

Identifizierung von chemischen Modulatoren der Cisplatin- induzierten Apoptose in Lungenkrebszellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Brigitte Schweitzer

aus

Timisoara

KIT-Dekan: Prof. Dr. P. W. Roesky

Referent: PD Dr. C. Weiss

Korreferentin: Prof. Dr. A. Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015

Erklärung der Urheberschaft

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Karlsruhe, 02.03. 2015

Brigitte Schweitzer

Danksagung

Danke an PD Dr. Carsten Weiss für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am ITG durchführen zu können. Danke auch für die gute Betreuung!

Herzlichen Dank für die Übernahme der Koreferenz an Professor Dr. Andrea Hartwig!

Danke zudem auch an PD Dr. Carsten Weiss, Dr. Silvia Diabaté, Dr. Markus Reischl (IAI) und Dr. Gary Davidson für hilfreiche Anregungen während meiner TAC Meetings!

Danke an Dr. Gary Davidson für die Möglichkeit in seinem Labor den Topflash Reporter-gen Test zu erlernen und anzuwenden. Hier auch vielen Dank an Nico Braunegger und Janine Wesslowski für ihre tatkräftige Hilfe!

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Silvia Diabaté für das Korrekturlesen meiner Arbeit!

Vielen Dank an Ilona für ihre Hilfe und Unterstützung!

Danke auch an Iris für ihre Unterstützung während des Screens!

Dankeschön an Dorit für ihre tatkräftige Unterstützung, v.a. in der Endphase!

Vielen lieben Dank an alle meine Toxis, eine wunderbare Arbeitsgruppe, die mir immer eine große Hilfe waren und mir auch privat viel Freude bereitet haben!

Auch allen meinen Freunden möchte ich für ihren Beistand und Rückhalt danken!

Ganz besonders möchte ich Alessandro für seine fortwährende Unterstützung danken, sei es durch seine Ermutigungen in schwierigen Phasen, sei es einfach durch seine Geduld in der Endphase!

Meiner Schwester Claudia danke ich sehr für ihre Unterstützung und das Korrekturlesen!

Ich danke natürlich auch meinen Eltern ganz herzlich, welche mir das Studium überhaupt ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen.

Zusammenfassung

Der Zelltod ist ein fester Bestandteil eines jeden Lebewesens. Ständig werden Zellen im Körper mittels Apoptose, einer regulierten Form des Zelltodes, abgebaut. Die Erhaltung der Balance zwischen Zellwachstum und Zelltod ist essentiell, da sonst Krankheiten, wie z.B. Krebs, entstehen können. Die Inhibierung der Apoptose ist ein bedeutendes Merkmal von Krebs. Im Jahr 2004 machte Krebs etwa 13% aller Todesursachen weltweit aus. Dabei stellt Lungenkrebs eine der häufigsten und aggressivsten Formen von Krebs dar. Cisplatin ist Mittel der Wahl bei der Behandlung von Lungenkrebs sowie weiterer Tumore. Ein tieferes Verständnis der Cisplatin-induzierten Apoptose bietet die Grundlage einer Optimierung der Cisplatin-Therapie und war das Ziel dieser Doktorarbeit.

Zur Untersuchung der Cisplatin-induzierten Apoptose wurde die humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie A549 verwendet und der Ablauf des Zelltodes unter Einsatz verschiedener Methoden (Mikroskopie, LDH Test, Durchflusszytometrie, Westernblot Analyse) charakterisiert. Die Generierung einer A549 Zelllinie, welche ein Fusionsprotein bestehend aus dem Grünfluoreszierenden Protein (GFP) und dem Histonprotein H2B exprimiert, ermöglichte Mikroskopie-basierte Zeitverlaufstudien des Cisplatin-induzierten Zelltodes. Der Mikroskopie-basierte Chemikalienscreen sollte Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen identifizieren. Die eingesetzten Substanzen entstammten den Bibliotheken „Known Bioactives“ des ICCB (Institute of Chemistry and Cell Biology) sowie „FDA (Food and Drug Administration) approved Drugs“. Die Kenntnis der Zielproteine bzw. -proteinklassen aller Substanzen erleichtert die Einordnung der identifizierten Sensibilisatoren und Suppressoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes in bestimmte Wirkstoffklassen. Zuletzt wurde die Rolle der Glykogensynthase Kinase (GSK-3 β) im Cisplatin-induzierten Zelltod genauer untersucht, da mehrere Hemmstoffe dieser Kinase im Screen identifiziert wurden.

Neben dem Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase induzierte Cisplatin bei höheren Konzentrationen Apoptose. Die Aktivierung bekannter Apoptosewege nach der Cisplatin Behandlung konnte in den A549 Zellen bestätigt werden.

Die Zeitverlaufsexperimente mit Cisplatin-behandelten A549 H2B-GFP Zellen dokumentieren die klassischen morphologischen Merkmale der Apoptose: Die Zellen runden sich ab und die Membran wird zu apoptotischen Körperchen abgeschnürt. Indessen kommt es im Zellkern zur partiellen DNA-Kondensation, welche in eine homogene Kondensation übergeht und in der Fragmentierung der DNA resultiert.

Die im Chemikalienscreen identifizierten Sensibilisatoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes sind in Signalwege zur Regulation des Zelltodes oder Zellwachstums involviert. Dabei spielen Hedgehog, der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Autophagie, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Signalwege, welche den Ionenhaushalt in der Zelle aufrechterhalten, ebenso eine Rolle wie Regulatoren von Efflux Transportern. Bedeutend für die Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes sind Mitogen aktivierte Protein-kinasen (MAPK), Antioxidantien, funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMA) sowie Inhibitoren der Proteinsynthese, Calciumkanäle, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sowie der GSK-3 β .

Die Verwendung des GSK-3 β Inhibitors 6-Bromoindirubin-3'-oxim (BIO) bestätigte die Selektivität der Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes durch die im Chemikalienscreen verwendeten GSK-3 β Inhibitoren (SB-415286/ Indirubin-3'-oxim). Zudem verdeutlichten Experimente in Kolonkarzinom (HCT-116) und Zervixkarzinom (HeLa) Zellen sowie mit anderen Apoptose-induzierenden Substanzen (Staurosporin/ Etoposid/ TNF α), dass die Apoptose-hemmende Wirkung von BIO Cisplatin- und Zelltyp-spezifisch ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die aufgezeigte Aktivierung von β -Catenin durch BIO nicht für die Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes verantwortlich ist. Jedoch hob die Depletion der GSK-3 β die hemmende Wirkung auf die Apoptose auf. Somit scheint GSK-3 β unabhängig von seinem direkten Substrat β -Catenin über bisher unbekannte Signalwege den Zelltod zu beeinflussen. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit zusätzlich zu schon bekannten Signalwegen bzw. Schlüsselproteinen der Apoptose weitere neue Regulatoren identifiziert werden. Speziell die verstärkende oder hemmende Wirkung vieler Medikamente auf die Cisplatin-induzierte Apoptose bedarf weiterer Forschung.

Abstract

Cell death is part of every living organism. Apoptosis, a controlled form of cell death, occurs constantly in our body. The balance of proliferation and apoptosis is essential and its deregulation causes a variety of disease, one of which is cancer. Evasion of apoptosis is an important hallmark of cancer. In 2004, cancer-related cell death accounted for 13% of all deaths worldwide. Among these, lung cancer is one of the most abundant and aggressive forms of cancer. Cisplatin is the first choice in treating lung cancer and many other tumors. The aim of this thesis was to better understand cisplatin-induced apoptosis *in vitro*, in order to establish the base for optimizing cisplatin treatment.

To analyze cisplatin-induced apoptosis, the human non-small cell lung cancer cell line A549 was employed and further characterized by different methods, such as microscopy, LDH assay, flow cytometry, western blot analysis). An A549 cell line expressing a fusion protein containing the green fluorescent protein (GFP) and the histone H2B was generated. With this cell line, it was possible to perform microscopy based time-lapse experiments for studying cisplatin-induced cell death. Microscopy based chemical screening was intended to identify modulators of cisplatin-induced apoptosis. The chemicals of the Known Bioactives of ICCB (Institute of Chemistry and Cell Biology) and FDA (Food and Drug Administration) approved drugs libraries were tested. For every compound, target informations were provided. That facilitated sorting of the identified suppressors and sensitizers of cisplatin-induced cell death into certain drug classes. Finally, the role of glycogen synthase kinase (GSK-3 β) in cisplatin-induced cell death was further investigated, because two inhibitors of this kinase were identified in the chemical screen as suppressor of cisplatin-induced apoptosis.

Cisplatin induces cell cycle arrest in S and G2/M phase and also apoptosis, if higher concentrations are used. Activation of known apoptotic players after cisplatin treatment has been confirmed in A549 cells.

Time-lapse experiments using the A549 H2B-GFP cells demonstrated classical morphological features of apoptosis: firstly cells detach, followed by membrane blebbing and

apoptotic body formation. Meanwhile, on nuclear level, DNA condenses partially then homogenously and results finally in DNA fragmentation.

Sensitizers of cisplatin-induced cell death, which were identified by the chemical screen, are all involved in pathways dealing with cell death and proliferation. Hedgehog, epidermal growth factor receptor (EGFR), autophagy, reactive oxygen species (ROS) or signaling pathways maintaining the ion homeostasis inside the cell are contained as well as regulators of efflux transporters. Suppressors are represented by mitogen activated protein kinases (MAPK), antioxidants, functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA) and inhibitors of proteinsynthesis, calcium channels, G-protein coupled receptors (GPCR) and GSK-3 β .

GSK-3 β inhibitor 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO) confirmed the selectivity of reduced cisplatin-induced cell death obtained by GSK-3 β inhibitors (SB-415286/ Indirubin-3'-oxime) in the chemical screen. Using the human colon (HCT-116) and cervix (HeLa) carcinoma cell lines and other apoptosis inducers (staurosporine/ etoposide/ TNF α) revealed, that antiapoptotic action of BIO is cisplatin and cell type specific. Even though activated upon BIO treatment, β -Catenin is not responsible for the attenuated cisplatin-induced cell death due to BIO. Interestingly, depletion of GSK-3 β by RNAi reversed the antiapoptotic action of BIO on cisplatin-induced cell death. Therefore, GSK-3 β seems to regulate cisplatin-induced cell death not by regulation of its direct substrate β -Catenin, but by other pathways, so far unknown. Moreover new regulators of apoptosis could be identified in addition to already known signaling pathways and key regulators of apoptosis. Especially sensitizing and suppressing action of identified approved drugs on cisplatin-induced apoptosis needs further examination.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract.....	iii
Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	xii
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung.....	18
1.1 Zelltodformen.....	18
1.1.1 Apoptose	18
1.1.2 Nekrose.....	22
1.2 Zellzyklus.....	23
1.3 Cisplatin	26
1.3.1 Wirkungsweise	27
1.3.2 Resistenzbildung	28
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Chemikalien und sonstiges Material	33
2.1.2 Laborgeräte und Softwareprogramme	38
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	40
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Zellkultur.....	43
2.2.2 Behandlung der Zellen	47
2.2.3 Methoden zur Charakterisierung der Zellen und der Cisplatin- induzierten Zytotoxizität.....	48

2.2.4	Mikroskopie-basierter Chemikalienscreen	63
2.2.5	Statistik	66
3	Ergebnisse.....	67
3.1	Charakterisierung der Wirkungsweise von Cisplatin in A549 Zellen	67
3.1.1	Fluoreszenzmikroskopie-basierte Analyse zeigt konzentrations- und zeitabhängige Cisplatin-induzierte Apoptose in den A549 Zellen.....	68
3.1.2	Der klassische LDH Test bestätigt die Mikroskopie-Ergebnisse.....	71
3.1.3	Die durchflusszytometrische Analyse zeigt einen Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase nach Cisplatin.....	73
3.2	A549 H2B-GFP Zellen als Werkzeug für die Untersuchung der Dynamik der Apoptose	75
3.2.1	Fluoreszenzmikroskopie-basierte Analyse weist konzentrations- und zeitabhängige Cisplatin-induzierte Apoptose in den A549 H2B-GFP Zellen nach	77
3.2.2	Der LDH Test reproduziert die Mikroskopie-Ergebnisse qualitativ	80
3.2.3	Die durchflusszytometrische Analyse zeigt leicht unterschiedliche Veränderungen im Zellzyklus der A549 H2B-GFP Zellen im Vergleich zu den A549 Zellen.	82
3.2.4	Zeitverlauf der Cisplatin-induzierten Apoptose	83
3.3	Biochemische Merkmale der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen	85
3.3.1	Kinasen und apoptotische Proteine werden nach Cisplatin-Behandlung aktiviert.....	85
3.3.2	Hat die Inhibierung von ATM/ATR sowie von Caspasen Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Apoptose?	87
3.4	Chemikalienscreen zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose	93
3.4.1	Substanzen, welche den basalen Zelltod in den A549 Zellen erhöhen..	93

3.4.2	Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod in den A549 Zellen modulieren	99
3.5	Weiterverfolgung des GSK-3 β - Inhibitors SB-415286, eines der stärksten Treffer innerhalb der Suppressoren.....	107
3.5.1	Ist der Effekt des Inhibitors BIO zelltypabhängig?	109
3.5.2	Ist der Effekt des Inhibitors BIO Cisplatin-spezifisch?	112
3.5.3	Ist β -Catenin involviert in den Zelltod-inhibierenden Effekt von BIO?	117
3.5.4	Die Depletion von β -Catenin hat keinen Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Zelltod	119
3.5.5	Die durch BIO ausgelöste Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes ist abhängig von GSK-3 β	122
4	Diskussion	125
4.1	Charakterisierung der Wirkungsweise von Cisplatin in A549 Zellen	125
4.1.1	Cisplatin führt einerseits zum konzentrationsabhängigen Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase, andererseits induziert es konzentrations- und zeitabhängig Apoptose.....	125
4.1.2	A549 H2B-GFP Zellen eignen sich als Werkzeug für die Untersuchung der Dynamik der Apoptose	127
4.1.3	Aktivierung von Kinasen und apoptotischen Proteinen nach Cisplatin Behandlung	129
4.2	Chemikalienscreen zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose	131
4.2.1	Substanzen mit basaler Toxizität.....	131
4.2.2	Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod modulieren	138
4.3	Die Involvierung von GSK-3 β in den Cisplatin-induzierten Zelltod.....	155
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	161
5	Literaturverzeichnis.....	166
6	Anhang.....	189

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Intrinsischer und extrinsischer Apoptose Signalweg.....	21
Abbildung 1-2: Übersicht über die Regulation des Zellzyklus.....	25
Abbildung 1-3: Aufnahme und Aktivierung von Cisplatin unter physiologischen Bedingungen.....	27
Abbildung 1-4: Mechanismen zur Überwindung der Resistenz gegenüber der Cisplatin Behandlung.....	30
Abbildung 2-1: Generierung der Kernmaske durch die ScanR Analysis-Software.....	49
Abbildung 2-2: ScanR Analyse der Mikroskopiebilder.....	50
Abbildung 2-3: Plasmidkarte des H2B-GFP Plasmids von Addgene.....	54
Abbildung 2-4: Vorgehensweise der Verdünnung der Mutterplatten.....	64
Abbildung 1-1: Plattenlayout der durchgeführten Screens	65
Abbildung 3-1: Induzierung der Apoptose in A549 Zellen nach Behandlung mit CDDP.....	69
Abbildung 3-2: A549 Zellen weisen nach CDDP- Behandlung die typischen apoptotischen Merkmale auf.....	70
Abbildung 3-3: Der LDH Test bestätigt größtenteils die Ergebnisse der Mikroskopie.....	72
Abbildung 3-4: Zellzyklusverteilung nach 24h CDDP-Behandlung.....	74
Abbildung 3-5: Die A549 H2B-GFP Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Proliferation nicht von den A549 Zellen.....	75
Abbildung 3-6: Das Fusionsprotein H2B-GFP ist im Überschuss vorhanden im Vergleich zum endogenen Protein.....	76
Abbildung 3-7: Apoptose-Induzierung in A549 H2B-GFP Zellen durch CDDP.....	78
Abbildung 3-8: A549 H2B-GFP Zellen weisen nach CDDP-Behandlung die typischen apoptotischen Merkmale auf.....	79
Abbildung 3-9: Der LDH Test bestätigt die Ergebnisse der Mikroskopie qualitativ.....	81

Abbildung 3-10: Zellzyklusverteilung in den A549 H2B-GFP Zellen nach 24h CDDP-Behandlung.....	82
Abbildung 3-11: Aufnahmen in Apoptose gehender A549 H2B-GFP Zellen während einer Zeitverlaufsstudie.....	84
Abbildung 3-12: Übersicht über die Wirkungsweise von Cisplatin sowie die Proteine, deren Aktivierung in den A549 Zellen nachgewiesen werden konnte.....	86
Abbildung 3-13: Bestätigung der Rolle der Hauptbeteiligten in der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549.....	86
Abbildung 3-14: Cisplatin-induzierter Zelltod in A549 ist abhängig von ATM/ATR sowie Caspasen.....	88
Abbildung 3-15: Cisplatin-induzierter Zelltod in A549 wird durch ATM/ATR Inhibition erhöht, durch zVAD herabgesetzt.....	89
Abbildung 3-16: Inhibition der Caspasen durch Q-VD-OPH verringert den CDDP-induzierten Zelltod.....	91
Abbildung 3-17: Zytotoxizität der getesteten Substanzen. Die A549 Zellen wurden mit den jeweiligen Substanzen behandelt, nach 24h mit Hoechst/PI gefärbt und am Mikroskop aufgenommen.....	94
Abbildung 3-18: Darstellung der Substanzen, die den Zelltod von A549 Zellen erhöhen.....	95
Abbildung 3-19: Die Krebstherapeutika in der Trefferliste zeigen die Wirksamkeit der Methode.....	96
Abbildung 3-20: Substanzen, die den basalen Zelltod in den A549 Zellen erhöhen.....	97
Abbildung 3-21: Wirkung getesteter Substanzen auf den Cisplatin-induzierten Zelltod.....	100
Abbildung 3-22: Die Kombinationspräparate (aus den ICCB und FDA Bibliotheken) haben nur einen schwach verstärkenden, keinen oder sogar supprimierenden Effekt auf den CDDP-induzierten Zelltod.....	101
Abbildung 3-23: Die Sensibilisatoren aus der FDA/ ICCB Bibliothek können in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt werden.....	103

Abbildung 3-24: Die Suppressoren des CDDP-induzierten Zelltodes lassen sich in 9 funktionelle Gruppen einteilen.....	105
Abbildung 3-25: Prozentuale sowie absolute Verteilung der supprimierenden Substanzen in unterschiedliche, funktionelle Klassen.....	106
Abbildung 3-26: Der GSK-3 β -Inhibitor SB-415286 setzt den CDDP-induzierten Zelltod deutlich herab.....	106
Abbildung 3-27: Der GSK-3 β Inhibitor BIO reduziert CDDP-induzierten Zelltod in den A549 Zellen und reproduziert damit den Effekt von SB-415286.....	108
Abbildung 3-28: BIO erhöht den Cisplatin-induzierten Zelltod in HCT-116 leicht, hat jedoch keinen Effekt auf HeLa Zellen.....	111
Abbildung 3-29: BIO hat einen leicht hemmenden Einfluss auf den Etoposid-induzierten Zelltod, welcher mit steigender Konzentration verloren geht.....	113
Abbildung 3-30: BIO hat keinen Effekt auf den Staurosporin-induzierten Zelltod.....	115
Abbildung 3-31: 1 μ M BIO erhöht den durch TNF- α /CHX induzierten Zelltod leicht.....	116
Abbildung 3-32: β -Catenin Aktivierung nach Präinkubation mit BIO allein und nach Doppelbehandlung mit CDDP.....	118
Abbildung 3-33: Cisplatin-induzierter Zelltod ist unabhängig von β -Catenin hat weder Einfluss auf den noch auf die durch BIO verursachte Reduktion des Zelltodes.....	120
Abbildung 3-34: Die Herunterregulation des β -Catenin-Proteins durch beide siRNA Sequenzen kann mittels Western Blot Analyse bestätigt werden.....	121
Abbildung 3-35: Die Herunterregulation von GSK-3 β hat keinen Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod, verhindert aber die protektive Wirkung von BIO.....	123
Abbildung 3-36: Die Herunterregulation des GSK-3 β Proteins kann mittels Western Blot Analyse bestätigt werden.....	124
Abbildung 4-1: Übersicht der Sensibilisatoren auf den Cisplatin-induzierten Zelltod...	147
Abbildung 4-2: Übersicht der Suppressoren auf den Cisplatin-induzierten Zelltod	155

Abbildung 4-3: Übersicht verschiedener Funktionen von GSK-3 β Funktionen auf den Zelltod.	161
Abbildung 6-1: Apoptose-Induzierung in A549 H2B-GFP Zellen durch CDDP nach Auswertung über das Hoechstsignal.....	190
Abbildung 6-2: Zellzyklusprofile der A549 Zellen sowie der A549 H2B-GFP Zellen.....	193
Abbildung 6-3: Die GSK-3 β -Inhibitoren SB-415286 und IO sowie die Casein Kinase Inhibitoren A-3 und DRB verringern den CDDP-induzierten Zelltod deutlich.....	194
Abbildung 6-4: NCBI Blast der GSK-3 β siRNA Sequenz (dunkelgraue obere Sequenz) sowie die Basenabfolge der Gene, dessen mRNA sie theoretisch binden könnte.....	195

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Eingesetzte Chemikalien und Materialien mit ihren Bezugsquellen	33
Tabelle 2-2: Eingesetzte Antikörper und ihre Bezugsquellen	36
Tabelle 2-3: Eingesetzte siRNA Sequenzen und ihre Bezugsquellen	37
Tabelle 2-4: Laborgeräte und Softwareprogramme	38
Tabelle 2-5: Zusammensetzung des Lysepuffers nach Laemmli	40
Tabelle 2-6: Zusammensetzung der SDS Gele.....	40
Tabelle 2-7: Zusammensetzung des Laufpuffers	40
Tabelle 2-8: Zusammensetzung des Blotpuffers.....	41
Tabelle 2-9: Zusammensetzung des TBS	41
Tabelle 2-10: Zusammensetzung des Stripping-Puffers	41
Tabelle 2-11: Zusammensetzung des Gly-Gly- sowie des Coelenterazin Puffers.....	42
Tabelle 2-12: Zusammensetzung der verschiedenen Reaktionspuffer	42
Tabelle 2-13: Charakterisierung der in der Arbeit eingesetzten Zelllinien	43
Tabelle 2-14: Verwendete Zelldichten und weitere Informationen zu durchgeführten Experimenten.....	47
Tabelle 2-15: siRNA und HiPerfect pro Well.	62
Tabelle 3-1: Substanzen, welche den basalen Zelltod erhöhen, eingeteilt nach Bibliothek und Anwendung. Insgesamt wurden 1120 Chemikalien getestet. Dargestellt sind die Anzahl an reproduzierten Treffern sowie die Menge an Krebstherapeutika unter diesen.	95
Tabelle 3-2: Chemikalien, welche den basalen Zelltod um mehr als die Hälfte des CDDP-induzierten Zelltodes erhöhen und deren Wirkungsart. PP Protein Phosphatase; MAP Mitogen aktivierte Protein-; PKC Proteinkinase C; FIASMA Funktioneller Inhibitor der sauren Sphingomyelinase; TPEN N,N,N',N',-tetrakis(2-Pyridylmethyl) Ethylendiamin; TRP Kanal „Transient Receptor Potential“ Kanal; N-WASP Neutrales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein.....	98
Tabelle 3-3: Einteilung der Sensibilisatoren in funktionelle Gruppen.....	102

Abkürzungsverzeichnis

10-HCPT	10-Hydroxycamptothecin
ABC Transporter	ATP-binding cassette Transporter
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis inducing factor
AIF	Protein Apoptose-induzierender Faktor
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASM	Saure Sphingomyelinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A und ATP7B	P- type copper-transporting adenosintriphosphatase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAPTA-AM	(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BIO	6-Bromoindirubin-3'-oxim
BRCA1/BRCA2	breast cancer 1, early onset
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdc25	Cell division cycle 25
CDDP	Cis-Diamindichlorplatin(II), Cisplatin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
Chk 1	Checkpoint Kinase 1
CHX	Cycloheximid
CK	Casein Kinase
Ctr1 und 2	Copper transporter 1 und 2
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol

DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DYRK 1B	dual-specificity Y-phosphorylation-regulated kinase 1B
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
ERCC 1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälber Serum
FDA	Food and Drug Administration
FIASMA	Funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase
FRAS-1	Fraser syndrome 1
FRAT-1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK-3 β	Glykogensynthase Kinase
H2B	Histon 2B
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HCl	Salzsäure
HER-1 und HER-2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 1 und 2
HRP	Meerrettich-Peroxidase

HSP	Heat-shock protein
ICCB	Institute of Chemistry and Cell Biology
INT	(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride
JNK	c-JUN N-terminal kinase
LDH	Laktat Dehydrogenase
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
LRP	lipoprotein receptor-related protein
MAP	Mitogen aktivierte Protein
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAPKAPK 2/MK2 (C-18)	Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinasen
MAPKAP- β	MAP Kinase-aktivierte Proteinkinase- β
MATE	Multidrug extrusion transporter 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MDR1	Multidrug resistance 1
MMR	Mismatch Reparatur
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilisation
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
Mrp2	Multidrug resistance-associated protein 2
NAD ⁺ / NADH	Oxidiertes/ reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
NSITC	Cathepsin L Inhibitor
N-WASP	Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein

OCT2	Organic cation transporter 2
PARP-1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
Pgp	Permeability glycoprotein
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Protein kinase C
PP	Protein Phosphatase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
Q-VD-OPH	(3S)-5-(2,6-Difluorophenoxy)-3-[[[(2S)-3-methyl-1-oxo-2-[(2-quinolinylcarbonyl)amino]butyl]amino]-4-oxo-pentanoic acid hydrate
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom Protein
RIP Kinase 1 (oder RIPK1)	Receptor inter-acting serine/threonine-protein kinase-1
RISC	RNA Induced-Silencing-Complex
RLU	Relativen Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-interference
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rsk-2	Ribosomal s6 Kinase
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Fehler

siRNA	Silencing RNA
STABW	Standardabweichung
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween-20
TCF	T-cell factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TLR3 und TLR4	Toll-like Rezeptoren
TLS	Translesion synthesis
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TPEN	N,N,N',N',-tetrakis(2-Pyridylmethyl) Ethylendiamin
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRP Kanal	„Transient Receptor Potential“ Kanal
TRPV 1	Vanilloid type 1 receptor
vATPase	vacuolar ATPase
VDAC	voltage-dependent anion channel
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrom Protein
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
zVAD	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

1 Einleitung

Der Zelltod ist ein fester Bestandteil eines jeden Lebewesens. Minütlich werden Zellen in unserem Körper mittels einer regulierten Form des Zelltodes abgebaut, der sogenannten Apoptose. Es ist wichtig für den Körper, Zellwachstum und Zelltod in Balance zu halten. Sobald diese Prozesse aus dem Gleichgewicht geraten, können Krankheiten, wie z.B. Krebs, entstehen. Eines der wichtigsten Merkmale von Krebs ist die verminderte Apoptose. Im Jahr 2004 machte Krebs etwa 13% aller Todesursachen weltweit aus (Center et al. 2011). Dabei stellt Lungenkrebs eine der häufigsten und aggressivsten Formen von Krebs dar, die zudem mit schlechten Prognosen verbunden ist. Eine Möglichkeit zur Bekämpfung von Lungenkrebs besteht in der Behandlung mit Cisplatin, einem Tumorthapeutikum, welches durch Schädigung der DNA Apoptose hervorruft. Das Problem hierbei ist das Auftreten von Resistenzen in Krebszellen gegenüber Cisplatin oder apoptotischem Zelltod im Allgemeinen. Daher ist die Unterbindung dieser Resistenzentwicklung von zentraler Bedeutung für die Krebstherapie. Apoptose ist ein stark erforschtes Gebiet, dennoch gibt es noch Lücken, welche noch geschlossen werden müssen. Je detaillierter der Mechanismus der Apoptose aufgeschlüsselt werden kann, in diesem Falle die Cisplatin-induzierte Apoptose, desto eher finden sich Wege, die Effizienz der Krebsbehandlung zu steigern.

1.1 Zelltodformen

1.1.1 Apoptose

Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltodes dar und zielt auf die Beseitigung von Zellen, welche für die Entwicklung oder den Fortbestand des Organismus unnötig oder hinderlich sind. Dies können u.a. Zellen mit irreparablen Mutationen sein oder infizierte Zellen (z.B. Viren). Jedoch spielt die Apoptose auch eine wichtige Rolle in der

Entwicklung, z.B. werden zur Gewährleistung der richtigen „Verschaltung“ von Nervenzellen bis zur Hälfte aller ursprünglich entstandenen Nervenzellen noch vor der Geburt wieder auf diese Weise vernichtet.

Während der Apoptose löst sich die betroffene Zelle zunächst aus dem Gewebsverband, wobei sie sich abrundet und zunehmend kleiner wird. Zudem bilden sich an der Zellmembran sichtbare Bläschen, welche nach und nach abgeschnürt und als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Diese werden im Körper normalerweise von Makrophagen phagozytiert, sodass die Zellen abgebaut werden, bevor die Membran durchlässig werden kann. Denn dann würde der Austritt des Zytosols in die zelluläre Umgebung eine Entzündungsreaktion der umliegenden Zellen herbeiführen, wie das für den unprogrammierten Zelltod (Nekrose) zutrifft. Innerhalb der Zelle findet derweil die Chromatin-Kondensation und -Fragmentierung statt (Taylor et al. 2008). Chromatin besteht aus DNA, welche um Histone gewickelt ist, sowie aus weiteren Proteinen (u.a. DNA-Bindeproteine), welche sich ebenfalls an die DNA anlagern. Diese Komplexbildung führt zur Verkürzung (Kondensation) der chromosomalen DNA-Stränge um das rund 10.000- bis 50.000-fache ihrer Länge, so dass sie in den Zellkern passen und die DNA zudem geschützt ist.

Im Prinzip gibt es zwei Möglichkeiten, wie Apoptose induziert werden kann (Abbildung 1-1). Auf der einen Seite über die Aktivierung von Todesrezeptoren, auch als „extrinsischer Signalweg“ bezeichnet, auf der anderen Seite gibt es den „intrinsischen Signalweg“, welcher unter der Beteiligung der Mitochondrien erfolgt. Bei der Apoptose sind bestimmte Proteasen, die Caspasen (cysteine-dependent aspartate-specific proteases), von großer Bedeutung. Sie werden durch Spaltung ihrer inaktiven Form zur funktionell aktiven Caspase aktiviert. Die verschiedenen Caspasen werden in Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8 und 9) sowie Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3 und 7) eingeteilt. Initiatorcaspasen spielen zu Beginn der Caspase-Signalkette eine Rolle und aktivieren die Effektorcaspasen, welche den apoptotischen Zelltod verursachen. Dies geschieht über die Aktivierung unterschiedlicher Proteine, wie z.B. DNAsen, welche letztendlich durch

den Abbau sämtlicher zellulärer Strukturen, Organellen sowie der DNA oben beschriebene morphologische und nukleäre Veränderungen bewirken.

Der intrinsische Signalweg kann unter anderem durch DNA-Schäden oder oxidativen Stress eingeleitet werden. Dabei wird der „Wächter des Genoms“ aktiviert, der Transkriptionsfaktor p53. Dieser wird im Normalfall ubiquitiniert und damit zum proteasomalen Abbau markiert. Liegt jedoch ein Schaden an der DNA vor, so wird er phosphoryliert, kann akkumulieren und neben einem Zellzyklusblock der Zelle die Apoptose einleiten. Dies erfolgt durch die Induktion von pro-apoptotischen Genen (u.a. PUMA, Noxa, Bax, Bid und Fas) und über die Hemmung von anti-apoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-2 und Bcl-XL) (Haupt et al. 2003). Die von Bax generierte Porenbildung verursacht eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilisation). Cytochrom c und andere pro-apoptotische Faktoren werden so ins Zytoplasma freigesetzt. Diese führen zur Bildung des Apoptosoms, bei welchem es sich um einen Komplex aus dem Adapterprotein Apaf1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und dem Cytochrom c handelt. Diese formen durch die Heptamerisierung von Apaf1 eine radähnliche Struktur, welche der Rekrutierung und anschließenden Aktivierung der Caspase 9 dient (Orrenius et al. 2011; Riedl & Salvesen 2007). Diese spaltet wiederum die Procaspase 3 und leitet damit die Endprozesse der Apoptose ein.

Der extrinsische Signalweg wird z.B. ausgelöst durch die Bindung der zur TNF-Familie gehörenden Liganden (TNF- α , FasL, TRAIL) an deren jeweilige Todesdomänenrezeptoren (zB. TNFR (Tumor necrosis factor receptor), CD95 (oder Fas), TRAIL-R1/2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1/2)) und zur Rekrutierung von FADD (Fas-associated death domain protein) (de Vries et al. 2006). Zusammen mit der Initiatorcaspase 8 bilden sie den DISC (death-inducing signaling complex) und leiten die Aktivierung der Caspase 8 ein. Diese kann dann entweder direkt die Effektorcaspase 3 aktivieren oder sie führt zur Spaltung von Bid (BH3 interacting-domain death agonist) zu tBid (truncated Bid). Dies stellt die Verbindung zwischen den beiden apoptotischen Signalwegen dar, da tBid das Protein Bax aktivieren kann, welches wiederum die MOMP auslöst.

Neben der Caspase-abhängigen Apoptose gibt es auch eine Form, welche unabhängig ist von Caspasen. Das mitochondriale Protein Apoptose-induzierender Faktor (AIF), welcher aufgrund der MOMP aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, kann in den Zellkern wandern und dort Caspase-unabhängig die DNA-Kondensation und -Fragmentierung auslösen, wenn auch nur bis zu einem bestimmten Grad, nämlich nur periphere Kondensation und große DNA Fragmente (~50 kB) (Susin et al. 2000). Die Endonuklease G ist ein weiteres Protein, welches aus dem Mitochondrium während der Apoptose freigesetzt wird und im Nukleus direkt die DNA schneiden kann, ohne auf Caspasen angewiesen zu sein (Li et al. 2001).

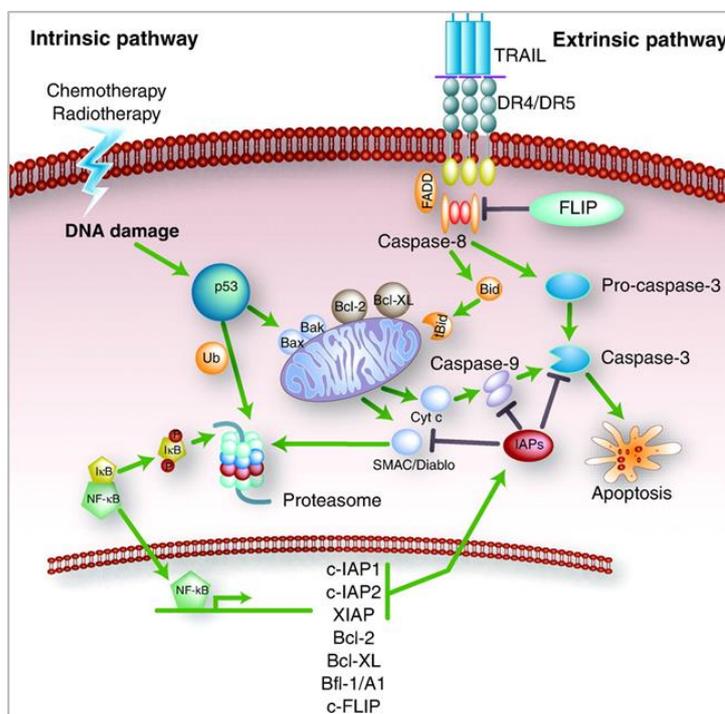


Abbildung 1-1: Intrinsischer und extrinsischer Apoptose Signalweg. Die Induktion der Apoptose kann sowohl extrinsisch über die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgen, als auch intrinsisch durch endogene Stimulierung, was z.B. nach Schädigung der DNA der Fall ist und auch als „mitochondrialer Signalweg“ bezeichnet werden kann. Chemotherapien sowie Strahlentherapien induzieren normalerweise den intrinsischen Signalweg. Es existiert zudem die Möglichkeit, dass der intrinsische Signalweg durch den extrinsischen Signalweg ausgelöst werden kann durch die Beteiligung und Aktivierung des Proteines Bid. Durch beide Apoptose Signalwege wird letztlich die Caspase 3 aktiviert, welche die Endprozesse der Apoptose einleitet, nämlich den Abbau sämtlicher zellulärer Strukturen, Organellen sowie der DNA und damit der Zelle selbst. Geändert nach de Vries et al. 2006¹.

¹ Adapted by permission from the American Association for Cancer Research: De Vries, E. G. E., Gietema, J. a., & De Jong, S., Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications, *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(8), 2390–2393, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-06-0352

1.1.2 Nekrose

Morphologisch gesehen sind das Anschwellen des Zytoplasmas sowie der Zellorganellen, v.a. der Mitochondrien, ebenso charakteristisch für die Nekrose wie die Ruptur der Plasmamembran. Aufgrund des letzteren Vorganges gelangen Bestandteile des Zytoplasmas nach außen, wodurch Entzündungsreaktionen in den umliegenden Zellen verursacht werden (Kroemer et al. 2009; Golstein & Kroemer 2007). Der Abbau der DNA erfolgt hier unreguliert im Gegensatz zur kontrollierten Fragmentierung in Oligonukleosome während der Apoptose (Proskuryakov & Gabai 2010). Ausgelöst werden kann der nekrotische Zelltod durch verschiedene exogene Faktoren, wie etwa extremen Temperaturschwankungen, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, energiereicher Strahlung oder toxische Substanzen. Diese können dann eine Schädigung der Mitochondrien, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit oxidativen Stress, Probleme in der Calcium-Homöostase oder ATP (Adenosintriphosphat) Depletion herbeiführen. Verschiedene Krankheitsbilder sind mit dem Auftreten von Nekrosen verbunden, so z.B. Ischämie nach einem Schlaganfall oder neurodegenerative Krankheiten (Golstein & Kroemer 2007).

Es gibt neue Erkenntnisse darüber, dass die Nekrose nicht, wie bisher angenommen, ein vollkommen unkontrollierter passiver Prozess ist. Er kann sehr wohl reguliert sein, wobei man dann von Nekroptose spricht. Diese tritt ein, wenn die RIP Kinase 1 (*receptor interacting serine/threonine-protein kinase-1*, RIPK1) aktiviert wird, was über die Todesdomänenrezeptoren (z.B. TNFR1, TRAIL-R) und Toll-like Rezeptoren (TLR3 und TLR4) eingeleitet werden kann. Die RIPK1 verursacht dann eine Schädigung der Mitochondrien, was die MOMP bewirkt, welche wiederum die Aktivierung von Proteasen wie Calpain, Cathepsin und Phospholipasen zur Folge hat. Hierdurch wird auch die Permeabilisierung der Plasmamembran in die Wege geleitet, eines der Hauptmerkmale der Nekrose bzw. Nekroptose (Proskuryakov & Gabai 2010).

1.2 Zellzyklus

Der Zellzyklusstatus einer Zelle kann die zytotoxische Wirkung einer Substanz beeinflussen, wobei dieser komplexe Zusammenhang noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Im folgenden Kapitel sind einige Grundlagen zum Thema Zellzyklus aufgeführt sowie dessen Bezug zum Zelltod und zur Krebsentstehung erläutert.

Der Zellzyklus ist ein hochkonservierter Vorgang in eukaryotischen Zellen, der die Zellteilung und damit die Weitergabe der DNA Information gewährleistet. Er lässt sich in vier unterschiedliche Abschnitte unterteilen (Abbildung 1-2): Die Mitose Phase, kurz M Phase genannt, die DNA Synthese Phase (S Phase), sowie die G1 Phase und die G2 Phase. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen sind streng überwacht und reguliert, um z.B. die Weitergabe von mutierter DNA zu verhindern oder aber die Zellteilung hinauszuzögern, bis die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren in der Zelle ausreichend sind. Somit können die Zellen nur in den nächsten Vorgang überführt werden, wenn der vorhergehende Vorgang abgeschlossen ist. Dabei spielen drei Kontrollpunkte eine wesentliche Rolle: Der G1/S Kontrollpunkt, der G2/M Kontrollpunkt sowie der Metaphasen/Anaphasen Kontrollpunkt. (Novak et al. 2002; Elledge 1996).

In der G1 Phase, welche mit etwa 10 Stunden die längste Phase darstellt, wird die Zelle auf die Synthesephase vorbereitet: Zellbestandteile, welche nach der Mitose nicht schon vorhanden waren, werden nun gebildet, z.B. Zellorganellen. Doch auch Histone oder Enzyme für die Synthesephase müssen produziert werden, wie etwa die DNA-Polymerasen. Sobald dann am Ende der Phase der G1/S Kontrollpunkt erreicht ist, werden einerseits äußere Faktoren überprüft, wie z.B., ob die Zelle schon ihre entsprechende Größe erreicht hat, oder, ob genug Nährstoffe und Wachstumsfaktoren vorliegen. Trifft das nicht zu, so wird die Zelle zunächst am Übergang in die S Phase gehindert und in einen Ruhezustand versetzt, der sogenannten G0 Phase. Gleiches gilt, wenn in einem Gewebsverband die Zelle in Kontakt kommt mit der Nachbarzelle. Diese als Kontaktinhibition bezeichnete Reaktion ist den Krebszellen verloren gegangen. So teilen sie sich unentwegt weiter und bilden Tumore aus. Es werden aber auch innere

Faktoren kontrolliert, wie z.B. der Status der DNA in der Zelle oder, ob alle Enzyme und Proteine, welche für die S Phase benötigt werden, vorhanden sind. Denn wenn die DNA beschädigt oder mutiert ist, kann bzw. sollte sie schließlich nicht vervielfältigt werden.

Während der S Phase wird, wie der Name schon sagt, die DNA repliziert und anschließend um die Histone gewickelt.

In der G2 Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor, z.B. durch die Expression Mitose-relevanter Proteine. Auch löst sich nun die Zelle aus dem Zellverband und rundet sich ab. Der Chromosomensatz liegt doppelt vor, besteht also aus zwei Schwesterchromatiden. Am Kontrollpunkt wird dann überprüft, ob die Replikation fehlerlos abgelaufen ist und ob die Endgröße der Zelle erreicht wurde.

Anschließend beginnt die M Phase. Hier teilt sich zuerst der Chromosomensatz in beide Chromatiden auf und anschließend auch der Zellkern und die Zelle selbst, sodass zuletzt zwei Tochterzellen mit identischem Chromosomensatz vorliegen. Der Metaphase/Anaphase Kontrollpunkt gegen Ende der Metaphase stellt sicher, dass die Mitose vollständig und akkurat abgelaufen ist. Er induziert auch das Verlassen der Mitose und den Übergang in die G1 Phase.

Die ganze Zellzyklusmaschinerie wird durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) reguliert. Nur der Komplex aus beiden bildet eine funktionelle Einheit. Auf die Details wird hier jedoch nicht weiter eingegangen.

Die Gene bzw. Proteine, welche an der Regulierung der Kontrollpunkte beteiligt sind, können die Zelle an den verschiedenen Kontrollpunkten arretieren, falls dies notwendig ist um die genomische Integrität zu schützen. Insofern spielt die Inaktivierung dieser Gene durch Mutationen bei der Bildung von Tumoren eine bedeutende Rolle. Daher werden diese auch als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Beispiele dafür sind p53 und das Retinoblastom-Protein (Rb). Ist p53 mutiert - und das ist der Fall in mehr als 50% aller Tumore - gibt es mehrere Möglichkeiten, wie dies zu Krebs führen kann. Der Zellzyklusblock wird nach DNA Schädigung nicht mehr induziert und führt zur Ansammlung weiterer Mutationen, welche die Tumorentstehung zusätzlich vorantreiben. Oder aber die Induktion der Apoptose kann nicht mehr erfolgen oder ist zumindest vermindert.

Durch mutiertes Rb wiederum kann die Zelle den G1/S Kontrollpunkt auch dann passieren, wenn nicht genug Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Umgekehrt können Mutationen die Daueraktivierung von Zellzyklusfördernden Proteinen, wie den Cyclinen, herbeiführen, sodass der Zellzyklus weitergetrieben wird, ohne zum Stillstand zu kommen (Novak et al. 2002).

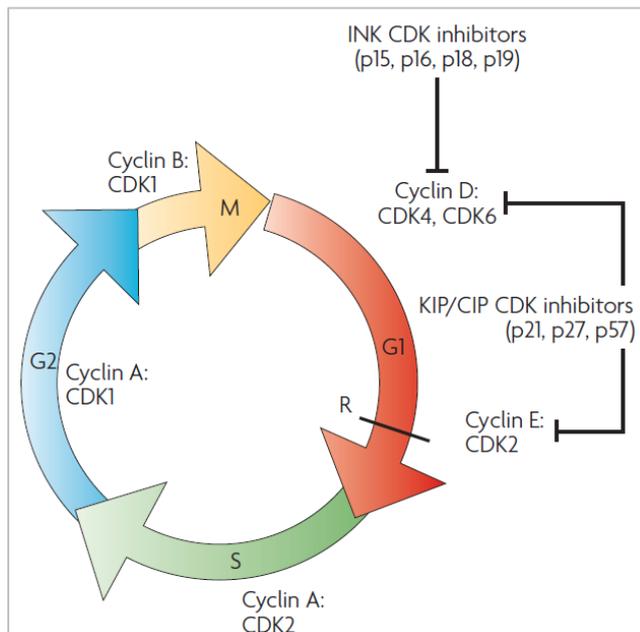


Abbildung 1-2: Übersicht über die Regulation des Zellzyklus. Der Zellzyklus lässt sich in vier verschiedene Stadien einteilen. In der M Phase findet die Mitose statt, also die Teilung der Zelle und des genetischen Materials. In der S Phase, der Synthese Phase, wird wiederum die DNA verdoppelt. Und dann gibt es noch die G1 und G2 Phasen. Die G1 Phase ist bedeutend, da die Zelle in dieser Phase auf ihre Umgebung reagieren kann, indem die Entscheidung getroffen wird, ob sich die Zelle nochmals teilt oder in einen Ruhestand übergeht, der G0 Phase. Zudem spielen die sogenannten Kontrollpunkte eine wichtige Rolle (Elledge 1996). Details zum Zellzyklus finden sich im oberen Textabschnitt (Abbildung aus Dehay & Kennedy 2007)².

² Reprinted by kind permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews. Neuroscience, (Dehay, C., & Kennedy, H. Cell-cycle control and cortical development, 8(6), 438–50. doi:10.1038/nrn2097), copyright (2007). <http://www.nature.com/nrn/index.html>

1.3 Cisplatin

Bei Cisplatin handelt es sich um eines der am häufigsten eingesetzten Zytostatika, welches zur Behandlung von Lungentumoren sowie vieler anderer Tumore, wie Hoden-, Gebärmutterhals-, Kopf-, Nacken-, Darm- und Blasenkrebs dient. Chemisch wird es in die Gruppe der Alkylantien eingeordnet. Cisplatin bindet an die DNA, genauer genommen an die Nukleobasen, führt dadurch zur DNA-Schadens-Antwort und leitet entweder einen permanenten Proliferationsarrest ein, auch als Seneszenz bezeichnet, oder aber den apoptotischen Zelltod. Trotz des anfänglich guten Ansprechens der Therapie kommt es vermehrt zur Resistenzentwicklung der Krebszellen gegenüber Cisplatin. In den letzten Jahrzehnten wurde viel unternommen, um die Wirkungsweise der Resistenzbildung zu ermitteln und dieser entgegen zu wirken (Galluzzi et al. 2014; Ott & Gust 2006).

Aufnahme und Aktivierung von Cisplatin

Nach der Injektion wird das verfügbare unveränderte Cisplatin aus dem Blut in die Zellen aufgenommen, u.a. durch passive Diffusion oder aber, wie neuerdings herausgefunden, aktiv über verschiedene Transporter (*Copper transporter 1 und 2 (Ctr1 und 2)*, *P- type copper-transporting Adenosinriphosphatases (ATP7A und ATP7B)*, *Organic cation transporter 2 (OCT2)*, *Multidrug extrusion transporter 1 (MATE)*) (Ciarimboli 2012; Wang & Lippard 2005). Im Zytosol findet aufgrund der niedrigen Chloridkonzentration (4 mM) die Bildung eines reaktiven Aquaplatin(II)-Komplexes statt. Dieser bindet dann im Kern meist an zwei benachbarte Nukleobasen eines DNA-Stranges, v.a. an Guanine (in 65 % der Fälle), und bildet so Addukte aus. Eine derartige Form der Quervernetzung bezeichnet man als *intrastrand crosslink* (Abbildung 1-3). Dabei kommt es in einer nukleophilen Substitutionsreaktion zum Austausch der H₂O-Gruppen gegen den nukleophilen Reaktionspartner, wodurch eine kovalente Bindung mit dem Nukleophil entsteht (Abbildung 1-3). Bei starken Nukleophilen (z.B. Methionin oder Cystein) findet auch ein direkter Austausch der Chloridgruppen statt, wohingegen bei schwachen Nukleophilen (z.B. Guanin) die

oben erwähnte Hydrolysierung von Cisplatin vorangeschaltet ist. Die als *interstrand cross-link* genannte Vernetzung zweier Basen an komplementären Strängen tritt dagegen nur selten auf (1 %), ebenso eine Cisplatin-DNA-Protein-Vernetzung (Ott & Gust 2006).

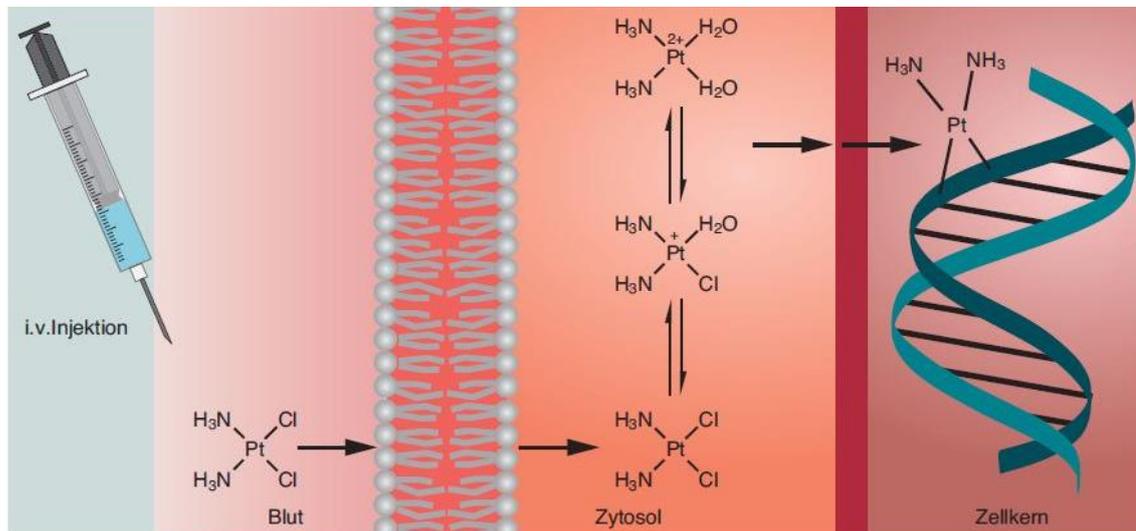


Abbildung 1-3: Aufnahme und Aktivierung von Cisplatin unter physiologischen Bedingungen. Nach der Injektion wird das Cisplatin aus dem Blut in die Zellen aufgenommen. Dort entstehen reaktive Aquaplatin(II)-Komplexe, welche dann mit DNA-Basen interagieren können und so v.a. *intrastrand crosslinks* herbeiführen (aus Ott & Gust 2006)³

1.3.1 Wirkungsweise

Cisplatin führt, wie schon im vorhergehenden Abschnitt erklärt, zur Entstehung von DNA Addukten, welche eine Konformationsänderung der DNA bewirkt. Der DNA Schaden wird anschließend durch über 20 Proteine der Schadenserkennung erkannt (u.a. Proteine des Mismatch Reparatur (MMR) Komplexes) (Siddik 2003). Abhängig von dem Ausmaß der DNA-Schädigung und davon, welche Proteine an der Erkennung beteiligt sind, gibt es unterschiedliche Ausgänge für die betroffenen Zellen: Zum einen können sie in den Zellzyklusarrest gehen bis die Schäden durch Reparaturprozesse, wie der NER (Nukleotid-exzisionsreparatur) oder MMR behoben sind, oder aber in eine permanente Form des

³ Ott, I., & Gust, R.: Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. Pharmazie in Unserer Zeit, 2006, 35(2), 124–133. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Zellzyklusarrestes, nämlich der Seneszenz übergehen. Zum anderen können sie Apoptose einleiten, eines der häufigsten Schicksale nach Cisplatin Behandlung. Dies erfolgt zum größten Teil über den intrinsischen Weg ab, in Abhängigkeit vom Tumorsupressorprotein p53, zum Teil jedoch auch über den extrinsischen Weg über die Aktivierung der Caspase 8 (Ott & Gust 2006; Siddik 2003; Florea & Büsselberg 2011).

Die Zytotoxizität des Cisplatins wird hauptsächlich auf die DNA-schädigende Wirkung zurückgeführt, doch tritt diese auch in entkernten Zellen auf, was auch auf die Bindung von Cisplatin an andere zelluläre Moleküle hindeutet (L Galluzzi et al. 2012). Es ist erwiesen, dass Cisplatin an eine beträchtliche Anzahl von endogenen Nukleophilen binden kann, wie z.B. an reduziertes Glutathion, an die Aminosäure Methionin, an Metallothionein oder an sonstige Proteine mit einer Cysteingruppe, was wiederum ein Grund für die Inaktivierung von Cisplatin darstellt (Basu & Krishnamurthy 2010). Metallothionein schützt die Zelle durch seine Fähigkeit reaktive Sauerstoffverbindungen zu binden vor oxidativem Stress. ROS können zur Induktion von Apoptose führen kann und deren konzentrationsabhängige Generierung durch Cisplatin wurde bereits gezeigt (Florea & Büsselberg 2011).

1.3.2 Resistenzbildung

Die der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin zugrundeliegenden Mechanismen lassen sich in vier Arten von Zellveränderungen einteilen: Entweder wird A) die Interaktion von Cisplatin mit der DNA verhindert (*pre-target resistance*) oder es handelt sich um verstärkte B) Entfernung der DNA Addukte (*on-target resistance*). Des Weiteren führen auch die Hemmung von C) Signalkaskaden, welche nach der Cisplatin Applikation für gewöhnlich den Zelltod herbeiführen (*post-target resistance*) oder D) veränderte Signalwege, welche nur indirekt an der Cisplatin-Wirkung beteiligt sind, zur Resistenz gegenüber Cisplatin (*off-target resistance*) (L Galluzzi et al. 2012).

Als erste Hürde wird Cisplatin zunächst durch sich im Blut befindliche Nukleophile abgefangen, wie etwa Serumproteine (z.B. Albumin, aufgrund seines Cysteinanteils). So ist nur noch maximal 35% des Cisplatins nach intravenöser Gabe wirklich verfügbar. Auch

in der Zelle sind Nukleophile vorzufinden, welche schon im vorherigen Abschnitt erwähnt wurden, wie z.B. das Glutathion, dessen Level in resistenten Tumoren oft erhöht ist. Weiterhin kann eine verminderte Aufnahme des Cisplatin (z.B. aufgrund von mutiertem, nicht funktionellem CTR 1) ebenso eine reduzierte Akkumulation von Cisplatin in der Zelle bewirken wie der verstärkte Export aus der Zelle (durch Überexpression von u.a. MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2), auch ABCC2 (*ATP-binding cassette, subfamily C2*) genannt oder ATP7B (Galluzzi et al. 2014; Siddik 2003; L Galluzzi et al. 2012)).

Die *on-target resistance* ist zum einen an erhöhter DNA Reparatur festzumachen, u.a. durch die Überexpression von ERCC 1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) oder BRCA1/BRCA2 (*breast cancer 1, early onset*)) bedingt, zum anderen führt verminderte DNA-Schadenserkennung, z.B. durch Mutationen einiger MMR-Proteine, zum Überleben der entarteten Zelle.

Bei der *post-target resistance* sind wiederum Proteine der Apoptose-Maschinerie mutiert und haben daher die Fähigkeit verloren, Apoptose einzuleiten. Eines der wichtigsten Moleküle hierbei stellt der Tumorsuppressor p53 dar, welcher in mehr als 50% aller Tumore mutiert und daher inaktiv ist. Auch die Inhibition von MAPKinase p38 und JNK (*c-JUN N-terminal kinase*) scheint die Resistenz gegen Cisplatin zu begünstigen (Mansouri et al. 2003; Bragado et al. 2007; L Galluzzi et al. 2012). Doch es gibt auch Studien, die das genaue Gegenteil zeigen (Siddik 2003). Desweiteren gibt es Untersuchungen, welche belegen, dass die Überexpression anti-apoptotischer Proteine, wie z.B. Bcl 2, Bcl XI oder Survivin, oder die Inaktivierung apoptotischer Proteine, wie z.B. Caspasen (z.B. Caspase 4 (Cetintas et al. 2012)), die Resistenzbildung fördern.

