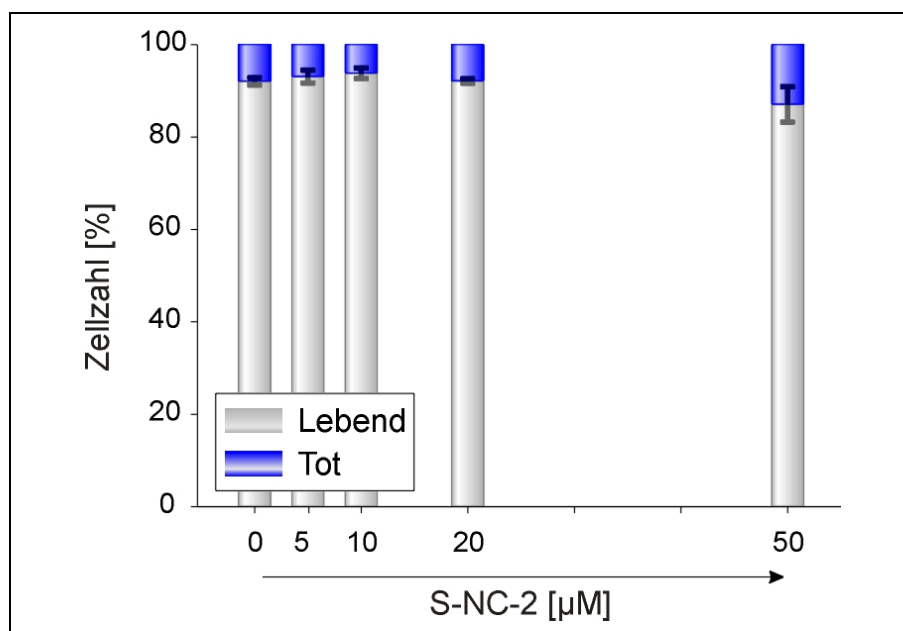


Abb. 79: Trypanblau-Färbung primärer Blutlymphozyten

Zur Unterstützung der mikroskopischen Auswertung erfolgte eine Färbung der Zellen mit Trypanblau. Dieser Farbstoff kann nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringen und färbt diese blau. Die statistische Auswertung erfolgt durch das direkte Auszählen der Zellen in einer Neubauerkammer. Ein Messbalken entspricht dem Mittelwert von drei unabhängigen Versuchsreihen, welche jeweils doppelt ausgezählt wurden.

Die isolierten Blut-Zellen wurden zusätzlich mittels der Analyse des apoptotischen Markerproteins PARP auf eine mögliche durch S-NC-2 ausgelöste Apoptose-Induktion getestet (siehe Abb. 80). Auch in dieser Versuchsreihe konnten keine Anzeichen für einen Einfluss des synthetischen Lipids S-NC-2 auf die Zellen beobachtet werden. Keine der eingesetzten Konzentrationen induzierte die Spaltung von PARP. Nur die Behandlung der Zellen mit 1 μM TBT (Abb. 80, +) führte zum *Cleavage* des nativen 116 kDa großen Proteins in ein kleineres Fragment von 89 kDa, was auf eine Apoptose-induzierende Wirkung von TBT in Blut-Zellen schließen lässt.

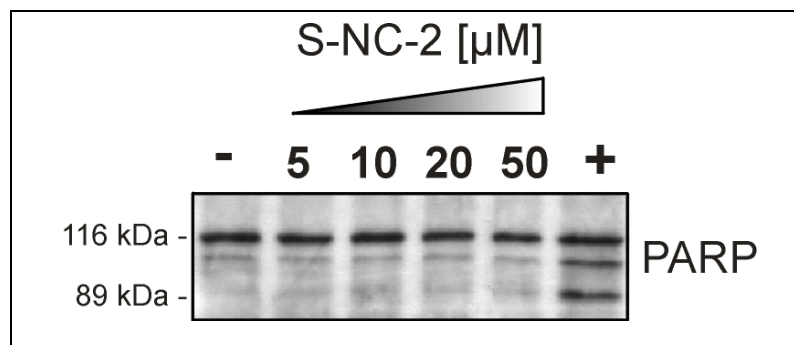


Abb. 80: S-NC-2 induziert keine Spaltung von PARP

Die Untersuchung auf apoptotische Anzeichen in den hier verwendeten Blut-Lymphozyten, hervorgerufen durch die Behandlung mit S-NC-2, erfolgte durch die Analyse des Marker-Proteins PARP. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an S-NC-2 behandelt und auf das Auftreten der Bande bei 89 kDa analysiert. Dieses Ergebnis zeigt exemplarisch die Daten von 3 unabhängigen Versuchsreihen, die alle einen gleichen Verlauf aufwiesen.

Da in der Literatur die beschriebene Resistenz nicht-maligner Zellen gegenüber synthetischer Alkyllysolipide hauptsächlich auf den Mangel an inkorporiertem Lipid zurückgeführt wurde, sollte in diesem Zusammenhang die Aufnahme des radioaktiv markierten [^{14}C]-R-NC-2 überprüft werden (Mollinedo *et al.*, 1997). Die Zellen wurden hierfür mit 0,05 μCi des radioaktiven Lipids beladen und anschließend für 16 Stunden inkubiert. Später erfolgte die Trennung von Medium und Zellen sowie die Radioaktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen. Abb. 81 zeigt eine deutlich verminderte Aufnahme des Lipids in Blut-Lymphozyten. Während die leukämischen Zelllinien nach 16 Stunden eine Aufnahme von 30 – 60% (je nach Zelllinie, siehe Abb. 26) verzeichneten, konnte in den nicht-malignen Zellen lediglich ein prozentualer Anteil von 1,57% ($\pm 0,02$) dokumentiert werden.

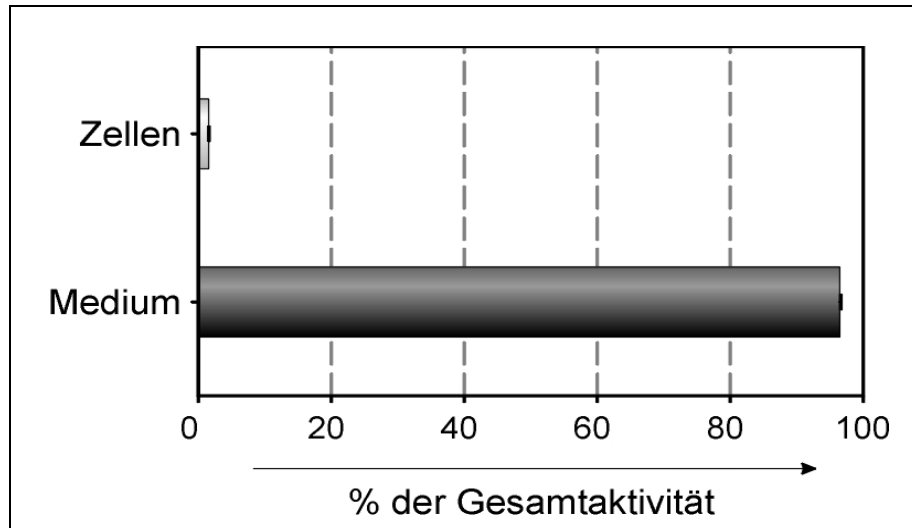


Abb. 81: Aufnahmekinetik primärer Lymphozyten.

Die Aufnahmekinetik erfolgte mit $0,05 \mu\text{Ci } [^{14}\text{C}]\text{-R-NC-2}$ für einen Zeitraum von 16 Stunden. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Menge der Radioaktivität in Medium und Zellen bestimmt. Die Balken stellen Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchsreihen dar, welche jeweils in doppelter Ausführung durchgeführt wurden.

4.9 APC und LPC

Die zytotoxischen Nebeneffekte, die bei der Behandlung von *in vitro* Zellkulturen mit synthetischen Lipiden wie HePC oder Et-18-OCH₃ auftreten, sind zum Teil auf die Hemmung der Synthese von Phosphatidylcholin (PC) zurückzuführen. PC ist das mengenmäßig häufigste Phospholipid in tierischen und menschlichen Zellen und fungiert als Vorstufe zur Synthese weiterer wichtiger Membranlipide wie Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin (Boggs *et al.*, 1998). Zur Bildung von PC wird Cholin, nachdem es einen metabolischen Umbau zu Phosphocholin durch die Cholin-Kinase erfahren hat, in die polare Kopfgruppe von PC eingebaut. Der zweite und geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Synthese von Cytidindiphospho-(CDP)-cholin durch die Cytidyltransferase (CT). Am Ende wird das Phosphocholin mit Hilfe der Cholintransferase vom CDP-Cholin auf Diacylglycerol übertragen und es entsteht PC (Kent, 1990).

Für synthetische Phospholipide wie z. B. Et-18-OCH₃ wurde bereits eine hemmende Wirkung der Phospholipidsynthese auf der Ebene von CT beschrieben (Boggs *et al.*, 1995a). Et-18-OCH₃ demonstriert zytotoxische und zytostatische Effekte *in vitro* in Makrophagen. Experimente mit exogen verabreichtem LPC zeigten eine Umkehrung der zytotoxischen Wirkung. In diesem Fall wird LPC für die Synthese von Phospholipiden verwendet, indem es in den Zellen acyliert und durch einen CT-unabhängigen Mechanismus PC gebildet wird. Somit verblieben hauptsächlich nur noch die zytostatischen Eigenschaften des Et-18-OCH₃, da die exogene Verabreichung von LPC die Zellen vor apoptotischen Ereignissen rettete. Dies äußerte sich durch einen nicht vollendeten Zellzyklus sowie einen Proliferationsstopp (Boggs *et al.*, 1995b). Ebenso konnte für das synthetische Lipid HePC gezeigt werden, dass die Hemmung der *de novo* Synthese von PC am

CT-Schritt gehemmt ist. Dies stellte den Hauptgrund der wachstumshemmenden und zytotoxischen Eigenschaften von HePC dar (Boggs *et al.*, 1998).

Transformierte Zellen zeichnen sich generell durch einen stark angehobenen PC-Metabolismus aus. Sie weisen meist eine gesteigerte Aktivität der Phospholipasen D und/oder C auf, welche mit einem hohen Maß an PC-Abbau und –Neusynthese einhergeht. Durch diesen hohen PC-Umsatz haben die Zellen auch einen gesteigerten Bedarf an PC-Biosynthesewegen, um die benötigte Masse an Phospholipiden liefern zu können. Daher zeigen transformierte Zellen eine höhere Sensitivität zu CT-Inhibitoren als nicht-transformierte Zellen (Boggs *et al.*, 1998).

Im Hinblick auf die Möglichkeit, dass eine exogene Verabreichung von LPC die zytotoxische Wirkung synthetischer Phospholipide herabsetzt und somit eine spezifischere Wirkung der Substanz erreicht werden kann, sollte dieser Fall auf unser *in vitro* Modell übertragen werden. Hierzu wurden Jurkat und BJAB Zellen für einen Zeitraum von 16 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPC und S-NC-2 behandelt und anschließend die Anzahl vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Hilfe der Annexin-PI-Färbung quantitativ erfasst. In Abb. 82 ist die Verteilung der vitalen und apoptotischen/nekrotischen Zellen zusammenfassend dargestellt.

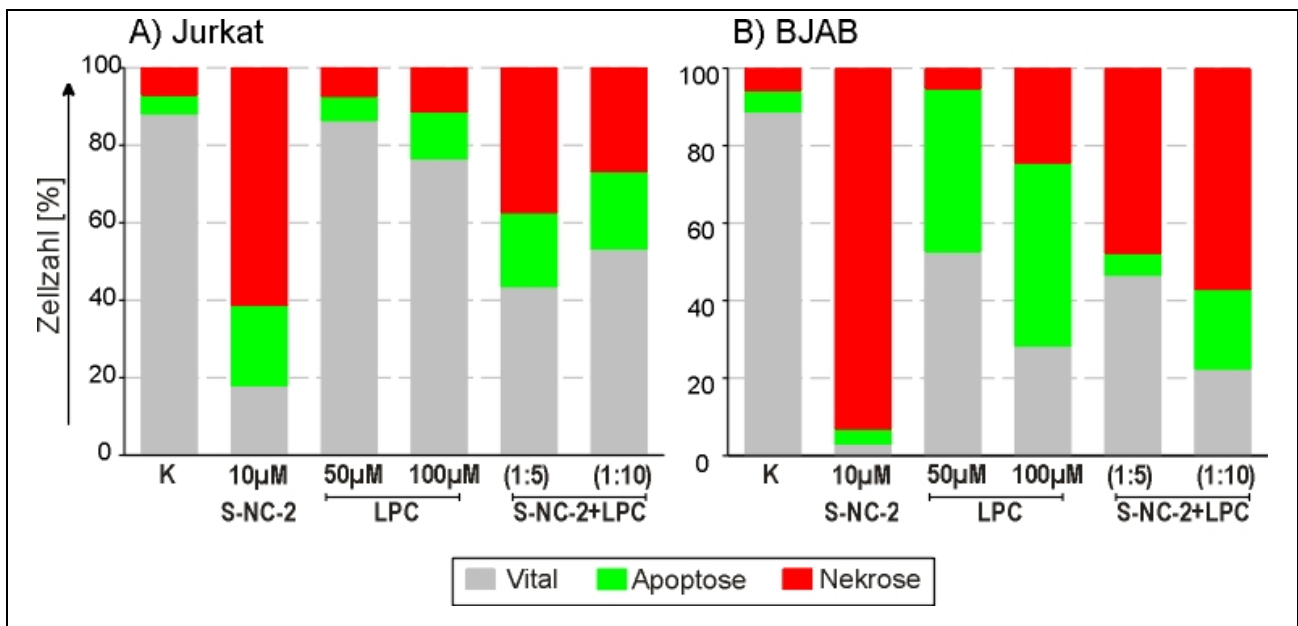


Abb. 82: Exogenes LPC steigert die Anzahl vitaler Zellen in der S-NC-2 induzierten Apoptose

Jurkat und BJAB Zellen wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit S-NC-2, LPC oder einer Kombination beider Lipide in unterschiedlichen Verhältnissen inkubiert und anschließend mit Hilfe von Annexin und PI die Anzahl vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt.

Zur Ermittlung der zytotoxischen Wirkung von LPC wurde dies in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht: 50 und 100 µM. Jurkat Zellen (Abb. 82A) zeigten keine Einschränkung in ihrer Vitalität bei den eingesetzten Konzentrationen an LPC. Die Konzentration von 100 µM führte in 12,1% der Zellpopulation zu einer Apoptose-Induktion. Im Gegensatz dazu

erwiesen sich BJAB Zellen als wesentlich empfindlicher (Abb. 82B). Während 50 μM in 42% der Zellen den apoptotischen Zelltod induzierten, konnte 100 μM nochmals eine geringe Steigerung auf 47,2% hervorrufen.

Weiterhin erfolgte die Untersuchung des Effekts von exogenem LPC auf Jurkat und BJAB Zellen bei gleichzeitiger Inkubation von 10 μM S-NC-2, wobei die Lipide hierfür in zwei unterschiedlichen Verhältnissen zueinander eingesetzt werden (1:5 bzw. 1:10). Daraus resultierte in beiden Zelllinien ein deutlicher Anstieg der vitalen Zellen: in Jurkat konnte eine Steigerung von 25,6% (1:5) bzw. 35,3% (1:10) erzielt werden und in BJAB eine Erhöhung von 43,6% (1:5) bzw. 19,3% (1:10). Im allgemeinen demonstriert dieses Ergebnis eine schützende Wirkung von LPC in der S-NC-2 induzierten Apoptose.

Exogenes LPC wird sehr schnell von kultivierten Säugerzellen aufgenommen, acetyliert und für den Aufbau von PC verwendet. Dieser Weg ist eine effiziente alternative Route zu PC, da Zellen normal in Gegenwart von exogenem LPC weiterwachsen können, während die Cholin-Aufnahme in PC mittels des *de novo* CDP-Cholin Syntheseweges praktisch nicht existiert (Boggs *et al.*, 1995a).

Eine rasante Aufnahme des LPC konnte auch in Jurkat und BJAB Zellen beobachtet werden, das Ausmaß der Aufnahme war jedoch stark Zelltyp abhängig (Abb. 83). Während die Aufnahme der Jurkat Zellen etwas langsamer begann, nach 16 Stunden wurden 36,7% der Gesamtradioaktivität im Zellpellet detektiert, inkorporierten die BJAB Zellen im gleichen Zeitraum bereits zu 81,3%.

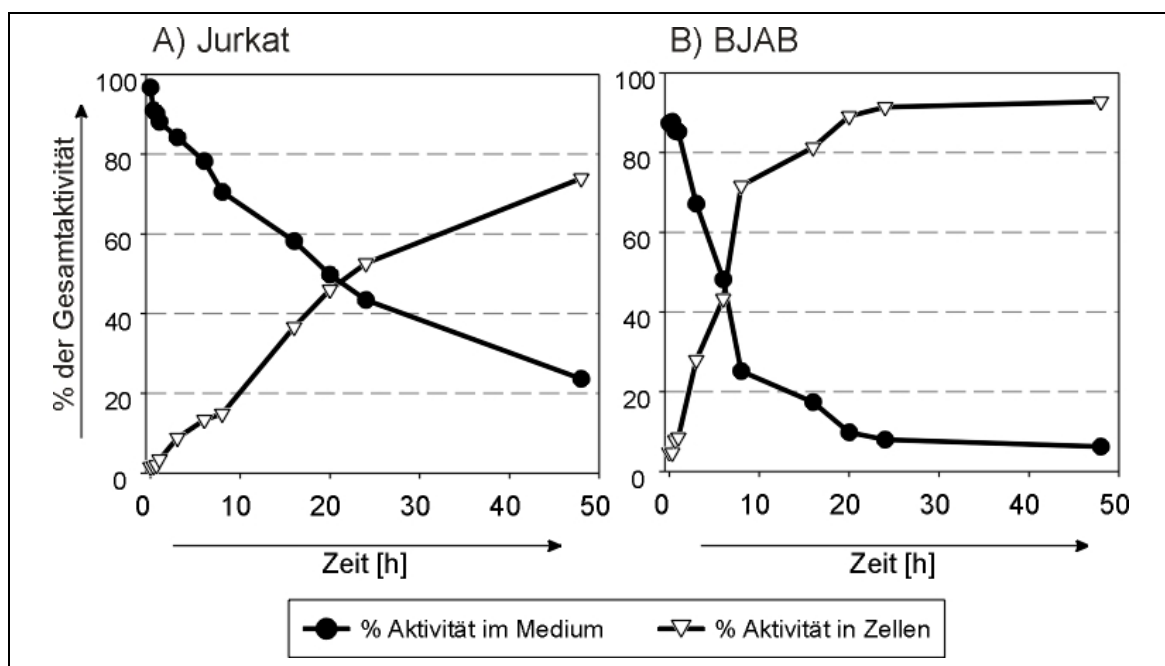


Abb. 83: Aufnahmekinetik von LPC in Jurkat und BJAB Zellen

Die Aufnahmekinetik von LPC erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden. Hierbei wurden Jurkat und BJAB Zellen mit 0,05 μCi [^{14}C]-Lyso-3-Phosphatidylcholine, 1-[1- ^{14}C]palmitoyl inkubiert und nach definierten Zeitpunkten die Menge der Radioaktivität im Medium sowie im Zellpellet bestimmt.

