

MODULATION DER CISPLATIN-INDUZIERTEN APOPTOSE DURCH BIOAKTIVE KLEINE MOLEKÜLE

Dissertation von

Iris Hansjosten

an der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
Institut für Toxikologie und Genetik (ITG)

Erstgutachten: PD Dr. Carsten Weiss

Zweitgutachten: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

April 2017

Modulation der Cisplatin-induzierten Apoptose durch bioaktive kleine Moleküle

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Iris Hansjosten

aus

Karlsruhe

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: PD Dr. Carsten Weiss

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2017

Hiermit versichere ich, die Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben, sowie alles, das unverändert oder mit Änderungen den Arbeiten anderer entnommen wurde, kenntlich gemacht zu haben. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, sowie zur Archivierung der Primärdaten des KIT wurden beachtet. Ich erkläre ebenfalls, dass außerhalb der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften keine weiteren Promotionsverfahren anhängig sind oder erfolglos beendet wurden.

Karlsruhe, 14.03.2017

Iris Hansjosten

ZUSAMMENFASSUNG

Cisplatin gehört zu den weltweit am häufigsten eingesetzten Zytostatika und wird in der Behandlung einer Vielzahl verschiedener Tumore angewandt, wie beispielsweise bei Lungen-, Cervix-, Ovarial-, Testis-, Gallen- und Kopf-Hals-Karzinomen. Die zytotoxische Wirkung entfaltet es über die Bindung an die DNA, was im Rahmen einer DNA-Schadensantwort schlussendlich zur Apoptose führt. Trotz eines anfänglich hohen Therapieerfolgs wird der Einsatz von Cisplatin jedoch stark durch die Entstehung von Resistenzen der Tumorzellen limitiert. Ein umfassendes Verständnis der molekularen Grundlagen, die der Apoptose-induzierenden Wirkung des Cisplatins zugrunde liegen oder sie beeinflussen können, ist daher von großer klinischer Relevanz. Des Weiteren kann die Wirksamkeit von Cisplatin auch durch eine Interaktion mit Medikamenten bei Co-Medikation positiv oder negativ beeinflusst werden. Die Identifizierung derartiger Wechselwirkungen kann somit ebenfalls zur Verbesserung der Tumorthherapie beitragen.

Um Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose und Arzneimittel-Interaktionen zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Bibliothek von 1120 bioaktiven Substanzen mit bekannten Zielstrukturen und FDA-zugelassenen Medikamenten in einem Fluoreszenzmikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Verfahren auf ihren Effekt auf die Cisplatin-induzierte Apoptose analysiert. Die Lungen- und Cervixkarzinomzelllinien A549 und HeLa wurden hierzu mit den Substanzen vorinkubiert, gefolgt von einer Cisplatin-Behandlung um Apoptose zu induzieren. Nach der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der Zellen 24 Stunden später erfolgte softwaregestützt die Quantifizierung der induzierten Apoptose auf Einzelzellebene.

Die Ergebnisse weisen auf klinisch relevante Arzneimittel-Interaktionen mit Cisplatin hin: Unter den Substanzen, die die Wirksamkeit von Cisplatin verminderten, befanden sich FDA-zugelassene Medikamente, deren Co-Medikation im Rahmen einer Cisplatin-Therapie sehr wahrscheinlich ist. Dazu gehören das Analgetikum Aspirin, die Antidepressiva Fluoxetin und Paroxetin, sowie das Antiemetikum Promethazin. Des Weiteren konnte eine Verstärkung der Wirksamkeit von Cisplatin durch das Antidiarrhoikum Loperamid, sowie das Malaria-Medikament Artesunat identifiziert werden. Diese sind somit für *drug repositioning*-Ansätze geeignet und könnten in Kombination

mit Cisplatin zu einer Steigerung des Therapieerfolgs beitragen. Um neben der Apoptose-modulatorischen Wirkung einzelner Medikamente auch zelluläre Signalwege zu identifizieren, die die Apoptose-Initiation beeinflussen können, wurden die Substanzen, die die Cisplatin-induzierte Apoptose veränderten anhand ihrer biologischen Zielstrukturen gruppiert. Zu diesen Modulatoren gehören die funktionellen Gruppen der Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und nukleären Rezeptoren, Kinase- und Enzym-Inhibitoren, sowie Substanzen, die die zelluläre Ionenhomeostase beeinflussen, wie Ionenkanal-Inhibitoren. Innerhalb dieser breiten Gruppen wurde anschließend eine funktionelle Anreicherungsanalyse durchgeführt um einzelne Zielproteine zu identifizieren. Die Ergebnisse legen eine Rolle des Dopamin- und G-Protein-gekoppelten Estrogen-Rezeptors (GPER) in der Cisplatin-induzierten Apoptose nahe. Die pro-apoptotische Funktion des GPER wurde in weiterführenden Untersuchungen als Stimulus-abhängig für Cisplatin, jedoch nicht für weitere Apoptose-Stimuli wie Etoposid oder Staurosporin, bestätigt. Durch die Analyse von Patientendaten konnte darüber hinaus eine prognostisch günstige Rolle der GPER-Expression in Cervixkarzinomen für die Überlebenschancen Cisplatin-behandelter Patienten festgestellt werden.

Neben der Modulation der Cisplatin-induzierten Apoptoserate wurde auch die Beeinflussung der apoptotischen Morphologie durch Substanzen der Bibliothek analysiert. Die kontrollierte Abfolge morphologischer Veränderungen apoptotischer Zellen ist von großer Bedeutung für die geordnete Apoptose-Exekution und Voraussetzung für die Vermeidung von Entzündungsreaktionen *in vivo*. Die Ergebnisse bestätigen eine wichtige Rolle der Kalium- und Calciumionen-Homeostase bei der Regulation der apoptotischen Morphologie, wie z.B. dem Erhalt der Zellmembranintegrität oder dem Volumenverlust apoptotischer Zellen. Ferner wurde durch die Einzelzellanalyse apoptotischer Zellen deutlich, dass die Apoptose-Exekution eine Heterogenität aufweist, die sich auch in der unterschiedlichen Ausprägung der apoptotischen Morphologie widerspiegelt und deren Aufklärung weiterer Studien bedarf.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse zu Mechanismen, die an der Regulation Cisplatin-induzierter Apoptose beteiligt sind. Darüber hinaus stellt das verwendete System ein *in vitro*-Modell zur Identifizierung pharmakologisch relevanter Arzneimittel-Interaktionen dar. Ebenso bietet es die Möglichkeit der Einzelzellanalyse, über die molekulare Mechanismen entschlüsselt werden können, die der heterogenen Reaktion einer Gesamtzellpopulation auf zytotoxische Stimuli zugrunde liegen.

ABSTRACT

Cisplatin is one of the most widely used anticancer drugs to treat a variety of tumors, like lung, cervix, ovary, testis, bladder or head and neck carcinomas. Cisplatin binds to DNA, which in turn triggers a DNA damage response and ultimately apoptosis. However, a drawback is the emerging resistance of cancer cells to Cisplatin treatment, that frequently occurs despite an initial high therapeutic response. Therefore, detailed insights into the molecular mechanisms that are underlying Cisplatin-induced apoptosis or that can modulate cellular responses to Cisplatin are of high clinical relevance. Furthermore, the therapeutic response to Cisplatin might also be affected by possible interactions of co-administered drugs negatively or positively. Thus, the identification of such interactions could also contribute to improve cancer therapy.

In order to identify modulators of Cisplatin-induced apoptosis, as well as drug-drug interactions, a chemical biology and high-throughput fluorescence microscopy imaging approach is applied to screen a library of 1120 bioactive compounds with known targets and FDA-approved drugs for effects on Cisplatin-induced apoptosis. The lung and cervical cancer cell lines A549 and HeLa were first incubated with the compounds or drugs, followed by Cisplatin treatment to induce apoptosis. 24 hours later the cells were imaged and induced apoptosis was subsequently quantified at the single cell level by image analysis software.

The findings indicate pharmacologically relevant drug interactions with Cisplatin: among the compounds that decreased Cisplatin efficacy, several FDA-approved drugs were identified that are likely to be co-administered with Cisplatin in cancer therapy. These include the analgesic Aspirin, the antidepressants Fluoxetine and Paroxetine, as well as the antiemetic Promethazine. Moreover, an increase in Cisplatin efficacy was observed by the antidiarrheal Loperamide, as well as the antimalarial drug Artesunate. Thus, they might be suitable for drug repositioning approaches and could improve the therapeutic efficacy in combination with Cisplatin. In addition to the apoptosis-modulatory effects of individual drugs, cellular signalling pathways were investigated that can affect initiation of apoptosis by Cisplatin. The compounds that showed an effect on Cisplatin-induced apoptosis were clustered based on their biological target. These modulators comprise functional groups of ligands of G protein-coupled receptors and nuclear receptors, kinase and enzyme

inhibitors as well as compounds affecting cellular ion homeostasis, like ion channel inhibitors. A functional enrichment analysis was performed within these wide functional groups to subsequently identify specific targets. The results of this analysis suggest a role of the dopamine receptor and G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in Cisplatin-induced apoptosis. The pro-apoptotic role of the GPER was confirmed to be stimulus-specific for Cisplatin, but not for Etoposide or Staurosporine, by follow-up investigations. Furthermore, the analysis of patient data showed a beneficial prognostic role of GPER expression levels in cervical carcinomas with regard to the survival probability of patients that underwent Cisplatin therapy.

Besides the modulatory effects of compounds of the biochemical library on the apoptosis rate induced by Cisplatin, their influence on the morphology of apoptotic cells was investigated, too. Apoptotic cells undergo a controlled sequence of morphological changes that are highly important for an orderly executed apoptosis and prerequisite for preventing cell death-associated inflammatory conditions *in vivo*. The findings confirm an important role of potassium and calcium ion homeostasis in regulating aspects of the apoptotic morphology, like the maintenance of cell membrane integrity or the volume decrease of apoptotic cells. In addition, single cell analysis of apoptotic cells revealed a heterogeneity in the execution of apoptosis reflected in different morphological characteristics which need to be elucidated in the future.

Overall, the findings provide new insights into mechanisms involved in the regulation of Cisplatin-induced apoptosis, as well as their potential clinical relevance. Furthermore, the applied screening approach represents an *in vitro* model to identify pharmacologically relevant drug-drug interactions. Moreover, it enables single cell analysis, which is required to study and elucidate the molecular mechanisms that underlie a heterogeneous reaction of a cell population to cytotoxic stimuli.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Apoptose	1
1.1.1 Regulation der Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg	3
1.1.2 Regulation der apoptotischen Morphologie der Apoptose-Exekution	4
1.2 Weitere Formen des Zelltods	7
1.2.1 Nekrose und Nekroptose	7
1.2.2 Zelltod mit Autophagie	7
1.3 Cisplatin	8
1.3.1 Metabolismus von Cisplatin	9
1.3.2 Zytotoxische Wirkung von Cisplatin	9
1.4 Die Bedeutung von Arzneimittel-Interaktionen für die Tumorthherapie	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Zellkultur	15
2.1.1 Kultivierung der Zellen	15
2.1.2 Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellen	16
2.2 Behandlung von Zellen	16
2.2.1 Behandlung von Zellen mit Proteininhibitoren und Apoptose-Stimuli	16
2.2.2 Screen der bioaktiven Substanz-Bibliothek	16
2.3 Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie	17
2.3.1 Analyse der Gesamtzellzahl, sowie verschiedener Zelltodstadien	17
2.3.2 Analyse des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials	19
2.3.3 Zeitverlaufsanalysen	19

2.3.4	Analyse γ -H2AX-positiver Zellkerne	20
2.3.5	Bildanalyse	20
2.4	Proteinanalytik.....	22
2.5	Analyse der Genexpression von Krebspatienten mit Daten aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas	23
2.6	Datenanalyse und Statistik	24
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
3.1	Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen	25
3.1.1	Cisplatin wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose.....	26
3.1.2	Die Cisplatin-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig.....	31
3.1.3	Der Verlust der Plasmamembranintegrität nach Cisplatin-Behandlung erfolgt im späten Verlauf der Apoptose-Exekution	37
3.1.4	Cisplatin führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials	41
3.1.5	Die Einzelzell-Analyse zeigt zwei verschiedene Phänotypen des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials	43
3.1.6	Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in Abhängigkeit der Caspase-Aktivierung.....	48
3.1.7	Cisplatin induziert verschiedene morphologische Sub-Phänotypen der Apoptose auf Einzelzellebene	53
3.1.8	Interaktion apoptotischer Zellen.....	58
3.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung Cisplatin-induzierter Apoptose	61
3.2	Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose	63
3.2.1	Die Quantifizierung phänotypischer Apoptose-Parameter generiert ein apoptotisches Profil	64
3.2.2	Veränderung des phänotypischen Apoptose-Profiles durch Stoffe der bioaktiven Substanz-Bibliothek.....	70
3.2.3	Modulation des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Lungen- und Cervixkarzinomzellen	79
3.2.4	Identifizierung von Zytostatika-Interaktionen, die die zytotoxische Wirkung von Cisplatin beeinflussen.....	85
3.2.5	Identifizierung von pharmakologisch relevanten Arzneimittel-Interaktionen mit Cisplatin	89
3.2.6	Funktionelle Zielstrukturen-Analyse	94
3.2.7	Verifizierung der Rolle des GPER in Cisplatin-induzierter Apoptose	97
4	ABSCHLIESSENDE DISKUSSION	107
4.1	Die Charakterisierung der Cisplatin-induzierten Apoptose auf Einzelzellebene zeigt die Heterogenität zellulärer Reaktionen	108
4.2	Der Screen einer bioaktiven Substanzbibliothek identifiziert Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose	110

LITERATUR	115
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
A. ANHANG	129
A.1 Material und Methoden.....	129
A.2 Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen	132
A.3 Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose.....	137
PUBLIKATIONSLISTE	143
LEBENS LAUF	145
DANKSAGUNG	147

1 EINLEITUNG

Zelltod ist ein wesentlicher Bestandteil der Existenz eines multizellulären Organismus und kann unter verschiedenen Umständen und mit unterschiedlichen Konsequenzen auftreten. So trägt Zelltod unter physiologischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der natürlichen Gewebhomeostase bei, kann aber auch in Folge toxischer Substanzen oder der Verletzung von Gewebe auftreten. Für jede einzelne Zelle stellt der Zelltod den Endpunkt ihrer Existenz dar. Auf Ebene des multizellulären Gesamtorganismus ist jedoch von großer Bedeutung, wie eine Zelle stirbt, da sich daraus unterschiedliche Konsequenzen ergeben, wie beispielsweise eine Zelltod-induzierte Entzündungsreaktion. Es existieren verschiedene Zelltodformen, die anhand unterschiedlicher Kriterien klassifiziert werden können. Über morphologische Merkmale können Apoptose, Nekrose und Zelltod mit autophagischen Prozessen unterschieden werden. Des Weiteren können biochemische Kriterien, wie die Beteiligung bestimmter Proteasen und Nukleasen, zur Unterscheidung herangezogen werden. Auch anhand funktioneller Aspekte kann eine Einteilung vorgenommen werden, wie beispielsweise das Auftreten programmierten oder zufälligen Zelltods und ob dieser unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen erfolgt (Galluzzi et al., 2015; Kroemer et al., 2009).

1.1 Apoptose

Bei Apoptose handelt es sich um eine regulierte Form des Zelltods, d.h. sie unterliegt genetischer Kontrolle und findet als aktiver Prozess unter Energieverbrauch statt. Daher wird Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Die zellulären Komponenten werden dabei enzymatisch im Zellinneren abgebaut, wobei die Zellmembran bis zuletzt intakt bleibt und somit die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile verhindert. Dadurch wird die Schädigung umliegender Gewebe vermieden, weshalb Apoptose eine nicht entzündliche Form des Zelltods darstellt (Elmore, 2007; Taylor et al., 2008). Aufgrund dieser Tatsache ist Apoptose von großer physiologischer Bedeutung, da sie es ermöglicht kontrolliert Zellen zu eliminieren. In multizellulären Organismen stellt sie den

Gegenspieler der Zellproliferation dar und ist somit unerlässlich um die Gewebehomöostase aufrecht zu erhalten. Insbesondere die apoptotische Eliminierung gealterter und geschädigter Zellen, die z.B. ein irreparables Maß an DNA-Schäden aufweisen, ist von großer Relevanz. Werden diese Zellen nicht entfernt, stellen sie anderenfalls ein hohes Risiko für den Gesamtorganismus dar, da es durch DNA-Schäden zu Mutationen und darüber zur Entartung einer Zelle kommen kann. Apoptose spielt jedoch nicht nur im adulten Organismus eine essentielle Rolle, sondern auch bereits während der Embryonalentwicklung. Ein Beispiel für die organ- und gewebeformende Rolle der Apoptose während der Entwicklung eines multizellulären Organismus ist die Separation der Finger durch Eliminierung der Zellen im Interdigitalbereich über Apoptose. Eine Störung oder Dysfunktion in der Regulation der Apoptose hat somit fatale Folgen für einen Organismus und ist maßgeblich an der Entstehung von Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs, beteiligt (Elmore, 2007; Suzanne & Steller, 2013).

Das sichtbare Charakteristikum der Apoptose ist die apoptotische Morphologie einer Zelle (**Abbildung 1.1**). Dazu gehören zu Beginn der Apoptose-Exekution das Abrunden der Zelle und die Bildung von Membran-Ausstülpungen, das sogenannte Membran-Blebbing. Die DNA kondensiert, der Zellkern schrumpft und wird im weiteren Apoptose-Verlauf fragmentiert. Die apoptotische Zelle verliert an Volumen und wird schlussendlich in membranumschlossene Vesikel, die Apoptotic Bodies, aufgelöst. Zuletzt erfolgt die Aufnahme der Apoptotic Bodies durch Phagozyten, wodurch die apoptotischen Überreste einer Zelle beseitigt werden (Elmore, 2007; Häcker, 2000; Taylor et al., 2008). Diese bestimmte Morphologie war die Grundlage für die Entdeckung der Apoptose und ihre Definition 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie (Kerr et al., 1972) und ist bis heute ein wichtiges Merkmal um apoptotischen Zelltod von anderen Zelltodformen zu unterscheiden.

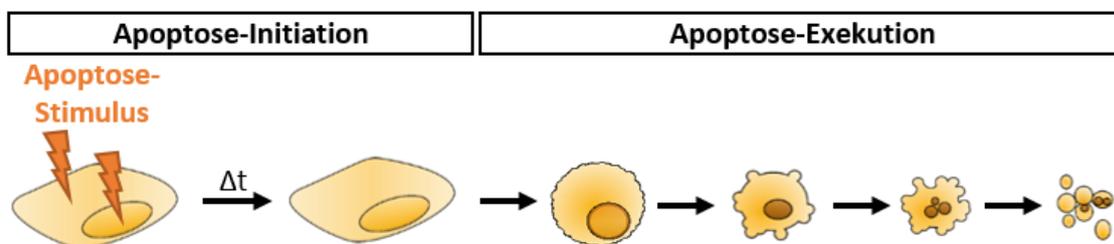


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der zellulären Morphologie während der apoptotischen Exekutionsphase. Nach Apoptose-Initiation durch einen Apoptose-Stimulus ist die apoptotische Zelle zu Beginn der Apoptose-Exekution gekennzeichnet durch Abrunden der Zelle und Membran-Blebbing, sowie die Kondensation des Zellkerns. Im weiteren Verlauf kommt es zur Fragmentierung des Zellkerns und zum Volumenverlust der Zelle. Im letzten Schritt wird die apoptotische Zelle in Apoptotic Bodies aufgelöst.

1.1.1 Regulation der Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg

Apoptose kann in eine Initiations- und eine Exekutionsphase unterteilt werden. Apoptose-Initiatoren sind vielfältig und können exogene Stoffe wie Gentoxine oder UV- und ionisierende Strahlung sein, die intrazellulär wirken und zu DNA-Schädigung und oxidativem Stress führen können. Aber auch endogene Faktoren, wie beispielsweise Zytokine, können Apoptose auslösen, indem sie an sogenannte Todesrezeptoren der Zellmembran binden. Während der Initiationsphase findet die von einem Apoptose-Stimulus ausgelöste Signaltransduktion und genetische Regulation statt (Renehan et al., 2001). Dabei kann es zur Aktivierung pro- und anti-apoptotischer Signalwege kommen, deren Verhältnis zueinander schlussendlich darüber entscheidet, ob in einer Zelle die Apoptose-Exekution eingeleitet wird. Die beteiligten Mechanismen sind dabei Stimulus-abhängig, sehr komplex und bisher nicht vollständig geklärt. Es können dabei sowohl nukleäre, wie auch zytoplasmatische Komponenten beteiligt sein, wie beispielsweise im Rahmen UV-induzierter Apoptose. Die UV-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die pro- oder anti-apoptotisch wirken können, erfolgt einerseits über nukleäre Faktoren der zellulären Antwort auf die DNA-Schädigung. Andererseits sind ebenfalls zytoplasmatische Komponenten, wie Rezeptortyrosinkinasen, an der Signaltransduktion beteiligt (Herrlich et al., 2008). Trotz dieser anfänglich großen Vielfalt an Signalwegen, die durch einen apoptotischen Stimulus aktiviert werden können, münden diese bei Überwiegen pro-apoptotischer Signale schlussendlich in der Aktivierung einer speziellen Gruppe von Proteasen, den Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*). Caspasen stellen die Hauptregulatoren der apoptotischen Exekutionsphase dar, da sie über ihre proteolytische Aktivität maßgeblich zum apoptotischen Abbau einer Zelle beitragen. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Initiator-Caspasen, wie Caspase-8 oder -9, und Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, -6 und -7. Caspasen liegen als inaktive Zymogene in einer pro-Form vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen erfolgt dabei durch die Initiator-Caspasen. Initiator-Caspasen selbst werden in Abhängigkeit des apoptotischen Stimulus über zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert: den intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalweg (Elmore, 2007; Prokhorova et al., 2015; Taylor et al., 2008).

Der extrinsische Signalweg wird durch Aktivierung von membranständigen Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie durch Ligandenbindung (z.B. TNF, FasL) und die resultierende Rezeptortrimerisierung aktiviert. Über die intrazelluläre *death domain* (DD) des Rezeptors wird mittels Adapterproteinen pro-Caspase-8 rekrutiert. Die Bildung dieses *death-inducing signaling complex* (DISC) führt dabei zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8. Neben der Aktivierung von Effektor-Caspasen, kann Caspase-8 über die Spaltung des pro-apoptotischen Bcl-2

(*B-cell lymphoma 2*)-Proteins Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) auch zur Aktivierung des intrinsischen Signalwegs führen (Elmore, 2007; Taylor et al., 2008).

Apoptotische Stimuli, deren Wirkung an intrazellulären Zielstrukturen ansetzt, induzieren Apoptose klassischerweise über den intrinsischen Signalweg. Dazu gehören insbesondere DNA-Schäden und ROS (*reactive oxygen species*). Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilisation*) ist dabei das Schlüsselereignis, da sie zur Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma führt. Zu diesen Proteinen gehört Cytochrom c, das über die Rekrutierung von APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) und pro-Caspase-9, das sogenannte Apoptosom bildet, wodurch es zur Aktivierung von Caspase-9 kommt. Weitere Proteine, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden, wie Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) und HtrA2 (*high temperature requirement protein A2*), tragen ebenfalls zur Caspase-Aktivierung bei, indem sie die anti-apoptotische Wirkung der Caspase-Inhibitoren IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) hemmen. Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wird maßgeblich vom Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine reguliert. Bei einem Überwiegen der pro-apoptotischen Signale bilden die Bcl-2-Proteine Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) und Bax (*Bcl-2-associated X protein*) Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, die die Permeabilisierung herbeiführen. Die Regulation der Bcl-2-Proteine und ihre Verknüpfung zu den vorgeschalteten Signalen der apoptotischen Initiationsphase ist bisher nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch eine Regulation über das Tumorsuppressor-Protein p53 bekannt, das in Folge von DNA-Schädigung aktiviert wird. Des Weiteren können auch MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) regulatorischen Einfluss auf Bcl-2-Proteine haben. Mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran geht auch der Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials einher, das für die zelluläre Energiegewinnung bedeutend ist. Somit gilt MOMP als *point of no return* in der Apoptose-Exekution (Elmore, 2007; Fuchs & Steller, 2015; Liddiard & Taylor, 2015; Tait & Green, 2008; Trempolec et al., 2013; Youle & Strasser, 2008).

1.1.2 Regulation der apoptotischen Morphologie der Apoptose-Exekution

Der intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalweg münden beide in der Aktivierung der Effektor-Caspasen. Effektor-Caspasen gelten als entscheidende Regulatoren der apoptotischen Exekutionsphase, da sie durch ihre proteolytische Aktivität und eine Vielzahl von Substraten entscheidend zur Degradierung apoptotischer Zellen beitragen. Dennoch ist bisher nur unvollständig verstanden, wie das Zusammenspiel der proteolytischen Aktivität der Caspasen und die Beteiligung weiterer biochemischer Mechanismen schlussendlich die charakteristische apoptotische Morpho-

logie hervorrufen. Auf Ebene des Zellkerns konnte bisher die Beteiligung der Caspase-aktivierten Kinase MST1 (*Mammalian sterile 20-like kinase 1*) an der frühen peripheren Chromatinkondensation gezeigt werden, die über die nachgeschaltete Aktivierung von JNK (*c-jun N-terminal kinase*) zu erfolgen scheint (Ura et al., 2007). Für die anschließende vollständige Chromatin- bzw. Kernkondensation wird die DNA sowohl über Caspase-abhängige, wie auch unabhängige Mechanismen fragmentiert. Dazu gehören die Caspase-aktivierte DNase (CAD) und die aus den Mitochondrien freigesetzten Proteine Endonuklease G (EndoG) und AIF (*apoptosis inducing factor*) (Doonan & Cotter, 2008; Elmore, 2007; Prokhorova et al., 2015; Taylor et al., 2008). Im späteren Verlauf der Apoptose-Exekution kommt es zur Fragmentierung des gesamten Zellkerns. Diesem Schritt geht die proteolytische Schwächung der Kernlamina voraus, die durch den Abbau von Kernlaminaen über Caspasen vermittelt wird (Taylor et al., 2008). Die Caspase-aktivierte Kinase ROCK 1 (*Rho-associated protein kinase 1*) spielt im anschließenden Auseinanderziehen der Kernfragmente eine wichtige Rolle, indem ROCK 1 über die Phosphorylierung von Myosin zur Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten des Zytoskeletts führt. Diese kontraktile Kräfte reißen die geschwächte Kernlamina auseinander, wodurch der Zellkern in Fragmente zerfällt. Auch auf zytoplasmatischer Ebene sind diese kontraktile Kräfte für die Ausprägung der apoptotischen Morphologie mitverantwortlich, da sie am Membran-Blebbing apoptotischer Zellen beteiligt sind. Neben dieser Caspase-induzierten Kontraktion des Zytoskeletts geschieht jedoch gleichzeitig auch dessen proteolytischer Abbau durch Caspasen, der ebenfalls für die Ausbildung des Membran-Blebbings benötigt wird. Erst durch die Schwächung des Zytoskeletts kann es in Membranbereichen, die nicht mehr von zytoskelettalen Strukturen gestützt werden, zur Ausstülpung der Plasmamembran kommen (Coleman et al., 2001; Croft et al., 2005; Taylor et al., 2008). Auch das Abrunden apoptotischer Zellen wurde neben dem proteolytischen Abbau des Zytoskeletts ebenfalls mit der Caspase-vermittelten Spaltung von Zelladhäsionsproteinen in Verbindung gebracht (Saraste & Pulkki, 2000; Taylor et al., 2008; Wen et al., 1997). Eine wichtige Rolle in der Ausprägung der apoptotischen Morphologie scheinen auch Mikrotubuli des Zytoskeletts zu spielen. Während der Apoptose-Exekution wird ihre Umorganisation beobachtet, durch die sie ein Netzwerk an der Plasmamembran (AMN, *apoptotic microtubule network*) bilden. Dies ermöglicht es, die Integrität der Plasmamembran bis zuletzt aufrecht zu erhalten um den apoptotischen Abbau einer Zelle und die Auflösung in Apoptotic Bodies zu gewährleisten (Atkin-Smith & Poon, 2016). Nicht zuletzt ist auch die Reduktion des Zellvolumens apoptotischer Zellen wichtiger Bestandteil der apoptotischen Morphologie. Dieser Prozess, der als apoptotische Volumenreduktion (AVD, *apoptotic volume decrease*) beschrieben wird, ist ebenfalls bisher nicht vollständig geklärt. Der Verlust von Kaliumionen scheint dabei jedoch eine wichtige Rolle zu spielen. Aus regulatorischer Sicht wurde dieser Vorgang lange

vernachlässigt, ist jedoch von großer Bedeutung für die apoptotische Exekution, da die Reduktion der intrazellulären Kaliumkonzentration zur Aktivierung der Caspasen beiträgt (Bortner et al., 2008; Bortner & Cidlowski, 2002). Obwohl Caspasen als Hauptregulatoren der apoptotischen Exekution und der damit einhergehenden apoptotischen Morphologie etabliert sind, sind noch viele Details im Zusammenspiel der einzelnen Prozesse ungeklärt. Insbesondere die zeitliche Koordination im Ablauf der einzelnen Prozesse untereinander und ihre Abhängigkeit voneinander ist bisher nicht genau verstanden. Es ist beispielsweise unklar, wie bestimmt wird, wann und wo eine Effektor-Caspase welches Substrat spaltet und wie die Apoptose-Exekution auf Ebene des Zytoplasmas mit der des Zellkerns koordiniert wird. Eine Feinabstimmung dieser Prozesse erscheint jedoch unerlässlich, da beispielsweise der Zellkern nur fragmentiert werden kann nachdem die DNA zuvor fragmentiert wurde, wohingegen die Kernlamina nicht zu früh von Caspasen proteolytisch aufgelöst werden darf und das Zytoskelett nach derzeitigem Stand des Wissens relativ lange intakt bleiben muss um die Kernfragmentierung und Bildung von Apoptotic Bodies zu gewährleisten (Atkin-Smith & Poon, 2016; Taylor et al., 2008; Vorobjev & Barteneva, 2016). Die Analyse der Prozesse, die der Apoptose-Exekution und der damit einhergehenden Morphologie zugrunde liegen, gestaltet sich jedoch auf Grund ihrer Dynamik und Schnelligkeit schwierig. Sie erfordert den Einsatz bildgebender Methoden mit der Kombination verschiedener Fluoreszenzmarker, die die verschiedenen Prozesse der Apoptose-Exekution visualisieren können, wie beispielsweise Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie oder bildgebender Durchflusszytometrie (Mattiuzzi Usaj et al., 2016; Vorobjev & Barteneva, 2016). Die Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen eröffnet zudem die Möglichkeit der Analyse einer Gesamtzellpopulation auf Einzelzellebene im zeitlichen und räumlichen Verlauf. Die Etablierung solcher Techniken und die zugehörige softwaregestützte Bildanalyse ist daher ein wichtiger Schritt um die der Apoptose-Exekution zugrunde liegenden Prozesse, ihr Zusammenspiel und ihre Regulation tiefergehend analysieren zu können.