Die *off-target resistance* stellt das Schlusslicht in dieser Einteilung dar. Dabei sind Signalwege verändert, welche nicht mit der Cisplatin-Wirkung im Zusammenhang stehen, wie z.B. HER-2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) oder der PI3-K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt Signalweg, welche, sofern sie überexprimiert sind, ebenfalls eine Resistenz herbeiführen. All diese Informationen stellen natürlich eine Strategie zur

Bekämpfung von Resistenzen dar, die in Abbildung 1-4 gelistet sind und auf die teilweise in der Diskussion näher eingegangen wird (Galluzzi et al. 2012).

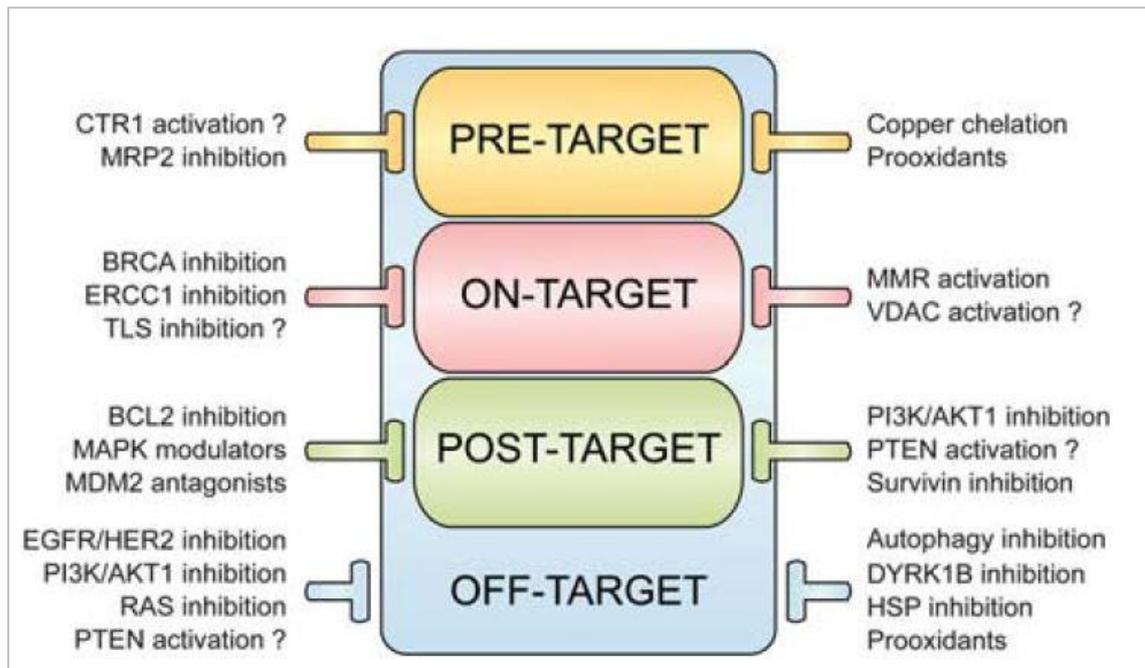


Abbildung 1-4: Mechanismen zur Überwindung der Resistenz gegenüber der Cisplatin-Behandlung. Die Inhibition bzw. Aktivierung der entsprechenden, hier aufgelisteten Proteine oder Signalwege dienen als Strategie zur Bekämpfung der Resistenzbildung. Erläuterungen hierzu finden sich im oberen Abschnitt. TLS, *translesion synthesis*; VDAC, *voltage-dependent anion channel*; MDM2, *Mouse double minute 2 homolog*; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; RAS, *Rat sarcoma*; DYRK 1B, *dual-specificity Y-phosphorylation-regulated kinase 1B*; HSP, *heat-shock protein*. (aus Galluzzi et al. 2012)⁴

⁴ Reprinted by kind permission from Macmillan Publishers Ltd: *Oncogene* (Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., ... Kroemer, G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–83. doi:10.1038/onc.2011.384), copyright (2012) <http://www.nature.com/onc/index.html>

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Prozesse während der Cisplatin-induzierten Apoptose besser zu verstehen, um Erkenntnisse zu erhalten, mit welchen die Cisplatin-Therapie optimiert werden könnte. Cisplatin ist eines der am meisten eingesetzten und effektivsten Chemotherapeutika, jedoch mit der Limitierung, dass viele Tumore Resistenzen ausbilden. Trotz jahrelanger Forschung auf diesem Gebiet lässt sich eine Resistenzentwicklung meist nicht umgehen, da es sich dabei um komplexe Vorgänge handelt, bei denen viele Faktoren zusammenspielen (siehe 1.3.2).

Um die Cisplatin-induzierte Apoptose näher zu untersuchen, wurde ein Mikroskopie-basierter Chemikalienscreen zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen durchgeführt. Die A549 Linie ist eine humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie und gehört damit zu den Zielzellen von Cisplatin. Die eingesetzten Substanzen entstammen der „*Known Bioactives*“ Bibliothek des *Institute of Chemistry and Cell Biology* (ICCB) sowie der „*FDA (Food and Drug Administration) approved Drugs*“ Bibliothek. Dabei sind die Zielproteine oder -proteinklassen vieler Substanzen bekannt, was zum Verständnis der Mechanismen beiträgt.

Diese Untersuchung soll helfen, sowohl Sensibilisatoren als auch Suppressoren der Cisplatin-induzierten Apoptose zu ermitteln. Hierdurch erhaltene Erkenntnisse können so in das bereits bestehende Wissen eingeordnet werden, um dieses zu erweitern.

Sensibilisatoren aus der FDA Bibliothek sind dabei natürlich besonders interessante Substanzen. Sie könnten aufgrund ihrer Zulassung als Medikamente bereits nach wenigen Untersuchungen in der Therapie eingesetzt werden, um die Cisplatin-Wirkung zu optimieren. Suppressoren aus dieser Bibliothek hingegen sind insofern von Bedeutung, da sie eventuell, ohne Wissen über ihre supprimierende Wirkung, bereits mit Cisplatin verabreicht wurden, mit dem Resultat einer schwächeren Cisplatin-Wirkung. Und dies ließe sich so natürlich verhindern.

Die hierzu eingesetzte Hochdurchsatzmikroskopie, ermöglicht eine Analyse auf Einzelzellebene sowie die gleichzeitige Auswertung verschiedener Parameter, sodass Informationen über den Apoptose-Status erhalten werden, die aber gleichzeitig eine Unterscheidung zur Nekrose erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und sonstiges Material

Tabelle 2-1: Eingesetzte Chemikalien und Materialien mit ihren Bezugsquellen

Chemikalie oder sonstiges Material	Bezugsquelle
4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für Fluoreszenzmikroskopie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
(2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxime (BIO)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Colbe
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ATP (Adenosintriphosphat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
CGK 733 (ATM/ ATR Inhibitor)	Calbiochem /Merck Millipore Darmstadt
Cis-Diamindichlorplatin(II) (Cisplatin, CDDP)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
CompactPrep Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Coelenterazin Luziferase	BIOSYNTH AG, Konstanz
Cytotoxicity Detection KitPlus (LDH Test)	Roche, Mannheim
Cystain DNA-05-5004 (DAPI-Solution = 4',6-Diamidin-2-phenylindol)	System Partec GmbH, Görlitz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

DPBS-/-) (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (- CaCl ₂ /- MgCl ₂)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECL-Lösung Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Safe	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Filme	GE Healthcare, Freiburg
Firefly Luziferin	BIOSYNTH AG, Konstanz
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Colbe
G418 (Geneticin)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycylglycin	Applichem GmbH, Darmstadt
H2B-GFP Plasmid	Addgene, Cambridge MA, USA
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HCL (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Hoechst 33342 (Bis-Benzimid)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Saliter, Obergünzburg
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge	Merck, Darmstadt
p7LEF-luc TOPFLASH	(Davidson et al. 2005)
Passive Lysis buffer (PLB)	Promega, Mannheim
pCS2+ LacZ	(Davidson et al. 2005)
pTK-Rluc Renilla	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
PeqGOLD Protein-Marker IV	PeqLab, Erlangen
Pipettenspitzen	Corning Life Sciences, USA
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Merck Millipore, Darmstadt
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Q-VD-OPH (Pan Caspase Inhibitor) (N-(2-Quinoly)-L-valyl-L-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy) methylketone)	Enzo Life Sciences
Reaktionsgefäße (Falcon) (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Screen-Well® FDA approved drug library	Enzo Life Sciences, Lörrach
Screen-Well® ICCB Known Bioactives library	Enzo Life Sciences, Lörrach
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Staurosporin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris-HCl, Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin 0,25%-EDTA	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten, mit flachem Boden, verschiedene Größen	Greiner Labortechnik, Nürtingen
Z-VAD-FMK (Pan Caspase Inhibitor)	Enzo Life Sciences, Lörrach

Tabelle 2-2: Eingesetzte Antikörper und ihre Bezugsquellen

Antikörper	Größe (kD)	Verdünnung	Sekundär-Antikörper Spezies	Vetrieb
Primärantikörper				
Bcl-2 (100)	26	1/1000	Maus	Santa Cruz
Bcl-xl	26	1/1000	Kaninchen	Transduction Laboratories
β-Catenin (C2206)	94	1/2000	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Caspase-8 (1C12)	18/ 43/ 57	1/1000	Maus	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	17/19	1/400	Kaninchen	Cell Signaling
Cleaved Caspase-7 (Asp175)	20/35	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
cleaved Caspase-9 (Asp 315)	35	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
GSK-3β (27C10)	46	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
MAPKAPK 2 (C-18)	45	1/1000	Ziege	Santa Cruz
p53 (FL-393)	53	1/1000	Kaninchen	Santa Cruz
PARP 1/2 (H-250)	1=116/89/24 2=62	1/1000	Kaninchen	Santa Cruz

PCNA (PC-10)	36	1/1000	Maus	Santa Cruz
phosphospezifische Primärantikörper				
Phospho-Chk 1 (Ser345)	62	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
Phospho-H2A.X (Ser139)	15	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
Phospho-MAPKAPK- 2 (Thr334)	49	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
Phospho-p53 (Ser15)	53	1/1000	Kaninchen	Cell Signaling
Sekundärantikörper				
Antikörper	Verdünnung		Vetrieb	
anti-goat-HRP	1/5000		DakoCytomation	
anti-mouse-HRP	1/5000		DakoCytomation	
anti-rabbit-HRP	1/5000		DakoCytomation	

Tabelle 2-3: Eingesetzte siRNA Sequenzen und ihre Bezugsquellen

siRNA	Sequenz	Vetrieb
β -Catenin 1	5'-AGC UGA UAU UGA UGG ACA G TT-3'	MWG
β -Catenin 2	5'-CAG UUG UGG UUA AGC UCU U AC-3'	MWG
dsR	5'-AGU UCC AGU ACG GCU CCA A TT-3'	MWG
GSK-3 β	5'-GAG CAA AUC AGA GAA AUG AAC TT-3'	MWG bzw. (Kulikov et al. 2005)

2.1.2 Laborgeräte und Softwareprogramme

Tabelle 2-4: Laborgeräte und Softwareprogramme

Geräte/Software	Vertrieb
Block Heater	Stuart, Bibby Scientific, UK
Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus Christ, Fellbach
CellQuest Pro x.x	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer (FACS LSR II)	BD Biosciences, Heidelberg
Einfriergefäß	Nalgene™, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Elektrophorese Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Elektrophorese Power Supply Peq Power	PeqLab, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Heidolph Polymax 1040 Schüttler	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Image J 1.46m [32-bit]	National Institute of Health, Bethesda (USA) http://rsb.info.nih.gov/ij
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten-Zentrifuge ROTIXA/RP	Hettrich GmbH, Tuttlingen
Minifuge RF	Heraeus Christ, Fellbach
Mini-Protean®3-System	Bio-Rad, München
Scan^R Aquisition/Analysis Software	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Christ, Fellbach
Stickstofftank Locator 8 Plus Thermolyne	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Ultraschall Multiporator, Branson Sonifier 250	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Ultraschallgerät Ultrasonic cleaner Branson 200	Branson, Emerson, Danbury, USA
Mikrotiter Plattenreader Versamax (LDH Test)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Vortex-Genie 2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserbäder	GFL 1083, Grossburgwedel
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim
Zentrifuge Digifuge GL	Heraeus Christ, Fellbach

2.1.3 Puffer und Lösungen

Proteinanalytik

Tabelle 2-5: Zusammensetzung des Lysepuffers nach Laemmli

Lysepuffer (2x)	
1M Tris pH 6,8	12,5 ml
Glycerin	20 ml
20 % SDS	20 ml
Bromphenolblau	25 mg
β -Mercaptoethanol	10 %
H ₂ O	47,5 ml

Tabelle 2-6: Zusammensetzung der SDS Gele

Sammelgel (5%)	
Acrylamid	5 %
1M Tris pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

Trenngel (6-15%)	
Acrylamid	6-15 %
1M Tris pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

Tabelle 2-7: Zusammensetzung des Laufpuffers

Laufpuffer	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

Tabelle 2-8: Zusammensetzung des Blotpuffers

Blotpuffer	
TRIS BASE	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol	10 %

Tabelle 2-9: Zusammensetzung des TBS

TBS	
TRIS-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Auf pH 7,6 einstellen	
Für TBS-T: 0,1 % Tween hinzufügen	

Tabelle 2-10: Zusammensetzung des Stripping-Puffers

Stripping-Puffer	
TRIS pH 7,6	62,5 mM
SDS	2 %
β -Mercaptoethanol	100 mM

Topflash-Reportergen Test

Tabelle 2-11: Zusammensetzung des Gly-Gly- sowie des Coelenterazin Puffers

Gly-Gly-Puffer	
Glycylglycin	25 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	15 mM
EGTA	4 mM
Auf pH 7,8 einstellen	

Coelenterazin-Puffer	
K ₂ HPO ₄	87 mM
KH ₂ PO ₄	13 mM
NaCl	0,5 M
EDTA	1 mM
Auf pH 7,6 einstellen	

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der verschiedenen Reaktionspuffer

Luziferin Reaktionspuffer	
DTT	0,1 µM
ATP	0,1 µM
In Gly-Gly Puffer	

Luziferin Reaktionsmix	
Firefly Luziferin	1 mM
In Gly-Gly Puffer	

Renilla Reaktionslösung	
Coelenterazin Luziferin	1 mM
In Coelenterazin Puffer	

Der Passive Lysis buffer (PLB) wurde für die Verwendung 1:5 in Wasser verdünnt.

Aufgefüllt wurden alle Lösungen jeweils mit bidestilliertem Wasser.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit Zellen wurde immer an einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Medien, Puffer, Lösungen sowie sonstige Materialien waren steril gefiltert, autoklaviert, hitzesterilisiert oder desinfiziert.

Verwendete Zelllinie

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um vier verschiedene menschliche Zelllinien, welche in Tabelle 2-13 näher beschrieben sind.

Tabelle 2-13: Charakterisierung der in der Arbeit eingesetzten Zelllinien

Name	Beschreibung	Kulturmedium	Herkunft
A549	Menschliches Lungenkarzinom, Typ-II Alveolarepithelzellen	DMEM, + 10% FCS, + 0,5% Penicillin/ Streptomycin + 2mM L-Glutamin	ATCC
HCT 116	Menschliches Colonkarzinom, Epithelzellen	DMEM, + 10% FCS, + 0,5% Penicillin/ Streptomycin	ATCC
Hela CCL2	Menschliches Cervixkarzinom, Epithelzellen	DMEM, + 10% FCS, + 0,5% Penicillin/ Streptomycin	ATCC
A549 H2B-GFP	A549 Zellen, stabil transfiziert mit H2B-GFP Plasmid	DMEM, + 10% FCS, + 1% Penicillin/ Streptomycin + 2mM L-Glutamin + 1mg/ml G418	A549 → ATCC Plasmid von Addgene

Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen erst einem Waschschrift mit PBS unterzogen und anschließend zur Ablösung der Zellen von der Flaschenoberfläche 4 Minuten lang im Brutschrank mit 1 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Trypsin ist ein Enzym, welches Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen auflöst; EDTA hingegen kann als Chelatkomplexbildner Ionen abfangen, wie Kalzium und Magnesium, welche einen inhibierenden Effekt auf Trypsin haben. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 9ml Medium abgestoppt und die Zellen resuspendiert bevor die Zellzahl bestimmt werden konnte und die Zellen entweder ausgesät wurden oder aber passagiert wurden. Das Passagieren erfolgte montags und freitags, wobei montags 0,5-Mio Zellen, freitags 1 Mio Zellen in eine Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm²) ausgesät wurden.

Langzeitkonservierung und Auftauen der Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Um die Zellen einzufrieren, wurden sie zunächst vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Falconröhrchen transferiert für den nachfolgenden Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 1500 rpm). Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet in der entsprechenden Menge Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 10% DMSO) aufgenommen und auf Kryogefäße verteilt, sodass sich hinterher 3-4 Millionen Zellen in jedem Kryogefäß befanden. Anschließend wurden sie in einem Einfriergefäß, welches ein langsames, kontrolliertes Einfrieren ermöglichte (-1°C/ Minute), über Nacht auf -80°C heruntergekühlt, bevor sie zur Langzeitlagerung in dem Stickstofftank eingefroren wurden.

Das Auftauen der Zellen sollte schnell erfolgen und fand daher im Wasserbad bei 37°C statt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15ml-Falconröhrchen mit 10 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, um das DMSO herauszuwaschen. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium resuspendiert und in eine

Zellkulturflasche überführt. Nach zweiwöchigem Kultivieren der Zellen konnten diese für die Experimente verwendet werden.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dabei wurde etwas unverdünnte Zellsuspension auf die Kammer mit Deckgläschen gegeben und anschließend die Zellen in den vier Quadranten unter dem Lichtmikroskop gezählt. Der Mittelwert der vier ausgezählten Zellzahlen multipliziert mit 10^4 ergibt die Zellzahl/ ml Suspension.

Bestimmung der Verdopplungszeit

Die Formel zur Berechnung der mittleren Verdopplungszeit lautet folgendermaßen:

$$x = \ln(2) / \text{Steigung (k)}$$

mit x = Verdopplungszeit in Stunden.

Die Berechnung für die entsprechende Zelllinie ist im Folgenden aufgeführt:

A549

$$y = 828,87 \cdot e^{0,0277x}; (R^2 = 0,9867)$$

Dabei entspricht 828,87 der Anfangszellzahl und $e^{0,0277}$ der Steigung k .

R^2 ist das Bestimmtheitsmaß und stellt ein Qualitätsmaß für die Annäherung der gemessenen Werte an die ideale Exponentialfunktion dar.

Um die Verdopplungszeit zu berechnen setzt man $y = 2 \cdot 828,87 = 1657,74$.

$$1657,74 = 828,87 \cdot e^{0,0277x}$$

$$2 = e^{0,0277x}$$

$$x = \ln(2) / \text{Steigung (k)}$$

$$= \ln(2) / 0,0277$$

$$= \underline{\underline{25,02 \text{ Stunden}}}$$

A549 H2B-GFP

$$y = 755,33 \cdot e^{0,0274x}; (R^2 = 0,9913)$$

$$= \ln(2) / 0,0274$$

$$= \underline{25,29 \text{ Stunden}}$$

2.2.2 Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden 24 oder 48 Stunden (bei RNAi-Experimenten) vor der Inkubation mit Cisplatin oder anderen Substanzen in den entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät. Die Behandlungslösung wurde entweder direkt in das Medium der ausgesäten Zellen gegeben, oder es erfolgte zuerst die Abnahme des Mediums und anschließend die Zugabe der Behandlungslösung. Sofern Inhibitoren verwendet wurden, so erfolgten eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit diesen und anschließend die Behandlung mit Cisplatin. Das Cisplatin war in bidestilliertem Wasser gelöst, wohingegen die Inhibitoren alle in DMSO gelöst waren. Die Zellzahlen sowie weitere Informationen zu den Behandlungen in den jeweiligen Experimenten sind in Tabelle 2-14 dargestellt.

Tabelle 2-14: Verwendete Zelldichten und weitere Informationen zu durchgeführten Experimenten

Experiment	Zelllinie	Kulturgefäß	Ausgesäte Zellzahl/ Volumen
Durchflusszytometrie	A549/A549 H2B-GFP	6-Wellplatte	$5 \cdot 10^5$ in 3 ml
Mikroskopie und LDH Test	A549/A549 H2B-GFP	96-Wellplatte	$1,2 \cdot 10^4$ in 100 μ l
Mikroskopie: Screen/ Inhibitor-Experimente	A549/HCT 116/HeLa	96-Wellplatte	$8 \cdot 10^3$ in 100 μ l
Proteinanalytik	A549/A549 H2B-GFP	6-Wellplatte	$1,4 \cdot 10^5$ in 3 ml
RNAi-Experimente	A549	96-Wellplatte	$8 \cdot 10^3$ in 100 μ l
Topflash-Reportergen Test	A549	96-Wellplatte	$6 \cdot 10^3$ in 100 μ l
Zeitverlauf	A549 H2B-GFP	12-Wellplatte	$2 \cdot 10^4$ in 1,5 ml

Die Experimente in 3.5.1 und 3.5.2 sind von der Masterstudentin Bianca Schatz während eines Praktikums durchgeführt worden.

2.2.3 Methoden zur Charakterisierung der Zellen und der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität

Automatisierte Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie

Die Hochdurchsatz-Mikroskopie stellt eine Methode dar, mit welcher viele unterschiedliche Parameter und somit Zelleigenschaften gleichzeitig detektiert werden können. Die Anfärbung der Zellkerne geben bereits Aufschluss über Zellzahl, Zellzyklus oder Apoptose. Durch die Fluoreszenz-Markierung von Proteinen können weitere Informationen auf Einzelzellebene erhalten werden. Im folgenden Experiment sollte die Auswirkung von Cisplatin auf die Lebendzellzahl sowie auf den Zelltod näher untersucht werden.

A549 und A549 H2B-GFP Zellen wurden hierfür in eine 96-Wellplatte ausgesät und am nächsten Tag mit Cisplatin (50 μM oder 100 μM) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach der halbstündigen Färbung mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (Hoechst) und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI) im Brutschrank erfolgte die automatisierte Aufnahme von vier Bildern je Well am Olympus IX-81 Fluoreszenzmikroskop. Das Hoechst wird mit einem UV-Laser angeregt und an DNA gebunden besitzt es sein Absorptionsmaximum bei 355 nm, das Emissionsmaximum beträgt wiederum 465 nm, das Absorptionsmaximum von PI wiederum liegt in dem Falle bei 540 nm, sein Emissionsmaximum bei 608 nm. GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima (395 nm und 475 nm), das Emissionsmaximum beträgt 509 nm. Die akquirierten Bilder umfassen bei 10-facher Vergrößerung jeweils eine Fläche von 0,57 mm^2 (867x660 μm^2 , 1344x1024 Pixel). Insgesamt repräsentieren die aufgenommenen Bildausschnitte somit etwa 8 % der Gesamtoberfläche eines Wells der 96-Wellplatte. Die Akquisition und Analyse der Bilder wurde mit der Olympus Scan^R Software durchgeführt, welche im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

Auswertung des Apoptoseassays

Alle Zellen werden über die Hoechst-Färbung der Zellkerne von der Scan^R Software erkannt. Dazu wird eine Kernmaske erstellt, die über das Hoechstsignal. bei den A549 H2B-GFP Zellen über das GFP Signal gelegt wird. Jeder Kern wird darin als Objekt erfasst, Randobjekte bleiben dabei unberücksichtigt. Diese Vorgehensweise ist in Abbildung 2-1 visualisiert.

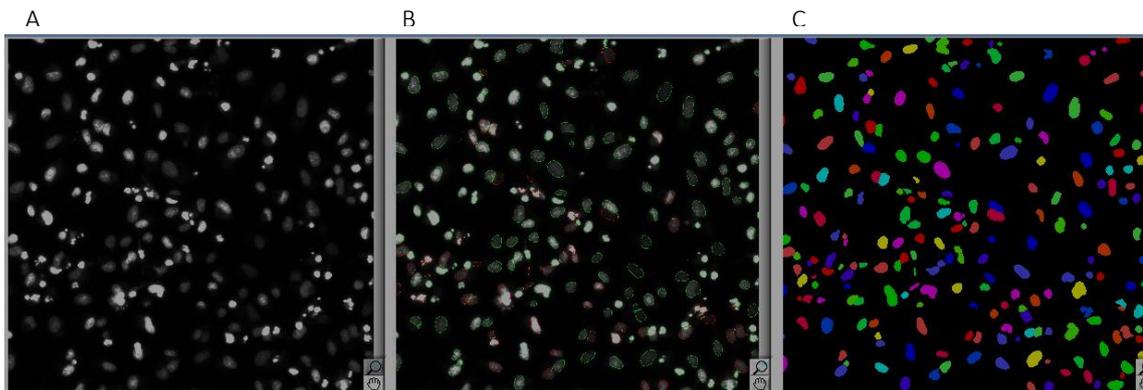


Abbildung 2-1: Generierung der Kernmaske durch die Scan^R Analysis-Software. In (A) sind die mit Hoechst gefärbten Zellkerne der A549-Zellen dargestellt, während (B) die Software-basierte Erkennung der Zellkerne als Objekte aufzeigt. (C) stellt die fertig erstellte Kernmaske dar.

Mittels der Unterschiede in der Hoechst/GFP Intensität und dem Vorhandensein der PI Färbung kann einerseits zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden (Latt & Wohlleb 1975; Crompton et al. 1992). Weiterhin ist auf diese Weise auch die Einteilung der toten Zellen in frühapoptotische, spätapoptotische und nekrotische Zellen möglich, welche in Abbildung 2-2 dargestellt ist. Hoechst ist fähig die Membran lebender Zellen zu passieren, wohingegen PI nur in die Zelle gelangen kann, wenn die Zellmembran beschädigt ist. Lebende Zellen (grüner Kasten) zeichnen sich durch eine moderate Hoechst Intensität im Zellkern aus sowie der fehlenden PI Färbung. Bei frühapoptotischen Zellen (blauer Kasten) ist die Zellkernfärbung durch Hoechst sehr intensiv, da die DNA kondensiert, doch auch hier ist aufgrund der noch intakten Zellmembran noch kein PI im Zellkern vorhanden. Während der späten Apoptose (roter Kasten), bei welcher die DNA weiterhin kondensiert oder auch schon fragmentiert vorliegt, beginnt die Plasmamemb-

ran immer durchlässiger zu werden, was anhand des Einstroms des PI erkennbar ist. Nekrose (rosa Kasten) ist eine unkontrollierte Form des Zelltodes und zeigt im Gegensatz zur Apoptose keine DNA Kondensierung, weshalb die Intensität des Hoechstsignals nur moderat ist. Während der Nekrose platzt die Zellmembran, sodass sie dann auch permeabel für das PI wird.

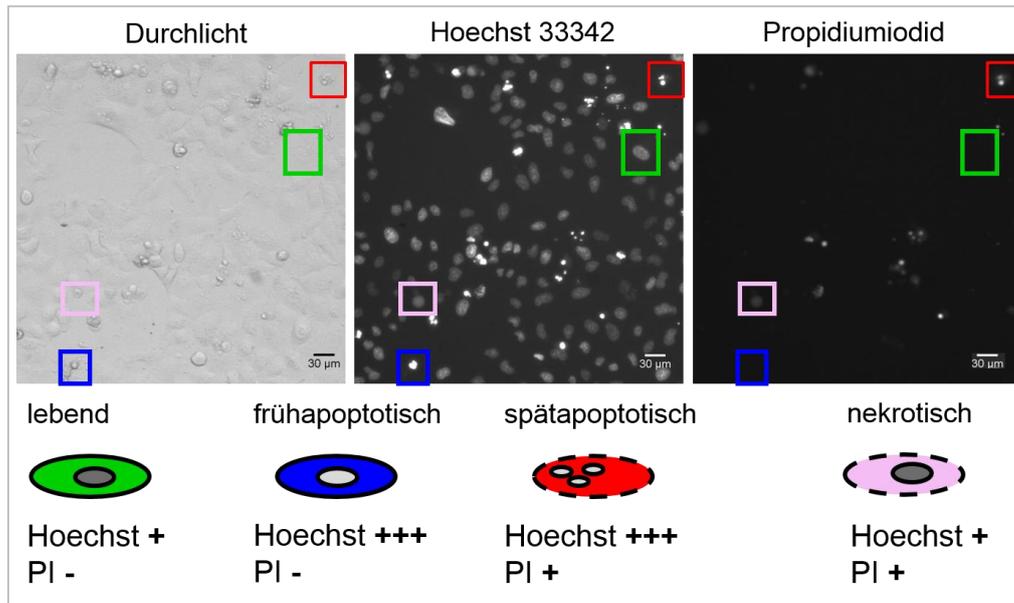


Abbildung 2-2: ScanR Analyse der Mikroskopiebilder. Die Einteilung der Zellen in lebende Zellen, sowie in die verschiedenen Arten des Zelltodes erfolgt mittels unterschiedlicher Hoechst und PI Intensitäten. Die Färbung erfolgte 30 Minuten vor der Aufnahme.

Laktat Dehydrogenase Test (LDH Test)

Dieser Test beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis von freigesetzter Laktat Dehydrogenase (LDH) als Indikator für eine zerstörte Membran, da LDH normalerweise nur intrazellulär vorkommt (Korzeniewski & Callewaert 1983). Der Nachweis der Aktivität wird über die Umsetzung eines hellgelben Tetrazoliumsalzes (z.B. INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride)) zu einem roten Formazan durchgeführt. Dabei oxidiert die LDH Laktat zu Pyruvat und reduziert NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Nachlas et al. 1960). In der zweiten Reaktion wird durch den Katalysator Diaphorase $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder zu NAD^+ umgesetzt und gleichzeitig wird das Tetrazoliumsalz zum roten Formazan reduziert. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Menge der freigesetzten LDH und somit zur Membranschädigung. Für die Untersuchung der Membranschädigung wurde das Cytotoxicity Detection KitPlus angewendet.

Hierfür wurden A549 bzw. A549 H2B-GFP Zellen in eine 96-Wellplatte ausgesät und am folgenden Tag für 24 bzw 48 Stunden mit 50 bzw. 100 μM Cisplatin inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, 50 μl der jeweiligen Überstände in eine neue 96-Wellplatte überführt und in 50 μl PBS verdünnt. Nach Zugabe des Katalysators und der Farbstofflösung (100 μl) folgte eine Inkubation im Dunkeln bis ein Farbumschlag in der Positivkontrolle (1% Triton X-100) zu sehen war. Die Reaktion wurde mit 50 μl einer 1 N HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption des Farbstoffes mit einem Plattenspektrometer bei 450 nm gemessen. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen, die 10 min vor der Messung durch die Zugabe von Triton X-100 lysiert wurden (1% Endkonzentration) und damit der maximalen LDH-Freisetzung entsprechen. Die Werte wurden alle auf die Positivkontrolle normiert, welche auf 100% gesetzt wurde.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Messung von Signalen, welche von einzelnen Zellen erhalten werden, während sie in einem Flüssigkeitsstrom einen Lichtstrahl passieren. Es ist möglich, mehrere Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation zur selben Zeit zu quantifizieren. Das Durchflusszytometer misst die Absorption, Reflektion und Streuung des Lichtes durch die Zellen und gibt zudem Aufschluss über die emittierte Fluoreszenz.

In einer Zelle ist der Gehalt an chromosomaler DNA durch die Anzahl an Chromosomen definiert. In proliferierenden Zellen verdoppelt sich die chromosomale DNA und damit die Anzahl der Chromosomen in der S Phase des Zellzyklus. Aus diesem Grund ist der DNA Gehalt zwischen der G2 Phase und der Mitose doppelt so hoch wie in einer ruhenden Zelle oder in einer postmitotischen Zelle (G1 Phase oder G0 Phase). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert in die DNA und kann mit einem UV Laser angeregt werden. Da die Fluoreszenzintensität einer Zelle proportional zu ihrem DNA Gehalt ist, kann diese Färbung genutzt werden, um den DNA Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle oder einer Zellpopulation zu bestimmen. Ein typisches Merkmal der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA in kleine Bruchstücke (180 Basenpaare) oder einem Mehrfachen davon. Folglich ist der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen geringer als bei einer Zelle in der G1 Phase, weshalb man diese auch als sub-G1 Zellen bezeichnet. Somit kann die DNA-Färbung auch verwendet werden, um Apoptose in einer Zellpopulation zu quantifizieren.

A549 bzw. A549 H2B-GFP Zellen wurden hierfür in 6-Wellplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit je 1 ml PBS gewaschen. Für das Serumhungern wurde anschließend FCS-freies Medium zu den Zellen gegeben, für alle anderen Behandlungen FCS-haltiges Medium sowie Cisplatin (10/ 50/ 100 μ M). Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen und nach 5 Minuten Behandlung mit Accutase von der Platte abgelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min bei 1500 rpm) und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dieser sowie alle folgenden Schritte

erfolgten auf Eis. Um die Zellen zu fixieren wurden 3 ml eiskaltes Ethanol (100%) unter ständigem Vortexen hinzugegeben. Nach 1 Stunde wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min bei 1500 rpm) und das Pellet in 500 µl DAPI-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 4°C gefärbt.

Direkt vor der Messung wurden 100 µl Probe mit 300 µl PBS verdünnt und gevortext und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. DAPI wird mit einem UV-Laser angeregt und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 358 nm, das Emissionsmaximum beträgt wiederum 461 nm.

Zunächst wurden die H2B-GFP Plasmid tragenden Bakterien (DH5alpha) verfielfältigt, welche von Addgene erhalten wurden, um anschließend das Plasmid mithilfe des CompactPrep Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben (Quiagen) aufzureinigen.

Generierung stabiler A549 H2B-GFP Zellen

Die A549 Zellen wurden hierzu einer fast forward Transfektion unterzogen. Darunter versteht man, dass erst die Zellen ausgesät und nach 24h das H2B-GFP Plasmid hinzugegeben wurde. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf ein Well einer 24-Wellplatte:

$1 \cdot 10^5$ Zellen wurden in 500 μ l Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden sowohl das Plasmid (0,8 μ g bzw. 0,8 μ l) als auch das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (2 μ l) mit Medium (ohne jegliche Zusatzstoffe) auf je 50 μ l aufgefüllt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Plasmid- bzw. Lipofectaminlösung vorsichtig miteinander gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der gebildete Komplex (100 μ l) zu den Zellen (500 μ l) pipettiert wurde. Nach sechsstündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in eine Petrischale (15 cm) überführt, sofern die Transfektion erfolgreich war, was sich am Fluoreszenzmikroskop überprüfen lässt. Zur Selektion der H2B-GFP positiven Klone (mit G418 Resistenz) wurde dem Medium nun G418 hinzugefügt, mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml. Die G418 Stammlösung war in Wasser gelöst. Täglich wurde das Selektionsmedium gewechselt, solange bis Zellkolonien zu sehen waren. Jede Kolonie wurde nach dem Waschen in PBS mit 20 μ l Trypsin abgelöst und in je ein Well einer 96-Wellplatte mit 150 μ l Selektionsmedium transferiert. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen in eine 24-Wellplatte überführt und zuletzt in die Zellkulturflasche.

Zur Kultiveringung wurden die A549 H2B-GFP Zellen, wie auch die A549 Wildtyp Zellen, montags und freitags passagiert, nur eben in Selektionsmedium.

Zeitverlaufsstudien mit den A549 H2B-GFP Zellen

Hierfür wurden die A549 H2B-GFP Zellen in eine 12-Wellplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch 750 μ l frisches Medium ersetzt. Die Behandlung mit Medium oder 50 μ M Cisplatin erfolgte in 500 μ l. Direkt im Anschluss wurde noch 250 μ l PI-Färbelösung hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 0,5 μ g/ml erhalten wurde. Nach 8,5 Stunden Inkubation im Brutschrank fanden über einen Zeitraum von 24h automatisierte Mikroskopieaufnahmen der Zellen statt. Das verwendete Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200M) war dabei mit einer Inkubationskammer ausgestattet, welche die für die Zellen notwendigen Bedingungen (5% CO², 37°C und ausreichend Luftfeuchtigkeit) aufrechterhielt. Die Bilder wurden im Abstand von ca. 2,5 Minuten in den Kanälen Durchlicht, GFP und PI aufgenommen. Die Messung wurde erst zu diesem Zeitpunkt gestartet, weil Vorversuche gezeigt hatten, dass es davor kaum Zellen gibt, welche apoptotische Morphologien aufweisen.

Proteinanalytik

Die Proteinanalytik dient dem Nachweis von spezifischen Proteinen in Zelllysaten, sodass die abgelaufene Reaktion auf molekularer Ebene nachvollzogen werden kann.

A549 Zellen wurden hierfür in eine 6-Wellplatte ausgesät und am nächsten Tag für 24 Stunden mit 50 μM Cisplatin inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 75 μl Lysepuffer (nach Lämmli) lysiert. Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten lang bei 95°C inkubiert, zur Scherung der DNA im Ultraschallbad 3x15 Minuten sonifiziert und bis zur Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel bei -20°C eingefroren.

Doch auch im Anschluss an die RNAi Experimente (im 96-Wellformat), auf welche im übernächsten Abschnitt näher eingegangen wird, wurden die Zellen nach der Mikroskopie noch für proteinanalytische Untersuchungen lysiert. Dabei wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen mit 40 μl Lysepuffer/Well lysiert und wie oben beschrieben weiter behandelt.

Die Lademengen (+/- Cisplatin) sind aneinander angepasst, entweder durch die Gesamtzellzahl (bei vorangehender Mikroskopie) oder durch das Auftragen der doppelten Menge an Lysat der behandelten Zellen (6-Well Format).

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

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht fand eine diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli 1970) statt. Das Laufgel setzte sich aus einem 5 %-igem Sammelgel, sowie aus einem 10 oder 15 %-igem Trenngel, abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine zusammen. Je kleiner das Protein, desto höher sollte der Acrylamidanteil sein, da hierdurch die von dem polymerisierten Acrylamid gebildeten Maschen enger sind. Im Sammelgel werden die Proben zunächst konzentriert, im Trenngel dann in Banden aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde ein vertikales Gelelektrophoresesystem angewendet, das mit Laufpuffer gefüllt wurde. Für eine Stunde lang wurde eine Spannung von

170 V angelegt, bzw. bis die blaue Bromphenolfront das Gelende erreicht hatte. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde zusätzlich ein Proteinmarker im Gel aufgetragen.

Western Blot Analyse

Für die immunologische Detektion der Proteine wurden sie von dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, 0,45 µM Porengröße) übertragen unter Verwendung des Nassblot-Verfahrens (Herrmann & Wiche 1987). Zunächst wurde die Membran in 100 % Methanol aktiviert, damit eine Bindung der Proteine an die Membran erfolgen kann. Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf die Membran überführt mithilfe einer Blot-Kassette. Der einstündige Transfer der Proteine fand in einer gekühlten, mit Blotpuffer gefüllten Blot-Kammer bei 100 V statt.

Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran durch die einstündige Inkubation in 5 % Milchpulver (gelöst in TBS-T) blockiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und danach mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Primäre Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine wurden je nach Herstellerangabe entweder in 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBS-T verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei den Antikörpern gegen phosphorylierte Proteine hingegen erfolgte die Verdünnung in einer 3 % BSA-Lösung. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran zur späteren Detektion des primären Antikörpers mit dem zugehörigen Sekundär-Antikörper (in 5% Milchpulver in TBS-T) inkubiert. Dieser ist gegen die Spezies des Primär-Antikörpers gerichtet und kann mithilfe der an ihn gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP) detektiert werden.

Vor der Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe wurden drei Waschschriffe durchgeführt um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach der Zugabe der ECL-Lösung, in der

Luminol enthalten ist, kann die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte HRP die Oxidation des Luminols, das Substrat der HRP, katalysieren. Dabei entsteht Chemilumineszenz, die mit einem licht-empfindlichen Film detektiert werden kann. Hierfür wurden die beiden ECL-Komponenten im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert und 2 Minuten inkubiert. Die ECL-Lösung wurde abgenommen und die Membran im Dunklen mit einem Film exponiert. Mithilfe einer Entwicklerlösung wurden die Proteinbanden auf dem Film sichtbar gemacht, bevor dieser nach einem Waschschrift in einem Fixierbad geschwenkt wurde. Als Letztes wurde der Film durch einen Waschschrift in bidest Wasser von Rückständen der Fixierlösung befreit.

Alle verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sind unter 2.1.3 im Abschnitt „Proteinanalytik“ aufgelistet. Alle Westernblotexperimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt, mit Ausnahme der Caspase 9 Nachweises, welches erst ein Mal detektiert wurde und ein daher preliminäres Ergebnis darstellt.

Entfernen gebundener Antikörper von der Membran

Das Ablösen (stripping) bzw. Denaturieren gebundener Antikörper von der PVDF-Membran ermöglicht, dass verschiedene Antigene auf ein und derselben Membran detektiert werden können. Dazu wurde die Membran 30 Minuten lang in Stripping-Puffer im Wasserbad bei 50 °C geschwenkt. Anschließend wurde sie drei Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und dann, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, blockiert und mit Antikörpern inkubiert.

Topflash-Reportergen Test

Bei diesem Test handelt es sich um eine Methode um die Transkriptionsaktivität von Genen zu bestimmen, welche von den Transkriptionsfaktoren TCF (T-cell factor)/LEF (Lymphoid enhancer-binding factor 1) reguliert sind. Dabei wird ein p7LEF-luc TOPFLASH Reporter Konstrukt verwendet, ein Expressionsvektor, welcher ein Firefly Luziferase Reportergen unter der Kontrolle der TCF/LEF Bindestellen besitzt. Die Luziferase ist ein Enzym, welches sein Substrat Luziferin in einer Chemolumineszenz-Reaktion oxidiert. Die dabei entstehende Lichtemission kann in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen werden und spiegelt die relative Luziferase Aktivität wider.

Der aktive Wnt/ β -Catenin Signalweg führt zur Dephosphorylierung, Stabilisierung und Translokation von β -Catenin in den Nukleus. Dieses bildet mit TCF/ LEF einen Komplex, durch welchen es zur Aktivierung von Zielgenen kommt. Daher hängt die Expression der Luziferase von der Menge an aktiven TCF/LEF Komplexen ab und die wiederum korreliert mit der Menge an aktivem β -Catenin. Wird also nach der Transfektion des TOPflash Reporterkonstruktes durch eine Behandlung der Zellen der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert, so ist die Luziferase Aktivität erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Um die Aktivierung der induzierten Reporteraktivität zu normalisieren, werden Zellen zusätzlich mit TK-Renilla transfiziert, einem Expressionsvektor mit einem Renilla-Luziferase Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven TK-Promotors.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf jeweils ein Well einer 96-Wellplatte. A549 Zellen wurden ausgesät und am folgenden Tag mit dem Topflash- und Renilla-Plasmid über Nacht transfiziert. Dabei wurden 40 ng Topflash, 10 ng Renilla sowie 70 ng des Plasmides LacZ (pCS2 LacZ), welches verwendet wird um die DNA auf eine Gesamtmenge von 100 ng aufzufüllen, mit 0,2 μ l P3000TM Reagenz in Transfektionsmedium (Medium ohne jegliche Zusatzstoffe) gelöst, sodass 5 μ l DNA-Mix erhalten werden. 0,15 μ l Lipofectamin 3000 wird auch mit Transfektionsmedium auf ein Gesamtvolumen von 5 μ l aufgefüllt. Die zwei Lösungen (DNA- bzw. Lipofectamin-Mix) werden gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen pipettiert. Nach Ende der Transfektionsdauer (13,5 h) erfolgte nach 30-minütiger Vorinkubation mit dem GSK-3 β

Inhibitor BIO (0,5 μM) die Behandlung mit 50 μM Cisplatin für die Dauer von 10 Stunden. Anschließend wurden die Zellen nach vollständiger Abnahme des Mediums mit 40 μl 1x Passive Lysis buffer (PLB) für 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Dabei wurde die 96-Wellplatte jede 10 Minuten für 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Zellen zur Sicherstellung der vollständigen Freisetzung der gebildeten Luziferase mindestens eine Stunde bei -80°C gelagert. Vor der Messung am Luminometer wurde die Platte aufgetaut, nochmals gevortext und jeweils 10 μl in zwei undurchsichtige 96-Wellplatten transferiert und mit 10 μl PLB verdünnt. Für die Messung wurden der jeweilige Reaktionspuffer sowie das entsprechende Substrat automatisiert in jedes Well gepumpt. Für die Bestimmung der Firefly-Luziferase waren dies 70 μl Luziferin Reaktionspuffer sowie 20 μl Luziferin Reaktionsmix; für die Messung der Renilla Luziferase waren es 100 μl Renilla Reaktionslösung.

Von den gemessenen Luziferase-Werten wurde zuerst der Messwert des Blanks (PLB allein) abgezogen. Anschließend wurden diese noch auf die Werte der TK-Renilla normiert. Zuletzt wurden die Werte noch auf unbehandelte Kontrollzellen (d.h. ohne Cisplatin) normalisiert.

RNA Interferenz

Die RNAi (RNA-interference) Technologie ermöglicht es, die Expression von Genen zu unterbinden. Hierbei werden kleine doppelsträngige siRNA-Oligonukleotide (18-22 Nukleotide) in der Zelle von RISC (RNA Induced-Silencing-Complex) gebunden. Dadurch werden Prozesse aktiviert, welche den Abbau der komplementären mRNA einleiten (Bartlett & Davis 2006).

A549 Zellen wurden hierfür einer reversen Transfektion mit einer (GSK-3 β) bis zwei (β -Catenin 1 und 2) siRNA Sequenzen unterzogen. Darunter versteht man, dass zunächst die siRNAs zusammen mit der Transfektionsreagenz HiPerfect in die Wells vorgelegt (25 μ l) und anschließend die Zellen (in 75 μ l) darauf ausgesät wurden (Tabelle 2-15). Dabei erfolgte zunächst bei Raumtemperatur eine zehnmünütige Vorinkubation der siRNA mit dem HiPerfect-Transfektionsmedium-Gemisch. Pro Well wurden 0,75 μ l HiPerfect mit Transfektionsmedium auf 25 μ l aufgefüllt und davon die entsprechende Menge in ein Eppi vorgelegt, um zusammen mit der jeweiligen siRNA 25 μ l Gesamtvolumen zu erhalten. Nach 48h Transfektion wurden die A549 Zellen für 30 Minuten mit DMSO oder 0,5 μ M BIO vorinkubiert, bevor sie mit Cisplatin (50 μ M) behandelt wurden. Damit sollte jeweils die Spezifität der eingesetzten GSK3-Inhibitoren (SB-415286 und BIO) überprüft werden. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen mit Hoechst und PI gefärbt, am Mikroskop aufgenommen und anschließend analysiert, wie bereits im Abschnitt „Automatisierte Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie“ beschrieben wurde. Um die Effizienz der mRNA Depletion zu überprüfen, wurde das Medium im Anschluss an die Mikroskopie abgenommen, die Zellen lysiert und mittels SDS PAGE und Western Blot auf β -Catenin bzw. GSK-3 β analysiert.

Tabelle 2-15: siRNA und HiPerfect pro Well.

	β -Catenin RNAi	GSK-3 β RNAi	dsR RNAi
Zellzahl	8000 in 75 μ l	4000 in 75 μ l	8000 oder 4000 in 75 μ l
siRNA	3 pmol, 0,15 μ l einer 20 pmol/ μ l Stamm- lösung in siRNA Puffer	2 pmol, 0,1 μ l einer 20 pmol/ μ l Stamm- lösung in siRNA Puffer	3 pmol, 0,15 μ l einer 20 pmol/ μ l Stamm- lösung in siRNA Puffer

HiPerfect-Transfektions- medium-Gemisch	0,75 μ l HiPerfect ad 25 μ l Transfektionsmedium
--	--

2.2.4 Mikroskopie-basierter Chemikalienscreen

Um einen tieferen Einblick in die Wirkung verschiedener Chemikalien auf die Cisplatin-induzierte Apoptose in A549 Zellen zu erhalten, wurden zwei Chemikalienbibliotheken verwendet: die „*Known Bioactives*“ Bibliothek des *Institute of Chemistry and Cell Biology* (ICCB) der Harvard Universität, bestehend aus 480 chemischen Verbindungen mit bekannten Zielstrukturen, darunter auch einige Medikamente, sowie die „*FDA approved Drugs*“ Bibliothek, bestehend aus 640 Arzneimitteln mit bekannter Wirkungsweise. Alle Chemikalien liegen dabei in DMSO gelöst vor. Insgesamt wurden vier Chemikalienscreens durchgeführt, zwei Basalscreens unter alleinigem Einsatz der Chemikalien und zwei Doppelscreens, in welchen die Zellen einer Kombination aus Chemikalien und Cisplatin ausgesetzt waren.

Als Erstes wurden die sich in der Mutterplatte (M1) befindlichen Chemikalien in drei Schritten verdünnt und aliquotiert, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Chemikalien zu vermeiden. Abbildung 2-4 stellt die Vorgehensweise dar. Als letzter Schritt kommt die Zugabe zu den Zellen, welche 50 μ l Medium als Überstand besitzen, wodurch die letzte Verdünnung stattfindet, sodass eine Gesamtverdünnung von 1:525 erreicht wird, wobei die Endkonzentrationen der einzelnen Substanzen unterschiedlich sind. Sie liegen im Bereich von 0,2 bis 101 μ M bei der ICCB Bibliothek und zwischen 2,7 und 33,4 μ M bei der FDA Bibliothek.

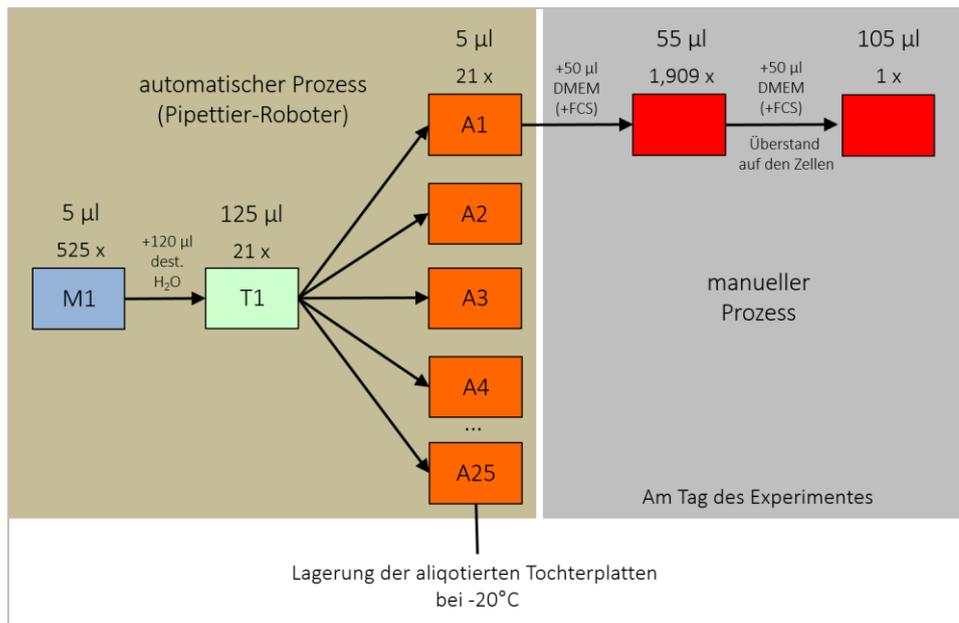


Abbildung 2-4: Vorgehensweise der Verdünnung der Mutterplatten. Aus der Mutterplatte (M1) wurden 5 μl der Chemikalienlösung entnommen und in eine neue 96-Wellplatte überführt, in der sich 120 μl bidest. Wasser befand, und somit 1:25 verdünnt. Diese Platte wurde zu je 5 μl aliquotiert (A1-25) und bei -20°C eingefroren und gelagert. Für einen Screen wurde eine solche Platte aufgetaut und mit Medium nochmals 1:11 verdünnt. Durch die Zugabe dieser 55 μl Inhibitorlösung zu den Zellen, welche sich zu diesem Zeitpunkt in 50 μl Medium befinden, erfolgt ein weiterer Verdünnungsschritt, nämlich 1:1,9. Somit beträgt die Gesamtverdünnung 1:525.

Für alle Screens wurden immer jeweils A549 Zellen derselben Passage (P11) ausgesät. Am folgenden Tag wurden für die Basalscreens die chemischen Substanzen aufgetaut, abzentrifugiert und in 50 μl Medium gelöst. Währenddessen wurden 50 μl des überstehenden Mediums von den Zellen abgenommen. Anschließend wurden 55 μl der gelösten Chemikalien zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Medium zugegeben, um auf das gleiche Volumen wie bei den Cisplatin-behandelten Zellen zu kommen. Zu den jeweiligen Positivkontrollen wurden 10 μl Cisplatin pipettiert (Endkonzentration: 50 μM) (Abbildung 2-5). Nach 24h wurden die Zellen mit Hoechst und PI gefärbt, am Mikroskop aufgenommen und die Daten anschließend ausgewertet. Der Basalscreen galt der Überprüfung, ob sich die Chemikalien und Medikamente in der jeweils verwendeten Konzentration allein schon auf die Zellen hinsichtlich der Induktion von Zelltod auswirken.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	DMSO											DMSO
C												
D												
E												
F												
G	CDDP											CDDP
H												

Abbildung 2-5: Plattenlayout der durchgeführten Screens.

In den Basalscreens wurde dabei jede Substanz als Treffer gewertet, bei welcher der Anteil an toten Zellen um die dreifache Standardabweichung des Anteils an toten Zellen in der jeweiligen Negativkontrolle (DMSO) erhöht ist, welcher über die 14 Platten des jeweiligen Screens gemittelt wurde. Zudem muss die Substanz im Wiederholungsscreen diese Kriterien ebenfalls erfüllen. Alle Werte sind auf den Mittelwert der Positivkontrolle des zugehörigen Screens normalisiert. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{normierter Zelltod [Substanz X]} = \frac{\text{prozentualer Zelltod [Substanz X]}}{\text{Mittelwert des prozentualen Zelltodes von Cisplatin}}$$

Die Bilder im ersten Basalscreen wurden versehentlich mit 16-facher Vergrößerung aufgenommen, im Gegensatz zu den anderen drei Screens, die wie üblich mit zehnfacher Vergrößerung aufgenommen wurden. Dies wirkte sich allerdings hauptsächlich auf die Gesamtzellzahl aus, auf welche im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter eingegangen wurde.

Im Doppelscreen wurde überprüft, wie die Chemikalien und Medikamente in der verwendeten Konzentration den Cisplatin-induzierten Zelltod beeinflussen. Hierfür wurden die A549 Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit den Chemikalien vorinkubiert, wie schon für die Basalscreens beschrieben wurde. Im Anschluss erfolgte die Behandlung aller Zellen mit 10 µl Cisplatin, sodass die Endkonzentration 50 µM betrug, ausgenommen der Negativkontrollen (DMSO), zu welchen 10 µl Medium gegeben wurde. Jede Substanz, die den Zelltod um die dreifache Standardabweichung der Positivkontrolle (nur CDDP) erhöht oder erniedrigt und dessen Ergebnis im zweiten Durchgang reproduziert werden konnte, wurde als Treffer gewertet. Hinzu kam, dass nur Substanzen gewertet wurden, die in den

Basalscreens nicht mehr als 15% Zelltod verursacht haben, weil der Cisplatin-induzierte Zelltod im Vordergrund stand und nicht der Zelltod in den A549 Zellen allgemein. Alle Werte sind auch hier auf die jeweilige Positivkontrolle (CDDP) normalisiert.

Alle vier Screens wurden mit der Unterstützung von Iris Hansjosten (Doktorandin) jeweils innerhalb einer Woche durchgeführt.

2.2.5 Statistik

Bei denjenigen Ergebnissen, in welchen Statistikberechnungen erfolgten, wurde der zweiseitige Student's t-Test angewendet. Die Berechnungen wurden immer auf die jeweilige Kontrolle bezogen, sei es die behandelte oder unbehandelte Kontrolle (- oder + Cispatin). Dabei entsprechen * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Wirkungsweise von Cisplatin in A549 Zellen

Bei Cisplatin handelt es sich um eines der am häufigsten eingesetzten Zytostatika, welches der Behandlung von Lungentumoren sowie vieler anderer Tumore dient. Cisplatin bindet an die DNA, führt zur DNA-Schadens-Antwort und leitet letzten Endes Apoptose ein. Eine Beeinträchtigung stellt jedoch die Resistenzentwicklung der Krebszellen gegenüber Cisplatin dar. Daher ist es von hohem Interesse mehr über die Wirkungsweise von Cisplatin zu erfahren, um die Behandlung von Krebs effektiver zu gestalten.