5 DISKUSSION

Eine Vielzahl bösartiger Veränderungen im Zellgewebe zeichnen sich durch eine schlechte Aussicht in der Behandlung aus, da Tumorzellen von lebenden gesunden Zellen häufig nicht exakt abgegrenzt werden können. Weiterhin ist es schwierig, mögliche Infiltrationen genau zu lokalisieren oder Metastasen operativ zu entfernen. Ein Ausweg aus dieser Problematik bietet die Chemotherapie, welche jedoch mit starken Nebenwirkungen einhergeht, da in der Tumorthherapie eingesetzte Medikamente häufig sehr starke Zellgifte sind (Eibl *et al.*, 1987).

Ein wichtiges Ziel in der Krebsbehandlung ist die Entwicklung neuer Methoden und Substanzen, welche geringere Nebeneffekte als die bisher eingesetzten Medikamente hervorrufen. Dies kann nur durch eine höhere Selektivität der Antitumormittel erreicht werden. Somit hat sich der Schwerpunkt intensiver Studien weiter ausgedehnt. Interessante Kandidaten wurden bei den Lipiden, im Speziellen bei den synthetischen Phospholipiden entdeckt.

Lipide besitzen eine zentrale Rolle als Energiespeicher und Wärmeisolatoren der Zelle. Phospholipide im speziellen repräsentieren darüber hinaus wichtige Strukturelemente biologischer Membranen und sind somit eng mit der Funktionalität und Aktivität membrangebundener Proteine verstrickt (Krug *et al.*, 2002). In den vergangenen Jahren ist zur biologischen Bedeutung der Phospholipide als Strukturbildner ein völlig neuer Gesichtspunkt hinzugekommen. Mit der Entdeckung des Thrombozyten-aktivierenden Faktors (PAF: *platelet-activating factor*), dessen Struktur im Jahre 1979 aufgeklärt wurde, konnte gezeigt werden, dass Lipide nicht nur im Verband, sondern auch als Einzelmolekül einen biologischen Effekt auslösen können (Demopoulos *et al.*, 1979; Kötting *et al.*, 1988). Strukturell verwandte Moleküle des PAF sind die synthetischen Alkyl-Lysophospholipide (ALP).

Die antitumorale Wirkung synthetischer ALP wurde bereits zu Beginn der 80er Jahre beschrieben, als die besonderen Eigenschaften des Lipids Et-18-OCH₃ entdeckt wurden (Berdel *et al.*, 1987). Hierbei konnten insbesondere drei günstige Eigenschaften der ALP beobachtet werden, welche ihnen entscheidende Vorteile gegenüber anderen Antitumormitteln verschafften (Eibl *et al.*, 1987):

1. Selektivität, d.h. eine bevorzugte toxische Wirkung gegenüber neoplastischen Zellen
2. Keine Beeinträchtigung der körpereigenen Abwehr
3. Mögliche orale Verabreichung infolge der effektiven Resorption dieser Substanzen im Magen-Darm-Trakt

Seit dieser Zeit entstanden immer neue Strukturvarianten, die letztendlich in die vielversprechenden Alkylphosphocholine (APC) überliefen. Hierbei sind besonders die Substanzen Hexadecylphosphocholin (Unger *et al.*, 1989; Eibl *et al.*, 1990), Perifosine (Crul *et al.*, 2002) und Erucylphosphocholin (Jendrossek *et al.*, 1999) hervorzuheben.

Bis heute wurde die genaue anti-tumorale Wirkungsweise dieser Lipidstrukturen noch nicht geklärt. Der Schwerpunkt ihrer Wirkung ist ein direkter Effekt gegenüber Krebszellen, den sie unter anderem durch Apoptose-Induktion erreichen. Dies ist auch der Punkt, an dem diese Arbeit anknüpft. Hierbei wurde eine neue Substanz, das S-NC-2, auf dessen antitumorale Wirkung untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf der näheren Beleuchtung des Apoptose-Signalwegs ruhte.

5.1 Aufnahme und zelluläre Veränderung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die allgemeinen Auswirkungen des APC S-NC-2 in leukämischen Zellen näher untersucht. Hierzu erfolgten Versuche zur Aufnahme des Lipids, dessen Metabolismus sowie zu Veränderungen im Wachstumsverhalten und zum Wandel der Zellmorphologie.

Die Aufnahmekinetiken in Abb. 26 zeigen deutlich, dass ein kontinuierlicher Einschluss des Lipids über einen Zeitraum von 16 Stunden stattfand. Die Menge des inkorporierten Lipids war jedoch abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Wachstumsraten der einzelnen Zelllinien kann eine Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Aufnahmemenge beobachtet werden. Durch eine starke Zellvermehrung steigt der Bedarf an Bausteinen, wie z. B. Phospholipiden, für die Bildung von Zellmembran. Die Biosynthese von Phospholipiden erfolgt über Lysophospholipide, die pro Glycerin-Grundgerüst nur eine Fettsäure aufweisen (Lands, 1960; Eibl *et al.*, 1969; Eibl *et al.*, 1987). Die Zelle versucht, eine erhöhte Menge an Lysophospholipid aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Daraus sollte auch eine gesteigerte Inkorporation des synthetischen Phospholipids S-NC-2 bzw. [¹⁴C]-R-NC-2 resultieren.

Eine erhöhte Aufnahme von Lipiden aus der Umgebung der Zelle hängt aber nicht nur von ihrer Wachstumsrate ab. Die Gruppe um Munder evaluierte weitere wichtige Parameter, die für die Aufnahme und die zerstörende Wirkung von ALP, im speziellen Et-18-OCH₃, in leukämischen Zellen notwendig sind (Andreesen *et al.*, 1982). Es wurde deutlich, dass Faktoren wie die Serumkonzentration, Temperatur und der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielen. Ein abweichender Verlauf in der Aufnahmekinetik, hervorgerufen durch einen unterschiedlichen Serumgehalt, konnte auch in einer vergangenen Studie mit [¹⁴C]-R-NC-2 demonstriert werden (Matzke, 1999). Hierbei führte der Verzicht von Serum schon nach wenigen Minuten zu einer derart hohen Toxizität in den Zellen, dass die Menge an eingesetztem [¹⁴C]-R-NC-2 um den Faktor 4 gesenkt werden musste. Es wurde davon ausgegangen, dass [¹⁴C]-R-NC-2 wahrscheinlich an Bestandteile des Serums bindet. Ähnliche Studien mit Et-18-OCH₃ wiesen ebenfalls darauf hin, dass bei einer Beteiligung von Serum ein deutlicher Unterschied in der

Aufnahmemenge des Lipids in resistente und normale HL-60 Zellen beobachtet werden konnte (Small *et al.*, 1997). Daher musste angenommen werden, dass Bestandteile des Serums die Interaktion von Et-18-OCH₃ mit der Zelle sowie dessen Aufnahme vermitteln. Ein möglicher Kandidat ist das Serumprotein Albumin (Kötting *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1997). Andreesen beschreibt weiter, dass ein Anstieg der Serumkonzentration in einer Abnahme der zytotoxischen Wirkung von ALP resultiert (Andreesen *et al.*, 1982). Dieser entgegengesetzte Effekt lässt sich durch zwei Ereignisse erklären. Zum einen könnte eine ansteigende, nicht-spezifische Bindung der ALP an Serumproteine, zum anderen eine mit dem Serum zunehmende Menge an Lysophosphatidylcholin (LPC) ausschlaggebend sein. Andererseits wäre es auch möglich, dass das Verhältnis zwischen nicht-metabolisierbarem ALP und metabolisierbarem LPC wichtiger ist als die eigentliche Menge an ALP-Molekülen an sich. Die Lysophosphatide könnten um limitierte Bindungsstellen an der Plasmamembran konkurrieren oder aber auch um spezifische Trägerproteine im Serum (Andreesen *et al.*, 1982). Für alle weiteren Versuche mit S-NC-2 bzw. [¹⁴C]-R-NC-2 wurde aus diesen Gründen eine Konzentration von 10% FKS gewählt, da zum einen bei geringen Konzentrationen keine starken lytischen Vorgänge beobachtet werden konnten und zum anderen eine deutliche Aufnahme des Lipids in die Zellen stattfand.

Der Mechanismus der APC-Aufnahme ist bis heute eine umstrittene Frage. Prinzipiell werden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: zum einen die Aufnahme durch Endozytose und zum anderen eine aktive Aufnahme über spezifische Oberflächenproteine (Bazill *et al.*, 1990; Fleer *et al.*, 1993; Mollinedo *et al.*, 1997). Indirekte Beweise deuten auf eine mögliche Beteiligung von Proteinstrukturen hin, die bei der Aufnahme von Ether-Lipiden wie Et-18-OCH₃ eine Rolle spielen könnten. Dies zeigten Versuche mit Suramin behandelten Zellen. Suramin, ein allgemeiner Membran-impermeabler Inhibitor von Rezeptor-Ligand Verbindungen, verhinderte die Aufnahme von Et-18-OCH₃ und verminderte dessen Apoptose-induzierendes Potenzial in leukämischen Zellen (Mollinedo *et al.*, 1997; Gajate *et al.*, 2004). Weiterhin demonstrierte Li *et al.* die Interaktion eines photoaktivierbaren Et-18-OCH₃-Analoges mit zwei Proteinen der MCF-7 Brustkrebs Zelllinie, die für dessen Aufnahme verantwortlich sein könnten (Li *et al.*, 2003). Ferner zeigte eine kürzliche Entdeckung, dass Lemp3 (*ligand effect modulator 3 protein*) und LdMT (*Leishmania donovani putative Miltefosine transporter*) für die Aufnahme der APC in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie in Parasiten (*L. donovani*) verantwortlich sein sollen (Hanson *et al.*, 2003; Pérez-Victoria *et al.*, 2003; Gajate *et al.*, 2004).

Um eine mögliche Beteiligung von Oberflächenproteinen im Zusammenhang mit der Aufnahme von [¹⁴C]-R-NC-2 zu untersuchen, erfolgte eine Co-Inkubation der Zellen mit Suramin (70 bzw. 140 µM) und [¹⁴C]-R-NC-2 mit anschließender Szintillations-Messung, um die Aufnahme des radioaktiven Lipids zu verfolgen. Allerdings konnte in dieser Versuchsreihe nur ein leichter Rückgang der [¹⁴C]-R-NC-2 Aufnahme bei gleichzeitiger Verabreichung von Suramin verzeichnet

werden (Abb. 30). In Jurkat Zellen wurde eine Reduktion von 5,2 – 5,7%, in BJAB Zellen lediglich eine Verminderung von 4,9% detektiert. In Gegensatz dazu steht die signifikante Hemmung der Et-18-OCH₃ Aufnahme in der Literatur: in HL-60 Zellen konnte eine Reduktion um etwa 64%, in U937 Zellen eine Hemmung von ca. 47% gemessen werden (Mollinedo *et al.*, 1997). Im Vergleich zu diesen Resultaten kann anhand der Daten zur [¹⁴C]-R-NC-2 Aufnahmekinetik in Jurkat und BJAB Zellen einer Beteiligung von Oberflächenproteinen keine größere Rolle zugesprochen werden. Die zusätzliche Untersuchung einer möglichen Apoptose-Hemmung erwies sich ebenfalls als negativ. Suramin konnte weder die Spaltung des Marker-Proteins PARP noch die internukleosomale DNA-Degradierung hemmen (Abb. 42).

Ein charakteristisches Merkmal der ALP und APC ist deren schlechte Verstoffwechselung und die daraus resultierende hohe Halbwertszeit der Moleküle. Dies ist der Grund, weswegen sie sich in Zellmembranen ansammeln und dort ihre anti-neoplastische Wirkung entfalten (van Blitterswijk *et al.*, 1987; Ruiter *et al.*, 1999). Allerdings sind diese Lipide nicht vollkommen von einem Ab- bzw. Umbau verschont. Für Substanzen wie Et-18-OCH₃ und HePC wurde bereits ein möglicher Abbau durch ein Phospholipase C-ähnliches Enzym beschrieben, durch welches Et-18-OCH₃ zu 1-O-Octadecyl-2-O-methylglycerol bzw. HePC zu Hexadecanol umgebaut wurde (Fleer *et al.*, 1987). Dieser Prozess verläuft jedoch sehr langsam. Für die hier verwendeten APC lag es daher nahe, ebenfalls den möglichen [¹⁴C]-R-NC-2 Metabolismus in leukämischen Zellen zu untersuchen. Hierfür erfolgte die Behandlung unterschiedlicher leukämischer Zelllinien, wie den Jurkat, BJAB, SKW6.4 und K562 Zellen mit [¹⁴C]-R-NC-2 (Abb. 29). Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden sämtliche zellulären Lipide extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Detektion von [¹⁴C]-R-NC-2 geschah mittels Autoradiographie. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass [¹⁴C]-R-NC-2 beinahe keinem metabolischen Prozess während des untersuchten Zeitraums unterworfen ist. Zwar konnte in HL-60 sowie in MDA-MB-468 Zellen ein sehr geringer Abbau von [¹⁴C]-R-NC-2 beobachtet werden, der im zeitlichen Verlauf dem Muster zellulärer Lipide entsprach (Matzke, 1999), jedoch wurde in den hier untersuchten leukämischen Zelllinien kein Abbau in diesem Ausmaß beobachtet, auch nicht nach einer 10-tägigen Exposition der Dünnschichtplatten (Abb. 29). Generell kann davon ausgegangen werden, dass [¹⁴C]-R-NC-2 in dem untersuchten Zeitraum stabil in der Zelle vorliegt.

5.2 S-NC-2 und Apoptose

5.2.1 Einfluss auf das Wachstumsverhalten

Durch die Dokumentation der Aufnahme von [¹⁴C]-R-NC-2 in die jeweiligen Zelllinien, erfolgte im weiteren Schritt die Untersuchung einer möglichen Wachstumsbeeinflussung einer weiteren APC-Verbindung, dem S-NC-2. Als Beispiele für zwei unterschiedliche leukämische Zelllinien wurden HL-60 und K562 Zellen gewählt. Das Wachstum der HL-60 Zellen differierte deutlich von dem der K562. In HL-60 konnte in den ersten 4 Tagen Kulturzeit nur ein langsamer Anstieg der Zellzahl beobachtet werden, erst nach etwa 5 Tagen erfolgte ein explosionsartiger Wachstumsschub, der auch nach 9 Tagen noch keine Plateauphase erreichte. K562 Zellen zeigten vom ersten Tag an einen starken Wachstum, wobei die logarithmische Phase nach 6 Tagen beendet war. Durch die Zugabe steigender Konzentrationen des synthetischen Phospholipids S-NC-2 konnten deutliche zelltypspezifische Einschränkungen im Wachstumsverhalten beobachtet werden (Abb. 23). Konzentrationen von 5 - 20 µM S-NC-2 führten in HL-60 Zellen zu einem drastischen Wachstumsstop. Selbst eine geringe Konzentration von 1 µM resultierte, im Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen, in einem 37%igem Wachstumsverlust. Im Gegensatz dazu stand die K562 Zelllinie. Hier führten nur hohe Konzentrationen wie 10 und 20 µM zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Geringere Mengen an S-NC-2 zeigten nur minimale Wachstumseinschränkungen.

Laut Theorie sollte aufgrund einer stärkeren Zellvermehrung die Population auch auf eine höhere Aufnahme von Lysophospholipiden aus der Umgebung angewiesen sein (Lands, 1960; Eibl *et al.*, 1969; Eibl *et al.*, 1987). Dies würde bedeuten, dass auch eine erhöhte Menge an APC inkorporiert werden sollte. Diese Aussage korreliert auch mit den tatsächlich gemessenen Werten. In den anfangs schneller wachsenden K562 Zellen konnte nach 16-stündiger Inkubation mit [¹⁴C]-R-NC-2 beinahe 30% der Radioaktivität in der Zellfraktion vorgefunden werden, in HL-60 allerdings nur etwa 8% (Matzke, 1999).

Für die synthetischen Phospholipide HePC und Et-18-OCH₃ wurde bereits eine hemmende Wirkung der Synthese von Phospholipiden auf der Ebene der Cytidyltransferase (CT) beschrieben, welches einen der Gründe für die wachstumshemmenden und zytotoxischen Eigenschaften darstellt (Boggs *et al.*, 1995a; Boggs *et al.*, 1998). Demnach sollten K562 Zellen durch die Behandlung mit APC und deren verstärkte Aufnahme frühzeitig ein deutlich eingeschränkteres Wachstum aufweisen. Diese Theorie korrelierte jedoch nicht mit den tatsächlichen Ergebnissen, da HL-60 Zellen um ein Vielfaches sensitiver auf S-NC-2 reagierten als K562. Demnach muss noch ein weiterer Faktor eine Rolle spielen, der nicht nur auf die Hemmung der Lipidsynthese zurückzuführen ist. In den vergangenen Jahren kristallisierte sich heraus, dass APC starke Apoptose-induzierende Eigenschaften besitzen (Gajate *et al.*, 2001; Jendrossek *et al.*, 2003).

5.2.2 Morphologische Veränderungen

Nähere Untersuchungen zur Morphologie der Zellen erbrachten erste Einblicke in die Art des induzierten Zelltods. Zeitabhängige Studien in adhärent wachsenden HeLa Zellen demonstrierten erste morphologische Eigenschaften, die bereits in der Literatur als ein mikroskopisches Erkennungsmerkmal apoptotischer Zellen beschrieben wurden (Kerr *et al.*, 1972; Leverrier *et al.*, 2001). Die spiegeleiähnliche Zellform gesunder HeLa Zellen beginnt sich durch die Einwirkung von S-NC-2 zu verändern. Die Zellen werden schmaler und lösen ihre Bindungsstellen vom Untergrund. Plötzlich schnorkelt sie zusammen und löst sich in Blasen auf. Dieser Verlauf beschreibt das typische „Blebbing“ apoptotischer Zellen (Abb. 24).