1.2 Weitere Formen des Zelltods

1.2.1 Nekrose und Nekroptose

Nekrose stellt im Gegensatz zur Apoptose eine passive Form des Zelltods dar, die ungeordnet und Energie-unabhängig abläuft. Nekrose tritt häufig als Konsequenz verschiedener Traumata auf, wie Verbrennungen oder Kompressionsverletzungen, kann aber auch durch Nährstoffmangel oder Pathogene hervorgerufen werden (Elmore, 2007; Taylor et al., 2008). Morphologisch ist Nekrose durch das Anschwellen von Zytoplasma und Zellorganellen gekennzeichnet, sowie die frühe Ruptur der Plasmamembran. Dadurch werden zytoplasmatische Bestandteile in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt, was zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe führt. Die Chromatinstruktur nekrotischer Zellen bleibt dagegen zunächst meist unverändert und DNA-Fragmentierung tritt, wenn überhaupt, erst sehr spät und ungerichtet auf (Chaabane et al., 2013; Vanden Berghe et al., 2013).

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Nekrose eine vollständig unkontrollierte Zelltodform darstellt, ist mittlerweile auch eine regulierte Form der Nekrose bekannt, die Nekroptose. Morphologisch ähnelt sie der Nekrose stark, wird jedoch unter Bedingungen von Caspase-Inhibition aktiv über Todesrezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren ausgelöst. Aus physiologischer Sicht scheint Nekroptose einen Backup-Mechanismus darzustellen, für Situationen in denen Apoptose z.B. durch virale Caspase-Inhibitoren gehemmt ist (Fuchs & Steller, 2015; Kroemer et al., 2009; Tait et al., 2014).

1.2.2 Zelltod mit Autophagie

Autophagie stellt einen katabolen Prozess dar, über den zytoplasmatische Bestandteile, Proteinaggregate und Organellen über die Bildung von Autophagosomen eingeschlossen und durch die Fusion mit Lysosomen abgebaut werden. Dies ermöglicht einer Zelle Makromoleküle zu recyceln. Somit stellt Autophagie einen zellprotektiven, überlebensfördernden Mechanismus dar, der in Stresssituationen, z.B. als Antwort auf Nährstoffmangel, aktiviert werden kann. Morphologisch sind autophagische Prozesse durch das Auftreten von Vakuolen im Zytoplasma gekennzeichnet. Da eine derartige Vakuolisierung auch im Zusammenhang mit Zelltod auftreten kann, wurde lange angenommen, dass Autophagie Zelltod auslösen kann. Diese Ansicht wurde jedoch revidiert, da autophagische Prozesse unter Zelltodbedingungen zwar zum Zelltod beitragen können, z.B. durch die Erhöhung von ROS über den Abbau antioxidativer Enzyme, jedoch selten ursächlich für den Zelltod sind. Nach dieser Definition wird vom Zelltod mit Autophagie gesprochen. Eine Verbindung

von Autophagie mit Apoptose konnte über Caspasen hergestellt werden, da Caspasen neben ihrer pro-apoptischen Funktion ebenfalls pro-autophagisch wirken können, indem sie anti-autophagische Proteine inaktivieren (Fuchs & Steller, 2015; Tait et al., 2014).

1.3 Cisplatin

Cis-Diamindichlorplatin (II) (Cisplatin) ist seit seiner Zulassung durch die FDA (Food and Drug Administration) im Jahre 1978 eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Zytostatika, da es oft zu einem anfänglich großen Therapieerfolg führt. Es wird zur Behandlung verschiedener Tumore angewandt, wie Lungen-, Cervix-, Ovarial-, Testis-, Gallen- und Kopf-Hals-Karzinomen. Die starke zytotoxische Wirkung beruht auf der Eigenschaft von Cisplatin mit körpereigenen Nukleophilen zu interagieren, insbesondere der DNA. Der therapeutische Einsatz von Cisplatin wird jedoch stark durch die Entwicklung von Resistenzen der Tumorzellen limitiert, sowie die starken Nebenwirkungen, zu denen Nephro-, Oto-, Neuro- und gastrointestinale Toxizität zählen. Die fehlende Selektivität von Cisplatin für Tumorzellen ist für die starken Nebenwirkungen verantwortlich, wodurch auch andere Zellen mit einer hohen Proliferationsrate von der Wirkung betroffen sind. Um diese Limitierungen zu umgehen wird Cisplatin neben der Monotherapie häufig zusammen mit weiteren Zytostatika in Kombinationstherapien eingesetzt (Apps et al., 2015; L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001; Ott & Gust, 2006). Cisplatin besteht aus einem zentralen Platinatom an das über koordinative Bindungen jeweils zwei Chloridionen und zwei NH₃-Moleküle in cis-Konfiguration gebunden sind (**Abbildung 1.2**).

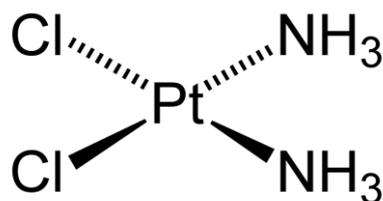


Abbildung 1.2: Strukturformel von Cisplatin.

1.3.1 Metabolismus von Cisplatin

Cisplatin an sich ist chemisch inert. Aufgrund seiner quadratisch planaren Struktur ist es jedoch anfällig für den Angriff durch Nucleophile, wie schwefelhaltige Aminosäuren oder DNA-Basen. Dabei werden in einer Substitutionsreaktion eine oder beide Chloridgruppen gegen den nucleophilen Reaktionspartner ausgetauscht, wodurch eine kovalente Bindung mit dem Nucleophil entsteht. Die Stärke der Nucleophile ist dabei entscheidend ob es zu einer direkten Reaktion kommt. Dies ist z.B. bei den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein der Fall. Eine Reaktion mit den schwächer nucleophilen Basen der DNA erfolgt dagegen erst nach Substitution der Chloridionen durch Wassermoleküle, wodurch hochreaktive Aquaplatin-Komplexe entstehen (L Galluzzi et al., 2012; Ott & Gust, 2006). Da Cisplatin intravenös verabreicht wird, bindet ein beträchtlicher Anteil des Cisplatins im Blut durch den beschriebenen Reaktionsmechanismus über schwefelhaltige Aminosäuren an Serumproteine. Untersuchungen gehen davon aus, dass deshalb nur 10 - 35 % des applizierten Cisplatins frei verfügbar sind (Cepeda et al., 2007; Ott & Gust, 2006). Dieser ungebundene Anteil liegt im Serum in unveränderter Form vor, da aufgrund der hohen Chloridionenkonzentration (100 mM) im Blut keine Hydrolyse stattfindet. Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle ist bisher nicht vollständig verstanden und erfolgt nach aktuellem Stand des Wissens über passive Diffusion, Kupfer-Transporter (z.B. CTR1, copper transporter 1) oder Kationen-Transporter (z.B. OCT2, *organic cation transporter 2*). Da die intrazelluläre Chloridionenkonzentration mit 2 - 30 mM deutlich niedriger ist als im Blut, erfolgt im Zytoplasma die Bildung der reaktiven Aquaplatin-Komplexe. Diese können daraufhin mit der DNA oder anderen zellulären Nucleophilen reagieren. Die intrazellulär verfügbare Menge an reaktivem Cisplatin wird dabei jedoch durch Bindung an Thiole, wie dem antioxidativen Tripeptid Glutathion oder Metallothioneine, reduziert. Außerdem tragen auch aktive Efflux-Transporter in der Plasmamembran, wie ATP7B (*copper-transporting P-type adenosine triphosphate*), ABCC2 (*ATP-binding cassette, sub-family C2*) und MATE1 (*multidrug extrusion transporter 1*) zur Reduktion der intrazellulären Cisplatin-Konzentration bei (Cepeda et al., 2007; Ciarimboli, 2012; Köberle et al., 2010; Norbury & Hickson, 2001; Ott & Gust, 2006; Wang & Lippard, 2005; Wheate et al., 2010).

1.3.2 Zytotoxische Wirkung von Cisplatin

Obwohl nur etwa 1 - 10 % des intrazellulären Cisplatins an die DNA bindet, gilt die DNA-bindende Wirkung als Hauptursache der Cisplatin-vermittelten Zytotoxizität. Die Bindung von Cisplatin kann grundsätzlich an allen vier Basen erfolgen, wobei Purinbasen jedoch bevorzugt werden. Da das Stickstoffatom an Position 7 von Guanin das nucleophilste Zentrum darstellt, bindet hier der überwiegende Anteil an Cisplatin. Nach einer monofunktionalen Bindung von Cisplatin an zunächst

eine Base, wird von einem Großteil dieser Cisplatin-DNA-Addukte über die Bindung einer zweiten Base eine Quervernetzung herbeigeführt. Dadurch kann Cisplatin mit der DNA verschiedene Addukte bilden, da diese bifunktionalen Addukte zwischen benachbarten Basen innerhalb eines DNA-Strangs (*intrastrand crosslink*) oder zwischen den beiden DNA-Strängen (*interstrand crosslink*) erfolgen können. Der Großteil (etwa 85 – 90 %) der Cisplatin-induzierten DNA-Addukte tritt dabei innerhalb eines DNA-Strangs auf. Intrastrand-Crosslinks zwischen benachbarten Guanin-Basen (1,2-GpG) sind dabei mit ca. 65 % aller induzierten Läsionen am häufigsten und treten mit ca. 25 % nur zu einem geringeren Anteil zwischen benachbartem Guanin und Adenin (1,2-ApG) auf. Quervernetzungen zwischen den beiden DNA-Strängen sind dagegen mit 1-5 % selten. Ferner kann es auch zu DNA-Protein-Vernetzungen kommen (**Abbildung 1.3**). Die Intrastrand-Crosslinks benachbarter Basen gelten als Hauptursache der Cisplatin-induzierte Zytotoxizität. Diese Ansicht basiert nicht nur auf der Häufigkeit mit der diese Vernetzungen auftreten, sondern vor allem auf der Tatsache, dass das Cisplatin-Isomer trans-Platin nur eine geringe Zytotoxizität *in vitro* und keine Antitumoraktivität *in vivo* zeigt. Trans-Platin bindet über den gleichen Mechanismus an die DNA, ist jedoch im Gegensatz zu Cisplatin aufgrund seiner chemischen Struktur nicht in der Lage 1,2-Intrastrand-Vernetzungen auszubilden. Die Konsequenz der Cisplatin-DNA-Addukte ist eine Veränderung der DNA-Konformation. 1,2-Intrastrand-Vernetzungen beugen die DNA in Richtung der großen Furche und führen zu einer teilweisen Entwindung der Helix. Diese Deformierungen

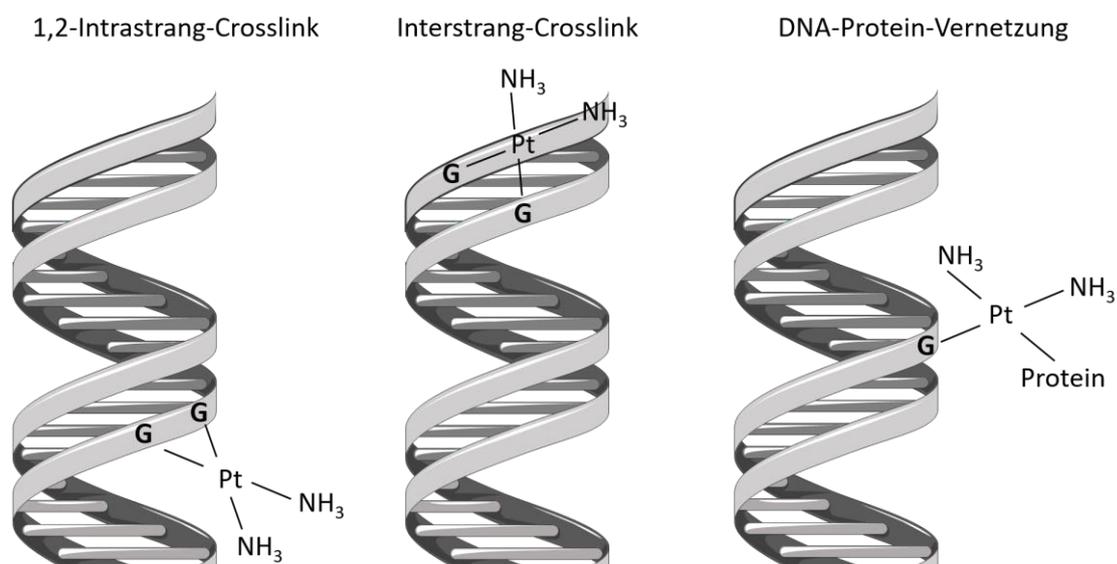


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Bindungsmöglichkeiten von Cisplatin an Guanin in doppelsträngiger DNA. Nähere Erläuterungen siehe Text.

blockieren die Replikation und Transkription und können Brüche im Rückgrat der Helix hervorrufen (Cepeda et al., 2007; Köberle et al., 2010; Ott & Gust, 2006; Wheate et al., 2010). Dadurch führen sie zu einer DNA-Schadensantwort, die der Reparatur der Schäden dient. Übersteigt jedoch das Ausmaß der Schäden die Reparaturkapazitäten einer Zelle, wird Apoptose ausgelöst, wodurch die Entstehung von Mutationen und fehlerhaften Zellteilungen verhindert wird. Die zugrunde liegenden Signalwege, die die Erkennung von DNA-Schäden mit der Apoptose-Exekution verknüpfen, sind komplex und bisher nicht vollständig aufgeklärt. Eine DNA-Schadensantwort beginnt mit der Schadensdetektion, die im Falle von Cisplatin über die DNA-Schadenssensoren ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), sowie deren nachgeschaltete Checkpoint-Kinasen 1 und 2 (Chk1/2) verläuft. Über die Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 kommt es dabei zur Zellzyklusinhibition, was der Wiederherstellung der DNA-Integrität durch Reparatur der DNA-Schäden dient. Die Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Addukte erfolgt hauptsächlich über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), bei der der beschädigte DNA-Strang rechts und links des Cisplatin-Addukts eingeschnitten, entfernt und anschließend neu synthetisiert wird. Im Zuge insuffizienter oder fehlerhafter DNA-Reparatur können daraus jedoch auch weitere DNA-Einzel- (SSB, *single strand break*) oder -Doppelstrangbrüche (DSB, *double strand break*) entstehen. Bei einem zu hohen Grad der DNA-Schädigung spielt p53 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Apoptose-Initiation, da es pro- und anti-apoptotische Bcl-2-Proteine reguliert. Außerdem ist die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen durch Cisplatin bekannt, die ebenfalls zur zytotoxischen Wirkung beitragen können, wie die MAP-Kinasen, die Proteinkinasen PKC (Proteinkinase C), Akt und c-Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) (L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001; Siddik, 2003; Wang & Lippard, 2005).

Auch wenn die DNA-schädigende Wirkung als Hauptursache der Zytotoxizität gilt, ist auch die Bindung von Cisplatin an andere zelluläre Strukturen als Ursache der zytotoxischen Wirkung nicht zu vernachlässigen. Insbesondere die Tatsache, dass Cisplatin auch in entkernten Zellen zytotoxisch wirkt, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass weitere zelluläre Zielstrukturen zur Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege beitragen. Die bereits angesprochene Bindung von Cisplatin an Glutathion kann beispielsweise zur Erhöhung der intrazellulären ROS-Level beitragen, die neben der DNA auch eine direkte Schädigung der Mitochondrien begünstigen können. Da der intrinsische Apoptose-Signalweg als Hauptweg der Cisplatin-induzierten Apoptose gilt, können hier eine Vielzahl Cisplatin-induzierter pro-apoptotischer Signalwege zusammenlaufen, die in der Summe die zytotoxische Wirkung vermitteln (Cepeda et al., 2007; L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001; Siddik, 2003). Die genauen Mechanismen und ihr Zusammenspiel in der Vermittlung Cispla-

tin-induzierter Apoptose sind jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt und vielschichtig. Die Entschlüsselung von Mechanismen, die an der Cisplatin-induzierten Apoptose beteiligt sind oder sie beeinflussen können, ist daher von großer Bedeutung, um der Entstehung von Resistenzen vorzubeugen und die Tumorthherapie zu optimieren.

1.4 Die Bedeutung von Arzneimittel-Interaktionen für die Tumorthherapie

Nicht nur die Identifizierung von Regulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose ist von großer Bedeutung für die Tumorthherapie. Auch die Analyse möglicher Arzneimittel-Interaktionen, die die therapeutische Effizienz beeinflussen können, ist von großer klinischer Relevanz. Dabei können zwei prinzipielle Interaktionsmöglichkeiten unterschieden werden: positive und negative Interferenz von Arzneimitteln, aus denen sich eine Verbesserung oder Verschlechterung des Therapieerfolgs ergibt.

Positive Interferenz ist ein wünschenswerter Effekt, bei dem durch die Kombination zweier (oder mehrerer) Medikamente ein synergistischer Effekt auftritt, der größer ist als die Summe der Einzeleffekte und entsprechend den Therapieerfolg erhöht. In der Tumorthherapie wird Cisplatin häufig in Kombinationstherapien eingesetzt, z.B. mit weiteren Zytostatika wie Doxorubicin, Paclitaxel oder Gemcitabin (Crul et al., 2002). Auch wenn die genauen Mechanismen, die der synergistischen Wirkung zugrunde liegen, in den meisten Fällen bisher nicht bekannt sind, ermöglicht die Kombinationstherapie die Verminderung von Resistenzbildungen und erhöht den langfristigen Therapieerfolg (Crul et al., 2002). Die Kombination von Medikamenten zur Tumorthherapie ist in der Klinik verständlicherweise rational getrieben, sodass meist verschiedene Zytostatika in Kombination angewandt werden. Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass bis zu 90 % aller zugelassenen Medikamente eine bisher unbekannte Zweitindikation haben können und sich darunter einige befinden, die für die Tumorthherapie genutzt werden könnten (Gupta et al., 2013). Deshalb stellt der Ansatz des *drug repositionings* eine aussichtsreiche Strategie in der Entwicklung neuer Tumortherapien dar. Beim *drug repositioning* oder auch *drug repurposing* genannt, werden Medikamente auf einen möglichen Einsatz in neuen Anwendungsgebieten überprüft, für die sie ursprünglich nicht zugelassen wurden. Der große Vorteil dieser Methode gegenüber der vollständigen Neuentwicklung eines Wirkstoffs ist die Tatsache, dass bereits umfangreiche Daten zu Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Toxizität der Medikamente vorliegen, wodurch sich die Kosten für präklinische und klinische Studien im neuen Anwendungsbereich deutlich reduzieren. Das systematische Screening von Medikament-Kombinationen, die unvoreingenommen aus verschiedenen therapeutischen Anwendungsbereichen kombiniert werden, ist daher ein wichtiger Ansatz

um zunächst *in vitro* aussichtsreiche synergistische Effekte für die Tumorthherapie zu identifizieren (Gupta et al., 2013; Strittmatter, 2014; Zimmermann et al., 2007).

Die Identifizierung negativer Arzneimittel-Interferenz, wodurch sich der Therapieerfolg verschlechtert oder es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann, ist nicht minder von Bedeutung. Ein erhöhtes Risiko derartiger Wechselwirkungen ist vor allem bei Krebspatienten gegeben, da sie häufig weitere Medikamente zur begleitenden Behandlung von Nebenwirkungen einer Chemotherapie erhalten. Zudem sind ca. 60 % der Tumorpatienten älter als 65 Jahre, was die Wahrscheinlichkeit altersbedingter Begleiterkrankungen und damit verbundener Medikamentengabe erhöht. Nach Schätzungen trifft dies auf bis zu 80 % der Krebspatienten über 65 Jahren zu (Blower et al., 2005). Polypharmazie, d.h. die regelmäßige Einnahme mehrerer Medikamente gleichzeitig, erhöht die Wahrscheinlichkeit für Arzneimittel-Interaktionen stark. Die Wahrscheinlichkeit auftretender Interaktionen beträgt bereits bei 5 Medikamenten 50 % und erhöht sich bei 8 Medikamenten auf 100 %. Mögliche Interaktionen von Arzneimitteln in der Klinik können jedoch leicht übersehen werden und sind schwierig zu identifizieren, da für ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie oder die Verschlechterung des Zustands eines Patienten während der Therapie, häufig die Progression der Krankheit oder Nebenwirkungen einer Chemotherapie als ursächlich betrachtet werden (Blower et al., 2005; Delafuente, 2003). Die Etablierung von *in vitro*-Modellen zur Identifizierung möglicher negativer Arzneimittel-Interaktionen ist somit von großer klinischer Bedeutung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mittels eines Mikroskopie-basierten Screens bioaktiver Substanzen und FDA-zugelassener Medikamente Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose zu identifizieren. Da Cisplatin eines der am häufigsten eingesetzten Zytostatika in der Tumorthherapie ist, stellt es einen Apoptose-Stimulus dar, der gut zur Aufklärung grundlegender molekularer Mechanismen der Apoptose geeignet ist. Von großer Bedeutung für den therapeutischen Einsatz ist darüber hinaus ein möglichst umfassendes Verständnis zellulärer Signalwege, die der induzierten Toxizität zugrunde liegen oder sie beeinflussen können. Auf folgende Fragestellungen soll dabei eingegangen werden:

- Welche zellulären Signalwege beeinflussen die Cisplatin-induzierte Apoptose?
- Kann die apoptotische Morphologie durch bioaktive Substanzen in ihrer Ausprägung beeinflusst werden?
- Kommt es durch Medikamente zu klinisch relevanten Wechselwirkungen mit Cisplatin-induzierter Apoptose?

Dazu soll ein Fluoreszenzmikroskopie-basiertes Hochdurchsatz-Verfahren verwendet werden, das eine softwaregestützte Bildanalyse nutzt. Dieses System soll des Weiteren dahingehend optimiert werden, zusätzliche Apoptose-assoziierte Endpunkte zu etablieren und die softwaregestützte Bildanalyse zu erweitern. Ferner soll die Möglichkeit implementiert werden Zeitverlaufsanalysen apoptotischer Zellen mit diesem System durchzuführen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Feinchemikalien wurden, wenn nicht explizit angegeben, von Carl Roth, Karlsruhe bezogen. Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur stammen von Greiner Bio One, Frickenhausen, wenn nicht anders beschrieben. Eine Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen ist im Anhang aufgeführt, sofern nicht direkt im Text angegeben.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung der Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei humane Krebszelllinien epithelialen Ursprungs verwendet, die Lungenkarzinomzelllinie A549, sowie die Cervixkarzinomzelllinie HeLa CCL-2. Beide Zelllinien wurden über ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) bzw. den deutschen Distributor DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Für einige Kinetikversuche wurde außerdem ein transgener Subklon der A549 Zelllinie verwendet, der stabil mit einem H2B-GFP Plasmid transfiziert wurde (Schweitzer, 2015). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco Life Technologies, Darmstadt), supplementiert mit 10 % FCS (*fetal calf serum*, PAA, Cölbe), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco Life Technologies, Darmstadt), sowie für A549 zusätzlich 2 mM L-Glutamin (Gibco Life Technologies, Darmstadt). Für die A549-H2B-GFP Linie wurde das Medium außerdem mit 1 mg/ml G418 (Gibco Life Technologies, Darmstadt) angereichert. Die Passage der Zellen erfolgte bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % (3-4 Tage). Dazu wurden die Zellen mit PBS-/- (*phosphate buffered saline*, Calcium- und Magnesium-frei, Gibco Life Technologies, Darmstadt) gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA (0,25 %, Gibco Life Technologies, Darmstadt) zur Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche (T75) für etwa 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 9 ml Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt, die Zellen vereinzelt und zur weiteren Kultivierung in eine neue Zellkulturflasche

überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer Zählkammer nach Herstellerangaben.

2.1.2 Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitkonservierung wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Einfrieren wurden die Zellen wie zuvor beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium mit allen Supplementen und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden sie in einem Einfriergefäß mit Isopropanol (Nalgene Labware, USA) nach Herstellerangaben über Nacht bei -80 °C gelagert und am folgenden Tag in den Stickstofftank überführt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden die Kryogefäße schnell in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, VWR, Bruchsal) mit frischem Medium überführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2 Behandlung von Zellen

Zur Behandlung der Zellen wurden diese wie oben beschrieben aus den Zellkulturflaschen abgelöst und in den zur Behandlung verwendeten Multiwellplatten kultiviert.

2.2.1 Behandlung von Zellen mit Proteininhibitoren und Apoptose-Stimuli

24 Stunden nach Aussaat wurde das Medium abgenommen und frisches Medium vorgelegt. Bei Behandlung mit Proteininhibitoren (Q-VD-OPh, MP Biomedicals, Heidelberg; G36, Biomol, Hamburg) wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C damit vorinkubiert, bevor die Apoptose-Stimuli (Cisplatin, Sigma, München; Etoposide, Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Staurosporin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) entsprechend konzentriert zugegeben wurden.

2.2.2 Screen der bioaktiven Substanz-Bibliothek

Die Bibliothek der bioaktiven Substanzen besteht aus zwei Teilbibliotheken: Die *SCREEN-WELL® FDA approved drug library* (640 Substanzen, #BML-2841 v1.4, Enzo Life Sciences, Lörrach) und die *SCREEN-WELL® ICCB Known Bioactives library* (480 Substanzen, #BML-2840 v2.1, Enzo Life Science, Lörrach). Die insgesamt 1120 Substanzen wurden 1:500 verdünnt mit den Zellen in 96-Well

Platten wie unter 2.2.1 beschrieben für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Cisplatin für 24 Stunden behandelt. Um die Substanzen unter äquitoxischen Bedingungen zu testen, wurden A549 mit 50 μM und HeLa mit 45 μM Cisplatin behandelt, was in beiden Zelllinien zu etwa 40 - 50 % Zelltod nach 24-stündiger Behandlung führt. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl, sowie verschiedene Zelltodstadien wie unter 2.3.1 beschrieben mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die 1120 bioaktiven Substanzen verteilten sich auf 14 x 96-Well Platten (jeweils 80 Substanzen pro 96-Well Platte). Auf jeder Platte wurden 16 DMSO-Kontrollen (0,2 %) mitgeführt, von denen jeweils 8 als Negativkontrolle (Behandlung mit Medium) und 8 als Positivkontrolle (Behandlung mit Cisplatin) dienen. Die finale Konzentration der bioaktiven Substanzen lag dabei abhängig von der Ausgangskonzentration zwischen 0,2 - 100 μM in Medium mit 0,2 % DMSO. Jede Zelllinie wurde mit allen Substanzen der Bibliothek \pm Cisplatin in 2 unabhängigen Replikaten untersucht.

2.3 Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie können durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene zelluläre Endpunkte zeitgleich erfasst werden. Die Automatisierung von Bildakquisition und -auswertung, sowie die Verwendung kleiner Zellkulturformate, wie 96-Well Platten, ermöglicht dabei die parallele Analyse einer Vielzahl von Proben.

2.3.1 Analyse der Gesamtzellzahl, sowie verschiedener Zelltodstadien

Die Gesamtzellzahl, sowie die Anzahl toter Zellen wurde mittels einer kombinierten Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Propidiumiodid (PI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bestimmt. Beides sind DNA-färbende Stoffe, jedoch mit dem Unterschied, dass Hoechst membranpermeabel ist und die DNA lebender und toter Zellen anfärbt, wohingegen PI nicht membranpermeabel ist und somit nur die DNA membrangeschädigter und somit als tot definierter Zellen färbt. Mit dieser Färbemethode können des Weiteren tote Zellen in früh-, spätapoptotische und sehr spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen unterschieden werden. Durch die im Verlauf der Apoptose auftretende DNA-Kondensation nimmt die Hoechst-Intensität dieser Zellen zu, was sie von lebenden Zellen unterscheidet. Bei spätapoptotischen Zellen tritt neben der erhöhten Hoechst-Intensität aufgrund von Membranschädigung auch ein PI-Signal auf. Bei sehr spätapoptotischen Zellen nimmt die Hoechst-Intensität aufgrund passiven Auslaufens der Zelle wieder ab, das PI-Signal bleibt bestehen. Nekrotische Zellen weisen ebenfalls aufgrund feh-

Tabelle 1: Klassifizierung der verschiedenen Zellstadien mittels scan^R-Software. Die Hoechst-Intensität wird in normal (+) und erhöht (++) unterteilt, PI wird in PI-positiv (+) und negativ (-) unterschieden.