Da Lungentumore zu den Hauptanwendungsgebieten von Cisplatin zählen, wurde in dieser Arbeit die humane, aus einem Adenokarzinom stammende Zelllinie A549 eingesetzt (Lieber et al. 1976). Zur Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltodes in A549 Zellen wurden diese mit Cisplatin behandelt und deren Reaktion hinsichtlich Zelltod sowie Zellzyklus unter Einsatz verschiedener Methoden untersucht. Um mehr über die Reihenfolge und das Zusammenspiel der morphologischen und nukleären Ereignisse während der Cisplatin-induzierten Apoptose zu erfahren, wurden die Klone A549 H2B-GFP generiert, die ebenfalls charakterisiert wurden. Dabei handelt es sich um stabil transfizierte A549 Zellen, in denen das Kernprotein H2B mit GFP markiert ist. Anschließend erfolgte ein Chemikalienscreen zur Bestimmung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen, um Verbindungen zu finden, in deren Anwesenheit die Wirkung von Cisplatin entweder verstärkt oder aber abgeschwächt wird. Beide Kategorien leisten einen Beitrag zum tieferen Verständnis der molekularen Wirkungsweise von Cisplatin.

3.1.1 Fluoreszenzmikroskopie-basierte Analyse zeigt konzentrations- und zeitabhängige Cisplatin-induzierte Apoptose in den A549 Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Einzelzellanalyse sowie die Untersuchung verschiedener Parameter zur selben Zeit: die Ermittlung der Zellzahl, die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen sowie die Bestimmung der Art des Zelltodes unter Einsatz der DNA-Farbstoffe Hoechst 33342 (Hoechst) und Propidium Iodid (PI).

Die Behandlung der A549 Zellen mit 50 und 100 μM Cisplatin führt nach 24 Stunden zu einem deutlichen Rückgang der relativen Lebendzellzahl im Bezug auf die Kontrollzellen (Abbildung 3-1A). Dieser Effekt ist nach 48 Stunden noch ausgeprägter. Betrachtet man den Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen, dann resultiert die Behandlung mit der höheren Konzentration in einem größeren Anteil an lebenden Zellen. In Bezug auf den Zelltod bewirkt die Cisplatin-Behandlung eine Zunahme an toten Zellen, welche nach 24 Stunden vorwiegend frühapoptotisch ist, unabhängig von der Konzentration von Cisplatin (Abbildung 3-1B). Im Gegensatz dazu sind die toten Zellen nach Applikation beider Konzentrationen nach 48 Stunden hauptsächlich nekrotisch. Vergleicht man das Resultat beider Konzentrationen an Cisplatin bezüglich des Zelltodes miteinander, so fällt auch hier nach beiden Zeitpunkten ein konzentrationsabhängiger Abfall im Zelltod auf.

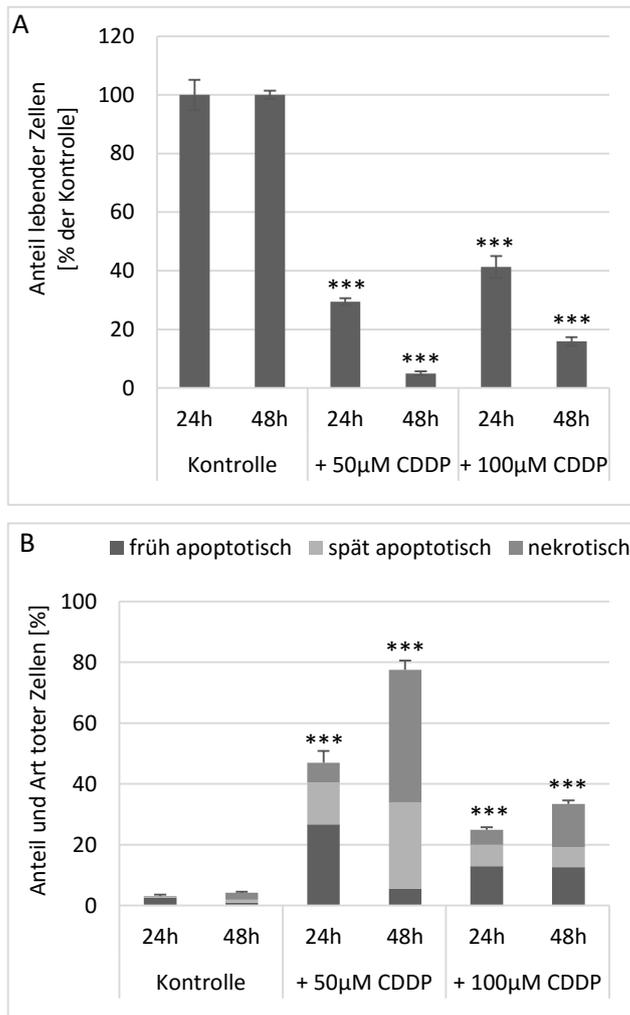


Abbildung 3-1: Induzierung der Apoptose in A549 Zellen nach Behandlung mit CDDP. Der Inkubation mit 50 und 100µM CDDP für 24 und 48 Stunden folgten die Färbung der Zellen, die Akquisition der Bilder sowie die Analyse der Daten mittels ScanR Software. In (A) sind repräsentative Mittelwerte der Lebendzellzahl (relativ zur Lebendzellzahl der Kontrolle) dargestellt, während (B) den prozentualen Anteil der toten Zellen (im Bezug auf die entsprechende Gesamtzellzahl), deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie den nekrotischen Zelltod zeigt. Die Mittelwerte entstammen einem von zwei unabhängigen Experimenten mit je 6 Replikaten (n=6) und sind mit der Standardabweichung aufgetragen.* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle.

Mikroskopische Merkmale der Apoptose werden nach Cisplatin-Behandlung sichtbar

Die verschiedenen Stadien bzw. Arten des Zelltodes, welche durch Cisplatin induziert werden, sind in Abbildung 3-2 visualisiert. Die behandelten Zellen weisen im Durchlicht die typischen morphologischen Kennzeichen der Apoptose auf, wie z.B. das Ablösen der Zelle aus dem Zellverband, Membranausstülpungen und die Ausbildung apoptotischer Körperchen. Auf nukleärer Ebene können DNA Kondensation sowie Kernfragmentierung beobachtet werden. Auch spiegeln sich die Ergebnisse unter 3.2.1 in den Bildern wieder: Der Zelltod nach 24 Stunden nimmt konzentrationsabhängig ab, wie man anhand der geringeren Menge an toten Zellen in der Behandlung mit 100 μM Cisplatin sehen kann. Sowohl der Anteil an kondensierter DNA (Hoechst-Kanal) als auch an PI positiven Zellen nimmt dabei ab. Auch fällt der deutliche Rückgang der lebenden Zellen aufgrund der

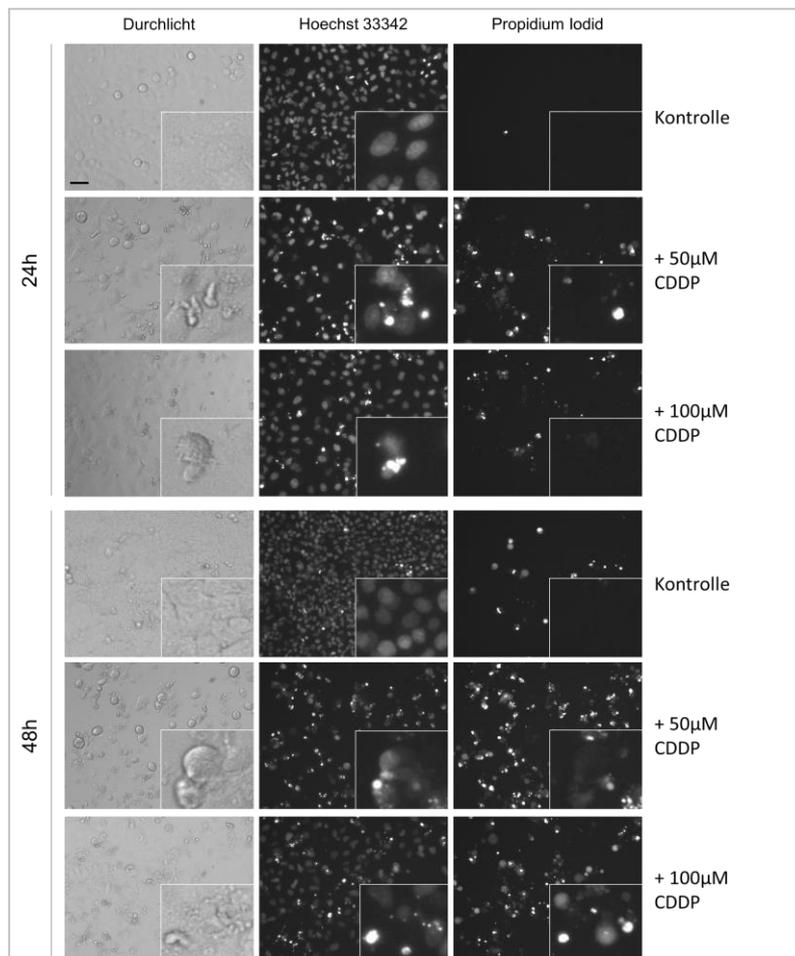


Abbildung 3-2: A549 Zellen weisen nach CDDP-Behandlung die typischen apoptotischen Merkmale auf. A549 Zellen wurden mit 50 und 100 μM CDDP versetzt. Nach 24 und 48h Inkubation wurden Bilder von den gefärbten Zellen am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (10-fache Vergrößerung). Bei den dargestellten Bildern handelt es sich um repräsentative Abbildungen aus zwei unabhängigen Experimenten. (Maßstab: 50 μM)

Cisplatin-Behandlung auf, verglichen mit den Kontrollzellen. Bei 48-stündiger Behandlung mit 50 und 100 μM Cisplatin ist der in Bezug auf den 24 Stunden Zeitwert gestiegene Anteil an spätapoptotischen und nekrotischen Zellen aus den vielen PI positiven Zellen gut ersichtlich.

3.1.2 Der klassische LDH Test bestätigt die Mikroskopie-Ergebnisse

Die erhaltenen mikroskopischen Daten wurden anschließend mithilfe eines Toxizitätstests, dem Laktat Dehydrogenase (LDH) Test, validiert (Abbildung 3-3A). Der Test beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis von freigesetzter LDH als Indikator für eine zerstörte Membran. Die Prozentangabe relativ zu Positivkontrolle (Triton X-100) quantifiziert den Anteil an membrangeschädigten Zellen. Beim Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen der Mikroskopie sollten daher nur die spätapoptotischen und nekrotischen Zellen (Abbildung 3-3B) betrachtet werden. Dabei fällt auf, dass die Werte im LDH Test im Allgemeinen etwas höher ausfallen, vor allem in der Kontrolle. Dennoch zeigen die beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse: Die 24 stündige Inkubation der A549 Zellen mit 50 und 100 μM Cisplatin erhöht bei beiden Assays den Anteil an membrangeschädigten Zellen auf jeweils etwa 20 %. Die Behandlung mit 100 μM Cisplatin resultiert in der gleichen Menge an freigesetztem LDH wie nach 50 μM Cisplatin. Demnach spiegelt es nicht die bei der Mikroskopie beobachtete Reduktion an membrangeschädigten Zellen wieder. Nach 48 h steigt der Anteil an membrangeschädigten Zellen bei beiden Methoden auf etwa 70 % nach der Behandlung mit 50 μM Cisplatin und sinkt nach 100 μM Cisplatin auf 20-30%.

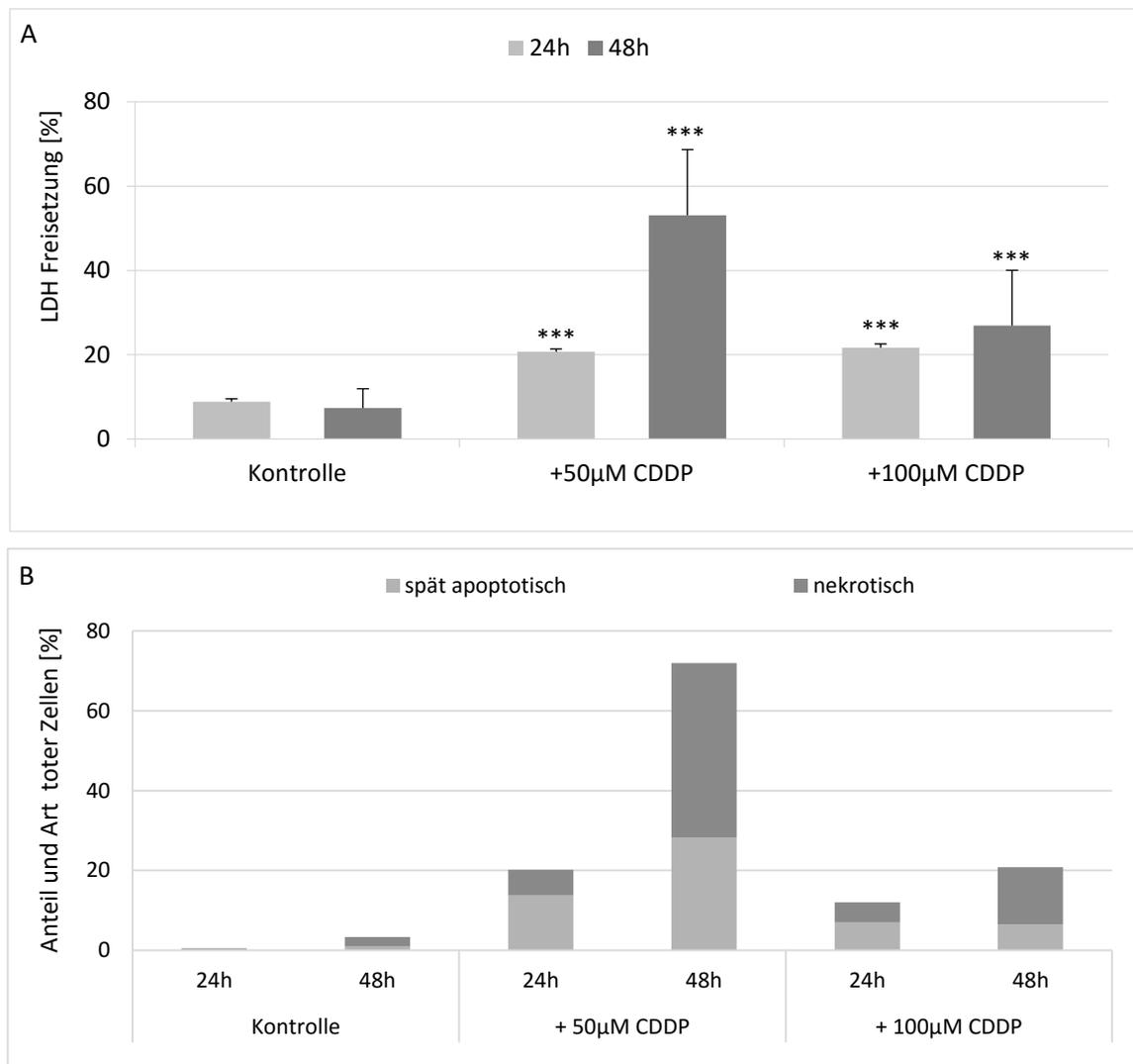


Abbildung 3-3: Der LDH Test bestätigt größtenteils die Ergebnisse der Mikroskopie. (A) A549 Zellen wurden am folgenden Tag für 24h und 48h mit CDDP inkubiert (50 und 100 µM). Zehn Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurden unbehandelte Zellen mit 0.1% Triton X-100 versetzt (Positivkontrollen). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der LDH Test durchgeführt. Die LDH Freisetzung der Proben ist auf die maximale LDH Freisetzung der Positivkontrolle (100%) normalisiert. Die Mittelwerte stammen aus drei individuellen Experimenten mit je 5 Replikaten (n=15) und sind zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung aufgetragen. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Die Signifikanzwerte beziehen sich dabei auf die jeweilige Kontrolle. In (B) sind zum Vergleich die Mittelwerte der Anteile an spätapoptotischen und nekrotischen Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl aus Abbildung 3-1B aufgetragen.

3.1.3 Die durchflusszytometrische Analyse zeigt einen Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase nach Cisplatin

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen der Zelltod im Vordergrund stand, sollte die Durchflusszytometrie nun Aufschluss geben über den Einfluss von Cisplatin auf den Zellzyklus der A549 Zellen. Die in Abbildung 3-1A beobachtete Lebendzellzahlverminderung nach CDDP Applikation ist vermutlich auf einen Zellzyklusblock zurückzuführen, da schon gezeigt wurde, dass Cisplatin den Zellzyklus arretiert (Siddik 2003). Um dies zu überprüfen, wurden die A549 Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cisplatin behandelt bzw. für die Positivkontrolle serumgehungert (-FCS) und nach einer Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI der Zellzyklusanalyse unterzogen. Der Entzug von Serum sollte einen G1 Phase Arrest der Zellen bewirken, weil die Zellen aufgrund des Mangels an wichtigen Überlebensfaktoren den Restriktionspunkt nicht passieren können (Bartek & Lukas 2001), was auch beobachtet werden konnte (Abbildung 3-4). Doch besitzen auch die Kontrollzellen schon einen großen Anteil an Zellen in der G1 Phase, sodass der Effekt nicht sehr ausgeprägt ist. Cisplatin führt hingegen bei niedriger Konzentration einen Arrest in der S und G2/M Phase herbei. Nach Behandlung mit 100 μM Cisplatin ist ein schwacher Anstieg des Anteils an Zellen in der G2/M Phase zu vernehmen, bei 50 μM Cisplatin gibt es allerdings keinen großen Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 3-4 und Abbildung 6-2K). Zusätzlich wurde eine Zunahme von apoptotischen Zellen beobachtet, was mit den Mikroskopiedaten konform ist, wenn die Werte hier zum Teil auch etwas höher ausfallen (v.a. nach 100 μM) als in der Mikroskopie (späte Apoptosen). Vermutlich ist das bedingt durch die Methodik. Die als apoptotische Zellen erkannten Zellen besitzen als sub-G1 Zellen weniger DNA als die G1 Zellen, wodurch es sich bei ihnen um DNA Fragmente handelt (siehe Abschnitt Durchflusszytometrie im Material und Methodenteil). Es könnte durchaus sein, dass vom Durchflusszytometer mehrere zu einer Zelle gehörende Fragmente als einzelne tote Zellen erkannt werden, wohingegen die Auswertungssoftware der Mikroskopie (ScanR) die Fragmente einer Zelle möglicherweise auch entsprechend als eine tote Zelle erkennen kann.

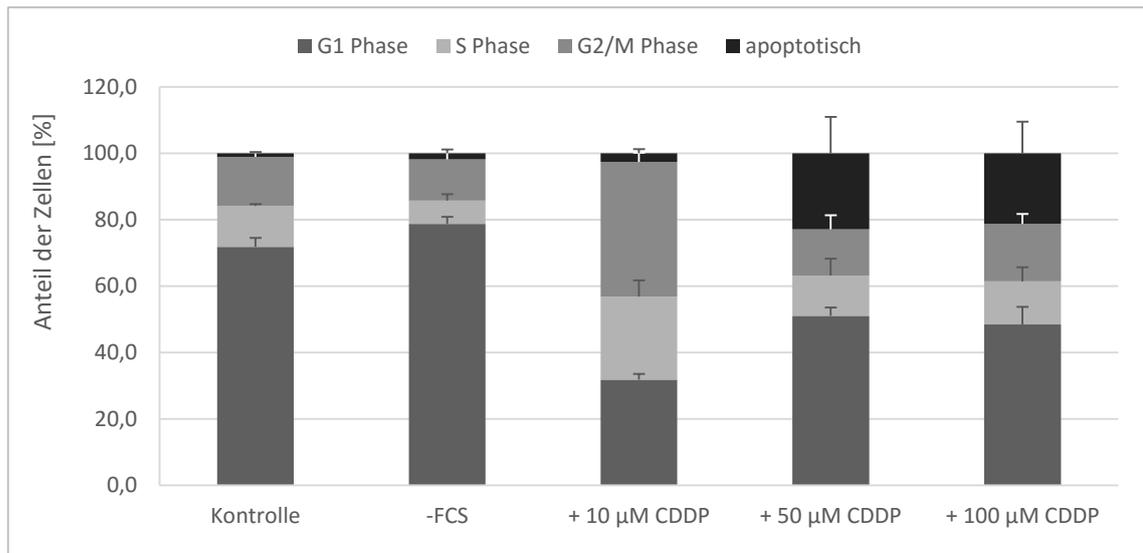


Abbildung 3-4: Zellzyklusverteilung nach 24h CDDP-Behandlung. A549 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CDDP oder mit serumfreiem Medium (-FCS) versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese fixiert, mit DAPI angefärbt und der Durchflusszytometrie unterzogen. Die Werte stellen die prozentualen Anteile der A549 Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus bzw. Apoptose dar. Sie zeigen die Mittelwerte \pm STABW aus 3 unabhängigen Experimenten. Repräsentative Zellzyklusprofile aus einem Experiment sowie die Zellzyklusverteilung ohne Involvement der sub-G1 Zellen befinden sich im Anhang (Abbildung 6-2).

3.2 A549 H2B-GFP Zellen als Werkzeug für die Untersuchung der Dynamik der Apoptose

Die Apoptose stellt einen dynamischen Prozess dar, weshalb es wichtig ist keine Informationen zu verlieren aufgrund der Beschränkung auf den festen Zeitpunkt einer mikroskopischen Aufnahme. Um die zeitliche Abfolge der unterschiedlichen Apoptosestadien der CDDP-induzierten Apoptose ermitteln zu können, war daher ein Zeitverlaufsexperiment unerlässlich. Die Zytotoxizität des DNA-Farbstoffes Hoechst, welches für die bisherigen Experimente genutzt wurde, stellt jedoch einen Limitierungsfaktor für diese Methode dar. Daher wurde die A549 Zelllinie mit dem H2B-GFP Plasmid transfiziert, um stabile Klone zu erhalten, welche das nukleäre Fusionsprotein H2B-GFP exprimieren und somit eine Verfolgung der CDDP-induzierten Apoptose über einen längeren Zeitraum erlauben. Studien zufolge scheint das Fusionsprotein H2B-GFP keinen Einfluss auf den Zellzyklus zu haben (Kanda et al. 1998). Dies konnte im folgenden Experiment bestätigt werden, in dem die absoluten Zellzahlen von A549 wt und A549 H2B-GFP nach 5, 24, 48 und 72 h mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt wurden (Abbildung 3-5). Dabei ergeben sich für beide untersuchten Zelllinien ähnliche Proliferationsraten. Die mittlere Verdopplungszeit beträgt 25h, dessen Berechnung ist unter 2.2.1 aufgeführt.

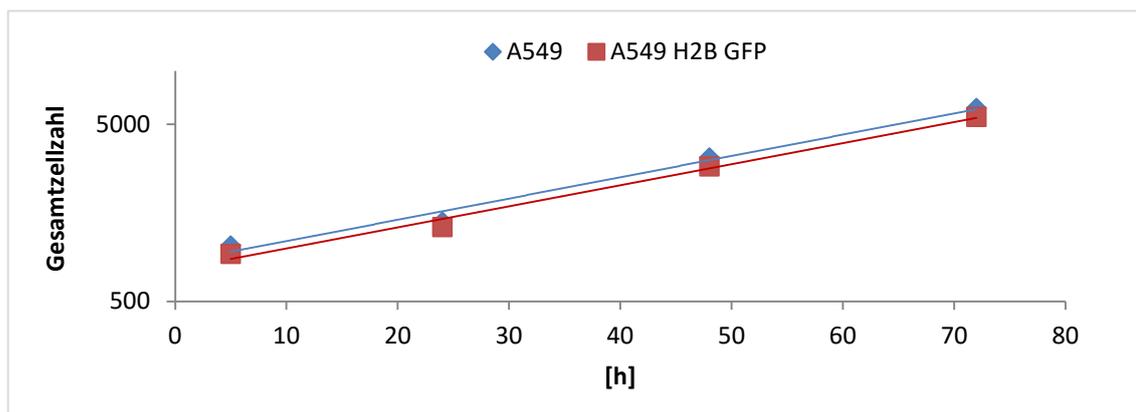


Abbildung 3-5: Die A549 H2B-GFP Zellen unterscheiden sich hinsichtlich der Proliferation nicht von den A549 Zellen. A549 H2B-GFP und A549 Zellen wurden ausgesät und zu den angezeigten Zeitpunkten wurden Bilder der Zellen am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die A549 Zellen wurden zuvor mit Hoechst gefärbt. Die A549 H2B-GFP Zellen wurden aufgrund der Kernfärbung mit GFP detektiert. Beide Zelllinien wurden anschließend mit der ScanR Software analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW) dar und repräsentieren zwei individuelle Experimente mit je 8 Replikaten ($n=16$). Die y-Achse ist logarithmisch aufgetragen (\lg_{10}). Die STABW ist aufgrund der Skalierung im Diagramm nicht sichtbar.

Als nächstes erfolgte die Detektion von H2B-GFP sowie endogenem H2B in den A549 H2B-GFP Zellen, um Aufschluss über das Verhältnis des überexprimierten zum endogenen Protein zu erhalten. Aus Abbildung 3-6 geht hervor, dass das stabil transfizierte H2B-GFP (obere Bande) verglichen zum endogenen Protein (untere Bande) im Überschuss vorkommt. Die Quantifizierung der Proteinbanden mit ImageJ ergab, dass 2,14 Mal mehr H2B-GFP als endogenes H2B vorliegt. Ein Überschuss des Fusionsproteins kann einerseits von Vorteil sein, denn so wäre die Konkurrenz zum endogenen H2B bezüglich des Einbaus in das Nukleosom nicht so groß, andererseits würde das überschüssige, nicht eingebaute H2B nicht linear eingebaut werden, wäre jedoch trotzdem durch Mikroskopie oder FACS Analyse detektierbar. Dies erklärt womöglich, dass anhand des GFP Signals kein typisches Zellzyklusprofil erkennbar ist (Daten nicht gezeigt).

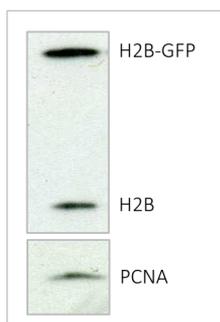


Abbildung 3-6: Das Fusionsprotein H2B-GFP ist im Überschuss vorhanden im Vergleich zum endogenen Protein. A549 H2B-GFP Zellen wurden lysiert und das H2B mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Ladekontrolle wurde mit einem Antikörper gegen PCNA nachgewiesen.

Um sicherzustellen, dass die Klone sich auch bezüglich der Cisplatin-Behandlung nicht von den Wildtypzellen unterscheiden, wurden die Experimente zur Charakterisierung der Cisplatin-induzierten Apoptose mit den Klonen in gleicher Weise wiederholt.

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie-basierte Analyse weist konzentrations- und zeitabhängige Cisplatin-induzierte Apoptose in den A549 H2B-GFP Zellen nach

A549 H2B-GFP Zellen zeigen, wie auch die Wildtypzellen, einen signifikanten Rückgang der relativen Lebendzellzahl nach Behandlung mit Cisplatin, bei beiden Zeitpunkten sowie beiden Konzentrationen an CDDP. Auch fällt nach 48h Behandlung auf, dass die relative Lebendzellzahl nach der Behandlung mit 100 μ M CDDP ebenfalls höher ist im Vergleich zur geringeren CDDP-Konzentration (Abbildung 3-7A und Abbildung 3-1A). Bezüglich des Zelltodes lässt sich feststellen, dass bei der Behandlung mit 50 μ M CDDP nach 24 Stunden gleich viele der behandelten Zellen frühapoptotisch wie spätapoptotisch sind, ein etwas geringerer Anteil ist durch Nekrose abgestorben. Bei 100 μ M CDDP hingegen verhält es sich anders: der Anteil an frühapoptotischen Zellen ist in der Minderheit, während sich gleich viele Zellen in dem spät apoptotischen Stadium wie auch im nekrotischen Zelltod befinden. Vergleicht man jedoch den Zelltod innerhalb der zwei Cisplatin Konzentrationen, so gibt es keine großen Abweichungen. Nach 48-stündiger Behandlung führen beide Konzentrationen von Cisplatin vorwiegend Nekrose herbei. Der Anteil des Zelltodes an sich ist jedoch nach 100 μ M CDDP geringer (Abbildung 3-7B). Im Großen und Ganzen scheinen die A549 H2B-GFP Zellen nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zu den A549 Wildtyp Zellen jeweils fortgeschrittener im Zelltod zu sein, was sich anhand des höheren Anteils an toten Zellen zeigt. Auch ist der Effekt, dass 100 μ M Cisplatin weniger Zelltod induziert als 50 μ M, hier erst nach 48 Stunden zu beobachten, wohingegen dieses Phänomen bei den Wildtypzellen bereits nach 24h auftritt. Um Unterschiede in der Auswertung auszuschließen, welche mit der Verwendung des GFP Signals zur Auswertung einhergehen könnten, wurden die A549 H2B-GFP Zellen noch zusätzlich mit Hoechst angefärbt. Die Auswertung mittels der Hoechst-Signale (Abbildung 6-1) weist keine wesentlichen Unterschiede auf zu derjenigen mit den GFP-Signalen, weder bezüglich der Anteile lebender Zellen der Kontrolle noch der Anteile und Arten toter Zellen.

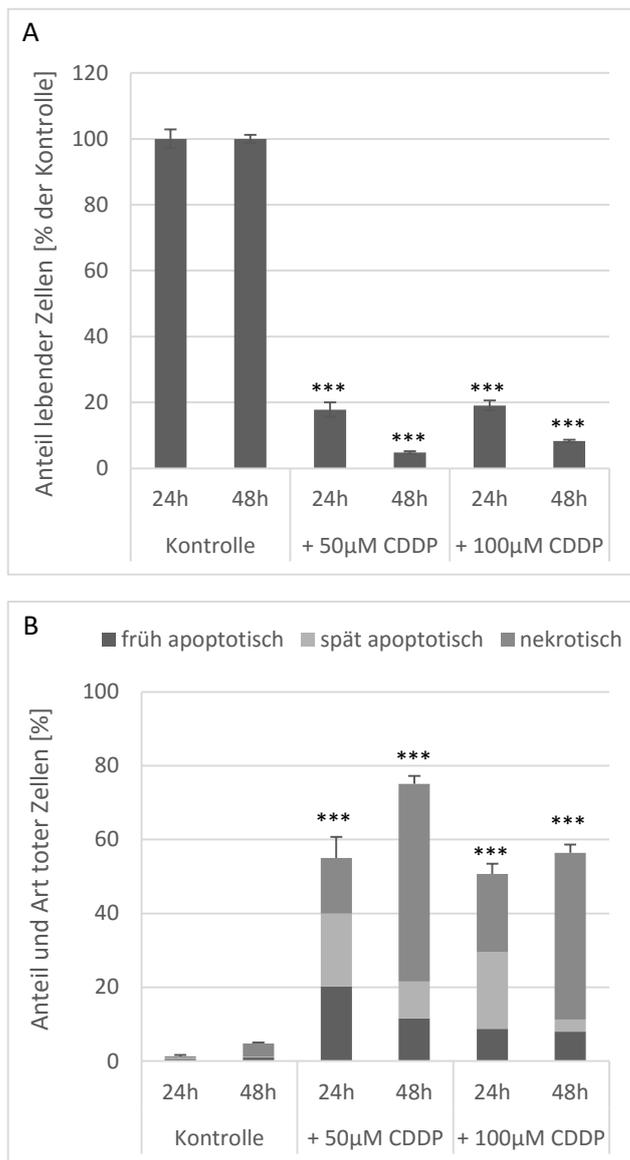


Abbildung 3-7: Apoptose-Induzierung in A549 H2B-GFP Zellen durch CDDP. A549 H2B-GFP Zellen wurden mit 50 und 100 μ M CDDP versetzt. Nach weiteren 24 bzw. 48h wurden nach Färbung der Zellen mit PI Mikroskopiebilder akquiriert und die Analyse mittels der Olympus ScanR Software durchgeführt. In (A) sind die repräsentativen Mittelwerte der relativen Lebendzellzahl dargestellt, während (B) den prozentualen Anteil der toten Zellen und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod zeigt. Die Mittelwerte entstammen einem von zwei unabhängigen Experimenten mit je 6 Replikaten ($n=6$) und sind mit der Standardabweichung aufgetragen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Signifikanzwerte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle.

Mikroskopische Merkmale der Apoptose nach Cisplatin-Behandlung auch in A549 H2B-GFP sichtbar

Alle Merkmale der Apoptose, wie das Abrunden der Zellen oder Kondensation der DNA sowie deren Fragmentierung können sowohl nach 24 als auch 48 Stunden beobachtet werden (Abbildung 3-8). Demnach treten keine qualitativen Unterschiede zwischen den Klonen und den A549 Wildtypzellen hinsichtlich der Cisplatin-induzierten Apoptose auf. Das einzige was auffällt, ist der höhere Anteil an PI positiven Zellen.

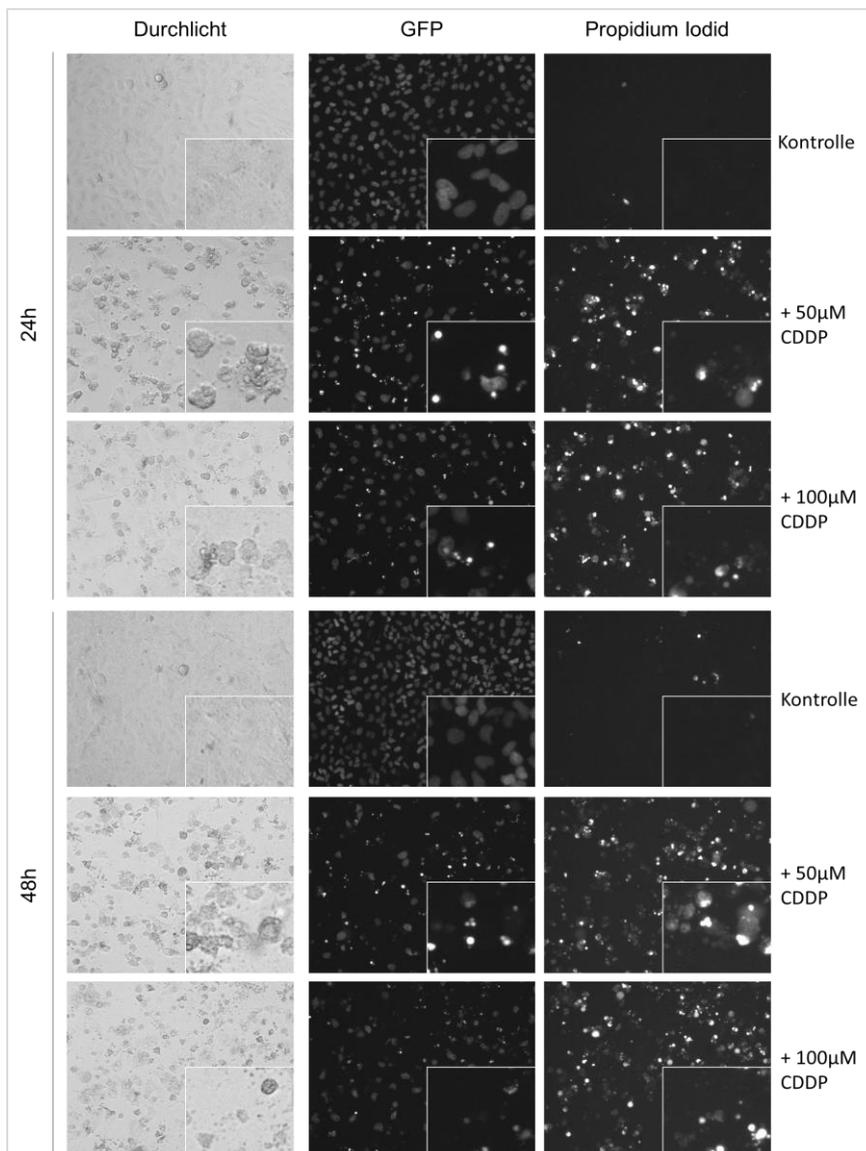


Abbildung 3-8: A549 H2B-GFP Zellen weisen nach CDDP-Behandlung die typischen apoptotischen Merkmale auf. A549 H2B-GFP Zellen wurden mit 50 und 100 µM CDDP behandelt und nach 24 bzw. 48h Inkubation mit Hoechst/PI angefärbt. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Bilder am Fluoreszenzmikroskop (10-fache Vergrößerung). Bei den dargestellten Bildern handelt es sich um repräsentative Abbildungen aus 2 Experimenten. (Maßstab: 50 µM)

3.2.2 Der LDH Test reproduziert die Mikroskopie-Ergebnisse qualitativ

Die mikroskopischen Daten der A549 H2B-GFP wurden ebenfalls mithilfe des LDH Testes validiert (Abbildung 3-9). Auch hier ist die LDH Freisetzung in den Kontrollen gegenüber dem Anteil an membrangeschädigten Zellen in der Mikroskopie etwas erhöht. Im Gegensatz dazu ist nach der Cisplatin Behandlung die LDH Freisetzung deutlich geringer ausgeprägt. Nach 24 Stunden werden in der Mikroskopie mit beiden Cisplatin Konzentrationen etwa doppelt so viele membrangeschädigte Zellen detektiert wie im LDH Test. Nach 48 Stunden Behandlung mit Cisplatin (50/ 100 μM) steigt der Anteil an membrangeschädigten Zellen, verglichen zum 24 Stunden Wert, weiter an. Auch hier fällt die LDH Freisetzung geringer aus. Damit unterscheiden sich die erhaltenen Resultate zwar quantitativ, nicht aber qualitativ, von denen der Mikroskopie. Im Vergleich zu den A549 Wildtyp Zellen (Abbildung 3A) fallen keine Unterschiede auf, außer dass nach 48h der Anteil an membrangeschädigten Zellen nach der Behandlung mit 50 μM Cisplatin geringerer ausfällt. Damit ist auch keine Reduktion des Anteils an membrangeschädigten Zellen bei 100 μM gegenüber 50 μM Cisplatin zu erkennen.

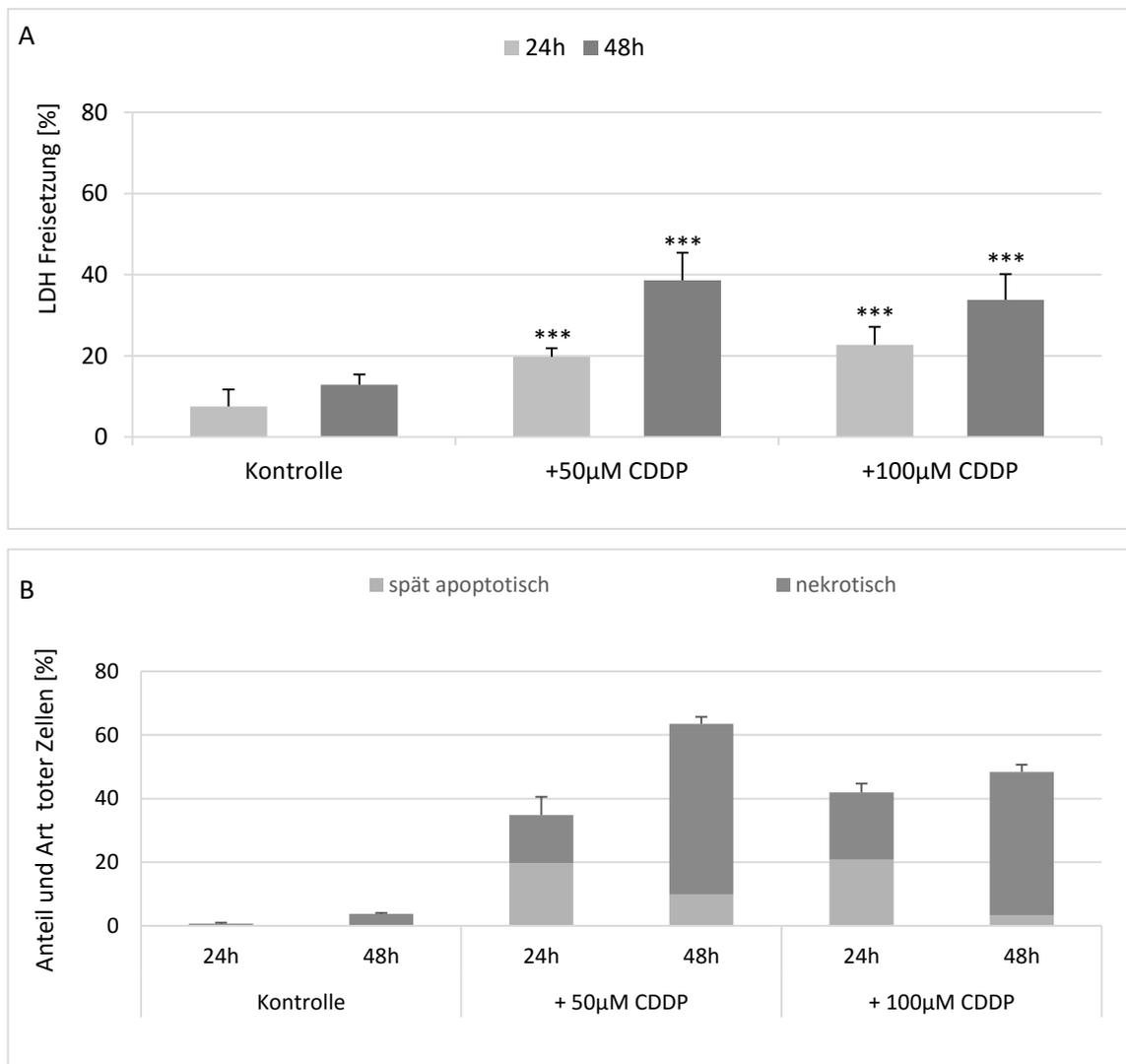


Abbildung 3-9: Der LDH Test bestätigt die Ergebnisse der Mikroskopie qualitativ. (A) Hierzu wurden A549 H2B-GFP Zellen am folgenden Tag für 24h und 48h mit CDDP inkubiert (50 und 100 μ M). Zehn Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurden unbehandelte Zellen mit 0.1% Triton X-100 versetzt (Positivkontrollen). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der LDH Test durchgeführt. Die LDH Freisetzung der Proben ist auf die maximale LDH Freisetzung der Positivkontrolle (Triton X-100) normalisiert. Die Mittelwerte stammen aus drei individuellen Experimenten mit je 5 Replikaten ($n=15$) und sind zusammen mit der Standardabweichung aufgetragen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Signifikanzwerte beziehen sich dabei auf die jeweilige Kontrolle. In (B) sind zum Vergleich die Mittelwerte der Anteile an spätapoptotischen und nekrotischen Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl aus Abbildung 3-7B aufgetragen.

3.2.3 Die durchflusszytometrische Analyse zeigt leicht unterschiedliche Veränderungen im Zellzyklus der A549 H2B-GFP Zellen im Vergleich zu den A549 Zellen.

Die Daten der Durchflusszytometrie bestätigen, dass die A549 H2B-GFP Zellen auf Serumentzug ebenso mit einem Arrest in der G1 Phase reagieren (Abbildung 3-10) wie schon die A549 Wildtypzellen (Abbildung 3-4). Auch hier besitzen selbst die Kontrollzellen schon einen großen Anteil an Zellen in der G1 Phase. Die Behandlung mit 10 μM Cisplatin führt wie bei den A549 Zellen zum Arrest in der S Phase sowie der G2/M Phase, jedoch befinden sich hier im Gegensatz zu den A549 Zellen etwas mehr Zellen in der S Phase als der G2/M Phase. Die höheren Cisplatin Konzentrationen weisen keinen Unterschied zur Kontrolle auf (Abbildung 3-10 und Abbildung 6-2L), womit sich nur die mit 100 μM Cisplatin behandelten A549 H2B-GFP Zellen leicht von den Wildtypzellen unterscheiden. Ebenso kommt es zur konzentrationsabhängigen Erhöhung des Anteils an toten Zellen nach der Cisplatin Behandlung, welche in etwa mit dem Anteil an toten, spätapoptotischen Zellen in der Mikroskopie übereinstimmen (Abbildung 3-7).

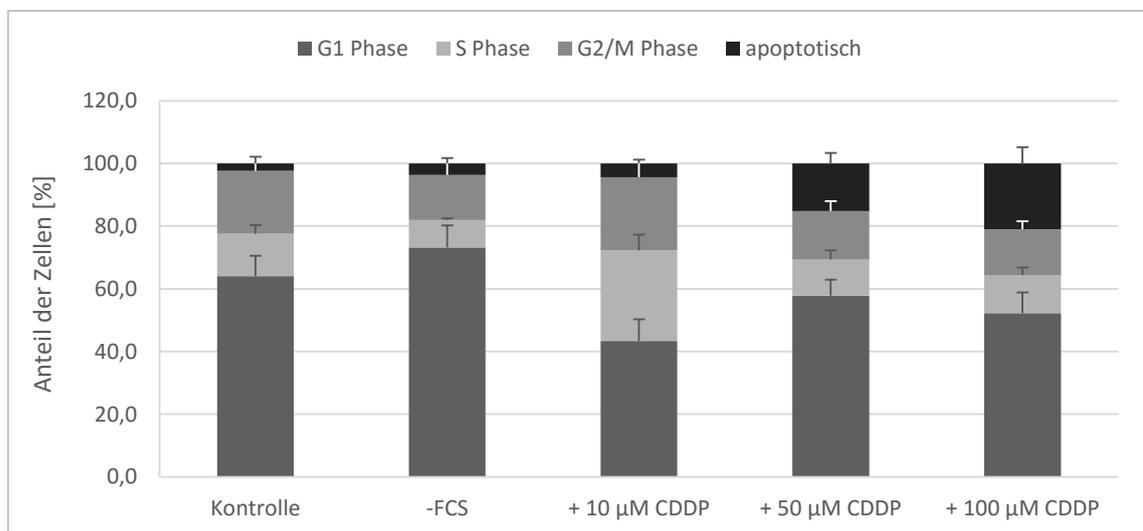


Abbildung 3-10: Zellzyklusverteilung in den A549 H2B-GFP Zellen nach 24h CDDP-Behandlung. A549 H2B-GFP Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CDDP oder mit serumfreiem Medium (-FCS) versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese fixiert, mit DAPI angefärbt und der Durchflusszytometrie unterzogen. Die Werte stellen die prozentualen Anteile der A549 H2B-GFP Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus bzw. Apoptose dar. Sie zeigen die Mittelwerte +STABW aus 3 unabhängigen Experimenten. Zellzyklusprofile aus einem repräsentativen Experiment befinden sich im Anhang.

3.2.4 Zeitverlauf der Cisplatin-induzierten Apoptose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die A549 H2B-GFP Zellen sich qualitativ nicht sonderlich von den A549 Wildtypzellen unterscheiden (mit Ausnahme des Zellzyklusprofils), wurden mit ihnen Zeitverlaufsstudien durchgeführt, um mehr über die Reihenfolge und das Zusammenspiel der morphologischen Ereignisse während der Apoptose zu erfahren, da dieses Themengebiet noch einige ungeklärte Fragen aufwirft. Hierfür wurden die A549 H2B-GFP Zellen ausgesät, mit Cisplatin inkubiert und über einen Zeitraum von 24h erfolgten automatisierte Mikroskopieaufnahmen der Zellen in regelmäßigen, kurzen Abständen. Dabei wurde die Messung erst nach achteinhalb Stunden begonnen, weil sich aus Vorversuchen gezeigt hatte, dass ab diesem Zeitpunkt die ersten Zellen beginnen apoptotische Morphologien aufzuweisen. Der Zeitverlauf bestätigt die vermutete Reihenfolge (Taylor et al. 2008) der unterschiedlichen Stadien der Apoptose, welche in Abbildung 3-11 veranschaulicht sind:

Im Durchlicht: Zuerst rundet sich die Zelle ab (roter Pfeil; 1) gefolgt von Membranausstülpungen (2-4) und Ausbildung apoptotischer Körperchen (5-7).

Im GFP/PI Kanal: Anhand der Intensivierung der GFP Fluoreszenz kann man beobachten, dass die DNA teilweise zu kondensieren beginnt (2), was sich mit der Zeit verstärkt (3), gefolgt von der Fragmentierung der DNA (4-6).

Eine neue Erkenntnis bestand darin, dass die Bildung der apoptotischen Körperchen mitunter auch schon stattfindet, bevor die DNA fragmentiert und sich dann ein apoptotisches Körperchen mit der kompletten, kondensierten DNA abschnürt (6, untere Zelle). Zudem fällt auf, dass sobald die Membranintegrität verloren geht, die Propidiumiodid-Färbung der DNA sichtbar wird (6) und sich ihre Intensität dann auch mit der Zeit verstärkt, wohingegen die GFP-Intensität nachlässt bis sie nicht mehr detektierbar ist (6-7). Dies ist einerseits sicherlich bedingt durch den Integritätsverlust der Zellmembran und auch der Kernhülle sodass überschüssiges H2B-GFP hinausdiffundieren kann, andererseits durch die Fragmentierung der DNA, sodass sich das H2B-GFP herauslöst und auseinander diffundiert. Außerdem geht hervor, dass die sichtbaren apoptotischen Prozesse

erst nach ca. 10 Stunden einsetzen und dann relativ schnell, d.h. in weniger als einer Stunde, abgeschlossen sind (1-5).

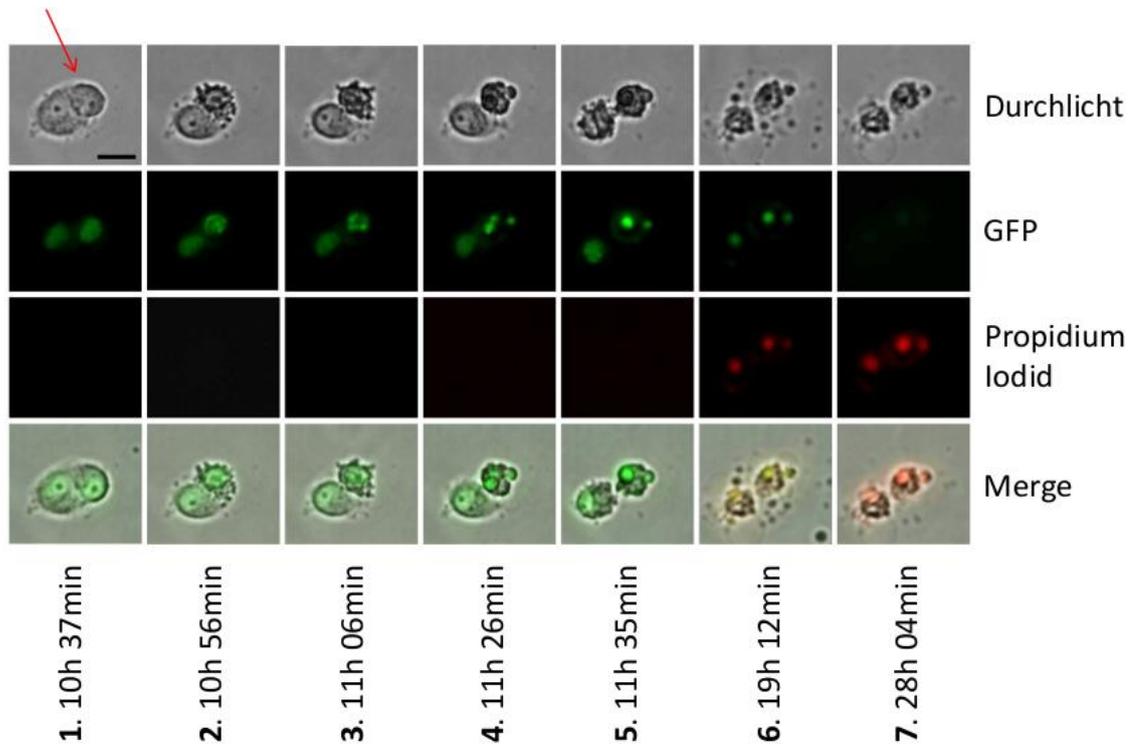


Abbildung 3-11: Aufnahmen in Apoptose gehender A549 H2B-GFP Zellen während einer Zeitverlaufsstudie. A549 H2B-GFP wurden mit 50 μM CDDP inkubiert. Nach 8,5h begann die Aufnahme der Bilder am Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenz Mikroskop, 20-fache Vergrößerung). Die Messung erstreckte sich über eine Zeitspanne von 24h im Abstand von 2,5 Minuten unter Verwendung einer Inkubationskammer (5% CO_2 , 37°C). Die Bilder zeigen die Reihenfolge der morphologischen, zytoplasmatischen und nukleären Veränderungen während der Apoptose anhand zweier Zellen. Die Aufnahmen sind repräsentativ für n= 3 Experimente. (Maßstab:20 μm)

3.3 Biochemische Merkmale der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen

3.3.1 Kinasen und apoptotische Proteine werden nach Cisplatin-Behandlung aktiviert

Cisplatin führt zu Vernetzungen zwischen und innerhalb von DNA Strängen. Dadurch werden verschiedene Signalwege angeschaltet (1.3.1). Um einen tieferen Einblick in die molekulare Regulierung der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen zu erhalten, wurden Kinasen und apoptotische Proteine nach 24-stündiger Cisplatin-Inkubation mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Aktivierung verschiedener Hauptakteure der Cisplatin-induzierten Apoptose ist in Abbildung 3-13 dargestellt. Die Histon H2Ax Phosphorylierung, welche normalerweise nach Doppelstrangbrüchen stattfindet, konnte ebenso gezeigt werden wie die Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 (Chk 1). Diese spielt eine wichtige Rolle während der DNA-Schadens-Antwort und führt weitergehend zur Aktivierung des „Wächters des Genoms“, dem Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53. p53 leitet verschiedene Prozesse ein, wie z.B. Zellzyklusarrest (u.a. über die Aktivierung von p21), DNA-Reparatur, aber auch Apoptose. Auch die Aktivierung und damit Stabilisierung von p53 konnte mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Dasselbe gilt für die Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl, welche ebenfalls durch p53 reguliert werden können, auf direktem und indirektem Wege (Hagn et al. 2010). Zudem sind nach der Cisplatin-Behandlung auch die Effektor Caspasen 3/ 7 / 9 und die Initiator Caspase 8 genauso beteiligt wie das geschnittene Caspase-Substrat Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1).

Aus der Literatur ist bekannt, dass MAP Kinasen (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) ebenfalls eine Rolle spielen in Signalwegen, welche durch Cisplatin (Siddik 2003; Germain et al. 2010) induziert werden (Abbildung 3-12). Daher wurde die MK 2 (MAPK-activated Protein Kinase-2) untersucht und deren Aktivierung nach Cisplatin gezeigt (Abbildung 3-13).

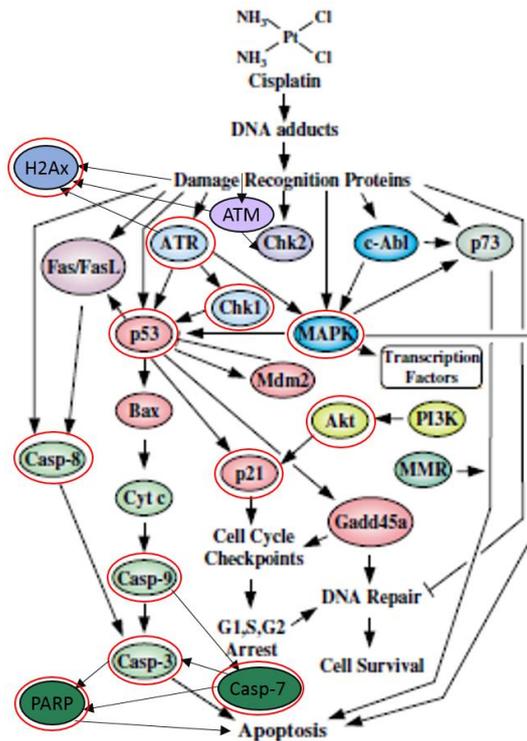
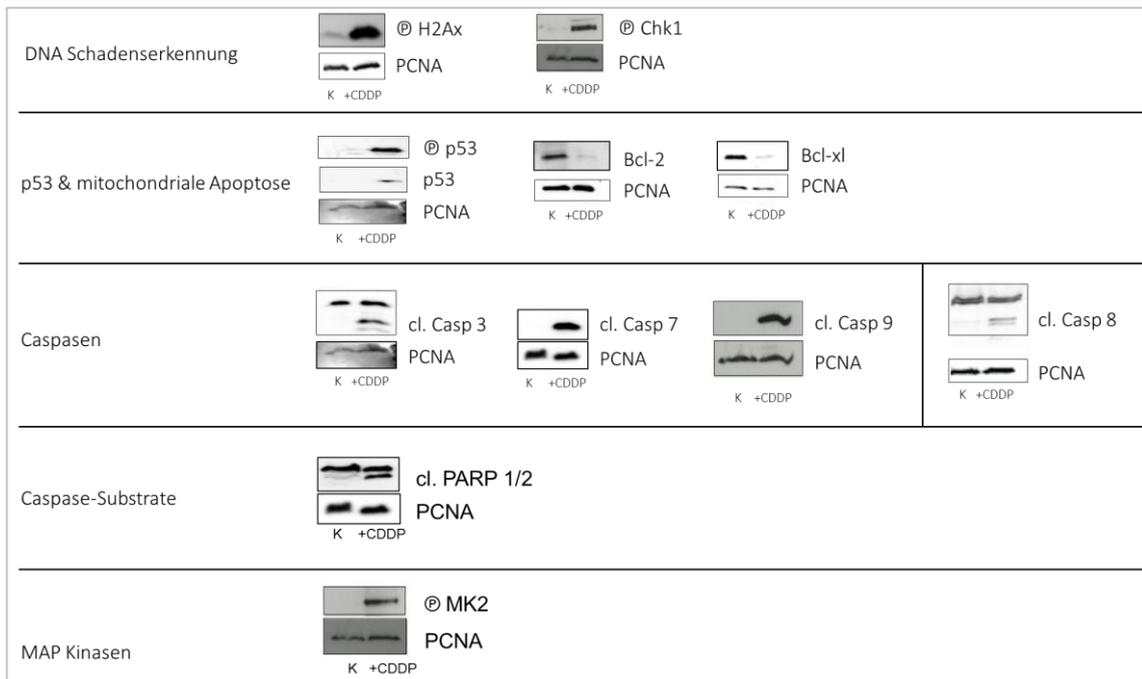


Abbildung 3-12: Übersicht über die Wirkungsweise von Cisplatin sowie die Proteine, deren Aktivierung in den A549 Zellen nachgewiesen werden konnte. Das aktivierte Cisplatin bildet DNA Addukte (v.a. *intrastrand crosslinks*) sobald es in den Kern gelangt. Daraufhin werden unterschiedliche Signalwege eingeschaltet: einerseits Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparatur, andererseits Apoptose, sofern der DNA-Schaden zu ernst ist. Diese kann über den intrinsischen Weg geschehen (über p53) oder den extrinsischen Weg (über Caspase 8). Die roten Markierungen kennzeichnen die in der Westernblot Analyse nachgewiesenen Proteine (Abbildung 3-13)
 Geändert nach (Siddik 2003) ⁵.