Einen deutlicheren Einblick in intrazelluläre Veränderungen erbrachte die Elektronenmikroskopie. Unbehandelte Jurkat Zellen haben eine runde Form und weisen an der Außenseite der Membran kleine Zellfortsätze auf, die sog. Filopodien. Diese strecken sich in einem ungestressten Zustand in alle Richtungen. Durch die Behandlung mit 10 μ M S-NC-2 konnten deutliche Veränderungen beobachtet werden, wie etwa das starke Abkugeln der Zelle, der Verlust der Zellfortsätze sowie eine starke Kondensierung des Zellkerns (Abb. 25, rote Pfeile). Ein weiteres, sehr auffälliges Erscheinungsbild ist die starke Vakuolenbildung in der Zelle, die auf eine Zerstörung von Zellorganellen hindeutet (Abb. 25, gelbe Pfeile). Es wäre möglich, dass in diesem Fall eine Überschneidung verschiedener Wege des programmierten Zelltods stattfindet. Die klassische Apoptose beschreibt einen frühzeitigen Zusammenbruch des Zytoskeletts, aber eine Bewahrung zellulärer Organellen. Im Gegensatz dazu steht die Autophagie, welche durch einen frühen Abbau der Organellen, aber einem längerfristigen Schutz des zellulären Skeletts charakterisiert ist (Jaattela *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2005). Bislang wurde angenommen, dass die Beteiligung der Autophagie nur während der Embryonalentwicklung oder während homeostatischer Prozesse im adulten Organismus eine Rolle spielt. Neuerdings zeigte sich jedoch die Beteiligung des autophagosomalen Zelltods auch im Zusammenhang mit krankem Gewebe und bei der chemotherapeutischen Behandlung von Tumorzellen. In vielen dieser Fälle konnten beide Arten des programmierten Zelltods, Apoptose und Autophagie, in der selben Zelle beobachtet werden (Bursch, 2001; Levine *et al.*, 2005). Das apoptotische Dogma besagt allerdings, dass die meisten der apoptotischen Zellen im Organismus durch Phagozyten beseitigt und durch deren Lysosomen eingeschmolzen werden. Aber in manchen Formen des programmierten Zelltods (z. B. Embryogenese) ist die Verfügbarkeit von phagozytierenden Zellen zu gering, um eine ausreichende Beseitigung toter Zellen zu gewährleisten. In diesem Fall kann die betroffene Zelle den autophagosomalen Signalweg aktivieren und somit selbstständig ihren Zellinhalt durch eigene Lysosomen degradieren (Levine *et al.*, 2005). Diese Notwendigkeit könnte somit zu einer Überlappung des apoptotischen und autophagosomalen Signalwegs führen. Interessanterweise zeigte ein *in vitro* Modell zur Milchdrüsenentwicklung für TRAIL eine regulierende Funktion bei der

Autophagie. Hierbei erfolgte die TRAIL-induzierte Apoptose sowie die autophagosomale Aktivierung parallel (Mills *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte auch den Mitochondrien eine Verknüpfung von Autophagie und Apoptose zugeschrieben werden, da sie zum einen apoptotische Signale generieren, aber bei Defekten durch Autophagie eliminiert werden. Im Fall der mit APC behandelten Jurkat Zellen konnte eine deutliche Kondensation der DNA (Apoptose) sowie eine starke Vakuolenbildung (Autophagie?) beobachtet werden. Da es sich hierbei aber um *in vitro* Zellkulturexperimente handelt, wäre es denkbar, dass aufgrund der fehlenden Beseitigung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ein paralleler Verlauf von Apoptose und Autophagie stattfindet. Ob diese Beobachtung jedoch nur auf den Fall der Zellkultur beschränkt ist oder auch in Geweben eines intakten Organismus auftritt, bleibt ein möglicher Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

5.2.3 Beteiligung der Todesrezeptoren

ALP und APC sind dadurch gekennzeichnet, dass sie aufgrund ihrer hohen metabolischen Stabilität nach der Aufnahme in die Zellmembran keinem gravierendem Ab- und Umbau unterliegen sind. Dadurch reichern sie sich in diesem Zellkompartiment an. Es ist denkbar, dass sie aufgrund ihrer lysolipiden Eigenschaft die Fluidität der Membran beeinflussen könnten und dadurch eventuell weitreichende Effekte auf membranlokalisierte Proteine ausüben. Da ebenfalls Proteine der Apoptose-Initiation, die sog. Todesrezeptoren, in der Zellmembran eingelagert sind, könnte hier eine Brücke zwischen APC/ALP-Aufnahme und der Induktion der Apoptose in den betroffenen Zellen geschlagen werden.

Erste Hinweise für eine mögliche Beteiligung der Todesrezeptoren am S-NC-2 induzierten Zelltod lieferten Untersuchungen in genetisch veränderten Jurkat und BJAB Zellen. Hierbei wurden Zellen gewählt, denen wichtige Verbindungsglieder im CD95- bzw. TRAIL-Rezeptor Signalweg fehlen. Im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypzellen, zeigte die FADDdn Version von Typ I BJAB Zellen nur eine geringe Spaltung der am Rezeptor gelegenen Initiator-Caspase-8. Hier konnte erst ab einer Konzentration von 50 µM S-NC-2 eine deutliche Spaltung der Caspase-8 detektiert werden. In Gegensatz dazu bewirkten in Wildtypzellen bereits 10 µM S-NC-2 eine effiziente Spaltung der Pro-Caspase-8 (Abb. 46). In diesem Fall zeigten die Zellen durch ein defektes Adapterprotein eine deutliche Hemmung der Apoptose-Induktion, die sich bis zur Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen sowie zur Spaltung von Marker-Proteinen (PARP) fortsetzte. Demnach kann eine Beteiligung der Todesrezeptoren nicht ausgeschlossen werden.

Auch immunhistochemische Untersuchungen zeigten bereits nach einer Stunde klare Anzeichen einer Rezeptor-Aktivierung. Hierbei konnte eine deutliche Zusammenlagerung der Todesrezeptoren CD95 (Abb. 43) bzw. TRAIL-R2 (Abb. 45) beobachtet werden. Dies war durch ein „Clustering“ der Rezeptormoleküle, immunhistochemisch mit fluoreszierenden Antikörpern

nachgewiesen, die im Lauf der Zeit zu einem Pol der Zelle wanderte (*Capping*). Ein „*Clustering*“ und „*Capping*“ von Todesrezeptoren wurde bereits bei der Behandlung von Zellen mit dem ALP Et-18-OCH₃ beschrieben (Gajate *et al.*, 2000a; Gajate *et al.*, 2002). Hierbei wurde von einer selektiven Aufnahme in die Tumorzellen sowie einer intrazellulären Aktivierung des Todesrezeptors berichtet, welche unabhängig von CD95/CD95-Ligand Interaktionen stattfand. Dies repräsentiert einen neuen Wirkungs-Mechanismus anti-tumoraler Substanzen und ermöglicht einen neuen Weg in der Krebstherapie. Auch im Fall der S-NC-2 induzierten Apoptose ist eine Abhängigkeit von der Ligandenbindung eher nicht zu beobachten, da eine Vorbehandlung der Zellen mit einem neutralisierenden anti-CD95 Antikörper keine Einschränkung in der S-NC-2 induzierten Apoptose erkennen ließ (Abb. 48).

Die Aktivierung von zellulären Oberflächenrezeptoren wird in jüngster Zeit immer wieder mit der Aggregation bestimmter Membranbereiche in Verbindung gebracht, den sog. *Lipid Rafts*. Die Struktur der *Lipid Rafts* und deren Aufgabe als funktionale Domäne wurde bereits ausführlich beschrieben (Simons *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998). Damit es zur Ausbildung dieser Mikrodomänen kommen kann, lagern sich spezielle Lipide wie Sphingolipide und Cholesterol, eng mit Glycerophospholipiden zusammen. Diese Assoziation wird durch hydrophobe und hydrophile Interaktionen zwischen den einzelnen Sphingolipiden untereinander sowie mit Cholesterol gewährleistet. Cholesterol führt zum größten Teil zur Stabilisierung der Mikrodomäne und scheint die Lücken zwischen den Glycerophospholipiden zu füllen. Diese enge Verbindung zwischen Cholesterol und Sphingolipiden führt zu einer lateralen Vereinigung dieser Lipide und resultiert in einer Bildung von getrennten Mikrodomänen, die sich im Meer der Lipide wie ein Floß verhalten. Daher resultiert der Name *Lipid Raft* (Raft = Floß) (Heerklotz, 2002; Szabo *et al.*, 2004). Als Antwort auf intra- oder extrazelluläre Stimuli sind *Lipid Rafts* bis zu einem gewissen Grad dazu in der Lage, bestimmte Proteine ein- oder auszuschließen. Dies begünstigt spezifische Protein-Protein-Interaktionen und moduliert die Aktivität unterschiedlicher Signalkaskaden (Garcia *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass Todesrezeptoren wie TNF- α oder CD95 sowie der T-Zell Rezeptor in speziellen Mikrodomänen aggregieren, welche den *Lipid Rafts* oder Caveolen ähneln (Kilkus *et al.*, 2003). Neuere Daten zeigen eine Beteiligung von *Lipid Rafts* bei der Kontrolle der Apoptose-Induktion, zum einen durch die positiven Interaktionen mit CD95 und zum anderen durch negative Interaktionen mit dem pro-apoptotischen Protein Bad (Ayllon *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2003). Gajate und Mollinedo konnten bereits eine direkte Interaktion zwischen dem CD95-Todesrezeptor und *Lipid Raft* demonstrieren (Gajate *et al.*, 2001). Hierbei induzierte Et-18-OCH₃ ein Co-*Capping* von CD95 und *Rafts* in humanen leukämischen Zellen, bevor das Apoptose-Programm gestartet wurde. Auch im Fall der S-NC-2 Behandlung von Jurkat Zellen konnte bereits nach einer Stunde eine Akkumulation von CD95 und dem *Lipid Raft* Marker Caveolin beobachtet werden (Abb. 43). Dies passierte deutlich, bevor erste Anzeichen der Apoptose wie etwa die Aktivierung von Caspasen, detektiert werden konnten.

Lipid Rafts können aufgrund von zwei Eigenschaften aus der Zelle isoliert werden. Zum einen sind sie in Triton X-100 bei 4°C unlöslich und zum anderen wandern sie aufgrund ihrer geringen Dichte in einem Sucrose-Gradienten in die oberen Schichten ein (Garcia *et al.*, 2003; Chamberlain, 2004). Für Et-18-OCH₃ behandelte Jurkat Zellen konnte bereits auf Protein-Ebene das Einwandern des CD95-Todesrezeptors in die Bereiche der *Lipid Rafts* demonstriert werden (Gajate *et al.*, 2001; Gajate *et al.*, 2004). Um dieses Ergebnis möglicherweise in die S-NC-2 induzierte Apoptose übertragen zu können, wurden unstimulierte sowie mit S-NC-2 behandelte Jurkat Zellen mit 1% Triton X-100 bei 4°C lysiert und mittels diskontinuierlicher Sucrose-Gradienten-Zentrifugation fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden per Western Blot auf den CD95-Todesrezeptor sowie einen weiteren *Lipid Raft* Marker, das Gangliosid G_{M1}, untersucht (Abb. 44). Die Detektion von Gangliosid G_{M1} erfolgte durch den spezifischen G_{M1}-Ligand, die B-Untereinheit des Cholera Toxins. Auch im Fall der S-NC-2 behandelten Zellen konnte ein Einwandern des CD95 Todesrezeptors in die Bereiche der Membran-Mikrodomänen beobachtet werden. Diese selektive Anreicherung der Rezeptormoleküle in bestimmten Membranregionen könnte zu einer gesteigerten Apoptose-Induktion im S-NC-2 induzierten Apoptose-Signalweg führen. Membran-Plattformen, an welchen CD95-Moleküle eng zusammengelagert werden, können möglicherweise die Ausbildung des DISC intensivieren und dadurch das CD95-Todessignal verstärken (Scheel-Toellner *et al.*, 2002; Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002; Gajate *et al.*, 2004).

Die Zusammenlagerung der *Lipid Rafts* zu größeren Plattformen, was durch das Capping des CD95-Rezeptors angedeutet wurde, könnte gegebenenfalls von S-NC-2 selbst induziert werden. Dies konnte bereits für spezielle Lipide, die Ceramide, demonstriert werden, deren Generierung mit der Aktivierung des CD95-Rezeptors einhergeht. Ceramide können durch die Förderung der CD95-Aggregation das Capping induzieren und somit die Apoptose-Induktion vermitteln (Cremesti *et al.*, 2001). Durch die Aufnahme von S-NC-2 in die Zellmembran und aufgrund dessen planare Struktur wäre es möglich, dass S-NC-2 zum einen zur Stabilisierung der *Lipid Rafts* beiträgt und andererseits für eine Zusammenlagerung der Mikrodomänen zu größeren Plattformen verantwortlich ist. Für Ceramide konnte ein ähnliches Prinzip demonstriert werden. Sie führen nicht zu einer erhöhten Membranfluidität sondern steigern die Ordnung der langen Acyl-Ketten in der Lipid-Doppelschicht der Membran, was in eine dichtere Zusammenlagerung der Lipid-Moleküle resultiert. Ceramide besitzen eine Tendenz zur Selbst-Aggregation und sondern sich dadurch, dicht gepackt mit weiteren Sphingolipiden und Cholesterol, in *Lipid Rafts* ab und können diese somit stabilisieren (Massey, 2001; van Blitterswijk *et al.*, 2003). Die einzigartige Eigenschaft der Ceramide, sich selbst über Wasserstoffbrücken zu verbinden, liefert die treibende Kraft, die der Verschmelzung der mikroskopischen *Rafts* zu großen Makrodomänen zugrunde liegt (Gulbins *et al.*, 2003).

Ein weiteres Ergebnis, das deutlich auf die Beteiligung des CD95-Rezeptors bei der S-NC-2 induzierten Apoptose hinwies, waren die Versuchsreihen mit CD95-defizienten K562 Zellen. In dieser Zelllinie konnte, obwohl eine deutliche Aufnahme von ca. 30% des [¹⁴C]-R-NC-2 stattfand, kein Anzeichen eines Zelltods beobachtet werden. Sie erwiesen sich in Versuchsreihen zum Wachstumsverhalten deutlich widerstandsfähiger im Vergleich zu HL-60 Zellen. Sie nahmen eine beachtliche Menge des Lipids auf, zeigten aber nur eine geringe Reduktion des Wachstums (Abb. 23). Die Untersuchung auf Caspasen-Spaltung sowie nukleosomale DNA-Degradierung verliefen negativ. Auch bei sehr hohen Konzentrationen von 50 µM S-NC-2 konnte keine Fragmentierung des Zellkerns beobachtet werden, obwohl diese Konzentration für alle anderen verwendeten Zelllinien starke zytotoxische Eigenschaften aufwies und zur Lyse der Zellen führte. Ein Vergleich der Proteinausstattung mit anderen Zelllinien verriet, dass K562 alle wichtigen Komponenten besaßen, die zu einem theoretisch reibungslosen Ablauf des apoptotischen Signalwegs benötigt werden und daher nach erhaltenem Signal voll funktionsfähig sein sollten. Ein wichtiger Unterschied konnte jedoch festgestellt werden: sie besitzen keinen CD95-Todesrezeptor. Um die Theorie zu untermauern, dass CD95 ein wichtiger Bestandteil der S-NC-2 induzierten Apoptose darstellt, musste das Wiedereinbringen des Rezeptors die Zellen gegenüber S-NC-2 sensitiv machen. Dies konnte in Abb. 52 deutlich demonstriert werden, da die transiente Transfektion der Zellen mit CD95 sowie deren Inkubation mit 50 µM S-NC-2 zu einer Spaltung der Caspasen-8, -9 und -10 und des apoptotischen Marker-Proteins PARP führte. Hierbei wurde der wichtige Beweis erbracht, dass der CD95-Todesrezeptor in der S-NC-2 induzierten Apoptose in leukämischen Zellen eine wichtige Rolle spielt.

5.2.4 Aktivierung der Caspase-Kaskade: Typ I und Typ II Zellen im Vergleich

Die Behandlung leukämischer Zelllinien mit S-NC-2 führte zum apoptotischen Tod der Zellen. Dieser ging mit der Aktivierung spezifischer Initiator- und Effektor-Caspasen einher. Die Beteiligung der einzelnen Caspasen wurde systematisch durch deren Spaltung im Western Blot untersucht. Weiterhin erfolgte eine Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999). Hierbei handelt es sich um zwei unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Aktivierung des CD95-Todesrezeptors zum Tod der Zelle führt. Typ I Zellen (z. B. SKW6.4, BJAB) sind dadurch charakterisiert, dass sich nach Induktion des Todessignals eine große Anzahl an DISC-Komponenten in der Zellmembran ausbilden. Dies führt zu einer verstärkten Menge aktiver Caspase-8 Moleküle, die für eine direkte Aktivierung der Effektor-Caspasen ausreichend sind und somit ohne Umwege den Zelltod einleiten. Im Gegensatz dazu weisen Typ II Zellen (z. B. Jurkat) eine geringere DISC-Bildung auf. Die daraus resultierende aktive Caspas-8 ist somit nicht für den direkten Signalweg ausreichend. Daher sind diese Zellen auf die pro-apoptotische Beteiligung der Mitochondrien angewiesen, die über einen Amplifizierungszyklus positiv in den apoptotischen

Zelltod eingreifen. Insbesondere in Typ II Zellen kann die mitochondriale Beteiligung durch eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 gehemmt werden und somit zum Stillstand des Signalweges führen (Scaffidi *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999).

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den erhaltenen Ergebnissen um allgemein gültige Aussagen oder um zelltypspezifische Ereignisse handelt, wurde im Verlauf dieser Arbeit das Apoptose-induzierende Potenzial von S-NC-2 sowohl in Typ I als auch in Typ II Zellen untersucht. Als Vertreter dieser Zelllinien erfolgte die Behandlung mit S-NC-2 in BJAB (Typ I) und in Jurkat (Typ II) Zellen.

Die Untersuchungen zur Caspase Aktivierung mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot erfolgte nach einer Inkubation von 16 Stunden mit steigenden Konzentrationen an S-NC-2. Caspase-8 steht am Beginn der Caspase-Kaskade, da sie auf Ebene des CD95-Todesrezeptors aktiviert werden kann (Lavrik *et al.*, 2003). Eine Spaltung der Pro-Form der Caspase-8 konnte in beiden Zellsystemen detektiert werden, wenn auch bei unterschiedlichen Konzentrationen. Hierbei erfolgte deren Aktivierung in Jurkat Zellen bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (10 μM) als in BJAB Zellen (20 μM). Auch Caspase-9 wurde in beiden Zelllinien proteolytisch geschnitten, was auf die Aktivierung dieser intrinsischen Initiator-Caspase hindeutet. Für beide Zelllinien könnte daher auch eine Beteiligung der Mitochondrien angedacht werden. Die Spaltung der jeweiligen Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 konnte in beiden Zelllinien in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an S-NC-2 detektiert werden. Diese Untersuchungen gaben einen ersten Hinweis auf einen möglicherweise einheitlichen, übergeordneten, von S-NC-2 ausgelösten Signalweg.