Zellstadium	Hoechst	PI
lebend	+	-
frühapoptotisch	++	-
spätapoptotisch	++	+
sehr spätapoptotisch/nekrotisch	+	+

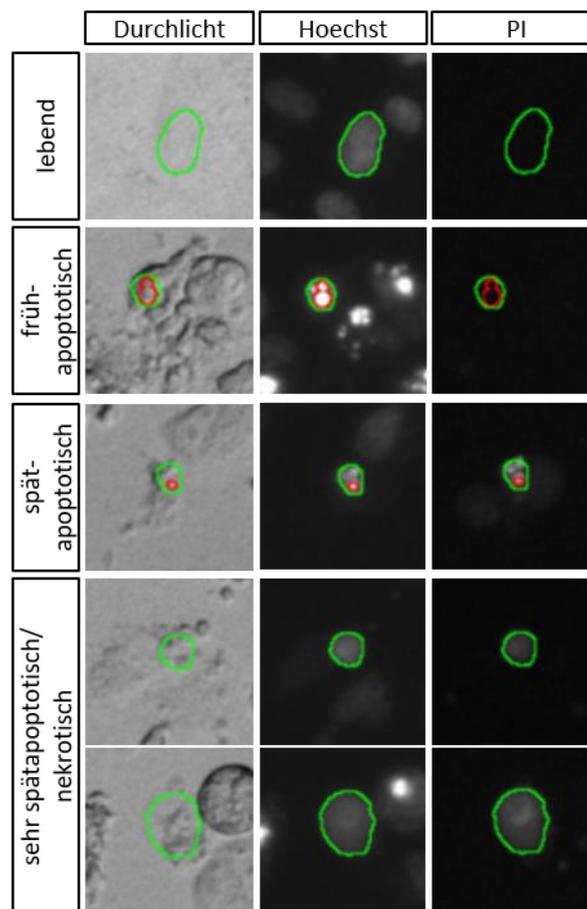


Abbildung 2.1: Repräsentative Beispiele der mittels kombinierter Hoechst/PI-Färbung unterscheidbaren Zellstadien mittels scan^R-Software. Lebende Zellen weisen eine normale Hoechst-Intensität auf und sind PI-negativ (Hoechst+/PI-). Frühapoptotische Zellen zeigen aufgrund der DNA-Kondensation ein erhöhtes Hoechst-Signal und sind ebenfalls PI-negativ (Hoechst++/PI-). Spätapoptotische Zellen sind neben der ebenfalls erhöhten Hoechst-Intensität durch ein PI-Signal gekennzeichnet, da bereits die Schädigung der Zellmembran auftritt (Hoechst++/PI+). Im sehr späten Verlauf der Apoptose nimmt die Hoechst-Intensität wieder auf ein normales Niveau ab, da durch die Zellmembranschädigung Zellinhalt aus der Zelle diffundiert (Hoechst+/PI+). Softwaregestützt sind nekrotische Zellen nicht von den sehr spätapoptotischen Zellen zu unterscheiden, da nekrotische Zellen aufgrund fehlender DNA-Kondensation und frühem Verlust der Zellmembranintegrität ebenfalls eine normale Hoechst-Intensität aufweisen und PI-positiv sind (Hoechst+/PI+). Die grüne Markierung kennzeichnet den durch die Software erkannten Zellkern.

lender DNA-Kondensation kein erhöhtes Hoechst-Signal auf und sind aufgrund der Membranpermeabilisierung PI-positiv (**Tabelle 1, Abbildung 2.1**). Die Gesamtzellzahl wird über die Anzahl Hoechst-gefärbter Zellkerne bestimmt.

Nach Behandlung wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, wurden die Zellen für eine Stunde mit den Farbstoffen (Hoechst 0,15 µg/ml, PI 0,25 µg/ml) bei 37 °C, 5 % CO₂ gefärbt. Pro Well einer 96-Well Platte wurden, wenn nicht anders angegeben, an vier Positionen mit einem 10-fach Objektiv im Hoechst-, PI- und Durchlichtkanal mit einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX81 mit scan^R Acquisition, Olympus, Hamburg) Aufnahmen gemacht. Das Bild einer Position umfasst eine Fläche von 0,57 mm² (867x660 µm², 1344x1024 Pixel). Die vier aufgenommenen Bilder repräsentieren somit ca. 8 % der Gesamtoberfläche eines Wells einer 96-Well Platte mit einer Wachstumsfläche von 32 mm²/Well. Die Aufnahmen wurden mittels scan^R Analysis Software (Version 2.5.1, Olympus, Hamburg) wie unter 2.3.5 beschrieben analysiert.

2.3.2 Analyse des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials wurde durch eine kombinierte Färbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst und Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE, Life Technologies, Darmstadt) untersucht. Hoechst dient dabei zur Detektion der Gesamtzellzahl, während TMRE als kationischer Farbstoff in Mitochondrien aufgrund ihres negativen Membranpotenzials akkumuliert. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials zeigt eine Schädigung der Mitochondrien an. Die Inkubation der Zellen mit Hoechst (0,15 µg/ml) und TMRE (30 nM), sowie die Aufnahme am Mikroskop erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Die Aufnahmen wurden mittels scan^R Analysis Software wie unter 2.3.5 beschrieben analysiert. Da TMRE und PI ein ähnliches Fluoreszenzspektrum aufweisen (**Tabelle A.2**), kann der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und der Zelltod nicht aus derselben Probe bestimmt werden. Um dennoch den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials mit dem Zelltod korrelieren zu können, wurde bei diesen Versuchen jeweils ein Teil der technischen Replikate je 96-Well Platte mit Hoechst/PI, der andere Teil mit Hoechst/TMRE angefärbt.

2.3.3 Zeitverlaufsanalysen

Durch Verwendung einer Inkubationskammer (EMBLEM Technology Transfer GmbH, Heidelberg) können neben der Analyse fester Zeitpunkte auch Zeitverlaufsanalysen bei 37 °C, 5 % CO₂ durchgeführt werden. Die Anfärbung der Zellen erfolgte wie in 2.3.1 bzw. 2.3.2 beschrieben. Bei Verwendung der transgenen Zelllinie A549-H2B-GFP, bei der die DNA bereits durch das H2B-GFP fluoreszent markiert ist, wurden die Zellen lediglich mit PI angefärbt um die Gesamtzellzahl, sowie

die Anzahl toter Zellen zu bestimmen. In diesem Falle erfolgten die Aufnahmen im GFP-, PI- und Durchlichtkanal. Unabhängig von der Zelllinie wurde nur eine Position je Well aufgenommen um Photobleaching der Fluorophore, sowie Phototoxizität zu verhindern.

2.3.4 Analyse γ -H2AX-positiver Zellkerne

Zur Detektion einer genotoxischen Wirkung wurde der immunologische Nachweis von γ -H2AX Foci verwendet. Die Zellen wurden dazu im 96-Well Format ausgesät und behandelt. Die Fixierung erfolgte mit 4 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-Lösung (v/v in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch Inkubation mit 2 % BSA (w/v in PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 1 h bei 4 °C abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper anti- γ -H2AX (Antikörper siehe Anhang **Tabelle A.3**) in 2 % BSA erfolgte für 1 h bei 37 °C. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (Alexa-488) in 2 % BSA inkubiert. Die Zellkerne wurden durch Zugabe von DAPI (4'6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochlorid, Invitrogen Life Technologies, Darmstadt) angefärbt (600 nM), das zur Lösung des sekundären Antikörpers gegeben wurde. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit PBS überschichtet und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Bei allen Waschschrritten wurde darauf geachtet ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Mikroskop wie unter 2.3.1 beschrieben im DAPI-, GFP (Alexa-488)- und Durchlichtkanal mit einem 20-fach Objektiv an sechs Positionen je Well.

2.3.5 Bildanalyse

Für die automatisierte Bildanalyse, die der Bestimmung der Gesamtzellzahl, der verschiedenen Zelltodstadien, dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, sowie der Detektion γ -H2AX-positiver Zellen zugrunde liegt, wurde die Software scan^R Analysis (Version 2.5.1, Olympus, Hamburg) verwendet. Dabei wurde zunächst auf den Hoechst- bzw. DAPI-Aufnahmen eine Kernmaske generiert (**Abbildung 2.2**). Dies erfolgte über Algorithmen zur Bild-Segmentierung durch beidseitige Kantenerkennung (edge detection). Dabei werden Objektkanten durch den sprunghaften Anstieg der jeweiligen Signalintensität erkannt. Die Objekterkennung wird mittels Auswahlparameter zur Bildkontrastierung, der minimalen und maximalen Objektgröße, sowie der Sensitivität der Kantenerkennung optimiert. Des Weiteren werden angeschnittene Randobjekte ausgeschlossen und über einen Watershed-Algorithmus wird versucht, übereinanderliegende Objekte separat zu erkennen. Anschließend wurde mit der Kernmaske die Intensität der Kerne in

Hoechst- und PI- bzw. GFP (Alexa 488)-Kanal bestimmt. Bei Färbung der Zellen mit TMRE wurde basierend auf der Kernmaske zusätzlich eine Subobjekt-Maske im Hoechst-Kanal erstellt (**Abbildung 2.3**). Sie dient der eindeutigen Zuordnung von Mitochondrien, die als Subobjekte im TMRE-

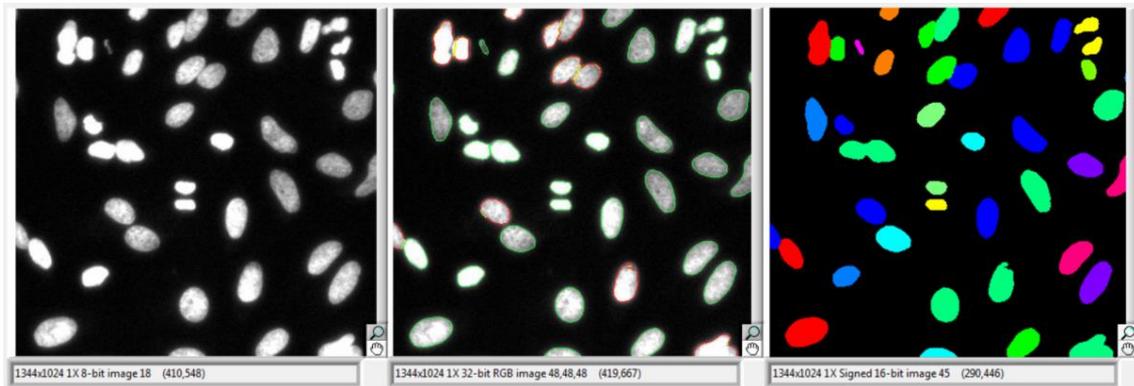


Abbildung 2.2: Prinzip der Objekterkennung mittels scan^R-Software im Hoechst bzw. DAPI-Kanal. Links: Ausgangsbild mit erhöhter Kontrasteinstellung, um die Objekterkennung zu optimieren. Mitte: Erkennung der Objektkanten durch sprunghaften Anstieg der Signalintensität. In mehreren Schritten werden geschlossene Objekte erkannt. Die Farbe der Linien gibt Auskunft darüber, in welchem Erkennungsschritt das geschlossene Objekt erkannt wurde (Grün: Erkennung im ersten Schritt; Gelb/Rot: Erkennung im zweiten Schritt unter Verwendung weiterer Parameter). Rechts: Aus den erkannten Objekten wird die Kernmaske generiert, die Farben werden den Objekten zufällig zugeordnet. Die Auswahlparameter zur Optimierung der Objekterkennung wurden anhand repräsentativer Aufnahmen für jeden Versuch manuell angepasst, so dass möglichst alle Zellkerne detektiert wurden.

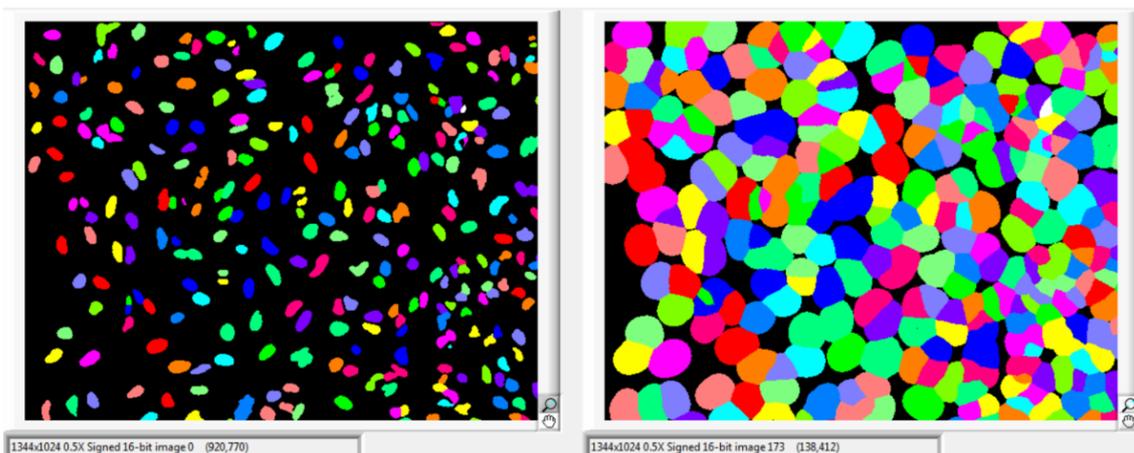


Abbildung 2.3: Erstellung einer Subobjekt-Maske zur Detektion von Mitochondrien als Subobjekte der Zellkerne. Links: Die bereits zur Objekterkennung (**Abbildung 2.2**) generierte Kernmaske des Hoechst-Kanals (links) dient als Grundlage zur Erstellung einer Subobjekt-Maske (rechts). Über die Kernmaske wird ein Bereich um jeden Zellkern definiert (Subobjekt-Maske), um Mitochondrien, die als Subobjekte im TMRE-Kanal detektiert werden (**Abbildung 2.4**) den entsprechenden Zellkernen mit möglichst hoher Genauigkeit zuordnen zu können. Auswahlparameter zur Erstellung der Subobjekt-Maske wurden für jeden Versuch anhand repräsentativer Aufnahmen manuell angepasst, um eine möglichst hohe Genauigkeit in der Zuordnung von Subobjekten zu den Zellkernen zu erreichen.

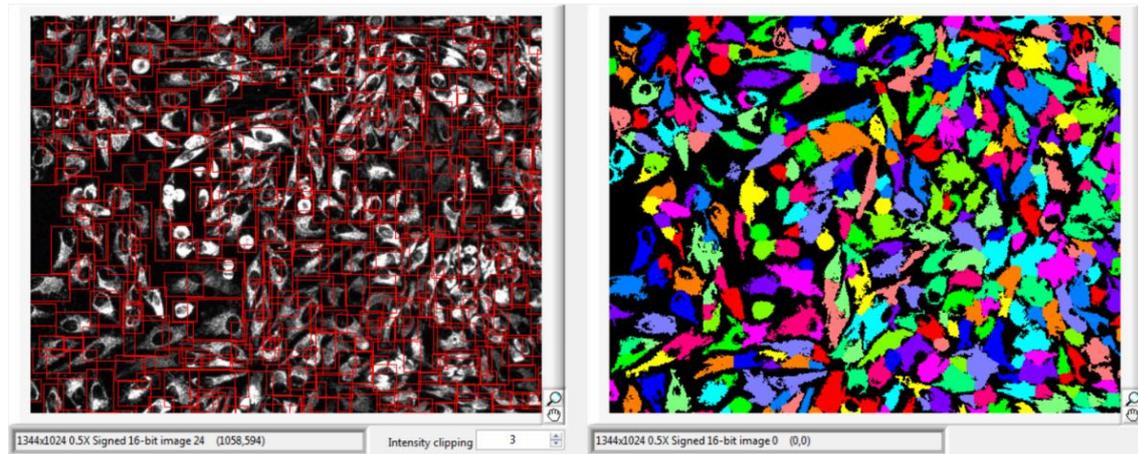


Abbildung 2.4: Detektion von Mitochondrien. Links: Kontrastoptimiertes Ausgangsbild im TMRE-Kanal zur Erkennung der Mitochondrien als Subobjekte. Rechts: Durch sprunghafte Intensitätsunterschiede erkannte Mitochondrien, die anschließend mittels der zuvor generierten Subobjekt-Maske (**Abbildung 2.3**, rechts) den Zellkernen zugeordnet werden. Auswahlparameter wurden für jeden Versuch anhand repräsentativer Aufnahmen dahingehend optimiert, möglichst alle Mitochondrien zu erkennen. Die Farben werden den Objekten durch die Software zufällig zugeordnet und beziehen sich in diesem Erkennungsschritt nicht auf die Subobjektmaske.

Kanal erkannt werden, zu den jeweiligen Zellkernen und verhindert die Zuordnung eines Subobjekts zu mehreren Zellkernen. Dazu wurde, ausgehend von den Objekten der Kernmaske, ein Bereich um den Zellkern definiert (Parameter: Abstand vom Kern und maximale Breite des Bereichs). Die im TMRE-Kanal detektierten Subobjekte (**Abbildung 2.4**), die sich in diesem Bereich befanden, wurden darüber anschließend dem jeweiligen Zellkern zugeordnet. Die Subobjekte selbst wurden zuvor ebenfalls über Intensitätsunterschiede detektiert (**Abbildung 2.4**). Für jeden Versuch wurden die Auswahlparameter anhand repräsentativer Aufnahmen dahingehend optimiert, möglichst alle Kerne und Subobjekte zu erkennen. Die Zuordnung der Farben zu Haupt- und Subobjekten erfolgt dabei zufällig durch die Software.

Für die manuelle Bildanalyse, sowie die Erstellung von Overlays verschiedener Kanäle wurde die open source Software ImageJ (Version 1.50i, NIH) (Schneider et al., 2012) verwendet. Zusammengesetzte Abbildungen, sowie schematische Zeichnungen wurden mit dem open source Vektorgrafikprogramm Inkscape (Version 0.91, Inkscape Community) erstellt.

2.4 Proteinanalytik

Eine Übersicht der verwendeten Puffer und Antikörper befindet sich im Anhang. Die Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und behandelt. Nach Inkubationsende wurde das Medium abge-

nommen und die Zellen in 80 µl 2x Laemmli Puffer lysiert. Nach Denaturierung (5 min, 95 °C) wurden die Lysate zur Scherung der DNA im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, Berlin) sonifiziert. Bis zur Auftragung auf ein SDS (*sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamid Gel wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Zur Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Lysate auf ein 10 % Trenngel mit 5 % Sammelgel geladen. Ein Molekulargewichtsmarker (peqGOLD Protein-Marker IV, prestained, Peqlab, Erlangen) wurde zur Identifizierung der Proteingrößen mitgeführt. Für die immunologische Detektion der aufgetrennten Proteine wurden diese nach Ende der Elektrophorese im Nassblot-Verfahren auf eine Immobilon-P Membran (Millipore, Schwalbach) transferiert. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde mit Odyssey Blockierpuffer (LI-COR, Biosciences, Bad Homburg) blockiert und danach über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörpern in Odyssey Blockierpuffer und TBS-T inkubiert. Die Inkubation mit Sekundäntikörpern erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Proteindetektion wurden die Membranen am Odyssey® Classic Infrared Imaging System (LI-COR, Biosciences, Bad Homburg) gescannt. Die Bildbearbeitung zur Anpassung des Kontrasts erfolgte mit Image Studio Lite (Version 4.0, LI-COR, Biosciences, Bad Homburg).

2.5 Analyse der Genexpression von Krebspatienten mit Daten aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas

Die Analyse der Expression des G-Protein-gekoppelten Estrogen-Rezeptors (GPER) mit Hilfe von Krebspatientendatenbanken wurde von Victor Gourain (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) durchgeführt. Dazu wurden aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://cancer-genome.nih.gov/>) Daten zu Tumorbehandlung, Überleben und Genexpression (mRNA Sequenzierungsdaten von Tumorgewebe) von Krebspatienten bezogen. Um die Genexpression der einzelnen Patienten miteinander vergleichen zu können, wurden für jeden Patienten die Rohdaten der Genexpression (Anzahl zugeordneter Transkripte pro Gen) über alle Gene normalisiert unter Verwendung des DEseq2 Pakets (Love et al., 2014) in R (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich). Anschließend wurden alle Cervixkarzinom-Patienten (cancer type: CESC, *cervical squamous cell carcinoma*) ausgewählt, die eine Cisplatin-Therapie (ohne kombinierte Bestrahlungs-Therapie) durchlaufen hatten und deren Überlebensdaten verfügbar waren. Anhand der GPER-Expressionswerte wurde der Patientenpool unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte der GPER-Expression in niedrige bzw. hohe GPER-Expression unterteilt. Für jeden Schwellenwert wurden jeweils für beide Patientengruppen (niedrige bzw. hohe GPER-Expression) die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) berechnet und

deren Differenz bestimmt (Überlebenswahrscheinlichkeit Gruppe hohe GPER-Expression - niedrige GPER-Expression). Zuvor wurden dafür die Angaben zur Überlebenszeit der individuellen Patienten von Tagen in Jahre umgerechnet und gerundet.

2.6 Datenanalyse und Statistik

Zur Datenanalyse wurde Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM (Standardfehler des Mittelwerts, *Standard Error of the Mean*) unabhängiger Versuchswiederholungen angegeben, sofern in den Abbildungslegenden nicht explizit anderweitig beschrieben. Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Office Excel 2016 durchgeführt. Unter Verwendung der Funktion t.test, die die Teststatistik eines Student'schen t-Tests zurückgibt, wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Die Signifikanzwerte wurden unter Verwendung der jeweiligen Kontrollbehandlungen als Referenzniveau ermittelt. Ergebnisse ab $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet und entsprechend in den Abbildungen annotiert.

Zur Analyse der Daten des Screens der bioaktiven Substanz-Bibliothek wurden die Messwerte jeder Substanz je 96-Well Platte mittels z-score auf die jeweilige Kontrolle (8 Replikate/Platte) normiert, um einen Vergleich zwischen den Platten unter Berücksichtigung von inter-Plattenvariabilität zu ermöglichen. Der z-score gibt an, um wie viele Standardabweichungen der Kontrolle sich ein Wert von dieser unterscheidet:

$$Z = \frac{x - \mu_p}{\sigma_p}$$

Dabei ist Z der normalisierte Messwert, x der Messwert, μ_p der Mittelwert der Kontrollen einer Platte und σ_p die Standardabweichung der Kontrollen einer Platte. Die unbehandelten DMSO-Negativkontrollen einer Platte dienten dabei in Versuchen zur Analyse einer möglichen Eigenzytotoxizität der Substanzen (Inkubation der bioaktiven Substanzen ohne Cisplatin Co-Behandlung) zur Berechnung des z-scores. In den Versuchen mit Co-Behandlung der bioaktiven Substanzen mit Cisplatin wurde der z-score analog anhand der Cisplatin-Positivkontrollen berechnet. Für beide Bedingungen (\pm Cisplatin) wurde anschließend der Mittelwert des z-scores der beiden Replikate gebildet. Da der z-score keine Aussage über die absolute Effektstärke macht, wurden zusätzlich analog auch die Mittelwerte \pm Cisplatin je analysiertem Endpunkt der Replikate in Prozent der Gesamtzellzahl berechnet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen

Cisplatin wird zur Behandlung verschiedener Tumore in nahezu jeder zweiten Therapie eingesetzt und gehört damit zu den am häufigsten angewandten Zytostatika weltweit (Apps et al., 2015; Wheate et al., 2010). Die zytotoxische Wirkung entfaltet es durch kovalentes Binden an die DNA, was insbesondere zu DNA-Intrastrang-Vernetzungen führt, die eine DNA-Schadensantwort hervorrufen. Übersteigt das Maß an DNA-Schäden dabei die Reparaturkapazitäten der Zelle, wird in letzter Konsequenz der programmierte Zelltod in Form von Apoptose ausgelöst. Die Wirksamkeit von Cisplatin ist jedoch häufig stark limitiert durch Resistenzbildung, weshalb die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der zytotoxischen Wirkung zugrunde liegen, auch mittlerweile fast 40 Jahre nach der Zulassung von Cisplatin, immer noch von großer Bedeutung ist (Cepeda et al., 2007; L Galluzzi et al., 2012; Wheate et al., 2010). Für die unvoreingenommene Identifizierung von Regulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose wurde in dieser Arbeit eine Bibliothek bioaktiver Substanzen in einem Fluoreszenzmikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Verfahren auf Modulatoren Cisplatin-induzierter Apoptose analysiert. Als Grundlage dafür wurde zunächst die Cisplatin-induzierte Apoptose im verwendeten Zellkulturmodell zeitlich und phänotypisch charakterisiert. Dazu wurden Apoptose-assoziierte Endpunkte untersucht und dahingehend optimiert, sie im Fluoreszenzmikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Verfahren und für zeitkinetische Analysen nutzen zu können. Als Modellsystem zur Untersuchung der Cisplatin-induzierten Apoptose wurden die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 und die humane Cervixkarzinomzelllinie HeLa verwendet. Die Zelllinien sind repräsentativ für die mit Cisplatin behandelten Tumorarten, zu denen neben Lungen- und Cervixkarzinomen auch Ovarial-, Hoden-, Gallen- und Kopf-Hals-Karzinome gehören (Apps et al., 2015; L Galluzzi et al., 2012).

3.1.1 Cisplatin wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose

Die zytotoxische und antiproliferative Wirkung von Cisplatin wurde mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärben der Zellen mit Hoechst und Propidiumiodid (PI) untersucht. Über ein automatisiertes Mikroskop besteht dabei die Möglichkeit in großem Umfang Bilder in verschiedenen Kanälen aufzunehmen und diese softwaregestützt auszuwerten. Über die kombinierte Färbung können dabei neben der Gesamtzellzahl auch lebende und tote Zellen erfasst werden. Der Anteil toter Zellen kann ferner in früh- und spätapoptotische, sowie sehr spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen klassifiziert werden. Diese Klassifizierung basiert auf der Detektion kondensierter DNA (erhöhte Hoechst-Intensität) und dem Verlust der Plasmamembranintegrität (PI-Influx). Durch die im Verlauf der Apoptose auftretende DNA-Kondensation nimmt die Hoechst-Intensität frühapoptotischer Zellen zu, wodurch sie sich von lebenden Zellen unterscheiden. Charakteristisch

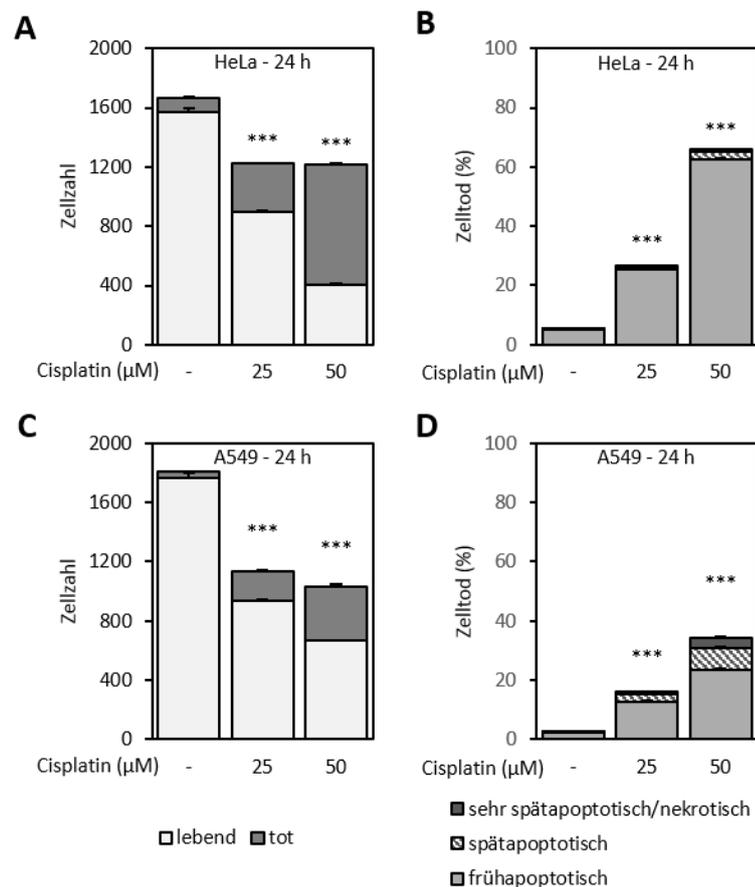


Abbildung 3.1: Cisplatin wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose. HeLa (A, B) und A549 (C, D) wurden für 24 Stunden mit Cisplatin (25 bzw. 50 µM) oder Medium (-) behandelt. Die Zellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien (früh-, spät- und sehr spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen) wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und Propidiumiodid (PI) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$.

für spätapoptotische Zellen ist neben der erhöhten Hoechst-Intensität auch ein PI-Signal, das aufgrund der Plasmamembranschädigung auftritt. Bei sehr spätapoptotischen Zellen nimmt die Hoechst-Intensität aufgrund passiven Auslaufens der Zelle wieder ab, ein PI-Signal bleibt bestehen. In diese Klasse fallen auch nekrotische Zellen, die aufgrund fehlender DNA-Kondensation ebenfalls kein erhöhtes Hoechst-Signal aufweisen, infolge einer frühen Permeabilisierung der Plasmamembran jedoch PI-positiv sind, wodurch sie sich von lebenden Zellen unterscheiden. Nach 24-stündiger Behandlung wird bei beiden Zelllinien unabhängig der getesteten Konzentration die antiproliferative Wirkung von Cisplatin durch die Abnahme der Zellzahl deutlich (**Abbildung 3.1A, C**). Die zytotoxische Wirkung tritt dagegen in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig auf und ist in HeLa deutlich stärker (**Abbildung 3.1B, D**). Mit Blick auf die verschiedenen Zelltodstadien wird jedoch deutlich, dass in A549-Zellen trotz niedrigerer Zytotoxizität mehr spätapoptotische Zellstadien detektiert werden verglichen mit HeLa-Zellen. Dies weist auf eine schnellere Apoptose-Exekution in A549 hin, wohingegen die Apoptose-Initiationsrate in HeLa höher ist. In beiden Zelllinien sind unabhängig der eingesetzten Cisplatin-Konzentration die Apoptose-typischen morphologischen Zellveränderungen sichtbar (**Abbildung 3.2A, B**). Auf den repräsentativen Aufnahmen im Durchlicht-Kanal werden die Veränderungen auf zellulärer Ebene deutlich, wie das Abrunden der apoptotischen Zelle, die Bildung von Ausstülpungen der Zellmembran (Membran-Blebbing), das Schrumpfen der Zelle bis hin zur Bildung von abgeschnürten Vesikeln (Apoptotic Bodies). Im Hoechst-Kanal sind die morphologischen Veränderungen des Zellkerns sichtbar, wie DNA-Kondensation und Abnahme der Zellkerngröße, sowie die Fragmentierung des Zellkerns. Aufnahmen im PI-Kanal zeigen den Verlust der Zellmembranintegrität, was charakteristisch für spätapoptotische bzw. sehr spätapoptotische Zellstadien ist, da diese *in vitro* nicht phagozytiert werden. Da nekrotische Zellen anhand der Hoechst/PI-Färbung durch die Software nicht von sehr spätapoptotischen Zellstadien unterschieden werden können, wurde die Zelltodklasse sehr spätapoptotisch/nekrotisch manuell auf nekrotische Zellen hin analysiert. Erwartungsgemäß war diese Klasse in beiden Zelllinien von sehr spätapoptotischen Zellen dominiert, erkennbar an der charakteristischen Morphologie mit kleinen Zellkernfragmenten und einer geringen Größe der Zellüberreste. Nekrotische Zellen traten dagegen sehr selten auf.