5



⁵ Adapted by kind permission from Macmillan Publishers Ltd: Oncogene, Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, 22(47), 7265–79. doi:10.1038/sj.onc.1206933, copyright (2003). <http://www.nature.com/onc/index.html>

Abbildung 3-13: Bestätigung der Rolle der Hauptbeteiligten in der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549. A549 Zellen wurden mit 50 μ M CDDP für 24 h inkubiert. Die Aktivierung der phosphorylierten Proteine wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern, die anderen Proteine mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Für die Ladekontrolle wurden Antikörper gegen PCNA eingesetzt. K Kontrolle; @ phosphoryliert

3.3.2 Hat die Inhibierung von ATM/ATR sowie von Caspasen Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Apoptose?

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Chk1 als auch H2Ax in A549 Zellen aktiviert werden durch Cisplatin (Abbildung 3-13). Beide Proteine stellen Substrate von ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) dar (Siddik 2003; Wang & Lippard 2005; Srivastava et al. 2009), weshalb ein Inhibitor gegen ATR/ATM (Ataxia-telangiectasia mutant) eingesetzt wurde, um deren Rolle in der Cisplatin-induzierten Apoptose näher zu untersuchen. Außerdem wurde auch der Caspase Inhibitor zVAD-fmk (zVAD) verwendet, ein zellpermeabler Pan-Caspase Inhibitor. Dieser sollte Aufschluss darüber geben, ob in den A549 Zellen auch Caspase-unabhängige Apoptose stattfindet nach Cisplatin-Behandlung (Lock et al. 2007). Hierfür wurden A549 Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor vorbehandelt und dann für 24 h mit Cisplatin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Mikroskop betrachtet und aufgenommen.

Die Analyse der Daten ergab, dass die Inhibition von ATM/ATR per se eine signifikante Reduktion der relativen Lebendzellzahl bewirkt, was auch für die Doppelbehandlung mit Cisplatin und dem Inhibitor zutrifft (Abbildung 3-14A). Im Bezug auf den Zelltod fällt auf, dass eine deutliche Sensibilisierung der A549 Zellen gegenüber Cisplatin eintritt (Abbildung 3-14B). Nach Inkubation mit dem Inhibitor allein werden vor allem Zellen im frühapoptotischen Stadium beobachtet, wie auch durch die alleinige Applikation von Cisplatin. Die Erhöhung des Anteils an Zellen im spätapoptotischen Stadium sowie der Nekrosen lässt sich zudem in Abbildung 3-15C gut anhand der Zunahme der PI-positiven Zellen erkennen.

Die Inhibition der Caspasen hat keinen Effekt auf die relative Lebendzellzahl (Abbildung 3-14A), führt jedoch zu einem deutlichen Rückgang des Zelltodes nach Cisplatin-Behandlung, welcher außerdem vorwiegend frühapoptotischer Natur ist (Abbildung 3-14B).

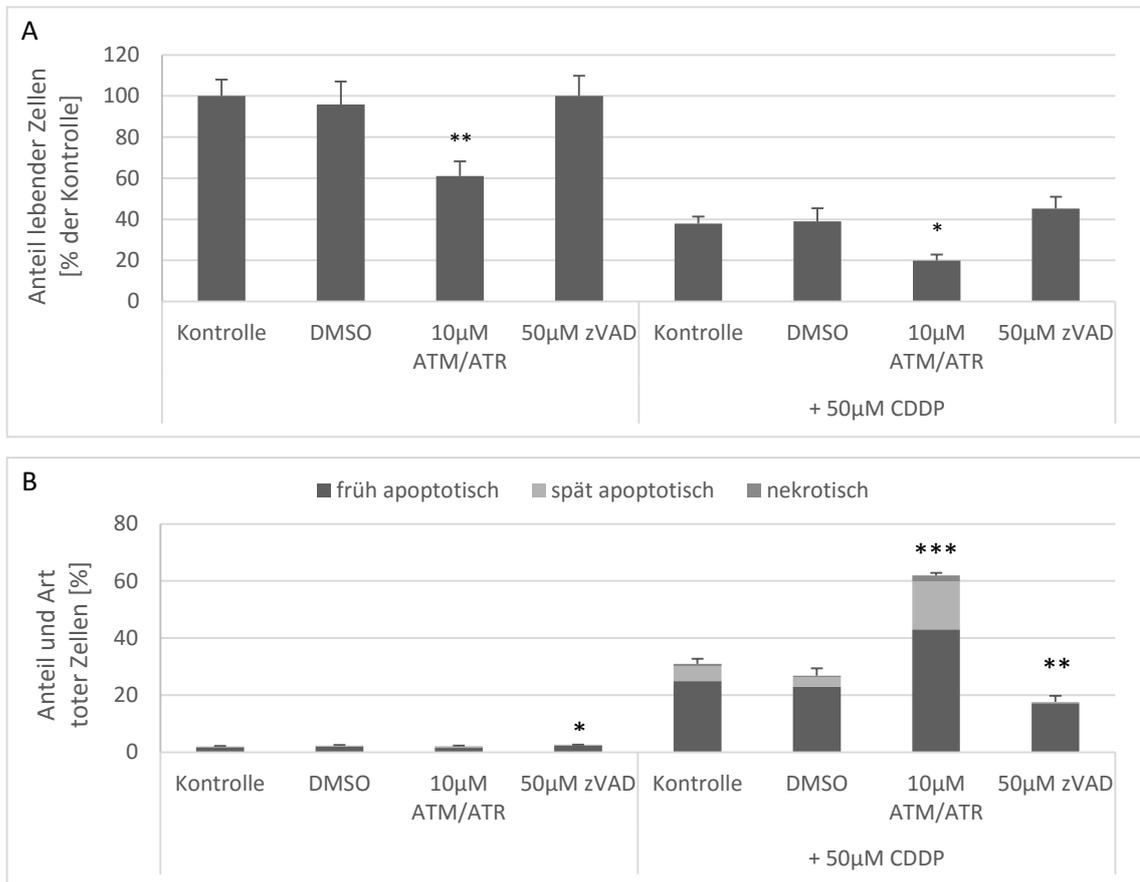


Abbildung 3-14: Cisplatin-induzierter Zelltod in A549 ist abhängig von ATM/ATR sowie Caspasen. A549 Zellen wurden am dritten Tag nach dem Aussäen mit CDDP inkubiert für 24h nach 30-minütiger Präinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen, die Akquisition der Bilder sowie die Analyse der Daten mit der Olympus ScanR Software. (A) stellt die Mittelwerte der Lebendzellzahl (relativ zur Lebendzellzahl der Kontrolle) dar, während (B) den prozentualen Anteil der toten Zellen (im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle) und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod zeigt. Die Mittelwerte entstammen zwei unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten (n=6) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP).

Die durch CDDP-induzierte Kondensation sowie das Abrunden der Zellen können mit zVAD jedoch nur zu einem gewissen Ausmaß gehemmt werden, wie aus Abbildung 3-15 ersichtlich wird.

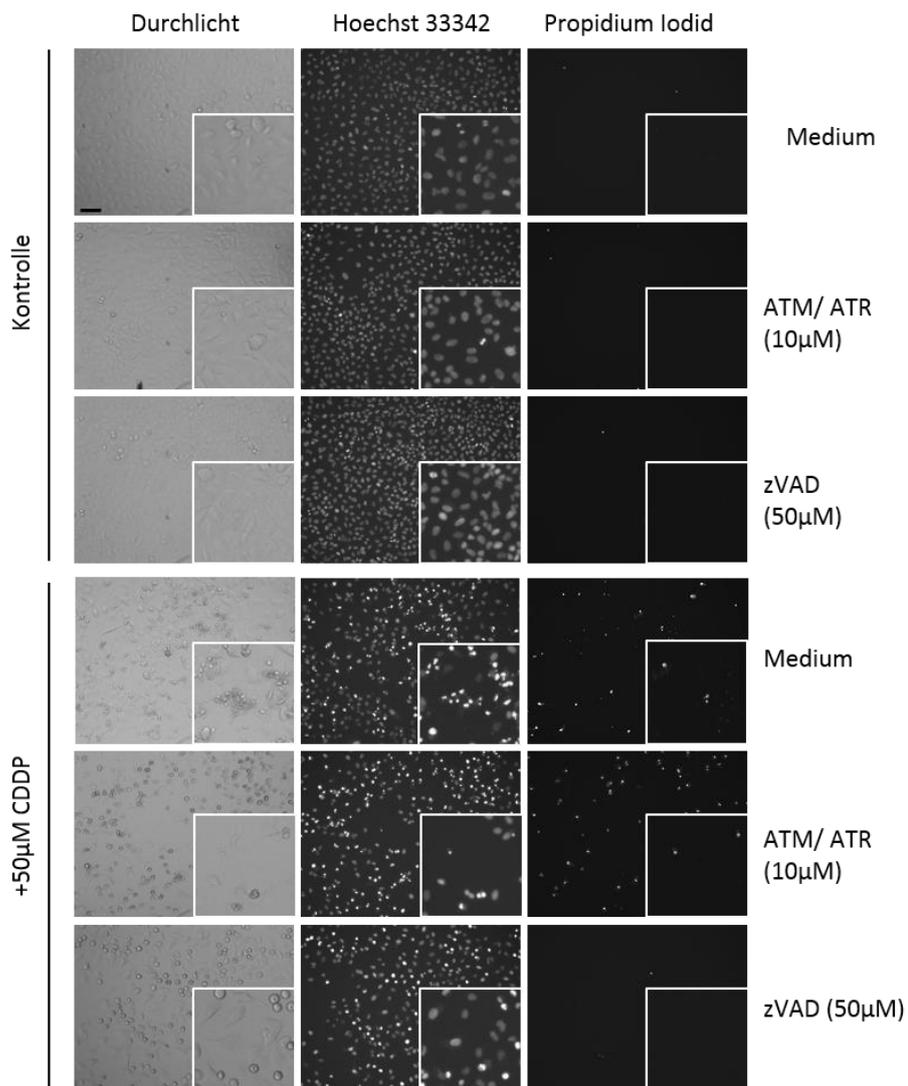
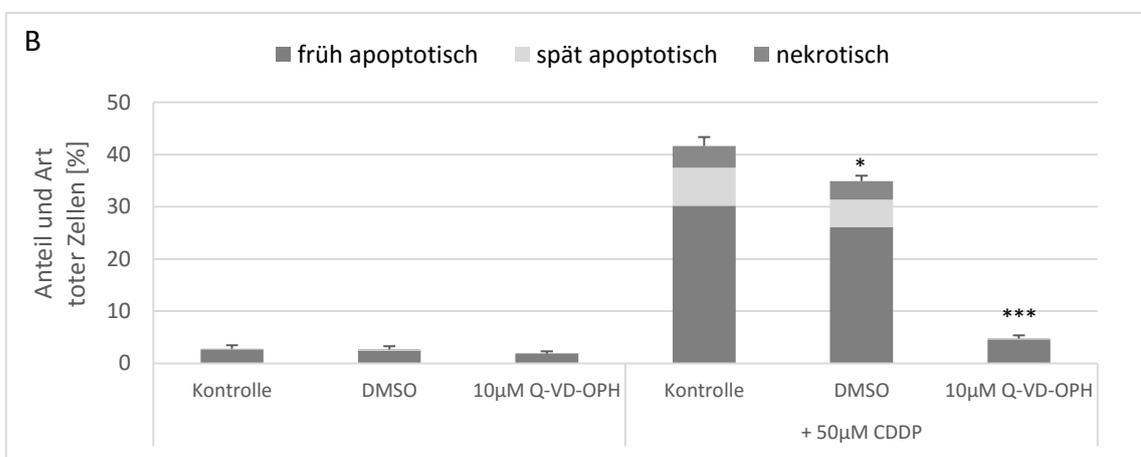
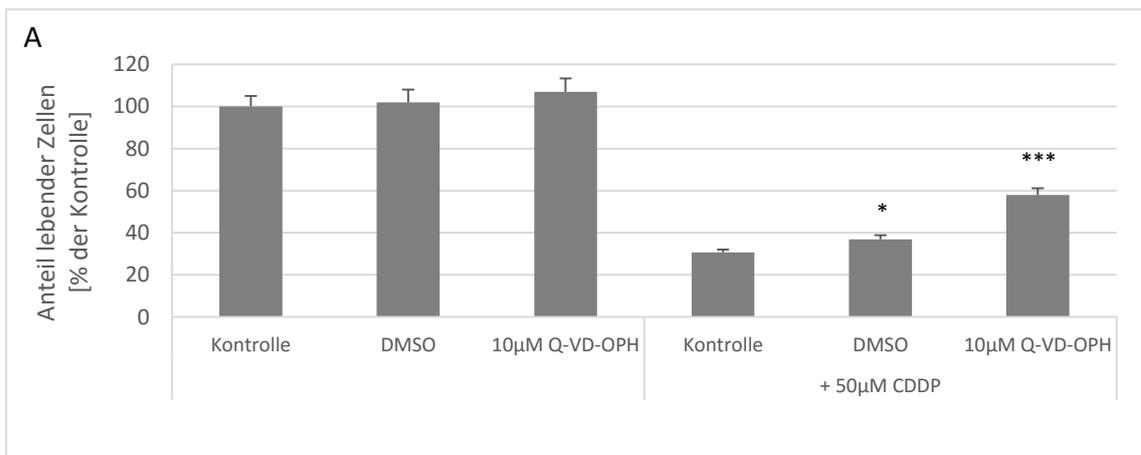


Abbildung 3-15: Cisplatin-induzierter Zelltod in A549 wird durch ATM/ATR Inhibition erhöht, durch zVAD herabgesetzt. A549 Zellen wurden wie in Abbildung 3-14 beschrieben, behandelt. Nach der Akquisition der Bilder (10-fache Vergrößerung) erfolgte die Analyse der Daten. Bei den dargestellten Bildern handelt es sich um repräsentative Abbildungen aus zwei unabhängigen Experimenten (Maßstab: 50 µm).

Um eine bessere Hemmung der Caspasen zu erzielen, wurde ein weiterer Inhibitor eingesetzt, von dem berichtet wurde, dass er weniger toxisch und effektiver sei als zVAD, nämlich Q-VD-OPH (Kuželová et al. 2011). Die A549 Zellen wurden vor der Cisplatin Behandlung mit Q-VD-OPH vorinkubiert. Eine eindeutige Zunahme der relativen Lebendzellzahl nach Cisplatin bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Inhibitor ist zu beobachten (Abbildung 3-16A). Doch auch das Lösungsmittel (DMSO) allein hat einen schwachen Effekt zur Folge. Betrachtet man die Induktion des Zelltodes (Abbildung 3-16B), so fällt eine leichte Abnahme des prozentualen Zelltodes nach CDDP-Behandlung in Kombination mit DMSO auf. Dieser hemmende Effekt auf den Zelltod ist nach Vorinkubation mit Q-VD-OPH sehr deutlich ausgeprägt. Im Gegensatz zu den mit Cisplatin behandelten Kontrollen bzw. DMSO-Kontrollen gibt es bei den Zellen mit dem Inhibitor fast nur frühapoptotische Zellen. Diese Effekte sind auch durch die Bilder in Abbildung 3-16C veranschaulicht.



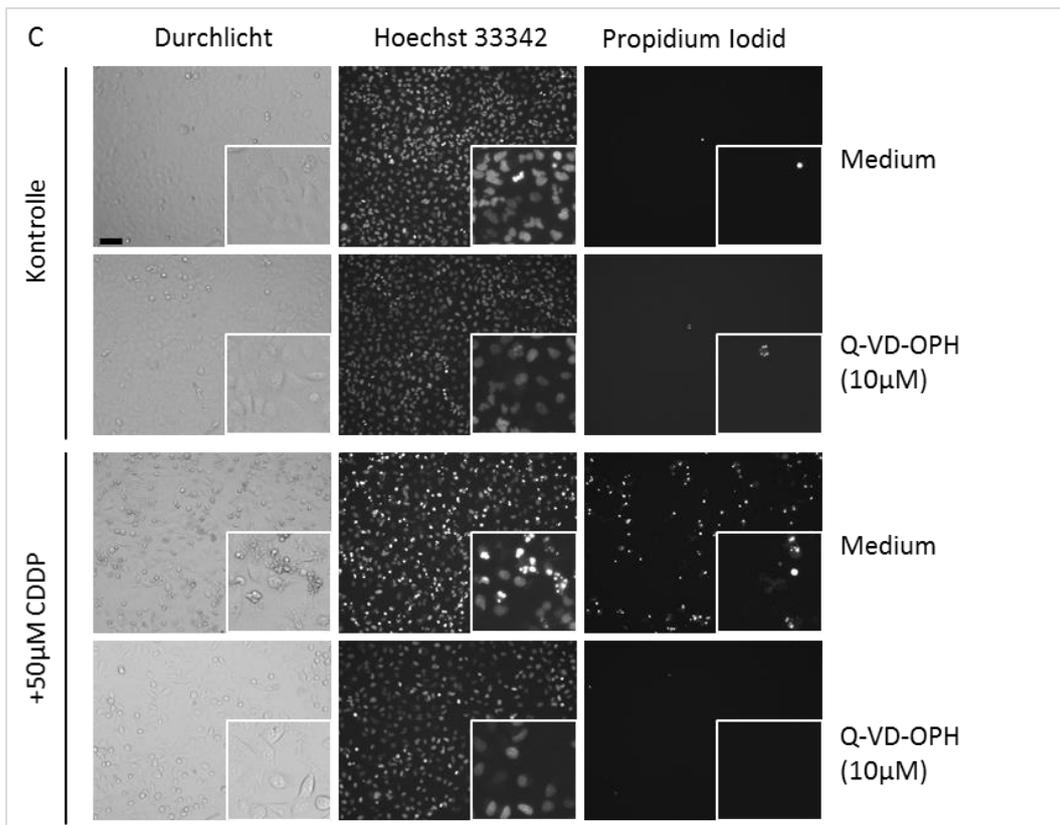


Abbildung 3-16: Inhibition der Caspasen durch Q-VD-OPH verringert den CDDP-induzierten Zelltod. A549 Zellen wurden ausgesät und am dritten Tag nach 30-minütiger Präinkubation mit 10 µM Q-VD-OPH für 24h mit 50 µM CDDP inkubiert. Anschließend folgte die Färbung der Zellen, die Akquisition der Bilder sowie die Analyse der Daten mit der ScanR Software. In (A) sind die Mittelwerte der Lebendzellzahl (relativ zur Lebendzellzahl der Kontrolle) dargestellt, während (B) den prozentualen Anteil der toten Zellen (im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle) und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod zeigt. In (C) sind repräsentative Bilder der unterschiedlichen Behandlungen abgebildet. Die Mittelwerte in (A) und (B) wurden aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten berechnet (n=6) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP). (Maßstab: 50 µm)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Cisplatin-induzierte Zelltod, zumindest größtenteils, über Caspasen vermittelt wird, wie durch die Hemmung des Zelltodes durch den Einsatz von Caspase Inhibitoren deutlich wird. Dennoch kann zumindest die Abrundung der Zellen nicht verhindert werden, auch nicht mit dem deutlich stärker wirkenden Q-VD-OPH. Dies deutet darauf hin, dass die Abrundung der Zelle während der Cisplatin-induzierten Apoptose teilweise unabhängig von Caspasen ist.

Weiterhin ist eine Sensibilisierung der Zellen durch Cisplatin zu beobachten, wenn ATM/ATR inhibiert ist. ATR und ATM werden während der DNA Schadensantwort aktiviert und aktivieren einerseits die Reparaturmaschinerie und auch den Tumorsuppressor p53 und auch für Cisplatin ist diese Aktivierung, zumindest von ATR aus der Literatur bekannt (Siddik 2003; Carreras Puigvert et al. 2013b). Daher war eine solche Sensibilisierung zu erwarten. Zudem scheint der verwendete Inhibitor demnach die ATM/ATR zu hemmen, auch wenn seine Spezifität in Frage gestellt wurde (Choi et al. 2011), wobei weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig wären um unspezifische Effekte gänzlich auszuschließen.

3.4 Chemikalienscreen zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose

Die vorangegangene Charakterisierung der A549 Zelllinie bestätigte die Beteiligung schon bekannter Apoptose-Mediatoren am Cisplatin-induzierten Zelltod. Um nun einen tieferen Einblick in die Wirkung verschiedener Chemikalien auf die Cisplatin-induzierte Apoptose zu erhalten, kamen zwei Chemikalienbibliotheken zum Einsatz: die „*Known Bioactives*“ Bibliothek des *Institute of Chemistry and Cell Biology* (ICCB) der Harvard Universität, bestehend aus 480 chemischen Verbindungen, u.a. auch Medikamenten, mit bekannten Zielstrukturen, sowie die „*FDA (Food and Drug Administration) approved Drugs*“ Bibliothek, bestehend aus 640 Arzneimitteln mit bekannter Wirkungsweise. Letztere haben natürlich den Vorteil, dass sie als Medikamente schon umfassenden Sicherheits- sowie Bioverfügbarkeitstests unterzogen worden sind. Insgesamt wurden vier Chemikalienscreens durchgeführt, zwei Basalscreens unter alleinigem Einsatz der Chemikalien und zwei Doppelscreens, in welchen die Zellen einer Kombination aus Chemikalien und Cisplatin ausgesetzt waren.

3.4.1 Substanzen, welche den basalen Zelltod in den A549 Zellen erhöhen

Für den Basalscreen wurden die A549 Zellen ausgesät und am folgenden Tag mit den Substanzen für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Medium versetzt. Diese Behandlung ist analog zu derjenigen im später durchgeführten Doppelscreen. Der Basalscreen galt der Überprüfung, ob sich die Chemikalien und Medikamente in der jeweils verwendeten Konzentration schon allein auf die Zellen hinsichtlich der Induktion von Zelltod auswirken. Dabei wurde jede Substanz als Treffer gewertet, bei der die Anzahl an toten Zellen im Mittel um mehr als die dreifache Standardabweichung der toten Zellen in der Negativkontrolle (DMSO) erhöht ist. Die Werte wurden auf den jeweiligen Mittelwert der Positivkontrolle aller 14 Platten normalisiert (Basalscreen 1:CDDP = 33%; Basalscreen 2: CDDP = 39%).

Abbildung 3-17 zeigt eine Übersicht der Wirkung aller untersuchten Substanzen auf den Zelltod. Dabei sind nur die Werte aus einem der Basalscreens aufgetragen. Denn zur Ermittlung der Treffer wurden die erhaltenen Werte des induzierten Zelltodes der beiden Screens nicht gemittelt, sondern separat ausgewertet um so die Variabilität der Screens zueinander nicht zu vernachlässigen, wenn sie auch nicht besonders groß ist.

Dabei fällt auf, dass die meisten der Chemikalien und Medikamente keinen Einfluss auf die Zellvitalität ausüben, d.h. die Anzahl der toten Zellen befindet sich im Bereich zwischen den gestrichelten Linien ($\pm 3x$ STABW der DMSO-Kontrolle). Dennoch gibt es eine beträchtliche Anzahl an Substanzen, welche zytotoxisch sind, teilweise sogar stärker als Cisplatin selbst (größer als 1). Die Treffer werden in der folgenden Tabelle und den Abbildungen (Tabelle 3-1; Abbildung 3-18 - Abbildung 3-20) nochmals genauer betrachtet.

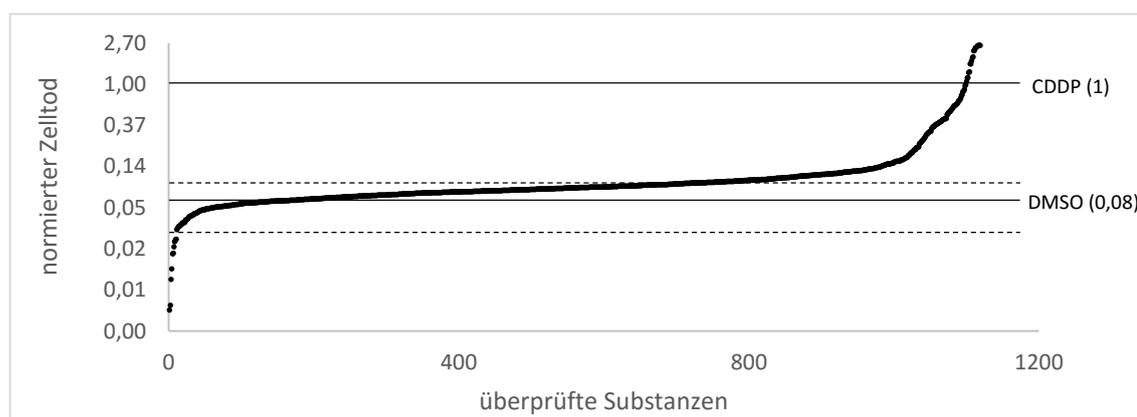


Abbildung 3-17: Zytotoxizität der getesteten Substanzen. Die A549 Zellen wurden mit den jeweiligen Substanzen behandelt, nach 24h mit Hoechst/PI gefärbt und am Mikroskop aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der ScanR Software. Dargestellt sind die Zelltodraten der untersuchten Substanzen, normiert auf die Positivkontrolle CDDP (= 1) aus dem zweiten Basalscreen. Zudem sind der normierte Mittelwert der DMSO-Kontrolle (durchgezogene Linie) sowie die Grenzwerte ($\pm 3x$ STABW der DMSO-Kontrolle; gestrichelte Linien) aufgezeigt. Die y-Werte sind logarithmisch aufgetragen ($\lg_e = \ln$).

In Tabelle 3-1 sind dann die Substanzen aufgelistet, welche den basalen Zelltod der A549 Zellen in beiden Basalscreens erhöhten und damit reproduzierbar waren. Dabei handelt es sich um insgesamt 86 Verbindungen aus den 1120 getesteten Chemikalien, wovon die Mehrheit aus der ICCB stammt. Darunter befinden sich auch einige Krebstherapeutika, v.a. aus der FDA Bibliothek. Um die Verteilung zu veranschaulichen, sind sie in Abbildung

3-18 die Treffer zum einen als prozentualer Anteil aller getesteten Substanzen dargestellt, zum anderen sind die Treffer in Krebstherapeutika und Sonstige aufgeteilt sowie hinsichtlich ihrer Herkunft.

Tabelle 3-1: Substanzen, welche den basalen Zelltod erhöhen, eingeteilt nach Bibliothek und Anwendung. Insgesamt wurden 1120 Chemikalien getestet. Dargestellt sind die Anzahl an reproduzierten Treffern sowie die Menge an Krebstherapeutika unter diesen.

	ICCB	FDA
Anzahl getesteter Verbindungen	480	640
Reproduzierter Treffer (bezüglich der Zelltoderhöhung)	51	35
davon Krebstherapeutika	5	19
Krebstherapeutika ohne doppelt auftretende Substanzen	21	

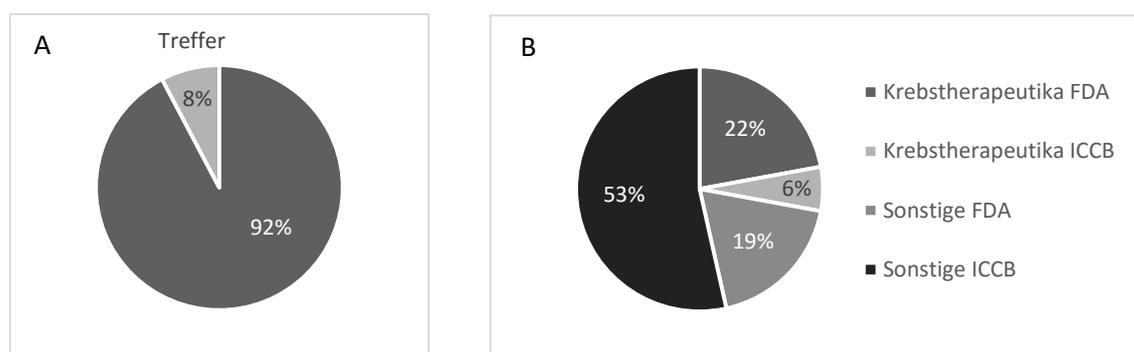


Abbildung 3-18: Darstellung der Substanzen, die den Zelltod von A549 Zellen erhöhen. (A) zeigt den Anteil an Substanzen, die als Treffer eingestuft worden sind, während in (B) die Treffer in Krebstherapeutika und sonstige Substanzen eingeteilt sind, mit der Angabe der jeweiligen Bibliothek, aus der sie stammen.

Die Krebstherapeutika, die den Zelltod erhöhten, sind in Abbildung 3-19 einzeln aufgeführt. Im Vergleich zu Cisplatin induzierten sie meist weniger Zelltod. Es finden sich darunter auch Zytostatika, die in der Therapie von Lungenkrebs (insbesondere „Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)“) eingesetzt werden: Paclitaxel, Docetaxil, Vinorelbin, Gemcitabin, Etoposid (nccn.org), Doxorubizin (media.chemotherapyadvisor.com) und Mitomycin (Zarogoulidis et al. 2013). Einige der Krebstherapeutika sind in beiden

Bibliotheken vertreten, teilweise unterscheidet sich ihr Effekt jedoch aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen, in denen sie vorliegen. Die aus der ICCB Bibliothek stammenden Krebstherapeutika sind jeweils etwa doppelt so hoch konzentriert wie diejenigen aus der FDA Bibliothek. Die Einstufung der Krebstherapeutika als Treffer hinsichtlich des Zelltodes bestätigt die Wirksamkeit der Methode.

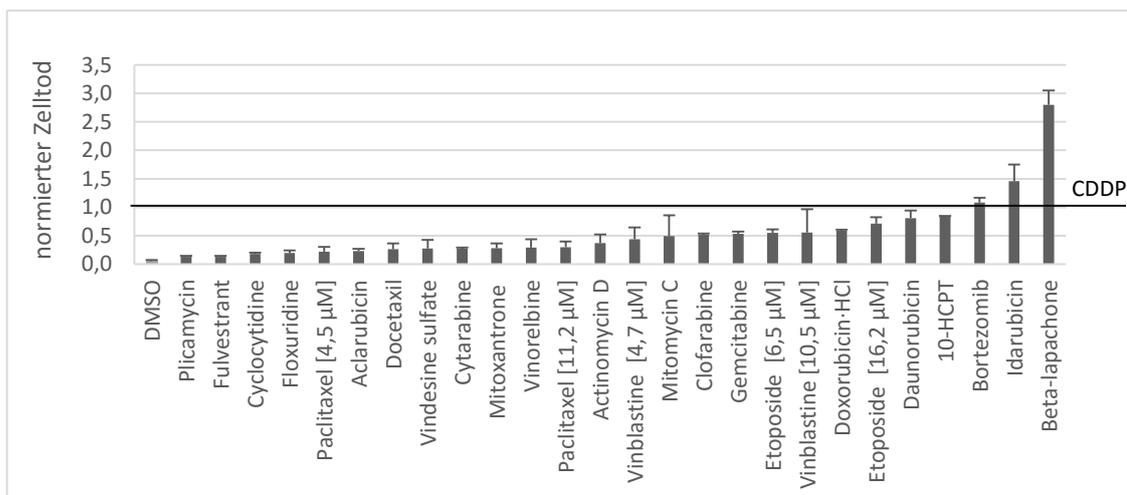


Abbildung 3-19: Die Krebstherapeutika in der Trefferliste zeigen die Wirksamkeit der Methode. Die A549 Zellen wurden 24h mit den Chemikalien behandelt, mit Hoechst/PI gefärbt und mit der automatisierten Mikroskopie analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte + die mittlere Abweichung (MITTELABW) der Zelltodes aus den zwei Basalscreens (n=2), normiert auf den durch CDDP induzierten Zelltod. Die Namen der Substanzen sind den Listen der Enzo Life Sciences Screen-Well Bibliotheken „ICCB Known Bioactives library“ (BML-2840-0100) und „FDA approved drug library“ (BML-2841-0100) entnommen und daher auf Englisch. HCPT Hydroycamptothecin.

Die übrigen Substanzen, die als Treffer gewertet wurden, sind in Abbildung 3-20 visualisiert, aufgeteilt hinsichtlich der Bibliothek, der sie entstammen. Die Treffer aus der FDA Bibliothek (Abbildung 3-20A) induzieren weniger Zelltod im Vergleich zu Cisplatin, ausgenommen Quinacrin, einem früher eingesetzten Antiprotozoikum, welches u.a. die Phospholipase A2 hemmt (Wallace 1989), sowie dem Proteinsynthese-Inhibitor Puro-mycin. Allgemein lassen sich die Treffer einteilen in Anthelminthika sowie in Mittel, welche einen Einfluss auf Enzyme ausüben oder sonstige Effekte haben.

Im Gegensatz dazu gibt es unter den Chemikalien der ICCB Bibliothek deutlich mehr Treffer, bei welchen es sich nicht um Krebstherapeutika handelt (Abbildung 3 20B).

Sie können in Stoffe aufgeteilt werden in Effektoren von Enzymen und Kinasen, Ionenkanal Liganden und Substanzen mit sonstigen Effekten.

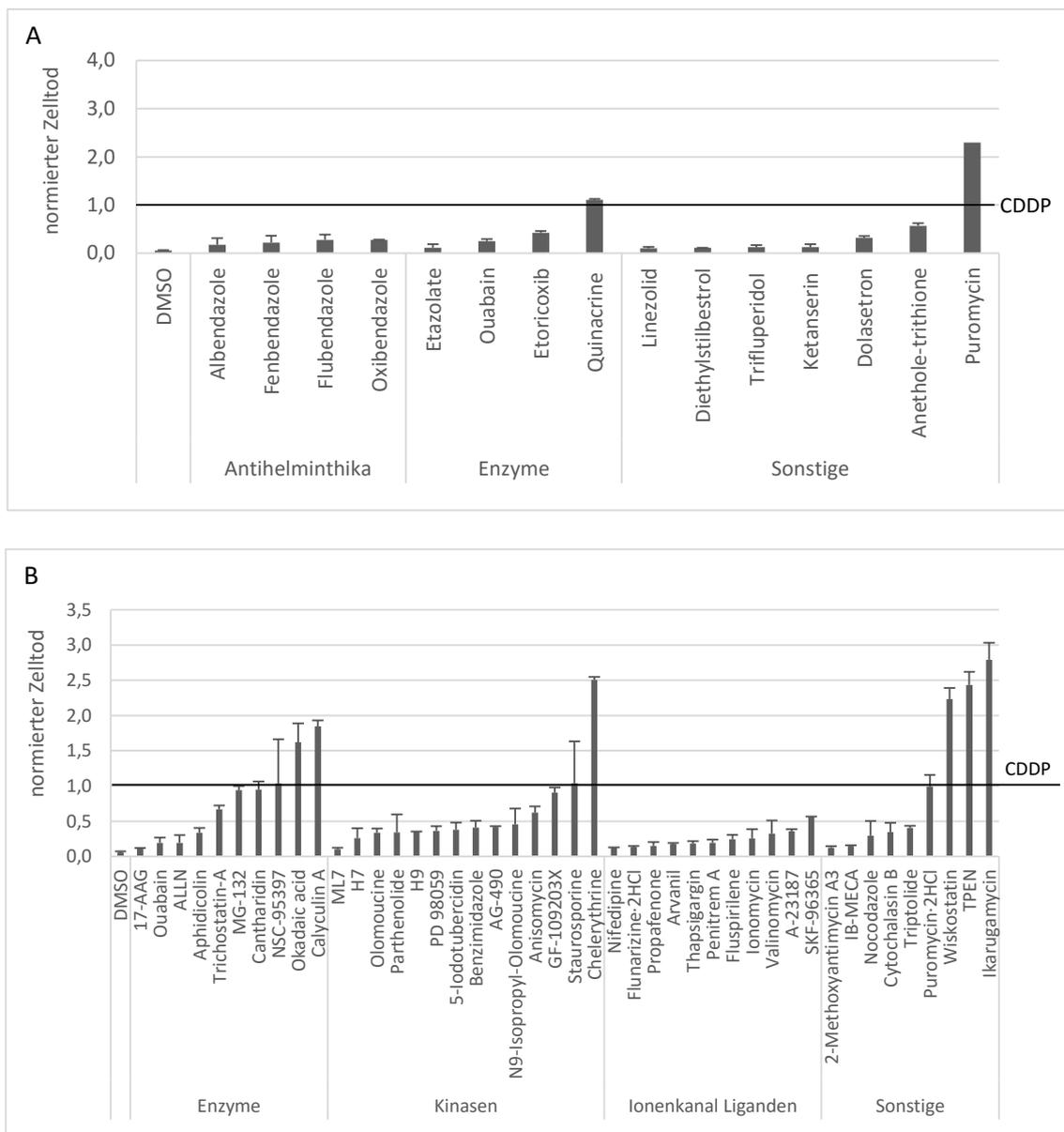


Abbildung 3-20: Substanzen, die den basalen Zelltod in den A549 Zellen erhöhen. Die A549 Zellen wurden 24h mit den Chemikalien behandelt, mit Hoechst/PI gefärbt und mit der automatisierten Mikroskopie analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte + MITTELABW des Zelltodes aus den zwei Basalscreens (n=2), normiert auf den durch CDDP induzierten Zelltod. (A) stellt die Treffer aus der FDA Bibliothek dar, ausgenommen der Krebstherapeutika, während in (B) die entsprechenden Chemikalien aus der ICCB Bibliothek gezeigt sind. Die Namen der Substanzen sind den Listen der Enzo Life Sciences Screen-Well Bibliotheken „ICCB Known Bioactives library“ (BML-2840-0100) und „FDA approved drug library“ (BML-2841-0100) entnommen und daher auf Englisch. 17-AAG 17-Allylamino-Geldanamycin; ALLN Ac-Leu-Leu-Nle-CHO

Die Chemikalien, welche mehr als die Hälfte des durch Cisplatin-induzierten Zelltodes herbeiführen, sind zusätzlich in Tabelle 3-2 aufgelistet, zusammen mit ihrer Wirkungsart. Sie entstammen größtenteils der Substanzgruppe, welche Einfluss auf Enzyme nimmt. Dabei stellt die aufgelistete Wirkungsart oft nur eine von Mehreren dar.

Tabelle 3-2: Chemikalien, welche den basalen Zelltod um mehr als die Hälfte des CDDP-induzierten Zelltodes erhöhen und deren Wirkungsart. PP Protein Phosphatase; MAP Mitogen aktivierte Protein-; PKC Proteinkinase C; FIASMA Funktioneller Inhibitor der sauren Sphingomyelinase; TPEN N,N,N',N'-tetrakis(2-Pyridylmethyl) Ethylendiamin; TRP Kanal „Transient Receptor Potential“ Kanal; N-WASP Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein

Substanz	Wirkung
Calyculin A	PP2A Inhibitor
Cantharidin	
Okadasäure	
Chelerythrin	PKC Inhibitor
GF-109203X	
Staurosporin	
Anisomycin	Proteinsynthese Inhibitor
Puromycin·2HCl	
Ikarugamycin	Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose
MG-132	Proteasom Inhibitor
NSC-95397	CDC25 Phosphatase Inhibitor
Quinacrin (Mepacrin)	Phospholipase A2
Trichostatin-A	Histon-Deacetylase Inhibitor
Anetholtrithion	Sialagogum; Choleretikum
TPEN	Schwermetall Chelator
SKF-96365	TRP Kanal Inhibitor
Wiskostatin	N-WASP Inhibitor

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem Inhibitoren von Phosphatasen (PP2A/ CDC25), der Proteinkinase C sowie Stoffe, die der Proteinbiosynthese entgegenwirken, in den A549 Zellen basal Zelltod auslösen.

Kinasen und Phosphatasen sind durch ihre Eigenschaft, Proteine phosphorylieren oder dephosphorylieren zu können, für die Regulierung der meisten Signalwege in der Zelle verantwortlich (Bartek & Lukas 2003; Brognard et al. 2001; Janssens & Goris 2001; Hanahan & Weinberg 2000). Ihre Mutation kann in vielen Fällen Krebs hervorrufen bzw. das Überleben der Krebszellen sichern (Brognard et al. 2001; Lapenna & Giordano 2009), sodass es nicht verwunderlich ist, sie unter den Treffern wiederzufinden. Auch für Proteinbiosynthese Inhibitoren wurde schon gezeigt, dass sie, v.a. in hohen Dosen Zelltod herbeiführen können (Chang et al. 1997; Meijerman et al. 1999).

3.4.2 Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod in den A549 Zellen modulieren

Nachdem in den Basalscreens geklärt wurde, welche der Substanzen eigenständig schon Zelltod induzieren, wurde als nächstes im Doppelscreen überprüft, wie die Chemikalien und Medikamente in der verwendeten Konzentration den Cisplatin-induzierten Zelltod beeinflussen. Hierfür wurden die A549 Zellen wie schon in den Basalscreens ausgesät, am nächsten Tag für 30 Minuten mit den Chemikalien vorinkubiert und im Anschluss mit Cisplatin behandelt. Nach 24h wurden die Zellen gefärbt, am Mikroskop aufgenommen und die Daten anschließend ausgewertet. Jede Substanz, die den mittleren Zelltod durch Cisplatin um die dreifache Standardabweichung der Positivkontrolle (CDDP) ändert und dessen Ergebnis im zweiten Durchgang reproduziert werden konnte, wurde als Treffer gezählt. Dabei wurden nur Substanzen berücksichtigt, die in den Basalscreens nicht mehr als 15% Zelltod verursacht haben. Die Werte sind auf die Positivkontrolle (CDDP) normiert. Eine Übersicht der Wirkung aller Substanzen auf den Cisplatin-induzierten Zelltod ist in Abbildung 3-21 gezeigt. Die Treffer liegen dabei außerhalb der Grenzwerte ($\pm 3x$

STABW des Cisplatin-Mittelwertes; gestrichelte Linien). Es wurden Substanzen identifiziert, welche die Cisplatin-Wirkung entweder verstärken (Sensibilisatoren) oder abschwächen (Suppressoren).

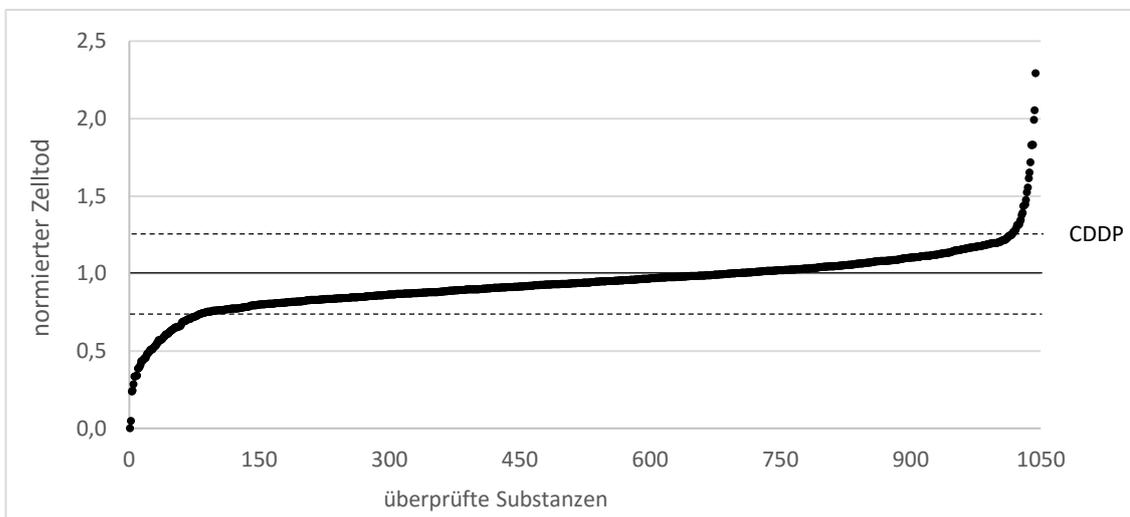


Abbildung 3-21: Wirkung getesteter Substanzen auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Die A549 Zellen wurden nach der 30-minütigen Vorinkubation mit den Chemikalien für 24h mit CDDP behandelt, anschließend gefärbt und mit der automatisierten Mikroskopie analysiert. Aufgetragen sind die auf die Positivkontrolle CDDP normierten Zelltodraten aus dem zweiten Doppelscreen, ausgenommen der Substanzen, die im Basalscreen mehr als 15% Zelltod verursachten. Zudem sind der durch CDDP induzierte Zelltod (durchgezogene Linie) sowie die Grenzwerte ($\pm 3 \times$ STABW des CDDP-Mittelwertes; gestrichelte Linien) dargestellt.

3.1.2.1 Krebstherapeutika aus der Kombinationstherapie mit Cisplatin

Insbesondere aufgrund der Resistenzentwicklung und der damit einhergehenden Rezidive erfolgt die Behandlung der Patienten oft im Rahmen einer Kombinationstherapie. Die in Abbildung 3-22 aufgeführten Zytostatika werden in der Klinik bei Lungenkrebs (NSLC bzw. SLC) häufig zusammen mit Cisplatin eingesetzt (nccn.org; Zarogoulidis et al. 2013). Daher ist es interessant, diese separat zu betrachten. Nur Docetaxil, die höhere Konzentration an Doxorubizin und das geringer dosierte Etoposid erhöhen den von Cisplatin induzierten Zelltod leicht. Paclitaxel (Taxol) hat in beiden eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss, während Gemcitabin, Vinorelbin, die geringere Kon-

zentration an Doxorubizin und die höhere Konzentration an Etoposid den Cisplatin-induzierten Zelltod sogar supprimieren. Dabei scheint der Effekt der Kombinationspräparate konzentrationsabhängig zu sein.

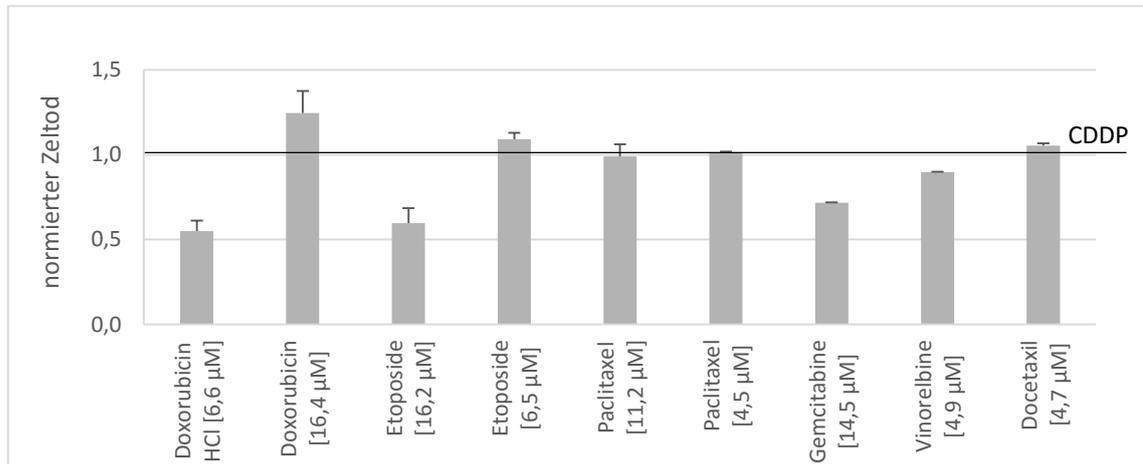


Abbildung 3-22: Die Kombinationspräparate (aus den ICCB und FDA Bibliotheken) haben nur einen schwach verstärkenden, keinen oder sogar supprimierenden Effekt auf den CDDP-induzierten Zelltod. Die A549 Zellen wurden nach 30 Minuten Vorinkubation mit den jeweiligen Substanzen für 24h mit Cisplatin inkubiert, anschließend gefärbt und mit der automatisierten Mikroskopie analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte + MITTELABW des Zelltodes aus den zwei Doppelscreens (n=2), normiert auf den CDDP-induzierten Zelltod. Die Namen der Substanzen sind den Listen der Enzo Life Sciences Screen-Well Bibliotheken „ICCB Known Bioactives library“ (BML-2840-0100) und „FDA approved drug library“ (BML-2841-0100) entnommen und daher auf Englisch.

Sensibilisatoren

Die Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod in den A549 Zellen erhöhen und basal nur maximal 15% Zelltod aufweisen, lassen sich in sechs funktionelle Gruppen unterteilen (Tabelle 3-3/ Abbildung 3-23):

Tabelle 3-3: Einteilung der Sensibilisatoren in funktionelle Gruppen

	Funktionelle Gruppe
1	EGF-Rezeptor Inhibitoren
2	Ionenkanal Liganden
3	Inhibitoren Calcium-abhängiger Signalwege
4	Protease Inhibitoren
5	Kinase Inhibitoren
6	Sonstige

Dabei handelt es sich um insgesamt neunzehn Verbindungen, wovon die Mehrheit aus der ICCB Bibliothek stammt. Nur Artesunat, ein Antimalaria-Medikament, Lapatinib, ein Zytostatikum, welches in der Brustkrebs Behandlung Einsatz findet und Itraconazol, ein Antimykotikum, sind Medikamente der FDA Bibliothek. Doch auch in der ICCB gibt es Medikamente, welche hier auftreten, so z.B. Cyclosporin A, ein Immunsuppressivum, und Nimesulid, welches wiederum Verwendung als Schmerzmittel findet, um nur zwei der Medikamente zu erwähnen.

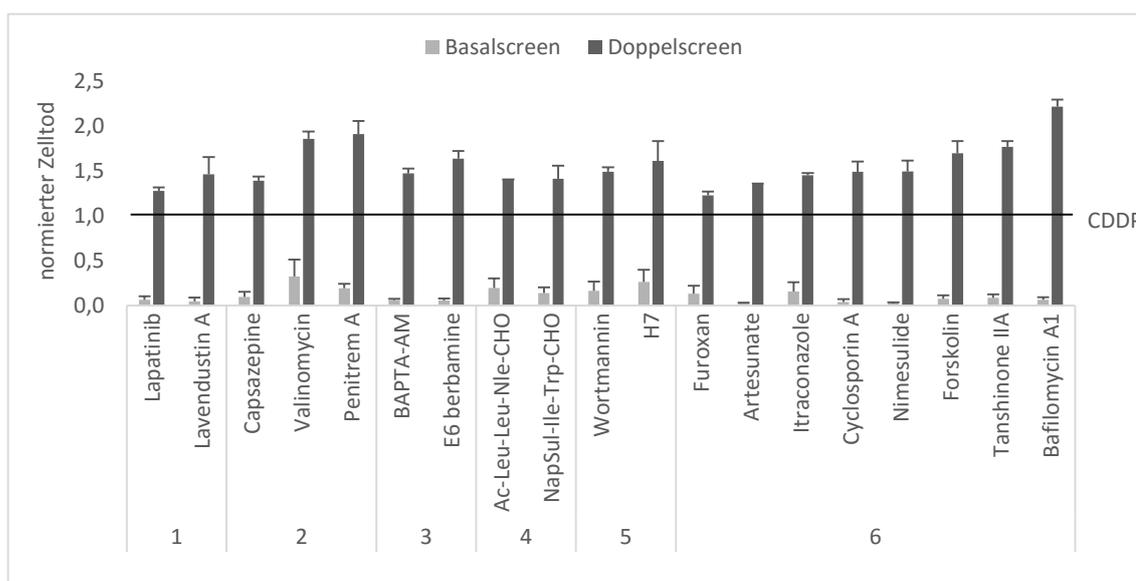
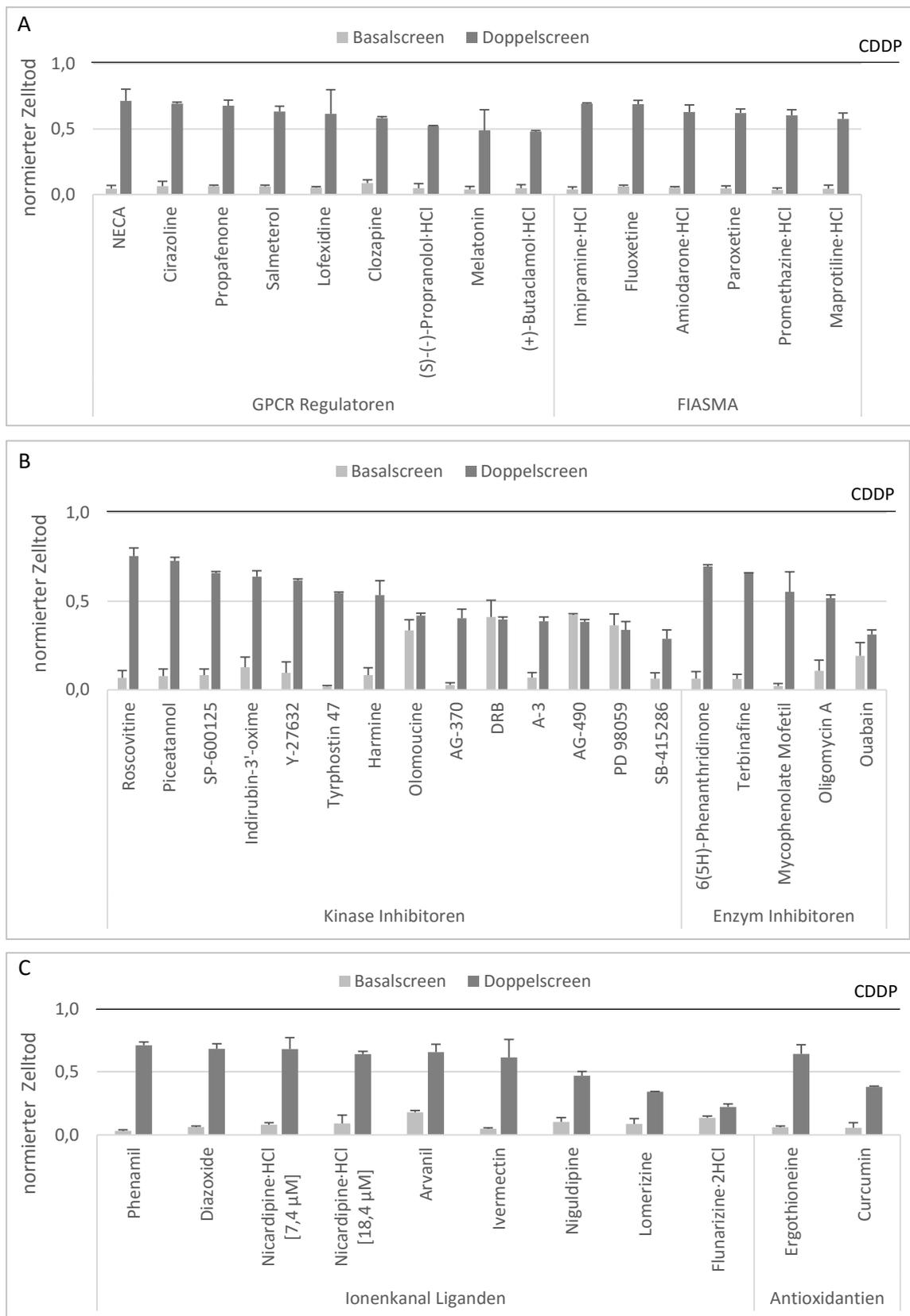


Abbildung 3-23: Die Sensibilisatoren aus der FDA/ ICCB Bibliothek können in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Deren Bezeichnung ist der Tabelle 3-3 zu entnehmen. Die A549 Zellen wurden, wie schon in Abbildung 3-22 beschrieben, behandelt und analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte + MITTELABW des Zelltodes aus den zwei Basalscreens sowie den zwei Doppelscreens mit jeweils 2 Replikaten ($n=2$), normiert auf den CDDP-induzierten Zelltod. Die Namen der Substanzen sind den Listen der Enzo Life Sciences Screen-Well Bibliotheken „ICCB Known Bioactives library“ (BML-2840-0100) und „FDA approved drug library“ (BML-2841-0100) entnommen und daher auf Englisch.