Mit Hilfe des Caspase-Assays (BD ApoAlert™, Becton Dickinson) erfolgte die zeitliche Studie der Aktivierung von Caspase-2, -3, -8 und -9 (Abb. 38). Dieser offenbarte einige Unterschiede im Verhalten der beiden Zelllinien. Während in Jurkat Zellen z. B. die Aktivierung der Caspase-3 bereits nach knapp 1-stündiger Inkubation mit 20 μM S-NC-2 beobachtet werden konnte, erfolgte diese in BJAB Zellen erst nach 5 - 6 Stunden. Interessanterweise erfolgte in beiden Zelllinien zeitgleich mit der Caspase-3 die Aktivierung der Caspase-2. Diese zeigte aber ein schwächeres Signal. Caspase-2 wird in der Literatur z. B. im Zusammenhang mit der Translokation von Bax zu den Mitochondrien sowie der direkten und indirekten Freisetzung mitochondrialer Proteine durch die Prozessierung von Bid beschrieben. Der genaue Wirkungsort dieser Caspase ist jedoch noch weitgehend unbekannt (Kumar *et al.*, 2002; Enoksson *et al.*, 2004). Da in den Western Blot Untersuchungen eine Aktivierung der Caspase-9 gezeigt werden konnte, wäre es möglich, dass Caspase-2 zur Induktion des mitochondrialen Signalweges durch die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bid oder durch die eigenständige Permeabilisierung der mitochondrialen Membran beitragen könnte (Gross *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2002). Hierbei wandert die prozessierte Form tBid zu den Mitochondrien, führt dort zur Freisetzung von Cytochrom c und kann somit die Aktivierung der Caspase-9 induzieren. Hierbei bildet die Pro-Form mit dATP, Cytochrom c und Apaf-1 einen Komplex (Hengartner, 2000; Cain *et al.*, 2002). Im weiteren Verlauf

des Caspase-Aktivierungs-Assays erfolgte die Beobachtung von Caspase-8 und -9. Allerdings konnte in diesem Fall nur eine geringe Aktivierung der jeweiligen Caspasen in Jurkat Zellen detektiert werden, was etwas gegensätzlich zu den Ergebnissen der Spaltung auf Protein-Ebene verläuft. Auch nach 16-stündiger Inkubation konnte kein signifikanter Anstieg dieser beiden Caspasen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dies könnte bei Caspase-8 auf ein nicht ganz so optimales Tetrapeptid-Erkennungsmotiv zurückzuführen sein, da in diesem Assay als Substrat für die aktive Caspase-8 das Tetrapeptid IETD gewählt wurde. Jurkat Zellen reagierten jedoch in Inhibitionsuntersuchungen auf die Hemmung der Caspase-8 durch z-LETD-fmk deutlich stärker als auf z-IETD-fmk (Daten nicht gezeigt). Dies könnte eine mögliche Erklärung der sehr geringen Caspase-8 Aktivierung darstellen. Im Fall der BJAB Zellen konnte wiederum ein zeitlich verzögerter Anstieg der Caspase-8 und -9 Aktivierung beobachtet werden, welcher wiederum zeitgleich mit Caspase-2 verlief und nach 16 Stunden das Optimum erreicht hatte.

Interessanterweise konnte in diesem Assay eine sehr frühe und ausgesprochen starke Aktivierung der Caspase-3 beobachtet werden. In jüngster Zeit wiesen Aouad und Mitarbeiter aufgrund von CD95-Immunpräzipitationen die Caspase-3 als Bestandteil des DISC nach und stellte dadurch die alleinige Vorherrschaft der apikalen Caspase-8 in Frage (Aouad *et al.*, 2004).

Auch in den S-NC-2 behandelten Jurkat Zellen konnte die Caspase-3 bei Co-Immunpräzipitationen im Präzipitat detektiert werden (siehe Abb. 47). In diesem Versuch wurde der CD95-Rezeptor selektiv aus einem Proteinpulver behandelter Jurkat Zellen gefischt und anschließend auf bestimmte Bestandteile des DISC im Präzipitat untersucht. Hierbei konnte durch das Auffinden der Caspase-8 ein weiterer wichtiger Beweis für die Beteiligung des CD95-Todesrezeptors und die Ausbildung des DISC bei der S-NC-2 induzierten Apoptose erbracht werden. Zusätzlich wurde die Pro-Form der Caspase-3 detektiert.

Weitere Indizien führen zu der Annahme, dass Caspase-3 nicht nur als Effektor-Caspase, sondern auch bereits auf Rezeptor-Ebene eine Rolle spielt. Hierzu zählt z. B. eine Versuchsreihe mit Jurkat Zellen, welche durch Transfektion mit einer dominant negativen Variante der Caspase-3 eine starke Beeinträchtigung der Caspase-8 Aktivierung aufwiesen (Aouad *et al.*, 2004). Da die Caspase-3 auch im Präzipitat von S-NC-2 behandelten Zellen vorgefunden werden konnte sowie im Caspase-Assay bereits nach 1 (Jurkat) bzw. 5 Stunden (BJAB) eine deutliche Aktivierung der Caspase-3 stattfand (Abb. 38), könnte diese Caspase, auch im Fall der S-NC-2 behandelten Zellen, nicht nur die Aufgabe einer Effektor-Caspase innehaben. Zusätzliche Studien mit dem spezifischen Caspase-3 Inhibitoren z-DEVD-fmk zeigten ebenfalls eine starke Reduktion des proapoptotischen Proteins Bid sowie eine vollkommene Hemmung der PARP-Spaltung (Daten nicht gezeigt).

5.3 Intrazellulärer Crosstalk

Wenn auch die Resultate für Typ I Zellen darauf hinweisen, dass den Todesrezeptoren eine übergeordnete Rolle in der S-NC-2 induzierten Apoptose zugeschrieben werden kann, ist durch die Induktion des programmierten Zelltods in Typ II Zellen ebenfalls eine Beteiligung der Mitochondrien zu postulieren. Diese These konnte mit Hilfe von Zelllinien mit ausschlaggebenden genetischen Änderungen im DISC-Signalweg soweit erhärtet werden, dass der intrinsische Weg in der APC-induzierten Apoptose gleichrangig zum extrinsischen sein kann.

Die Hauptfunktion der Mitochondrien besteht selbstverständlich in der Energieproduktion - sie repräsentieren die Kraftwerke der Zellen. Daher ist die Anzahl an Mitochondrien grob von der benötigten Energie der entsprechenden Zelle abhängig (Szewczyk *et al.*, 2002). Durchschnittlich wurden in Parenchymzellen bis zu 1312 Mitochondrien pro Zelle detektiert, was etwa 17% des zellulären Volumens entspricht (Loud, 1968). Neben ihrer „klassischen“ Aufgabe der Energieproduktion sind Mitochondrien aber auch in weiteren Mechanismen involviert, wie etwa bei der Apoptose. Ein frühes Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes wird durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) beschrieben, unter anderem konnte dies auch bei der Behandlung leukämischer Zellen mit Et-18-OCH₃ beobachtet werden (Gajate *et al.*, 2000b; Marzo *et al.*, 2001; Kamp *et al.*, 2002; Budinger *et al.*, 2002).

5.3.1 Der Verlust des MMP geht ohne die Freisetzung von ROS einher

Die Behandlung verschiedener Jurkat und BJAB Zelllinien mit S-NC-2 induzierte ebenfalls einen frühzeitig erkennbaren Verlust des MMP (Abb. 62 & 63). Allerdings war S-NC-2 nicht in der Lage, in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Zellen eine Reduktion des Membranpotenzials zu induzieren. Dieser Schutz durch die Bcl-2 Überexpression steht im Einklang mit den Daten aus der Literatur. Es wurde gezeigt, dass Typ II Zellen durch eine Hemmung der mitochondrialen Amplifizierungsschleife nicht mehr dazu in der Lage sind, eine ausreichende Menge an Caspasen zu aktivieren, um den apoptotischen Zelltod zu vollziehen (Scaffidi *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999). Demnach demonstriert der Schutz durch Bcl-2 eine starke Abhängigkeit der S-NC-2 induzierten Apoptose von den Mitochondrien, zumindest in Typ II Jurkat Zellen. Dies konnte auf Ebene der Proteine bestätigt werden, da in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Zellen weder eine Aktivierung von Caspasen, noch die Spaltung von PARP beobachtet wurde. Ebenfalls war auch kein Abbau der zellulären DNA zu detektieren. Für einen Vergleich zwischen Typ I und II wurden zusätzlich die SKW6.4 Zellen gewählt. Auch bei dieser Zelllinie stand eine Kontroll-Transfektante sowie eine Bcl-2 überexprimierende Variante zur Verfügung. Wäre die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran der Haupteffekt der S-NC-2-induzierten Apoptose, so müsste, unabhängig vom Zelltyp, die Überexpression dieses anti-apoptotischen Proteins immer zu einer

Hemmung der Apoptose führen. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Obwohl in Bcl-2 überexprimierenden Zellen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie Neo, etwa die doppelte Konzentration an S-NC-2 für die Spaltung der Initiator- und Effektor-Caspasen benötigt wurde, konnte jedoch keine vollständige Reduktion der Apoptose in diesen Zellen festgestellt werden. Zwar deuteten die Ergebnisse wiederum auf eine starke Beteiligung der Mitochondrien in diesem Signalweg, allerdings zeigte sich auch die Wichtigkeit der Todesrezeptoren, durch deren Aktivierung der mitochondriale Signalweg teilweise umgangen werden konnte.

Eine wachsende Zahl an Daten deutet auf eine mögliche Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während des programmierten Zelltods (Fleury *et al.*, 2002). Experimente mit Antioxidantien zeigten, dass ROS stromaufwärts von MMP, Bax Translokation, Cytochrom c Freisetzung, der Aktivierung von Effektor-Caspasen und nuklearer Fragmentierung gelegen ist. Weiterhin wird angenommen, dass ROS für Konformationsänderungen in pro-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-X_L verantwortlich sein könnte (Herrera *et al.*, 2001; Fleury *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde eine Beeinflussung der Caspasen-Aktivierung durch ROS beschrieben, da eine alleinige Stimulation von ROS Caspasen aktivieren könnte. Wie jedoch diese zellulären Ereignisse in die CD95 vermittelte Apoptose eingegliedert werden können, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend unklar. Zusätzlich erbrachten neuere Daten, dass ROS für die Bildung des Apoptosoms in Jurkat Zellen eine wichtige Rolle spielen könnte (Sato *et al.*, 2004). Allerdings konnte während der S-NC-2 induzierten Apoptose keine Bildung von ROS beobachtet werden. Dies war auch nicht nach einem sehr langen Inkubationszeitraum von 10 bis 24 Stunden möglich. ROS spielen in diesem Zusammenhang der Apoptose also keine Rolle.

5.3.2 Die Rolle von Bid während des apoptotischen Signalwegs

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte die Beteiligung der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 sowie die Teilnahme der Mitochondrien am S-NC-2 induzierten Zelltod unabhängig voneinander demonstriert werden. Da beide Angriffspunkte räumlich getrennt voneinander in der Zelle vorliegen, wurde nach einer möglichen Verbindung dieser beiden Signalwege gesucht. Ein wichtiges, bereits gut in der Literatur dokumentiertes Verbindungsprotein stellt das *BH3-only* Protein Bid (p22) und dessen aktive Form tBid (p15) dar. Bid war eines der ersten entdeckten Mitglieder der *BH3-only* Proteine und wurde ursprünglich als Bindungspartner von Bax und Bcl-2 identifiziert (Wang *et al.*, 1996; Esposti, 2002). Die aktive Form von Bid ist in der Lage, eine Konformationsänderung des Proteins Bax zu induzieren, welches dadurch mit einem weiteren Protein namens Bak Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bildet und somit zur Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen, wie z. B. Cytochrom c führt (Zinkel *et al.*, 2003). Bid kann von Caspase-8, Granzym B, Cathepsinen und Calpain geschnitten sowie die

Konformationsänderung und/oder die Oligomerisierung von Bax und tBid durch Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden (Heibein *et al.*, 2000). Das geschnittene Bid transloziert zu den Mitochondrien, indem es das mitochondriale Lipid Cardiolipin ansteuert. Die Aminosäuren 103-162 von Bid wurden als Cardiolipid-Bindungsdomäne identifiziert (Lutter *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004).

Auch im Zusammenhang der S-NC-2 induzierten Apoptose konnte eine Spaltung des p22 Bid beobachtet werden. Diese erfolgte zwar in jeder der untersuchten Zellen, jedoch war das Ausmaß der Bid-Spaltung von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich (Abb. 67 & 68). Ein leichter Rückgang der Bid-Spaltung konnte in FADDdn BJAB sowie in Caspase-8 defizienten Jurkat Zellen beobachtet werden. Da in beiden Fällen eine sehr eingeschränkte Aktivierung der Caspase-8 für die Spaltung von Bid zur Verfügung steht, deutet dies auf einen weiteren Mitspieler in dieser Signalkaskade, der ebenfalls zur proteolytischen Spaltung von Bid beitragen kann. Hierbei könnten lysosomale Proteasen, insbesondere Cathepsin B, eine Rolle spielen. Cathepsin B wurde, neben Caspase-8 und Granzym B, als weiterer Aktivator von Bid beschrieben (Gross *et al.*, 1999; Heibein *et al.*, 2000).

Nur Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen demonstrierten eine deutliche Hemmung der Bid-Spaltung. Bid wurde unter anderem als Bindungspartner von Bcl-2 identifiziert. Ebenso konnte die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins die Bid-induzierte Freisetzung von Cytochrom c verhindern (Bernardi *et al.*, 1999). Es erweist sich häufig als schwierig, eine prä-mitochondriale Spaltung von Bid durch Caspase-8 von der Apoptosom-unterstützten Caspase-Kaskade zu unterscheiden. Diese findet nach der Freisetzung von Cytochrom c statt und erweist sich als katalytisch viel stärker im Vergleich zu Caspase-8 (Esposti, 2002). Daher wäre es denkbar, dass das übermäßig vorhandene Bcl-2 schnell die geringe Menge an gespaltenem Bid, hervorgerufen durch die katalytisch schwächere Caspase-8, neutralisiert, die Freisetzung von Cytochrom c unterbindet und dadurch die Bildung einer effizienten Menge an Bid verhindert. Da Bcl-2 auch bereits auf weiteren zellulären Membranen in der Zelle detektiert werden konnte, unter anderem auf dem endoplasmatischen Retikulum oder auf der nuklearen Membran (Korsmeyer *et al.*, 2000), wäre es möglich, dass die Überexpression dieses Proteins zu einer großflächigen Verteilung von Bcl-2 in den gesamten zellulären Membranen führt. Dabei könnte sich Bcl-2 auch in der Plasmamembran oder in der lysosomalen Membran einlagern und somit die pro-apoptotische Funktion von Bid unterbinden.

Wäre die Spaltung von Bid ausschließlich ein Caspase-abhängiger Prozess, so sollte die Vorbehandlung der Zellen mit spezifischen Caspase-Inhibitoren zu einem Schutz der S-NC-2-induzierten MMP führen. Es konnte beobachtet werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk zum größten Teil zu einer starken Hemmung des Verlusts von MMP führt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden spezifische Caspase-Inhibitoren eingesetzt, um möglicherweise die Rettung des MMP einer bestimmten Caspase zuzuordnen. In

Abb. 64 zeigte sich deutlich, dass durch die Hemmung der Caspase-9 (z-LEHD-fmk) eine Reduktion des MMP um ca. 40% in Jurkat und über 50% in BJAB erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu führten die Inhibitoren der Caspase-8, -10, -3 und -2 zu keinen großen Veränderungen. Möglicherweise geht dieser Effekt auf die Hemmung der Apoptosom-unterstützten Aktivierung der Caspase-Kaskade zurück. Wie zuvor beschrieben, zeigt die prä-mitochondriale Bid-Spaltung durch Caspase-8 eine wesentlich geringere katalytische Aktivität, als die über den mitochondrialen Amplifizierungszyklus induzierte Caspase-Aktivierung (Esposti, 2002). Dieser Vorgang verläuft in Abhängigkeit der Caspase-9 und könnte somit durch die Behandlung der Zellen mit z-LEHD-fmk stark beeinträchtigt werden. Da jedoch keine vollständige Hemmung beobachtet wurde, deutet dieses Ergebnis auf eine mögliche Beteiligung weiterer Partner bei der Spaltung von Bid.

Auch der Caspase-2 wird eine denkbare Rolle bei der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran zugeschrieben (Robertson *et al.*, 2002a; Enoksson *et al.*, 2004). Die Gruppe um Gores beschrieb in diesem Zusammenhang eine durch TNF- α induzierte, Bid-abhängige Aktivierung der Caspase-2, die über die Freisetzung lysosomaler Proteine wie Cathepsin B vermittelte wird (Guicciardi *et al.*, 2005). Die aktive Caspase-2 wandert zu den Mitochondrien und führt dort zur Freisetzung von Cytochrom c. Das Ergebnis des Caspase-Assays deutete auf eine sehr frühe und starke Aktivierung dieser Caspase hin. Daher wäre es denkbar, dass Caspase-2 ebenfalls bei der S-NC-2 induzierten mitochondrialen Membranpermeabilisierung beteiligt ist. Allerdings konnte durch die spezifische Hemmung mit z-VDVAD-fmk keine deutliche Verminderung des MMP-Verlusts beobachtet werden. Demnach kann vermutet werden, dass ebenso weitere Faktoren in diesem Prozess der Permeabilisierung beteiligt sind.

Zusätzlich zu seiner Funktion bei der Apoptose besitzt Bid auch eine Lipid-Transferase Funktion, was diesem Protein ebenfalls eine mögliche Rolle bei der dynamischen Umstrukturierung intrazellulärer Membranen einräumt (Liu *et al.*, 2004). Die Gruppe um Esposti wies eine Anreicherung von Lysophospholipiden während des apoptotischen Prozesses in Mitochondrien nach. Weiterhin konnte für das ungeschnittene Protein Bid eine neue Funktion dargelegt werden: es ist dazu in der Lage, spezifische Lysophospholipide in die Membranoberfläche der Mitochondrien einzulagern – dies ist ein möglicher Auslöser für die Freisetzung der pro-apoptotischen Proteine (Goonasinghe *et al.*, 2005).

Auch für S-NC-2 könnte ein direkter Effekt auf die Mitochondrien postuliert werden. Nach erfolgter Aufnahme in die Zellen wäre eine intrazelluläre Umverteilung dieses Lipids denkbar, was in einer eventuellen Anreicherung in den Mitochondrien resultieren würde. S-NC-2 könnte dadurch, ähnlich wie bei *Lipid Rafts* in der Zellmembran, eine Reorganisation der mitochondrialen Oberfläche hervorrufen, dadurch eine Ausbildung von Poren in der Membran induzieren (z. B. mittels der mitochondrialen Permeabilitätspore) und somit selbst zur Freisetzung der intermembranen

Proteine beitragen. Da es sich bei S-NC-2 ebenfalls um einen Abkömmling der Lysophospholipide handelt, könnte Bid für eine eventuelle Translokation von S-NC-2 in die Mitochondrien verantwortlich sein.

5.3.3 Die Freisetzung von Cytochrom c und Smac/DIABLO

Die Prozessierung von Bid, mit nachfolgender Aktivierung von Bax und Bak, führt zur Permeabilisierung der Membran und zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Eines dieser Proteine ist Cytochrom c, welches nach dem Einwandern ins Zytoplasma einen Komplex mit Apaf-1, der Pro-Caspase-9 und dATP bildet - das Apoptosom.

Die Behandlung von Jurkat und BJAB Zellen mit 20 μ M S-NC-2 führte ebenfalls zu einer Freisetzung des pro-apoptotischen Moleküls Cytochrom c (Abb. 70 & 71). Dies erfolgte in einem geringen Ausmaß bereits nach 4 Stunden, wurde aber mit steigender Inkubationszeit immer deutlicher. Nach 6 Stunden erreichte die Freisetzung ihr Maximum und war mit der Bandenintensität der Etoposide-Positivkontrolle vergleichbar.