Obwohl nur ein geringer Prozentsatz des intrazellulären Cisplatins an die DNA bindet, gilt die DNA-schädigende Wirkung als Hauptursache der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität (L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001). Im Rahmen einer DNA-Schadensantwort wird zunächst die Zellzyklusprogression an Kontrollpunkten arretiert um Zeit für die DNA-Reparatur zu gewinnen und dadurch fehlerhafte DNA-Replikation und Zellteilungen zu unterbinden. Cisplatin ist bekannt dafür einen Zellzyklusarrest vor allem am G2/M-Kontrollpunkt auszulösen, was für die

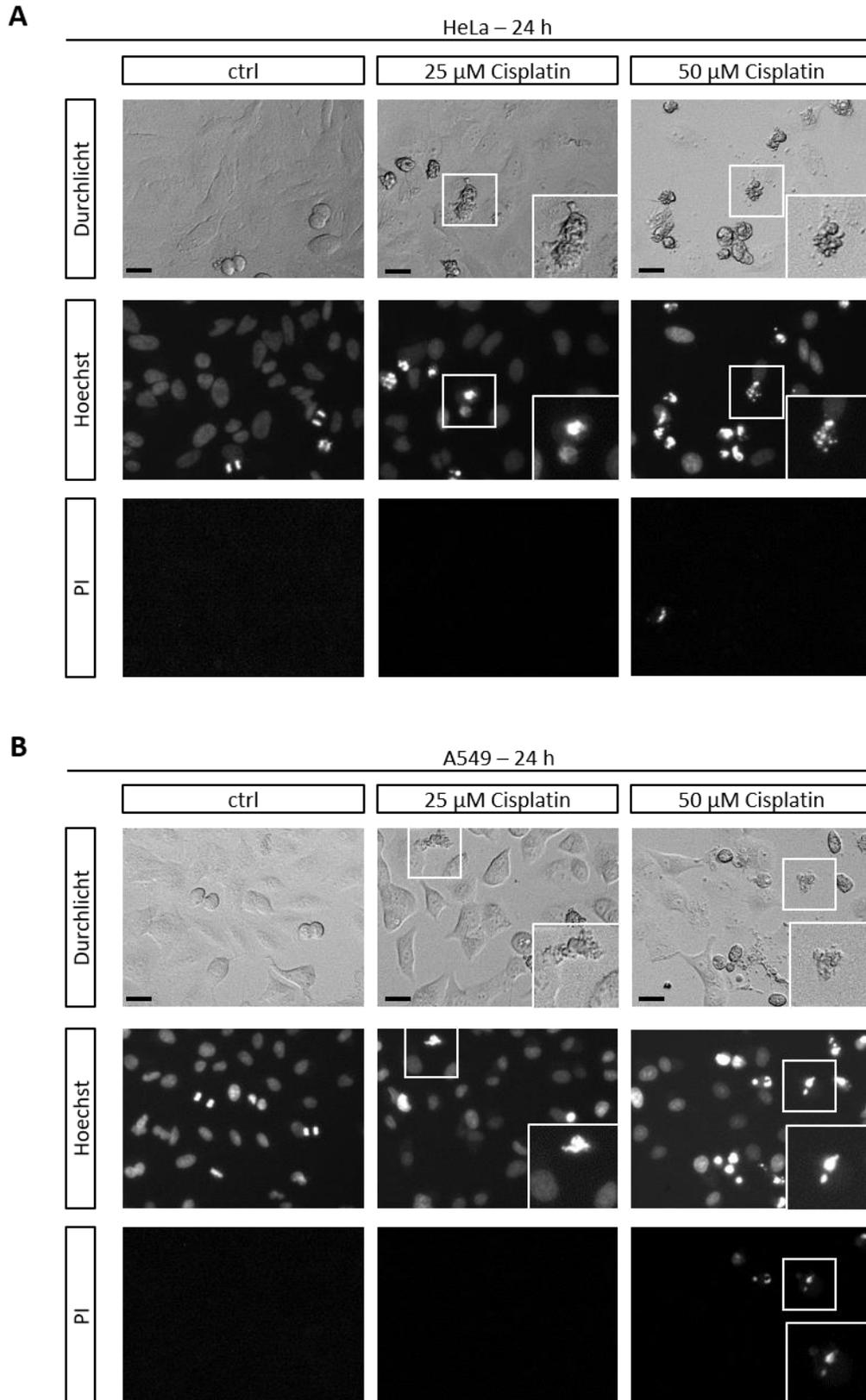


Abbildung 3.2: Cisplatin induziert die typischen phänotypischen Kennzeichen der Apoptose auf zytoplasmatischer und nukleärer Ebene. HeLa (A) und A549 (B) wurden für 24 Stunden mit Cisplatin (25 bzw. 50 μ M) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der für die quantitative Auswertung der in **Abbildung 3.1** verwendeten Versuche. Maßstab 50 μ m.

antiproliferative Wirkung verantwortlich ist (L Galluzzi et al., 2012; Siddik, 2003). Übersteigt jedoch die DNA-Schädigung die zellulären Reparaturkapazitäten, wird Apoptose initiiert (Giglia-Mari et al., 2011). Auch die Verwendung der zwei Cisplatin-Konzentrationen spiegelt in HeLa und A549 wider, dass die Hemmung der Zellproliferation der Apoptose-Initiation vorausgeht: Bereits die niedrigere Cisplatin-Konzentration war ausreichend für einen antiproliferativen Effekt. Im Gegensatz dazu wurde die Apoptose-Initiation durch Erhöhung der Cisplatin-Konzentration verstärkt. Der Auslösung eines Zellzyklusarrests und Apoptose liegen komplexe Signaltransduktionswege zugrunde, die ihren Anfang mit der Detektion von DNA-Schäden nehmen. Im Falle von Cisplatin verläuft die Schadensdetektion über die DNA-Schadenssensoren ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und die nachgeschalteten Checkpoint-Kinasen 1 und 2 (Chk1/2). Ihnen ist wiederum das Tumorsuppressorprotein p53 nachgeschaltet (L Galluzzi et al., 2012; Siddik, 2003). Insbesondere p53 spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusinhibition und der Apoptose-Initiation, da es als Transkriptionsfaktor sowohl zellzyklushemmende, wie auch pro-apoptische Gene reguliert (L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001; Reinhardt & Schumacher, 2012; Siddik, 2003). Es existieren jedoch auch p53-unabhängige Wege einer Zellzyklusinhibition, was insbesondere im Hinblick auf HeLa von Bedeutung ist, da diese durch die Infektion mit einem humanen Papillomvirus funktionell p53-defizient sind (Scheffner et al., 1991). Neben der Möglichkeit, dass ATM und ATR über die Checkpoint-Kinasen p53-unabhängig die zellzyklusregulatorischen Cyclin-abhängigen Kinasen hemmen, wurde auch eine Rolle der MK2 (MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 2) in der p53-unabhängigen Zellzyklusinhibition nach Cisplatin-Behandlung beschrieben (Reinhardt et al., 2007; Taylor & Stark, 2001). Die Ergebnisse legen somit nahe, dass es sowohl p53-abhängig, wie auch -unabhängig effektiv zur Zellzyklushemmung und Apoptose-Initiation nach Cisplatin-Behandlung kommt.

Beim Vergleich der beiden Zelllinien hinsichtlich des Ausmaßes der Cisplatin-induzierten Apoptose war auffallend, dass die Apoptose-Initiation in HeLa höher ist, wohingegen die Apoptose-Exekution in A549 schneller zu erfolgen scheint. Möglicherweise können diese Unterschiede auch auf eine Beteiligung von p53 zurückgeführt werden. Es kommen aber auch weitere Ursachen für zelltypspezifische Unterschiede in Betracht, da Cisplatin bekannt dafür ist neben den klassischen DNA-Schadenssignalwegen auch eine Reihe weiterer, komplexer Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren. So konnte die Beteiligung verschiedener Proteinkinasen an Cisplatin-induzierter Apoptose gezeigt werden, wie beispielsweise die Tyrosinkinase c-Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), die Kinasen PKC (Proteinkinase C) und Akt, sowie die zur Familie der MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MAPK) gehörenden ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 (Norbury & Hickson, 2001; Siddik, 2003).

Die Aktivierung von p38 in Abhängigkeit der Nukleotidexzissionsreparatur (NER), die die Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden durch Intrastrang-Crosslinks vermittelt, konnte in eigenen Versuchen der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Schreck et al., 2016). Unterschiede in der Stärke und Kinetik der Aktivierung dieser Signalwege könnten somit ursächlich für die beobachteten zelltypspezifischen Unterschiede in der Apoptose-Initiation in HeLa und A549 sein. Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass es zelltypspezifisch zur Interaktion von Cisplatin mit weiteren Zielstrukturen kommt, unabhängig der Bindung von Cisplatin an die DNA. Nur etwa 1-10 % des intrazellulären Cisplatins liegt an die DNA gebunden vor und zytotoxische Effekte konnten auch in kernlosen Zytoplasten beobachtet werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Rolle weiterer Cisplatin-Zielstrukturen, die unabhängig der DNA-schädigenden Wirkung an der Apoptose-Initiation beteiligt sind (L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001). Anfällig für die Bindung von Cisplatin außerhalb des Zellkerns sind zelluläre Nukleophile, wie beispielsweise Proteine, die die schwefelhaltige Aminosäure Cystein enthalten. Cisplatin kann über die Thiol-Gruppe des Cysteins an diese Proteine binden und somit deren Funktion beeinträchtigen. Das antioxidative, cystein-haltige Peptid Glutathion ist dafür bekannt, Cisplatin zu binden, wodurch die Redox-Balance der Zelle beeinflusst wird und Redox-sensitive Signalwege aktiviert werden (L Galluzzi et al., 2012; Norbury & Hickson, 2001; Siddik, 2003). Wahrscheinlich ist, dass eine Zelllinien-spezifische Kombination der genannten Faktoren, die auf genetischen Unterschieden der Zelllinien beruhen, ursächlich für die Unterschiede im Ausmaß der Apoptose-Initiation ist.

Um in zukünftigen Studien auch das Ausmaß der DNA-Schädigung als Ursache für die Apoptose-Initiation berücksichtigen zu können, wurde in dieser Arbeit der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) anhand der Phosphorylierung des Histonproteins H2AX für die Verwendung im 96-Well-Format und die softwaregestützte Analyse optimiert. H2AX wird in Folge von DSB durch ATM, ATR und die DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) im umliegenden Bereich eines DSB phosphoryliert um DNA-Reparaturproteine an den DSB zu rekrutieren (Kuo & Yang, 2008; Olive & Banàth, 2009). Die DNA-schädigende Wirkung von Cisplatin konnte mittels dieser Methode über den Anstieg γ -H2AX-positiver Zellen quantifiziert werden (**Abbildung A.1**). DNA-Doppelstrangbrüche werden durch Cisplatin nicht primär induziert, es kann jedoch durch die Reparatur Cisplatin-vermittelter Intrastrang-Crosslinks über die Nukleotidexzissionsreparatur oder die Blockade und das Kollabieren von Replikationsgabeln durch Interstrang-Crosslinks zu DSBs kommen (L Galluzzi et al., 2012; Olive & Banàth, 2009). Die Methode eignet sich somit gut um in zukünftigen Studien im Hochdurchsatz-Verfahren das DNA-schädigende Potenzial verschiedener Substanzen, sowie Unterschiede in Abhängigkeit der Zelllinie, zu untersuchen.

3.1.2 Die Cisplatin-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig

Zu den bekanntesten Regulatoren der Apoptose-Exekution gehören Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*). Durch ihre proteolytische Aktivität und die daraus resultierende Aktivierung einer Vielzahl nachgeschalteter Mechanismen, initiieren sie die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose (Atkin-Smith & Poon, 2016; Häcker, 2000; Taylor et al., 2008). Ihre Aktivierung gilt somit als wichtiges Kennzeichen apoptotischen Zelltods und kann über den extrinsischen, wie auch den intrinsischen Apoptose-Signalweg stattfinden. Dennoch können Teilschritte der Apoptose-Exekution, wie beispielsweise die Fragmentierung der DNA, Caspase-unabhängig erfolgen und auch die Diskussion zur Existenz Caspase-unabhängiger Apoptose oder Apoptose-ähnlichen Zelltods ist nach wie vor nicht abgeschlossen (Broker et al., 2005; Chipuk & Green, 2005; Leist & Jäätelä, 2001; Michels et al., 2013; Prokhorova et al., 2015). Um die Caspase-Abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Apoptose zu überprüfen wurde der pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh verwendet. Mit steigender Inhibitor-Konzentration wird in beiden Zelllinien unabhängig der Cisplatin-Konzentration der Zelltod nach 24- und 48-stündiger Cisplatin-Behandlung reduziert (**Abbildung 3.3A-D**), was die Caspase-Abhängigkeit deutlich zeigt. Die niedrigste Q-VD-Konzentration (2,5 μM) führt bei beiden Zelllinien zu einer Verzögerung der Apoptose-Exekution, was insbesondere nach 48-stündiger Behandlung durch die Verschiebung der Zelltodanteile zu frühapoptotischen Stadien auffällig ist. In mittlerer (10 μM) und höchster (20 μM) Inhibitor-Konzentration wird in HeLa-Zellen die Cisplatin-induzierte Apoptose komplett gehemmt. Interessanter Weise wird dagegen in A549 keine vollständige Hemmung des Zelltods erreicht, insbesondere nach 48 Stunden wird erneut eine Verzögerung durch das verstärkte Auftreten frühapoptotischer Zellen deutlich. Die antiproliferative Wirkung von Cisplatin erfolgt dagegen Caspase-unabhängig, da die Zellzahlreduktion nach Cisplatin-Behandlung nicht durch Hemmung der Caspasen beeinflusst wird.

Interessant ist nun die Frage, wie sich die Hemmung der Caspasen auf die apoptotische Morphologie auswirkt, da Caspasen zu den bisher am besten etablierten Regulatoren der apoptotischen Morphologie zählen (Häcker, 2000; Taylor et al., 2008). Wie die repräsentativen Bilder beider Zelllinien zeigen (**Abbildung 3.4** und **Abbildung 3.5**), wird durch Caspase-Inhibition das Auftreten der charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose deutlich verringert, in HeLa bei 24-stündiger Cisplatin-Behandlung und hoher Konzentration des Caspase-Inhibitors (20 μM) vollständig. Interessanterweise sind die frühapoptotischen Zellen, die bei niedriger Konzentration (2,5 μM) des Caspase-Inhibitors bei beiden Zelllinien nach Cisplatin-Behandlung auftreten, überwiegend durch Abrunden des Zellkörpers und DNA-Kondensation gekennzeichnet. Membran-Blebbing oder Kernfragmentierung sind hingegen nicht zu beobachten. Das Abrunden

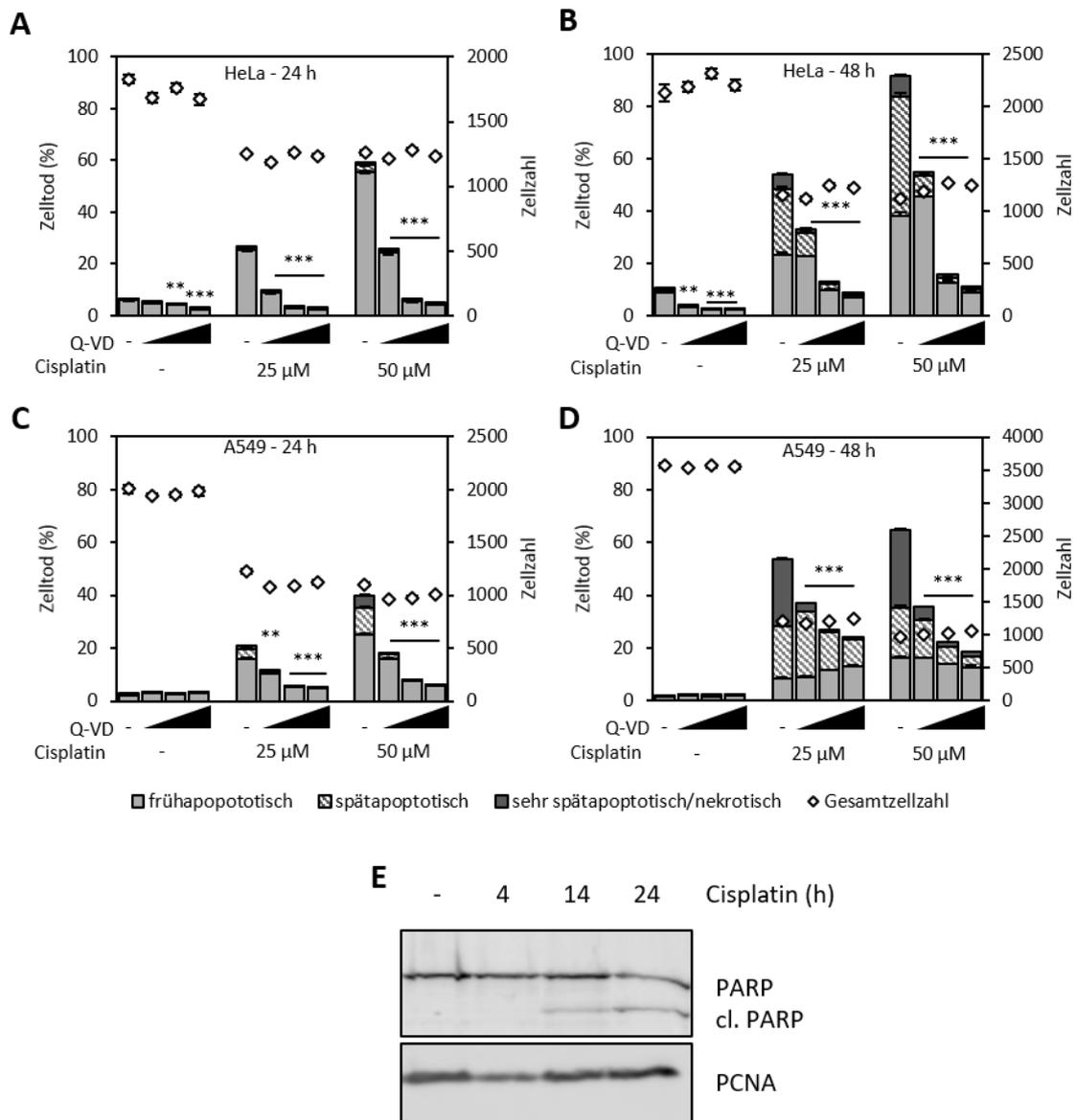


Abbildung 3.3: Cisplatin-induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig. A-D HeLa (A, B) und A549 (C, D) wurden mit dem pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph (2,5, 10, 20 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Cisplatin (25 bzw. 50 μ M) oder Medium (-) für 24 bzw. 48 Stunden behandelt. Die Gesamtzellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien (%) (früh-, spät- und sehr spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen) wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärben der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 2 Replikaten (HeLa), bzw. von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten (A549). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle ohne Inhibitor wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$. E A549 wurden mit Cisplatin (50 μ M) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt bzw. für 24 Stunden mit Medium (-). Anschließend wurden PARP und dessen Caspase-Spaltprodukt (cl. PARP) im Western Blot detektiert. PCNA diente als Ladekontrolle. Es ist ein repräsentativer Blot von 2 unabhängigen Experimenten abgebildet.

der Zellen ist jedoch auch bei höheren Konzentrationen des Caspase-Inhibitors nach 24 (A549) und 48 Stunden (A549 und HeLa) noch zu beobachten, jedoch ohne begleitende DNA-Kondensation oder andere Charakteristika apoptotischer Morphologie. Dies würde darauf hinweisen, dass für das Abrunden der Zellen eine geringere Caspase-Aktivität ausreichend ist als für weitere morphologische Veränderungen wie das Membran-Blebbing, die DNA-Kondensation oder Kernfragmentierung. Darüber hinaus könnte das Abrunden der Zellen auch durch alternative, nicht Caspase-abhängige Signalwege erfolgen. Auffällig ist auch das verstärkte Auftreten vakuolisierter Zellen bei Cisplatin-Behandlung und gleichzeitiger Hemmung der Caspasen, insbesondere bei Verwendung der niedrigen Inhibitor-Konzentration (2,5 μM). Da eine massive Vakuolisierung als Kennzeichen von Zelltod mit Autophagie gilt (Kroemer et al., 2009), deuten die beobachteten Vakuolen möglicherweise auf autophagische Prozesse hin.

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Caspase-Abhängigkeit des Cisplatin-induzierten Zelltods wurde auch die Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) auf Proteinebene im Western Blot untersucht. PARP, das unter nicht-apoptotischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden spielt, wird während der Apoptose von Caspase-3 gespalten und dadurch inaktiviert. Die Inaktivierung energieaufwändiger Prozesse, wie die DNA-Reparatur, findet unter apoptotischen Bedingungen zu Gunsten der Nutzung der Energie für die ebenfalls energieaufwändige Apoptose-Exekution statt (Bernstein et al., 2002). Bereits nach 14 Stunden konnte in A549 die Spaltung von PARP detektiert werden, die nach 24 Stunden noch deutlicher wird (**Abbildung 3.3E**), was eine weitere Bestätigung für die Caspase-abhängige Apoptose-Exekution nach Cisplatin-Behandlung ist.

Die Caspase-Abhängigkeit der Cisplatin-induzierten Apoptose konnte in HeLa und A549 bestätigt werden, jedoch scheinen nicht alle Schritte der Apoptose-Exekution gleichermaßen auf Caspase-Aktivität angewiesen zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass insbesondere das zu Beginn der Apoptose-Exekution auftretende Abrunden der Zellen auch Caspase-unabhängig erfolgen könnte. Da jedoch eine Beteiligung der Caspasen über die proteolytische Spaltung von Zelladhäsionsproteinen an diesem Prozess als etabliert gilt (Oropesa-Avila et al., 2013; Taylor et al., 2008; Wen et al., 1997), muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass trotz hoher Inhibitor-Konzentration keine vollständige Caspase-Hemmung vorliegt. Die verbliebene Restaktivität der Caspasen könnte somit ausreichend sein, um die morphologischen Veränderungen hervorzurufen. Es ist jedoch auch möglich, dass die proteolytische Funktion der Caspasen bei deren Hemmung teilweise von anderen Proteasen übernommen werden könnte. Dies könnte beispielsweise durch Calpaine oder Cathepsine geschehen, die ebenfalls an der Apoptose-Exekution beteiligt sein können (Broker et al., 2005). Für diese Möglichkeit spricht eben-

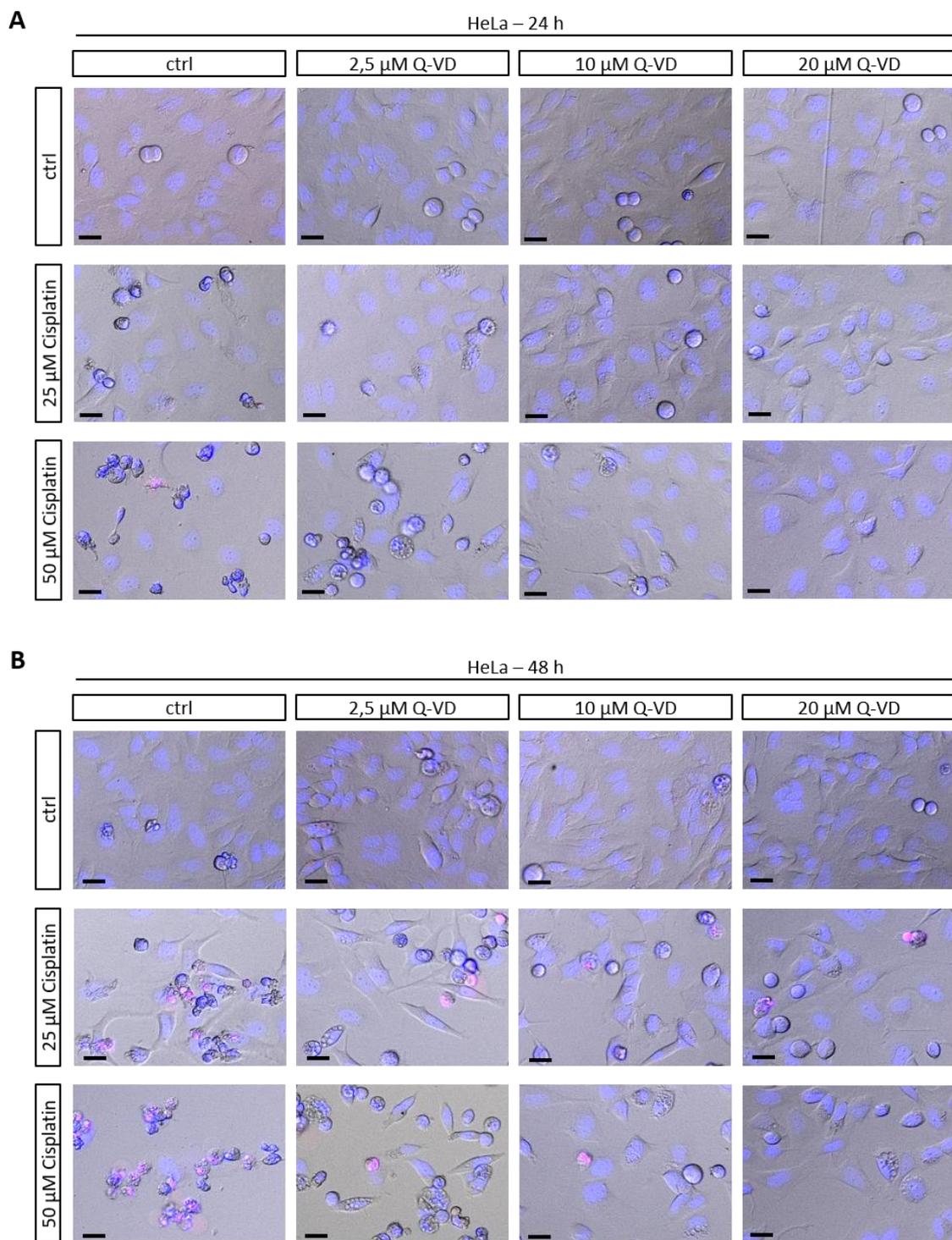


Abbildung 3.4: Unterschiedlich starke Hemmung der Caspasen blockiert selektiv verschiedene phänotypische Merkmale der Apoptose in HeLa-Zellen. Insbesondere bei niedriger Konzentration des Caspase-Inhibitors kommt es verstärkt zur Vakuolisierung der Zellen, wobei das Abrunden der Zellen, sowie die DNA-Kondensation nicht vollständig gehemmt werden. HeLa wurden mit dem pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH (2,5, 10, 20 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 24 (**A**) bzw. 48 (**B**) Stunden mit Cisplatin (25 bzw. 50 μ M) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) der für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.3** verwendeten Versuche. Maßstab 50 μ m.