Suppressoren

Auch die 57 Suppressoren, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod der A549 Zellen verringern und basal maximal 15% Zelltod induzieren, lassen sich in neun funktionelle Gruppen zusammenfassen (Abbildung 3-24A-D). Dabei bestätigen Substanzen, welche Kinasen hemmen, wie z.B. der Inhibitor der c-Jun N-terminale Kinase SP 600125, oder Antioxidantien, wie Curcumin und Ergothionein, die jeweilige Rolle der Kinasen oder Antioxidantien in bekannten Cisplatin-induzierten Apoptose Signalwegen (Siddik 2003; Francescato et al. 2007; Pereira et al. 2013). Sie bekräftigen demnach auch die Wirksamkeit der angewandten Methode.



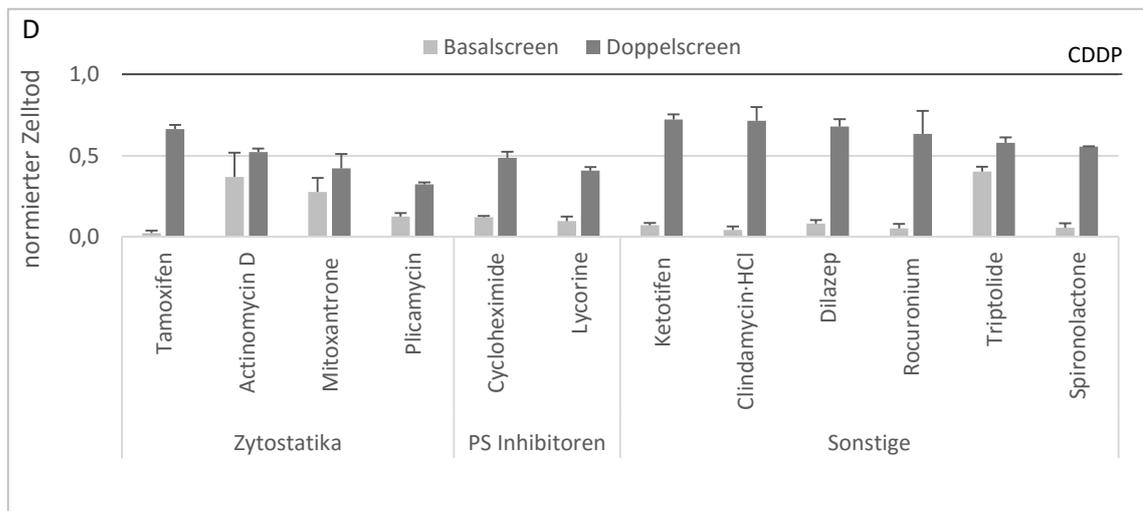


Abbildung 3-24: Die Suppressoren des CDDP-induzierten Zelltodes lassen sich in 9 funktionelle Gruppen einteilen. (A) Substanzen, die G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) beeinflussen sowie funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMA), (B) Kinase- und Enzyminhibitoren, (C) Ionenkanal Liganden und Antioxidantien und (D) Zytostatika, Proteinsynthese (PS) Inhibitoren und sonstige. Die A549 Zellen wurden, wie schon in Abbildung 3-22 beschrieben, behandelt und analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte + MITTELABW des Zelltodes aus den zwei Basalscreens sowie den zwei Doppelscreens mit jeweils zwei Replikaten (n=2), normiert auf den CDDP-induzierten Zelltod. Die Namen der Substanzen sind den Listen der Enzo Life Sciences Screen-Well Bibliotheken „ICCB Known Bioactives library“ (BML-2840-0100) und „FDA approved drug library“ (BML-2841-0100) entnommen und daher auf Englisch.

Betrachtet man die Verteilung der funktionellen Gruppen innerhalb der Suppressoren (Abbildung 3-25), so fällt auf, dass es sich bei den meisten Substanzen um Kinase Inhibitoren handelt, gefolgt von G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR) Regulatoren und Ionenkanal Liganden sowie einer Gruppe, welche als Funktionelle Inhibitoren der Sauren Sphingomyelinase (FIASMA) zusammengefasst werden können. Insgesamt sind die Treffer jedoch relativ breit gefächert hinsichtlich ihrer Funktion. Auffällig ist auch, dass mit 25 Medikamenten fast die Hälfte der Suppressoren aus der FDA Bibliothek stammt.

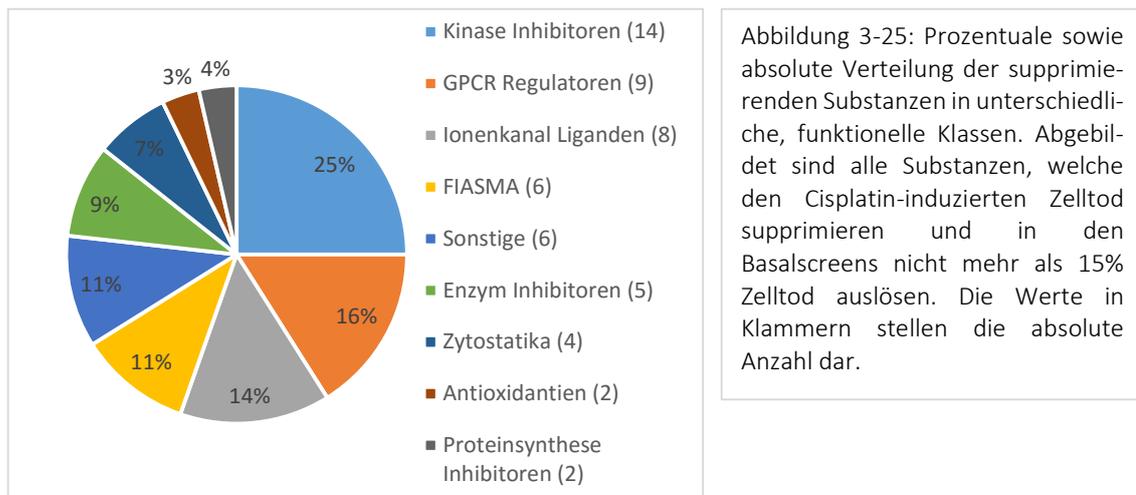


Abbildung 3-25: Prozentuale sowie absolute Verteilung der supprimierenden Substanzen in unterschiedliche, funktionelle Klassen. Abgebildet sind alle Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod supprimieren und in den Basalscreens nicht mehr als 15% Zelltod auslösen. Die Werte in Klammern stellen die absolute Anzahl dar.

Der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) Inhibitor SB-415286 stellte durch seinen sehr starken inhibierenden Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod einen interessanten Treffer für nähere Charakterisierung dar. Gründe für diese Wahl waren mitunter eine Untersuchung, welche die Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalweges an der DNA Schadensregulierung in embryonalen Stammzellen hervorhebt (Carreras Puigvert et al. 2013a) sowie die hemmende Wirkung weiterer Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin Signalweges (GSK-3 β und Casein Kinase (CK) Inhibitoren) (Abbildung 6-3). Allein weist der Inhibitor SB-415286 keinen Effekt auf den Zelltod der A549 Zellen auf, führt jedoch in Kombination mit Cisplatin zur deutlichen Reduktion des induzierten Zelltodes (Abbildung 3-26).

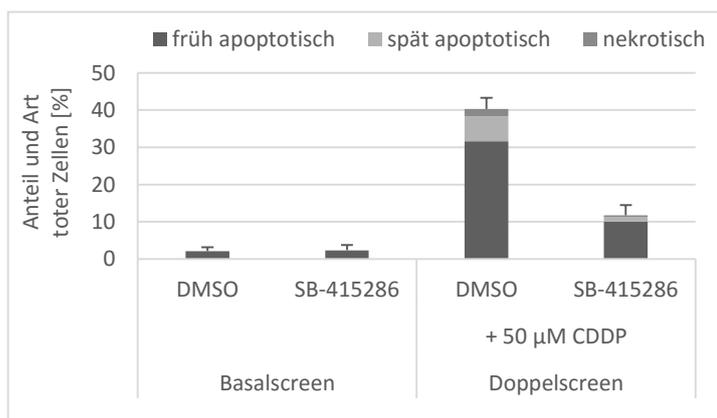


Abbildung 3-26: Der GSK-3 β -Inhibitor SB-415286 setzt den CDDP-induzierten Zelltod deutlich herab. A549 Zellen wurden mit 26,5 μ M SB-415286 30 Minuten lang inkubiert bevor sie für 24h mit 50 μ M CDDP versetzt wurden. Nach der Färbung erfolgten die Aufnahme der Bilder sowie deren Analyse mittels der ScanR Software. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Anteile an toten Zellen (im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle) und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod + MITTEL-ABW der zwei Basalscreens bzw der zwei Doppelscreens mit jeweils 2 Replikaten (n=2).

3.5 Weiterverfolgung des GSK-3 β - Inhibitors SB-415286, eines der stärksten Treffer innerhalb der Suppressoren

Die GSK-3 β ist an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt, welche eine wichtige Rolle in Bereichen wie Proliferation, Erneuerung von Stammzellen, Apoptose und auch Entwicklung spielen. Die wichtigsten Signalwege sind dabei der Insulin Signalweg, der Wnt/ β -Catenin Signalweg sowie der Hedgehog Signalweg (Takahashi-Yanaga 2013). Es gab einige Untersuchungen, die belegten, dass der Wnt-Signalweg in der Apoptose involviert ist (Carreras Puigvert et al. 2013a; Gao et al. 2013). Daher war die Vermutung naheliegend, dass die Hemmung der GSK-3 β über den Wnt-Signalweg Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Zelltod nimmt.

Zur Validierung des Suppressors SB-415286 wurden die A549 Zellen mit einem anderen GSK-3 β -Inhibitor, namens 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO), vorinkubiert und dann mit Cisplatin behandelt. Die Analyse der Daten zeigt, dass der im Doppelscreen aufgetretene, supprimierende Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod mit BIO reproduziert werden konnte (Abbildung 3-27B, Abbildung 3-26). Weiterhin gibt es auch einen positiven Effekt auf die relative Lebendzellzahl nach der Cisplatin-Behandlung (Abbildung 3-27A).

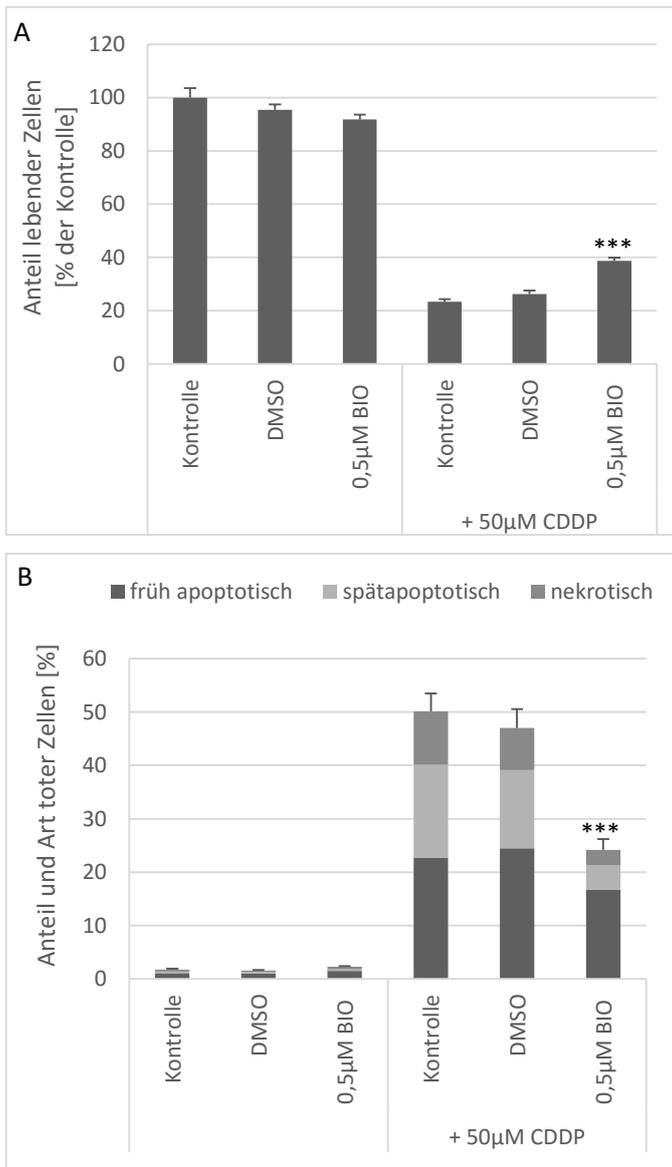


Abbildung 3-27: Der GSK-3 β Inhibitor BIO reduziert CDDP-induzierten Zelltod in den A549 Zellen und reproduziert damit den Effekt von SB-415286. A549 Zellen wurden mit 0,5µM BIO 30 Minuten lang inkubiert bevor sie für 24h mit 50 µM CDDP versetzt wurden. Nach der Färbung erfolgten die Aufnahme der Bilder sowie deren Analyse mittels der ScanR Software. (A) zeigt die Mittelwerte der Lebendzellzahl (relativ zur Lebendzellzahl der Kontrolle), während in (B) die prozentualen Anteile der toten Zellen (im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle) und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod darstellt. Die Mittelwerte wurden aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten berechnet (n=8) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen. 0,05% DMSO dient als Lösungsmittelkontrolle für BIO. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. - CDDP).

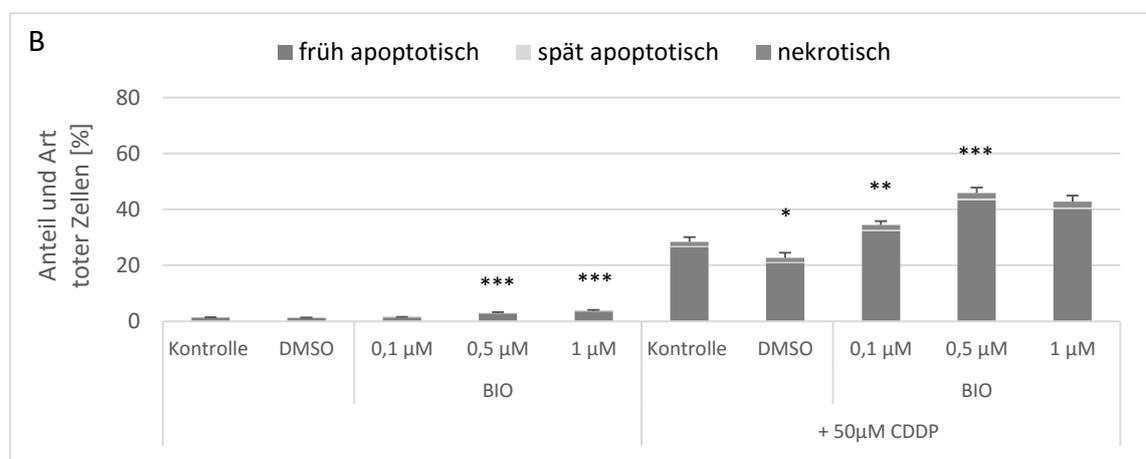
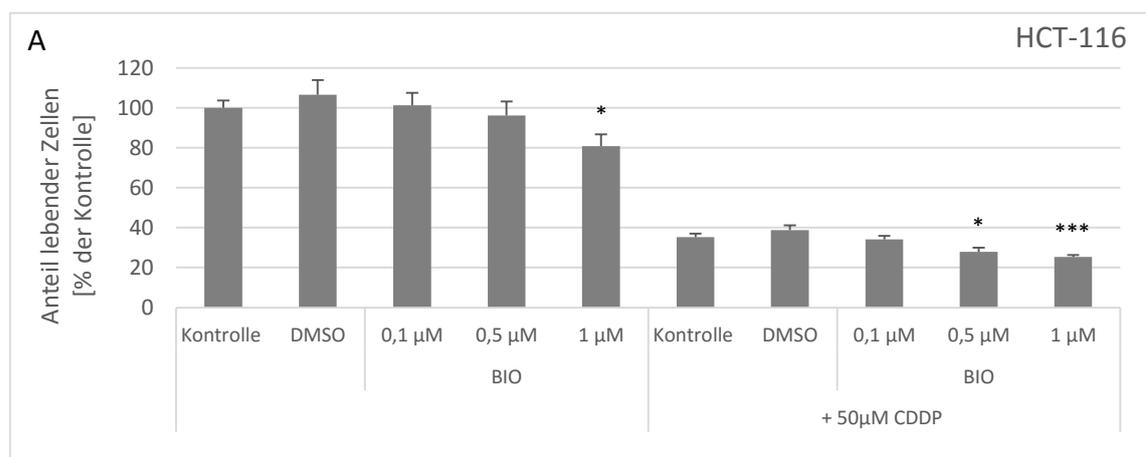
3.5.1 Ist der Effekt des Inhibitors BIO zelltypabhängig?

Als nächstes wurde überprüft, ob die supprimierende Wirkung von BIO auch in Krebszellen aus anderen Organen besteht, welche mit Cisplatin behandelt werden. Hierfür wurden die Zelllinien Hct-116 (Kolonkarzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) mit verschiedenen Konzentrationen von BIO vorinkubiert und anschließend für 24h mit Cisplatin behandelt. Die HCT-116 weisen eine Mutation im β -Catenin-Gen (CTNNB1) auf, wodurch der Abbau des Proteins nicht stattfinden kann, oder nur vermindert, was folglich einen erhöhten β -Catenin Level in den Zellen bewirkt (Ilyas et al. 1997). BIO sollte daher eher keinen Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod ausüben, da β -Catenin schon akkumuliert vorliegt. Auch in HeLa Zellen ist der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert, allerdings aufgrund einer Überexpression des LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) (Chen et al. 2014). Bei einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges wird die GSK-3 β durch die Rekrutierung des β -Catenin-Abbauflexes, bestehend aus GSK-3 β , CK1 α , AXIN und APC, an den Wnt-Rezeptorkomplex (LRP (lipoprotein receptor-related protein)5/LRP6 und Frizzled) und durch die Bindung von Dishevelled inhibiert (Stewart 2014). Somit wäre in den HeLa Zellen auch kein Effekt von BIO zu erwarten, da GSK-3 β schon inaktiv ist. Die beiden Zelllinien boten damit eine gute Möglichkeit zur Überprüfung, ob der Apoptose-hemmende Einfluss von BIO über β -Catenin vermittelt ist. Würde der in den A549 Zellen beobachtete Effekt also auch in diesen zwei Zelllinien auftreten, würde das auf die Involvierung anderer Signalwege als den Wnt/ β -Catenin Signalweg hindeuten.

In Abbildung 3-28A ist zu erkennen, dass die Cisplatin Behandlung auch bei HCT-116 Zellen einen deutlichen Rückgang des relativen Anteils an lebenden Zellen bewirkt. Durch die Doppelbehandlung mit 1 μ M BIO und Cisplatin wird in den höheren Konzentrationen eine leichte Erniedrigung der Lebendzellzahl hervorgerufen, wobei die Präinkubation mit BIO allein keinen Einfluss auf die Lebendzellzahl hat. Betrachtet man hingegen den prozentualen Anteil an toten Zellen, so ist dieser durch die Inkubation mit 0,5 und 1 μ M BIO allein bereits leicht erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Beide BIO Konzentrationen erhöhen den Cisplatin-induzierten Zelltod etwas, welcher bei etwa 30% liegt

bei 50 μM CDDP (Abbildung 3-28B). Unabhängig von der Behandlung ist der Zelltod hauptsächlich frühapoptotischer Natur und auch allgemein niedriger als bei den A549 Zellen bei gleicher Konzentration an Cisplatin.

Bei den HeLa-Zellen führt die Behandlung mit BIO zu keinen großen Unterschieden in der relativen Lebendzellzahl, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen. Cisplatin verursacht eine starke Reduktion der Lebendzellzahl (Abbildung 3-28C). In Bezug auf den Zelltod verstärkt die Inkubation mit 1 μM BIO den basalen Zelltod etwas, in Kombination mit Cisplatin treten jedoch keine Unterschiede zur alleinigen Cisplatin Behandlung auf. Im Vergleich zu den A549 und den HCT-116 scheinen die HeLa Zellen mit etwa 60% Zelltod bei einer Cisplatin-Konzentration von 40 μM , am sensitivsten gegenüber Cisplatin zu sein. Die frühe Apoptose ist hier ebenfalls die häufigste Form des Zelltodes (Abbildung 3-28D).



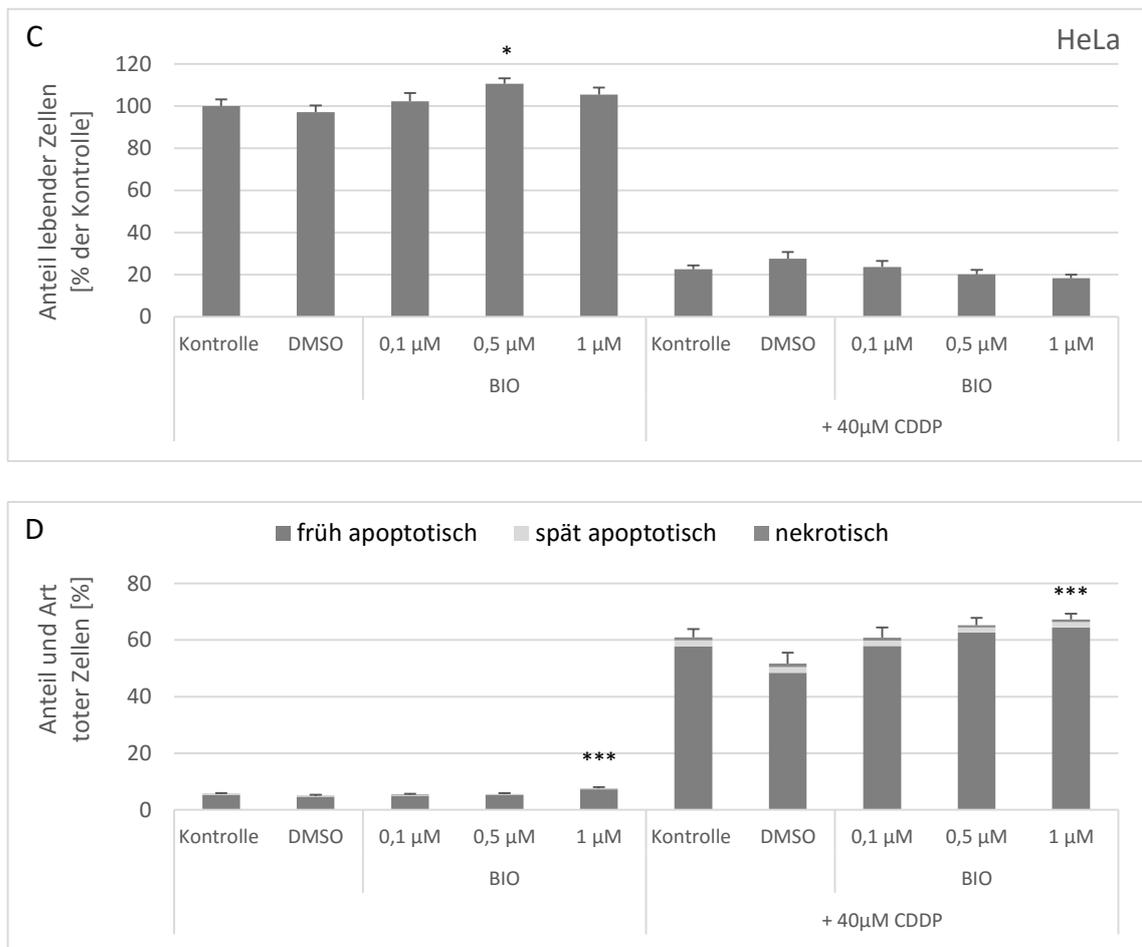


Abbildung 3-28: BIO erhöht den Cisplatin-induzierten Zelltod in HCT-116 leicht, hat jedoch keinen Effekt auf HeLa Zellen. HCT-116 bzw. HeLa Zellen wurden am Tag nach dem Aussäen mit 0,1/0,5/1 µM BIO 30 Min lang inkubiert. Anschließend wurden sie mit jeweils 50 bzw. 40 µM CDDP behandelt und nach 24h analysiert. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl der HCT-116, während in (B) der prozentuale Anteil an toten Zellen sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. (C) stellt die relative Lebendzellzahl der HeLa Zellen dar, während in (D) der prozentuale Anteil an toten Zellen sowie deren Einteilung in die verschiedenen Apoptose-Stadien bzw. in Nekrose abgebildet sind. Die Mittelwerte wurden aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten berechnet (n=12) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen (* p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle und hat mit 0,1% dieselbe Konzentration wie in 1 µM BIO.

Abschließend kann festgehalten werden, dass der suppressive Effekt von BIO auf den Cisplatin-induzierten Zelltod von der Zelllinie abhängt: In den HCT-116 sensibilisiert BIO die Zellen etwas für Cisplatin, wohingegen es den Cisplatin-bedingten Zelltod der HeLa Zellen nicht beeinflusst.

3.5.2 Ist der Effekt des Inhibitors BIO Cisplatin-spezifisch?

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der BIO-Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod vom Zelltyp abhängt, kam als nächstes die Frage auf, an welchem Schritt die Induktion der Apoptose durch den Einsatz von BIO gehemmt wird. Dafür wurden weitere Substanzen verwendet, welche sich in der Art der Apoptose-Induktion unterscheiden. Die A549 Zellen wurden hierzu nach der Präinkubation mit BIO mit Etoposid, Staurosporin oder TNF- α / Cycloheximid behandelt.

Bei Etoposid handelt es sich um ein Derivat des Podophyllotoxins. Es inhibiert das Enzym Topoisomerase II, welches durch einen temporären Doppelstrangbruch die DNA entwindet. Die Hemmung dieses Enzyms erfolgt durch die Bindung von Etoposid an den DNA-Topoisomerase II-Komplex, wodurch die normalerweise folgende Ligation der DNA verhindert wird. Aufgrund der so eintretenden Akkumulation von Doppelstrangbrüchen arretiert der Zellzyklus und Apoptose wird eingeleitet (Montecucco & Biamonti 2007).

Die Behandlung mit Etoposid führt in der eingesetzten Konzentration, welche durch Vorversuche festgelegt wurde (Daten nicht gezeigt), zu einer deutlichen Reduktion der relativen Lebendzellzahl, doch die gleichzeitige Inkubation mit BIO hat keinen Einfluss darauf (Abbildung 3-29A). Der Zelltod, welcher durch Etoposid ausgelöst wird, wurde größtenteils als frühe Apoptosen identifiziert (Abbildung 3-29B). Die geringste Konzentration von BIO erniedrigt den durch Etoposid induzierten Zelltod etwas im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Zudem fällt ein leichter, konzentrationsabhängiger Anstieg des basalen Zelltodes durch BIO allein auf.

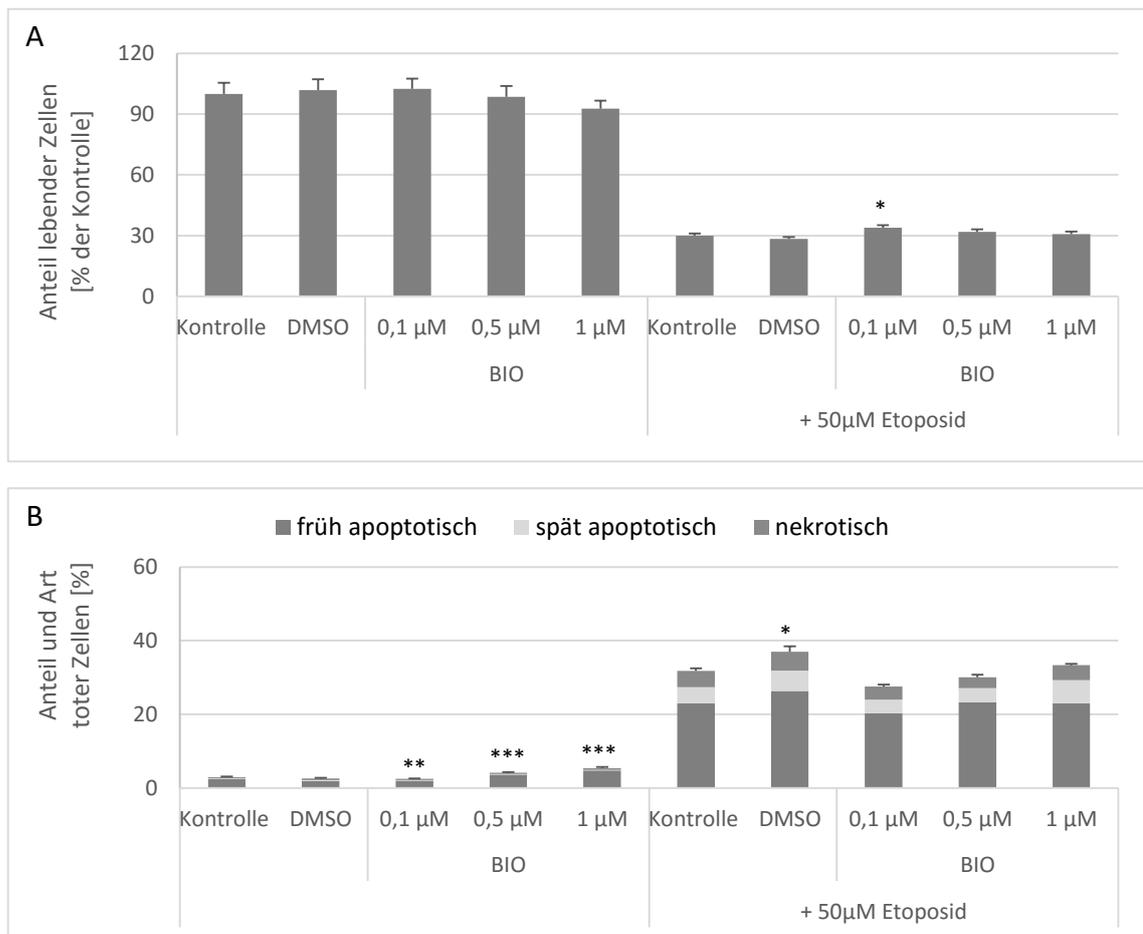


Abbildung 3-29: BIO hat einen leicht hemmenden Einfluss auf den Etoposid-induzierten Zelltod, welcher mit steigender Konzentration verloren geht. A549 Zellen wurden für 30 Minuten mit 0,1/0,5/1 µM BIO inkubiert. Anschließend wurden sie mit 50 µM Etoposid versetzt und nach 24h analysiert. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl, während in (B) der prozentuale Zelltod sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten berechnet (n=12) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle und hat mit 0,1% dieselbe Konzentration wie in 1µM BIO.

Staurosporin ist ein Alkaloid, welches aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde. Es ist zwar ein Breitband Kinase Inhibitor, jedoch scheint es besonders die Proteinkinase C zu hemmen (Tamaoki 1986). Es wird gewöhnlich eingesetzt zur Induktion von Apoptose, meist basierend auf der Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges (Wu et al. 2014; Smaili et al. 2001).

Staurosporin führt in der eingesetzten Konzentration, welche durch Vorversuche ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt), einen klaren Rückgang in der relativen Lebendzellzahl herbei, während die gleichzeitige Inkubation mit BIO keinerlei Einfluss darauf hat (Abbildung 3-30A). Die frühe Apoptose ist die häufigste Art, durch welche Staurosporin-behandelte Zellen sterben. Auch ist ein leichter, konzentrationsabhängiger Anstieg des basalen Zelltodes durch die Inkubation mit BIO zu beobachten. Die Doppelbehandlung mit Staurosporin und BIO zeigt auch auf den Zelltod keinen Einfluss (Abbildung 3-30B).

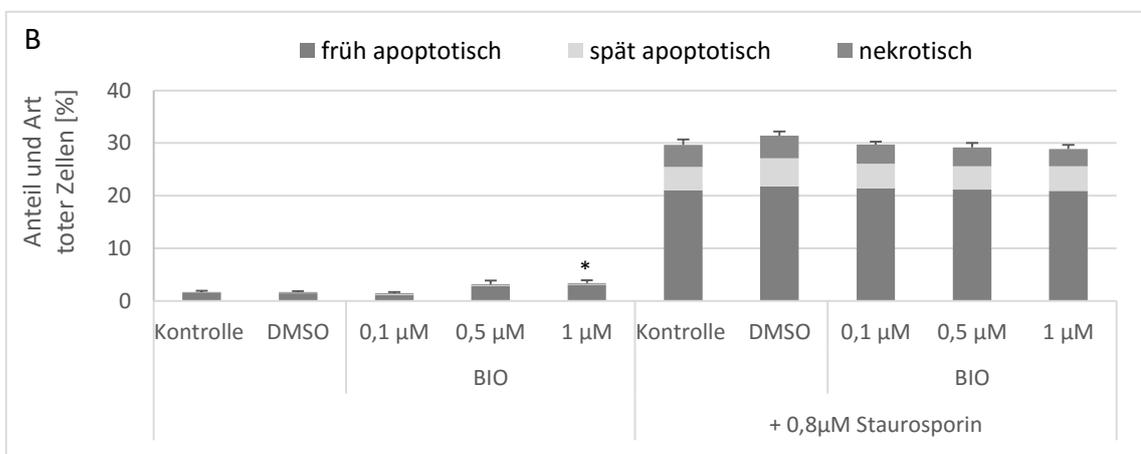
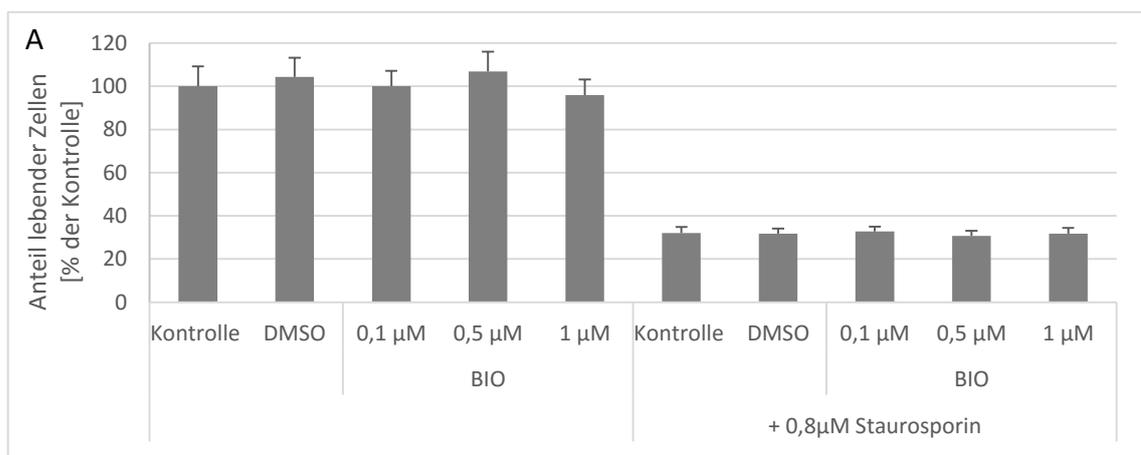


Abbildung 3-30: BIO hat keinen Effekt auf den Staurosporin-induzierten Zelltod. A549 Zellen wurden am Tag nach dem Aussäen mit 0,1/0,5/1 μ M BIO für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie mit 0,8 μ M Staurosporin versetzt und nach 24h erfolgte die Analyse. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl, während in (B) der prozentuale Anteil an toten Zellen sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. Die Mittelwerte wurden aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten berechnet (n=8) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle und hat mit 0,1% dieselbe Konzentration wie in 1 μ M BIO.

TNF- α ist der Ligand des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 1 (TNFR1), welcher die Aktivierung des extrinsischen Apoptose Signalweges einleiten kann. Neben der Caspase 8 stellt der Transkriptionsfaktor Nf κ B ein weiteres Zielprotein des TNFR1 dar. Aktivierung von Nf κ B kann u.a. mehrere anti-apoptotische Gene induzieren. Um diese Signalkaskade zu vermeiden wurde gleichzeitig der Translationsinhibitor Cycloheximid mit inkubiert, so dass die Zielgene von Nf κ B nicht induziert werden können (Wang et al. 1996) und so primär die extrinsische Apoptose ausgelöst wird. Bei der Betrachtung der analysierten Daten fällt auf, dass 20 μ M Cycloheximid alleine die relative Lebendzellzahl schon auf etwa die Hälfte herabsetzt (Abbildung 3-31A). Durch die Behandlung mit TNF- α / Cycloheximid wird dieser Effekt noch weiter verstärkt. Bei der zusätzlichen Inkubation mit 1 μ M BIO ist die Lebendzellzahl dann nochmals niedriger als bei der Positiv-Kontrolle. Der Zelltod, welcher durch TNF- α / Cycloheximid hervorgerufen wird, zeichnet sich vorwiegend durch frühe Apoptosen aus (Abbildung 3-31B). BIO erhöht den basalen Zelltod konzentrationsabhängig und auch durch den Einsatz von Cycloheximid steigt der Zelltod leicht an. Die Präinkubation mit 1 μ M BIO sensibilisiert die Zellen etwas gegenüber der Behandlung mit TNF- α / Cycloheximid.

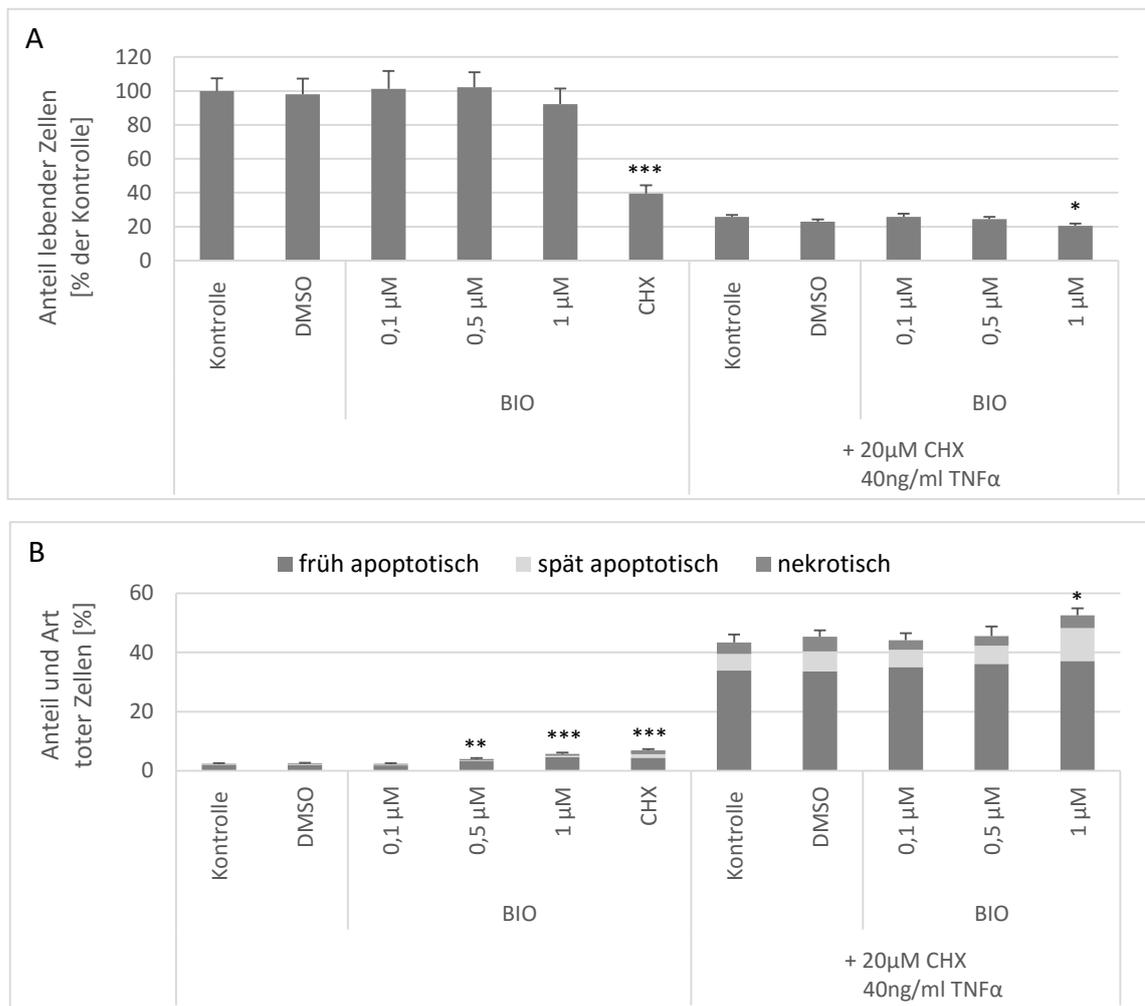


Abbildung 3-31: 1 µM BIO erhöht den durch TNF- α /CHX induzierten Zelltod leicht. A549 Zellen wurden am Tag nach dem Aussäen mit 0,1/0,5/1 µM BIO 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden sie für 1h mit 20 µM CHX behandelt und dann mit 40 ng/ml humanem TNF- α versetzt. Nach 24h erfolgte die Analyse. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl, während in (B) der prozentuale Zelltod sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. Die Mittelwerte wurden aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten berechnet (n=8) und sind mit dem jeweiligen Standardfehler aufgetragen (* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (+ bzw. – CDDP). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle und hat mit 0,1% dieselbe Konzentration wie in 1 µM BIO.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der suppressive Effekt von BIO auf den induzierten Zelltod in dem Maße nur bei Cisplatin auftritt. Bei Etoposid ist eine Tendenz in diese Richtung erkennbar, diese lässt jedoch mit steigender Konzentration nach, im Gegensatz zur Doppelbehandlung mit Cisplatin und BIO, bei welcher der hemmende Effekt mit steigender Konzentration an BIO stabil blieb (Daten nicht gezeigt).

3.5.3 Ist β -Catenin involviert in den Zelltod-inhibierenden Effekt von BIO?

Wie unter 3.5 schon erwähnt, spielt die GSK-3 β u.a. eine bedeutende Rolle im Wnt/ β -Catenin Signalweg. Dabei ist GSK-3 β eine der Hauptkomponenten des β -Catenin-Abbaukomplexes. Ob β -Catenin auch unter den hier vorliegenden Bedingungen reguliert wird, wurde mithilfe des Topflash Reportergen-Tests überprüft. Bei diesem Test wird das Reportergen Luziferase exprimiert, sofern der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiv ist und β -Catenin somit zusammen mit TCF/LEF an die Promotoren der Zielgene bindet. Diese Luziferaseaktivität kann dann nach Zugabe des Substrates am Luminometer gemessen werden, wodurch es durch die im Abschnitt „Topflash-Reportergen Test“ (im Material und Methoden Teil) beschriebenen Reaktion zur Bildung von Lichtquanten kommt.

In Abbildung 3-32 ist die auf die Negativkontrolle (Topflash und Renilla Transfektion) normierte Luziferase Aktivität zu sehen, welche mit der β -Catenin Aktivität korreliert. Diese wird durch den Einsatz von BIO allein eindeutig erhöht, sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit der Cisplatin-Behandlung. Auf diese Weise kann auf der Ebene der Transkription bestätigt werden, dass es durch die Behandlung mit dem GSK-3 β Inhibitor wahrscheinlich zur Akkumulation von β -Catenin kommt und der Wnt/ β -Catenin Signalweg damit in der BIO-vermittelten Hemmung der Cisplatin-induzierten Apoptose eine Rolle spielen könnte. Allerdings fällt auch auf, dass die β -Catenin-Aktivität nach der Cisplatin-Behandlung allgemein etwas abgeschwächt ist und die Zunahme der Aktivität durch BIO nicht mehr mehr so ausgeprägt ist.

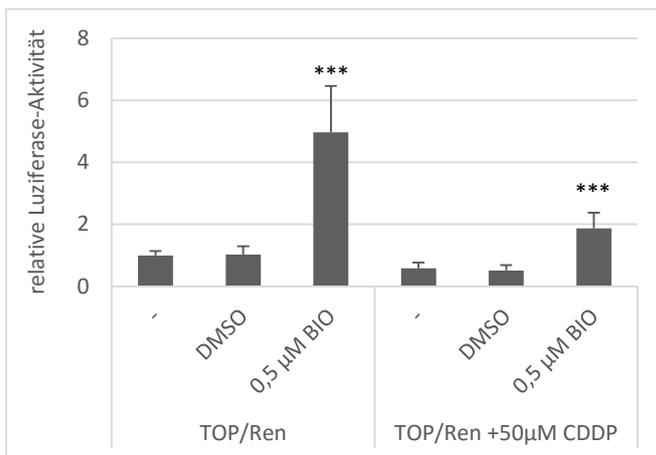


Abbildung 3-32: β -Catenin Aktivierung nach Präinkubation mit BIO und nach Doppelbehandlung mit CDDP. Die A549 Zellen wurden ausgesät und am folgenden Tag mit dem Topflash-, Renilla- sowie dem LacZ-Plasmid über Nacht transfiziert. Dann wurden die Zellen mit 0,5 μ M BIO für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 10h weiterinkubiert (-) oder mit DMSO bzw. 50 μ M Cisplatin behandelt, bevor die Luciferase Aktivität bestimmt wurde. Dargestellt sind die auf die Negativkontrolle (unbehandelte Topflash/ Renilla (Top/ Ren)-Kontrolle) normalisierten Mittelwerte der Luciferaseaktivität sowie die STABW. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (- bzw. + CDDP). DMSO dient als Lösungsmittelkontrolle und besitzt mit 0,05% dieselbe Konzentration wie in den mit BIO behandelten Ansätzen.

3.5.4 Die Depletion von β -Catenin hat keinen Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Zelltod

Der Hypothese zufolge führt die GSK 3- β Inhibition zur Akkumulation und Aktivierung von β -Catenin, welches antiapoptotisch wirkt. Um dies nachfolgend zu validieren, wurde als weitere Methode die RNA Interferenz verwendet. Dabei wird die β -Catenin RNA abgebaut und damit das Protein herunterreguliert (Depletion). In Abwesenheit von β -Catenin sollte der antiapoptotische Effekt des Inhibitors demnach auch nicht mehr zu sehen sein. Hierfür wurden die A549 Zellen einer reversen Transfektion mit zwei β -Catenin siRNA Sequenzen (β -Catenin 1 und 2) unterzogen. Zunächst wurden die siRNAs in die Wells vorgelegt und anschließend die Zellen darauf ausgesät. Nach der Vorinkubation mit BIO fand die Cisplatin-Applikation statt. Die Effizienz der Depletion wurde im Anschluss an die Mikroskopie noch mittels Western Blot Analyse überprüft.

Abbildung 3-33A zeigt, dass durch die Herunterregulation von β -Catenin die relative Lebendzellzahl herabgesetzt wird. Hierbei muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die siRNA gegen dsR, welche als Kontroll-siRNA eingesetzt wurde, um Effekte der Transfektion selbst auszuschließen, bereits einen reduzierenden Effekt aufweist, wenn auch in geringerem Ausmaß. Eine weitere Reduktion ist auch durch die zusätzliche Inkubation der β -Catenin siRNA-behandelten Zellen mit BIO sichtbar. Betrachtet man die mit Cisplatin behandelten Zellen, so hat die Depletion von β -Catenin kaum einen Einfluss auf die Lebendzellzahl, wohingegen BIO zu einem leichten Anstieg der Vitalität führt im Vergleich zur Positivkontrolle (DMSO+Cisplatin). Aus Abbildung 3-33B geht hervor, dass der basale Zelltod sowohl durch dsR und den beiden β -Catenin siRNA-Sequenzen erhöht wird, als auch durch BIO allein sowie in Kombination mit beiden β -Catenin siRNA-Sequenzen. Der Cisplatin-induzierte Zelltod wird durch die β -Catenin Depletion leicht herabgesetzt, doch auch hier hat dsR einen vergleichbaren Effekt. BIO führt, wie schon erwartet (vgl. Abbildung 3-27B), zum Rückgang des Zelltodes, welcher durch die Depletion von β -Catenin allerdings nicht sonderlich beeinflusst wird.

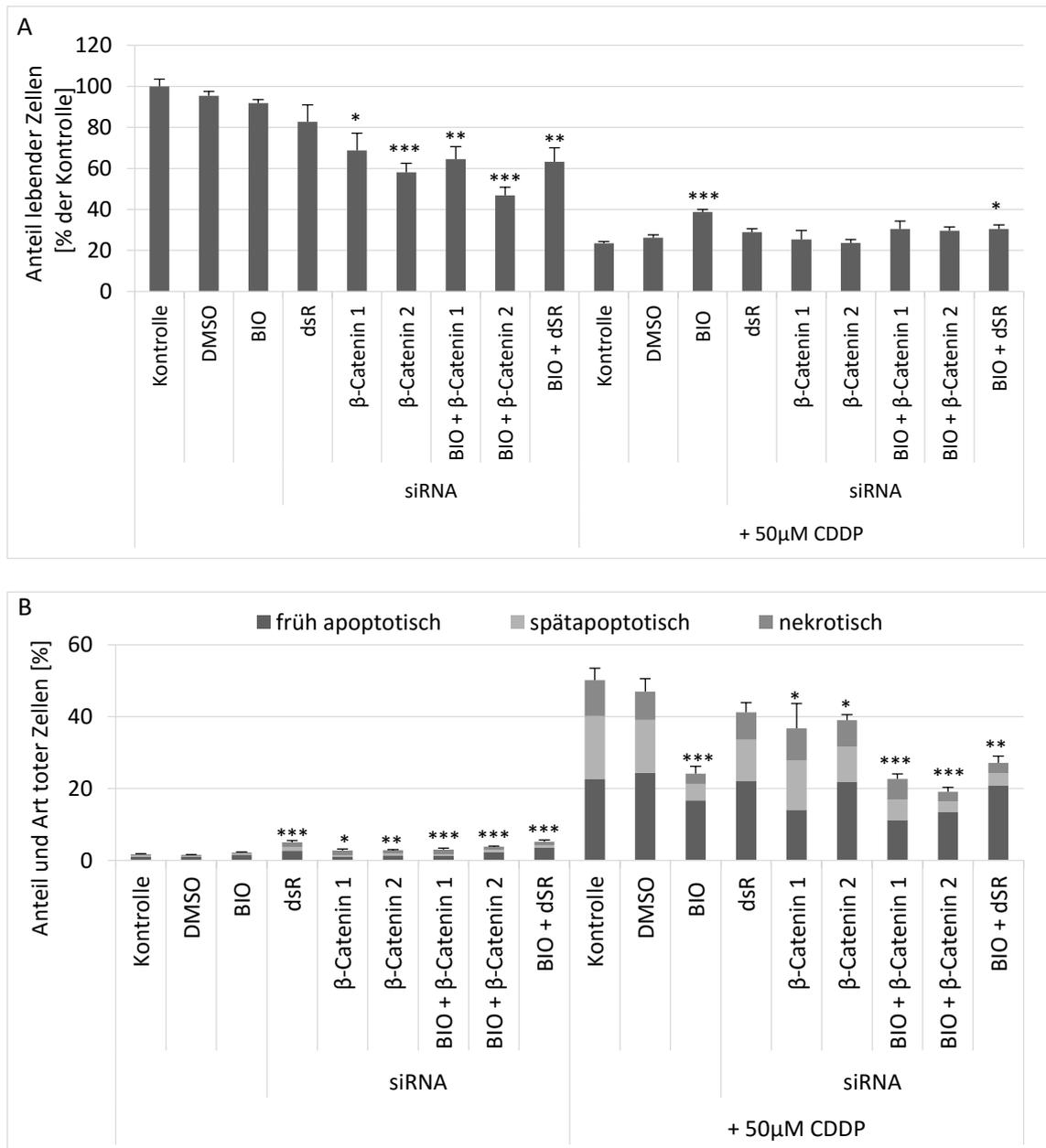


Abbildung 3-33: Die durch BIO verursachte Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes wird durch die β -Catenin Depletion nicht beeinflusst. Die A549 Zellen wurden einer reversen Transfektion mit den siRNA Sequenzen β -Catenin 1 und 2 bzw. der Kontroll-siRNA dsR unterzogen (jeweils 20 nM). Nach 48h wurden die A549 Zellen mit 0,5 μ M BIO inkubiert, bevor Cisplatin (50 μ M) hinzugefügt wurde. 24h später wurden die Zellen analysiert. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl, während in (B) der prozentuale Zelltod sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. Die Resultate stellen die Mittelwerte + Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten dar ($n=8$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (- bzw. + CDDP). DMSO dient als Lösungsmittelkontrolle und hat mit 0,05% dieselbe Konzentration wie BIO.

In Abbildung 3-34 ist die erfolgreiche Herabregulierung des β -Catenin Proteins in unbehandelten Zellen (links) visualisiert. Durch Cisplatin wird β -Catenin reduziert, die siRNA bewirkt keine drastische weitere Verringerung des Proteins.

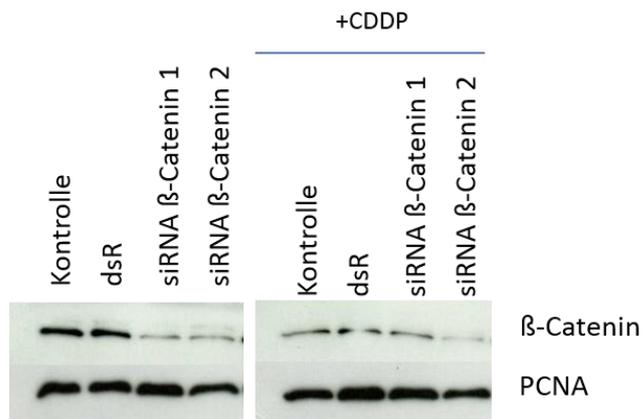


Abbildung 3-34: Die Herunterregulation des β -Catenin-Proteins durch beide siRNA Sequenzen kann mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. A549 Zellen wurden, wie in Abbildung 3-33 beschrieben, behandelt. Nach der Mikroskopie wurden die Zellen lysiert und die Lysate einer SDS-PAGE unterzogen, gefolgt von einer Western Blot Analyse. β -Catenin wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Für die Ladekontrolle wurden Antikörper gegen PCNA eingesetzt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Depletion von β -Catenin weder den Cisplatininduzierten Zelltod noch die Wirkung von BIO beeinflusst. Demnach ist die Hypothese, dass BIO über die Aktivierung von β -Catenin anti-apoptotisch wirkt, eher falsch. Zudem scheint das β -Catenin eine Rolle für das Überleben der Zellen zu spielen.

3.5.5 Die durch BIO ausgelöste Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes ist abhängig von GSK-3 β

Aus den bisherigen Experimenten geht hervor, dass β -Catenin eher nicht der Vermittler der durch BIO hervorgerufenen Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes ist. Daher wurde als nächstes das Verhalten der Zellen auf die Depletion von GSK-3 β hin untersucht, um auszuschließen, dass die GSK 3- β -Inhibitoren einen unspezifischen Effekt zeigen. Im Fall eines spezifischen Effektes sollte die Depletion von GSK 3- β denselben Effekt aufweisen, nämlich die Verminderung des Cisplatin-induzierten Zelltodes. Außerdem sollte der Inhibitor BIO in Abwesenheit von GSK 3- β keine Wirkung mehr zeigen, weshalb die Auswirkung der gleichzeitigen Applikation von BIO und GSK-3 β Depletion getestet wurde. Die Effizienz der Depletion wurde im Anschluss durch eine Western Blot Analyse überprüft.

Wie aus Abbildung 3-35A deutlich wird, bewirkt die Herunterregulation von GSK-3 β eine deutliche Abnahme der relativen Lebendzellzahl, was auch durch die zusätzliche Inkubation von BIO unbeeinflusst bleibt. Die Kontroll-siRNA dsR besitzt ebenfalls einen leichten Einfluss auf die Lebendzellzahl. Im Vergleich zur Positivkontrolle Cisplatin führt die Vorinkubation mit BIO, wie bereits in den vorhergehenden Versuchen (Abbildung 3-27, Abbildung 3-33), zu einem Anstieg der relativen Lebendzellzahl bei gleichzeitiger Behandlung mit Cisplatin. Im Gegensatz dazu führt die Depletion von GSK-3 β zu einer weiteren Erniedrigung der Lebendzellzahl nach Cisplatin-Behandlung und hebt zudem den BIO-vermittelten Anstieg der Lebendzellzahl auf, was allerdings bereits durch dsR auch schon bewirkt wird.

Die GSK-3 β siRNA führt zudem eine Erhöhung des Zelltodes herbei, welche durch die gleichzeitige Anwesenheit von BIO noch verstärkt wird (Abbildung 3-35B). Die von BIO vermittelte Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes wird in den Zellen mit der GSK-3 β siRNA aufgehoben, während die Depletion von GSK-3 β allein sich nicht auf den Cisplatin-induzierten Zelltod auswirkt.