Cytochrom c liegt nicht als lösliches Protein im Intermembranraum vor sondern ist an die innere mitochondriale Membran gebunden. Für die Freisetzung dieses pro-apoptotischen Moleküls wird ein 2-Schritt Mechanismus postuliert. Hierbei spielt ein spezielles Lipid, das Cardiolipin, eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um ein anionisches Phospholipid, das hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, nur in der inneren Membran der Mitochondrien vorkommt (McMillin *et al.*, 2002). Die Dissoziation von Cytochrom c und Cardiolipin stellt den ersten kritischen Schritt für die Freisetzung von Cytochrom c dar (Orrenius, 2004). Hierbei wurde die Peroxidation von Cardiolipin als möglicher Grund für die Freisetzung von Cytochrom c postuliert (Petrosillo *et al.*, 2001). Da jedoch keine Freisetzung reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies bei der Behandlung mit S-NC-2 detektiert werden konnte, kann dieser Schritt nur eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Die Gruppe um Lee zeigte auf, dass die Cardiolipin-Bindungsdomäne (CBD) des Bid-Proteins die Bindung von Cardiolipin und Cytochrom c beeinflusst und somit die Freisetzung des Proteins einleitet. Daher besitzt die CBD nicht nur die Funktion, Bid an die Mitochondrien zu leiten, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von Cytochrom c. Eine weitere Funktion von CBD ist die Bildung eines tertiären Komplexes aus Cardiolipin, tBid und Bax, da Cardiolipin für die Bildung des Cytochrom c Kanals verantwortlich ist. Hierbei interagiert tBid mit Bax durch seine BH3-Domäne und mit Cardiolipin mittels CBD (Liu *et al.*, 2004). Allerdings gibt es noch eine Vielzahl anderer Faktoren, welche die Interaktion zwischen Cardiolipin und Cytochrom c beeinflussen: z. B. die Plasmakonzentration an freien Fettsäuren, Ca^{2+} -Fehlregulation und reaktive Sauerstoffspezies (Iverson *et al.*, 2004).

Da die Aktivierung des Proteins Bid während der S-NC-2 induzierten Apoptose aufgezeigt werden konnte, liegt es nahe, dieses Protein auch mit der S-NC-2 induzierten Freisetzung von Cytochrom c in Verbindung zu bringen. Hierbei könnte die Aktivierung von Bid eine in der Literatur beschriebene Konformationsänderung von Bax und Bak induzieren (Scorrano *et al.*, 2003b). Die Aktivierung von Bax involviert die Translokation zu den Mitochondrien sowie die Integration in die mitochondriale Membran. Bak liegt bereits als integrales Protein in der äußeren Mitochondrienmembran vor (Suzuki *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003). Eine Aktivierung von Bax und Bak resultiert in der Bildung eines hoch geordneten homo-oligomeren Komplexes innerhalb der mitochondrialen Membran.

Wie können jedoch Bax und Bak die äußere Membran der Mitochondrien permeabilisieren? Die ersten Hinweise ergaben sich durch genauere Untersuchungen der Proteinstruktur. Diese zeigten eine deutlich Übereinstimmung mit den Poren-bildenden Domänen bakterieller Toxine (Adams *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). Das einfachste Modell wäre daher, dass *BH3-only* Proteine, wie z. B. Bid, eine allosterische Konformationsänderung in Bax/Bak induzieren, somit die Oligomerisierung dieser Proteine auslösen und dadurch die Bildung einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran hervorrufen. Die Gruppe um Newmeyer konnte zeigen, dass t-Bid und Bax (oder oligomerisiertes Bax allein) supramolekulare Öffnungen in Liposomen hervorrufen können, welche Moleküle bis zu einer Größe von 2 MDa passieren ließen (Kuwana *et al.*, 2002). Interessanterweise wies die Bildung dieser Poren eine Abhängigkeit von dem mitochondrialen Lipid Cardiolipin auf, welches an der inneren Membran sowie an Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran angereichert ist. Allerdings deuten eine Vielzahl weiterer Ergebnisse darauf hin, dass die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran nicht ausschließlich auf die Porenbildung von Bax/Bak zurückzuführen ist (Breckenridge *et al.*, 2004). Die Zeitfenster der freigesetzten pro-apoptotischen Proteine zeigen Variationen auf und scheinen von weiteren Faktoren abhängig zu sein.

Dies konnte auch in der S-NC-2-induzierten Freisetzung mitochondrialer Proteine beobachtet werden, da Smac/DIABLO bereits nach 1 – 2 Stunden im Zytoplasma gefunden wurde, während eine Freisetzung von Cytochrom c erst nach einem Zeitraum von 4 Stunden statt fand (siehe Abb. 70 & 71).

Ferner wurde beobachtet, dass Mitochondrien vor der Freisetzung von Cytochrom c morphologische Veränderungen durchlaufen, wie etwa eine Umstrukturierung der Cristea und Veränderungen in der Membranstruktur (Scorrano *et al.*, 2002). Auch eine gesteuerte transiente Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore wäre denkbar. Bis heute konnte die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum nicht bis ins Detail aufgeklärt werden und bleibt somit ein Gegenstand der aktuellen Forschung.

5.3.4 Lysosomen als Verstärker der Apoptose?

Im Verlauf der Untersuchung des S-NC-2 induzierten apoptotischen Zelltods konnten erste Hinweise auf eine Beteiligung der Lysosomen erbracht werden. Die Behandlung der Zellen mit 20 µM S-NC-2 bewirkte einen Verlust der lysosomalen Membranintegrität. Dies konnte anhand von Färbungen mit Acridine Orange untersucht werden, da der Farbstoff in den Lysosomen akkumuliert und durch eine mögliche Permeabilisierung der Membran ins Zytoplasma freigesetzt wird. Somit ist es möglich, den zeitabhängigen Verlust der Rotfluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu bestimmen (Abb. 74 & 75). Nach 3 – 4-stündiger Inkubation mit 20 µM S-NC-2 erfolgte ein deutlicher Verlust der lysosomalen Rotfluoreszenz. Dieser schien in Jurkat Neo bzw. BJAB Wildtypzellen besonders stark ausgeprägt zu sein. Die Untersuchung genetisch veränderter Zelllinien demonstrierte einen vollkommenen Schutz bei Bcl-2 Überexpression (Jurkat) sowie eine starke Reduktion der lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP) in FADDdn BJAB Zellen.

Die Permeabilisierung der lysosomalen Membran wurde in jüngster Zeit mit Mitgliedern der Bcl-2 Familie in Verbindung gebracht. Eine Behandlung der Zellen mit Staurosporine führte zur Translokation von Bax zu den Lysosomen. Dies wurde mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen aufgezeigt. Zusätzlich konnte eine Co-Lokalisation von Bax mit Lysosomen bzw. Mitochondrien beobachtet werden. Weiterhin war es möglich, eine Einlagerung von rekombinanten Bax in die lysosomale Membran sowie die daraus resultierende Freisetzung von lysosomalen Enzymen zu demonstrieren (Kagedal *et al.*, 2005).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wäre es denkbar, dass die S-NC-2-induzierte tBid-Spaltung zur Aktivierung von Bax und dessen Translokation zu den Lysosomen führt. Wäre dies der Fall, so müsste die Aktivierung der Lysosomen unterhalb der Bid-Prozessierung angelagert werden. Bid wird im mitochondrialen Signalweg als treibende Kraft für die Aktivierung von Bax beschrieben. Wird nun die proteolytische Aktivierung von Bid durch das anti-apoptotische Protein Bcl-2 oder, im Fall der FADDdn BJAB Zellen durch ineffektive Caspase-8-Aktivierung gehemmt, so kann keine Konformationsänderung in Bax erfolgen und dadurch keine Permeabilisierung der lysosomalen/mitochondrialen Membran induziert werden. Dies könnte auch die stark verminderte Reduktion des LMP in Jurkat Bcl-2 bzw. FADDdn BJAB erklären.

Im Verlauf der LMP wurde zusätzlich die Freisetzung des lysosomalen Proteins Cathepsin B beobachtet (Abb. 76). Diese erfolgte sowohl in Jurkat als auch in BJAB Zellen bereits innerhalb der ersten drei Stunden der S-NC-2 Behandlung. Eine mögliche Verbindung zwischen dem klassischen, Rezeptor-vermittelten Signalweg der Apoptose und der lysosomalen Destabilisierung wurde bereits von weiteren Gruppen beschrieben (Guicciardi *et al.*, 2000; Guicciardi *et al.*, 2005). Hierbei resultiert die Aktivierung des CD95-Rezeptors in einer Aktivierung der Caspase-8, dadurch erfolgt eine lysosomale Permeabilisierung und somit die Freisetzung von Cathepsin B.

Cathepsin B ist in der Lage, das pro-apoptotische Protein Bid zu schneiden, welches die Freisetzung von Cytochrom c und wiederum eine Verbindung zu den Mitochondrien ermöglicht (Ferri *et al.*, 2001; Brunk *et al.*, 2001; Boya *et al.*, 2003; Jaattela *et al.*, 2003; Jaattela *et al.*, 2004).

5.3.5 Das endoplasmatische Retikulum – ein weiterer Mitspieler?

Auch das endoplasmatische Retikulum (ER) erfährt immer mehr Aufmerksamkeit im apoptotischen Signalweg, obwohl dieses Organell meist mit Stress-induzierter Apoptose in Verbindung gebracht wird (Rutkowski *et al.*, 2004). Hierbei spielt nicht nur die Freisetzung von Ca^{2+} eine wichtige Rolle sondern auch eine ER-spezifische Caspase, die Caspase-12 (Mehmet, 2000; Nakagawa *et al.*, 2000b). Caspase-12 ist *in vitro* dazu in der Lage, Caspase-9 unabhängig von Cytochrom c und Apaf-1 zu aktivieren. Weiterhin deuten manche der Daten an, dass Ca^{2+} für die Aktivierung der Caspase-12 verantwortlich sei, da die Spaltung dieser Caspase wahrscheinlich über das Ca^{2+} -abhängige Protein Calpain bewerkstelligt wird (Nakagawa *et al.*, 2000a). Da es im Fall der S-NC-2 induzierten Apoptose nicht möglich war, eine definitive Freisetzung von Ca^{2+} zu detektieren, sollte eine mögliche Beteiligung von Ca^{2+} bzw. des ERs indirekt durch die Aktivierung der Caspase-12 untersucht werden. Die Spaltung der Pro-Caspase-12 konnte in beinahe allen untersuchten Zellen demonstriert werden, nur die resistente Zelllinie K562 sowie Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen zeigten keine Reduktion der Pro-Caspase (Abb. 77). Dies deutet eventuell auf eine Beteiligung von Ca^{2+} in der S-NC-2 induzierten Apoptose. Die Verbindung mit dem bisherigen Signalweg könnte wiederum über Mitglieder der Bcl-2-Familie aufgebaut werden, da Proteine wie Bax, Bak und Bcl-2 bereits auf dem ER entdeckt wurden (Oakes *et al.*, 2003). Dort führen sie zu einer gezielten Beeinflussung der Ca^{2+} -Homeostase und könnten für eine Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien verantwortlich sein. Es wurde bereits demonstriert, dass die Anreicherung von Ca^{2+} in den Mitochondrien zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore und somit zur Freisetzung pro-apoptotischer Proteine beitragen kann (Scorrano *et al.*, 2003b; Carvalho *et al.*, 2005).

Ob jedoch die Caspase-12 durch Ca^{2+} -abhängige Proteine gespalten wird, und dadurch ihr, bzw. einer denkbaren Freisetzung von Ca^{2+} eine Rolle bei der S-NC-2 induzierten Apoptose zugeschrieben werden kann, bleibt ein möglicher Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

5.4 Resistenz primärer Blutzellen und Reduktion der Zytotoxizität durch LPC

Eine wichtige Eigenschaft der APC-Verbindungen beschreibt ihre Selektivität – entartete Zellen sind empfänglich für die Einleitung des programmierten Zelltodes sowie die anti-neoplastische

Aktivität, während primäre Zellen (normale Knochenmarkszellen, hämatopoetische Vorläuferzellen, periphere Blutlymphozyten sowie Neutrophile) nicht beeinträchtigt sind. Dies konnte auch für die Apoptose-induzierende Wirkung von S-NC-2 gezeigt werden.

Die Behandlung peripherer Blutzellen führte weder zu einer Aufnahme des Lipids [¹⁴C]-R-NC-2, noch konnte eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung beobachtet werden. Die Inkubation der Zellen induzierte auch keine apoptotischen Ereignisse, dargestellt durch das Ausbleiben der Spaltung des apoptotischen Markerproteins PARP. Die Zellen waren resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von S-NC-2, selbst bei einer sehr hohen Konzentration von 50 µM S-NC-2. Im Vergleich dazu zeigten sich die in dieser Arbeit verwendeten leukämischen Zelllinien bei gleicher Konzentration als hoch sensibel. Konzentrationen von 10 – 20 µM waren hierbei schon ausreichend, um nach 16-stündiger Inkubation eine sehr starke Beeinträchtigung der Zellen zu beobachten.

Die Selektivität lässt sich möglicherweise auf das unterschiedliche Wachstumsverhalten der entarteten (sehr schnelles Wachstum) und der normalen Zellen (langsames Wachstum) zurückführen. Durch ein intensives Wachstum wird sehr schnell und viel Material für den Aufbau von Zellmembranen benötigt. Da Lysophospholipide eine bevorzugte Quelle zum Aufbau weiterer Phospholipide darstellen, wird durch deren starke Aufnahme auch eine große Menge der angebotenen APC aufgenommen (Eibl *et al.*, 1987). Dadurch akkumulieren Krebszellen, im Vergleich zu normalen Zellen, eine enorme Menge dieser Lipide, die zur kritischen Konzentration angehäuft werden und letztendlich zum Tod der Zelle führen.

Eine Möglichkeit, die zytotoxischen Effekte zu vermindern, besteht in der parallelen Verabreichung von LPC (Boggs *et al.*, 1995b).

Bereits 10 µM S-NC-2 zeigten in Annexin-PI-Färbungen einen relativ hohen Anteil nekrotischer Zellen. Durch eine parallele Verabreichung von LPC wurde versucht, die zytotoxischen Nebeneffekte zu reduzieren, welche zum Teil auf die Hemmung der Synthese von Phosphatidylcholin (PC) zurückgeführt werden. So erfolgte, im Hinblick auf die Möglichkeit, dass eine exogene Verabreichung von LPC die zytotoxische Wirkung von S-NC-2 herabsetzt, eine gleichzeitige Behandlung mit S-NC-2 und LPC. Tatsächlich konnte dadurch die Anzahl vitaler Zellen deutlich erhöht werden, wobei der Anteil apoptotischer Zellen nicht reduziert wurde (Abb. 82). Dieser Effekt wurde bereits für weitere synthetische Phospholipid-Verbindungen beschrieben, wie z. B. HePC. In diesem Fall konnte die Hemmung der induzierten Apoptose ebenfalls durch eine exogene Zugabe von LPC beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde auf die allgemeine Zunahme der Phospholipid-Masse zurückgeführt, die für eine Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Proliferation benötigt wird (Boggs *et al.*, 1995a). LPC liefert somit einen alternativen Weg für die Phosphocholin-Synthese durch die Acylierung von exogenem LPC (Boggs *et al.*, 1998).

5.5 Zeitlicher Ablauf der S-NC-2 induzierten Apoptose

Der zeitliche Ablauf der S-NC-2 induzierten Apoptose ist in Abb. 84 dargestellt.

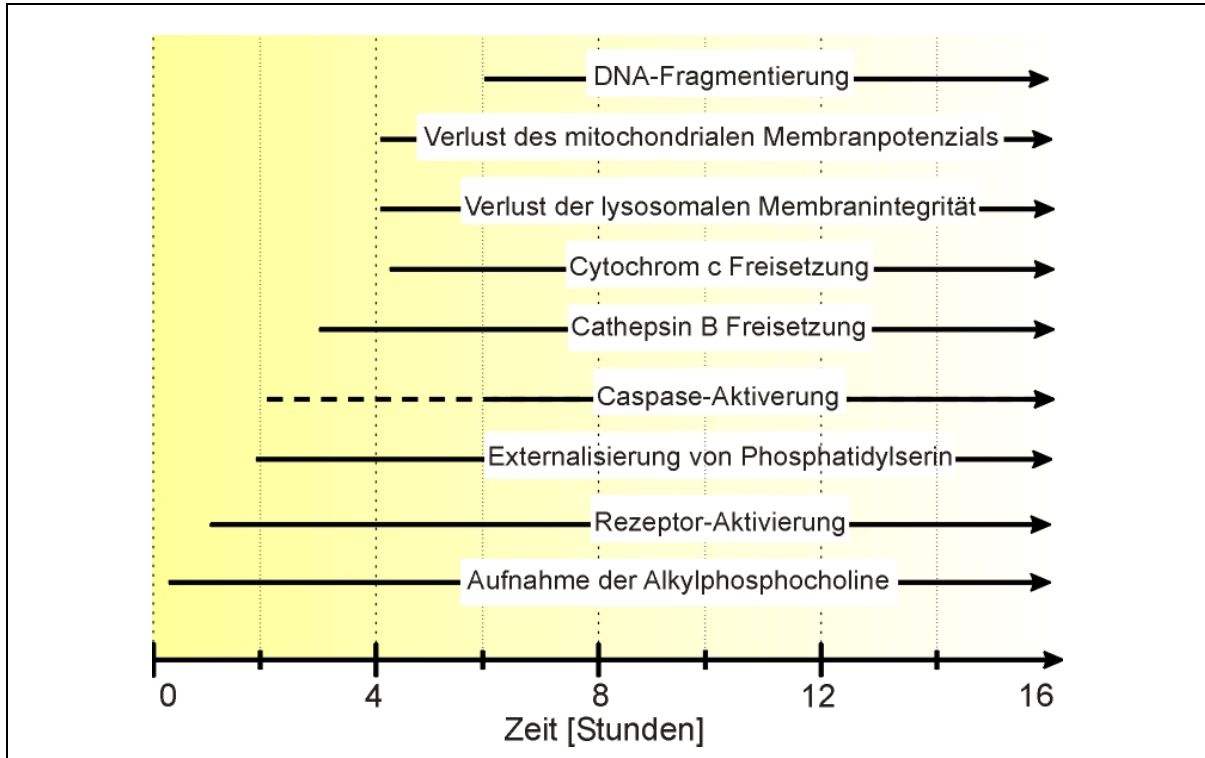


Abb. 84: Zeitlicher Verlauf der S-NC-2 induzierten Apoptose

Damit die entartete Zelle sterben kann, muss zuerst das synthetische Phospholipid selektiv in die jeweiligen Krebszellen aufgenommen werden. Dieser Prozess konnte bereits nach 10 Minuten beobachtet werden. Mit der Aufnahme des Lipids kann nach etwa 1 Stunde die Aktivierung der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R2 in Form eines *Clusterings* der Rezeptormoleküle beobachtet werden. Weiterhin erfolgt die Bildung des DISC und die Einlagerung in *Lipid Rafts*. Die ersten frühen Marker der Apoptose läuten den programmierten Zelltod ein. Nach etwa 1 - 2 Stunden wurde ein sehr leichter Anstieg der Zellen mit externalisiertem Phosphatidylserin deutlich. Dies war auch der Zeitraum, in dem die Aktivierung der Caspasen-2 und -3 in Jurkat Zellen gemessen werden konnte. In BJAB Zellen erfolgte diese etwas später und wurde erst nach ca. 6 Stunden Inkubation deutlich. Kurz nach Aktivierung der Caspasen erfolgte die messbare Freisetzung des lysosomalen Proteins Cathepsin B. Ein wenig später konnten die mitochondrialen Proteine Cytochrom c und Smac/DIABLO im Zytoplasma beobachtet werden. Die Freisetzung ging mit dem Verlust der Membranintegrität der entsprechenden Zellorganellen einher. Am Ende, kurz bevor die meisten Zellen endgültig ihre äußere Form verloren und ein starkes „Blebbing“ der Membran aufzeigten, erfolgte der internukleosomale Abbau der DNA sowie die Fragmentierung des Zellkerns.