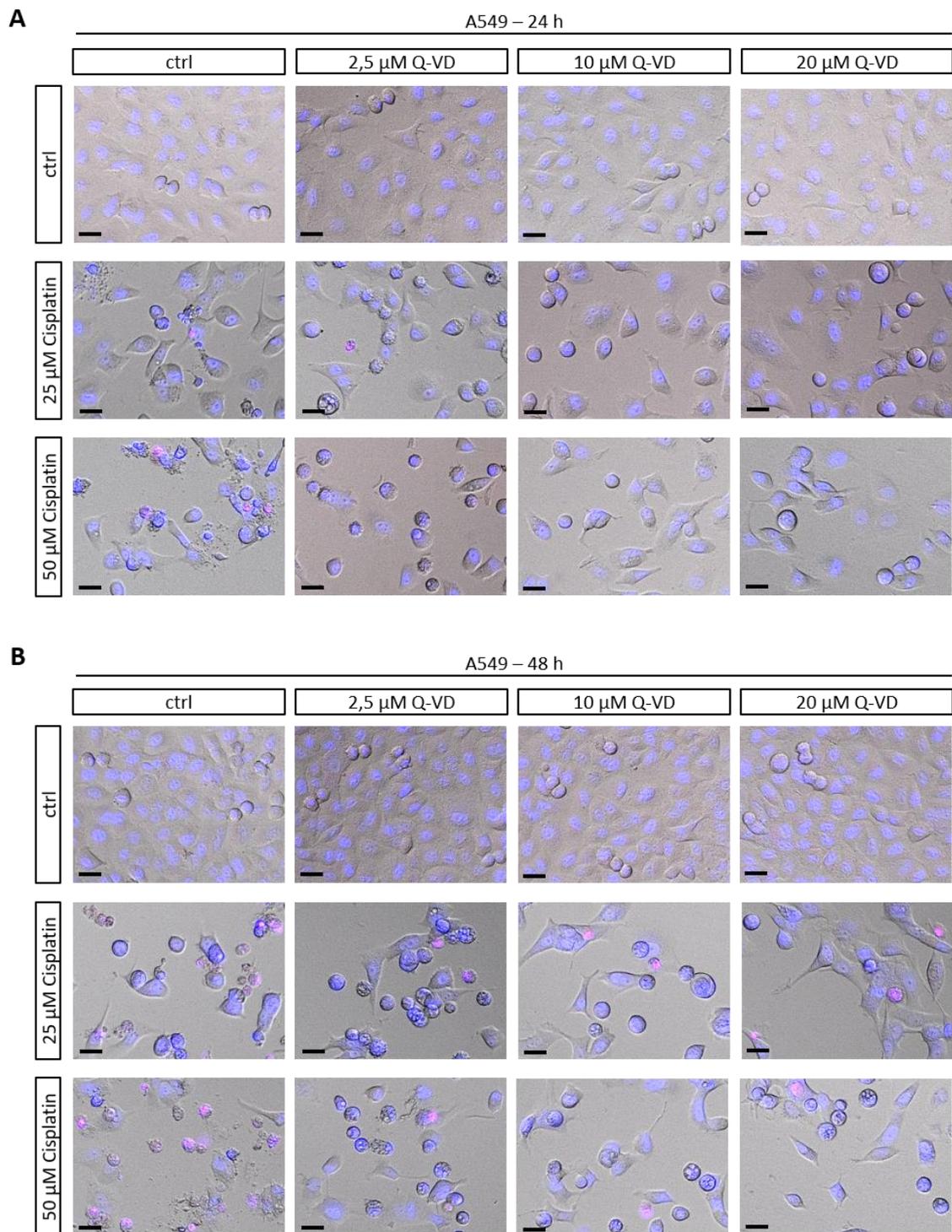


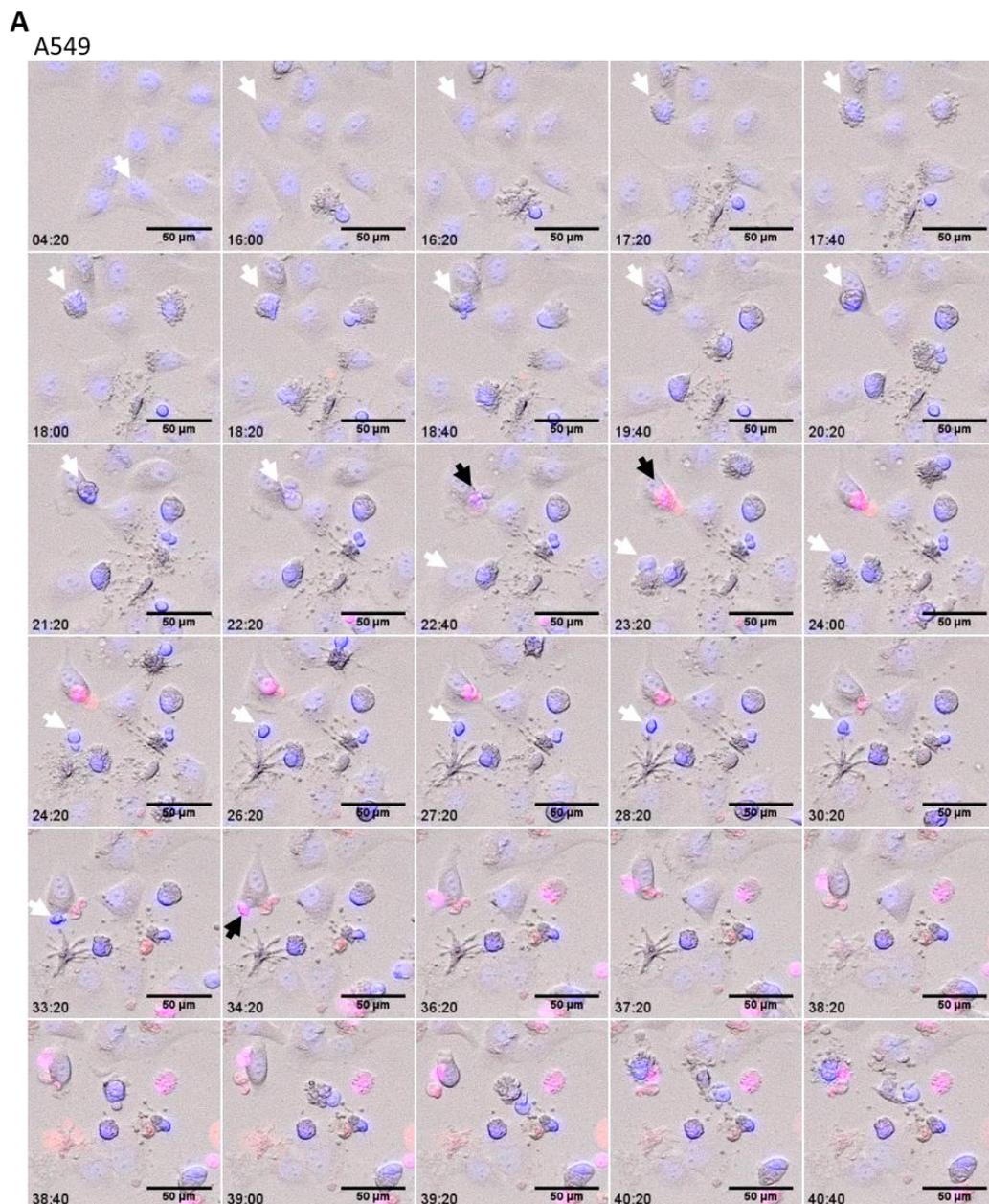
Abbildung 3.5: Unterschiedlich starke Hemmung der Caspasen blockiert selektiv verschiedene phänotypische Merkmale der Apoptose in A549-Zellen. Insbesondere bei niedriger Konzentration des Caspase-Inhibitors kommt es verstärkt zur Vakuolisierung der Zellen, wobei das Abrunden der Zellen, sowie die DNA-Kondensation nicht vollständig gehemmt werden. A549 wurden mit dem pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH (2,5, 10, 20 μM) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend für 24 (**A**) bzw. 48 (**B**) Stunden mit Cisplatin (25 bzw. 50 μM) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) der für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.3** verwendeten Versuche. Maßstab 50 μm .

falls die Tatsache, dass die Auflösung von Zelladhäsionskontakten, die für das Abrunden apoptotischer Zellen erforderlich ist, neben Caspasen auch durch Calpaine möglich erscheint. Diesbezüglich konnte die Spaltung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), einem Bestandteil von Zelladhäsionskomplexen, durch Calpain in zellfreien *in vitro*-Versuchen gezeigt werden (Cooray et al., 1996). Darüber hinaus gelten als Caspase-unabhängige Mediatoren der Chromatinkondensation die Nukleasen EndoG (Endonuklease G) und AIF (*apoptosis-inducing factor*), die nach Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran in den Zellkern translozieren und dort ihre Wirkung entfalten (Broker et al., 2005; Prokhorova et al., 2015). Die Beteiligung von AIF an Cisplatin-induzierter Apoptose unabhängig von Caspasen konnte bereits bestätigt werden (Liu et al., 2007). Möglicherweise tragen diese Caspase-unabhängigen Mechanismen zum Auftreten der verbleibenden apoptotischen Morphologie und Apoptose-Exekution bei.

Die Hemmung von Caspasen kann auch zur Induktion alternativer Zelltodarten, wie Nekroptose, führen. Nekroptose wurde als eine aktiv regulierte Zelltodform identifiziert, die unter Bedingungen von Caspase-Inhibition durch apoptotische Stimuli auftreten kann (Galluzzi et al., 2011; Tait et al., 2014). Nekroptose unterscheidet sich jedoch morphologisch stark von Apoptose durch ein Anschwellen der Zellen und fehlende DNA-Kondensation (Fuchs & Steller, 2015). Da derartige morphologische Veränderungen in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnten, kann die Beteiligung von Nekroptose am Cisplatin-induzierten Zelltod unter Caspase-Hemmung ausgeschlossen werden. Vielmehr scheinen autophagische Prozesse unter zytotoxischen Bedingungen bei Hemmung der Caspasen eine Rolle zu spielen. Autophagie wurde ursprünglich als ein protektiver, überlebensfördernder Prozess identifiziert, der in Stresssituationen durch Recycling intrazellulärer Bestandteile der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase dient. (Lockshin & Zakeri, 2004). Eine Vernetzung von Autophagie und Apoptose besteht über Caspasen, da Caspasen durch die Spaltung pro-autophagischer Proteine wie Beclin-1 Autophagie in apoptotischen Zellen inhibieren (Tait et al., 2014; Zhu et al., 2010). Durch die Veränderung der Level aktivierter Caspasen durch den Caspase-Inhibitor könnte somit die anti-autophagische Wirkung der Caspasen entfallen, worauf die Beobachtung einer verstärkten Vakuolisierung beruhen könnte.

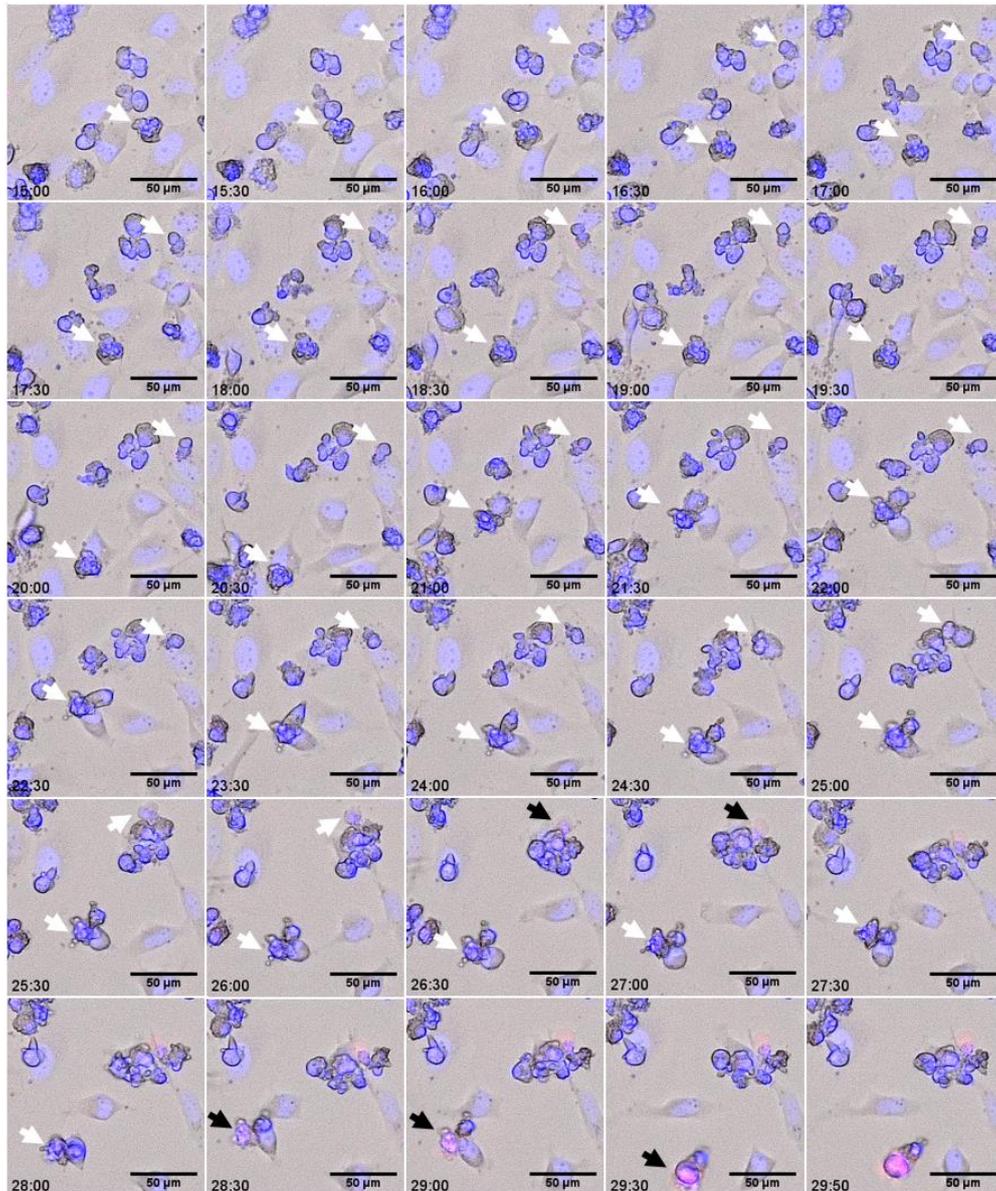
3.1.3 Der Verlust der Plasmamembranintegrität nach Cisplatin-Behandlung erfolgt im späten Verlauf der Apoptose-Exekution

Die Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität ist neben der Morphologie ein bedeutendes Charakteristikum der Apoptose. Erst dadurch ist es möglich, eine Zelle zu degradieren ohne pro-inflammatorische Zellbestandteile in das umliegende Gewebe freizusetzen, was Apoptose von nekrotischem Zelltod abgrenzt. Da *in vitro*, im Gegensatz zur Situation *in vivo*, jedoch die Überreste apoptotischer Zellen in der Regel nicht von Makrophagen beseitigt werden, kann bei apoptotischen Zellen *in vitro* der Verlust der Plasmamembranintegrität beobachtet werden. Dieser Pro-



B

HeLa

**C**

Kernkondensation - Membranschädigung	HeLa (%)	A549 (%)
< 15 h	20	82
> 15 h	80	18
<i>n=</i>	235	120

Abbildung 3.6: Der Verlust der Plasmamembranintegrität erfolgt im späten Verlauf der Apoptose. A549 (A) und HeLa (B) wurden mit Cisplatin (50 µM) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatinbehandlung. Mit weißem Pfeil sind jeweils 2 Zellen im zeitlichen Verlauf während der Apoptose-Exekution markiert, schwarze Pfeile zeigen den Verlust der Zellmembranintegrität an. C Manuelle Quantifizierung der Zeitspanne von Kernkondensation bis zum Verlust der Zellmembranintegrität in weniger oder mehr als 15 Stunden in der jeweiligen Zelle. Die Quantifizierung erfolgte aus zwei unabhängigen Experimenten je Zelllinie.

zess wird sekundäre Nekrose genannt (Krysko et al., 2008; Oropesa-Avila et al., 2013; Rogers et al., 2017; Vanden Berghe et al., 2013). Wie die statische Analyse des Cisplatin-induzierten Zelltods nach 24 bzw. 48 Stunden Behandlung in den vorausgegangenen Kapiteln bereits zeigte, tritt die Plasmamembranschädigung in A549 früher auf als in HeLa. So hatte in A549 bereits nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung ein deutlicher Anteil apoptotischer Zellen die Integrität der Plasmamembran verloren und wurde daher als spät- bzw. sehr spätapoptotisch klassifiziert, in HeLa dagegen erst nach 48-stündiger Behandlung (**Abbildung 3.3**). Um sicherzustellen, dass die als spät- bzw. sehr spätapoptotisch klassifizierten Zellen tatsächlich aus apoptotischen Zellen hervorgehen und um die Dynamik dieses Prozesses zu untersuchen, wurden manuell apoptotische Zellen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung analysiert. Die Analysen zeigen, dass in A549, wie auch in HeLa, die Schädigung der Plasmamembran erst im späten Verlauf der Apoptose-Exekution auftritt. So haben die apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt der Plasmamembranschädigung bereits die morphologischen Stadien wie das Abrunden der Zelle und das Membran-Blebbing, die Kernkondensation und Kernfragmentierung durchlaufen. In **Abbildung 3.6A** und **B** sind repräsentative Bildausschnitte dargestellt. Zusätzlich wurde das Zeitintervall zwischen dem Stadium der abgerundeten Zelle mit Kernkondensation und dem Verlust der Plasmamembranintegrität manuell auf Einzelzellebene als größer oder kleiner 15 Stunden bestimmt (**Abbildung 3.6C**). Dabei ergibt sich ein inverses Bild: Während in A549 ca. 80 % der Zellen in weniger als 15 Stunden nach Zellkernkondensation die Integrität der Plasmamembran verlieren, sind es in HeLa gerade einmal 20 %. Damit bestätigen sich die vorausgegangenen Analysen, dass zwar in beiden Zelllinien der Verlust der Plasmamembranintegrität im späten Verlauf der Apoptose-Exekution erfolgt, in A549 jedoch deutlich schneller. Außerdem zeigen die zeitkinetischen Aufnahmen, dass in sehr spätapoptotischen Zellen mit geschädigter Plasmamembran aufgrund passiven Auslaufens der Zelle auch die Hoechst-Intensität wieder abnimmt. Dies ist die Ursache, dass sehr spätapoptotische Zellen bei softwaregestützter Quantifizierung, wie in den vorausgegangenen Abbildungen, nicht mehr von nekrotischen Zellen zu unterscheiden sind. Die Aufnahmen im zeitlichen Verlauf zeigen jedoch deutlich, dass diese Zellen aus apoptotischen Zellen hervorgehen. Diese Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutsamkeit zeitkinetischer, bildbasierter Analysen bei Zelltodstudien um zytotoxische Effekte und ihre zugrunde liegenden Zelltodformen richtig einordnen zu können. Ein Teil der zeitkinetischen Untersuchungen in HeLa-Zellen wurde von Patricia Muschong während ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung angefertigt.

Um eine geordnete Apoptose-Exekution zu gewährleisten, ist die Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität essentiell. Kommt es zu einer vorzeitigen Permeabilisierung der Plasmamembran kann dies *in vivo* eine Entzündungsreaktion hervorrufen, die eine Gewebeschädigung als

Konsequenz haben kann. Die Apoptose-Exekution ist ein, wenn auch kontrollierter, destruktiver Vorgang. Umso erstaunlicher ist, wie es eine apoptotische Zelle bewerkstelligt die Plasmamembran in einer von proteolytischem Abbau gekennzeichneten Umgebung während der Apoptose-Exekution bis zuletzt intakt zu erhalten. Neuere Studien konnten zeigen, dass während der Apoptose-Exekution Mikrotubuli des Zytoskeletts ein Netzwerk um die Plasmamembran bilden, das sogenannte apoptotische Mikrotubuli-Netzwerk (AMN, *apoptotic microtubule network*) (Atkin-Smith & Poon, 2016; Oropesa-Avila et al., 2013; Sánchez-Alcázar et al., 2007). Dieses Netzwerk dient als physische Barriere um an der Plasmamembran eine Protease-freie Zone aufrecht zu erhalten, bis die apoptotische Zelle phagozytiert wird. Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen scheinen noch ungeklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Bildung des AMNs Caspase-unabhängig, jedoch in Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration erfolgt (Sánchez-Alcázar et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass es Caspasen nach der Zerstörung des AMNs in apoptotischen Zellen mittels Colchizin möglich ist Proteine der Plasmamembran zu spalten. Damit einher gingen eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembran, die Störung der zellulären Ionenhomeostase und der bioenergetische Kollaps der Zelle, wodurch die apoptotischen Zellen in die sekundäre Nekrose übergingen (Oropesa-Avila et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für den schnelleren Verlust der Plasmamembranintegrität in A549 verglichen mit HeLa könnte demnach darin liegen, dass in A549 das AMN schneller durch proteolytische Prozesse während der Apoptose-Exekution abgebaut wird. Dadurch könnten Caspasen schneller und verstärkt die Plasmamembran erreichen und dort durch ihre proteolytische Aktivität die Schädigung der Plasmamembran hervorrufen. Interessanterweise konnte kürzlich in einer Studie ein Caspase-Spaltprodukt identifiziert werden, über das in apoptotischen Zellen die sekundäre Nekrose herbeigeführt werden kann (Rogers et al., 2017). Dabei kommt es durch die Caspase-3-vermittelte Spaltung des Proteins DFNA5 (*deafness associated tumor suppressor*) im Verlauf der Apoptose-Exekution zur Translokation des Spaltprodukts zur Zellmembran. Dort führt es über die Bildung von Poren zur Permeabilisierung der Membran und löst somit die sekundäre Nekrose aus (Rogers et al., 2017). Unterschiedliche Expressionslevel von DFNA5 in A549 gegenüber HeLa oder Unterschiede in der Kinetik der Caspase-vermittelten Spaltung von DFNA5 zwischen den beiden Zelllinien, könnten somit ebenfalls zum schnelleren Verlust der Plasmamembranintegrität in A549 beitragen.

3.1.4 Cisplatin führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials

Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse ein. Da sie sowohl für die zelluläre Energiegewinnung, wie auch für die Apoptose-Exekution über den intrinsischen Signalweg unerlässlich sind, stellen sie eine bedeutende Schnittstelle in der Zellphysiologie dar (Bhola & Letai, 2016; Lorenzo Galluzzi et al., 2012). Dem intrinsischen Apoptose-Signalweg liegt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilisation*) zugrunde und der damit verbundenen Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine, wie Cytochrom c. Letzteres ist ein Schlüsselmolekül in der Aktivierung der Caspase-Kaskade über Caspase-9 (Galluzzi et al., 2009; Lorenzo Galluzzi et al., 2012; Tait & Green, 2008). Mit der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran geht auch der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials über die innere Mitochondrienmembran einher, wodurch die mitochondriale Energiegewinnung der Zelle zusammenbricht. Daher gilt MOMP als *point of no return* hinsichtlich der Apoptose-Exekution (Galluzzi et al., 2009; Lorenzo Galluzzi et al., 2012; Tait & Green, 2008). Fluoreszenzmikroskopisch lässt sich MOMP über den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials durch den Einsatz kationischer Fluoreszenzfarbstoffe, wie TMRE (Tetramethylrhodamin-Ethylester) nachweisen. In intakten Mitochondrien akkumuliert TMRE auf Grund des negativen mitochondrialen Potenzials. Beim Verlust des mitochondrialen Membran-

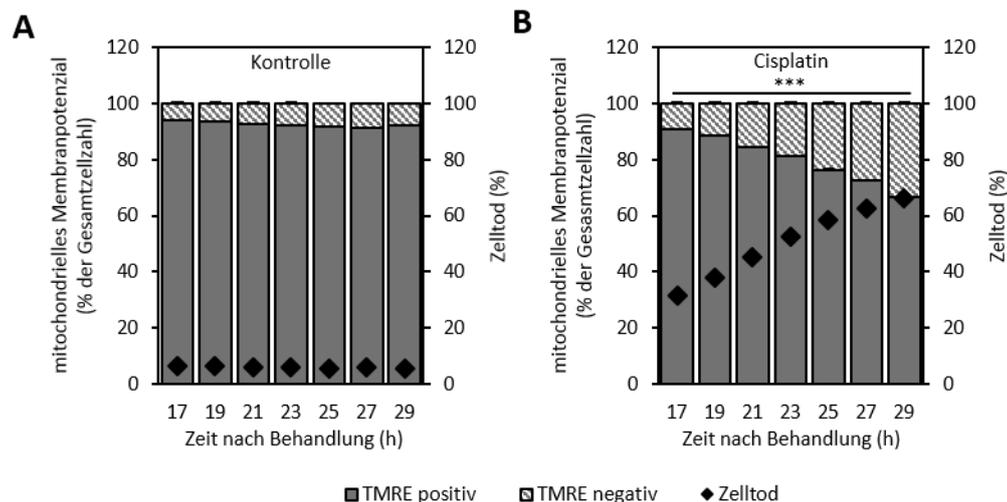


Abbildung 3.7: Cisplatin-induzierter Zelltod korreliert mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials. HeLa wurden mit Cisplatin (50 μ M) (B) oder Medium (Kontrolle) (A) behandelt. Die Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials, sowie des Zelltods erfolgte mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie als Zeitverlaufsanalyse. Die Zellen wurden dazu jeweils zur Hälfte mit Hoechst und TMRE bzw. Hoechst und PI angefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 8 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede im Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und des Zelltods zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (***) p < 0,001).

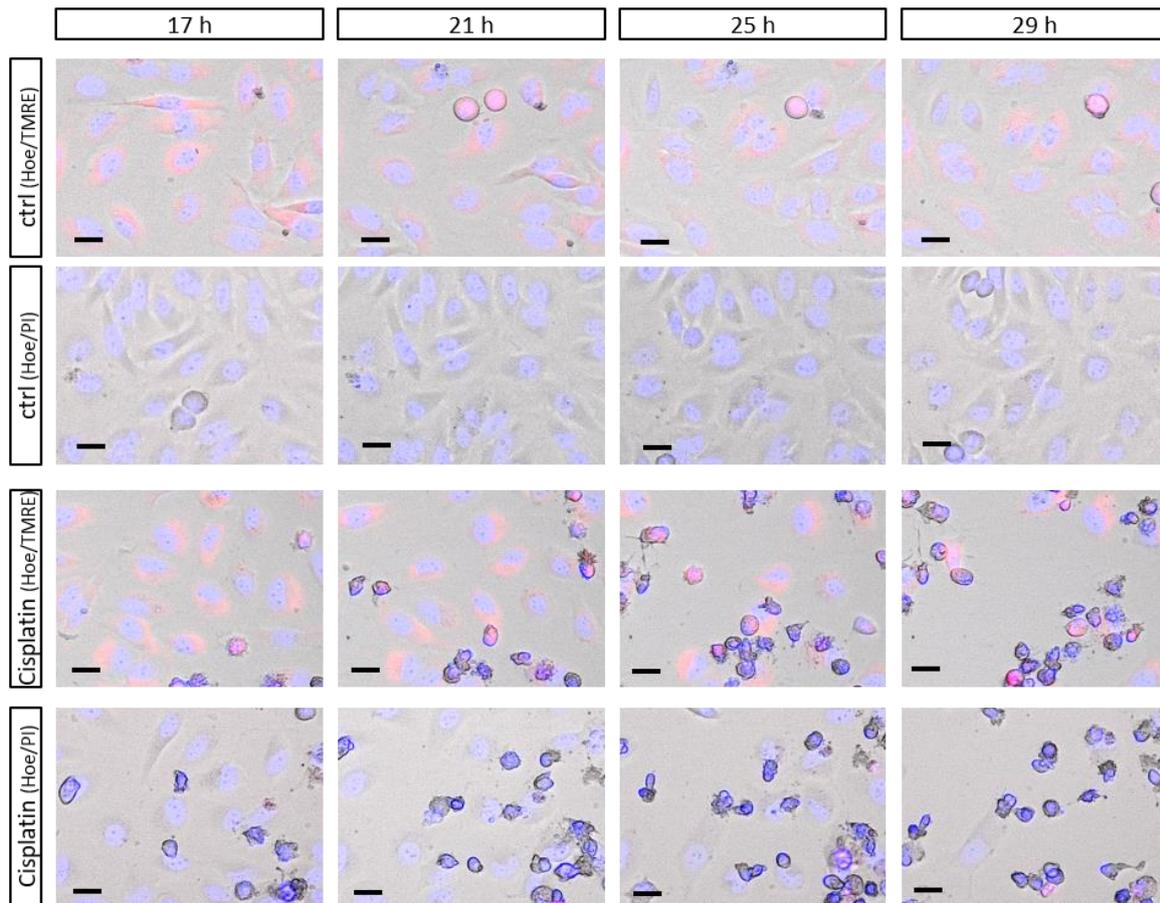


Abbildung 3.8: Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials korreliert mit dem induzierten Zelltod nach Cisplatin-Behandlung. Zellen mit bereits apoptotischer Morphologie können jedoch noch ein schwaches mitochondrielles Membranpotenzial aufweisen. HeLa wurden mit Cisplatin ($50\mu\text{M}$) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Die Zellen wurden jeweils zur Hälfte mit Hoechst und TMRE bzw. Hoechst und PI angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und TMRE- bzw. PI-Kanal (rot) der für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.7** verwendeten Versuche. Maßstab $50\ \mu\text{m}$.

potenzials verliert sich somit auch die TMRE-Färbung. Zur parallelen Analyse des Zelltods und des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials wurde ein Teil der Zellen mit Hoechst und PI, der andere mit Hoechst und TMRE angefärbt. Wie in **Abbildung 3.7** zu erkennen, korrelieren der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (Anteil TMRE-negativer Zellen) und der induzierte Zelltod nach Cisplatin-Behandlung, was eine Beteiligung des intrinsischen, Mitochondrien-abhängigen Signalwegs an der Apoptose-Exekution nahelegt. Auffällig ist dabei jedoch, dass unabhängig des Behandlungszeitpunkts der Anteil toter Zellen größer ist als der Anteil an TMRE-negativen Zellen, die das mitochondrielle Membranpotenzial bereits verloren haben. Dies würde bedeuten, dass in einem Teil der Zellen Apoptose über den extrinsischen Signalweg ausgelöst würde, bei dem es unabhängig der Permeabilisierung der Mitochondrien zur Aktivierung der

Caspase-Kaskade über Caspase-8 und damit zur Apoptose-Exekution kommt (Lorenzo Galluzzi et al., 2012; Tait & Green, 2008).

Die Differenz zwischen den Anteilen der als tot, bzw. als TMRE-negativ klassifizierten Zellen hängt jedoch auch mit der Analysemethode zusammen, da eine Zelle softwaregestützt erst als TMRE-negativ detektiert wird, wenn nahezu alle Mitochondrien ihr Membranpotenzial verloren haben. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (**Abbildung 3.8**) zeigen jedoch deutlich, dass in Zellen häufig noch ein schwaches TMRE-Signal zu beobachten ist, obwohl diese bereits durch DNA-Kondensation gekennzeichnet sind und somit als tot klassifiziert werden. Dieses schwache TMRE-Signal einer Zelle wird dadurch verursacht, dass noch nicht alle Mitochondrien der Zelle ihr Membranpotenzial verloren haben. Somit werden diese Zellen noch als TMRE-positiv eingestuft, obwohl bereits bei einem Teil der Mitochondrien das Membranpotenzial verloren wurde. Andere Zellen, die ebenfalls apoptotische Kennzeichen wie DNA-Kondensation aufweisen und somit durch die Software als tot klassifiziert werden, zeigen dagegen noch ein deutliches TMRE-Signal, sodass die Apoptose-Exekution in diesen Zellen möglicherweise tatsächlich durch den extrinsischen Apoptose-Signalweg ausgelöst wird. Nachfolgend werden Zeitverlaufsanalysen auf Einzelzellebene durchgeführt um den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials im zeitlichen Zusammenhang mit dem Beginn der Apoptose-Exekution differenzierter zu untersuchen. Um auch die Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Signalweges an der Apoptose-Exekution weiterführend zu analysieren, wird der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials bei gleichzeitiger Caspase-Hemmung betrachtet. Die Versuche zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in diesem Kapitel wurden von Patricia Muschong und Michelle Dierolf unter meiner Betreuung während ihrer Bachelorarbeiten durchgeführt.