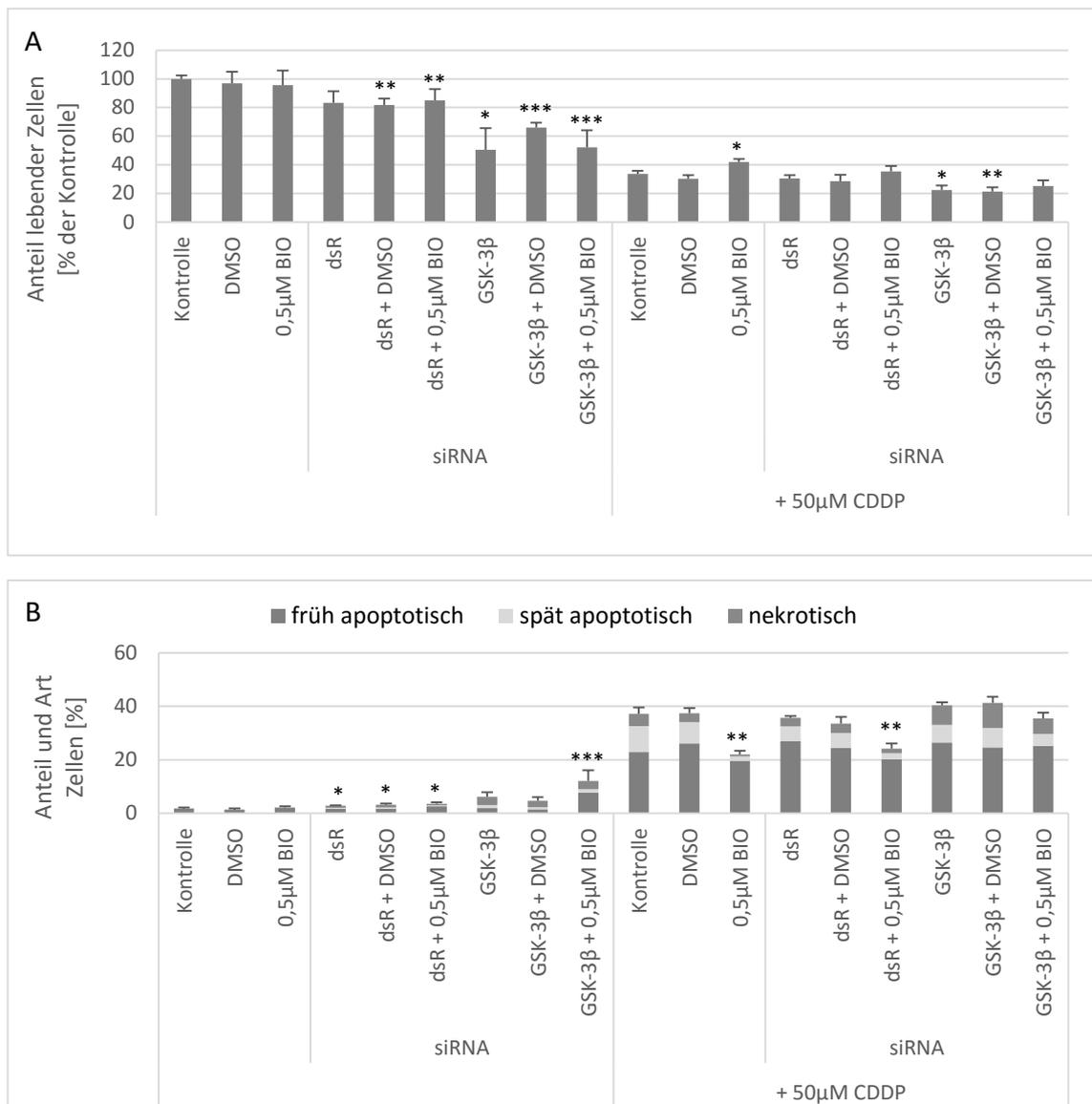
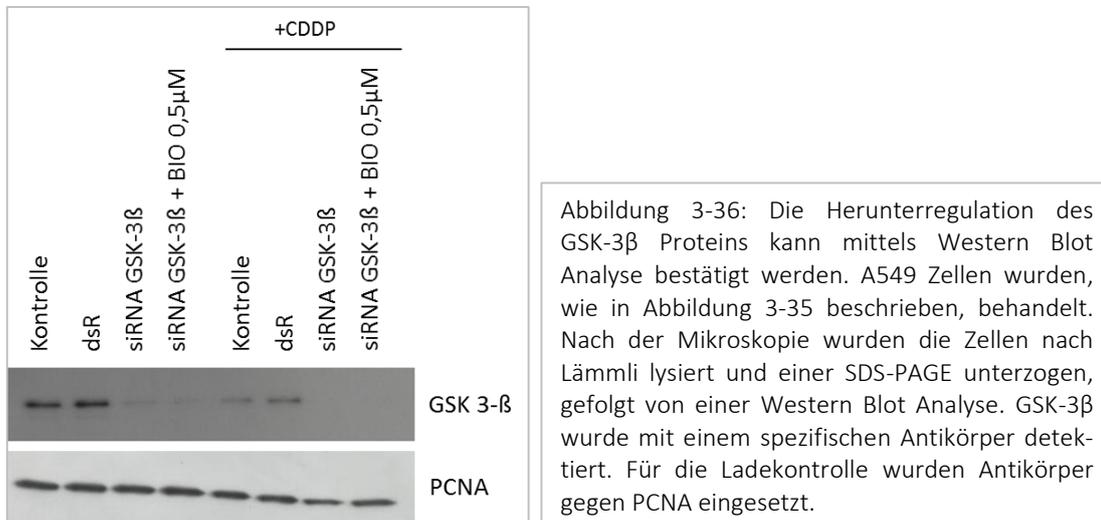


Abbildung 3-35: Die Herunterregulation von GSK-3 β hat keinen Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod, verhindert aber die protektive Wirkung von BIO. Die A549 Zellen wurden einer reversen Transfektion mit der siRNA gegen GSK-3 β bzw. dsR unterzogen (jeweils 20 nM). Nach 48h wurden die A549 Zellen mit 0,5 μ M BIO inkubiert, bevor sie mit Cisplatin (50 μ M) versetzt wurden. 24h später wurden die Zellen gefärbt aufgenommen und analysiert. (A) zeigt die relative Lebendzellzahl, während in (B) der prozentuale Zelltod sowie die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Apoptose bzw. die Nekrose abgebildet sind. Die Resultate stellen die Mittelwerte + Standardfehler aus einem von zwei unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten dar (n=4; * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001). Die Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle (- bzw. + CDDP). DMSO dient als Lösungsmittelkontrolle und besitzt mit 0,05% dieselbe Konzentration wie BIO.

In Abbildung 3-36 ist die erfolgreiche Depletion des GSK-3 β Proteins veranschaulicht, sowohl in der Ab- als auch Anwesenheit von Cisplatin



Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich die Hemmung von GSK-3 β durch die Inhibitoren SB-415286, Indirubin-3'-oxime (Abbildung 3-24B, Abbildung 3-26 und Abbildung 6-3) und BIO (Abbildung 3-27B) in ihrem Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod von demjenigen unterscheidet, welcher durch die Depletion des Proteins erreicht wurde. Während alle erwähnten Inhibitoren einen Rückgang des Cisplatin-induzierten Zelltodes bewirken, bleibt der Zelltod durch die Depletion von GSK-3 β unbeeinflusst. Dennoch konnte auch gezeigt werden, dass sich die durch BIO hervorgerufene Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes sowie die Erhöhung des Anteils an lebenden Zellen nach Cisplatin Behandlung vermutlich trotzdem auf einer Wirkung der GSK-3 β zurückführen lässt.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Wirkungsweise von Cisplatin in A549 Zellen

Der Zelltod gehört zu jedem Lebewesen genauso wie Zellwachstum. Beide müssen im Körper ausgeglichen sein, sonst können Krankheiten, wie zB Krebs, entstehen (Taylor et al. 2008). Die Umgehung der Apoptose stellt das Hauptmerkmal von Krebs dar. Krebs tritt heutzutage immer häufiger auf und Lungenkrebs gehört zu den häufigsten und aggressivsten Formen (publications.cancerresearchuk.org). Das Tumorthapeutikum Cisplatin ist das Mittel der Wahl bei der Bekämpfung von Lungenkrebs. Es löst in den schnell wachsenden Krebszellen durch DNA-Schädigung Apoptose aus, doch die Resistenzbildung der Krebszellen gegenüber Cisplatin oder apoptotischem Zelltod im Allgemeinen schränkt die Heilungschancen stark ein. Daher ist die Unterbindung dieser Resistenzentwicklung von zentraler Bedeutung für die Krebstherapie. Die Apoptose stellt ein stark erforschtes Gebiet dar, dennoch gibt es noch Aufklärungsbedarf. Je detaillierter der Mechanismus der Apoptose aufgeschlüsselt werden kann, in diesem Falle der Cisplatin-induzierten Apoptose, desto eher finden sich Wege, die Effizienz der Tumorthherapie zu steigern.

4.1.1 Cisplatin führt einerseits zum konzentrationsabhängigen Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase, andererseits induziert es konzentrations- und zeitabhängig Apoptose.

Da Lungentumore zu den Hauptanwendungsgebieten von Cisplatin zählen, wurde in dieser Arbeit die humane, aus einem Adenokarzinom stammende Zelllinie A549 eingesetzt (Lieber et al. 1976). Zur Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltodes in A549 Zellen wurden diese mit Cisplatin behandelt und deren Reaktion hinsichtlich Zelltod sowie Zellzyklus unter Einsatz verschiedener Methoden untersucht.

Die in A549 Zellen induzierte Apoptose ist konzentrations- und zeitabhängig, wie anhand der Ergebnisse der Hochdurchsatz Fluoreszenzmikroskopie und auch der Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte. Bei einer Konzentration von 50 μM Cisplatin, welche umgerechnet in etwa der Konzentration während der Therapie entspricht (media.chemotherapyadvisor.com), treten nach etwa 8-10 Stunden die ersten Anzeichen von Apoptose auf: die Abrundung der Zellen sowie Ausstülpungen der Membran, gepaart mit der Kondensation der DNA. Dies ließ sich v.a. durch Zeitverlaufsstudien mit den A549 H2B-GFP Zellen nachweisen. Nach 24 Stunden befinden sich fast die Hälfte aller A549 Zellen in der frühen Apoptose, welche nach weiteren 24 Stunden durch den Verlust der Membranintegrität in die späte Apoptose überging (Abbildung 3-2). Zudem konnte nach einer Inkubation von 24h mit 10 μM Cisplatin die Akkumulation von Zellen in den Zellzyklusphasen G2/M und auch S beobachtet werden, was sich auf den Arrest der Zellen in den jeweiligen Phasen zurückführen lässt. Damit hätten die Zellen die Möglichkeit den Schaden zu beheben (Wang & Lippard 2005). Der Zellzyklusarrest in diesen zwei Phasen stellt eine schon bekannte Auswirkung der Cisplatin-Behandlung dar, welche zudem abhängig von der Konzentration ist: Bei geringerer Konzentration tritt eigentlich eher ein S Phase Arrest auf (Sancho-Martínez et al. 2011), wohingegen mit steigender Konzentration oder auch Zeit eher ein Arrest in der G2/M Phase verursacht wird. (Siddik 2003; L Galluzzi et al. 2012; Wang & Lippard 2005). Überraschenderweise hat die Behandlung mit 50 μM Cisplatin in den A549 eher keinen Effekt auf deren Zellzyklusverteilung, obwohl in der Mikroskopie ein deutlicher Rückgang der Gesamtzellzahl nach Cisplatin-Behandlung zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung könnte sein, dass möglicherweise alle Phasen in ihrer Dauer verlängert sein könnten, was sich jedoch nicht durch Durchflusszytometrie nachweisen lassen würde. Bei der höchsten Konzentration gibt es allerdings einen leichten Anstieg (7%) im Anteil an G2/M Phase Anteil. Es fällt zudem auf, dass sich bereits relativ viele Zellen in der unbehandelten Kontrolle in der G1 Phase befinden, was sich möglicherweise durch den Grad der Konfluenz der Zellen erklären lässt, denn Konfluenz bzw. die dadurch resultierende Kontaktinhibition kann ebenfalls einen G1 Phasen Arrest in den Zellen hervorrufen (Novak et al. 2002). Andererseits sind Krebszellen auch nicht so anfällig gegenüber Nährstoff- und Wachstumsfaktorentzug. Die

von Wachstumsfaktoren aktivierten Signalwege sind nämlich oft aufgrund von Mutationen permanent aktiviert, so z.B. der RAS/RAF Signalweg in A549 Zellen (Kurtze et al. 2011).

Interessant war auch die Tatsache, dass die höhere Konzentration (100 μM) nur etwa die Hälfte an Zelltod hervorruft im Vergleich zur geringeren Konzentration (50 μM). Dies spiegelt sich nach 24 Stunden v.a. in dem Anteil der frühapoptotischen Zellen wieder. Dieser Effekt wird durch den LDH Test jedoch nicht bestätigt, da durch diesen Test nur spätapoptotische und nekrotische Zellen detektiert werden können. Erst nach 48 Stunden ist dieses Verhalten auch durch ansteigende LDH Freisetzung zu sehen. Der Effekt könnte damit erklärbar sein, dass es durch die hohe Menge an Cisplatin zur verstärkten Bindung von Cisplatin an die Caspasen kommen kann, da sie durch ihre Cystein-Gruppe auch Nukleophile darstellen. Diese Bindung wirkt sich hemmend auf die Caspasen aus, was zu vermindertem Zelltod führen könnte (Jin et al. 2005). Auch die Inhibition des Natriumeinstroms, welche bei höheren Dosen an Cisplatin beobachtet wurde, könnte eine mögliche Erklärung hierfür liefern (Sancho-Martínez et al. 2011). Der Einstrom von Natrium ist nämlich mitunter für den Apoptose-bedingten Volumenverlust der Zelle verantwortlich (Sancho-Martínez et al. 2011; Bortner & Cidlowski 2003). Möglicherweise kommt es auch zum Erliegen des Zellzyklus, sodass auch keine weitere Ansammlung von Zellen in der G2/M Phase deutlich wird. Ähnliches wurde auch schon für steigende Konzentrationen von BPDE beobachtet (Donauer 2010).

4.1.2 A549 H2B-GFP Zellen eignen sich als Werkzeug für die Untersuchung der Dynamik der Apoptose

Durch Zeitverlaufsstudien sollte es möglich werden die Reihenfolge der verschiedenen Stadien der Cisplatin-induzierten Apoptose aufzudecken. Hierzu wurden A549 Zellen mit dem H2B-GFP Plasmid transfiziert, um stabile Klone zu generieren, welche das Fusionsprotein H2B-GFP im Zellkern exprimieren. Auf diese Weise können die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ohne Zusatz von Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Kernfarbstoffe können durch ihre Bindung an die DNA sowie durch den Laserstrahl im UV

Bereich, der zur Anregung benötigt wird, nach einer Weile Gentoxizität auslösen (Martin et al. 2005).

Untersuchungen in den A549 H2B-GFP Zellen, welche parallel zu den Experimenten in den A549 Wildtypzellen durchgeführt wurden, zeigen, dass es keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich der Cisplatin-induzierten Apoptose gibt.

Die in den A549 H2B-GFP durchgeführten Zeitverlaufsstudien nach Cisplatin Behandlung bestätigen, dass die apoptotischen Vorgänge wie erwartet ablaufen: Die Zellen runden sich ab und die Membran beginnt sich abzuschnüren, gefolgt von der Ausbildung apoptotischer Körperchen. Währenddessen kommt es im Zellkern zur partiellen DNA-Kondensation, welche in eine homogene Kondensation übergeht und schließlich in der Fragmentierung der DNA resultiert (Taylor et al. 2008). Bisher war jedoch noch nicht bekannt, dass die apoptotischen Körperchen manchmal auch vor der DNA-Fragmentierung gebildet werden, sodass sich die kondensierte DNA dann in nur einem der apoptotischen Körperchen befindet. Dies deutet darauf hin, dass es sich dabei um zwei voneinander unabhängige Prozesse handelt. Solche Zeitverlaufsstudien sind von zentraler Bedeutung, da auf diese Weise keine wichtigen Informationen verloren gehen können, wie das bei Aufnahmen zu einem festen Zeitpunkt vorkommen kann. Es wurde beobachtet, dass ab der Abrundung der Zelle bis zur Bildung der apoptotischen Körperchen gerade einmal eine Stunde vergeht (Abbildung 3-11:1-5).

Nach Cisplatin Behandlung des A549 H2B-GFP Klons wurde ein höherer Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen beobachtet, verglichen mit dem A549 Wildtyp. Aufgrund der Zeitverlaufsstudien war bekannt, dass Zellen aus der späten Apoptose in die „Nekrose“ übergehen, zumindest den Phänotyp betreffend: Die anfängliche DNA-Kondensation verschwindet nämlich wieder mit der Zeit, sodass eine mit der ScanR Software als nekrotisch detektierte Zelle auch eine späte spätapoptotische Zelle sein könnte. Man bezeichnet diese Form der Nekrose als sekundäre Nekrose (Fishelson et al. 2001). Sie spiegelt ein Artefakt der Zellkultur wieder, der im Organismus normalerweise nicht eintritt. Dort werden die apoptotischen Körperchen phagozytiert, bevor deren Membran durchlässig werden kann (Taylor et al. 2008).

Das bedeutet, dass die A549 H2B-GFP Zellen möglicherweise einfach nur schneller in Apoptose und anschließend in sekundäre Nekrose geht im Vergleich zum Wildtyp, die Apoptose selbst aber gleich verläuft, wie anhand der morphologischen Veränderungen sowie der biochemischen Nachweise einiger Apoptose-Mediatoren, wie z.B. p53 (Daten nicht gezeigt), erkennbar ist.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen der A549 H2B-GFP Zellen stellte sich heraus, dass bei der geringsten Konzentration (10 μM), wie erwartet (Wang & Lippard 2005), mehr Zellen einen S Phase-Arrest aufzeigen im Vergleich zum G2/M Phase Arrest und dieser zudem etwas ausgeprägter ist als bei den A549 Wildtyp Zellen, bei denen mehr Zellen eher in der G2/M Phase arretiert sind. Doch sind die Unterschiede nicht besonders groß und es ist bekannt, dass Cisplatin die Zellen sowohl in der S als auch in der G2/M Phase anhält (Wang & Lippard 2005; Siddik 2003). Bei 50 und 100 μM Cisplatin gibt es keinen sichtlichen Arrest in einer der Zellzyklusphasen, nur eine Anhäufung von Zellen in der Sub-G1 Phase, also abgestorbene Zellen, welche auch die Mikroskopie und LDH Test Ergebnisse widerspiegeln.

4.1.3 Aktivierung von Kinasen und apoptotischen Proteinen nach Cisplatin Behandlung

Um auch auf molekularer Ebene Einsicht in die Regulation der Cisplatin-induzierten Vorgänge zu erhalten, wurden Apoptose-typische Proteine in Western Blot Analysen nachgewiesen. Die Effekte von spezifischen Inhibitoren auf die Cisplatin-induzierte Apoptose wurden mit der Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die bekannten Signalwege, welche nach Cisplatin-Applikation eingeleitet werden (Siddik 2003), konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13): Die Histon H2Ax Phosphorylierung konnte ebenso gezeigt werden wie die Aktivierung der Checkpoint Kinase 1 (Chk 1). Beide spielen eine wichtige Rolle bei der

DNA-Schadens-Antwort. H2Ax wird nach Doppelstrangbrüchen von ATM (*Ataxia telangiectasia mutated protein*) und ATR rasch phosphoryliert und ist an der Aktivierung der DNA Schaden Kontrollpunkte beteiligt. Die Aktivierung der Chk 1 durch ATR phosphoryliert wiederum den „Wächter des Genoms“, den Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53. p53 leitet dann verschiedene Prozesse ein, wie z.B. Zellzyklusarrest (u.a. über die Aktivierung von p21), DNA-Reparatur, aber auch Apoptose. Wurden ATM/ATR in den A549 Zellen inhibiert, so führte das zu einem Anstieg im Cisplatin-induzierten Zelltod (Abbildung 3-14). Da ATM und ATR in der Einleitung der DNA-Schaden Kontrollpunkte maßgeblich beteiligt sind, können die Zellen in deren Abwesenheit DNA-Schäden akkumulieren, wodurch letztendlich vermehrt Apoptose herbeigeführt wird. Der Rückgang in der relativen Lebendzellzahl nach Zugabe des ATM/ATR Inhibitors lässt sich jedoch auch mit einem Zellzyklusblock erklären. ATR trägt wesentlich zur Erhaltung der genomischen Stabilität bei, indem es z.B. verhindert, dass „stalled“ Replikationen in Doppelstrangbrüchen enden oder aber Replikationsstress in der S Phase unterbindet. Ist ATR jedoch inhibiert, so fragmentiert die Replikationsgabel womöglich und führt so zum Arrest am Kontrollpunkt der G2 Phase (Toledo et al. 2011). Zudem wurden nach der Cisplatin-Behandlung auch die Reduktion der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl detektiert. Diese können durch p53 reguliert werden, auf direktem und indirektem Wege (Hagn et al. 2010). Die Beteiligung der Effektor Caspasen 3/ 7 /9 und der Initiator Caspase 8 und damit beider Apoptose Wege (intrinsisch wie auch extrinsisch) wurde einerseits durch die Westernblot Analyse gezeigt, andererseits konnte durch die Verwendung der Caspase Inhibitoren zVAD und Q-VD-OPH der Zelltod verringert werden. Dennoch gelang es nicht, durch die Verwendung der Caspase-Inhibitoren den Zelltod vollständig zu verhindern, v.a. die Abrundung der Zellen und Kondensation ließ sich nur reduzieren nicht aber vermeiden. Dies weist auf die Beteiligung eines Caspase-unabhängigen Apoptose Weges hin, wie er z.B. über AIF (*Apoptosis inducing factor*) stattfindet, welches Chromatin Kondensation und Chromatin Fragmentierung im großen Maßstab herbeiführen kann (Susin et al. 2000). Das geschnittene Caspase-Substrat PARP-1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1), welches einen typischen Apoptose Marker darstellt, zeigt die Caspaseaktivität. Die Inhibition dieser Inaktivierung von PARP-1 durch die Caspase Inhibitoren kann jedoch

auch die Induktion der Apoptose selbst zur Folge haben (Boulares et al. 1999), was einen weiteren Grund für die nicht vollständige Verhinderung der Apoptose durch die Caspase Inhibitoren darstellt.

Die Aktivierung der Kinase MK-2 (*MAPK-activated Protein Kinase-2*) wurde zudem unter den verwendeten Bedingungen bestätigt. Aus der Literatur ist bekannt, dass MAP Kinasen (MAPK) ebenfalls eine bedeutende Rolle spielen nach der Behandlung mit Cisplatin (Siddik 2003; Germain et al. 2010).

4.2 Chemikalienscreen zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose

Anschließend erfolgte ein Chemikalienscreen zur Bestimmung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen, um Verbindungen zu finden, in deren Anwesenheit die Wirkung von Cisplatin entweder verstärkt oder aber abgeschwächt wird. Beide Kategorien leisten einen Beitrag zum tieferen Verständnis der molekularen Wirkungsweise von Cisplatin.

4.2.1 Substanzen mit basaler Toxizität

Zunächst wurden die Chemikalien und Medikamente jedoch auf ihre basale Toxizität überprüft, damit man später die Daten des Doppelscreens besser interpretieren kann.

Etwa acht Prozent der 1120 überprüften Substanzen hatten eine Erhöhung des basalen Zelltodes zur Folge. Dabei stammten 46 Substanzen aus der ICCB Bibliothek und 16 Medikamente aus der FDA Bibliothek. Weiterhin wurden 24 Krebstherapeutika (aus beiden Bibliotheken) erkannt. Deren zytotoxische Wirkung in der Krebszelllinie bestätigt die Wirksamkeit der verwendeten Methode. Innerhalb dieser Gruppe finden sich auch Zytostatika, welche in der Therapie von Lungenkrebs (insbesondere NSCLC) eingesetzt

werden: Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbin, Gemcitabin, Etoposid und Doxorubizin (nccn.org). Auch Mitomycin C wird oft zusammen mit Cisplatin zur Behandlung von Lungenkrebs eingesetzt (Wang & Lippard 2005). Interessant sind die drei Therapeutika mit dem stärksten Effekt auf den Zelltod, nämlich Daunorubizin, Bortezomib und Idarubizin. Daunorubizin gehört wie Doxorubizin in die Gruppe der Anthrazykline, wird jedoch verstärkt bei der Bekämpfung von akuter Leukämie eingesetzt, doch wurde bereits 1991 auch eine zytotoxische Wirkung auf Kleinzellige Bronchialkarzinomzellen (SCLC) gezeigt (Jensen et al. 1991). Der Proteasom Inhibitor Bortezomib bindet und hemmt dadurch das 26S-Proteasom. Er wird gegen das Multiple Myelom eingesetzt, doch auch hier gab es Studien, welche die Verwendung von Bortezomib bei Lungenkrebs indizieren (Edelman 2005; Chen et al. 2012). Idarubizin ist ein Analogon zu Daunorubizin und findet wie dieses Einsatz bei der Behandlung von Leukämie (Hande 1998). Auch 10-Hydroxycamptothecin (10-HCPT), ein Derivat des Camptothecin und Inhibitor der Topoisomerase I, wird eingesetzt gegen das Ewing-Sarkom (Knochenkrebs) (Han et al. 2014) und ist bekannt für seine Zelltodinduktion (Fei et al. 2013). Es scheint schon in geringer Dosis Apoptose und einen Proliferationsarrest in Kolonkarzinomzellen auszulösen (Ping et al. 2006). Während Camptothecin jedoch eher nicht als Krebsmedikament eingesetzt wird, u.a. aufgrund seiner schwachen Löslichkeit, sind hingegen auch weitere seiner Derivate, Irinotecan und Topotecan, bereits zugelassen gegen Ovarial- und Kolonkarzinome (Oberlies & Kroll 2004), Irinotecan auch gegen NSCLC (Zarogoulidis et al. 2013). Das Chemotherapeutikum β -Lapachon kann, wie auch Mitomycin C, der Gruppe der Chinone zugeordnet werden und weist ebenfalls Antitumoreigenschaften auf (Middleton et al. 2008). Erste Untersuchungen ergaben seine Wirkung als Topoisomerase I Inhibitor. Im Gegensatz zu 10-HCPT erfolgt die Inhibition nicht durch die Stabilisierung des Topoisomerase I Komplexes, sondern durch die Verhinderung des Zustandekommens dieses Komplexes, indem β -Lapachon an die Topoisomerase I selbst bindet (Li et al. 1993). β -Lapachon scheint zudem über die Hyperphosphorylierung von PARP-1 spezifisch NSCLC Zellen (Bey et al. 2007) und andere Tumorzellen abzutöten, welche NQO1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1) überexprimieren (Bey et al. 2007; Park et al. 2014; Chaitanya et al. 2010).

Es war zu erwarten, dass die Mehrheit der Treffer aus der ICCB Bibliothek stammen, da die Medikamente aus der FDA Bibliothek allesamt umfassenden Sicherheits- sowie Bioverfügbarkeitstests unterzogen worden sind. Die dennoch auftretenden Treffer unter den Medikamenten könnten den Zelltod aufgrund einer zu hohen Dosis eingeleitet haben. Im Allgemeinen induzieren sie jedoch immer weniger Zelltod als Cisplatin selbst.

Quinacrin, ein früher eingesetztes Antiprotozoikum, welches u.a. die Phospholipase A2 hemmt (Wallace 1989), besitzt jedoch ein ähnliches Potenzial wie Cisplatin bezüglich der Zelltodinduktion. Man würde aufgrund seiner Wirkungsweisen (antioxidativ) eigentlich auch keine Induktion von Zelltod vermuten. Jedoch besitzt es die Eigenschaft, dass es an die DNA binden und damit eine Hemmung der DNA und RNA Polymerase bewirken kann (Wallace 1989), was letztlich Apoptose einleiten würde. Der Proteinsyntheseinhibitor Puromycin hingegen, welcher hauptsächlich als Selektions-Antibiotikum in der Zellkultur Einsatz findet (Vara et al. 1986; De la Luna et al. 1988), induziert sogar mehr als doppelt soviel Zelltod im Vergleich zu Cisplatin. Es gibt schon Untersuchungen, die gezeigt haben, dass Proteinsyntheseinhibitoren allgemein - auch Puromycin - , v.a. in hohen Dosen, Zelltod herbeiführen (Chang et al. 1997; Davidoff & Mendelow 1992). Anetholtrithion ist ein Sialagogum, d.h. es fördert die Speichelbildung. Es wurde beschrieben, dass es im Hinblick auf Kolon- und Mammakarzinome chemopräventive Wirkung besitzt, indem es u.a. detoxifizierende Enzyme aktiviert und damit in den Metabolismus von Karzinogenen eingreift (Reddy 1996; Lubet et al. 1997). Jedoch ist nichts bekannt über toxische Wirkung in Krebszellen.

Allgemein lassen sich die Substanzen mit basaler Toxizität innerhalb der FDA Bibliothek einteilen in Anthelminthika, also Medikamente gegen Wurmbefall, sowie in Mittel, welche einen Einfluss auf Enzyme ausüben oder sonstige Effekte haben, welche zu unterschiedlich sind um sie zu gruppieren (Abbildung 3-20).

In der ICCB Bibliothek hingegen gibt es deutlich mehr zytotoxische Substanzen. Im Folgenden werden allerdings nur die Substanzen diskutiert, welche den Zelltod in den

A549 Zellen um mehr als die Hälfte des Cisplatin-induzierten Zelltodes erhöhten, da dies im Rahmen dieser Diskussion sonst zu detailliert wäre.

Kinasen und Phosphatasen sind durch ihre Eigenschaft, Proteine phosphorylieren oder dephosphorylieren zu können, für die Regulierung der meisten Signalwege in der Zelle verantwortlich (Bartek & Lukas 2003; Brognard et al. 2001; Janssens & Goris 2001; Hanahan & Weinberg 2000). Ihre Mutation kann in vielen Fällen Krebs hervorrufen bzw. das Überleben der Krebszellen sichern (Brognard et al. 2001; Lapenna & Giordano 2009), sodass es nicht verwunderlich ist, einige Vertreter unter den Treffern wiederzufinden.

Weitere Substanzen ließen sich zusammenfassen als Inhibitoren der Protein Phosphatase 2A (PP2A). PP2A ist als Tumorsuppressor eingestuft und daher würde sich für die Krebsbehandlung eigentlich eher seine Aktivierung eignen (Perotti & Paolo 2014; Meng et al. 2015). Auch wurde gezeigt, dass der PP2A Inhibitor Okadasäure (OA), welcher sich auch in dieser Gruppe wiederfindet, nach Injektion in Mäusen zu Krebsbildung führt (Seshacharyulu et al. 2014). Die IC₅₀ (die 50 prozentige, inhibitorische Konzentration) von OA sowie der anderen zwei PP2A Inhibitoren befindet sich im Nanomolarbereich (Seshacharyulu et al. 2014; Meng et al. 2015; Ishihara et al. 1989). Die Konzentration aller drei in Tabelle 3-2 aufgeführten PP2A Inhibitoren liegt hingegen im Mikromolar-Bereich (0,9 - 48,5 µM), weshalb die hier beobachteten Effekte eventuell auf unspezifische Inhibition anderer Proteine zurückzuführen sind.

Die Inhibition der Proteinkinase C (PKC) durch die drei Chemikalien Chelerythrin, GF-109203X und Staurosporin führte zum Absterben der A549 Zellen. Die Funktionen der Proteinkinase C, eine Serin/Threonin Kinase, sind sehr komplex, u.a. weil sie mit zehn verschiedenen Isoenzymen durchaus unterschiedliche Auswirkung auf Zellen besitzen kann (Basu 2001). Die PKC_δ ist beispielsweise eher bekannt für ihre proapoptotische Wirkung, wohingegen die PKC_ε eher das Überleben der Zelle sicherstellt (Griner & Kazanietz 2007). Der PKC_ε Level scheint zudem in Lungenkrebs und auch in A549 Zellen erhöht zu sein (Ding et al. 2002; Caino et al. 2012). Daher würde eine Apoptose Induktion durch PKC Inhibition auch Sinn ergeben, da dann der antiapoptotische Effekt wegfiel.

Jedoch gibt es auch zahlreiche Untersuchungen, welche die Spezifität dieser drei und noch weiterer PKC Inhibitoren in Frage stellen, wie es in (Clerk 2001; Davies et al. 2000) zusammengefasst wurde.

Das Alkaloid Chelerythrin scheint, wie auch hier beobachtet, Nekrose auszulösen, v.a. in höheren Konzentrationen. Bei geringerer Dosis führt es hingegen ROS-bedingte Apoptose herbei, jedoch unabhängig von der PKC (Yamamoto et al. 2001).

Bei Staurosporin handelt es sich um ein Alkaloid aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus*, welches häufig Einsatz findet in der Induktion der Apoptose (Wang et al. 2009). Es ist jedoch auch bekannt, dass es auch viele andere Kinasen inhibiert (Caponigro et al. 1997). Zudem liegt seine IC_{50} bei 2,7 nM (Tamaoki 1986), in dem vorliegenden Screen wurden 20,4 μ M eingesetzt. Auch bei niedriger Konzentration (0,8 μ M), welche spätergehend verwendet wurde (vgl. Abbildung 3-30), wird Apoptose ausgelöst.

GF 109203X, ein Analogon des Staurosporins, wurde synthetisiert, um die Spezifität von Staurosporin erfolgreich zu erhöhen (Toullec et al. 1991). Dennoch wurde gezeigt, dass es neben der PKC auch die MAPK-aktivierte Proteinkinase- β (MAPKAP- β / Rsk-2) sowie die p70 S6 Kinase inhibiert, welche beide durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden und daher möglicherweise die Proliferation begünstigen. Ihre Hemmung könnte demnach die proapoptotische Wirkung von GF 109203X erklären (Alessi 1997).

NSC-95397 ist ein Inhibitor der Phosphatase Cdc25 (*Cell division cycle 25*), welche eine bedeutende Rolle im Voranschreiten des Zellzyklus besitzt, da es u.a. die CDK1 (Cyclin abhängige Kinase 1) aktiviert und damit die Mitose ermöglicht (Graves et al. 2000). Wenn Cdc25 nun inhibiert ist, kann die Zelle sich nicht teilen, was letztendlich irgendwann auch zum Zelltod führt. In einem RNAi Screen wurde bereits herausgefunden, dass sie für das Überleben der Zelle essentiell ist (MacKeigan et al. 2005). Der IC_{50} von NSC-95397 gegenüber Cdc25 liegt allerdings im Nanomolarbereich, während im vorliegenden Screen eine deutlich höhere Konzentration (30,6 μ M) verwendet wurde. Damit lässt sich nicht ausschließen, dass der beobachtete Effekt auf unspezifische Inhibition anderer Proteine zurückzuführen ist.

Anisomycin, ein Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces griseolus*, ist einerseits ein Aktivator der MAP Kinasen, vor allem der p38 (Tang et al. 2012), andererseits ist es auch ein bekannter Inhibitor der Translation und damit der Proteinbiosynthese (Grollmann & Walsh 1967). Die Aktivierung der MAPK p38 nach Cisplatin-Behandlung wurde in den A549 Zellen schon nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es wird auch häufig eingesetzt zur Induktion der Apoptose. Auch in geringerer Konzentration ($\leq 10 \mu\text{M}$) bewirkt es bereits Apoptose (Hori et al. 2008). Zudem belegen Untersuchungen, dass Proteinsyntheseinhibitoren im Allgemeinen, v.a. in hohen Dosen, Zelltod herbeiführen können (Chang et al. 1997; Davidoff & Mendelow 1992).

Ikarugamycin ist ein Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces phaeochromogenes* (Subspezies: *ikaruganensis*), welches neben einer stark ausgeprägten Toxizität gegenüber Protozoen sich auch auf verschiedene Krebszelllinien toxisch auswirkt (Jomon et al. 1972; Popescu et al. 2011). Die Zytotoxizität in HL-60 Zellen scheint dabei über DNA Schädigung, über eine Erhöhung des Calciumlevels sowie über die MAP Kinase p38 und über Caspasen vermittelt zu sein (Popescu et al. 2011). Zudem wird es in geringerer Dosis ($10 \mu\text{M}$) auch als Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose eingesetzt (Bandmann et al. 2012).

Der Proteasom Inhibitor MG-132 ist schon bekannt für seine apoptotische Wirkung, v.a. auf Krebszellen, und weist eine ähnliche Selektivität und Spezifität wie das oben erwähnte Zytostatikum Bortezomib auf (Crawford et al. 2006). Beim Wirkmechanismus scheint bei Myelom und Melanom Zellen die Aktivierung des proapoptotischen Proteins NOXA beteiligt zu sein (Qin et al. 2005). In Leukämiezellen wurde nach Behandlung mit MG-132 eine Caspase-unabhängige Konformationsänderung des proapoptotischen Proteins BAX nachgewiesen, die dann zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und letztlich zur Apoptose führt (Dewson et al. 2003).

Trichostatin A ist ein Fungizid und Inhibitor der Histon-Deacetylase und es gibt bereits Untersuchungen, welche eine proapoptotische Wirkung in Leukämiezellen suggerieren, die auf der Inhibierung des NF κ B Signalweges beruht (Fabre et al. 2014).

TPEN, ein Schwermetallchelator, welcher zur Herabsetzung intrazellulären Zinks und Kupfers führt (Hyun et al. 2001), löst in verschiedenen Zellen Apoptose aus. Dies erfolgt aufgrund der Zinkdepletion, welche u.a. die Inhibition der Caspase 3 durch Zink aufhebt (Chimienti et al. 2001) oder aber über p53 und Caspase 11 die Caspase 3 aktiviert (Ra et al. 2009; J. M. Lee et al. 2008). Doch auch die Herabsetzung des Gluthathion Levels und damit oxidativer Stress wurde als möglicher Mechanismus der TPEN-induzierten Apoptose vorgeschlagen (Nakatani et al. 2000).

SKF-96365 ist ein Calciumkanalinhibitor („*Transient Receptor Potential*“ Kanal, TRP Kanal) (Singh et al. 2010), welcher dazu führt, dass der Calciumlevel in der Zelle sinkt, da auch kein Calcium mehr aufgenommen werden kann um die Calciumspeicher der Zelle aufzufüllen (Liu et al. 2011). Geringere Konzentrationen an SKF-96365 (10 μM) scheinen in A549 Zellen bereits Apoptose einzuleiten, wenn auch nur in geringem Ausmaß. Zudem bewirkte es eine deutliche Sensibilisierung der Zellen gegenüber Cisplatin (Li et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit hingegen reduziert es den Cisplatin-bedingten Zelltod bei einer Konzentration von 26 μM (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sterben die Zellen bei höherer Konzentration an SKF-96365 zwar stärker ab, was sich durch eine Untersuchung in einer Glioblastomzelllinie bestätigen lässt bei der ähnlich hohe Konzentrationen verwendet wurden (Liu et al. 2011). Allerdings verhält es sich gegenteilig in der Reaktion auf Cisplatin-induzierten Zelltod.

Wiskostatin stellt einen Inhibitor des N-WASP (Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) dar, welches an der Regulation der Aktin Polymerisierung beteiligt ist (Tolliday et al. 2006). Es gibt jedoch auch Studien, welche belegen, dass Wiskostatin unspezifisch wirkt und die beobachteten Effekte, wie z.B. die Inhibition normaler Transportprozesse, auf die Verringerung des ATP-Levels zurückzuführen sind (Guerriero & Weisz 2007). Das würde auch erklären, dass es in den A549 Zellen nekrotischen Zelltod auslöst (Daten nicht gezeigt) und nicht Apoptose, welche ATP benötigen würde (Golstein & Kroemer 2007; Taylor et al. 2008).

Für die Einleitung des Zelltodes in A549 Zellen scheinen demnach neben Krebstherapeutika auch Topoisomerase I Inhibitoren, die Proteinkinase C, ROS, die Proteinbiosynthese der Calciumhaushalt, MAP Kinasen, NFκB und Caspasen eine tragende Rolle zu spielen.

4.2.2 Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod modulieren

Beim Doppelscreen wurden nur Substanzen als Treffer gewertet, welche keine basale Toxizität aufgewiesen haben. Dies erfolgte aus dem Grund, dass speziell Modulatoren des Cisplatin-induzierten Apoptose gefunden werden sollten und nicht der Apoptose im Allgemeinen. Insgesamt gab es 19 Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod noch weiter verstärkten (Sensibilisatoren) und 57 Suppressoren, also Chemikalien, welche nach Cisplatin Behandlung weniger Zelltod auslösten. Die geringere Anzahl an Sensibilisatoren lässt sich durch die Wahl einer Konzentration an Cisplatin (50 µM) erklären, welche mit etwa 40% Zelltod bereits einen relativ hohen Anteil an Zelltod hervorbringt (Abbildung 3-26). Um weitere spezifische Sensibilisatoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes zu identifizieren, wäre es sinnvoller, eine niedrigere Cisplatin Konzentration mit geringerer basaler Zelltodinduktion zu verwenden. Die in dieser Studie verwendete Konzentration wurde jedoch mit dem Hintergrund ausgewählt, um sowohl Sensibilisatoren als auch Suppressoren zu erkennen. Abgesehen davon liegt sie im Rahmen der zur Behandlung von Patienten mit NSCLC eingesetzten Konzentrationen (Movsas et al. 2013) und wurde zudem auch schon in anderen, ähnlichen Screens verwendet (Tajeddine et al. 2008; Lorenzo Galluzzi et al. 2012).

Zunächst einmal fällt auf, dass von den Chemotherapeutika, welche den Patienten in der Kombinationstherapie zusammen mit Cisplatin verabreicht werden, nur Docetaxel, die höhere Konzentration an Doxorubizin und das geringer dosierte Etoposid den von Cisplatin induzierten Zelltod leicht erhöhen (Abbildung 3-22). Doxorubizin liegt mit der verwendeten Konzentration etwa im Rahmen der Konzentration, welche in älteren

Studien eingesetzt wurde. Es wurde jedoch eher nicht alleine mit Cisplatin verabreicht, sondern oft noch in Kombination mit weiteren Zytostatika, wie z.B. Cyclophosphamid, einem Alkylans (Rapp et al. 1988). Heutzutage wird es auch eher bei Kleinzelligem Lungenkarzinom (SLC) verabreicht, jedoch mit Cyclophosphamid und Vincristin (media.chemotherapyadvisor.com). Gemcitabin und Vinorelbin sowie die geringere Konzentration an Doxorubizin und die höhere Konzentration an Etoposid hingegen supprimieren den Cisplatin-induzierten Zelltod sogar. Die beobachteten Abweichungen lassen sich einerseits dadurch erklären, dass die bei der Kombinationstherapie eingesetzten Konzentrationen von 10 μ M (Vinorelbin) bis hin zu 1,2 mM (Gemcitabin) deutlich höher sind als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen (Fossella et al. 2003; Zalberg et al. 1998; Gatzemeier et al. 2000; Crinò et al. 1997). Hinzu kommt, dass bei der Chemotherapie die Zytostatika für gewöhnlich auch nicht gleichzeitig gegeben werden, sondern aufeinanderfolgend mit bis zu einer Woche Pause zwischen den Behandlungen (nccn.org).

Sensibilisatoren

Insgesamt wurden 19 Substanzen als Sensibilisatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose identifiziert, welche sich teilweise ihrer Funktion nach gruppieren lassen. Innerhalb der sechs Gruppen (EGF-Rezeptor Inhibitoren, Ionenkanal Liganden, Inhibitoren Calcium-abhängiger Signalwege, Protease Inhibitoren, Kinase Inhibitoren und Sonstige) stammen folgende drei Medikamente aus der FDA Bibliothek:

Artesunat, welches der Malaria-Prophylaxe dient, scheint sich zudem auch auf verschiedene Tumore, u.a. Melanome, toxisch auszuwirken, teilweise durch oxidativen Stress vermittelt (Efferth 2007; Xu et al. 2011; Jiao et al. 2007; Woong et al. 2007). Da Cisplatin bekanntlich zur Bildung von ROS führt (L Galluzzi et al. 2012; Florea & Büsselberg 2011), könnte der durch beide Medikamente verursachte Anstieg an oxidativen Stress in der Zelle die Ursache für den verstärkten Zelltod sein. In Ovarialkarzinomzellen wurde

eine solche sensitivierende Wirkung durch erhöhte Mengen an ROS auf Cisplatin-behandelte Zellen beobachtet (Hu & Friedman 2010).

Itraconazol, ein Antimykotikum, scheint auch schon durch Antitumoraktivität, u.a. auch in NSCLC, auf sich aufmerksam gemacht zu haben. Im Medulloblastom wurde diese Wirkung auf die Inhibition des Hedgehog (HH)-Signalweges zurückgeführt (Dirix 2014; Aftab et al. 2012). Der sensibilisierende Effekt der HH Inhibition auf A549 Zellen gegenüber Cisplatin ließ sich in einer durchgeführten Studie auf die Regulierung der EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) zurückführen (Ahmad et al. 2013).

Lapatinib ist ein Zytostatikum, welches den EGFR (*Epidermal growth factor receptor*, HER-1) sowie HER-2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) inhibiert (Moy et al. 2007). Da diese in Krebszellen oft überexprimiert sind, u.a. auch in A549 Zellen (Diaz et al. 2010), stellt er ein beliebtes Ziel in der Krebsbekämpfung dar. Er ist v.a. für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen (Ito et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass er den Zellzyklus in A549 Zellen inhibieren und Zelltod auslösen kann (Diaz et al. 2010). Trotz ähnlicher Konzentration zeigt Lapatinib in der vorliegenden Arbeit allerdings weder einen Zellzyklusarrest (Daten nicht gezeigt) noch basale Toxizität (Abbildung 3-23). Möglicherweise führten abweichende Versuchsbedingungen, wie z.B. die Verwendung anderer Methoden, zu diesen Unterschieden. Die Sensitivierung gegenüber Cisplatin durch EGFR Hemmung wurde auch in anderen Krebszelllinien schon beschrieben (Hiraishi et al. 2008; Zhang et al. 2011). Die Inhibition von EGFR bzw. EGFR und HER-2 (im Fall von Lapatinib) würde die simultane Hemmung unterhalb von EGFR befindlicher, wichtiger Vermittler u.a. zellulären Überlebens, wie z.B. Akt oder ERK, bedeuten, welche durch Cisplatin selbst bereits aktiviert werden (Germain et al. 2010; Basu & Krishnamurthy 2010; Siddik 2003; Sheridan et al. 2010; Zhang et al. 2011). Während Akt eher antiapoptotisch wirkt, wurden ERK eher proapoptotische Funktionen nachgesagt, wie z.B. die Aktivierung von p53. Doch ERK besitzt durchaus auch antiapoptotische Funktionen (Siddik 2003; Basu & Krishnamurthy 2010; Wernyj & Morin 2004). Das würde zur Folge haben, dass der durch Cisplatin verursachte Eigenschutz der Zelle durch die Aktivierung der EGFR-Akt/ERK Signalwege (Benhar et al. 2002; Arany et al. 2004) wegfielen und somit

eine stärkere Cisplatin-Wirkung zur Folge hätte. Allerdings darf man hierbei nicht vernachlässigen, dass in A549 Zellen K-RAS mutiert ist, welches dem EGFR in der Signalkette nachgeschaltet ist, weshalb die Zellen an sich etwas resistenter gegenüber EGFR Inhibition zu sein scheinen. Lapatinib hingegen scheint mehr Zelltod auszulösen als Erlotinib und Gefitinib (Kurtze et al. 2011). Ein Grund hierfür könnte die gleichzeitige Hemmung von EGFR und HER-2 sein, welche von Lapatinib ausgeht. HER-2 stellt einerseits den bevorzugsten Dimerisationspartner aller anderer HER Rezeptoren dar, andererseits sind HER-2 beinhaltende Heterodimere auch aktiver als andere mögliche Kombinationen aus HER-1 bis 4 (Zaczek et al. 2005). Durch die Hemmung von beiden Rezeptortypen kommt es daher vermutlich zu einem stärkeren Effekt, da mehr Dimere betroffen sind von der Inhibition. Das in der ICCB Bibliothek vorkommende Lavendustin A ist ebenfalls ein Vertreter der EGFR-Inhibitoren.

Furoxan, ein Stickstoffmonoxid Donor, wurde sogar schon an Cisplatin bzw. einem EGFR-Inhibitor gekoppelt, um Krebszellen (Kolonkarzinom bzw. NSCLC) abzutöten (Zhao et al. 2012; Han et al. 2013). Stickstoffmonoxid ist bereits bekannt für seine Antitumor-Eigenschaften, u.a. aufgrund der Inhibierung des antiapoptotischen Survivin hemmt (Hirst & Robson 2007). Survivin wird durch Cisplatin Behandlung aktiviert, was der Apoptose entgegenwirkt (Köberle et al. 2010), sodass dessen Hemmung durchaus den Zelltod verstärken könnte. Stickstoffmonoxid scheint zudem auch an der Inhibition des P-Glykoproteins (MDR1/Pgp) beteiligt zu sein. Dabei handelt es sich um einen ABC Transportprotein in der Zellmembran, welches mit Resistenzbildung in vielen Tumoren in Verbindung gebracht wurde (Fletcher et al. 2010). Letzteres könnte auch eine Erklärung für die sensitivierende Eigenschaft des Calcineurin Inhibitors und Immunsuppressivums Cyclosporin A liefern (Feske 2007), welcher ebenfalls für seine hemmende Wirkung auf MDR1/Pgp bekannt ist (Fletcher et al. 2010; Gottesman et al. 2002; Ross et al. 1997). Durch die Hemmung des MDR1/Pgp könnte es zu einer Akkumulation von Cisplatin in der Zelle kommen und dadurch zu verstärktem Zelltod. Bisher wurde Cisplatin allerdings eher als Substrat für diesen Transporter ausgeschlossen (Szakács et al. 2006; Gottesman & Pastan 1993) und nur als Substrat von MRP2, ABCC2, ATP7B nachgewiesen (Galluzzi et al.

2014; L Galluzzi et al. 2012; Siddik 2003). Jedoch wurde die Erhöhung der MDR1/Pgp Expression durch Cisplatin in A549 Zellen sowie in Leber, Niere und Darm nachgewiesen (Liang & Huang 2000; Demeule et al. 1999). Es ist auch erwiesen, dass ABC Transporter nicht nur am Efflux von Substanzen oder Medikamenten beteiligt sind, sondern auch weitere Funktionen besitzen. MDR1/Pgp scheint für die Proliferation und das Überleben in verschiedenen Krebszelllinien erforderlich zu sein und ist auch im Lipidstoffwechsel der Zellen involviert (Fletcher et al. 2010). Folglich ließe sich die Verstärkung des Cisplatin-induzierten Zelltodes möglicherweise durch die Hemmung antiapoptotischer Wirkungen des MDR1/Pgp erklären.

Eine andere Gruppe stellen Protease Inhibitoren dar, genauer genommen Cathepsin Inhibitoren (Ac-Leu-Leu-Nle-CHO und NapSul-Ile-Trp-CHO (NSITC)). Cathepsine sind Cysteinproteasen, ähnlich wie Caspasen, befinden sich jedoch nicht im Zytoplasma, sondern innerhalb von Lysosomen, wo sie den Abbau und das Recyceln von Proteinen vermitteln. Cathepsin B, welches vom erstgenannten Inhibitor u.a. gehemmt wird, kann selbst schon Caspase-abhängig Zelltod einleiten (Droga-Mazovec et al. 2008; Foghsgaard et al. 2001), daher hätte man durch seine Hemmung eher eine Inhibition des Cisplatin-induzierten Zelltodes vermutet, nicht dessen Erhöhung, wie das in der vorliegenden Arbeit eintrat. Auch haben Untersuchungen gezeigt, dass die Inhibition von Cathepsin den TNF α ausgelösten Zelltod reduzieren kann (Kroemer & Martin 2005). Diese Diskrepanz könnte von der höheren Konzentration in der vorliegenden Arbeit herrühren. Für den anderen Inhibitor, NSITC (Cathepsin L Inhibitor), wurde nämlich nach Applikation einer höheren Konzentration zytotoxische Aktivität in Endothelzellen nachgewiesen, wohingegen bei niedrigeren Konzentrationen nur ein G1 Phase Arrest auftrat (Rebbaa et al. 2009). Eine andere Untersuchung zeigte allerdings, dass die Inhibition von Cathepsin B durch den Proteasominhibitor Bortezomib zu verstärktem Zelltod führt (Kao et al. 2014). Als Erklärung wurde die Hemmung der Autophagie aufgeführt, die durch Cisplatin parallel zur Apoptose induziert wird und welche sich schützend auf Zellen auswirkt (Kao et al. 2014; Harhaji-Trajkovic et al. 2009; Dalby et al. 2010). Bortezomib zeigte tatsächlich auch im vorliegenden Screen einen sensitivierenden Effekt auf den Cisplatin-induzierten

Zelltod, ist jedoch nicht unter den Sensibilisatoren wiederzufinden, da es allein bereits mehr als 15% basalen Zelltod ausgelöst hat, was als Grenze definiert wurde (4.2.1). Bafilomycin A1 ist ein vATPase (*vacuolar ATPase*) Inhibitor. Die vATPase ist eine Protonenpumpe, welche in der Membran von intrazellulären Kompartimenten, wie z.B. den Endosomen, oder in der Plasmamembran eingelagert ist. Sie transportiert Protonen ATP-abhängig in intrazelluläre Kompartimente oder aus der Zelle (Jefferies et al. 2008). Wird sie daher gehemmt, verhindert das einerseits das Ansäuern der intrazelluläre Kompartimente andererseits führt es zum Absenken des intrazellulären pH Wertes im Zytosol der Zelle, was u.a. Apoptose triggern kann. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass ein hoher, intrazellulärer pH Wert mit der Resistenz gegenüber Cisplatin einhergeht und Protonenpumpen in Krebszellen im Allgemeinen oft induziert sind (Murakami et al. 2001; Stewart 2007). Unter sauren Bedingungen bindet Cisplatin effektiver an die DNA. Dies beruht u.a. auf der Tatsache, dass das Gleichgewicht dann eher auf Seiten der Aquaplatin(II)-Komplexe liegt. Für schwächer nukleophile DNA-Basen ist die Generierung dieses Komplexes notwendig, denn H₂O Liganden können sie leicht verdrängen und so an das Platinatom binden (Ott & Gust 2006). Dies wäre damit eine mögliche Erklärung für die höhere Sensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin nach Bafilomycin Vorinkubation. Eine andere Begründung läge in der Inhibition der Autophagie, welche mit der vATPase Hemmung einhergeht, oder die Inhibition des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 durch Bafilomycin A1 (Greene et al. 2013). Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Inhibitor Wortmannin besitzt ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf Autophagie (Harhaji-Trajkovic et al. 2009). Der PI3K/Akt Signalweg sichert außerdem das Überleben der Zelle und ist an Resistenzentwicklungen beteiligt (L Galluzzi et al. 2012). Es gibt auch Untersuchungen die seine Eigenschaft, verschiedene Zelllinien gegenüber Cisplatin-Behandlung zu sensibilisieren, belegen (Pastwa et al. 2014; Zhao et al. 2014).

H7, der andere Kinaseinhibitor neben Wortmannin, ist ein Analogon des Staurosporins und hemmt wie dieses die PKC. Der in A549 Zellen erhöhte PKC ϵ Level schützt diese vor

Apoptose (Ding et al. 2002; Caino et al. 2012) und könnte daher die sensibilisierende Eigenschaft von H7 auf die mit Cispatin behandelten A549 Zellen erklären.

Sowohl BAPTA-AM, E6 Berbamin als auch Tanshinon IIA sind in Calcium-abhängigen Signalwege involviert. BAPTA-AM ist ein zellgängiger Calciumchelator, der den intrazellulären Ca^{2+} Level reduziert und so Cisplatin-induzierten Zelltod in A549 Zellen zu hemmen scheint (Jones 2011). Es gibt aber auch Untersuchungen, welche darauf hindeuten, dass die Reduktion intrazellulären Calciums die Öffnung der Orai-Kanäle (CRAC, *Calcium-release-activated calcium channel*) und somit den Einstrom von Calcium in das Zytosol bewirken kann, um die Ca^{2+} -Speicher aufzufüllen (Feske 2007). Diese Erhöhung des intrazellulären Calciums gilt meist als Apoptose-Signal (Pinton et al. 2008). E6 Berbamin inhibiert Calmodulin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein. Die Hemmung von Calmodulin scheint Cisplatin-induzierten Zelltod zu steigern (Mine et al. 2011). Tanshinon IIA, welches den Calcium Spiegel in Endothelzellen zu erhöhen vermochte, konnte dort Caspase-abhängige Apoptose einleiten (Yang et al. 2005). Auch Cisplatin allein führt schon zu einem Anstieg des Calcium-Levels im Zytosol (Florea & Büsselberg 2011; Al-taweel et al. 2014). Dies könnte möglicherweise die Eigenschaft der drei Substanzen als Sensibilisatoren gegenüber Cisplatin erklären. Die Rolle von Calcium in Lungentumoren bleibt aber sehr komplex, weil sie von vielen Faktoren abhängig ist (Yang et al. 2010).