5.6 Möglicher Verlauf der S-NC-2-induzierten Apoptose: eine Arbeitshypothese

Der mögliche Verlauf der S-NC-2 induzierten Apoptose wurde in Abb. 85 zusammenfassend dargestellt. Die Eingliederung der folgenden Punkte sind in der Abbildung verzeichnet.

- I. Zur Initiation der Apoptose muss das synthetische Phospholipid S-NC-2 zunächst von der Zelle aufgenommen werden. Aufgrund der schlechten Substrateigenschaft dieses Lipids besitzt es eine hohe Halbwertszeit und reichert sich dadurch in der Zellmembran an. Hierbei erfolgt eine Reorganisation spezieller Mikrodomänen in der Plasmamembran (*Lipid Rafts*), die zu einer Zusammenlagerung der CD95-Todesrezeptoren führen. Es erfolgt die Rekrutierung der DISC-Komponenten an die *Lipid Rafts* sowie eine mögliche Anlagerung von weiteren Proteinen, wie z. B. Bid und Caspase-3.
- II. Die Aktivierung der Todesrezeptoren führt zur Initiation der Caspase-Kaskade, die in der Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und möglicherweise -10 sowie letztendlich in den Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 resultiert.
- III. Durch die Aktivierung von Caspase-8 kommt es zur proteolytischen Spaltung des pro-apoptotischen Proteins Bid zu tBid. Dies wandert zu den Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung des pro-apoptotischen Proteins Cytochrom c aus dem Intermembranraum.
Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran erfolgt möglicherweise über die Aktivierung von Bax und Bak. In diesem Zusammenhang werden auch weitere pro-apoptotische Proteine wie z. B. Smac/DIABLO freigesetzt.
- IV. Die Freisetzung von Cytochrom c induziert die Komplexbildung mit Apaf-1, dATP und der Pro-Caspase-9. Das sog. Apoptosom führt zur Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9, welche wiederum weitere Effektor-Caspasen aktiviert und somit einen Verstärkungs-Effekt hervorruft.
S-NC-2 könnte auch einen direkten Effekt auf die mitochondriale Membranpermeabilisierung ausüben. Durch eventuell existierende Mikrodomänen in der mitochondrialen Membran wäre es möglich, dass die Einlagerung des APCs zu einer Umstrukturierung führt und dadurch eine eventuelle transiente Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore auslöst.
- V. Die Permeabilisierung der lysosomalen Membran könnte durch die Aktivierung von Bid und Bax und der daraus resultierenden Porenbildung zustande kommen. Ebenso wäre auch die mögliche Einlagerung des S-NC-2 und einer daraus resultierenden Umstrukturierung der Membran denkbar. Durch den lytischen Charakter des Lipids könnte somit eine direkten Permeabilisierung der Membran ausgelöst werden.

Die Lysosomen befinden sich in der Signalkette unterhalb der Bid-Spaltung und üben somit möglicherweise eher einen verstärkenden Effekt als einen Apoptose-induzierenden Mechanismus aus.

- VI. Durch die Permeabilisierung der Lysosomen, möglicherweise durch tBid, kommt es zur Freisetzung des lysosomalen Proteins Cathepsin B. Cathepsin B ist in der Lage, das proapoptotische Protein Bid zu tBid zu spalten und dadurch eine Verstärkungsschleife zu initiieren, da geschnittenes tBid wiederum eine stärkere Permeabilisierung der Lysosomen hervorrufen kann.
- VII. Die Freisetzung der Cathepsine kann auch die Aktivierung der Caspase-2 induzieren, welche in ihrem aktiven Zustand zum einen weitere Caspasen in der Kaskade aktivieren und zum anderen bei der Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine beteiligt sein kann (Guicciardi *et al.*, 2005).

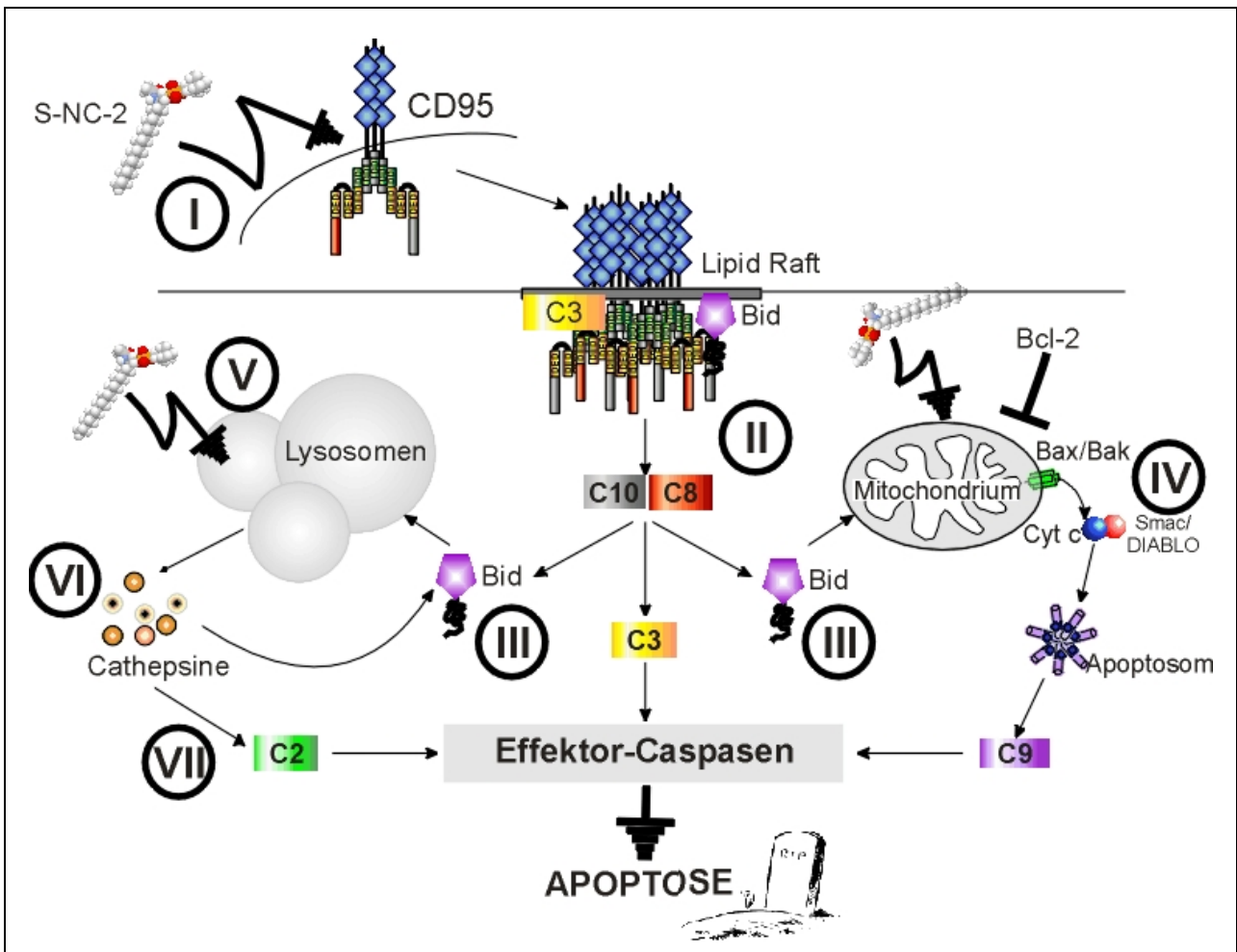


Abb. 85: Aktuelle Arbeitshypothese

Die Beschreibung der einzelnen Schritte in der S-NC-2 induzierten Apoptose sind im vorangehenden Text genauer erläutert (C: Caspase).

Alkylphosphocholine, insbesondere das S-NC-2, können demnach durch einen Multi-Induktions-Prozess sowohl in Typ I als auch in Typ II Zellen den programmierten Zelltod auslösen. Darin sind die Plasmamembran mit Todesrezeptoren, die lysosomale Membran und eine Cathepsin-Freisetzung sowie die mitochondriale Membran und deren Permeabilisierung beteiligt. Welcher dieser Prozesse am Beginn der Signalkaskade steht, bleibt allerdings offen. Auch die Tatsache, dass der Mechanismus der Apoptose-Induktion ebenfalls vom Zelltyp abhängig zu sein scheint, und die unterschiedlichen Möglichkeiten der Apoptose-Initiierung, bietet ein breites Spektrum für die Anwendung der APC in einer Vielzahl verschiedener Tumorerkrankungen.

6 L I T E R A T U R

- Adams J.M. & Cory S.** (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Algeciras-Schimmich A., Shen L., Barnhart B.C., Murmann A.E., Burkhardt J.K. & Peter M.E.** (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol.Cell Biol.* 22, 207-220.
- Andresen R.** (1988). Ether lipids in the therapy of cancer. *Prog.Biochem.Pharmacol.* 22, 118-131.
- Andresen R., Modolell M., Oepke G.H., Common H., Lohr G.W. & Munder P.G.** (1982). Studies on various parameters influencing leukemic cell destruction by alkyl-lysophospholipids. *Anticancer Res.* 2, 95-100.
- Andresen R., Modolell M., Weltzien H.U. & Munder P.G.** (1979). Alkyl-lysophospholipid induced suppression of human lymphocyte response to mitogens and selektive killing of lymphoblasts. *Immunobiol.* 156, 498-508.
- Aouad S.M., Cohen L.Y., Sharif-Askari E., Haddad E.K., Alam A. & Sekaly R.P.** (2004). Caspase-3 is a component of Fas death-inducing signaling complex in lipid rafts and its activity is required for complete caspase-8 activation during Fas-mediated cell death. *J.Immunol.* 172, 2316-2323.
- Arnold B., Reuther R. & Weltzien H.U.** (1978). Distribution and metabolism of synthetic alkyl-analogs of lysophosphatidylcholine in mice. *Biochim.Biophys.Acta* 530, 55.
- Arthur G. & Bittman R.** (1998). The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim.Biophys.Acta* 1390, 85-102.
- Ashkenazi A. & Dixit V.M.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Ayllon V., Cayla X., Garcia A., Fleischer A. & Rebollo A.** (2002). Segregation of Bad from lipid rafts is involved in the induction of apoptosis. *J.Immunol.* 168, 3387-3393.
- Baliga B.C., Read S.H. & Kumar S.** (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death.Differ.* 11, 1234-1241.
- Bazill G.W. & Dexter T.M.** (1990). Role of endozytosis in the action of ether lipids on WEHI-3B, HL-60, and FDCP-mix A4 cells. *Cancer Res.* 50, 7505-7512.
- Belka C. & Budach W.** (2002). Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int.J.Radiat.Biol.* 78, 643-658.
- Ben-Ari Z., Mor E., Azarov D., Sulkes J.R.T., Cheporko Y., Hochhauser E. & Pappo O.** (2005). Cathepsin B inactivation attenuates the apoptotic injury induced by ischemia/reperfusion of mouse liver. *Apoptosis* 10, 1261-1269.
- Berdel W.E., Fink U. & Rastetter J.** (1987). Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative Et-18-OCH₃. *Lipids* 22, 967-969.
- Berdel W.E. & Okamoto S.** (1990). Ether lipids in cancer chemotherapy. *Keio J.Med.* 39, 75-78.
- Berg C.P., Rothbart A., Lauber K., Stein G.M., Engels I.H., Belka C., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K. & Wesselborg S.** (2003). Tributyltin (TBT) induces ultra-rapid caspase activation independent of apoptosome formation in human platelets. *Oncogene* 22, 775-780.
- Berger M.R., Betsch B., Gebelein M., Amtmann E., Heyl P. & Scherf H.R.** (1993a). Hexadecylphosphocholine differs from conventional cytostatic agents. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 119, 541-548.
- Berger M.R. & Reich S.** (1993b). The bone marrow stimulatory activity of the antineoplastic agent hexadecylphosphocholine is abrogated by acetylcholine receptor blockade. *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* 34, 335.
- Berkovic D., Bensch M., Bertram J., Wille T., Haase D., Binder C. & Flier E.A.** (2001). Effects of hexadecylphosphocholine on thrombocytopoiesis. *Eur.J.Cancer* 37, 503-511.

- Berkovic D., Grundel O., Berkovic K., Wildfang I., Hess C.F. & Schmoll H.J.** (1997). Synergistic cytotoxic effect of ether phospholipid analogues and ionizing radiation in human carcinoma cells. *Radiother. Oncol.* 43, 293-301.
- Berkovic D., Sievers S., Haase D., Fleer E.A. & Binder C.** (2002). Effects of hexadecylphosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylserine metabolism in human lymphoma cells. *J.Exp.Ther.Oncol.* 2, 85-92.
- Berman J.** (2005). Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert.Opin.Pharmacother.* 6, 1381-1388.
- Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V. & Di Lisa F.** (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur.J.Biochem.* 264, 687-701.
- Bligh E.G. & Dyer W.J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol* 37, 911-917.
- Bodmer J.L., Holler N., Reynard S., Vinciguerra P., Schneider P., Juo P., Blenis J. & Tschopp J.** (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat.Cell Biol.* 2, 241-243.
- Boeryd B., Hallgren B. & Ställberg G.** (1971). Studies on the effect of methoxy-substituted glycerol ethers on tumour growth and metastasis formation. *Br.J.exp.Path.* LII, 221-230.
- Boggs K.P., Rock C.O. & Jackowski S.** (1998). The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim.Biophys.Acta* 1389, 1-12.
- Boggs K.P., Rock C.O. & Jackowski S.** (1995a). Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase step. *J.Biol.Chem.* 13, 7757-7764.
- Boggs K.P., Rock C.O. & Jackowski S.** (1995b). Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *J.Biol.Chem.* 19, 11612-11618.
- Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N., Perfettini J.-L., Metivier D., Ojcius D.M., Jaattela M. & Kroemer G.** (2003). Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondria-dependent fashion. *J.Exp.Med.* 197, 1323-1334.
- Boyce M., Degterev A. & Yuan J.** (2004). Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death.Differ.* 11, 29-37.
- Breckenridge D.G. & Xue D.** (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16, 647-652.
- Brohult A., Brohult J. & Brohult S.** (1970). Biochemical effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy. *Acta Chem.Scand.* 24, 730.
- Brown D.A. & London E.** (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 14, 111-136.
- Brudzy K., Munder P.G., Fischer H. & Westphal O.** (1967). Steigerung der Phagozytose von Peritonealmakrophagen durch Lysolecithin. *Z Naturforsch* 196, 1118-1120.
- Brunk U.T., Neuzil J. & Eaton J.W.** (2001). Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox.Rep.* 6, 91-97.
- Budinger G.R., Tso M., McClintock D.S., Dean D.A., Sznajder J.I. & Chandel N.S.** (2002). Hyperoxia-induced apoptosis does not require mitochondrial reactive oxygen species and is regulated by Bcl-2 proteins. *J.Biol.Chem.* 277, 15654-15660.
- Bursch W.** (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8, 569-581.
- Cain K., Bratton S.B. & Cohen G.M.** (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.
- Carvalho A.C., Sharpe J., Rosenstock T.R., Teles A.F., Kowaltowski A.J., Youle R.J. & Smaili S.S.** (2005). Bax affects intracellular Ca(2+) stores and induces Ca(2+) wave propagation. *Cell Death.Differ.* 12, 105.

- Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T.A., March C.J., Kronheim S.R., Druck T., Cannizzaro L.A., Huebner K. & Black R.A.** (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.
- Chamberlain L.H.** (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett.* 559, 1-5.
- Chen M. & Wang J.** (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis.* 7, 313-319.
- Cheng E.H.Y., Sheiko T.V., Fisher J.K., Craigen W.J. & Korsmeyer S.J.** (2003). VDAC2 inhibits Bak activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301, 513-517.
- Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E. & Dixit V.M.** (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 271, 4961-4965.
- Cikala M., Wilm B., Hobmayer E., Bottger A. & David C.N.** (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol.* 9, 959-962.
- Clive S., Gardiner J. & Leonard R.C.** (1999). Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 44 Suppl, S29-S30.
- Cremesti A., Paris F., Grassme H., Holler N., Tschopp J., Fuks Z., Gulbins E. & Kolesnick R.** (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *J.Biol.Chem.* 276, 23954-23961.
- Croft S.L., Seifert K. & Duchene M.** (2003). Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol.Biochem.Parasitol.* 126, 165-172.
- Crompton M.** (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem.J.* 341, 233-249.
- Crul M., Rosing H., de Klerk G.J., Dubbelman R., Traiser M., Reichert S., Knebel N.G., Schellens J.H., Beijnen J.H. & Bokkel Huinink W.W.** (2002). Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur.J.Cancer* 38, 1615-1621.
- de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Duxtrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., eMeur M., Malzinger C., Chambon P. & de Murcia G.** (1997). Requirement of poly(ADP-ribose)polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 7303-7307.
- Demopoulos C.A., Pinckard R.N. & Hanahan D.J.** (1979). Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J.Biol.Chem.* 254, 9355-9358.
- Diaz C. & Schroit A.J.** (1996). Role of translocases in the generation of phospholipid asymmetry. *J.Membrane Biol.* 151, 1-9.
- Du C., Fang M., Li Y. & Wang X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Eibl H., Hill E.E. & Lands W.E.M.** (1969). The subcellular distribution of acyltransferases which catalyze the synthesis of phospholipids. *Eur.J.Biochem.* 9, 250-258.
- Eibl H. & Unger C.** (1987). Phospholipide als Antitumormittel: Möglichkeit einer selektiven Therapie. *Aktuelle Onkologie* 34, 1-18.
- Eibl H. & Unger C.** (1990). Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat.Rev.* 17, 233-242.
- Eibl K.H., Banas B., Kook D., Ohlmann A.V., Priglinger A.K. & Welge-Luessen U.C.** (2004). Alkylphosphocholines: A new therapeutic option in glaucoma filtration surgery. *IOVS* 45, 2619-2624.
- Enoksson M., Robertson J.D., Gogvadze V., Bu P., Kropotov A., Zhivotovsky B. & Orrenius S.** (2004). Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J.Biol.Chem.* 279, 49575-49578.