3.1.5 Die Einzelzell-Analyse zeigt zwei verschiedene Phänotypen des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials

Um den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials im zeitlichen Zusammenspiel mit dem Auftreten der apoptotischen Morphologie zu untersuchen, wurden auf Einzelzellebene manuell apoptotische Zellen im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung analysiert und quantifiziert. Dabei zeigten sich zwei dominierende Phänotypen in der Gesamtzellpopulation: Ein Phänotyp ist charakterisiert durch einen partiellen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials kurz vor der DNA-Kondensation (sichtbar durch den Anstieg der Hoechst-Intensität) (**Abbildung 3.9**), wohingegen der andere Phänotyp ein konstantes mitochondrielles Membranpotenzial vor der DNA-Kondensation aufweist (**Abbildung 3.10**). Beide Phänotypen treten mit ähnlicher Häufigkeit auf (**Abbildung 3.11**). Im Falle eines partiellen Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials tritt

dieser kurz vor der Zellkernkondensation auf und somit zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keinerlei Merkmale der apoptotischen Morphologie beobachtet werden können (**Abbildung 3.9A**). Dieser plötzliche Abfall der TMRE-Intensität deutet somit auf die Apoptose-Exekution in dieser Zelle über den intrinsischen Signalweg hin. Der zweite beobachtete Phänotyp zeigt dagegen ein konstantes mitochondrielles Membranpotenzial vor Auftreten der ersten morphologischen Kennzeichen der Apoptose-Exekution (**Abbildung 3.10A**). Die konstante TMRE-Intensität weist damit möglicherweise auf die Initiation der Apoptose-Exekution über den extrinsischen Signalweg in diesen Zellen hin. Der vollständige Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials einer Zelle tritt bei beiden Phänotypen erst nach dem Durchlaufen der weiteren Apoptose-typischen morphologischen Veränderungen, wie dem Membran-Blebbing, der Abnahme der Zellgröße, sowie der Fragmentierung des Zellkerns und der DNA, auf. Für beide Phänotypen wurde diese Zeitspanne vom Auftreten der Zellkernkondensation bis zum vollständigen Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials quantifiziert, um kinetische Unterschiede zu berücksichtigen. Mit einer durchschnittlichen Dauer von ca. 5 Stunden unterschieden sich die beiden Phänotypen jedoch nicht was diese Zeitspanne betrifft (**Abbildung 3.9B**, **Abbildung 3.10B**). Auch die Streuung der minimalen bzw. maximalen Dauer in den dargestellten Histogrammen unterscheidet sich mit 1-12 Stunden im Falle des Phänotyps mit partiellem TMRE-Verlust vor der Zellkernkondensation, bzw. 2-11 Stunden beim Phänotyp mit konstantem TMRE-Signal, nicht. Neben einer möglichen Beteiligung des extrinsischen Signalwegs an der Apoptose-Exekution nach Cisplatin-Behandlung zeigen die Ergebnisse somit auch eine von Zelle zu Zelle variable Dynamik im Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials. Die der Quantifizierung zugrunde liegenden kinetischen Versuche wurden von Patricia Muschong während ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

Die auf Einzelzellebene beobachteten Unterschiede im Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials legen nahe, dass der intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalweg von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark an der Apoptose-Exekution beteiligt sein könnten. Es stellt sich jedoch auch die Frage, wie viele Mitochondrien einer Zelle überhaupt permeabilisiert werden müssen, damit es zur Apoptose-Exekution über den intrinsischen Signalweg kommt. Diese Frage scheint noch nicht eindeutig beantwortet (Bhola & Letai, 2016; Tait & Green, 2008). Unterschiede in Abhängigkeit der Zelllinie und des Stimulus scheint es jedoch zu geben, die einen individuellen Schwellenwert der benötigten Menge an Cytochrom c für die Caspase-Aktivierung im intrinsischen Signalweg nahelegen (Galluzzi et al., 2009; Tait & Green, 2008). Ist dieser Schwellenwert permeabilisierter Mitochondrien überschritten, folgen die restlichen Mitochondrien einer Zelle nach einem Alles-oder-nichts-Prinzip, wobei sich MOMP wellenförmig über die Mitochondrien einer Zelle ausbreitet (Bhola & Letai, 2016). Damit einher geht der bioenergetische Zusammenbruch einer

A partieller Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials vor der Zellkernkondensation

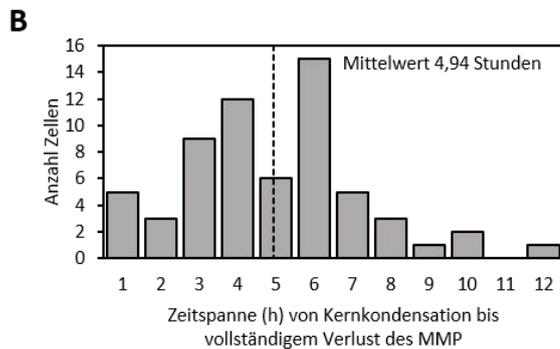
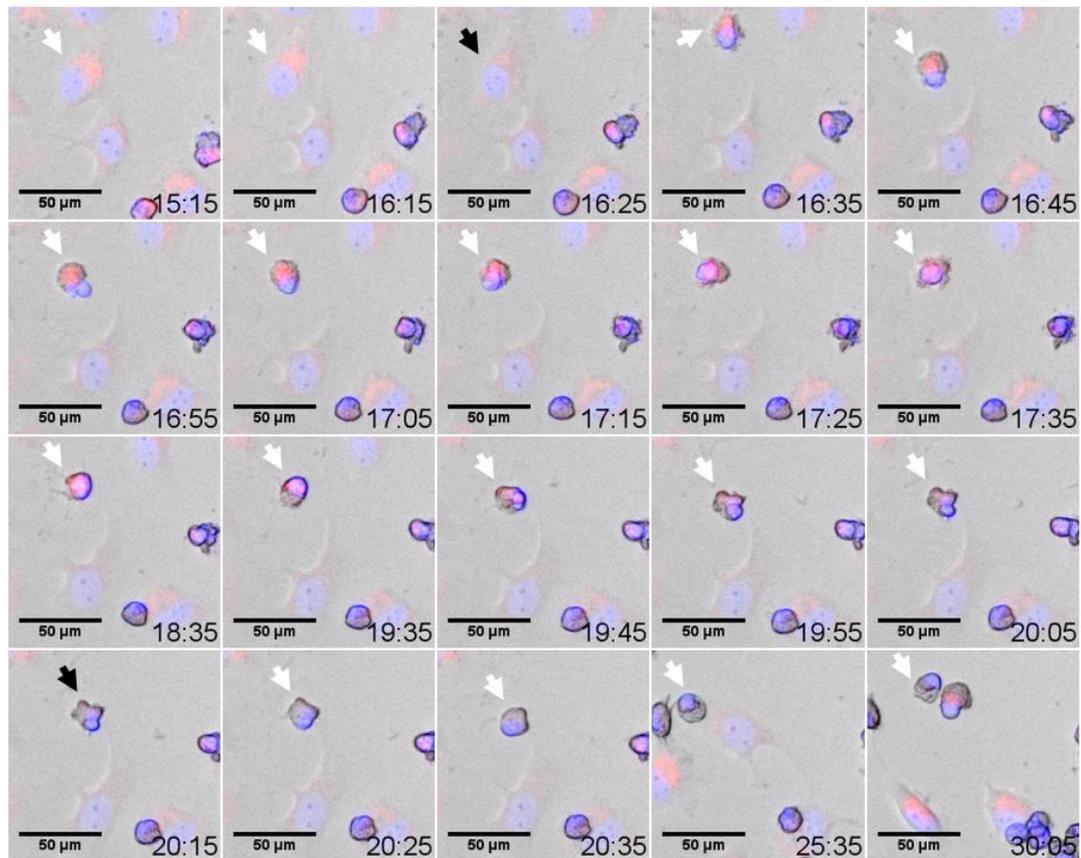


Abbildung 3.9: Partieller Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) vor der apoptotischen Zellkernkondensation. **A** zeigt repräsentative Bildausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und TMRE-Kanal (rot), die beobachtete Zelle ist mit weißem Pfeil markiert. Schwarze Pfeile markieren den partiellen (16:25), sowie den vollständigen (20:15) Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials der beobachteten Zelle im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. **B** Darstellung der Zeitspanne zwischen Zellkernkondensation und vollständigem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials des in **A** gezeigten Phänotyps als Histogramm. Zur Analyse wurden manuell Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten nach Cisplatin-Behandlung quantifiziert (n=62). HeLa wurden mit Cisplatin (50 μ M) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und TMRE mittels Fluoreszenzmikroskopie im Zeitverlauf alle 10 Minuten aufgenommen.

A konstantes Mitochondrienmembranpotenzial vor der Zellkernkondensation

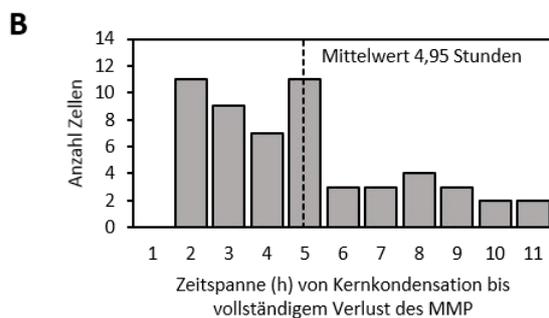
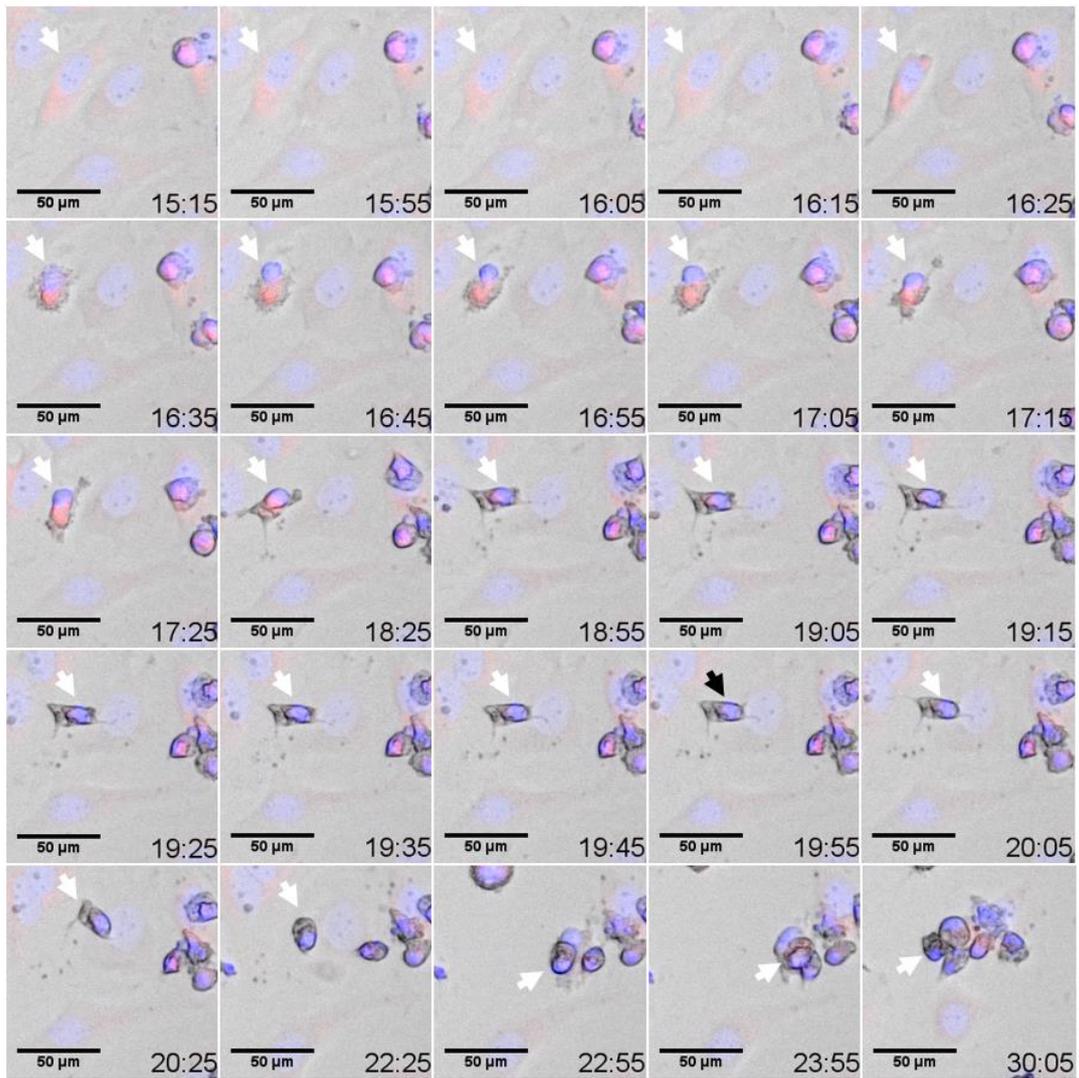


Abbildung 3.10: Konstantes mitochondrielles Membranpotenzial (MMP) vor der apoptotischen Zellkernkondensation. A zeigt repräsentative Bildausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und TMRE-Kanal (rot), die beobachtete Zelle ist mit weißem Pfeil markiert. Mit schwarzem Pfeil ist der vollständige (19:55) Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung markiert. B Darstellung der Zeitspanne zwischen Zellkernkondensation und vollständigem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials des in A gezeigten Phänotyps als Histogramm. Zur Analyse wurden manuell Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten nach Cisplatin-Behandlung quantifiziert (n=55). HeLa wurden mit Cisplatin (50μM) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und TMRE mittels Fluoreszenzmikroskopie im Zeitverlauf alle 10 Minuten aufgenommen.

Zelle, weshalb MOMP als *point of no return* gilt (Bhola & Letai, 2016; Galluzzi et al., 2009; Tait & Green, 2008). Da bei den Ergebnissen dieser Arbeit auf Einzelzellebene ein partieller Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials vor den morphologischen Veränderungen der Apoptose-Exekution bei etwa der Hälfte der Zellen auftrat, deutet dies darauf hin, dass bereits der Verlust dieses Anteils der Mitochondrien genügt um die Apoptose-Exekution über den intrinsischen Signalweg auszulösen. In anderen Zellen konnte dagegen kein Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials vor dem Auftreten der apoptotischen Zellmorphologie beobachtet werden, was möglicherweise durch die Apoptose-Exekution über den extrinsischen Signalweg in diesen Zellen erklärt werden kann. Aus physiologischer Sicht erscheint es vorteilhaft, dass nicht alle Mitochondrien gleichzeitig kollabieren, da so die Energieversorgung für die Apoptose-Exekution sichergestellt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen diesbezüglich, dass zumindest einige Mitochondrien der Zelle, während großen Teilen der Apoptose-Exekution, ein intaktes Membranpotenzial aufweisen. Unterschiede in der Anzahl Cisplatin-induzierter DNA-Schäden und den dadurch unterschiedlich stark aktivierten Signaltransduktionswegen einer Zelle, könnten möglicherweise zu den zellindividuellen Unterschieden in der Zeitspanne bis zum vollständigen Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials beitragen.

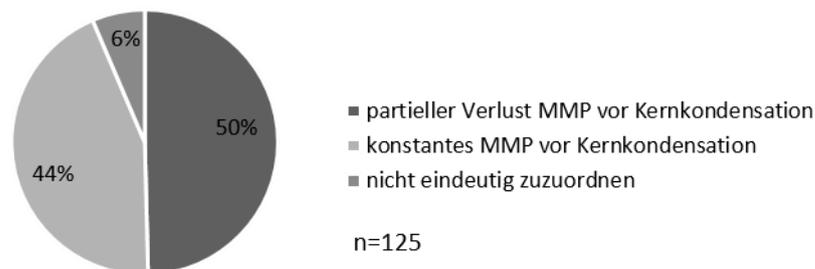


Abbildung 3.11: Verteilung der zwei Phänotypen des Verlusts des mitochondriellen Membranpotenzials an der Gesamtzellzahl. MMP: mitochondrielles Membranpotenzial

3.1.6 Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in Abhängigkeit der Caspase-Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials durch Cisplatin legen eine mögliche Beteiligung des intrinsischen, wie auch extrinsischen Apoptose-Signalwegs nahe. Um der Frage nachzugehen, inwiefern der extrinsische Signalweg an der Cisplatin-induzierten Apoptose beteiligt ist, wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials bei gleichzeitiger Caspase-Hemmung untersucht. Da es im extrinsischen Apoptose-Signalweg nur nach Aktivierung der Caspasen über die Spaltung von Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) zur Permeabilisierung der Mitochondrien und damit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials kommen kann, jedoch im intrinsischen Signalweg die Permeabilisierung der Mitochondrien die Voraussetzung für die Caspase-Aktivierung ist, können auf diese Weise die beiden Signalwege unterschieden werden. Nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung ist kein Unterschied im Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in Abhängigkeit der Caspase-Hemmung zu beobachten (**Abbildung 3.12A, Abbildung 3.13A**). Obwohl der Cisplatin-induzierte Zelltod durch den Caspase-Inhibitor bei hoher Konzentration vollständig gehemmt wird, wird der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials nicht beeinflusst, was die Apoptose-Exekution über den intrinsischen Sig-

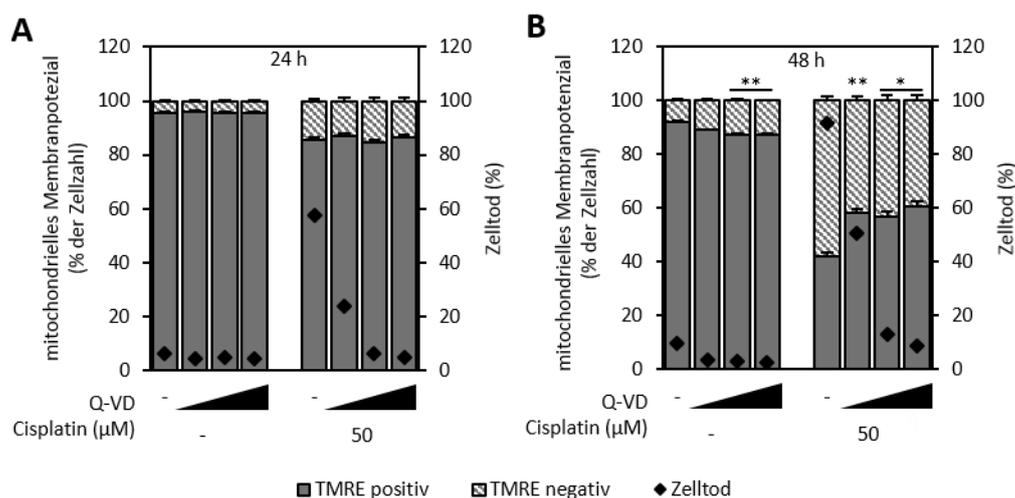


Abbildung 3.12: Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials erfolgt zu frühen Zeitpunkten Caspase-unabhängig, im späteren Verlauf reduziert Caspase-Inhibition jedoch den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials. HeLa wurden mit Cisplatin (50µM) oder Medium (-) behandelt. Die Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials, sowie des Zelltods erfolgte mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden dazu jeweils zur Hälfte mit Hoechst und TMRE bzw. Hoechst und PI angefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede im Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials zur jeweiligen Kontrolle ohne Inhibitor wurde mittels Student's t-Test getestet (** p < 0,01; * p < 0,05).

nalweg bestätigt. Auch bei 48-stündiger Cisplatin-Behandlung tritt der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in Gegenwart des Caspase-Inhibitors nach wie vor auf, er ist jedoch in Proben mit Caspase-Inhibitor deutlich verzögert gegenüber der Cisplatin-Kontrolle (**Abbildung 3.12B**). Die Verzögerung im vollständigen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials wird dabei nicht nur in der softwaregestützten Quantifizierung der Gesamtzellpopulation deutlich (**Abbildung 3.12B**), sondern auch bei detaillierter manueller Analyse auf Einzelzellebene: Wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (**Abbildung 3.13B**) zeigen, sind bei Caspase-Hemmung

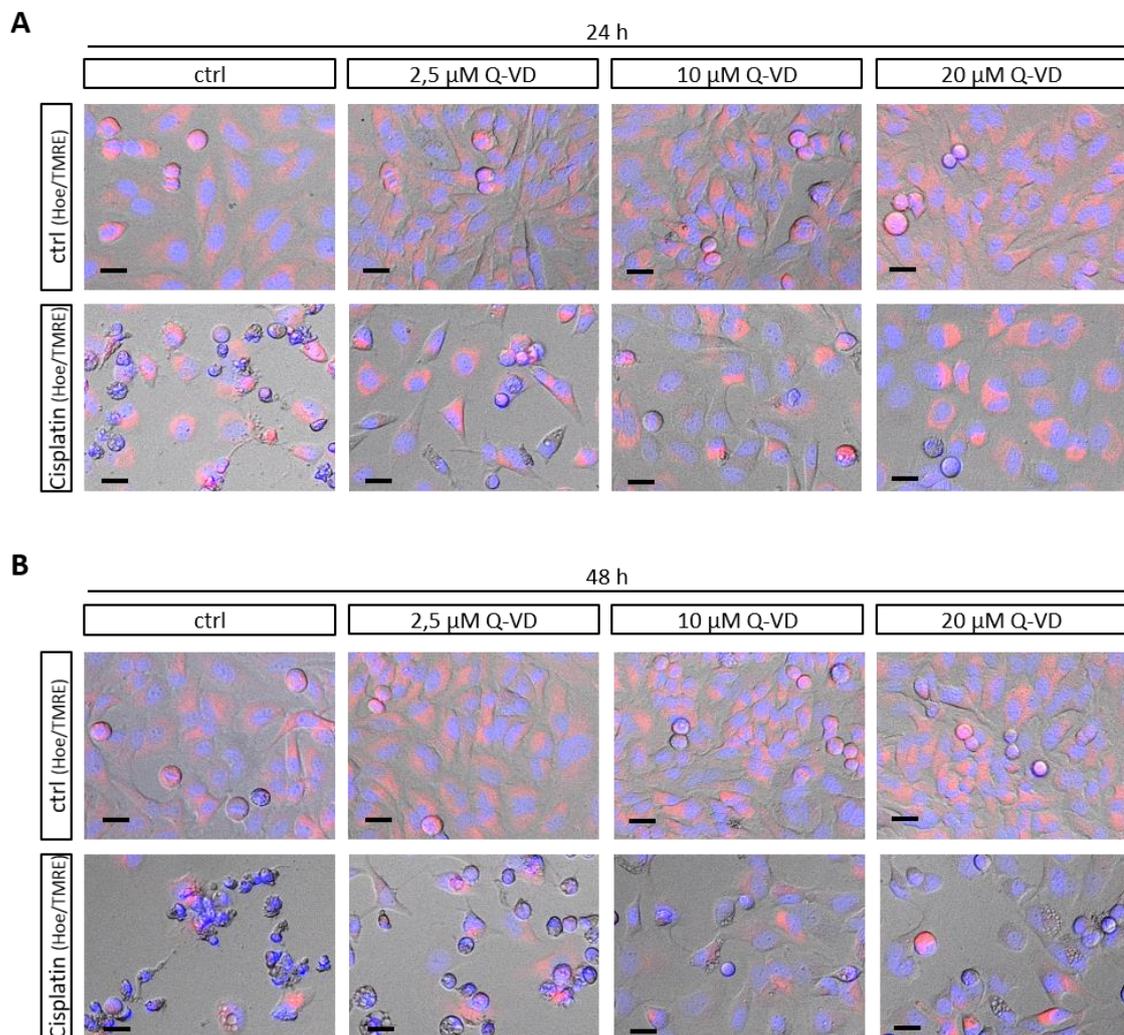


Abbildung 3.13: Der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials nach Caspase-Inhibition. **A** Nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung erfolgt der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials Caspase-unabhängig. **B** Im späten Behandlungsverlauf (48 Stunden) wird in einem Teil der Zellen der vollständige Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials durch Caspase-Hemmung verzögert, da verstärkt Zellen mit schwacher TMRE-Färbung detektiert werden. HeLa wurden mit Cisplatin (50 μ M) oder Medium (Kontrolle) behandelt. Die Zellen wurden mit Hoechst und TMRE angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und TMRE-Kanal (rot) der für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.12** verwendeten Versuche. Maßstab 50 μ m.

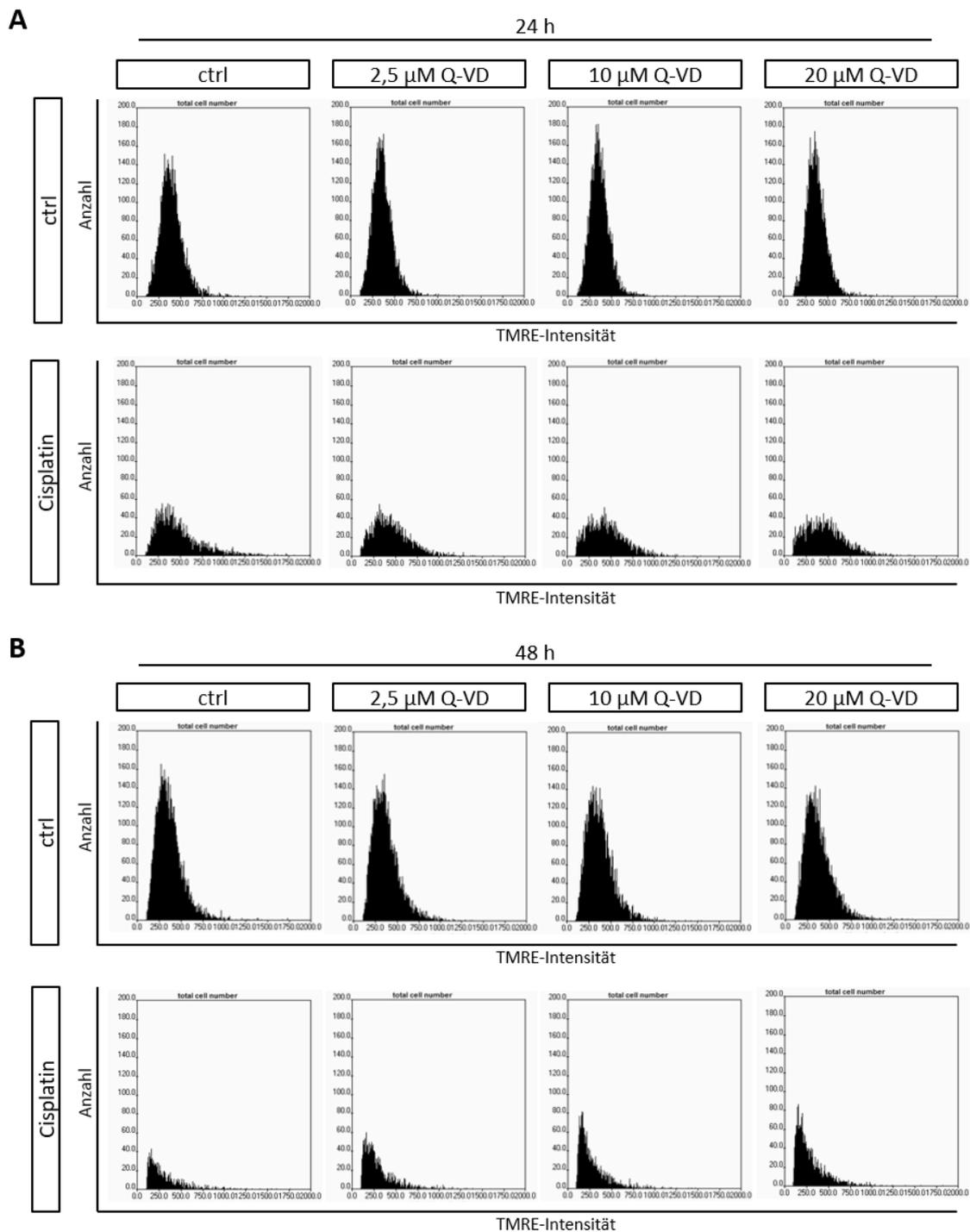


Abbildung 3.14: Caspase-Inhibition erhöht den Anteil schwach TMRE-positiver Zellen im späten Verlauf der Cisplatin-Behandlung. Dargestellt ist die Intensität aller TMRE-positiver Objekte an der Gesamtzellzahl. HeLa wurden mit Cisplatin (50 μ M) oder Medium (ctrl) für 24 (**A**) bzw. 48 (**B**) Stunden behandelt. Die Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials erfolgte mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärben der Zellen mit Hoechst und TMRE. Dargestellt ist die Gesamtheit aller TMRE-gefärbten Objekte entsprechend ihrer TMRE-Intensität, die die Grundlage für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.12** bilden. Es ist ein repräsentativer Versuch von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten gezeigt.

mehr Zellen TMRE-positiv als bei vergleichbarer Behandlung ohne Caspase-Inhibitor. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Zellen fällt zudem auf, dass unter diesen TMRE-positiven Zellen verstärkt schwach TMRE-gefärbte Zellen auftreten. Dies wird insbesondere deutlich mit Blick auf das Histogramm der TMRE-Intensität aller detektierten Objekte (**Abbildung 3.14**). Nach 48-stündiger Cisplatin-Behandlung ist in den Histogrammen der Proben mit Caspase-Inhibitor eine Zunahme der schwach TMRE-gefärbten Objekte zu erkennen (**Abbildung 3.14B**). Dies deutet auf eine Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs hin, der im Verlauf der Apoptose-Exekution zum vollständigen Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials einer Zelle beitragen könnte. Zumindest in einer Subpopulation der Zellen scheint dies der Fall zu sein. In anderen Subpopulationen scheint der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials dagegen ohne Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs zu erfolgen. Ein Teil der Versuche zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials in Abhängigkeit der Caspase-Aktivierung wurden von Patricia Muschong und Michelle Dierolf als Teil ihrer Bachelorarbeiten unter meiner Betreuung durchgeführt.

Die meisten genotoxischen Apoptose-Stimuli wie Cisplatin induzieren Apoptose über den intrinsischen Signalweg (L Galluzzi et al., 2012; Prokhorova et al., 2015; Tait & Green, 2008), dennoch ist für Cisplatin und andere DNA-schädigende Substanzen auch eine Rolle des extrinsischen Signalwegs bekannt (Fulda & Debatin, 2006; Siddik, 2003). Auch in vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte neben Caspase-9, die am Beginn des intrinsischen Signalwegs steht, ebenfalls die Aktivierung der Caspase-8 des extrinsischen Apoptose-Signalwegs durch Cisplatin-Behandlung mittels Westernblots nachgewiesen werden (Schweitzer, 2015), was die Aktivierung beider Signalwege durch Cisplatin bestätigt. Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs gilt als eine Konsequenz der DNA-Schadensantwort und erfolgt über komplexe Signaltransduktionskaskaden die zur Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine (*B-cell lymphoma 2*) führen, die die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran bewirken (Prokhorova et al., 2015). Es stellt sich jedoch die Frage, wie es durch Cisplatin, das intrazellulär wirkt, zur Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs kommen kann, dessen Aktivierung üblicherweise durch Liganden wie TNF (Tumornekrosefaktor) erfolgt, indem sie an sogenannte Todesrezeptoren an der Zellmembran binden. Eine Aktivierung des extrinsischen Signalwegs durch Chemotherapeutika wie Cisplatin konnte jedoch über eine Erhöhung der Expression des Todesrezeptor-Liganden FasL und autokrine oder parakrine Stimulierung des zugehörigen Rezeptors Fas beobachtet werden (Fulda & Debatin, 2006). Des Weiteren wurde nach Cisplatin-Behandlung eine Umverteilung und Anreicherung des Fas-Rezeptors, zusammen mit Pro-Caspase-8 und dem zur Aktivierung benötigten FADD (*Fas-associated death domain*)-Komplex in Lipid Rafts der Membran gezeigt. Das damit verbundene

Clustering der Fas-Rezeptoren könnte die Ursache einer verstärkten Aktivierung des Rezeptors sein (Lacour et al., 2004). Es ist somit wahrscheinlich, dass auch in der Subpopulation der in der vorliegenden Arbeit analysierten Zellen, die bei Caspase-Hemmung das mitochondrielle Membranpotenzial verzögert verloren, die Apoptose-Exekution unter zusätzlicher Beteiligung des extrinsischen Signalwegs erfolgt. Dabei würde die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid zusätzlich zur Permeabilisierung der Mitochondrien beitragen. Bestätigend wirkt dabei ebenfalls die Tatsache, dass die Verzögerung im Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials erst im späteren Verlauf der Cisplatin-Behandlung in einer Subpopulation auftrat. Somit wäre ausreichend Zeit für die Cisplatin-induzierte Hochregulation von Todesrezeptoren oder deren Liganden in dieser Zellpopulation gegeben. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um eine Subpopulation Cisplatin-resistenterer Zellen, die erst durch eine zusätzliche Stimulation über den extrinsischen Signalweg die Apoptose-Exekution beginnen. Da die Permeabilisierung der Mitochondrien maßgeblich von pro- und anti-apoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie bestimmt wird (Bhola & Letai, 2016), könnte diese Zellpopulation eine höhere Expression anti-apoptischer Bcl-2-Proteine aufweisen, die häufig an der Chemoresistenz von Tumorzellen beteiligt ist (Skommer et al., 2010).