Über Capsazepin, einem Vertreter der Ionenkanal Liganden, welcher an den TRPV 1 (*Vanilloid type 1 receptor*) bindet, wurde berichtet, dass es Kolonkarzinomzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensibilisiert, über die Aktivierung der Todesrezeptoren und die Herabregulierung antiapoptotischer Proteine (Sung et al. 2013) und damit jedoch unabhängig von seiner Funktion als TRPV 1 Ligand. Die Cisplatin-bedingte Ototoxizität hat es allerdings TRPV 1-spezifisch gehemmt (Mukherjea et al. 2008; Yarnell 2012). Der in den A549 beobachtete sensibilisierende Effekt ist womöglich auf unterschiedliche Versuchsbedingungen und Zelltypen zurückzuführen. Der Kalium Ionophor (Valinomycin), könnte durch den Efflux von Kalium aus der Zelle, was bereits Apoptose auslösen kann (Root et al. 2003; Krick et al. 2002; Abraham et al. 2004) - und das hat es zu einem gewissen Grad im Basalscreen auch getan - die Zunahme im Cisplatin-induzierten Zelltod

bewirken. Es gab auch Untersuchungen, welche den sensibilisierenden Einfluss von Kaliumionophoren auf Cisplatin-induzierte Apoptose belegen (Marklund et al. 2001). Auf diesen Efflux beruht zudem die Verringerung des Zellvolumens während der Apoptose (Yu et al. 2001). Penitrem A hingegen ist ein Kaliumkanal Inhibitor, sollte folglich die Apoptose eher hemmen. Es wurde jedoch auch mit der Hemmung des antiapoptotischen Wnt/ β -Catenin Signalweges in Verbindung gebracht, welcher in Tumoren oft überaktiv ist (Sallam et al. 2013; Teng et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten der erhaltenen Sensibilisatoren in Signalwege involviert sind, welche an der Regulation von Wachstum und Zelltod beteiligt sind, wie z.B. der HH-Signalweg, der EGFR-Signalweg, Autophagie, ROS-induzierte Signalwege oder Signalwege, welche den Ionenhaushalt der Zelle (v.a. Calcium und Kalium) betreffen. Daneben gibt es auch Substanzen, welche die Akkumulation von Cisplatin in der Zelle beeinflussen könnten, wie z.B. über Efflux Transporter (MDR1/Pgp) (Abbildung 4-1).

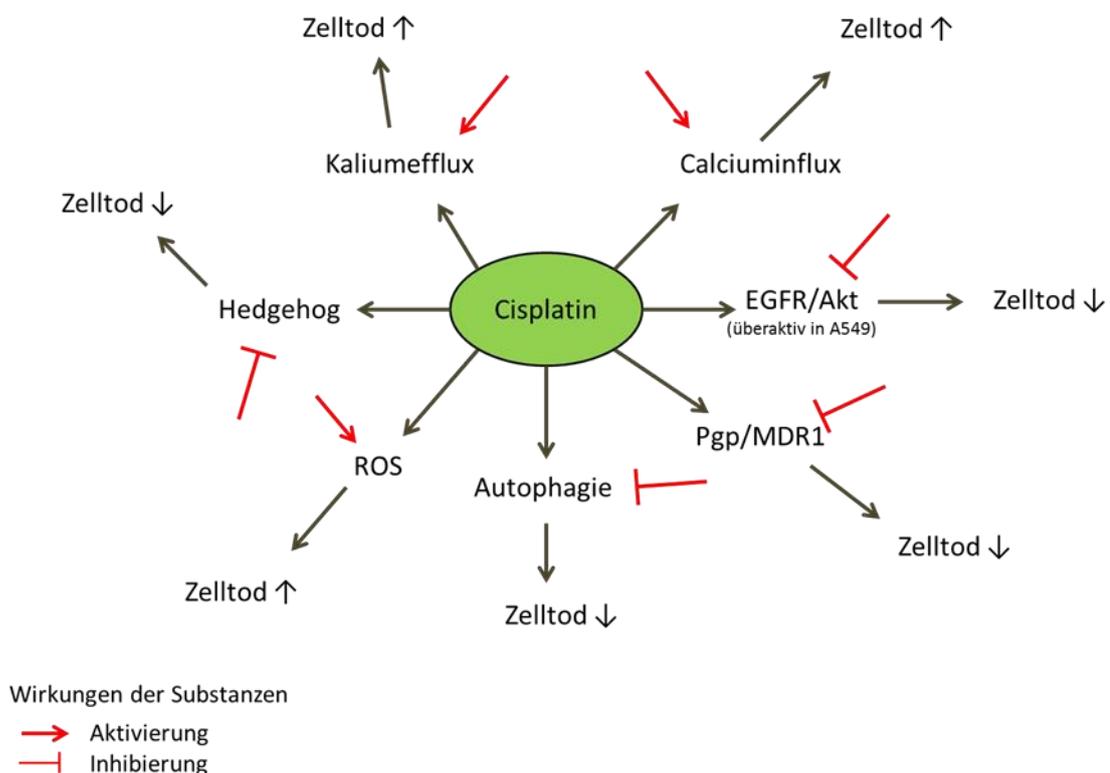


Abbildung 4-1: Übersicht der Sensibilisatoren auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Für Cisplatin wurde bereits die Generierung von ROS und der Influx von Calcium gezeigt, welche seine Apoptosewirkung unterstützen, aber auch die Aktivierung von Autophagie, Pgp/MDR1 und Akt, welche einen eher hemmenden Einfluss auf den Cisplatin-bedingte Zelltod ausüben. Die im Screen identifizierten Sensibilisatoren führen zur Aktivierung von ROS und zur Erhöhung des Calciuminflux, sodass deren proapoptotische Wirkung noch weiter verstärkt wird durch Cisplatin. Inhibitoren der Autophagie des Pgp/MDR1, des EGFR/Akt Signalweges würden deren antiapoptotische Wirkungen wiederum aufheben und so zu verstärktem Cisplatin-induzierten Zelltod führen. Die Inhibierung des antiapoptotischen Hedgehog Signalweges sowie die Aktivierung des proapoptotischen Kaliumeffluxes wirken sich ebenfalls sensibilisierend auf den Cisplatin-induzierten Zelltod aus. ROS Reaktive Sauerstoffspezies; Pgp/MDR1 P-Glykoprotein/Multidrug resistant 1; EGFR Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor

Suppressoren

Betrachtet man die Substanzen, welche den Cisplatin-induzierten Zelltod der A549 Zellen verringern und basal maximal 15% Zelltod induzieren, so ergeben sich 57 Suppressoren, welche sich in 9 funktionellen Gruppen zusammenfassen lassen (Abbildung 3-24). Unter den Treffern befinden sich 25 Medikamente aus der FDA Bibliothek, wovon etwa ein Viertel zu den FIASMA (Funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase) und ein Fünftel zu der Gruppe der GPCR (G Protein-gekoppelter Rezeptor) Regulatoren gehört. Es würde den Rahmen dieser Diskussion sprengen, auf alle Substanzen einzeln einzugehen, weshalb hier entweder der Vertreter mit dem stärksten Effekt oder Substanzen, welche schon bekannt sind für ihre hemmende Wirkung auf Cisplatin oder sich auf eine bestimmte Art hervorheben, diskutiert werden. Sofern das möglich ist, wird auch die Gruppe an sich diskutiert.

Die GPCR stellen eine breite Gruppe an Rezeptoren dar, welche sich am Beginn vieler unterschiedlicher Signaltransduktionsketten befinden und viele verschiedene Wirkungen aufweisen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sowohl Aktivatoren als auch Suppressoren dieser verschiedenen Rezeptoren dieselbe, supprimierende Wirkung auf den Cisplatin-induzierten Zelltod besitzen können. GPCRs stellen die häufigsten Zielmoleküle der bekannten, von der FDA zugelassenen Medikamente dar. Anwendungsgebiete sind beispielsweise Bluthochdruck, Migräne, Depression, Allergien, Geschwüre und Asthma (Overington et al. 2006; Wise et al. 2002). Den GPCRs wurden kürzlich auch eine Beteiligung an Kanzerogenese, Tumorprogression und Metastasierung zugesprochen

(Lappano & Maggiolini 2011; O'Hayre et al. 2014). So sind in Lungenkrebs z.B. Frizzled und der Prostaglandin E2 Rezeptor involviert (Lappano & Maggiolini 2011).

Butaclamol, ein Antidepressivum und Dopamin 2 Rezeptor Inhibitor, weist die stärkste Hemmung auf den Cisplatin-bedingten Zelltod innerhalb dieser Gruppe auf. Dopamin Rezeptoren kommen normalerweise nur in bestimmten Teilen des Gehirns oder der Niere, der Nebenniere oder in Blutgefäßen vor (Missale et al. 1998). Auch in den A549 Zellen wurde aber der Dopamin 2 Rezeptor nachgewiesen und auch die Fähigkeit von Dopamin Apoptose und auszulösen (Yang-hong et al. 2011). Zudem wurde im Ovarialkarzinom eine Effizienzsteigerung von Dopamin gegenüber Cisplatin beobachtet. Folglich fiele durch die Hemmung des Dopamin Rezeptors eine möglicherweise vorherrschende Dopamin-steigernde Wirkung auf den Cisplatin-induzierten Tod weg. Auch bei Clozapin handelt es sich um einen Dopaminrezeptor Antagonist. Melatonin, das Hormon der Zirbeldrüse, welches u.a. für den Wach/Schlafrhythmus verantwortlich ist, ist der natürliche Ligand der Melatonin Rezeptoren (MT₁/ MT₂). Für Melatonin wurde bereits *in vivo* eine antioxidative Wirkung und damit einhergehend der Schutz von Neuronen vor Cisplatin-induzierter Apoptose nachgewiesen, beruhend auf dem Schutz vor Lipidperoxidation (Song et al. 2010). Propranolol gehört zu den Betablockern und hemmt β -adrenerge Rezeptoren, wodurch es gegen Bluthochdruck oder Arrhythmien eingesetzt wird (drugs.com). β -adrenerge Rezeptoren scheinen auch in der Kanzerogenese involviert zu sein und deren Hemmung wirkt sich in verschiedenen Zellen proapoptotisch aus (Stiles et al. 2013; Ji et al. 2012). Es gab auch ein Experiment innerhalb einer dieser Studien, welches sensitivierende Eigenschaft von Propranolol gegenüber Cisplatin in einer Blasenkrebszelllinie zeigte (Chen et al. 2010), allerdings waren sowohl die Cisplatin als auch die Propranolol Konzentrationen niedriger als im vorliegenden Screen. Auch kann die Wahl der Zelllinie bereits für Unterschiede verantwortlich sein. Dies ist auch verdeutlicht durch eine andere Untersuchung, in der sich ein Agonist des β -adrenergen Rezeptors sensitivierend auf Cisplatin-induzierten Zelltod in NSCLC Zellen auswirkte, vermutlich über die Aktivierung der Na⁺, K⁺-ATPase und der intrazellulären Akkumulation von Cisplatin (Bando et al. 2000).

Eine andere Gruppe enthält Substanzen, welche an sich relativ unterschiedliche pharmakologische Wirkung besitzen, da die meisten auch GPCR Regulatoren sind, sich jedoch noch durch die gemeinsame Fähigkeit gruppieren lassen, das lysosomale Enzym saure Sphingomyelinase (ASM) zu hemmen: die FIASMA. Sie bewirken das Ablösen der ASM aus der inneren, lysosomalen Membran, wodurch diese gehemmt wird. Die ASM spaltet Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid. Ceramid, welches Zelltod induzierend wirkt, wird weiter zu Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat metabolisiert, welches an Differenzierung, Proliferation und Migration beteiligt ist (Morad & Cabot 2013). Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat ist bedeutend für die Entscheidung zwischen Zelltod und Überleben (Kornhuber et al. 2010; Kornhuber et al. 2011). Folglich könnte die Inhibition der ASM zur Abnahme des Ceramid Levels führen und damit verbunden zur Inhibition des Cisplatin-induzierten Zelltodes. Es wurde berichtet, dass Cisplatin in Kolonkarzinomzellen über die ASM die Produktion von Ceramid aktiviert, welche zu Caspase 8 vermittelten Apoptose führt (Lacour et al. 2004; Paul et al. 2012). Das würde wiederum bedeuten, dass durch die Hemmung der ASM auch kein Ceramid mehr produziert werden würde. Damit wäre möglicherweise die Caspase-8-vermittelte Apoptose gehemmt, was die Reduktion der Cisplatin-induzierten Zelltodes erklären könnte. Die meisten der FIASMA sind von der FDA zugelassene Antidepressiva (Imipramin, Fluoxetin, Paroxetin und Maprotilin) (Pechmann 2012; Kornhuber et al. 2011) und könnten damit ein Problem darstellen bei gleichzeitiger Verabreichung während der Cisplatin Therapie. Da Depressionen eine bekannte Nebenwirkung von Chemotherapeutika darstellen (Fresche De Souza et al. 2014), ist daher die Wahrscheinlichkeit groß, dass parallel Antidepressiva eingenommen werden.

Weitere Substanzen lassen sich als Kinase Inhibitoren gruppieren. Wie schon im Abschnitt 4.2.1 besprochen, sind Kinasen wichtige Komponenten der Signaltransduktion in der Zelle. Substanzen wie z.B. die Inhibitoren der MAP Kinasen JNK (c-Jun N-terminale Kinase) (SP 600125) und ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) (PD 98059, Olomoucine und Roscovitin (Price et al. 2004)) supprimierten den Cisplatin-induzierten Zelltod, was ihre Rolle in bekannten Cisplatin-induzierten Apoptose Signalwegen bestätigt (Siddik 2003;

Francescato et al. 2007; Germain et al. 2010). Es gibt auch einige Inhibitoren, welche Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) hemmen (Olomoucine und Roscovitine und Harmin), welche an sich ein Therapieziel in der Krebstherapie darstellen. In Tumoren kommt es nämlich oft zur Überexpression von CDKs, was mit unkontrollierter Proliferation einhergeht (Lapenna & Giordano 2009). Allerdings sind Pan-CDK Inhibitoren natürlich nicht auf eine Kinase festgelegt, sondern hemmen alle CDKs, was eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete Diskrepanz sein könnte. Möglicherweise sind die Zelltod hemmenden Effekte auch aufgrund der etwas höheren Konzentrationen unabhängig von CDKs, wie das auf Olomoucine und Roscovitine zutrifft. Olomoucine bewirkt auch basal schon ähnlich viel Zelltod, was für einen Cisplatin-unabhängigen Effekt sprechen könnte. Weiterhin fällt auf, dass vier der Kinase Inhibitoren auf Kinasen des Wnt/ β -Catenin Signalweges wirken, nämlich auf die Glykogensynthase-Kinase (GSK) 3 β (Indirubin-3'-oxim und SB-415286) und die Casein Kinase (CK) (DRB und A-3). Beide Kinasen wirken sich als Teil des β -Catenin Abbaukomplexes hemmend auf den sonst antiapoptischen und proliferationsfördernden Wnt/ β -Catenin Signalweg (Gao et al. 2013; Yuan et al. 2007; He et al. 2005; Carreras Puigvert et al. 2013a). Folglich würde deren Hemmung dann mit einer reduzierten Cisplatin-Wirkung einhergehen, so wie das in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

Unter den Inhibitoren unterschiedlicher Enzyme befindet sich z.B. AG-370, welches den PDGFR (*Platelet derived growth factor receptor*) hemmt, der in vielen Tumoren mutiert und dadurch überaktiv ist und so das Überleben des jeweiligen Tumors gewährleistet (Noskovičová et al. 2014). Daher würde man eigentlich erwarten, dass dessen Hemmung die A549 Zellen gegenüber der Behandlung mit Cisplatin sensibilisieren würde, v.a. da die Hemmung von PDGFR in A549 Zellen schon mit verringerter Proliferation und Apoptose in Verbindung gebracht wurde (Hu 2014). Der hier beobachtete hemmende Effekt könnte jedoch durch die Abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität von MAPK erklärbar sein, welche im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde. Zu den MAPK, welche von PDGFR aktiviert werden, gehört nämlich auch ERK (Noskovičová et al. 2014), welche folglich zusätzlich durch AG-370 gehemmt wird. Hierdurch könnte seine proapoptische Rolle

behindert sein, welche in dem Cisplatin-induzierten Zelltod vorherrscht (Price et al. 2004; Siddik 2003).

Regulatoren von Ionenkanälen haben schon als Sensibilisatoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes eine tragende Rolle gespielt. Es ist nicht zu bestreiten, dass Ionenkanäle und -pumpen wichtige Aufgaben übernehmen, um das Gleichgewicht zwischen Zelltod und dem Überleben von Zellen zu bewahren (Yu et al. 2001; Yu & Choi 2000). Der Vertreter mit dem stärksten Effekt auf die Inhibierung des Cisplatin-induzierten Zelltodes in A549 Zellen ist Flunarizin, ein Calciumkanal Inhibitor (T-Typ Calcium Kanäle), welcher als Migräne Medikament verwendet wird (Leone et al. 1991). Er schützte bereits auditorische Nervenzellen vor Cisplatin-bedingter Apoptose, wenn auch eher Calcium-unabhängig über die Hemmung der Cisplatin-induzierten Lipidperoxidation und Aktivierung des Akt Signalweges (So et al. 2005; So et al. 2006). Jedoch gibt es auch Berichte über proapoptotische, calciumabhängige Wirkungen von Flunarizin sowie weiteren T-Typ Calcium Kanal Inhibitoren, u.a auch in A549 Zellen (Conrad et al. 2010; Rim et al. 2012; Choi et al. 2014). Nicardipin, ebenfalls ein Calciumkanal Inhibitor, hat in derselben Untersuchung bei ähnlicher Konzentration wie diejenige im vorliegenden Screen (8 μ M) ebenfalls eine leichte Erhöhung der Vitalität in den mit Cisplatin-behandelten auditorischen Zellen bewirkt, wenn sie auch nicht signifikant war (So et al. 2005). Niguldipin und Lomerizin sind ebenfalls Calciumkanal Inhibitoren. Die Effekte von Calcium bzw. ihrer Inhibition sind jedoch oft zelltypspezifisch (Conrad et al. 2010) und sehr komplex, sodass geringe Unterschiede in der Behandlungsdauer und -art sich bereits unterschiedlich auf die sensitive Calcium-Homöostase auswirken könnten.

Die Gruppe der Antioxidantien bestätigen neben den MAPK Inhibitoren die Validität der eingesetzten Methode, da Cisplatin-induzierter Zelltod bekanntlich auch über die Bildung von ROS vermittelt ist (Luanpitpong et al. 2011; Bragado et al. 2007; Florea & Büsselberg 2011; Tajeddine et al. 2008; Tonino et al. 2011). Antioxidantien reduzieren oxidativen Stress, dadurch würde ihre Hemmung eine verringerte Zytotoxizität durch Cisplatin erklären können. Andererseits könnte gerade bei Ergothionein die Inaktivierung des

Cisplatin selbst eine weitere Erklärung darstellen, da es von den nukleophilen Anteil (Thiolgruppen) abgefangen werden könnte (L Galluzzi et al. 2012). Es wurde auch schon berichtet, dass Ergothionein Neuronen vor Cisplatin-bedingtem Zelltod schützt (Song et al. 2010). Bei Curcumin, welches als Nahrungszusatzstoff eingesetzt wird und auch Bestandteil von Curry ist, wurden auch antioxidative Wirkung festgestellt (Miquel et al. 2002; Ramsewak et al. 2000), was seinen hier beobachteten Effekt unterstützt. Jedoch besitzt es zudem auch viele andere Funktionen, sodass es oft als Tumorthapeutikum selbst oder als chemosensibilisierende Substanz eingesetzt wird, u.a. auch für Cisplatin-induzierten Zelltod (Notarbartolo et al. 2005; Ye et al. 2012; Shishodia et al. 2007). Auch das könnte mit zelltypabhängigen oder konzentrationsbezogene Unterschieden zusammenhängen.

Etwas verwunderlich war, dass auch Zytostatika unter den Suppressoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes waren. Oft ist gerade ihre unterschiedliche Weise, den Zelltod auszulösen, der Grund für Kombinationstherapien, da sie sich in ihrer Wirkung ergänzen und so auch Resistenzbildung verhindern bzw. überwinden könnten. Doch führen nicht alle Kombinationen immer zwingend zu einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie. Das als Suppressor auftretende Mitoxantron, ein Topoisomerase II Hemmer und Chemotherapeutikum im Einsatz gegen Brustkrebs und Leukämie (Hande 1998) wurde schon in Kombination mit Cisplatin eingesetzt, ohne dass es sichtlich von Vorteil gewesen wäre (Feun et al. 1996). Andere Topoisomerase II Hemmer wiederum, wie z.B. Etoposid und Doxorubizin sind jedoch gängige Kombinationspräparate in der Behandlung von Lungenkrebs (Hande 1998; nccn.org) und dennoch haben sie in der vorliegenden Arbeit auch konzentrationsabhängig supprimierend auf den Cisplatin-bedingten Zelltod gewirkt. Zwei weitere Zytostatika hemmen die Proteinbiosynthese, nämlich Actinomycin D und Plicamycin. In Bezug auf Cisplatin-induzierten Zelltod gibt es auch einen Bericht über sensibilisierende Effekte verschiedener Proteinsyntheseinhibitoren auf A549 Zellen, darunter auch Actinomycin D, welches durch die Hemmung der Transkription die Biosynthese inhibiert (Budihardjo et al. 2000). Die Versuchsbedingungen unterschieden sich jedoch deutlich zu denen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Dauer der

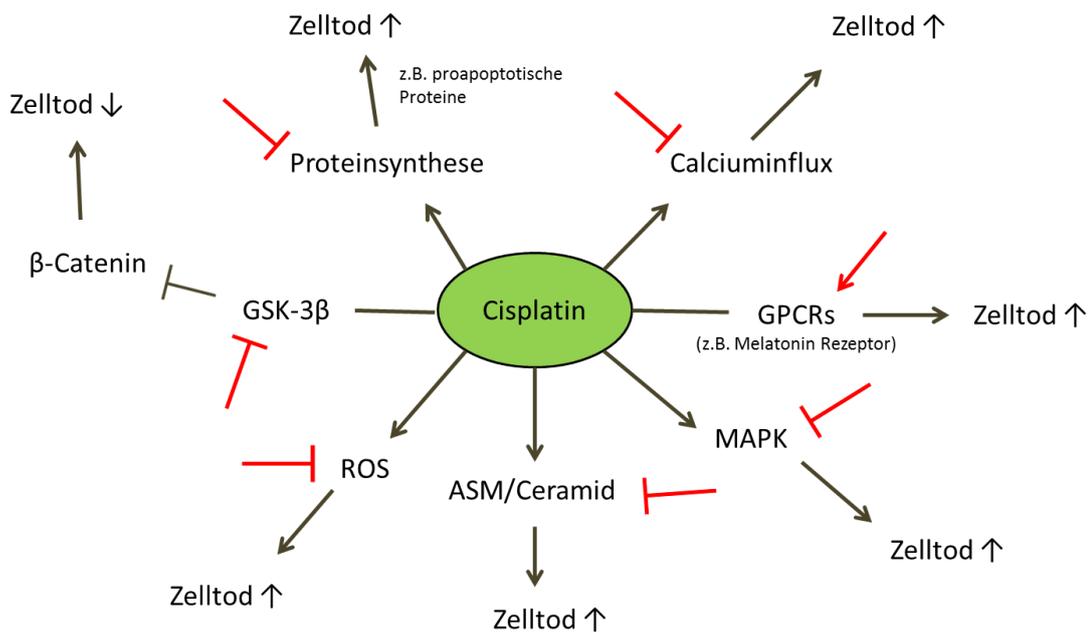
Vorinkubation sowie der Konzentration von Actinomycin D, sodass die Erzielung dieser gegensätzlichen Ergebnisse möglicherweise darauf beruhen könnte. Dass die Wirkung eines Zytostatikums auf Cisplatin-bedingten Zelltod zum Teil jedoch auch von der verwendeten Konzentration abhängt (Muscato et al. 1995), wird auch aus der Abbildung 3-22 ersichtlich, in welcher verschiedene Konzentrationen des gleichen Chemotherapeutikums verschiedene Einflüsse aufweisen. Der Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid aus der gleichnamigen Gruppe wurde in der vorher erwähnten Untersuchung ebenfalls verwendet, aber in etwa dreifacher Konzentration (Budihardjo et al. 2000). Möglicherweise behindert auch die simultane Hemmung der Proteinsynthese den Cisplatin-induzierten Zelltod. Bestimmte Proteine müssen nach der Cisplatin Behandlung schließlich erst transkriptionell aktiviert werden, so z.B. die proapoptotischen Proteine PUMA und NOXA, welche von p53 induziert werden (Basu & Krishnamurthy 2010; Sánchez et al. 1997). Zudem könnte der von Cycloheximid ausgelöste Zellzyklusarrest (Adolph et al. 1993) (Abbildung 3-31) verhindern, dass der Cisplatin-bedingte DNA Schaden zur Apoptose führt, da Cisplatin vorwiegend für proliferierende Zellen toxisch ist (Karasawa et al. 2013).

Einige Suppressoren lassen sich nicht mehr gruppieren. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Medikamente aus der FDA Bibliothek. Nur Triptolid stammt aus der ICCB Bibliothek und ist ein NFκB Inhibitor. Man würde aufgrund der Hemmung dieses antiapoptotischen Transkriptionsfaktors daher eher erwarten, dass Triptolid sensibilisierend wirkt und es gibt auch Studien, welche seine Antitumoreigenschaften und dessen bereits im Nanomolarbereich synergistische Wirkung mit Cisplatin hervorheben (Zhong et al. 2013; Li et al. 2012). Tatsächlich hat es auch im vorliegenden Basalscreen bereits Zelltod ausgelöst bei einer Konzentration von 26,4 μM (Abbildung 3-20B), was somit diese Erkenntnis teilweise unterstützt. Weiterhin wurde jedoch gezeigt, dass es konzentrationsabhängig auch die Transkription per se hemmt (Pan 2010), womit es auch in die Gruppe der Proteinsyntheseinhibitoren eingegliedert werden könnte (siehe vorheriger Abschnitt). Vertreter der FDA-zugelassenen Medikamente sind neben dem Antihistaminikum Ketotifen, das Antibiotikum Clindamycin, der Vasodilatator Dilazep und das

Muskelrelaxans Rocuronium. Ein weiteres Medikament ist der Mineralokortikoidrezeptor Antagonist Spirolacton, welches u.a. als Diuretikum wirkt. In Untersuchungen zeigte sich, dass es jedoch über die Bindung an den PXR (*pregnane X nuclear receptor*) das P-Glykoprotein (Pgp/MDR1) sowie das Mrp2 (*Multidrug resistance-associated protein 2*) induzieren kann (Rigalli et al. 2011; Ruiz et al. 2009). Diese zwei Vertreter der ABC (*ATP-binding cassette*) Transporter sind nachweislich an der Resistenzbildung von Krebszellen gegenüber Cisplatin beteiligt (Stewart 2007). Sie bewirken verstärkten Export von Cisplatin aus der Zelle, was eine Erklärung für die verminderte Zelltodinduktion durch Cisplatin in mit Spirolacton vorbehandelten Zellen sein könnte. Allerdings ist auch zu beachten, dass die Expression des PXR in A549 Zellen eher niedriger ist (Huang et al. 2006).

Im Allgemeinen sind auch supprimierend wirkende Medikamente eine wertvoller Informationsgewinn. Man sollte diesen im Hinblick auf die Vermeidung paralleler Verabreichung dieser Medikamente während der Chemotherapie mit Cisplatin berücksichtigen. Interessant wären hierbei natürlich Patientendaten, welche die entsprechenden Medikamente während ihrer Chemotherapie mit Cisplatin eingenommen haben und ob sich dabei Auswirkungen auf das Ansprechen der Chemotherapie gezeigt haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MAPK Inhibitoren, Antioxidantien, FIASMA, Proteinsynthese Inhibitoren, Inhibitoren der Calciumkanäle, GPCRs sowie der GSK-3 β in die Suppression des Cisplatin-induzierten Zelltod involviert zu sein scheinen (Abbildung 4-2).



Wirkungen der Substanzen

- Aktivierung
- | Inhibierung

Abbildung 4-2: Übersicht der Suppressoren auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Es ist bekannt, dass Cisplatin über Generierung von ROS und Ceramid sowie über die Aktivierung von MAPK zu Apoptose führt. Auch wird Calciuminflux in die Zelle durch Cisplatin ausgelöst, was proapoptotisch wirkt. Durch die Hemmung aller genannten Signalwege würde somit die Cisplatin-induzierte Apoptose gehemmt. Durch Regulationen von GPCRs könnte es ebenfalls dazu kommen, z.B. durch die Aktivierung des je nach Zusammenhang proapoptotischen Melatonins. Einige Vermittler der Cisplatin-bedingten Apoptose (proapoptotische Proteine) bedürfen der Proteinsynthese, sodass deren Hemmung sich auch einen inhibierenden Einfluss ausüben könnte. Die Hemmung der eher proapoptotischen GSK-3 β , könnte z.B. durch Aktivierung von β -Catenin die Cisplatin-induzierte Apoptose hemmen. Dies ist allerdings unter 4.3 sowie Abbildung 4-3 näher ausgeführt. ROS Reaktive Sauerstoffspezies; MAPK Mitogen aktivierte Proteinkinase; GPCR G-Protein gekoppelter Rezeptor; GSK-3 β Glykogensynthase Kinase.

4.3 Die Involvierung von GSK-3 β in den Cisplatin-induzierten Zelltod

Einer der stärksten Treffer unter den Suppressoren des Cisplatin-vermittelten Zelltodes war der GSK-3 β Inhibitor SB-415286. Ein weiterer GSK-3 β Inhibitor (Indirubin-3'-oxim) sowie zwei Caseinkinase Inhibitoren (DRB und A-3) (Abbildung 3-24B) weisen den gleichen hemmenden Effekt auf und aktivieren in Theorie den antiapoptotisch wirkenden Wnt/ β -Catenin Signalweg, in welchem beide Kinasen involviert sind und welcher mit der Resistenzbildung in Verbindung gebracht wird, u.a. auch in A549 Zellen gegenüber Cisplatin (Gao et al. 2013; Yuan et al. 2007; He et al. 2005; Carreras Puigvert et al. 2013a). Angesichts der beobachteten Effekte sowie der Tatsache, dass β -Catenin u.a. den MDR1/Pgp Transporter induzieren kann (Stewart 2014; Shen et al. 2013; Liu et al. 2010), und dessen Involvierung in den Cisplatin-induzierten Zelltod auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (Furoxan, Cyclosporin A1 und Spironolacton), ließ sich folgende Hypothese formulieren:

Die Inhibierung von GSK-3 β bewirkt die Akkumulation von β -Catenin, welches daraufhin die Expression von MDR1/Pgp induziert. Durch MDR1/Pgp wird Cisplatin verstärkt aus der Zelle exportiert, was die verminderte Zytotoxizität erklären würde.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde ein weiterer GSK-3 β Inhibitor (BIO) hinzugezogen, mit welchem der supprimierende Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod bestätigt werden konnte. Als nächstes wurde überprüft, ob die supprimierende Wirkung von BIO auch in Krebszellen aus anderen Organen auftritt, welche ebenfalls mit Cisplatin behandelt werden. Dementsprechend wurden die Zelllinien HCT-116 (Kolonkarzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) ausgewählt (Köberle et al. 2010). Es zeigte sich, dass der suppressive Effekt von BIO auf den Cisplatin-induzierten Zelltod zelltypabhängig ist: In den HCT-116 sensibilisiert BIO die Zellen sogar leicht für Cisplatin, wohingegen es den Zelltod der HeLa Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 3-28D). Da die HCT-116 Zellen eine Mutation im β -Catenin-Gen (CTNNB1) aufweisen, wodurch die Phosphorylierung von β -Catenin und damit sein Abbau nicht mehr möglich ist, ist der β -Catenin Level in diesen Zellen bereits erhöht (Ilyas et al. 1997; Morin et al. 1997). Daher war eigentlich kein Effekt

zu erwarten, sofern β -Catenin an der beobachteten Hemmung des Cisplatin-bedingten Zelltodes durch BIO beteiligt ist. Dass es die Zellen sogar leicht sensibilisiert, lässt darauf schließen, dass möglicherweise weitere Proteine oder Signalwege involviert sein könnten. In HeLa Zellen ist der Wnt/ β -Catenin Signalweg ebenfalls aufgrund einer Überexpression des LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) aktiviert und die GSK-3 β damit bereits gehemmt (Chen et al. 2014). Folglich wäre auch hier kein sonderlicher Effekt der GSK-3 β Hemmung (BIO) zu erwarten gewesen, was sich durch die Experimente auch bestätigte.

Weiterhin stellte sich die Frage, bei welchem Schritt die Induktion der Apoptose durch den Einsatz von BIO gehemmt wird. Dafür wurden weitere Substanzen in Kombination mit BIO in A549 Zellen getestet, welche sich in der Art der Apoptose-Induktion voneinander unterscheiden. Hierzu kamen einerseits zwei Substanzen zum Einsatz, welche den intrinsischen Apoptose Weg auslösen, nämlich Etoposid, ein Topoisomerase II Inhibitor und Staurosporin, ein Proteinkinase C Inhibitor, andererseits TNF α , welches den extrinsischen Apoptose Weg induziert (Abbildung 3-29-Abbildung 3-31) (Taylor et al. 2008; Wang et al. 1996). Die Ergebnisse deuten an, dass der supprimierende Effekt von BIO in A549 Zellen nur in Verbindung mit Cisplatin so stark ausfällt. Bei Etoposid ist eine leichte Tendenz in dieselbe Richtung erkennbar, diese verschwindet jedoch mit steigender Konzentration an BIO. Im Gegensatz dazu bleibt der hemmende Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod auch mit steigender Konzentration an BIO stabil (Daten nicht gezeigt). Die ähnlichen Effekte zwischen Cisplatin und Etoposid in Bezug auf die BIO Vorbehandlung könnten die Hypothese insofern bestärken, da Etoposid ein Substrat für den Transporter MDR1/Pgp darstellt und die Überexpression von MDR1/Pgp wiederum mit Cisplatin Resistenz zu korrelieren scheint (Gottesman et al. 2002; Holohan et al. 2013; Stewart 2007). Somit könnte ihr Efflux aus der Zelle möglicherweise für die abgeschwächte Wirkung von Cisplatin und Etoposid verantwortlich sein, auch wenn der Effekt von BIO auf Etoposid-induzierte Apoptose nicht so stark ausgeprägt ist. Auch, dass BIO keinen Einfluss auf den Zelltod durch Staurosporin und TNF α ausübt, könnte die Hypothese weiter bestärken: die MDR1/Pgp Expression kann eine einmal angefangene

Apoptose nicht stoppen. Andere Resistenzfaktoren, welche von β -Catenin induziert werden könnten, wie z.B. Survivin oder Livin (Stewart 2014), würden wiederum auch eine hemmende Wirkung auf andere Apoptose-auslösende Substanzen erwarten lassen, weil sie in den Apoptose Signalweg direkt eingreifen.

Um die Frage der Involvierung von β -Catenin in dem von BIO ausgehenden Effekt zu klären, wurde die Aktivität von β -Catenin mithilfe des Topflash Reporterassays gemessen. Dabei bestätigt sich, dass β -Catenin nach der Inkubation mit BIO in An- und Abwesenheit von Cisplatin aktiviert wird (Abbildung 3-32). Hinzu kommt aber, dass nach der Cisplatin Behandlung die basale β -Catenin Aktivität etwas geringer ausfällt als in der unbehandelten Kontrolle. Die Aktivierung von β -Catenin durch BIO ist ebenfalls etwas schwächer. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch Cisplatin zurückzuführen, welches β -Catenin ebenfalls zum proteasomalen Abbau markieren kann (Sadot et al. 2001). Die Aktivierung von β -Catenin impliziert noch nicht, dass es auch wirklich den supprimierenden Effekt von BIO auf den Cisplatin-bedingten Zelltod vermittelt. Daher wurde β -Catenin mittels RNAi herunterreguliert. Dabei wäre zu erwarten, dass die Depletion von β -Catenin den hemmenden Effekt von BIO auf Cisplatin-induzierten Zelltod aufhebt. Die Tatsache, dass die Depletion von β -Catenin jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung von BIO aufweist, spricht gegen die aufgestellte Hypothese, dass der Effekt von BIO über die Hochregulation von β -Catenin erfolgt. Andererseits wäre es vielleicht auch möglich, dass das, trotz der Depletion noch übrige, β -Catenin durch die Hemmung der GSK-3 β (BIO) insoweit stabilisiert und aktiviert wird, dass es den hemmenden Effekt von BIO erreichen könnte. Jedoch ist das eher fragwürdig, denn dann hätte die β -Catenin RNAi die A549 Zellen gegenüber Cisplatin eher sensibilisieren sollen, was jedoch nicht zu beobachten war. Der Wnt/ β -Catenin Signalweg wird somit zwar durch BIO induziert, scheint allerdings eher nicht für die hemmende Wirkung von BIO verantwortlich zu sein. Ferner scheint β -Catenin für die Proliferation der A549 Zellen von Bedeutung zu sein, denn die β -Catenin Depletion senkt den Anteil an lebenden Zellen verglichen zur Kontrolle. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Verlust von β -Catenin Zelltod und Autophagie induzieren kann (Chang et al. 2013) und tatsächlich

gibt es auch in den A549 Zellen Anzeichen von Autophagie nach der β -Catenin Depletion, nämlich in Form von Vakuolen Bildung (Daten nicht gezeigt).

Chemische Kinaseinhibitoren sind oft aufgrund ihrer Wirkungsweise, nämlich die Blockade der ATP-Bindungsstelle (Polychronopoulos et al. 2004), nicht immer ganz spezifisch. Für die Bestätigung der Spezifität von BIO sollte die Depletion von GSK-3 β daher denselben Effekt auf den Cisplatin-bedingten Zelltod besitzen. Weiterhin sollte die Behandlung mit BIO in A549 Zellen, in welchen GSK-3 β herunterreguliert ist, keinen Effekt auf den Cisplatin-bedingten Zelltod ausüben, da schließlich kein Protein mehr existiert, welches es zu hemmen gilt. Letzteres ist auch zu beobachten, was bedeutet, dass der Effekt von BIO auf die Hemmung der GSK-3 β zurückzuführen sein müsste. Im Gegensatz dazu hat die Depletion von GSK-3 β allerdings keinen Einfluss auf den Cisplatin-induzierten Zelltod, was im ersten Moment widersprüchlich klingt. Es könnte aber auch sein, dass die aktive GSK-3 β möglicherweise den Cisplatin-induzierten Zelltod begünstigen könnte und deren Hemmung durch BIO aber nur die Kinasefunktionen der GSK-3 β hemmen würde. Mögliche Kinase-unabhängige Funktionen von GSK-3 β könnten dann für die Zelltod-reduzierende Wirkung von BIO auf Cisplatin-behandelte A549 Zellen verantwortlich sein. Die Depletion der GSK-3 β würde allerdings auch diese Kinase-unabhängigen Funktionen inhibieren, wodurch der hemmende Effekt auf den Cisplatin-induzierten Zelltod verschwinden würde. Tatsächlich weiß man um die Bindung von GSK-3 β an p53 oder XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Watcharasit et al. 2002; Sun et al. 2009) sowie die Bildung von größeren Proteinkomplexen (Thorne et al. 2014b; Doble & Woodgett 2003; Kim & Kimmel 2000; Watcharasit et al. 2002; Sun et al. 2009). Das GSK-3 β Bindeprotein FRAT1 (*Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1*) ist z.B. in der Lage nur bestimmte Funktionen von GSK-3 β zu hemmen, wie z.B. die Phosphorylierung von β -Catenin, ohne andere Funktionen (Phosphorylierung der Glykogensynthase) wiederum zu beeinflussen (Thomas et al. 1999). Im Falle einer Depletion würden folglich alle GSK-3 β -abhängige Signalwege gehemmt werden, auch die Kinase-unabhängigen. Eine andere mögliche Erklärung könnte eventuell auch die durch eine Depletion von GSK-3 β ausgelöste Expression anderer Proteine, z.B. die der Isoform GSK-3 α . Es gibt Studien, die

zeigen, dass die GSK-3 α im Bezug auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg unter Umständen die Funktionen der GSK-3 β übernehmen kann (Doble & Woodgett 2003). Allerdings sind die beiden Proteine nicht komplett redundant in ihrer Wirkung, wie die Letalität von GSK-3 β Knockoutmäusen zeigt (Hoeflich et al. 2000). Es wurde auch gezeigt, dass GSK-3 α ebenfalls durch den Inhibitor BIO gehemmt wird, jedoch ist die Affinität zu GSK-3 β etwas höher (Meijer et al. 2003). Eine Bande für GSK-3 α war in der Westernblot Analyse nach der GSK-3 β Depletion zwar nicht zu detektieren, allerdings sollte der Antikörper laut Herstellerangaben auch nur für GSK-3 β spezifisch sein. Zuletzt besteht noch die Möglichkeit eines Offtarget-Effektes seitens der GSK-3 β siRNA, denn der Blast der siRNA Sequenz der GSK-3 β siRNA hat ergeben, dass sie theoretisch auch teilweise an die mRNA eines anderen Gens binden könnte. Die Übereinstimmung der Sequenzen beträgt zwar nur 80% (FRAS-1, *Fraser syndrome 1*) (Abbildung 6-4), jedoch scheint gerade die Homologie in den Basen 2-8, welche für die GSK-3 β siRNA und dem FRAS-1 Gen vorliegt, oft für Offtarget-Effekte verantwortlich zu sein (Birmingham et al. 2006). Die Depletion von FRAS-1 würde durch die Hemmung von FAK und Akt (Zhan et al. 2014; Guo et al. 2014) vermutlich den Cisplatin-induzierten Zelltod erhöhen. Dadurch könnte wiederum die durch die Depletion der GSK-3 β verursachte Reduktion des Cisplatin-bedingten Zelltodes aufgehoben werden.

Die Depletion von GSK-3 β setzt den Anteil an lebenden Zellen herab und scheint zudem auch den basalen Zelltod leicht zu erhöhen (Abbildung 3-35). GSK-3 β besitzt die paradoxe Fähigkeit, Zelltod gleichzeitig zu inhibieren und zu aktivieren, indem es einerseits den intrinsischen Apoptoseweg fördert, u.a. durch Interaktion mit p53 und dessen Phosphorylierung, und andererseits die extrinsische Apoptose inhibiert (Beurel & Jope 2006). Demnach lässt sich die basale, proapoptotische Wirkung der GSK-3 β Depletion möglicherweise auf die Einleitung des extrinsischen Apoptoseweges zurückführen. Dieser Weg wäre dann nämlich nicht mehr durch GSK-3 β gehemmt. Eine Zusammenstellung verschiedener Funktionen von GSK-3 β auf den Zelltod sowie den Einfluss von BIO ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

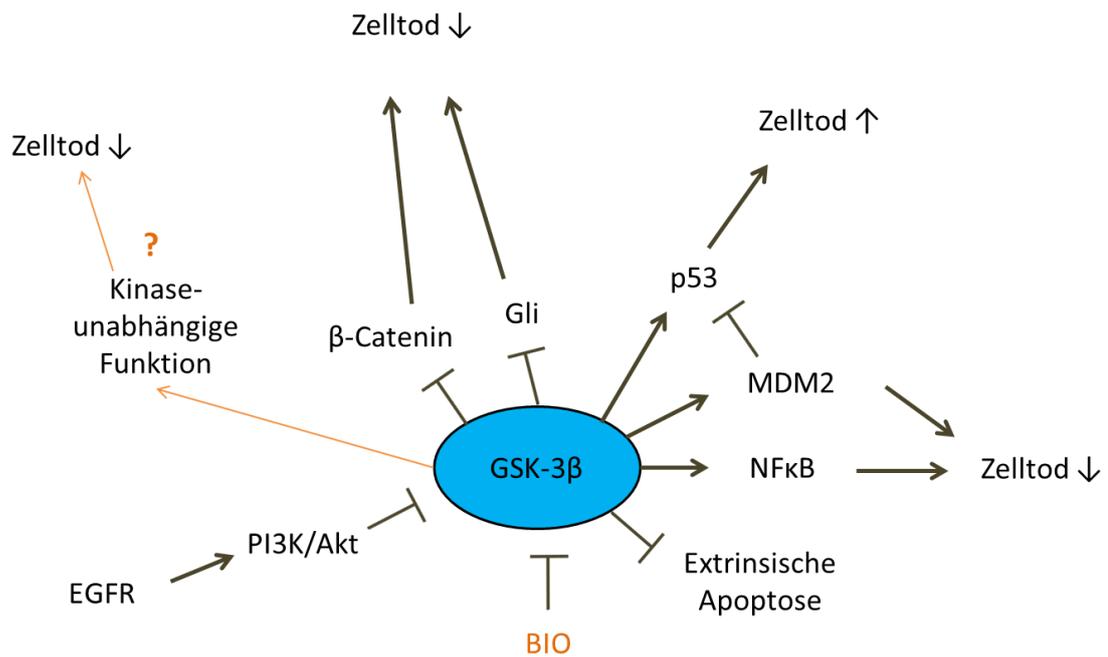


Abbildung 4-3: Übersicht verschiedener Funktionen von GSK-3 β auf den Zelltod. GSK-3 β wirkt über die Hemmung von β -Catenin und Gli sowie die Aktivierung von p53 proapoptotisch, wohingegen sich seine Aktivierung von NF κ B und MDM2 antiapoptotisch auswirkt. Zudem liegt auch eine Hemmung der extrinsischen Apoptose durch GSK-3 β vor. Eine Art der Regulation von GSK-3 β besteht in der hemmenden Wirkung des EGFR/PI3K/Akt Signalweges. Weiterhin könnte BIO über seine Hemmung der GSK-3 β Kinaseaktivität Kinase-unabhängige Funktionen der GSK-3 β hervorheben, welche wiederum für die Zelltod-hemmende Wirkung verantwortlich sein könnten. EGFR Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor; MDM2 Mouse double minute 2 homolog; NF κ B Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PI3K Phosphoinositid-3-Kinase

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ein tieferes Verständnis der Prozesse während der Cisplatin-induzierten Apoptose bietet die Grundlage für eine Optimierung der Cisplatin-Therapie. Cisplatin ist eines der am häufigsten eingesetzten und effektivsten Chemotherapeutika. Cisplatin bewirkt in der vorliegenden Arbeit einerseits einen konzentrationsabhängigen Arrest der A549 Zellen in der S und G2/M Phase, andererseits induziert es konzentrations- und zeitabhängig Apoptose. Die Beteiligung bekannter Apoptosewege (extrinsische und intrinsische Apoptose sowie Caspase-Abhängigkeit) nach der Cisplatin Behandlung konnte für die A549 Zellen bestätigt werden. Interessant war jedoch die beobachtete Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltodes bei 100 μM Cisplatin, welche vermutlich zurückzuführen ist auf die Bindung und dadurch Hemmung von Caspasen durch Cisplatin (Jin et al. 2005) oder aber auf eine mögliche Regulation von Ionen Kanälen durch Cisplatin, welche die Inhibierung des Natrium-abhängigen Apoptose-bedingten Volumenverlustes zur Folge hat (Sancho-Martínez et al. 2011; Bortner & Cidlowski 2003). Fraglich ist natürlich, ob eine Dosiserhöhung von Cisplatin auch in der Klinik eine solche verminderte Wirkung zeigt. Allerdings wird Cisplatin in der Therapie normalerweise immer in Kombination mit anderen Zytostatika verabreicht und ist durch seine starken Nebenwirkungen in seiner Dosis limitiert. Zwar ist eine der höchsten Dosen zwar mit 120 mg/m^2 (Rapp et al. 1988) und umgerechnet 132 μM (bei einer Größe von 1,69 m, einem Gewicht von 67 kg und einer Blutmenge von 5,36 l), sogar etwas höher, allerdings kommt davon im Körper, u.a. aufgrund von Detoxifikationsprozessen in der Leber, auch weniger beim Tumor selbst an im Vergleich zu Zellkulturexperimenten.

Die während dieser Arbeit generierte A549 H2B-GFP Zelllinie eignet sich gut als Werkzeug für mikroskopische Untersuchungen dynamischer Vorgänge der Apoptose, da sie, wie auch die A549 Wildtypzellen, fähig sind Apoptose auszulösen. Die Verwendung der A549 H2B-GFP Zellen bergen den Vorteil, dass eine Färbung des Zellkerns ausbleibt und somit auch Aufnahmen über einen längeren Zeitraum kein Problem darstellen bezüglich der Toxizität, welche DNA-bindende Farbstoffe besitzen. Die in den A549 H2B-GFP durchgeführten Zeitverlaufsstudien bestätigen den Ablauf der apoptotischen Vorgänge: Die

Zellen runden sich ab und die Membran beginnt sich abzuschnüren, gefolgt von der Ausbildung apoptotischer Körperchen. Währenddessen kommt es im Zellkern zur partiellen DNA-Kondensation, welche in eine homogene Kondensation übergeht und schließlich in der Fragmentierung der DNA resultiert (Taylor et al. 2008). Eine neue Erkenntnis lag jedoch in der Beobachtung der Bildung apoptotischer Körperchen vor der DNA-Fragmentierung, was dazu führt, dass die kondensierte DNA in ein einziges apoptotisches Körperchen eingelagert wird (Abbildung 3-11). Dies deutet auf zwei voneinander unabhängige Prozesse hin. Die Tatsache, dass die Apoptose in weniger als einer Stunde bereits abgeschlossen sein kann, unterstreicht nochmals die Bedeutung von Zeitverlaufsstudien, durch welche keine wichtigen Informationen verloren gehen.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Chemikalienscreen diente der Bestimmung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in A549 Zellen. Dabei leisten sowohl Verstärker als auch Suppressoren des Cisplatin-induzierten Zelltodes einen Beitrag zum tieferen Verständnis der molekularen Wirkungsweise von Cisplatin.

Alle an der Sensibilisierung des Cisplatin-induzierten Zelltodes beteiligten Signalwege stehen im Zusammenhang mit dem Zelltod oder Zellwachstum, wie z.B. der HH-Signalweg, der EGFR-Signalweg, die Autophagie, ROS-induzierte Signalwege oder Signalwege, welche den Ionenhaushalt der Zelle (v.a. Calcium und Kalium) betreffen oder es handelt sich um Proteine, wie der Efflux Transporter (MDR1/Pgp, Mrp2), welche die Akkumulation von Cisplatin beeinflussen. Bei der Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes spielen MAP Kinasen, Antioxidantien, FIASMA, Proteinsyntheseinhibitoren, Calciumkanäle, GPCRs sowie der GSK-3 β eine bedeutende Rolle. Die Beteiligung des Wnt/ β -Catenin Signalweges an der DNA Schadensantwort sowie an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Cisplatin und die Tatsache, dass mehrere Inhibitoren der GSK-3 β sowie der Caseinkinase im Chemikalienscreen einen hemmenden Effekt auf den Cisplatin-bedingten Zelltod ausüben, führte zur Aufstellung der Hypothese, dass die Inhibierung von GSK-3 β über die Akkumulation und Aktivierung von β -Catenin die Expression von MDR1/Pgp bewirkt. Durch dieses würde Cisplatin aus der Zelle exportiert und so in verringerter Zytotoxizität resultieren. Verschiedene Experimente zeigen jedoch, dass

die postulierte Hypothese so wahrscheinlich nicht stimmen kann. Es scheint zwar eine Aktivierung des β -Catenins während der BIO-vermittelten Reduktion des Zelltodes durch Cisplatin zu geben, jedoch zeigten RNAi Experimente, dass β -Catenin eher nicht für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Kinase-unabhängige Funktionen von GSK-3 β könnten wiederum eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte zwischen der Inhibition und der Depletion der GSK-3 β liefern (Miura 2014). Auch eine durch die Depletion bedingte Heraufregulierung der GSK-3 α , welche die Funktion der GSK-3 β möglicherweise kompensieren könnte, wäre eine weitere Möglichkeit. Zuletzt bestünde auch noch die Wahrscheinlichkeit eines Offtarget-Effektes der GSK-3 β RNAi, welcher die Unterschiede rechtfertigen könnte.

Es wäre daher sinnvoll weitere Experimente durchzuführen, welche zur Verständnis dieses Phänomens beitragen. Ein wichtiges Experiment bestünde in der Überprüfung des Proteinlevels von FRAS-1 (*Fraser syndrome 1*). Der Blast der siRNA Sequenz der GSK-3 β siRNA hatte ergeben, dass sie teilweise auch an die mRNA dieser Sequenz binden könnte (Abbildung 6-4). Die Überprüfung des GSK-3 α Levels nach der GSK-3 β RNAi bzw. eine simultane Depletion von GSK-3 α und β wären sicherlich hilfreich, um zu erfahren, ob GSK-3 α unter diesen Umständen möglicherweise die Rolle der GSK-3 β übernimmt. BIO hemmt zwar auch die GSK-3 α , jedoch bedarf es dazu auch höherer Konzentrationen von BIO (Meijer et al. 2003). Es könnte daher sehr wohl auch in der Behandlung mit Cisplatin, BIO und der GSK-3 β siRNA zur Aufhebung der BIO-vermittelten Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes kommen. Auch wäre die nähere Betrachtung weiterer Substrate der GSK-3 β interessant. Dass β -Catenin aktiviert wird, konnte bereits anhand des Topflash-Reportergentests gezeigt werden, auch wenn der hemmende Effekt von BIO auf Cisplatin-induzierten Zelltod eher unabhängig von β -Catenin zu sein scheint (Abbildung 3-33). Die GSK-3 β ist schließlich in vielen Signalwegen involviert, so z.B. in den Hedgehog Signalweg, bei dem GSK-3 β das Proteins Gli phosphoryliert und damit inaktiviert (Takahashi-Yanaga & Kahn 2010). Auch Notch gehört zu den Substraten der GSK-3 β , wobei es nicht ganz klar ist, ob die Phosphorylierung den Notch Signalweg eher inhibiert oder aktiviert (M.-J. Lee et al. 2008; Espinoza & Miele 2013). Eine hemmende Wirkung

der GSK-3 β auf Notch könnte hier bedeuten, dass BIO als GSK-3 β Inhibitor den antiapoptotischen, nicht-kanonischen Notch Signalweg aktivieren würde und damit z.B. auch NF κ B (Espinoza & Miele 2013) und so in der Hemmung des Cisplatin-induzierten Zelltodes resultieren könnte. Eine aktivierende Wirkung der GSK-3 β auf Notch könnte wiederum aber auch bedeuten, dass BIO als GSK-3 β Inhibitor den Notch Signalweg hemmen würde. Dieser scheint aber auch über die Regulation des Transporters MRP1 (Espinoza & Miele 2013) den Export von GSH zu begünstigen (L Galluzzi et al. 2012), was bedeuten würde, dass es zur Akkumulation von GSH kommen könnte, welches Cisplatin inaktivieren würde und dadurch dann den Cisplatin-induzierten Zelltod hemmen. Hier wäre es hilfreich die mögliche GSH Akkumulation mittels Westernblot Analyse zu überprüfen. Auch der Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher eine bedeutende Rolle in der Cisplatin-induzierten Apoptose besitzt, wird von der GSK-3 β inhibiert (Doble & Woodgett 2003) und wäre daher im Falle einer Hemmung der GSK-3 β aktiviert bzw. stabilisiert, was bereits mit der Resistenz gegenüber Cisplatin in Verbindung gebracht wurde (Xia et al. 2013). Ein weiteres Zielprotein von GSK-3 β ist das Tumorsuppressorprotein p53, an welches es aktivierend binden kann und so die intrinsischen Apoptose triggern kann. Es ist zudem bekannt, dass nach DNA Schädigung p53 v.a. im Kern an GSK-3 β bindet und dessen Wirkung so aktiviert. Somit kann GSK-3 β auch unabhängig von der aktivierenden Tyrosin-216 Phosphorylierung aktiviert werden (Beurel & Jope 2006; Watcharasit et al. 2002). Doch kann GSK-3 β auch die Aktivierung der MDM2 bewirken, welches p53 zur Degradierung markiert (Kulikov et al. 2005). Daher wäre es sicher sinnvoll, den p53 Status in Zellen zu überprüfen, welche mit Cisplatin und BIO behandelt wurden. Dafür würden sich Immunfluoreszenzanalysen gut eignen, da sich dadurch gleichzeitig auch die Lokalisation von GSK-3 β nachweisen ließe. Auch FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Analysen könnten über die Bindung von GSK-3 β Aufschluss geben.

Zur weiteren Aufklärung der beobachteten Apoptose-hemmenden Wirkung von BIO wäre es sicher von Vorteil, den Level an Cisplatin in A549 Zellen zu untersuchen in An- und Abwesenheit von BIO und GSK-3 β siRNA, auch wenn die vorliegenden Ergebnisse β -Catenin – und damit MDR-1/Pgp- als Vermittler des Effektes von BIO eher ausge-

geschlossen haben. Dies könnte einerseits mithilfe immunologischer Verfahren, wie z.B. ELISA, unter Einsatz eines Antikörpers gegen Cisplatin-Addukte, gemessen werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) (Lundholm et al. 2013). Weiterhin könnten noch weitere Zeitpunkte analysiert werden, um zu überprüfen, ob der Effekt auch zu späteren Zeitpunkten noch sichtbar ist und BIO nicht nur eine verlangsamende Wirkung bezüglich der Apoptose bewirkt. Im Allgemeinen lässt sich die Involvierung der GSK-3 β in Krebs nicht abstreiten. Einerseits agiert sie als Tumorsupressor, wie z.B. über den Wnt/ β -Catenin Signalweg und den Hedgehog Signalweg, deren Zielproteine sie hemmt, andererseits gibt es durchaus Untersuchungen, welche seine Funktion als Tumorpromotor hervorheben, z.B. durch die Aktivierung von überlebenssichernden Signalwegen (NF κ B) (Thorne et al. 2014a; Beurel et al. 2014; Beurel & Jope 2006; Takahashi-Yanaga 2013).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit zusätzlich zu schon bekannten Signalwegen bzw. Schlüsselproteinen der Apoptose weitere neue Regulatoren identifiziert wurden. Speziell die verstärkende oder hemmende Wirkung vieler Medikamente auf die Cisplatin-induzierte Apoptose bedarf allerdings noch weiterer Forschung. Vor allem der hohe Anteil an GPCR Regulatoren in der Gruppe der Cisplatin-hemmenden Substanzen Wirkung ist nicht zu vernachlässigen, da es sich dabei um häufig verwendete Medikamente handelt, wie z.B. Beta-Blocker gegen Bluthochdruck. Antidepressiva z.B. werden wiederum sicherlich häufig an Krebspatienten verabreicht aufgrund der Nebenwirkungen von Chemotherapeutika, welche Depressionen miteinschließen.