- Erdlenbruch B., Jendrossek V., Gerriets A., Vetterlein F., Eibl H. & Lakomek M.** (1999). Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 44, 484-490.
- Ergezinger K., Vehmeyer K. & Unger C.** (1999). Stimulation of human hematopoietic progenitor cells by the alkylphosphocholines hexadecylphosphocholine and hexadecyl-N,N,N-trimethyl-hexanolamine. *Anticancer Res.* 19, 3213-3219.
- Esposti M.D.** (2002). The roles of Bid. *Apoptosis.* 7, 433-440.
- Fehrenbacher N. & Jaattela M.** (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 65, 2993-2995.
- Ferri K.F. & Kroemer G.** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat.Cell Biol.* 3, E255-E263.
- Fleer E.A., Berkovic D., Eibl H. & Unger C.** (1993). Investigations on the cellular uptake of hexadecylphosphocholine. *Lipids* 28, 731-736.
- Fleer E.A., Unger C., Kim D.J. & Eibl H.** (1987). Metabolism of ether phospholipids and analogs in neoplastic cells. *Lipids* 22, 856-861.
- Fleury C., Mignotte B. & Vayssiere J.L.** (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.
- Friesen C., Herr I., Krammer P.H. & Debatin K.-M.** (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas)receptor/ligand system in drug induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med.* 2, 574-577.
- Froelich-Ammon S.J. & Osheroff N.** (1995). Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J.Biol.Chem.* 270, 21429-21432.
- Gajate C., Canto-Janez E., Acuna A.U., Amat-Guerri F., Geijo E., Santos-Beneit A.M., Veldman R.J. & Mollinedo F.** (2004). Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J.Exp.Med.* 200, 353-365.
- Gajate C., Fonteriz R.I., Cabaner C., Alvarez-Noves G., Alvarez-Rodriguez Y., Modolell M. & Mollinedo F.** (2000a). Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int.J.Cancer* 85, 674-682.
- Gajate C. & Mollinedo F.** (2001). The antitumor ether lipid Et-18-OCH₃ induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98, 3860-3863.
- Gajate C. & Mollinedo F.** (2002). Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr.Drug Metab* 3, 491-525.
- Gajate C., Santos-Beneit A.M., Macho A., Lazaro M., Hernandez-De Rojas A., Modolell M., Munoz E. & Mollinedo F.** (2000b). Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int.J.Cancer* 86, 208-218.
- Gajkowska B., Motyl T., Oleszewska-Badarczuk H. & Godlewski M.M.** (2001). Expression of Bax in cell nucleus after experimentally induced apoptosis revealed by immunogold and embedment-free electron microscopy. *Cell Biol Int.* 25, 725-733.
- Garcia A., Cayla X., Fleischer A., Guergnon J., Alvarez-Franco C.F., Rebollo M.P., Roncal F. & Rebollo A.** (2003). Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie* 85, 727-731.
- Garcia-Calvo M., Peterson E.P., Leiting B., Ruel R., Nicholson D.W. & Thornberry N.A.** (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J.Biol.Chem.* 273, 32608-32613.
- Gleiss B., Gogvadze V., Orrenius S. & Fadeel B.** (2002). Fas-triggered phosphatidylserin exposure is modulated by intracellular ATP. *FEBS Letters* 519, 153-158.
- Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I. & Green D.R.** (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat.Cell Biol.* 2, 156-162.

- Goonesinghe A., Mundy E.S., Smith M., Khosravi-Far R., Martinou J.C. & Esposti M.D.** (2005). Pro-apoptotic Bid induces membrane perturbation by inserting selected lysolipids into the bilayer. *Biochem.J.* 387, 109-118.
- Gottlieb E., Vander Heiden M.G. & Thompson C.B.** (2000). Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20, 5680-5689.
- Gross A., Yin X.M., Wang K., Wei M.C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. & Korsmeyer S.J.** (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J.Biol.Chem.* 274, 1156-1163.
- Guicciardi M.E., Bronk S.F., Werneburg N.W., Yin X.-M. & Gores G.J.** (2005). Bid is upstream of lysosome-mediated caspase-2 activation in tumor necrosis factor α -induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology* 129, 269-284.
- Guicciardi M.E., Deussing J.D. & Miyoshi H.** (2000). Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J.Clin.Invest.* 106, 1127-1137.
- Gulbins E. & Kolesnick R.** (2003). Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 22, 7070-7077.
- Gultekin H. & Heermann K.H.** (1988). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal.Biochem.* 172, 320-329.
- Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C., Parcellier A., Hammann A., Daugas E., Kouranti I., Spahr C., Pance A., Kroemer G. & Garrido C.** (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22, 6669-6678.
- Hanson P.K., Malone L., Birchmore J.L. & Nichols J.W.** (2003). Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J.Biol.Chem.* 278, 36041-36050.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P. & Simons K.** (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol.* 141, 929-942.
- Heerklotz H.** (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys.J.* 83, 2693-2701.
- Heesbeen E.C., Verdonck L.F., Hermans S.W., van Heugten H.G., Staal G.E. & Rijksen G.** (1991). Alkyllysophospholipid ET-18-OCH₃ acts as an activator of protein kinase C in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 290, 231-234.
- Heibein J.A., Goping I.S., Barry M., Pinkoski M.J., Shore G.C., Green D.R. & Bleackley R.C.** (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J.Exp.Med.* 192, 1391-1402.
- Hengartner M.O.** (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Herrera B., Alvarez A.M., Sanchez A., Fernandez M., Roncero C., Benito M. & Fabregat I.** (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.* 15, 741-751.
- Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B. & Tschopp J.** (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat.Immunol.* 1, 489-495.
- Iverson S.L. & Orrenius S.** (2004). The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch.Biochem.Biophys.* 423, 37-46.
- Jaattela M., Cande C. & Kroemer G.** (2004). Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death.Differ.* 11, 135-136.
- Jaattela M. & Tschopp J.** (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature Immunol.* 4, 416-423.
- Jendrossek V., Erdlenbruch B., Hunold A., Kugler W., Eibl H. & Lakomek M.** (1999). Erucylphosphocholine, a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines in vitro. *Int.J.Oncol.* 14, 15-22.
- Jendrossek V., Hammersen K., Erdlenbruch B., Kugler W., Krugener R., Eibl H. & Lakomek M.** (2002). Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 50, 71-79.

- Jendrossek V., Muller I., Eibl H. & Belka C.** (2003). Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 2621-2631.
- Jimenez-Lopez J.M., Carrasco M.P., Segovia J.L. & Marco C.** (2002). Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur.J.Biochem.* 269, 4649-4655.
- Juo P., Kuo C.J., Yuan J. & Blenis J.** (1998). Essential requirement of caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.* 8, 1001-1008.
- Juo P., Woo M.S., Kuo C.J., Signorelli P., Biemann H.P., Hannun Y.A. & Blenis J.** (1999). FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ.* 10, 797-804.
- Kagedal K., Johansson A.C., Johansson U., Heimlich G., Roberg K., Wang N.S., Jurgensmeier J.M. & Ollinger K.** (2005). Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis -- involvement of Bax? *Int.J.Exp.Pathol.* 86, 309-321.
- Kamp D.W., Panduri V., Weitzman S.A. & Chandel N.** (2002). Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis: role of mitochondrial dysfunction caused by iron-derived free radicals. *Mol.Cell Biochem.* 234-235, 153-160.
- Kaufmann S.H.** (1998). Cell death induces by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1400, 195-211.
- Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E. & Poirier G.G.** (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985.
- Keilin D.** (1925). On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants. *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 98, 312-339.
- Kent C.** (1990). Regulation of phosphocholine biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 29, 87-105.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. & Currie A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.
- Kilkus J., Goswami R., Testai F.D. & Dawson G.** (2003). Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines. *J.Neurosci.Res.* 72, 65-75.
- King M.T., Eckardt K., Gocke E., Wild D. & Berdel W.E.** (1981). Failure to detect mutagenic effects of antitumor alkyllysophospholipids. *Cancer Lett.* 12, 217-222.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D. & Ashkenazi A.** (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J.Biol.Chem.* 276, 46639-46646.
- Konstantinov S.M. & Berger M.R.** (1999). Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines. *Cancer Lett.* 144, 153-160.
- Konstantinov S.M., Kaminsky R., Brun R., Berger M.R. & Zillmann U.** (1997). Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in *Trypanosoma brucei* subspecies. *Acta Trop.* 64, 145-154.
- Konstantinov S.M., Topashka-Ancheva M., Benner A. & Berger M.R.** (1998). Alkylphosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. *Int.J.Cancer* 77, 778-786.
- Korsmeyer S.J., Wei M.C., Saito M., Weiler S., Oh K.J. & Schlesinger P.H.** (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death.Differ.* 7, 1166-1173.
- Kötting J., Fleer E.A.M., Unger C. & Eibl H.** (1988). Synthetische Alkylphospholipide als Antitumormittel-Strukturverwandte des "platelet activating factors". *Fat Sci.Technol.* 9, 345-351.
- Kötting J., Marschner N.W., Neumuhler W., Unger C. & Eibl H.** (1992). Hexadecylphosphocholine and octadecylmethyl-glycero-3-phosphocholine: A comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. Alkylphosphocholines: New drugs in cancer therapy. *Prog.Exp.Tumor Res.* 34, 131-142.
- Kroemer G. & Reed J.C.** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat.Med.* 6, 513-519.

- Krohn A.J., Wahlbrink T. & Prehn H.M.** (1999). Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J.Neurosci.* 19, 7394-7404.
- Krug H.F. & Massing U.** (2002). Neue Wege in der Tumorthherapie: synthetische Lipide als "Todessignale". *Biospektrum* 2, 164-165.
- Krug H.F., Oberle C., Matzke A. & Massing U.** (2003). The antiproliferative alkylphospholipid S-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecane (S-NC-2) induces apoptosis in leukemia cell lines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1010, 335-338.
- Kumar S. & Vaux D.L.** (2002). A cinderella caspase takes center stage. *Science* 297, 1290-1291.
- Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R. & Newmeyer D.D.** (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
- Kypta R.M., Hemming A. & Courtneidge S.A.** (1988). Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7, 3837-3844.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamparska-Przybysz M., Gajkowska B. & Motyl T.** (2005). Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *J.Physiol.Pharmacol.* 56, 159-179.
- Landowski T.H., Shain K.H., Oshiro M.M., Buyuksal I., Painter J.S. & Dalton W.S.** (1999). Myeloma cells selected for resistance to CD95-mediated apoptosis are not cross-resistant to cytotoxic drugs: evidence for independent mechanisms of caspase activation. *Blood* 94, 265-274.
- Lands W.E.M.** (1960). Metabolism of glycerolipids. II. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J.Biol.Chem.* 235, 2233-2237.
- Lavrik I., Golks A. & Krammer P.H.** (2005a). Death receptor signaling. *J.Cell Sci.* 118, 265-267.
- Lavrik I., Golks A. & Krammer P.H.** (2005b). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J.Clin.Invest.* 115, 2665-2672.
- Lavrik I., Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Weyd H., Krammer P.H. & Kirchhoff S.** (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death.Differ.* 10, 144-145.
- Leverrier Y. & Ridley A.J.** (2001). Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat.Cell Biol.* 3, E91-E93.
- Levine B. & Yuan J.** (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J.Clin.Invest.* 115, 2679-2688.
- Li G., Samadder P., Arthur G. & Bittman R.** (2003). Synthesis and antiproliferative properties of photoactivatable analogue of Et-18-OCH₃. *Tetrahedron* 57, 8925-8932.
- Li L.Y., Luo X. & Wang X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. & Wang X.** (1997). Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lisanti M.P., Tang Z., Scherer P.E. & Sargiacomo M.** (1995). Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. *Methods Enzymol.* 250, 655-668.
- Liu J., Weiss A., Durrant D., Chi N.W. & Lee R.M.** (2004). The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome c release. *Apoptosis.* 9, 533-541.
- Los M., Stroh C., Janicke R.U., Engels I.H. & Schulze-Osthoff K.** (2001). Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* 22, 31-34.
- Loud A.V.** (1968). A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol.* 37, 27-46.

- Lozzio C.B. & Lozzio B.B.** (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosomes. *Blood* 45, 321-334.
- Lutter M., Perkins G.A. & Wang X.** (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.* 2, 22.
- Marzo I., Perez-Galan P., Giraldo P., Rubio-Felix D., Anel A. & Naval J.** (2001). Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem.J.* 359, 537-546.
- Massey J.B.** (2001). Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochim.Biophys.Acta* 1510, 167-184.
- Massing U. & Eibl H.** (1994). Synthesis of enantiomerically pure 1-O-phosphocholine-2-O-acyl-octadecane and 1-O-phosphocholine-2-N-acyl-octadecane. *Chem.Phys.Lipids* 69, 105-120.
- Matzke A.** (1999). Alkylphosphocholine - eine neue Klasse von Antitumormitteln: Untersuchungen zum biochemischen Wirkungsmechanismus. *Thesis/Dissertation* .
- Matzke A., Massing U. & Krug H.F.** (2001). Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95. *Eur.J.Cell Biol.* 80, 1-10.
- McGill G. & Fisher D.E.** (1997). Apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy. *Frontiers in Bioscience* 2, 353-379.
- McMillin J.B. & Dowhan W.** (2002). Cardiolipin and apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 97-107.
- Mehmet H.** (2000). Caspases find a new place to hide. *Nature* 403, 29-30.
- Milhas D., Cuvillier O., Therville N., Clave P., Thomsen M., Levade T., Benoist H. & Segui B.** (2005). Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 280, 19836-29842.
- Mills K.R., Reginato M., Debnath J., Queenan B. & Brugge J.S.** (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 3438-3443.
- Modolell M., Andreesen R., Brugger U., Pahlke W. & Munder P.G.** (1979). Disturbance of phospholipid metabolism during selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids. *Cancer Res.* 39, 4681-4686.
- Mollinedo F., Fernandez-Luna J.L., Gajate C., Martin-Martin B., Benito A., Martinez-Dalmau R. & Modolell M.** (1997). Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res.* 57, 1320-1328.
- Mollinedo F., Gajate C., Martin-Santamaria S. & Gago F.** (2004). ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr.Med.Chem.* 11, 3163-3184.
- Mosmann J.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* 65, 55-63.
- Munker R. & Andreeff M.** (1996). Induction of death-(CD95/FAS), activation- and adhesion- (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-(infinity) and IFN- γ . *Cytokines Mol Ther* 2, 147-150.
- Munker R., Marini F., Jiang S., Savary C., Owen-Schaub L. & Andreeff M.** (1997). Expression of CD95(Fas) by gene transfer does not sensitize K562 to Fas-killing. *Hematol Cell Ther* 39, 75-78.
- Nakagawa T. & Yuan J.** (2000a). Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J.Cell Biol.* 150, 887-894.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A. & Yuan J.** (2000b). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403, 98-103.
- Ng P.W., Porter A.G. & Janicke R.U.** (1999). Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10. *J.Biol.Chem.* 274, 10301-10308.

- Nutt L.K., Chandra J., Pataer A., Fang B., Roth J.A., Swisher S.G., O'Neil R.G. & McConkey D.J.** (2002). Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J.Biol.Chem.* 277, 20301-20308.
- Oakes S.A., Opferman J.T., Pozzan T., Korsmeyer S.J. & Scorrano L.** (2003). Regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem.Pharmacol.* 66, 1335-1340.
- Oberle C., Massing U. & Krug H.F.** (2005). On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. *Biol.Chem.* 386, 237-245.
- Orrenius S.** (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol.Lett.* 149, 19-23.
- Papoff G., Hausler P., Eramo A., Pagano M.G., Di Leve G., Signore A. & Ruberti G.** (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J.Biol.Chem.* 274, 38241-38250.
- Penninger J.M. & Kroemer G.** (2003). Mitochondria, AIF and caspases - rivaling for cell death execution. *Nat.Cell Biol.* 5, 97-99.
- Pérez-Victoria F.J., Gamarro F., Ouellette M. & Castanys S.** (2003). Functional cloning of the mitofosine transporter. *J.Biol.Chem.* 278, 49965-49971.
- Peter M.E. & Krammer P.H.** (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.* 10, 26-35.
- Petrosillo G., Ruggiero F.M., Pistolesse M. & Paradies G.** (2001). Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis. *FEBS Lett.* 509, 435-438.
- Pronk L.C., Planting A.S., Oosterom R., Drogendijk T.E., Stoter G. & Verweij J.** (1994). Increases in leucocyte and platelet counts induced by the alkyl phospholipid hexadecylphosphocholine. *Europ.J.Cancer* 30A, 1019-1022.
- Ray S., Ponnathpur V., Huang Y., Tang C., Mahoney M.E., Ibrado A.M., Bullock G. & Bhalla K.** (1994). 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone-, and paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells: improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 34, 365-371.
- Ricci J.E., Gottlieb R.A. & Green D.R.** (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J.Cell Biol.* 160, 65-75.
- Robertson J.D., Enoksson M., Suomela M., Zhivotovsky B. & Orrenius S.** (2002a). Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 277, 29803-29809.
- Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B. & Orrenius S.** (2000). Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J.Biol.Chem.* 275, 32438-32443.
- Robertson J.D. & Orrenius S.** (2002b). Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology* 181-182, 491-496.
- Ruiter G.A., Verheij M., Zerp S.F. & van Blitterswijk W.J.** (2001). Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 49, 415-419.
- Ruiter G.A., Zerp S.F., Bartelink H., van Blitterswijk W.J. & Verheij M.** (1999). Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 2457-2463.
- Ruiter G.A., Zerp S.F., Bartelink H., van Blitterswijk W.J. & Verheij M.** (2003). Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* 14, 167-173.
- Rutkowski D.T. & Kaufman R.J.** (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14, 20-28.
- Salvesen G.S. & Dixit V.M.** (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 10964-10967.
- Santa-Rita R.M., Santos B.H., Meirelles M.N. & de Castro S.L.** (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 75, 219-228.

- Sato T., Machida T., Takahashi S., Iyama S., Sato Y., Kuribayashi K., Takada K., Oku T., Kawano Y., Okamoto T., Takimoto R., Matsunaga T., Takayama T., Takahashi M., Kato J. & Niitsu Y.** (2004). Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J.Immunol.* 173, 285-296.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H. & Peter M.E.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Scaffidi C., Medema J.P., Krammer P.H. & Peter M.E.** (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J.Biol.Chem.* 272, 26953-26958.
- Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., Korsmeyer S.J., Krammer P.H. & Peter M.E.** (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J.Biol.Chem.* 274, 22532-22538.
- Scheel-Toellner D., Wang K., Singh R., Majeed S., Raza K., Curnow S.J., Salmin M. & Lord J.M.** (2002). The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 297, 876-879.
- Schmidt-Ott R., Klenner T., Overath P. & Aebischer T.** (1999). Topical treatment with hexadecylphosphocholine (MilteX) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 93, 85-90.
- Schoen A. & Freire E.** (1989). Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside G_{M1}. *Biochemistry* 28, 5019-5024.
- Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A. & Korsmeyer S.J.** (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev.Cell* 2, 55-67.
- Scorrano L. & Korsmeyer S.J.** (2003a). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 304, 437-444.
- Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T. & Korsmeyer S.J.** (2003b). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.
- Seifert K., Duchene M., Wernsdorfer W.H., Kollaritsch H., Scheiner O., Wiedermann G., Hottkowitz T. & Eibl H.** (2001). Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45, 1505-1510.
- Siegel R.M., Chan F.K., Chun H.J. & Lenardo M.J.** (2000a). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat.Immunol.* 1, 469-474.
- Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y. & Lenardo M.J.** (2000b). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Simons K. & Ikonen E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Small G.W., Strum J.C. & Daniel L.W.** (1997). Characterization of an HL-60 cell variant resistant to the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Lipids* 32, 715-723.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150, 76-85.
- Smorenburg C.H., Seynaeve C., Bontenbal M., Planting A.S., Sindermann H. & Verweij J.** (2000). Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs* 11, 825-828.
- Snyder F.** (1972). Ether lipids. Chemistry and biology. *Academic Press*, New York.
- Soodsma J.F., Piantadosi C. & Snyder F.** (1970). The biocleavage of alkyl glyceryl ethers in Morris hepatomas and other transplantable neoplasms. *Cancer Res.* 30, 309-311.