Zusammenfassend legen die Untersuchungen zum Verlust des mitochondriellen Membranpotenzial in dieser Arbeit eine Beteiligung des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs an der Apoptose-Exekution nahe. Der intrinsische Signalweg ist dabei hauptsächlich für die Exekution der Apoptose nach Cisplatin-Behandlung verantwortlich. Jedoch scheint auch der extrinsische Signalweg in Subpopulationen der Zellen von Bedeutung zu sein und verstärkend zum Verlust des mitochondriellen Membranpotenzials dieser Zellen beizutragen. Die Identifizierung heterogener zellulärer Reaktionen, wie in diesem Beispiel, ist von großer Bedeutung für die Tumorthherapie, da der Erfolg einer Chemotherapie maßgeblich davon abhängt, die Gesamtheit heterogener Krebszellen zu eliminieren.

3.1.7 Cisplatin induziert verschiedene morphologische Sub-Phänotypen der Apoptose auf Einzelzellebene

Bei der Einzelzellanalyse apoptotischer Zellen im zeitlichen Verlauf in den vorausgegangenen Kapiteln fiel auf, dass auch die apoptotische Morphologie in ihrer Ausprägung variabel erscheint. Zur genaueren Analyse dieser Beobachtung wurde nachfolgend gezielt die Ausprägung des apoptotischen Phänotyps betrachtet und die Gesamtzellpopulation in Subgruppen apoptotischer Phänotypen unterteilt. Zellen, die die klassische apoptotische Morphologie zeigen, wie sie vielfach in der Literatur beschrieben wurde (Atkin-Smith & Poon, 2016; Häcker, 2000; Saraste & Pulkki, 2000; Taylor et al., 2008), werden im Nachfolgenden als klassisch apoptotischer Phänotyp beschrieben. Dieser Phänotyp ist im zeitlichen Verlauf gekennzeichnet durch das Abrunden der Zelle und Membran-Blebbing, die Volumenabnahme der Zelle, DNA- und Zellkernkondensation, gefolgt von

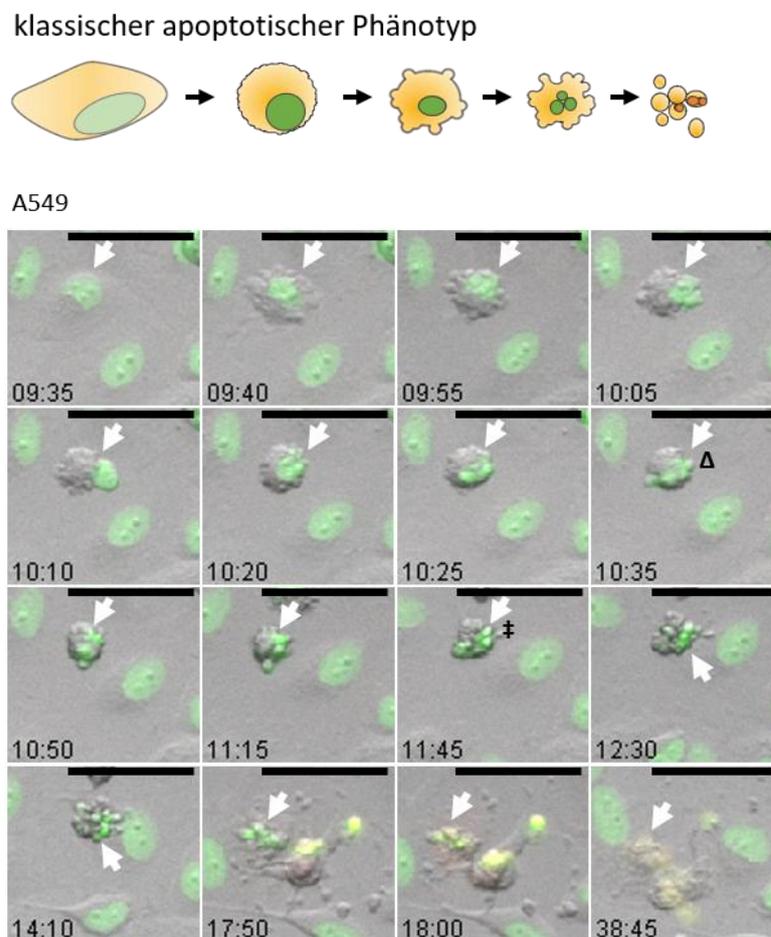


Abbildung 3.15: Klassischer apoptotischer Phänotyp (A549). Kennzeichnend sind die Fragmentierung des Zellkerns (Δ) nach der DNA-Kondensation und die Auflösung der Zelle in Apoptotic Bodies (\ddagger). Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (Gelbfärbung im Overlay). A549 H2B-GFP wurden mit Cisplatin ($50 \mu\text{M}$) behandelt und nach Anfärben mit PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, GFP- (grün) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab $50 \mu\text{m}$.

der Fragmentierung der DNA und des Zellkerns, bis hin zur Auflösung der gesamten Zelle in apoptotische Vesikel, die Apoptotic Bodies (**Abbildung 3.15** und **Abbildung A.3**). Neben diesem klassischen Phänotyp existieren in A549 und HeLa jedoch auch ein Phänotyp, der durch die Kondensation des Zellkerns dominiert wird (Kernkondensations-dominierter Phänotyp, **Abbildung 3.16** und **Abbildung A.4**), sowie ein weiterer Phänotyp, bei dem zusätzlich zur dominanten Kernkondensation eine Separation des Zellkerns vom restlichen Zellkörper auftritt (Kernkondensations-dominierter Phänotyp mit Kernseparation **Abbildung 3.17** und **Abbildung A.5**). Im frühen Stadium der Apoptose-Exekution unterscheiden sich diese beiden Phänotypen nicht vom klassischen

Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp



A549

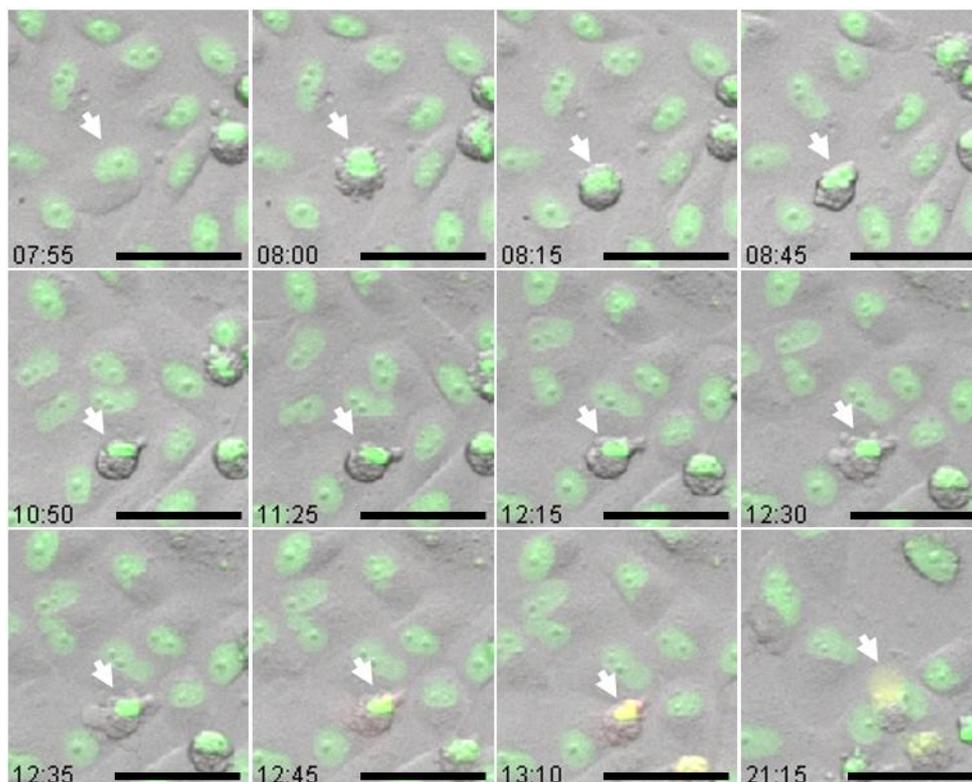
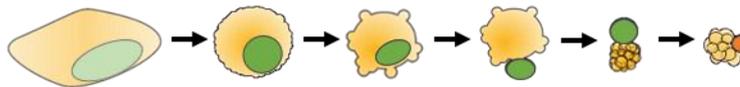


Abbildung 3.16: Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp (A549). Kennzeichnend sind die persistierende Kondensation des Zellkerns und das Ausbleiben der Kernfragmentierung. Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (Gelbfärbung im Overlay). A549 H2B-GFP wurden mit Cisplatin (50 μM) behandelt und nach Anfärben mit PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, GFP- (grün) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab 50 μm .

Phänotyp, da bei beiden Phänotypen mit dem Abrunden und Membran-Blebbing die typischen frühen morphologischen Veränderungen auftreten. Erst nach der Kondensation der DNA und des Zellkerns divergieren sie vom klassischen Phänotyp, da die Kernkondensation persistiert. Im Gegensatz zum klassischen Phänotyp findet keine Fragmentierung des Zellkerns statt und auch die Auflösung der gesamten Zelle in Apoptotic Bodies bleibt aus. Im Falle des Phänotyps mit Separation des Zellkerns, als Sub-Phänotyp des Kernkondensations-dominierten Phänotyps, verschiebt sich der kompakte, kondensierte Zellkern auf eine Seite des Zellkörpers, während der restliche Zellkörper eine Art traubenförmige Gestalt annimmt. Bei A549 kann es dabei sogar zur deutlichen räumlichen Separation des Zellkerns kommen. Anteilsmäßig treten in beiden Zelllinien der klassische und der Kernkondensations-dominierte Phänotyp in etwa ähnlich häufig auf, die Kernkondensations-dominierten Phänotypen überwiegen leicht mit insgesamt 54 % der apoptotischen

Kernkondensations-dominiertes apoptotisches Phänotyp mit Kernseparation



A549

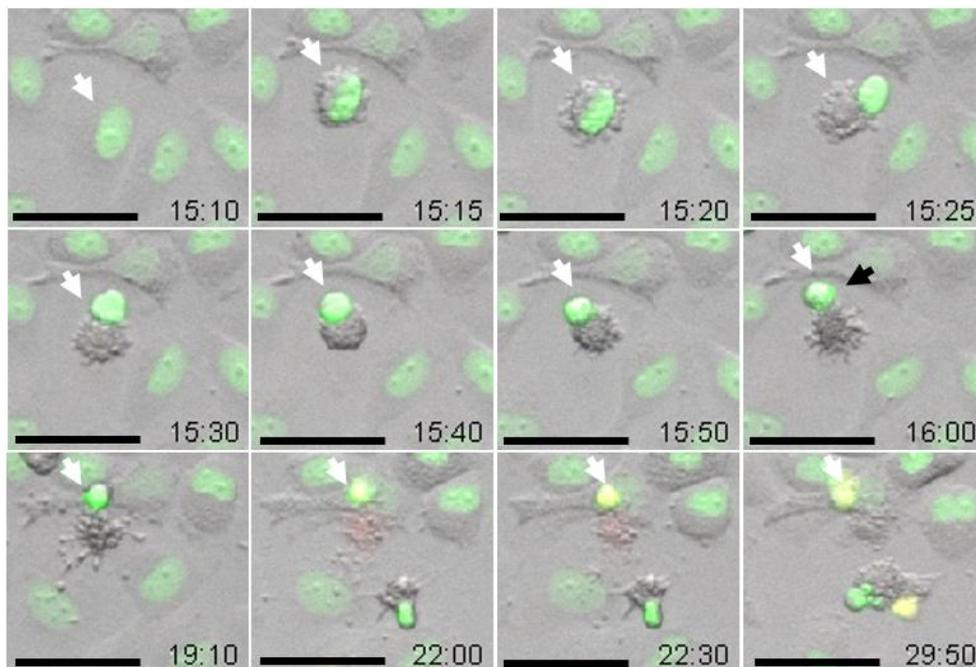


Abbildung 3.17: Kernkondensations-dominiertes apoptotisches Phänotyp mit Kernseparation (A549). Kennzeichnend ist die Separation des kondensierten Zellkerns vom restlichen Zellkörper (schwarzer Pfeil). Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (Gelbfärbung im Overlay). A549 H2B-GFP wurden mit Cisplatin (50 μ M) behandelt und nach Anfärben mit PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, GFP- (grün) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab 50 μ m.

Zellen in A549 bzw. 53 % in HeLa (**Abbildung 3.18**). Das Auftreten einer Kernseparation ist dagegen in A549 mit 15 % der apoptotischen Zellen deutlich häufiger, verglichen mit 3 % in HeLa. Unabhängig der Ausprägung der apoptotischen Morphologie kommt es bei allen drei Phänotypen im späten Verlauf der Apoptose-Exekution zum Verlust der Plasmamembranintegrität (nur für A549 gezeigt). Ein Unterschied in der Zeitspanne von Zellkernkondensation bis zum Verlust der Plasmamembranintegrität zwischen den drei Phänotypen konnte manuell nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es nur nach der Fragmentierung des Zellkerns auch zur Fragmentierung der gesamten Zelle in Apoptotic Bodies kommt.

Die repräsentativen Bilder in A549 wurden mit einem Klon der Zelllinie erstellt, bei dem stabil eine GFP-markierte Variante des Histon 2B exprimiert wird. Dadurch ist die DNA und somit der Zellkern bereits fluoreszent markiert und die Färbung mit Hoechst entfällt. Um auch in nicht transgenen Zelllinien Zeitverlaufsanalysen durchzuführen wurde die Hoechst-Konzentration in dieser Arbeit so gewählt, dass keine Gentoxizität durch die Hoechst-Färbung auftrat. Die verschiedenen Ausprägungen der apoptotischen Morphologie wurden sowohl in der ursprünglichen, wie auch in der transgenen A549-Zelllinie in ähnlicher Häufigkeit beobachtet, weshalb beide A549-Zelllinien für die Quantifizierung der verschiedenen Phänotypen berücksichtigt wurden.

Ein deutlicher Unterschied der beobachteten Phänotypen liegt in der Fragmentierung des Zellkerns und der Auflösung der gesamten apoptotischen Zelle in Apoptotic Bodies. Über die Regulation dieser Schritte der Apoptose-Exekution ist bisher bekannt, dass der Fragmentierung des Zellkerns die Schwächung der strukturgebenden Kernlamina vorausgeht, die durch Caspasen über die Spaltung von Laminen vermittelt wird. Anschließend wird der Kern durch Kontraktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts auseinandergezogen, das an der Kernlamina befestigt ist. Diese Kontraktionskräfte beruhen auf der Phosphorylierung von Myosin durch die Caspase-aktivierte Kinase ROCK1 (*Rho-associated protein kinase 1*) (Croft et al., 2005; Saraste & Pulkki, 2000; Taylor et al., 2008). Die Auflösung einer apoptotischen Zelle in Apoptotic Bodies ist bisher weniger gut charakterisiert. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine Voraussetzung dafür das Zellmembran-Blebbing ist, das durch die gleichen ROCK-Aktin-Myosin-vermittelten kontraktile Kräfte ausgelöst wird. Des Weiteren wurde auch eine Beteiligung des Mikrotubuli-Zytoskeletts an der Verlagerung von Zellkernfragmenten in die Apoptotic Bodies beobachtet (Atkin-Smith & Poon, 2016; Taylor et al., 2008). Möglicherweise sind somit zellindividuelle Unterschiede in der zeitlichen Aktivierung und Stärke der kontraktile Kräfte des Zytoskeletts oder der proteolytischen Schwächung der Kernlamina für das Auftreten der verschiedenen apoptotischen Phänotypen ursächlich. Da Caspasen an diesen Prozessen beteiligt sind, könnte das Timing ihrer Aktivierung, sowie die Anzahl aktivierter Caspasen einer Zelle entscheidend zu den Unterschieden in der Ausprägung der apoptotischen Morpho-

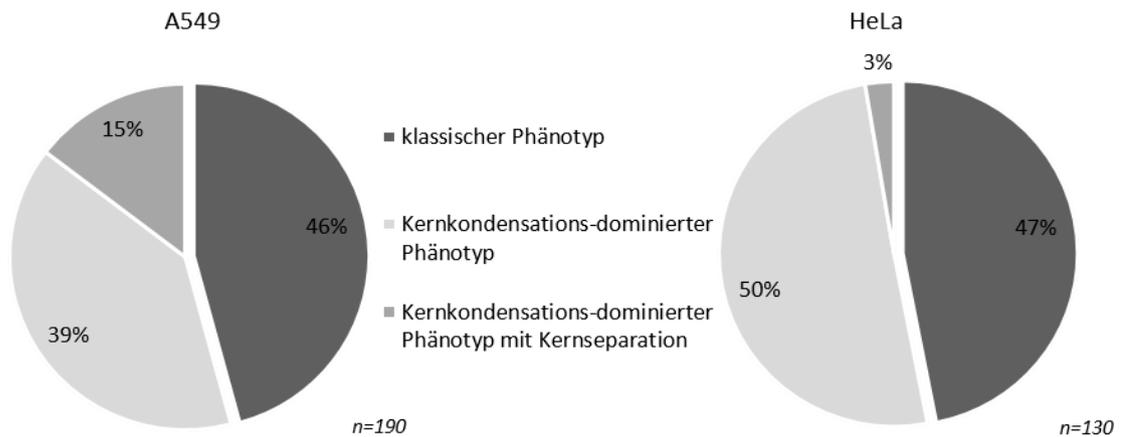


Abbildung 3.18: Anteilmäßige Verteilung der verschiedenen apoptotischen Phänotypen in A549 und HeLa. Unterteilung in klassischen, Kernkondensations-dominierten Phänotyp und Kernkondensations-dominierten Phänotyp mit Kernseparation. Die Quantifizierung erfolgte manuell aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten je Zelllinie.

logie beitragen. Eine stärkere Caspase- oder Protease-Aktivität könnte hypothetisch auch die Kern- und Zellfragmentierung behindern, indem sie das Zytoskelett zu früh oder an der falschen Stelle degradieren. Unabhängig davon, ob im späteren Verlauf der Apoptose-Exekution die Zellkernfragmentierung und Bildung von Apoptotic Bodies auftrat, konnte das Blebbing der Zellmembran jedoch bei allen Phänotypen beobachtet werden. Somit kann dies nicht die einzige Voraussetzung für die Zellfragmentierung sein. Vielmehr müssen weitere Faktoren, die im zeitlichen Verlauf der Apoptose-Exekution nach dem Zellmembran-Blebbing ansetzen entscheidend sein. Das Auftreten von Unterschieden in der Ausprägung der apoptotischen Morphologie konnte auch in einer weiteren Studie beobachtet werden, die ebenfalls beschreiben, dass apoptotische Zellen als ein apoptotisches Fragment oder in mehreren Apoptotic Bodies enden können (Orlando et al., 2006).

Die in dieser Arbeit beobachtete morphologische Variabilität der Apoptose-Exekution, wirft nicht nur Fragen nach den zugrunde liegenden Mechanismen auf, sondern auch hinsichtlich möglicher Auswirkungen *in vivo*. Generell wird die Bildung von Apoptotic Bodies als eine Maßnahme betrachtet, die die Aufnahme der apoptotischen Überreste einer Zelle durch Phagozyten vereinfacht (Taylor et al., 2008). Sollte *in vivo* die Phagozytose apoptotischer Zellen, die nicht in Apoptotic Bodies fragmentiert sind, erschwert sein, könnte die Entstehung von sekundären Nekrosen die Konsequenz sein, was eine Entzündungsreaktion hervorrufen würde. Derartige pro-inflammatorische Bedingungen begünstigen wiederum die Entstehung weiterer Erkrankungen. Insbesondere im Kontext einer Tumorthherapie hätte es negative Auswirkungen für den Therapieerfolg, wenn die Beseitigung derartiger nicht-fragmentierter apoptotischer Zellen beeinträchtigt wäre und der

Patient zusätzlich durch eine Entzündungsreaktion geschwächt würde. Ob das Ausbleiben der Zellkern- und Zellfragmentierung insbesondere in Tumorzelllinien auftritt, sollte in zukünftigen Studien adressiert werden.

3.1.8 Interaktion apoptotischer Zellen

Die Analyse apoptotischer Zellen im zeitlichen Verlauf bietet nicht nur die Möglichkeit die Dynamik einzelner Zellen zu beobachten, sondern auch die Dynamik des Umfelds apoptotischer Zellen zu berücksichtigen. Bei der manuellen Analyse apoptotischer Zellen und ihres zellulären Umfelds war bemerkenswert, dass es zwischen einer apoptotischen Zelle und einer zu diesem Zeitpunkt nicht apoptotischen Zelle zur Interaktion kommt, die gefolgt ist von der Apoptose-Exekution in der bis dahin nicht apoptotischen Zelle (**Abbildung 3.19** und **Abbildung 3.20**). Insbesondere in A549 kann dabei die Ausbildung von Zellausläufern vom Zellkörper der apoptotischen Zelle beobachtet werden, mit denen sie mit der Nachbarzelle interagiert, bevor diese selbst Anzeichen der Apoptose-Exekution in Form der apoptotischen Morphologie zeigt. Diese Art der Zellinteraktion

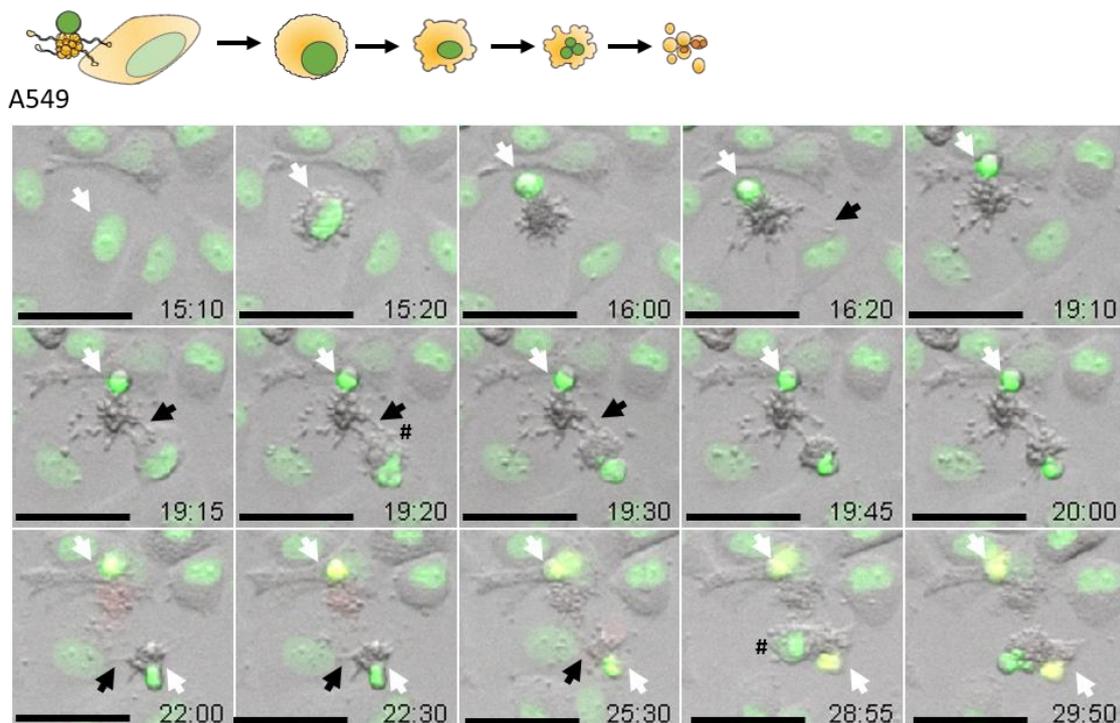


Abbildung 3.19: Interaktion apoptotischer Zellen (A549). Interaktion apoptotischer Zellen über Zellausläufer mit nicht-apoptotischen Zellen (schwarze Pfeile), gefolgt von beginnender Apoptose-Exekution in diesen Zellen (#). A549 H2B-GFP wurden mit Cisplatin (50 μM) behandelt und nach Anfärben mit PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, GFP- (grün) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab 50 μm .

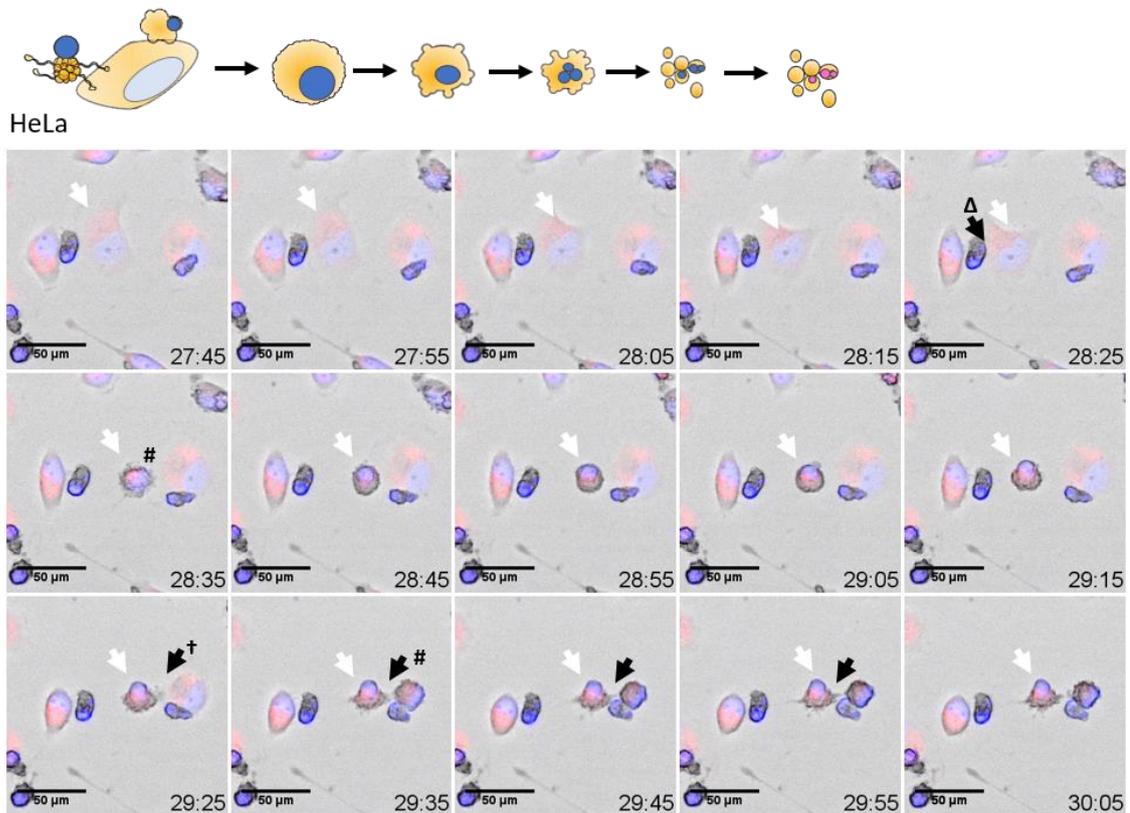


Abbildung 3.20: Interaktion apoptotischer Zellen (HeLa). Interaktion einer apoptotischen Zelle durch Überlagerung (Δ) oder über Zellausläufer (\dagger) mit einer nicht-apoptotischen Zelle (schwarze Pfeile), gefolgt von beginnender Apoptose-Exekution in dieser Zelle ($\#$). HeLa wurden mit Cisplatin ($50 \mu\text{M}$) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und TMRE mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und TMRE-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab $50 \mu\text{m}$.

tritt in 9 % der apoptotischen Zellen in A549 auf (**Abbildung 3.21**, manuelle Quantifizierung). Auch in HeLa sind Zellausläufer einer apoptotischen Zelle sichtbar, die jedoch in Anzahl und Länge kleiner erscheinen. Im Gegensatz zu A549 kann in HeLa jedoch häufig beobachtet werden, dass Zellen vor dem Eintritt in die Apoptose-Exekution mit bereits apoptotischen Zellen in direktem Nachbarschaftskontakt stehen, d.h. die Plasmamembranen scheinen sich zu berühren. Die manuelle Quantifizierung ergab, dass 47 % der apoptotischen HeLa-Zellen vor Auftreten der Apoptose-Exekution über direkten Nachbarschaftskontakt oder Zellausläufer in Kontakt mit einer bereits apoptotischen Zelle standen (**Abbildung 3.21**). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass apoptotische Zellen *in vitro* mit Zellen ihrer Nachbarschaft interagieren und diese möglicherweise in ihrem physiologischen Zustand beeinflussen, beispielsweise durch die Sezernierung pro-apoptotischer Faktoren.