5 Literaturverzeichnis

- Abraham, V.C., Taylor, D.L. & Haskins, J.R., 2004. High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends in biotechnology*, 22(1), pp.15–22.
- Adolph, S., Brüsselbach, S. & Müller, R., 1993. Inhibition of transcription blocks cell cycle progression of NIH3T3 fibroblasts specifically in G1. *Journal of cell science*, 105 (Pt 1, pp.113–122.
- Aftab, B.T. et al., 2012. Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 71(21), pp.6764–6772.
- Ahmad, A. et al., 2013. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), p.77.
- Alessi, D.R., 1997. The protein kinase c inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1 β (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Letters*, 402(2-3), pp.121–123.
- Al-taweel, N. et al., 2014. Cisplatin (CDDP) triggers cell death of MCF-7 cells following disruption of intracellular calcium ([Ca ²⁺]_i) homeostasis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(5), pp.765–774.
- Arany, I. et al., 2004. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287, pp.F543–F549.
- Bandmann, V. et al., 2012. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Letters*, 586(20), pp.3626–3632.
- Bando, T. et al., 2000. Selective beta2-adrenoceptor agonist enhances sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cell line. *Oncology Reports*, 7(49-101).
- Bartek, J. & Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3, pp.421–429.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, pp.738–747.

- Bartlett, D.W. & Davis, M.E., 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic acids research*, 34(1), pp.322–33.
- Basu, A., 2001. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(4), pp.899–908.
- Basu, A. & Krishnamurthy, S., 2010. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Benhar, M., Engelberg, D. & Levitzki, A., 2002. Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene*, 21, pp.8723–8731.
- Beurel, E., Grieco, S.F. & Jope, R.S., 2014. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 3.
- Beurel, E. & Jope, R.S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in neurobiology*, 79(4), pp.173–89.
- Bey, E.A. et al., 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by α -lapachone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11832–11837.
- Birmingham, A. et al., 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature methods*, 3(3), pp.199–204.
- Bortner, C.D. & Cidlowski, J. a., 2003. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp.39176–39184.
- Boulares, A.H. et al., 1999. Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), pp.22932–22940.
- Bragado, P. et al., 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(9), pp.1733–42.
- Brognaard, J. et al., 2001. Akt / Protein Kinase B Is Constitutively Active in Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Promotes Cellular Survival and Resistance to Chemotherapy and Radiation. *Cancer Research*, 61, pp.3986–3997.
- Budihardjo, I.I. et al., 2000. Effect of 6-aminonicotinamide and other protein synthesis inhibitors on formation of platinum-DNA adducts and cisplatin sensitivity. *Molecular pharmacology*, 57(3), pp.529–38.

- Caino, M.C. et al., 2012. Non-small cell lung carcinoma cell motility, Rac activation and metastatic dissemination are mediated by protein kinase C epsilon. *PLoS ONE*, 7(2).
- Caponigro, F., French, R.C. & Kaye, S.B., 1997. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anti-Cancer Drugs*, 8, pp.26–33.
- Carreras Puigvert, J. et al., 2013a. Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells. *Science signaling*, 6(259), p.ra5.
- Carreras Puigvert, J. et al., 2013b. Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells.supplements. *Science signaling*, 6, p.ra5.
- Center, M., Rebecca, S. & Jemal, A., 2011. Global Cancer Facts and Figures 2nd Edition. *American cancer society*, 2(700), pp.1–58.
- Cetintas, V.B. et al., 2012. Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines. *Cell biology international*, 36(3), pp.261–5.
- Chaitanya, G.V., Steven, A.J. & Babu, P.P., 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell communication and signaling : CCS*, 8(1), p.31.
- Chang, H.W. et al., 2013. Knockdown of β -catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cellular signalling*, 25(4), pp.839–47.
- Chang, T.-C. et al., 1997. Effects of Transcription and Translation Inhibitors on a Human Gastric Carcinoma Cell Line. *Biochemical Pharmacology*, 53, pp.969–977.
- Chen, D. et al., 2012. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 11(3), pp.239–253.
- Chen, Q., Cao, H. & Zheng, P., 2014. LGR5 promotes the proliferation and tumor formation of cervical cancer cells through the Wnt / β -catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 5(19), pp.9092–9105.
- Chen, R.J. et al., 2010. Long-term nicotine exposure-induced chemoresistance is mediated by activation of Stat3 and downregulation of ERK1/2 via nAChR and beta-adrenoceptors in human bladder cancer cells. *Toxicological Sciences*, 115(1), pp.118–130.

- Chimienti, F. et al., 2001. Role of cellular zinc in programmed cell death: Temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 62, pp.51–62.
- Choi, D.L. et al., 2014. Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells by T-type calcium channel antagonist. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(6), pp.1565–70.
- Choi, S. et al., 2011. CGK733 does not inhibit ATM or ATR kinase activity in H460 human lung cancer cells. *DNA Repair*, 10(10), pp.1000–1001.
- Ciarimboli, G., 2012. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica*, 2012, p.473829.
- Clerk, A., 2001. Death by protein kinase C inhibitor: a stressful event. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33, pp.1773–1776.
- Conrad, D.M. et al., 2010. The Ca²⁺ channel blocker flunarizine induces caspase-10-dependent apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Apoptosis*, 15, pp.597–607.
- Crawford, L.J. a et al., 2006. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Research*, 66(12), pp.6379–6386.
- Crinò, L. et al., 1997. Cisplatin-gemcitabine combination in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(1), pp.297–303.
- Crompton, T. et al., 1992. Propidium iodide staining correlates with the extent of DNA degradation in isolated nuclei. *Biochemical and biophysical research communications*, 183(2), pp.532–537.
- Dalby, K.N. et al., 2010. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 6(3), pp.322–329.
- Davidoff, A.N. & Mendelow, B. V, 1992. UNEXPECTED CYTOKINETIC EFFECTS INDUCED BY PUROMYCIN INCLUDE A G2-ARREST, A METAPHASE-MITOTIC- ARREST, AND APOPTOSIS. *Leukemia Research*, 16(11), pp.1077–1085.
- Davidson, G. et al., 2005. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 438(7069), pp.867–72.
- Davies, S.P. et al., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*, 105, pp.95–105.

- Dehay, C. & Kennedy, H., 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6), pp.438–50.
- Demeule, M., Brossard, M. & Béliveau, R., 1999. Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter. *The American journal of physiology*, 277, pp.F832–F840.
- Dewson, G. et al., 2003. Conformational change and mitochondrial translocation of Bax accompany proteasome inhibitor-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemic cells. *Oncogene*, 22, pp.2643–2654.
- Diaz, R. et al., 2010. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC cancer*, 10, p.188.
- Ding, L. et al., 2002. Protein kinase C- ϵ promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), pp.35305–35313.
- Dirix, L., 2014. Discovery and exploitation of novel targets by approved drugs. *Journal of clinical oncology*, 32(8), pp.720–1.
- Doble, B.W. & Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, 116(7), pp.1175–1186.
- Donauer, J., 2010. Regulation von Zellzyklus und Apoptose durch Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.
- Droga-Mazovec, G. et al., 2008. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry*, 283(27), pp.19140–50.
- Edelman, M.J., 2005. The Potential Role of Bortezomib in Combination with Chemotherapy and Radiation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 7(October), pp.S64–S66.
- Efferth, T., 2007. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. *Planta medica*, 73(4), pp.299–309.
- Elledge, S.J., 1996. Cell Cycle Checkpoints : Preventing an Identity Crisis. *Science*, 274, pp.1664–1672.
- Espinoza, I. & Miele, L., 2013. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), pp.95–110.

- Fabre, C. et al., 2014. A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors : NFκB inhibition in malignant myeloblasts. *Cell Cycle*, 7(14), pp.2139–2145.
- Fei, B., Chi, A.L. & Weng, Y., 2013. Hydroxycamptothecin induces apoptosis and inhibits tumor growth in colon cancer by the downregulation of survivin and XIAP expression. *World journal of surgical oncology*, 11(1), p.120.
- Feske, S., 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), pp.690–702.
- Feun, L.G. et al., 1996. Phase II Trial of Mitoxantrone and Cisplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cance. *American Journal of Clinical Oncology*, 19(2), pp.190–192.
- Fishelson, Z., Attali, G. & Mevorach, D., 2001. Complement and apoptosis. *Molecular immunology*, 38(2-3), pp.207–19.
- Fletcher, J.I. et al., 2010. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature reviews. Cancer*, 10(2), pp.147–56.
- Florea, A.-M. & Büsselberg, D., 2011. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), pp.1351–71.
- Foghsgaard, L. et al., 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology*, 153(5), pp.999–1010.
- Fossella, F. et al., 2003. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: The TAX 326 Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 21(16), pp.3016–3024.
- Francescato, H.D.C. et al., 2007. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 22(8), pp.2138–48.
- Fresche De Souza, B. et al., 2014. Women with breast cancer taking chemotherapy : depression symptoms and treatment adherence. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 22(5), pp.866–873.
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), pp.1869–83.

- Galluzzi, L. et al., 2012. Prognostic Impact of Vitamin B6 Metabolism in Lung Cancer. *Cell Reports*, 2, pp.257–269.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, 5(5), p.e1257.
- Gao, Y. et al., 2013. Inhibition of cytoplasmic GSK-3 β increases cisplatin resistance through activation of Wnt/ β -catenin signaling in A549/DDP cells. *Cancer letters*, 336(1), pp.231–9.
- Gatzemeier, U. et al., 2000. Phase III comparative study of high-dose cisplatin versus a combination of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(19), pp.3390–3399.
- Germain, C.S. et al., 2010. Cisplatin Induces Cytotoxicity through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Activating Transcription Factor 3. *Neoplasia*, 12(7), pp.527–538.
- Golstein, P. & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), pp.37–43.
- Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E., 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer*, 2(1), pp.48–58.
- Gottesman, M.M. & Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry*, 62, pp.385–427.
- Graves, P.R. et al., 2000. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp.5600–5605.
- Greene, L.M. et al., 2013. Inhibition of late-stage autophagy synergistically enhances pyrrolo-1,5-benzoxazepine-6-induced apoptotic cell death in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 43(14), pp.927–935.
- Griner, E.M. & Kazanietz, M.G., 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(April), pp.281–294.
- Grollmann, A.P. & Walsh, M., 1967. MACROMOLECULES : Inhibitors of Protein Biosynthesis : II . Arthur P . Grollman and With the technical assistance of Maria Walsh of Protein. *The Journal of Biological Chemistry*.

- Guerriero, C.J. & Weisz, O. a, 2007. N-WASP inhibitor wiskostatin nonselectively perturbs membrane transport by decreasing cellular ATP levels. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292, pp.C1562–C1566.
- Guo, B. et al., 2014. Fangchinoline as a kinase inhibitor targets FAK and suppresses FAK-mediated signaling pathway in A549. *Journal of Drug Targeting*, 23(3), pp.266–274.
- Hagn, F. et al., 2010. BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), pp.3439–50.
- Han, C. et al., 2013. Novel hybrids of (phenylsulfonyl)furoxan and anilinopyrimidine as potent and selective epidermal growth factor receptor inhibitors for intervention of non-small-cell lung cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, pp.4738–4748.
- Han, K. et al., 2014. Cyclophosphamide-hydroxycamptothecin as second-line chemotherapy for advanced Ewing's sarcoma: Experience of a single institution. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 10(2), pp.e114–e117.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, pp.57–70.
- Hande, K.R., 1998. Clinical Oncology Update Etoposide : Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor. *European journal of cancer*, 34(10), pp.1514–1521.
- Harhaji-Trajkovic, L. et al., 2009. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9), pp.3644–3654.
- Haupt, S. et al., 2003. Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science*, 116, pp.4077–4085.
- He, B. et al., 2005. Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer*, 7(1), pp.54–60.
- Herrmann, H. & Wiche, G., 1987. Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), pp.1320–1325.
- Hiraishi, Y. et al., 2008. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Pathology and Oncology Research*, 14, pp.39–43.
- Hirst, D. & Robson, T., 2007. Targeting nitric oxide for cancer therapy. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 59, pp.3–13.

- Hoeflich, K.P. et al., 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, 406(July), pp.86–90.
- Holohan, C. et al., 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 13(10), pp.714–26.
- Hori, T. et al., 2008. Molecular mechanism of apoptosis and gene expressions in human lymphoma U937 cells treated with anisomycin. *Chemico-biological interactions*, 172(2), pp.125–40.
- Hu, J. & Friedman, E., 2010. Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes & Cancer*, 1, pp.803–811.
- Hu, W., 2014. Crenolanib , a PDGFR inhibitor , suppresses lung cancer cell proliferation and inhibits tumor growth in vivo. *OncoTargets and Therapy*, 7, pp.1761–1768.
- Huang, R. et al., 2006. Vincristine transcriptional regulation of efflux drug transporters in carcinoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 71, pp.1695–1704.
- Hyun, H.J. et al., 2001. Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(2), pp.460–465.
- Ilyas, M. et al., 1997. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), pp.10330–4.
- Ishihara, H. et al., 1989. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 159(3), pp.871–877.
- Ito, Y. et al., 2007. Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer? *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 14(2), pp.156–62.
- Janssens, V. & Goris, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*, 353, pp.417–439.
- Jefferies, K.C., Cipriano, D.J. & Forgac, M., 2008. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, pp.33–42.
- Jensen, P.B. et al., 1991. Antagonistic Effect of Aclarubicin on Daunorubicin-induced Cytotoxicity in Human Small Cell Lung Cancer Cells : Relationship to DNA Integrity and Topoisomerase II. *Cancer research*, 51, pp.5093–5099.

- Ji, Y. et al., 2012. β -blockers: A novel class of antitumor agents. *OncoTargets and Therapy*, 5, pp.391–401.
- Jiao, Y. et al., 2007. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta pharmacologica Sinica*, 28(7), pp.1045–56.
- Jin, N.S. et al., 2005. Cisplatin inactivation of caspases inhibits death ligand-induced cell death in vitro and fulminant liver damage in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 280, pp.10509–10515.
- Jomon, K. et al., 1972. A new Antibiotic, Ikarugamycin. *The Journal of Antibiotics*, 25(5), pp.271–280.
- Jones, A.W.E.G., 2011. *Altered Cellular Signalling and Metabolism in Cisplatin Cytotoxicity and Chemoresistance*.
- Kanda, T., Sullivan, K.F. & Wahl, G.M., 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current biology : CB*, 8(7), pp.377–85.
- Kao, C. et al., 2014. Bortezomib enhances cancer cell death by blocking the autophagic flux through stimulating ERK phosphorylation. *Cell death and disease*, 5, pp.1–12.
- Karasawa, T. et al., 2013. Identification of Cisplatin-Binding Proteins Using Agarose Conjugates of Platinum Compounds. *PLoS ONE*, 8(6), pp.1–10.
- Kim, L. & Kimmel, A.R., 2000. GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, pp.508–514.
- Köberle, B. et al., 2010. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et biophysica acta*, 1806(2), pp.172–182.
- Kornhuber, J. et al., 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): A Novel Pharmacological Group of Drugs with Broad Clinical Applications. *Cellular Physiology and Biochemistry*.
- Kornhuber, J. et al., 2011. Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PloS one*, 6(8), p.e23852.
- Korzeniewski, C. & Callewaert, D.M., 1983. An Enzyme-Release Assay for Natural. *Journal of Immunological Methods*, 64, pp.313–320.
- Krick, S. et al., 2002. Nitric oxide induces apoptosis by activating K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(1), pp.H184–93.

- Kroemer, G. et al., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.3–11.
- Kroemer, G. & Martin, S.J., 2005. Caspase-independent cell death. *Nature medicine*, 11(7), pp.725–30.
- Kulikov, R., Boehme, K.A. & Blattner, C., 2005. Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Phosphorylation of Mdm2 Regulates p53 Abundance. *Molecular and cellular biology*, 25(16), pp.7170–7180.
- Kurtze, I., Sonnemann, J. & Beck, J.F., 2011. KRAS-mutated non-small cell lung cancer cells are responsive to either co-treatment with erlotinib or gefitinib and histone deacetylase inhibitors or single treatment with lapatinib. *Oncology reports*, 25(4), pp.1021–9.
- Kuželová, K., Grebeňová, D. & Brodská, B., 2011. Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *Journal of cellular biochemistry*, 112(11), pp.3334–42.
- De la Luna, S. et al., 1988. Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene*, 62, pp.121–126.
- Lacour, S. et al., 2004. Cisplatin-Induced CD95 Redistribution into Membrane Lipid Rafts of HT29 Human Colon Cancer Cells Cisplatin-Induced CD95 Redistribution into Membrane Lipid Rafts of HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research*, 64, pp.3593–3598.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, pp.680–685.
- Lapenna, S. & Giordano, A., 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(7), pp.547–66.
- Lappano, R. & Maggiolini, M., 2011. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(1), pp.47–60.
- Latt, S. a. & Wohlleb, J.C., 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 52(4), pp.297–316.
- Lee, J.M. et al., 2008. The involvement of caspase-11 in TPEN-induced apoptosis. *FEBS Letters*, 582, pp.1871–1876.
- Lee, M.-J. et al., 2008. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese anti-leukemia medicine, inhibits Notch1 signaling. *Cancer letters*, 265(2), pp.215–25.

- Leone, M. et al., 1991. Flunarizine in migraine: a minireview. *Headache*, 31, pp.388–391.
- Li, C.-J. et al., 2012. Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo. *Cancer letters*, 319(2), pp.203–13.
- Li, C.J., Averboukh, L. & Pardee, A.B., 1993. a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of Action Different from Camptothecin ". *The Journal of biological chemistry*, 268(30), pp.22463–22468.
- Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, pp.95–99.
- Li, W. et al., 2013. The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1. *Experimental and toxicologic pathology*, 65(7-8), pp.1073–81.
- Liang, X. & Huang, Y., 2000. Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioscience reports*, 20(3), pp.129–38.
- Lieber, M. et al., 1976. A CONTINUOUS TUMOR-CELL LINE FROM A HUMAN LUNG CARCINOMA WITH PROPERTIES OF TYPE T1 ALVEOLAR. , 70, pp.62–70.
- Liu, H. et al., 2011. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(3), pp.753–760.
- Liu, Y.-Y. et al., 2010. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. *Molecular cancer*, 9, p.145.
- Lock, E. a et al., 2007. Caspase-dependent and -independent induction of phosphatidylserine externalization during apoptosis in human renal carcinoma Cak(1)-1 and A-498 cells. *Toxicology*, 229(1-2), pp.79–90.
- Luanpitpong, S. et al., 2011. Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 16(8), pp.769–82.
- Lubet, R.A. et al., 1997. CHEMOPREVENTIVE EFFICACY OF ANETHOLE TRITHIONE , N-ACETYL-L-CYSTEINE , MICONAZOLE AND PHENETHYLISOTHIOCYANATE IN THE DMBA-INDUCED RAT MAMMARY CANCER MODEL. *International Journal of Cancer*, 72, pp.95–101.

- Lundholm, L. et al., 2013. Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. *Cell death & disease*, 4, pp.1–9.
- Mackeigan, J.P., Murphy, L.O. & Blenis, J., 2005. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nature cell biology*, 7(6), pp.591–600.
- Mansouri, A. et al., 2003. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(21), pp.19245–56.
- Marklund, L., Henriksson, R. & Grankvist, K., 2001. Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *International Journal of Cancer*, 93, pp.577–583.
- Martin, R.M., Leonhardt, H. & Cardoso, M.C., 2005. DNA labeling in living cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 67(1), pp.45–52.
- Meijer, L. et al., 2003. GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chemistry & Biology*, 10, pp.1255–1266.
- Meijerman, I. et al., 1999. Induction of Apoptosis and Changes in Nuclear G-actin Are Mediated by Different Pathways : The Effect of Inhibitors of Protein and RNA Synthesis in Isolated Rat Hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 156, pp.46–55.
- Meng, G. et al., 2015. Combination treatment with triptolide and hydroxycamptothecin synergistically enhances apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells through PP2A-regulated ERK , p38 MAPKs and Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 46, pp.1007–1017.
- Middleton, G. et al., 2008. New treatment options for advanced pancreatic cancer. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2(5), pp.673–96.
- Mine, N. et al., 2011. CBP501-calmodulin binding contributes to sensitizing tumor cells to cisplatin and bleomycin. *Molecular cancer therapeutics*, 10(10), pp.1929–38.
- Miquel, J. et al., 2002. The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, pp.37–46.
- Missale, C. et al., 1998. Dopamine Receptors : From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 78(1), pp.189–225.

- Miura, G., 2014. Kinase regulation: Switching GSK3 off. *Nature Chemical Biology*, 10(5), pp.325–325.
- Montecucco, A. & Biamonti, G., 2007. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer letters*, 252(1), pp.9–18.
- Morad, S. a F. & Cabot, M.C., 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, 13(1), pp.51–65.
- Morin, P.J. et al., 1997. Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC. *Science*, 275, pp.1787–1790.
- Movsas, B. et al., 2013. Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oncology Cancer Network*, pp.1–40.
- Moy, B. et al., 2007. Lapatinib. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(June), pp.431–432.
- Mukherjea, D. et al., 2008. Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(49), pp.13056–13065.
- Murakami, T. et al., 2001. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *International Journal of Cancer*, 93, pp.869–874.
- Muscato, J.J. et al., 1995. Etoposide (VP-16) and cisplatin at maximum tolerated dose in non-small cell lung carcinoma: a Cancer and Leukemia Group B study. *Lung cancer*, 13, pp.285–294.
- Nachlas, M.M. et al., 1960. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Analytical Biochemistry*, 1, pp.317–326.
- Nakatani, T. et al., 2000. Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 125, pp.151–163.
- Noskovičová, N. et al., 2014. PDGF signaling in the lung – from lung development and disease to clinical studies. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, pp.1–50.
- Notarbartolo, M. et al., 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF- κ B activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letters*, 224, pp.53–65.

- Novak, B., Sible, J.C. & Tyson, J.J., 2002. Checkpoints in the Cell Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- O'Hayre, M., Degese, M.S. & Gutkind, J.S., 2014. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 27, pp.126–135.
- Oberlies, N.H. & Kroll, D.J., 2004. Invited Reviews: Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. *Journal of Natural Products*, 67(2), pp.129–135.
- Orrenius, S., Nicotera, P. & Zhivotovsky, B., 2011. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 119(1), pp.3–19.
- Ott, I. & Gust, R., 2006. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Pharmazie in unserer Zeit*, 35(2), pp.124–133.
- Overington, J.P. et al., 2006. How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery*, 5(December), pp.993–6.
- Pan, J., 2010. RNA polymerase - an important molecular target of triptolide in cancer cells. *Cancer letters*, 292(2), pp.149–52.
- Park, E.J. et al., 2014. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell death & disease*, 5(5), p.e1230.
- Pastwa, E. et al., 2014. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53, pp.423–431.
- Paul, I. et al., 2012. Acquired differential regulation of caspase-8 in cisplatin-resistant non-small-cell lung cancer. *Cell death & disease*, 3, p.e449.
- Pechmann, S., 2012. *Identifikation neuer funktioneller Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase*.
- Pereira, L. et al., 2013. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO molecular medicine*, 5(11), pp.1759–74.
- Perotti, D. & Paolo, N., 2014. Targeting A Tumor Suppressor To Suppress Tumor Growth: News and Views on Protein Phosphatase 2A (PP2A) as a Target for Anti-cancer Therapy. *Lancet Oncology*, 14(6), pp.229–238.

- Ping, Y.-H. et al., 2006. Anticancer effects of low-dose 10-hydroxycamptothecin in human colon cancer. *Oncology reports*, 15(5), pp.1273–9.
- Pinton, P. et al., 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27, pp.6407–6418.
- Polychronopoulos, P. et al., 2004. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *Journal of medicinal chemistry*, 47, pp.935–946.
- Popescu, R. et al., 2011. Ikarugamycin induces DNA damage, intracellular calcium increase, p38 MAP kinase activation and apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Mutation research*, 709-710, pp.60–66.
- Price, P.M., Safirstein, R.L. & Megyesi, J., 2004. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *American journal of physiology. Renal physiology*, 286(2), pp.F378–84.
- Proskuryakov, S.Y. & Gabai, V.L., 2010. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Current pharmaceutical design*, 16(1), pp.56–68.
- Qin, J.Z. et al., 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Research*, 65(14), pp.6282–6293.
- Ra, H. et al., 2009. Essential role of p53 in TPEN-induced neuronal apoptosis. *FEBS letters*, 583(9), pp.1516–1520.
- Ramsewak, R.S., DeWitt, D.L. & Nair, M.G., 2000. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytotherapy : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 7(4), pp.303–308.
- Rapp, E. et al., 1988. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer--report of a Canadian multicenter randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 6(4), pp.633–641.
- Rebbaa, A. et al., 2009. The anti-angiogenic activity of NSITC, a specific cathepsin L inhibitor. *Anticancer Research*, 29, pp.4473–4481.
- Reddy, B.S., 1996. Chemoprevention of Colon Cancer by Minor Dietary Constituents and. *Preventive Medicine*, 25, pp.48–50.
- Riedl, S.J. & Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), pp.405–13.

- Rigalli, J.P. et al., 2011. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. *Toxicology*, 285(1-2), pp.18–24.
- Rim, H.-K. et al., 2012. T-type Ca²⁺ channel blocker, KYS05047 induces G1 phase cell cycle arrest by decreasing intracellular Ca²⁺ levels in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(23), pp.7123–7126.
- Root, D.E. et al., 2003. Biological Mechanism Profiling Using an Annotated Compound Library. , 10, pp.881–892.
- Ross, H.J. et al., 1997. Phase I/II trial of low dose cyclosporin A with EP for advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 18(2), pp.189–98.
- Ruiz, M.L. et al., 2009. Induction of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) by spironolactone in rats. *European Journal of Pharmacology*, 623(1-3), pp.103–106.
- Sadot, E. et al., 2001. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Molecular and cellular biology*, 21(20), pp.6768–6781.
- Sallam, A. a et al., 2013. Indole diterpene alkaloids as novel inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. *European journal of medicinal chemistry*, 70, pp.594–606.
- Sánchez, A. et al., 1997. Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26, pp.935–943.
- Sancho-Martínez, S.M. et al., 2011. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicological Sciences*, 122(1), pp.73–85.
- Seshacharyulu, P. et al., 2014. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer letters*, 335(1), pp.9–18.
- Shen, D.Y. et al., 2013. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. *Cancer Science*, 104(10), pp.1303–1308.
- Sheridan, C. et al., 2010. An ERK-dependent pathway to Noxa expression regulates apoptosis by platinum-based chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, 29(49), pp.6428–6441.

- Shishodia, S., Chaturvedi, M.M. & Aggarwal, B.B., 2007. Role of curcumin in cancer therapy. *Current problems in cancer*, 31(4), pp.243–305.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), pp.7265–79.
- Singh, A. et al., 2010. The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. *British journal of pharmacology*, 160, pp.1464–75.
- Smaili, S.S. et al., 2001. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell death and differentiation*, 8(9), pp.909–20.
- So, H.S. et al., 2005. Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. *Hearing Research*, 204, pp.127–139.
- So, H.-S. et al., 2006. Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell death and differentiation*, 13(February), pp.1763–1775.
- Song, T.-Y. et al., 2010. Ergothioneine protects against neuronal injury induced by cisplatin both in vitro and in vivo. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(12), pp.3492–9.
- Srivastava, N. et al., 2009. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681, pp.180–188.
- Stewart, D.J., 2007. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63, pp.12–31.
- Stewart, D.J., 2014. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(1), p.djt356.
- Stiles, J.M. et al., 2013. Targeting of Beta Adrenergic Receptors Results in Therapeutic Efficacy against Models of Hemangioendothelioma and Angiosarcoma. *PLoS ONE*, 8(3).
- Sun, M. et al., 2009. XIAP associates with GSK3 and inhibits the promotion of intrinsic apoptotic signaling by GSK3. *Cellular signalling*, 21(12), pp.1857–65.
- Sung, B. et al., 2013. Capsazepine, a TRPV1 antagonist, sensitizes colorectal cancer cells to apoptosis by TRAIL through ROSg–JNK–CHOP-mediated upregulation of death receptors. *Free radical biology and medicine*, 53(10), pp.1977–1987.

- Susin, S. a et al., 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), pp.571–80.
- Szakács, G. et al., 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(3), pp.219–34.
- Tajeddine, N. et al., 2008. Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene*, 27(30), pp.4221–32.
- Takahashi-Yanaga, F., 2013. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochemical pharmacology*, 86(2), pp.191–9.
- Takahashi-Yanaga, F. & Kahn, M., 2010. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(12), pp.3153–62.
- Tamaoki, T., 1986. STAUROSPORINE, A POTENT INHIBITOR OF PHOSPHOLIPID/Ca⁺⁺DEPENDENT PROTEIN KINASE. , 135(2).
- Tang, Z. et al., 2012. In vivo toxicological evaluation of Anisomycin. *Toxicology letters*, 208(1), pp.1–11.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3), pp.231–41.
- Teng, Y. et al., 2010. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 392(3), pp.373–9.
- Thomas, G.M. et al., 1999. A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of Axin and ??-catenin. *FEBS Letters*, 458, pp.247–251.
- Thorne, C. a et al., 2014a. GSK-3 modulates cellular responses to a broad spectrum of kinase inhibitors. *Nature Chemical Biology*, 11(1), pp.58–63.
- Thorne, C. a et al., 2014b. GSK-3 modulates cellular responses to a broad spectrum of kinase inhibitors. *Nature chemical biology*, 11(1), pp.58–63.
- Toledo, L.I. et al., 2011. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nature structural & molecular biology*, 18(6), pp.721–7.
- Tolliday, N. et al., 2006. Small molecules, big players: the National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics. *Cancer research*, 66(18), pp.8935–42.

- Tonino, S.H. et al., 2011. ROS-mediated upregulation of Noxa overcomes chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 30(6), pp.701–13.
- Toullec, D. et al., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 266, pp.15771–15781.
- Vara, J.A. et al., 1986. Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. *Nucleic Acids Research*, 14(11), pp.4617–4624.
- De Vries, E.G.E., Gietema, J. a & de Jong, S., 2006. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(8), pp.2390–3.
- Wallace, D.J., 1989. The use of quinacrine (Atabrine) in rheumatic diseases: A reexamination. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 18(4), pp.282–296.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. & Baldwin, a S., 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science (New York, N.Y.)*, 274, pp.784–787.
- Wang, D. & Lippard, S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(4), pp.307–20.
- Wang, Y. et al., 2009. Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC cancer*, 9, p.174.
- Watcharasit, P. et al., 2002. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp.7951–5.
- Wernyj, R.P. & Morin, P.J., 2004. Molecular mechanisms of platinum resistance: Still searching for the Achilles' heel. *Drug Resistance Updates*, 7, pp.227–232.
- Wise, A., Gearing, K. & Rees, S., 2002. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discovery Today*, 7(4), pp.235–246.
- Woong, N. et al., 2007. Effects of Artemisin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head & Neck*, pp.335–340.
- Wu, J. et al., 2014. Cytoprotective effect of selective small-molecule caspase inhibitors against staurosporine-induced apoptosis. *Drug design, development and therapy*, 8, pp.583–600.

- Xia, Y. et al., 2013. Differential regulation of c-Jun protein plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(27), pp.19321–9.
- Xu, Q. et al., 2011. Artesunate inhibits growth and induces apoptosis in human osteosarcoma HOS cell line in vitro and in vivo. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(4), pp.247–55.
- Yamamoto, S. et al., 2001. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33, pp.1829–1848.
- Yang, H. et al., 2010. Regulation of calcium signaling in lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 2, pp.52–56.
- Yang, L.-J. et al., 2005. Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* elicits the cell death of human endothelial cells. *Journal of biomedical science*, 12, pp.347–361.
- Yang-hong, P. et al., 2011. Expression of dopamine receptor D2 in pulmonary carcinoma cells and effects of dopamine on the cell apoptosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 31(6), pp.975–978.
- Yarnell, L.M., 2012. *CELLULAR SIGNALS OF CISPLATIN OTOTOXICITY* by Lindsey M . Yarnell A Capstone Project submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of : Doctor of Audiology Washington University School of Medicine Program in Audiology and Communicatio.
- Ye, M.-X. et al., 2012. Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1 α and caspase-3 mechanisms. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 19(8-9), pp.779–87.
- Yu, S.P., Canzoniero, L.M.. & Choi, D.W., 2001. Ion homeostasis and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4), pp.405–411.
- Yu, S.P. & Choi, D.W., 2000. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), pp.9360–9362.
- Yuan, D., Liu, L. & Gu, D., 2007. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. *Molecular and cellular biochemistry*, 306(1-2), pp.171–8.

- Zaczek, A., Brandt, B. & Bielawski, K.P., 2005. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histology and Histopathology*, 20, pp.1005–1015.
- Zalcberg, J. et al., 1998. Phase II study of docetaxel and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16(5), pp.1948–1953.
- Zarogoulidis, K. et al., 2013. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Disease*, 5, pp.2–9.
- Zhan, Q. et al., 2014. FRAS1 knockdown reduces A549 cells migration and invasion through downregulation of FAK signaling. *International Journal of Experimental Medicine*, 7(7), pp.1692–1697.
- Zhang, Y. et al., 2011. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of human glioma cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 31(6), pp.773–778.
- Zhao, J. et al., 2012. Antitumor platinum(II) complexes containing platinum-based moieties of present platinum drugs and furoxan groups as nitric oxide donors: Synthesis, DNA interaction, and cytotoxicity. *Inorganic Chemistry*, 51(li), pp.10317–10324.
- Zhao, J. et al., 2014. Wortmannin enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells in vitro. , pp.2428–2434.
- Zhong, Y.-Y. et al., 2013. Triptolide avoids cisplatin resistance and induces apoptosis via the reactive oxygen species/nuclear factor- κ B pathway in SKOV3(PT) platinum-resistant human ovarian cancer cells. *Oncology letters*, 6(4), pp.1084–1092.

Internetseiten:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.drugs.com/>

<http://emedicine.medscape.com/article/2007153-overview>

<http://flexikon.doccheck.com/de/Spezial:Mainpage>

http://media.chemotherapyadvisor.com/documents/32/lungcancer_7894.pdf

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_REPORT_WORLD.pdf

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional>

<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/lung-cancer/treatment/chemotherapy/about-chemotherapy-for-lung-cancer>

<http://www.dr-gawlitza.de/kof.htm>

<http://www.nccn.org/patients/guidelines/nscl/>

6 Anhang

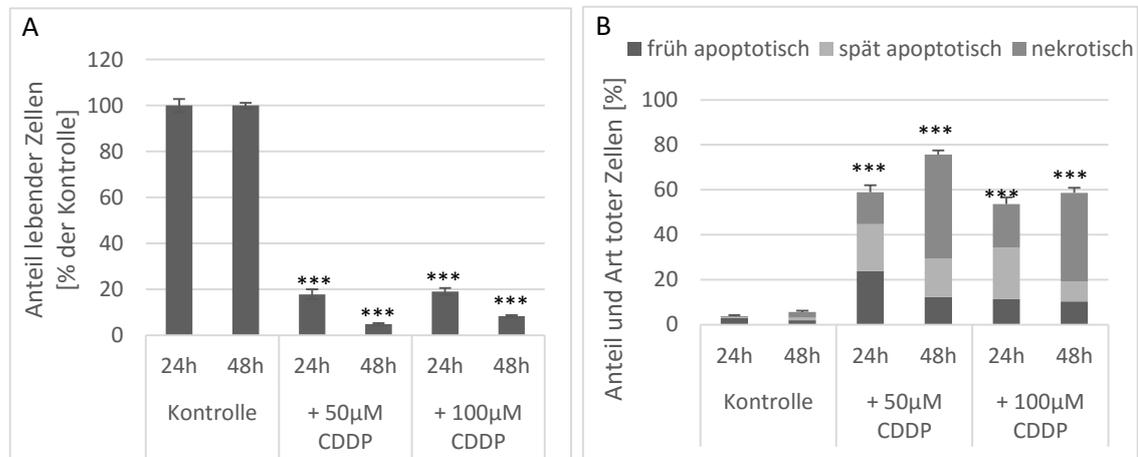
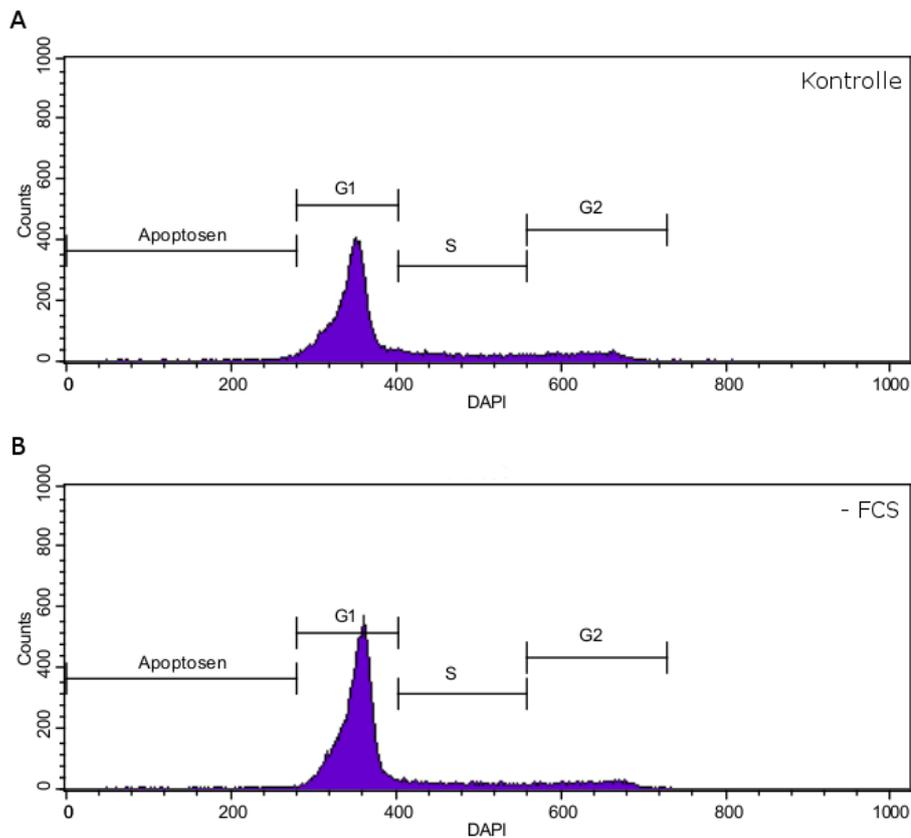
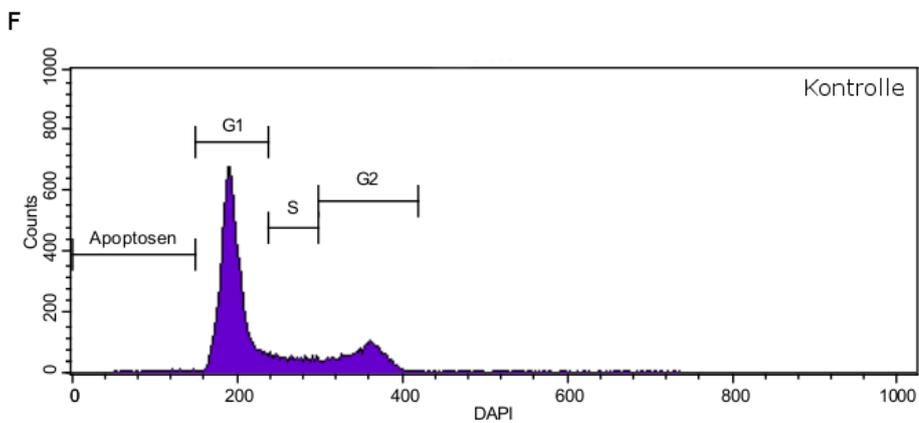
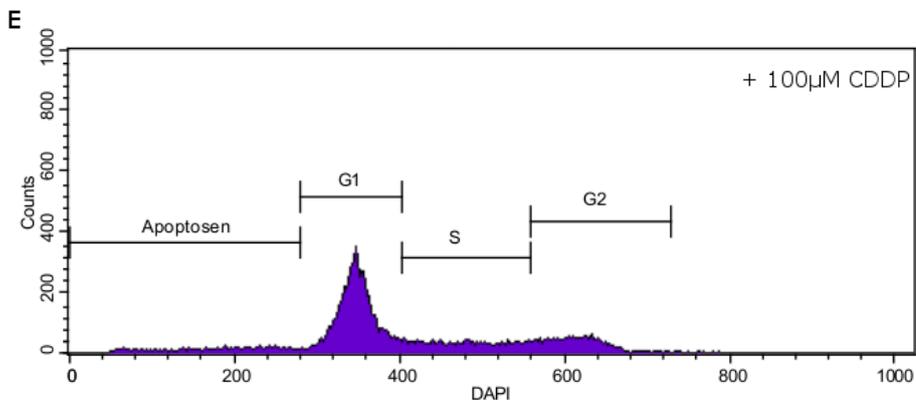
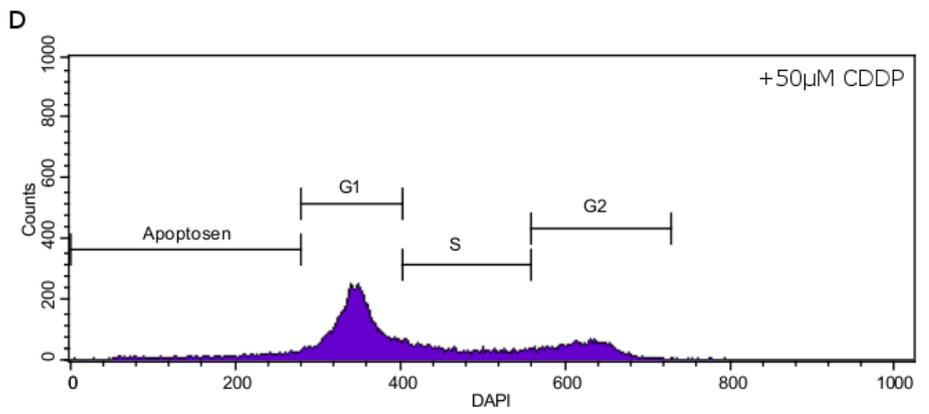
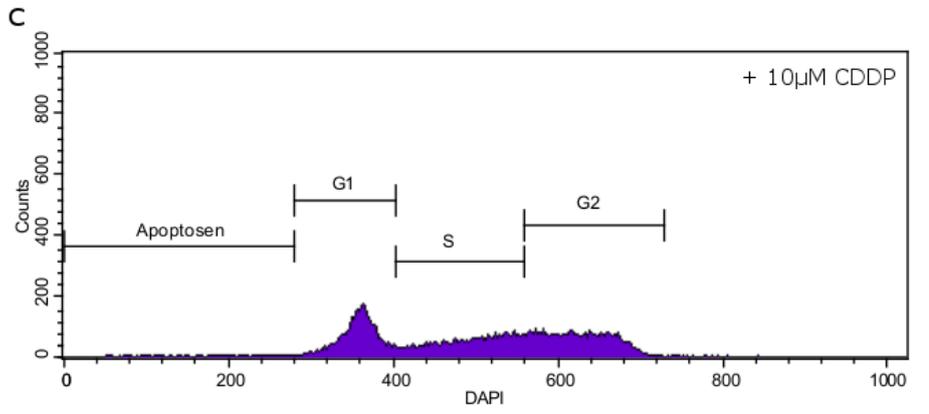
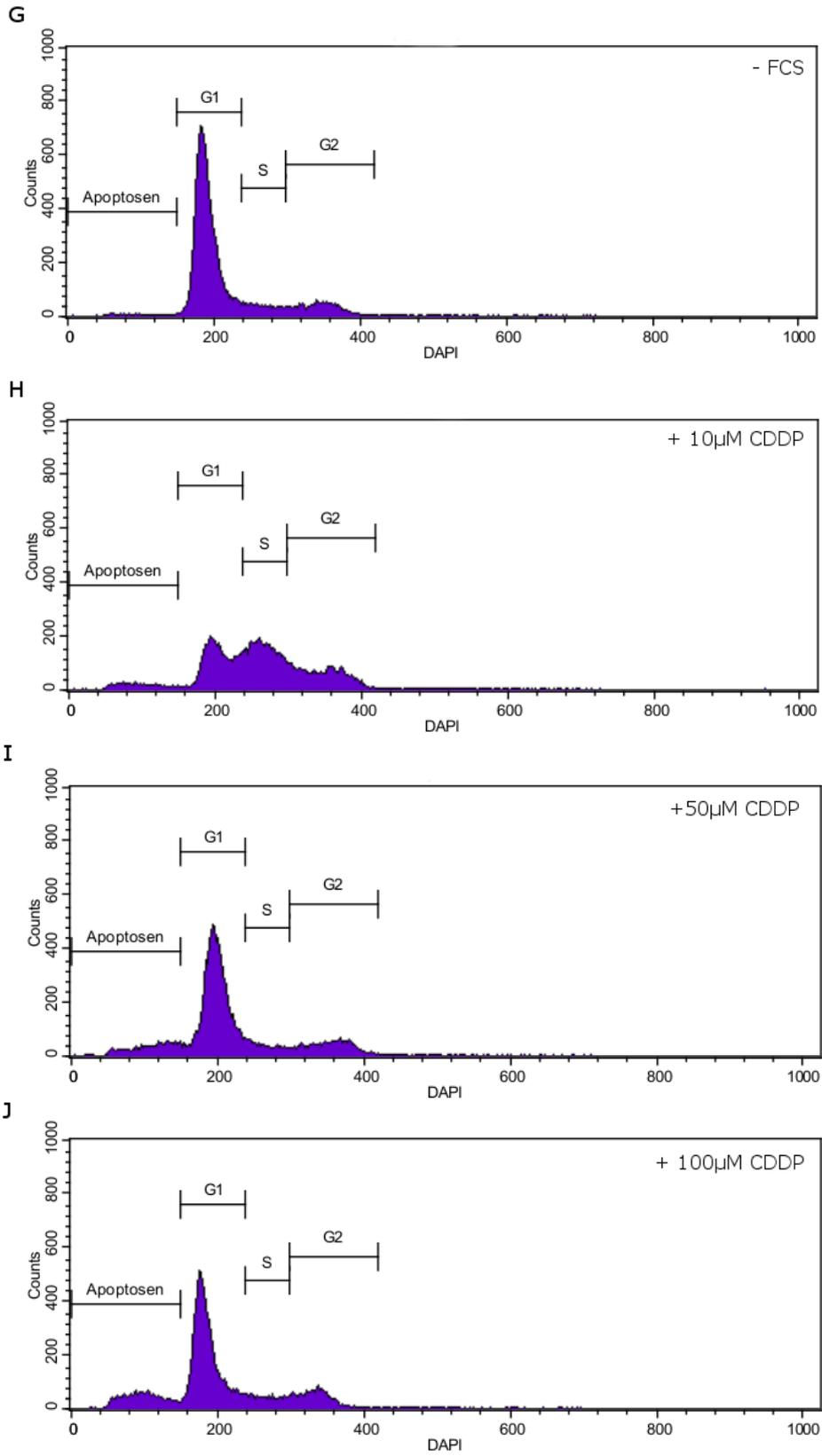


Abbildung 6-1: Apoptose-Induzierung in A549 H2B-GFP Zellen durch CDDP nach Auswertung über das Hoechstsignal. A549 H2B-GFP Zellen wurden mit 50 und 100 µM CDDP versetzt. Nach weiteren 24 bzw. 48h wurden nach Färbung der Zellen mit Hoechst und PI Mikroskopiebilder akquiriert und die Analyse mittels der Olympus ScanR Software durchgeführt. In (A) sind die repräsentativen Mittelwerte der relativen Lebendzellzahl dargestellt, während (B) den prozentualen Anteil der toten Zellen und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod zeigt. Die Mittelwerte entstammen einem von zwei unabhängigen Experimenten mit je 6 Replikaten (n=6) und sind mit der Standardabweichung aufgetragen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Signifikanzwerte beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle.







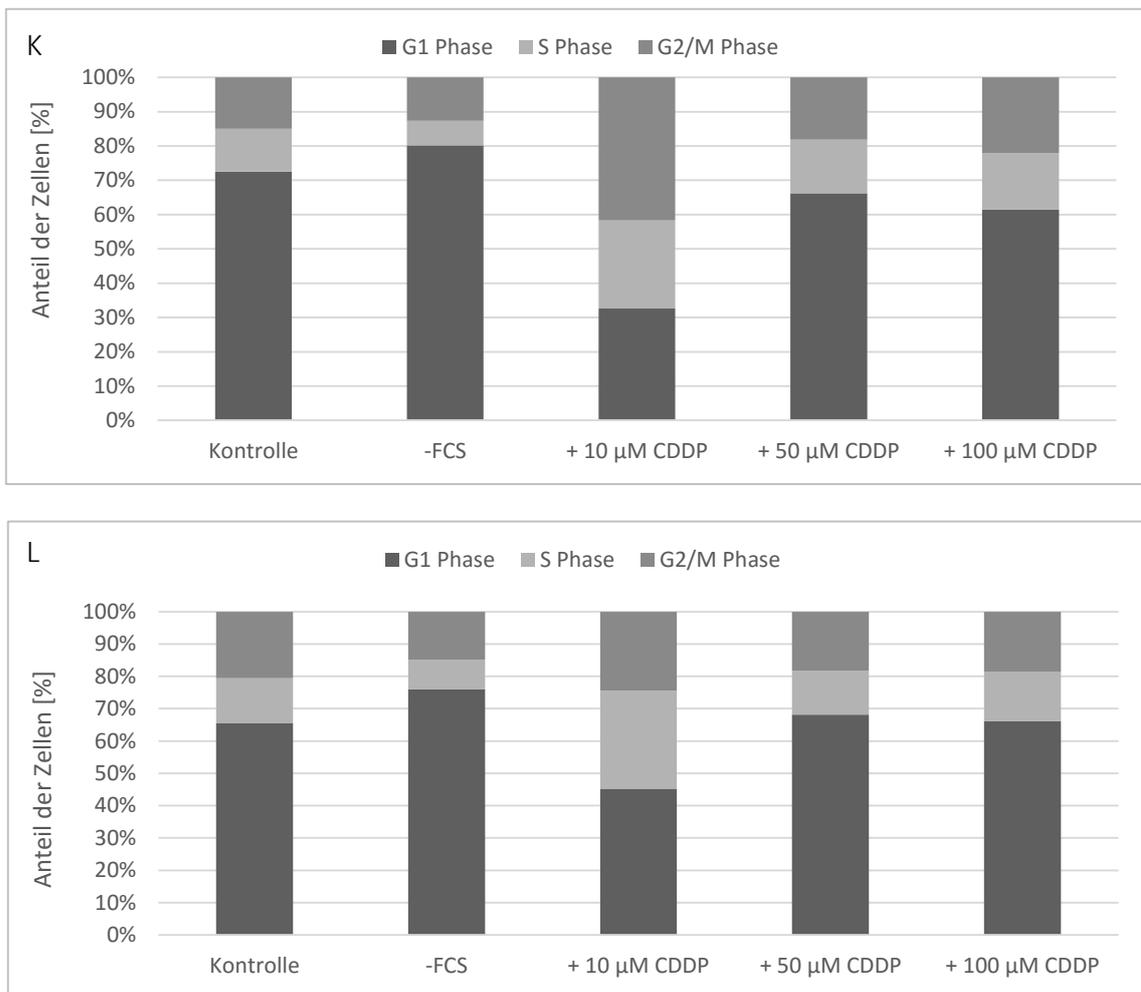


Abbildung 6-2: Zellzyklusprofile sowie die prozentuale Zellzyklusverteilung der A549 Zellen sowie der A549 H2B-GFP Zellen. (A-E) A549 Zellen bzw. (F-J) A549 H2B-GFP Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CDDP oder mit serumfreiem Medium (-FCS) versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese fixiert, mit DAPI angefärbt und der Durchflusszytometrie unterzogen. In der Abbildung ist die DAPI-Intensität gegen die Anzahl an Zellen aufgetragen, bezogen auf die verschiedenen Behandlungen. Auch sind die Einteilungen in Apoptosen, G1, S und G2/M Phase dargestellt. In (K) ist die prozentuale Zellzyklusverteilung in den A549 Zellen und in (L) in den A549 H2B-GFP Zellen aufgetragen ohne Berücksichtigung des Zelltodes, welcher in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-10 auch mitangegeben ist. Die Daten entstammen aus einem von zwei unabhängigen Experimenten und gehören zu den Daten in 3.1.3 und 3.2.3.

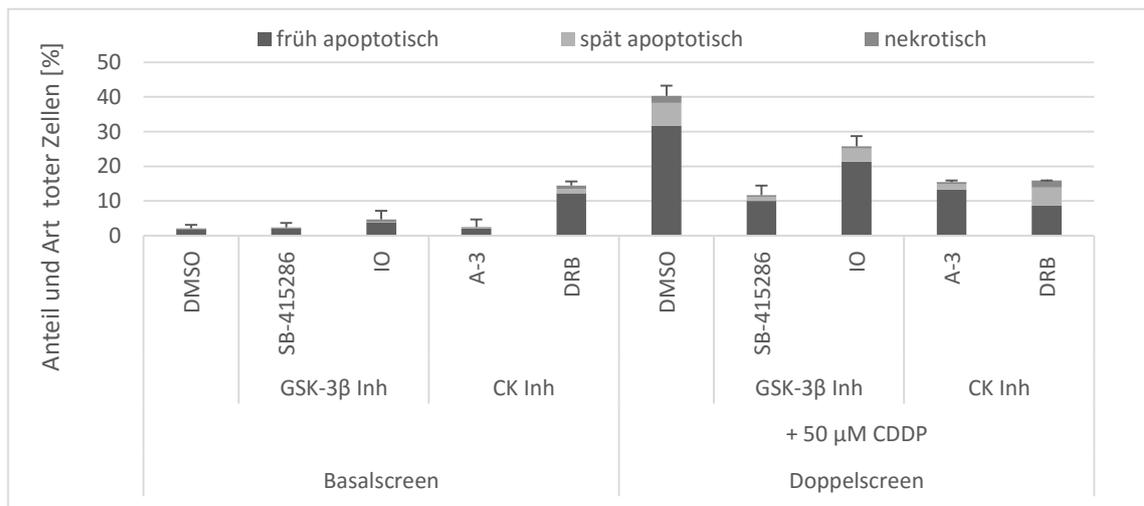


Abbildung 6-3: Die GSK-3 β -Inhibitoren SB-415286 und IO sowie die Casein Kinase Inhibitoren A-3 und DRB verringern den CDDP-induzierten Zelltod deutlich. A549 Zellen wurden mit SB-415286, IO, A-3 und DRB 30 Minuten lang inkubiert bevor sie für 24h mit 50 μ M CDDP versetzt wurden. Nach der Färbung erfolgten die Aufnahme der Bilder sowie deren Analyse mittels der ScanR Software. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Anteile der toten Zellen (im Bezug auf die Gesamtzellzahl der Kontrolle) und deren Einteilung in die beiden Apoptosestadien sowie in den nekrotischen Zelltod + MITTELABW der zwei Basalscreens bzw der zwei Doppelscreens mit jeweils 2 Replikaten (n=2). DRB 5,6-Dichlorobenzimidazole riboside

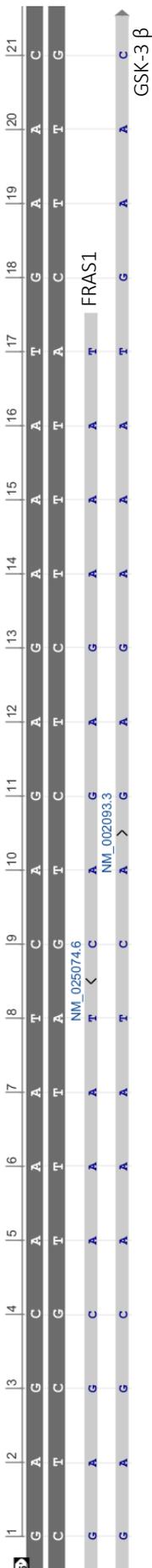


Abbildung 6-4: NCBI Blast der GSK-3 β siRNA Sequenz (dunkelgraue obere Sequenz) sowie die Basenabfolge der Gene, dessen mRNA sie theoretisch binden könnte. Bei GSK-3 β kommt es zur 100%igen Übereinstimmung, während nur 80% der siRNA-Sequenz mit der DNA Sequenz von FRAS1 übereinstimmen.