- Sprick M.R., Rieser E., Stahl H., Grosse-Wilde A., Weigand M.A. & Walczak H.** (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21, 4520-4530.
- Sprick M.R., Weigand M.A., Rieser E., Rauch C.T., Juo P., Blenis J., Krammer P.H. & Walczak H.** (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 12, 599-609.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M. & Kroemer G.** (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki M., Youle R.J. & Tjandra N.** (2000). Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.
- Szabo I., Adams C. & Gulbins E.** (2004). Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflugers Arch.* 448, 304-312.
- Szewczyk A. & Wojtczak L.** (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol.Rev.* 54, 101-127.
- Terrones O., Antonsson B., Yamaguchi H., Wang H.G., Liu J., Lee R.M., Herrmann A. & Basanez G.** (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J.Biol.Chem.* 279, 30081-30091.
- Terwogt J.M.M., Mandjes I.A.M., Sindermann H., Beijnen J.H. & ten Bokkel Huinink W.W.** (1999). Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. *Br.J.Cancer* 79, 1158-1161.
- Thornberry N.A. & Lazebnik Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Touchstone J.C., Levin S.S., Dobbins M.F. & Carter P.J.** (1981). Differentiation of saturated phospholipids on thin layer chromatograms. *J.HRC & CC* 4, 423-424.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76, 4350-4354.
- Tsujimoto Y.** (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J.Cell Physiol* 195, 158-167.
- Unger C., Damenz W., Fleer E.A., Kim D.J., Breiser A., Hilgard P., Engel J., Nagel G. & Eibl H.** (1989). Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncol.* 28, 213-217.
- Unger C., Eibl H., Breiser A., von Heyden H.W., Engel J., Hilgard P., Sindermann H., Peukert M. & Nagel G.A.** (1988). Hexadecylphosphocholine (D 18506) in the topical treatment of skin metastases: a phase-I trial. *Onkologie* 11, 295-296.
- Unger C., Eibl H., van Heyden H.W. & Nagel G.A.** (1984). Reversible opening of the blood-brain-barrier for drug transfer by short chain alkyl glycerols. *Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.* 3, 25.
- Unger C., Peukert M., Sindermann H., Hilgard P., Nagel G. & Eibl H.** (1990). Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Cancer Treat.Rev.* 17, 243-246.
- van Blitterswijk W.J., Hilkmann H. & Storme G.A.** (1987). Accumulation of an alkyl lysophospholipis in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion. *Lipids* 22, 820-823.
- van Blitterswijk W.J., van der Luit A.H., Veldman R.J., Verheij M. & Borst J.** (2003). Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem.J.* 369, 199-211.
- van Gurp M., Festjens N., van Loo G., Saelens X. & Vandenabeele P.** (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 304, 487-497.
- Vehmeier K., Eibl H. & Unger C.** (1992). Hexadecylphosphocholine stimulates the colony-stimulating factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells. *Exp.Hematol.* 20, 1-5.
- Vehmeier K., Scheurich P., Eibl H. & Unger C.** (1991). Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. *Cell.Immunol.* 137, 232-238.

- Vogler W.R. & Berdel W.E.** (1993). Autologous bone marrow transplantation with alkyl-lysophospholipid-purged marrow. *J.Hematother.* 2, 93-102.
- Vogt C.** (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothum, Schweiz: *Jent & Gassmann*.
- Walochnik J., Duchene M., Seifert K., Obwaller A., Hottkowitz T., Wiedermann G., Eibl H. & Aspöck H.** (2002). Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob.Agents Chemother.* 46, 695-701.
- Wang J., Chun H.J., Wong W., Spencer D.M. & Lenardo M.J.** (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 13884-13888.
- Wang K., Yin X.M., Chao D.T., Milliman C.L. & Korsmeyer S.J.** (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Dev.* 10, 2859-2869.
- Wolf A.A., Fujinaga Y. & Lencer W.I.** (2002a). Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J.Biol.Chem.* 277, 16249-16256.
- Wolf B.B. & Green D.R.** (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J.Biol.Chem.* 274, 20049-20052.
- Wolf B.B. & Green D.R.** (2002b). Apoptosis: letting slip the dogs of war. *Curr.Biol.* 12, R177-R179.
- Yin L., Stearns R. & Gonzalez-Flecha B.** (2005). Lysosomal and mitochondrial pathways in H₂O₂-induced apoptosis of alveolar type II cells. *J.Cell Biochem.* 94, 433-445.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M. & Horvitz H.R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zaucke F., Zöltzer H. & Krug H.F.** (1998). Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds. *Fresenius J Anal Chem* 361, 386-392.
- Zimmermann K.C., Bonzon C. & Green D.R.** (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol.Ther.* 92, 57-70.
- Zinkel S.S., Ong C.C., Ferguson D.O., Iwasaki H., Akashi K., Bronson R.T., Kutok J.L., Alt F.W. & Korsmeyer S.J.** (2003). Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev.* 17, 229-239.
- Zwaal R.F., Comfurius P. & Bevers E.M.** (2005). Surface exposure of phosphatidylserin in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62, 971-988.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Alkylphosphocholin(e)
ALP	Alkyl-Lysophospholipid(e)
AMC	7-amino-4-methyl Coumarin
AO	Acridine Orange
Apaf-1	<i>apoptosis activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchonininsäure
BH	<i>Bcl-2 homology domain</i>
Bid	<i>BH3-interacting death agonist</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CBD	Cardiolipin-Bindungsdomäne
CytOX	Cytochrom c Oxidase
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>death effector domain</i>)
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DIC	digitaler Interferenzkontrast (<i>digital interference contrast</i>)
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced Chemiluminescence</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Et-18-OCH ₃	1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FADD	<i>fas associated death domain</i>
FasL/CD95L	Fas/CD95 Ligand
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS (-hi)	fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
HePC	Hexadecylphosphocholin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse reddish peroxidase</i>)

IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IP	Immunpräzipitation
LD ₅₀	halbmaximale letale Dosis
LMP	lysosomale Membranpermeabilisation
LPC	Lysophosphaditylcholin
MBS	MES-gepufferte Kochsalzlösung (<i>MES-buffered saline</i>)
MES	Morpholinoethane sulfonic acid
MMP	mitochondriale Membranpermeabilisation
MPP	mitochondriale Permeabilitätspore
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diophenyl-Tetrazoliumbromid
NP-40	Nonylphenyl-polyethylene glycol (Igepal CA-630)
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Propidiumiodid
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R/S-NC-2	R/S-1-O-Phosphocholin-2-N-acetyl-octan
ROS	reactive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
tBid	truncated Bid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminester
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAIL-R2	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-2</i>
WT	Wildtyp
z-AEVD-fmk	z-Ala-Glu-Val-Asp-fluormethylketon
z-IETD-fmk	z-Ile-Glu-Thr-Asp-fluormethylketon
z-LEHD-fmk	z-Leu-Glu-His-Asp-fluormethylketon
z-LETD-fmk	z-Leu-Phe-Thr-Asp-fluormethylketon

z-VAD-fmk z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon
z-VDVAD-fmk z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1: Prototypen und die wichtigsten Vertreter der synthetischen Lipide	9
Abb. 2: Strukturen der neuen enantiomerenreinen APC.....	11
Abb. 3: C. elegans als Modellsystem des apoptotischen Signalwegs	15
Abb. 4: Schematische Darstellung des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes.....	16
Abb. 5: Schematische Darstellung des DISC der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R1/-R2.....	18
Abb. 6: Schematische Darstellung der Caspase-Familie	20
Abb. 7: Darstellung der möglichen Mechanismen der Caspase-Aktivierung	21
Abb. 8: Aufbau des Mitochondriums.....	23
Abb. 9: Zusammenfassung der pro-apoptotischen, mitochondrialen Proteine	24
Abb. 10: Mitglieder der Bcl-2 Familie.....	26
Abb. 11: Darstellung einer möglichen Beteiligung von Lysosomen und ER während der Apoptose.....	28
Abb. 12: Bildaufnahmen der Jurkat A3 Zellkulturen	33
Abb. 13: Jurkat Neo und Bcl-2 Zellkultur	34
Abb. 14: Die BJAB Zellen	35
Abb. 15: SKW Zellen	36
Abb. 16: Prinzip der Lymphozytenisolierung	39
Abb. 17: Reaktion der Formazan-Bildung	41
Abb. 18: Proteinbestimmung	42
Abb. 19: Schematische Darstellung der Filmentwicklung	47
Abb. 20: Bestimmung der lysosomalen Membranintegrität.....	51
Abb. 21: Prinzip der Caspase-Aktivitäts Messung	54
Abb. 22: Schematische Darstellung der Zytosolisolierung	56
Abb. 23: APC beeinflussen das Wachstum von HL-60 und K562 Zellen.....	65
Abb. 24: S-NC-2 induziert morphologische Veränderungen in HeLa Zellen.....	66
Abb. 25: Elektronenmikroskopische Beobachtung von Jurkat Zellen	67
Abb. 26: Aufnahme von [¹⁴ C]-R-NC-2 in unterschiedlichen leukämischen Zelllinien.....	69
Abb. 27: Lipidstandards.....	70
Abb. 28: Darstellung einer typischen Lipidverteilung in unterschiedlichen Zelllinien	71
Abb. 29: Untersuchungen zum Stoffwechsel von [¹⁴ C]-R-NC-2.....	72
Abb. 30: Suramin führt nicht zur Aufnahmemhemmung von [¹⁴ C]-R-NC-2 in Jurkat und BJAB Zellen	73
Abb. 31: Schematische Darstellung der Annexin-V/PI-Färbung	75
Abb. 32: Externalisierung von Phosphatidylserin	76
Abb. 33: Darstellung einer Punktwolken-Analyse der Annexin V – PI Messung.....	77
Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse der Annexin V – PI Färbung.....	79
Abb. 35: Spaltung der Initiator-Caspase-8.	80
Abb. 36: Aktivierung der intrinsischen Initiator-Caspase-9 durch S-NC-2	82

Abb. 37: S-NC-2 induziert die Spaltung von Effektor-Caspasen.....	83
Abb. 38: Caspase-Aktivierungs-Assay	84
Abb. 39: S-NC-2 induziert PARP- <i>Cleavage</i>	85
Abb. 40: Nukleare Fragmentierung induziert durch S-NC-2.....	86
Abb. 41: S-NC-2 induziert eine internukleosomale Zerstückelung der zellulären DNA	87
Abb. 42: Suramin hemmt nicht die Apoptose-induzierende Wirkung von R-NC-2.....	88
Abb. 43: S-NC-2 induziert ein <i>Clustering</i> des CD95 Todesrezeptors sowie eine Co-Lokalisation mit dem Lipid Raft Marker Caveolin	90
Abb. 44: S-NC-2 induziert die Translokation des CD95 Todesrezeptors in <i>Lipid Raft</i> Regionen	91
Abb. 45: Capping von TRAIL-R2	92
Abb. 46: FADDdn BJAB Zellen sind nahezu resistent gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose.....	94
Abb. 47: Nachweis der DISC Bildung durch Co-Immünpräzipitation des CD95 Todesrezeptors	95
Abb. 48: Keine Hemmung der Apoptose-Induktion durch ZB4	96
Abb. 49: K562 Zellen weisen keine, durch S-NC-2 induzierte Fragmentierung des Zellkerns auf	97
Abb. 50: Keine Spaltung von Caspasen und Caspase-Substraten in K562 Zellen	98
Abb. 51: Untersuchung leukämischer Zelllinien auf das Vorhandensein von CD95 und TRAIL-R2.....	99
Abb. 52: Transfektion des CD95 Rezeptors führt zur Sensibilisierung der K562 Zellen gegenüber S-NC-2 induzierter Apoptose.....	100
Abb. 53: Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Zellen	101
Abb. 54: Bcl-2 Überexpression schützt bis zu einem gewissen Grad Jurkat Zellen vor der Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin	102
Abb. 55: Bcl-2 überexprimierende Zellen weisen keine DNA-Degradierung auf	103
Abb. 56: Die Spaltung von PARP wird durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert.....	104
Abb. 57: Bcl-2 verhindert das <i>Cleavage</i> der Initiator-Caspasen-8 und -9.....	104
Abb. 58: Kein <i>Cleavage</i> der Effektor-Caspasen in Jurkat Bcl-2 Zellen.....	105
Abb. 59: Bcl-2 Überexpression führt zu keiner vollständigen Hemmung der Apoptose in Typ I Zellen.....	106
Abb. 60: S-NC-2 induziert die Spaltung von PARP sowie die Fragmentierung der DNA in SKW Zellen	107
Abb. 61: TMRE-Färbung von Jurkat Zellen zur Ermittlung des Membranpotenzials	108
Abb. 62: S-NC-2 induziert einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials	109
Abb. 63: Untersuchung des MMP in defizienten Zelllinien nach S-NC-2 Behandlung.....	110
Abb. 64: Nur die Hemmung der Caspase-9 führt zur Reduktion des MMP-Verlusts	111
Abb. 65: Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase.....	112
Abb. 66: S-NC-2 induziert keine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies	114
Abb. 67: Spaltung von Bid in Typ I und Typ II Zellen	115
Abb. 68: Das Fehlen von DISC-Komponenten führt zur Reduktion der Bid-Spaltung	116
Abb. 69: Darstellung der verschiedenen Fraktionen nach differentieller Zentrifugation	118
Abb. 70: S-NC-2 induziert die Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine	119
Abb. 71: In BJAB Zellen erfolgt nach S-NC-2 Behandlung nur eine geringe Freisetzung von Cytochrom c	119
Abb. 72: Fluoreszenzfärbung von Jurkat Zellen mittels Acridine Orange (AO).....	121
Abb. 73: Punktwolken-Analyse der Acridine Orange Messung.....	122

Abb. 74: S-NC-2 induziert einen Verlust der lysosomalen Membranintegrität.....	123
Abb. 75: LMP wird in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat und FADDdn BJAB Zellen gehemmt	125
Abb. 76: Untersuchung zur Freisetzung von Cathepsin B nach S-NC-2 Behandlung	126
Abb. 77: Spaltung der Capsase-12	127
Abb. 78: Mikroskopische Beobachtung von S-NC-2 behandelten Blut-Zellen.....	127
Abb. 79: Trypanblau-Färbung primärer Blutlymphozyten.....	128
Abb. 80: S-NC-2 induziert keine Spaltung von PARP	129
Abb. 81: Aufnahmekinetik primärer Lymphozyten.....	130
Abb. 82: Exogenes LPC steigert die Anzahl vitaler Zellen in der S-NC-2 induzierten Apoptose.....	131
Abb. 83: Aufnahmekinetik von LPC in Jurkat und BJAB Zellen	132
Abb. 84: Zeitlicher Verlauf der S-NC-2 induzierten Apoptose	154
Abb. 85: Aktuelle Arbeitshypothese.....	156

Tabellen:

Tab. 1: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Jurkat A3 T Zelllinien (500 ml).....	34
Tab. 2: Zusammensetzung des Kulturmediums für BJAB Zellen (500 ml)	35
Tab. 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für SKW6.4 Zellen (500 ml)	36
Tab. 4: Zusammensetzung des Kulturmediums für K562 Zellen (500 ml).....	36
Tab. 5: Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen (500 ml).....	37
Tab. 6: Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen (500 ml).....	38
Tab. 7: Zusammensetzung des Kulturmediums für primäre Lymphozyten (500 ml)	40
Tab. 8: Zusammensetzung des 2x Lämmli sowie des NP-40 Lysispuffers.....	43
Tab. 9: Zusammensetzung des Trenn- bzw. Sammelgels	44
Tab. 10: Zusammensetzung des Laufpuffers.....	44
Tab. 11: Zusammensetzung des Blotpuffers.....	45
Tab. 12: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (Western Blot).....	46
Tab. 13: Zusammensetzung der Puffer für die Isolation apoptotischer DNA-Fragmente	48
Tab. 14: Zusammensetzung des Calcium-haltigen Bindungspuffers.....	50
Tab. 15: Antikörper und Bezugsquelle in der Immunfluoreszenz.....	52
Tab. 16: Zusammensetzung des DISC-Lysispuffers.....	55
Tab. 17: Zusammensetzung des MBS-Puffers	56
Tab. 18: Zusammensetzung des Zytosol-Lysispuffers.....	57
Tab. 19: Die Kupfersulfat-Färbelösung.....	59
Tab. 20: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienanzucht.....	60

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F. (2005). On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. *Biol.Chem.* 386 (3), 237-245.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F. (2003). S-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecane induces apoptosis in T cells: Involvement of receptor activation and the intrinsic apoptotic pathway. *Sig.Trans* 5/6, 218-231.

Krug, H.F., Oberle, C., Matzke, A., Massing, U. (2003). The antiproliferative alkylphospholipid S-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecane (S-NC-2) induces apoptosis in leukemia cell lines. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1010, 335-338.

Vorträge:

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: Death of leukaemia cells by synthetic phospholipids.
2. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe für Biochemische Pharmakologie und Toxikologie, Juli 2004.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: Alkylphosphocholines – new and promising anticancer drugs.
1. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe für Biochemische Pharmakologie und Toxikologie, Januar 2003.

Posterbeiträge

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: Activation of multi-faceted pathways upon APC treatment.
9th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), November 2005.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: Do APCs act upstream of mitochondria?
Signal Transduction, 3 / 4: 151. 8th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), November 2004.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: Apoptosis-inducing potency of the alkylphosphocholine S-NC-2: involvement of the extrinsic and the intrinsic pathway.
Signal Transduction, 3 / 4: 183. 7th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), November 2003.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: On the mechanism of action of the Alkylphosphocholine S-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl octadecane S-NC-2.
Meeting der European Life Scientist Organization (ELSO), September 2003.

Oberle, C., Krug, H.F.: BIOCLIP: Killing tumor cells by alkylphosphocholines.
Meeting der European Life Scientist Organization (ELSO), September 2003.

Oberle, C., Massing, U., Krug, H.F.: The antiproliferative alkylphospholipid S-1-O-phosphocholine. APOPTOSIS, Januar 2003.