Die Versuche, die der Quantifizierung in HeLa zugrunde liegen, wurden von Patricia Muschong während ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

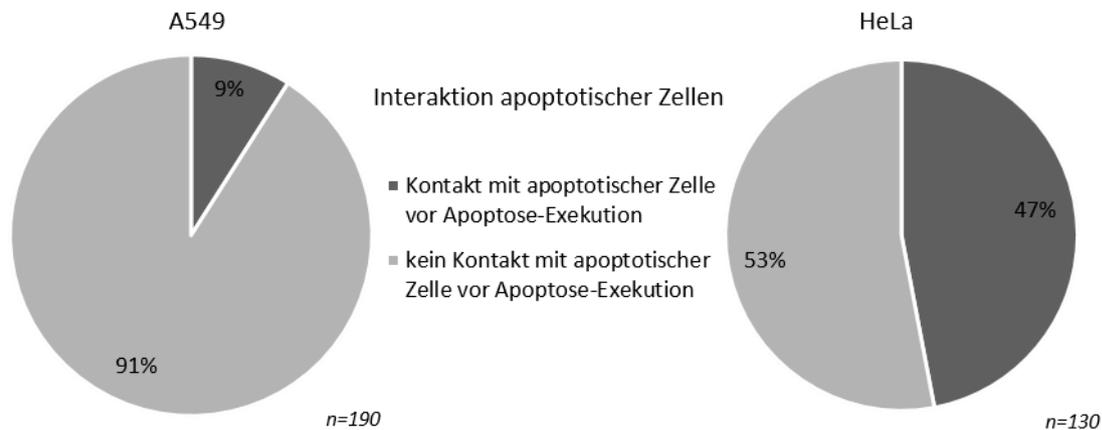


Abbildung 3.21: Anteil apoptotischer Zellen, die vor Apoptose-Exekution in Kontakt mit einer bereits apoptotischen Zelle stehen. Quantifizierung erfolgte manuell aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten je Zelllinie.

Apoptose wurde lange als eine stille Form des Zelltods betrachtet, da sie ermöglicht Zellen zu eliminieren, ohne dabei das umliegende Gewebe durch die Freisetzung von Entzündungsfaktoren zu schädigen (Fogarty & Bergmann, 2015). Es wurde jedoch auch schnell klar, dass apoptotische Zellen mit ihrer Umgebung interagieren müssen um die effiziente Aufnahme der apoptotischen Zellüberreste durch Phagozyten sicherzustellen. In diesem Zusammenhang konnten bereits verschiedene Faktoren identifiziert werden, die der Rekrutierung von Phagozyten in die Nähe der apoptotischen Zelle dienen, sowie um die Aufnahme der Zelle zu stimulieren. Zu diesen Faktoren zählen z.B. die Freisetzung von ATP durch apoptotische Zellen, sowie die Exposition von Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembran (Atkin-Smith & Poon, 2016; Elliott et al., 2009; Fogarty & Bergmann, 2015; Fuchs & Steller, 2015). Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass von apoptotischen Zellen weitaus mehr Signale ausgehen können, die ihre zelluläre Umgebung beeinflussen und verändern, wie Mitogene, die Proliferation und Geweberegeneration anregen. Ebenso wurde auch die Freisetzung Apoptose-stimulierender Faktoren durch apoptotische Zellen beschrieben, wie beispielsweise TNF bei massiver DNA-Schädigung. Dieser Prozess wurde als Apoptose-induzierte Apoptose bezeichnet (Fogarty & Bergmann, 2015; Fuchs & Steller, 2015). Wie bereits unter Kapitel 3.1.6 beschrieben, konnte nach Cisplatin-Behandlung ebenfalls eine erhöhte Expression des Todesrezeptor-Liganden FasL beobachtet werden (Fulda & Debatin, 2006). Die Freisetzung

von TNF oder FasL über Zellfortsätze könnte auch der Apoptose-stimulierenden Interaktion apoptotischer Zellen mit nicht apoptotischen Zellen zugrunde liegen, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Natürlich ist im Kontext dieser Versuche nicht auszuschließen, dass die Zelle, die zum Zeitpunkt der Interaktion noch keine apoptotische Morphologie aufwies, auch ohne den Kontakt der apoptotischen Zelle die Apoptose aufgrund Cisplatin-induzierter DNA-Schäden initiiert hätte. Die zusätzliche Stimulation könnte die Apoptose-Initiation jedoch beschleunigen. Dieser Mechanismus könnte ebenfalls von großer Bedeutung sein um Cisplatin-resistente Zellen, die beispielsweise weniger DNA-Schäden durch erhöhte Reparaturaktivität oder eine erhöhte Schadenstoleranz aufweisen, zu eliminieren. Somit könnte die Apoptose-induzierte Apoptose, die über extrazelluläre Faktoren initiiert wird, auch die teilweise Abhängigkeit des Verlusts des mitochondrialen Membranpotenzials vom extrinsischen Apoptose-Signalweg erklären (Kapitel 3.1.6).

Die Bedeutung der Apoptose-induzierten Apoptose ist somit enorm für multizelluläre Organismen. Neben dem Formen von Geweben oder der Eliminierung ganzer Zellgruppen während der Embryonalentwicklung, könnte darüber auch der Ausbreitung einer Virusinfektion vorgebeugt werden (Fuchs & Steller, 2015). Zudem ist dieser Mechanismus von großer klinischer Relevanz, da darüber auch der sogenannte Bystander-Effekt erklärt werden kann, bei dem Zellen in Nachbarschaft bestrahlter Krebszellen im Rahmen einer Tumorthherapie ebenfalls absterben (Fuchs & Steller, 2015).

3.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung Cisplatin-induzierter Apoptose

Die Versuche zur Charakterisierung der Cisplatin-induzierten Apoptose konnten zeigen, dass die Apoptose-Exekution eine hohe Dynamik aufweist und sich innerhalb einer Zellpopulation zeitlich und phänotypisch unterscheidet. Caspasen sind dabei wichtige Regulatoren der apoptotischen Morphologie, die charakteristisch für die Apoptose-Exekution ist. Diese wird nach Cisplatin-Behandlung vor allem über den intrinsischen Apoptose-Signalweg ausgeführt, da der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials Großteils Caspase-unabhängig geschieht. Der extrinsische Signalweg scheint jedoch in Subpopulationen zur Apoptose-Exekution beizutragen und spielt möglicherweise bei der Interaktion apoptotischer Zellen mit Nachbarzellen über Apoptose-induzierte Apoptose eine Rolle. In ihrer Morphologie unterscheiden sich apoptotische Zellen dahingehend, dass es neben der klassischen phänotypischen Ausprägung vom Abrunden der Zelle und Membran-Blebbing über DNA- und Zellkernkondensation bis hin zur Fragmentierung des Zellkerns und der Auflösung der Zelle in Apoptotic Bodies auch Phänotypen gibt, bei denen keine Fragmentierung des Zellkerns und Bildung von Apoptotic Bodies auftritt. Bei einer Untergruppe dieser apop-

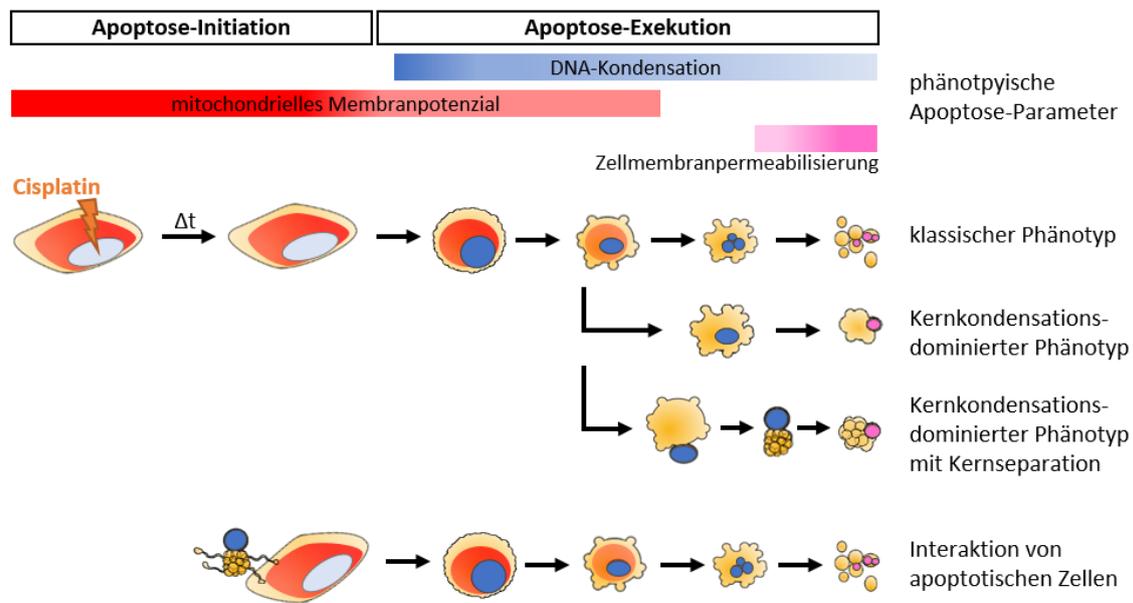


Abbildung 3.22: Mittels fluoreszenzmikroskopischer Endpunkte und Zeitverlaufsanalysen wurde die Cisplatin-induzierte Apoptose in humanen Krebszellen zeitlich und phänotypisch charakterisiert.

totischen Zellen wird der Zellkern sogar vom restlichen Zellkörper räumlich separiert. Der Verlust der Plasmamembranintegrität erfolgt im späten Verlauf der Apoptose, tritt jedoch in der untersuchten Lungenkrebszelllinie deutlich früher auf als in Cervixkarzinomzellen.

Die in dieser Arbeit beobachtete zeitliche und phänotypische Dynamik der Apoptose-Exekution zeigt die Bedeutsamkeit der Einzelzellanalyse um die biologische Heterogenität einer Zellpopulation abzubilden. Die Charakterisierung der Dynamik der apoptotischen Exekution ist dabei die Voraussetzung für die gezielte Etablierung von Methoden, die schlussendlich der Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen dienen. Um in Zukunft verstärkt Einzelzellanalysen im zeitlichen Verlauf softwaregestützt analysieren zu können, ist es essentiell die biologische Dynamik zu erfassen und zu charakterisieren, damit sie schlussendlich mittels bioinformatischer Ansätze abgebildet und dadurch softwaregestützt quantifiziert werden kann. Erst über die softwaregestützte Zellanalyse besteht die Möglichkeit im großen Maßstab Zellpopulationen auf Einzelzellebene nicht nur qualitativ, sondern quantitativ im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Diese Art der Analyse generiert Datensätze in Größenordnungen, die manuell nicht annähernd so effektiv und insbesondere objektiv analysiert werden könnten. Derartige Analysen können wichtige Hinweise auf die Heterogenität zellulärer Reaktionen liefern, die bei der Analyse von Gesamtzellpopulationen häufig maskiert werden. Die Identifizierung und Aufklärung heterogener zellulärer Reaktionen trägt nicht nur zum grundlegenden Verständnis zellphysiologischer Prozesse bei, sondern ist auch von großer Bedeutung beispielsweise für die Optimierung von Tumorthérapien.

3.2 Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose

Für die unvoreingenommene Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose und des apoptotischen Phänotyps wurde eine Bibliothek bioaktiver Substanzen verwendet (**Abbildung 3.23**). Diese Bibliothek besteht aus 640 durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Medikamenten, sowie 480 bioaktiven Substanzen mit bekannten

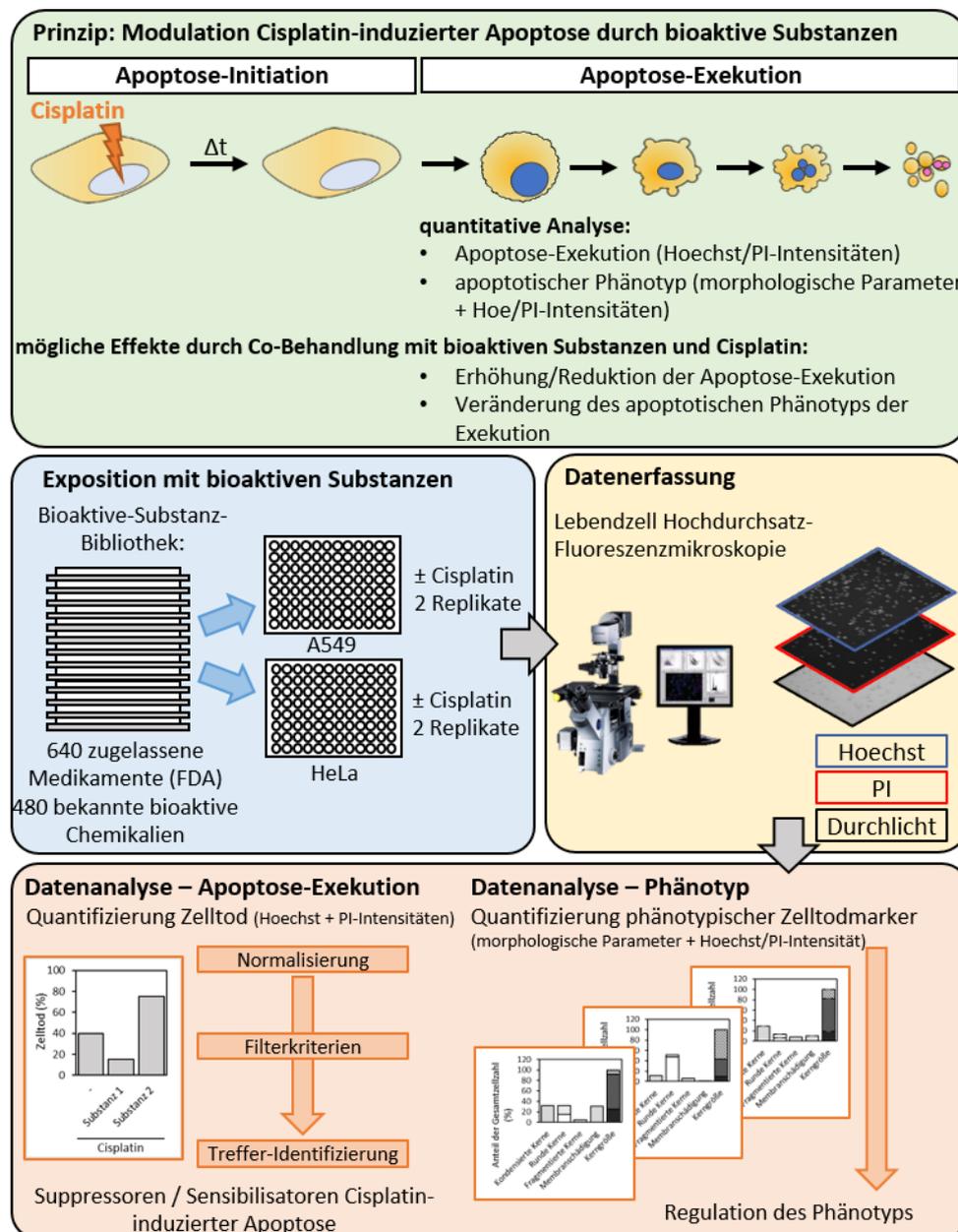


Abbildung 3.23: Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose. Nähere Erläuterungen siehe Text.

biologischen Zielstrukturen des Harvard Institute of Chemistry and Cell Biology (ICCB). Diese insgesamt 1120 Substanzen wurden in einem Fluoreszenzmikroskopie-basierten Hochdurchsatz-Screen auf ihren Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Apoptose in A549 und HeLa getestet. Dazu erfolgte eine Vorinkubation der Substanzen mit den Zellen, bevor durch Cisplatin Apoptose initiiert und nach 24-stündiger Behandlung quantifiziert wurde. Die Substanzbibliothek wurde ebenfalls ohne Cisplatin in den Zellen getestet um zytotoxische Wirkungen durch die Substanzen selbst erfassen zu können. Sowohl mit, wie auch ohne Cisplatin, erfolgte der Test der Substanz-Bibliothek zwei Mal je Zelllinie. Durch die Interaktion der bioaktiven Substanzen mit ihren biologischen Zielstrukturen in der Zelle, können diese Zielstrukturen, beispielsweise Rezeptoren oder Kinasen, aktiviert oder gehemmt werden. Spielt diese Zielstruktur eine Rolle in der Cisplatin-vermittelten Apoptose, kann sich die Interaktion auf die Apoptose-Exekution auswirken. Die sich daraus ergebenden möglichen Effekte durch die Co-Behandlung der bioaktiven Substanzen mit Cisplatin können eine Erhöhung oder Reduktion der Apoptose-Exekutionsrate sein, sowie eine Beschleunigung der Apoptose-Exekutionsphase oder die Veränderung des apoptotischen Phänotyps der Exekution. Darüber können Rückschlüsse zur Rolle der jeweiligen Zielstruktur in der Cisplatin-induzierten Apoptose gezogen werden. Die Apoptose-Exekution wurde wie im vorausgegangenen Kapitel softwaregestützt quantitativ analysiert. Um dabei neben dem induzierten Zelltod auch mögliche Effekte auf den apoptotischen Phänotyp erfassen zu können, wurden phänotypische Zelltodmarker etabliert, die ebenfalls auf der Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI beruhen. Die biologischen Zielstrukturen der bioaktiven Substanzen wurden vom Hersteller der Substanz-Bibliothek (Enzo Life Sciences) oder aus einer der folgenden Datenbanken bezogen: Drugbank (Wishart et al., 2006), PubChem (Kim et al., 2016) oder ChEMBL (Bento et al., 2014). Der Screen der bioaktiven Substanzbibliothek in A549 fand unter Mitarbeit von Brigitte Schweitzer statt.

3.2.1 Die Quantifizierung phänotypischer Apoptose-Parameter generiert ein apoptotisches Profil

In den bisherigen Versuchen erfolgte die softwaregestützte Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen über die Parameter DNA-Kondensation, basierend auf einer erhöhten Hoechst-Intensität, und dem Verlust der Plasmamembranintegrität (nachfolgend der Parameter Membranschädigung), gekennzeichnet durch einen PI-Influx. Apoptotische Ereignisse, wie beispielsweise die Kernfragmentierung oder Veränderung der Zellkerngröße, konnten bisher nicht softwaregestützt quantifiziert werden. Um Veränderungen des apoptotischen Phänotyps durch Co-Behandlung mit den Stoffen der bioaktiven Substanz-Bibliothek softwaregestützt quantifizieren zu können, wurden zunächst zusätzliche phänotypische Parameter etabliert. Dies erfordert

die Auswahl geeigneter morphologischer Parameter, die in Kombination mit der Hoechst-Intensität genutzt werden können. Darüber konnten die zusätzlichen phänotypischen Parameter Kerngröße, runde Kerne und Kernfragmentierung eingeführt werden (**Abbildung 3.24**).

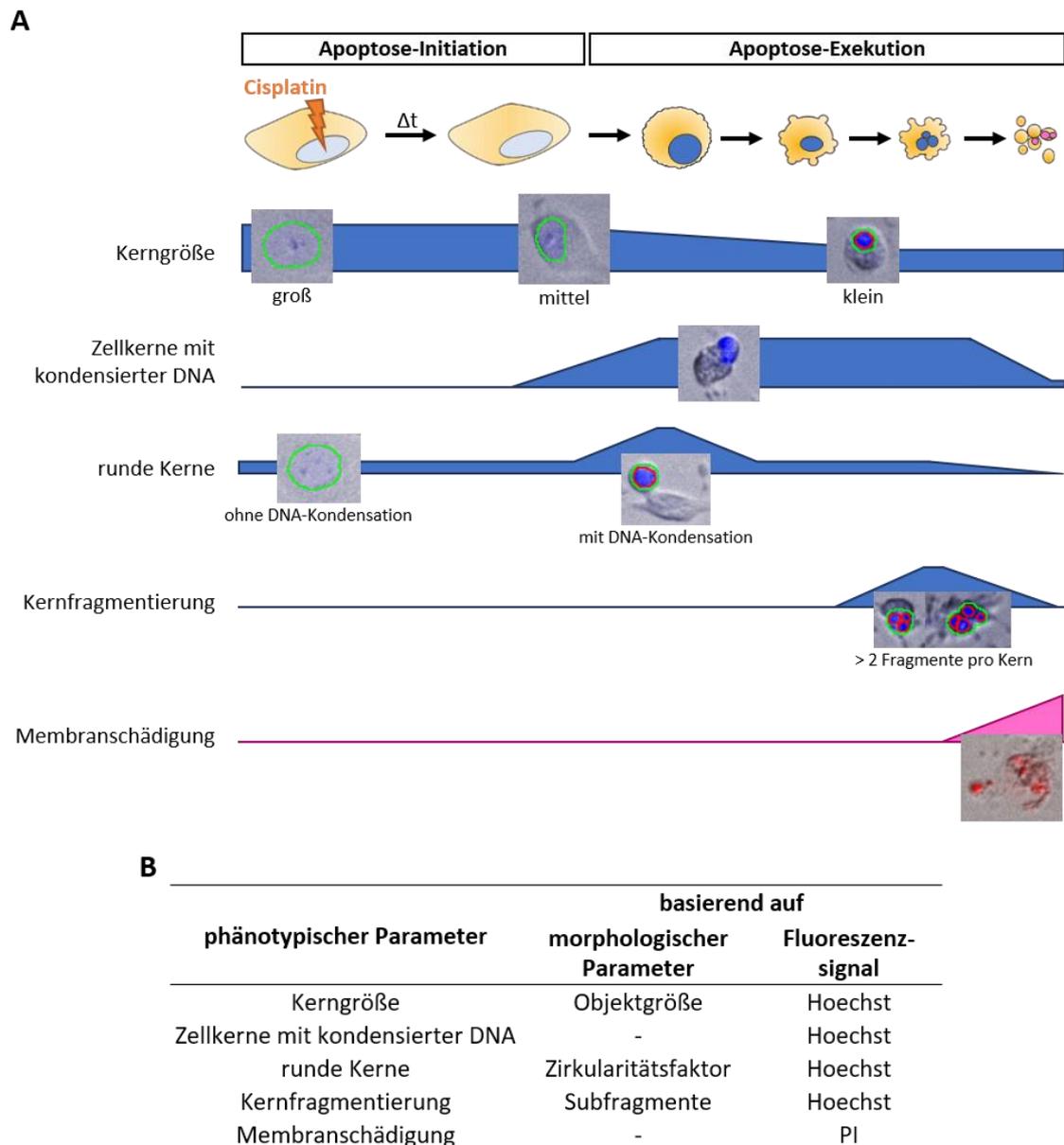


Abbildung 3.24: Etablierung einer softwaregestützten Quantifizierung phänotypischer Apoptose-Parameter. Durch die Kombination morphologischer Parameter mit Hoechst- und PI-Intensitäten wird die softwaregestützte Quantifizierung phänotypischer Apoptose-Parameter ermöglicht. **A** Grafische Darstellung der Parameter und ihrer Veränderung im apoptotischen Verlauf mit repräsentativen Bildern. **B** Tabellarische Übersicht der phänotypischen Apoptose-Parameter, sowie der zugrunde liegenden morphologischen Parameter und entsprechenden Fluoreszenzsignale. Blau: Hoechst, Magenta: PI.

Der phänotypische Marker Kerngröße basiert dabei auf dem morphologischen Parameter Objektgröße der Software, d.h. Anzahl der Pixel des detektierten Objekts, im Hoechst-Kanal. Im Laufe der Apoptose-Exekution ist eine Abnahme der Zellkerngröße zu erwarten, da der Kern der apoptotischen Zelle bedingt durch die DNA-Kondensation und den proteolytischen Abbau der Kernlamina an Größe verliert (nachfolgend als Kernschrumpfung bezeichnet). Für jeden Versuch wurde die Kerngröße in drei Klassen unterteilt: kleine, mittlere und große Kerne. Die Referenz für die Festlegung der Größenbereiche jeder Klasse bildete dabei die Größenverteilung der unbehandelten Kontrolle nach 24 Stunden. Anhand dieser normalverteilten Kurve wurden die Gesamtzellpopulation so eingeteilt, dass die Klasse der mittleren Kerngröße ca. 80 % der Kerne umfasst, die Klassen kleine und große Kerne jeweils die 10 % der kleinsten bzw. größten Zellkerne. Die Detektion und Quantifizierung runder Kerne erfolgte durch Verwendung des morphologischen Parameters Zirkularitätsfaktor der Software. Der Zirkularitätsfaktor beschreibt die Rundheit eines Objekts und hat bei einem perfekt runden Objekt den Wert 1,0. Als zellmorphologisch rund wurden Kerne mit einem Zirkularitätsfaktor von 0,97 bis 1,03 definiert. Im apoptotischen Verlauf erreichen Zellkerne einen Wert in diesem Bereich häufig bei vollständiger DNA-Kondensation und Kernschrumpfung, bevor der Zellkern fragmentiert und die Zirkularität dadurch bedingt wieder abnimmt. Um runde Zellkerne apoptotischer von runden Zellkernen nicht apoptotischer Zellen zu unterscheiden, wurden die runden Zellkerne anhand ihrer Hoechst-Intensität in runde Zellkerne mit und ohne DNA-Kondensation eingeteilt. Die Detektion fragmentierter Zellkerne ist aus bioinformatischer Sicht eine Herausforderung, da Teile eines Objekts, in diesem Fall die einzelnen Kernfragmente, gleichzeitig als einzelne Objekte, aber auch als Teil eines größeren Objekts, dem gesamten Zellkern, erkannt werden müssen. Dies konnte schlussendlich darüber erreicht werden, den gesamten, aus mehreren Fragmenten bestehenden Zellkern zunächst als zusammenhängendes Hauptobjekt zu erkennen und anschließend in einem zweiten Erkennungsschritt die einzelnen Kernfragmente separat als Subobjekte. Um dies zu ermöglichen wurden die Einstellungen für Kontrast und Detektionsselektivität im Hoechst-Kanal für die Erkennung der Hauptobjekte dahingehend optimiert, nahe beieinander liegende Kernfragmente eines Kerns als ein Objekt zu erkennen (durch eine temporäre Überbelichtung des Bildes im Erkennungsschritt der Hauptobjekte, im finalen Bild dargestellt durch die grüne Linie, **Abbildung 3.24A**). Anschließend wurden für die Erkennung der einzelnen Kernfragmente als Subobjekte der Kontrast und die maximale Objektgröße so angepasst, dass nur die einzelnen, kondensierten Kernfragmente erkannt wurden (rote Linie, **Abbildung 3.24A**). Alle Kerne mit mindestens zwei zugeordneten Subobjekten wurden als fragmentierter

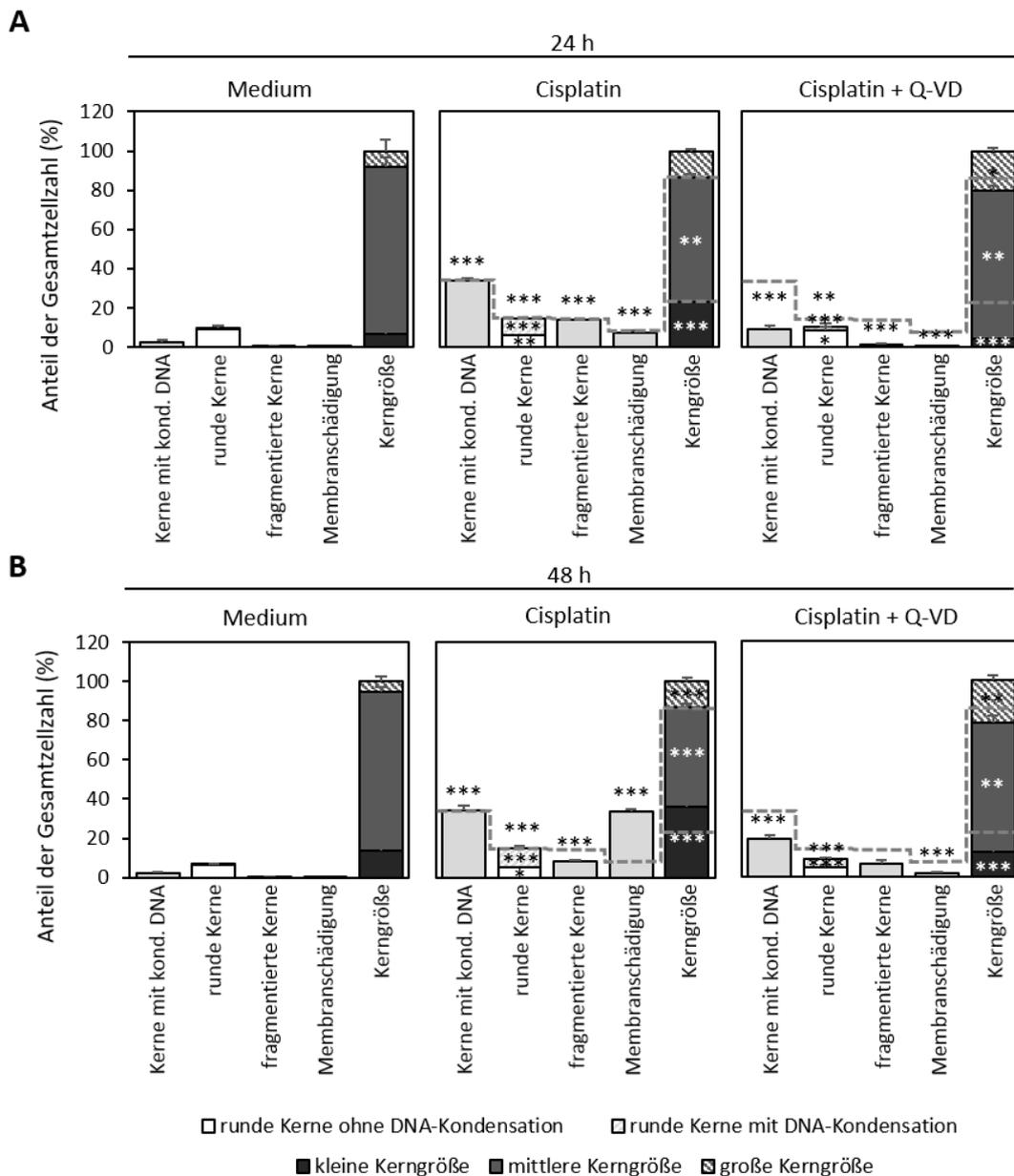


Abbildung 3.25: Die Quantifizierung phänotypischer Apoptose-Parameter generiert ein phänotypisches Apoptose-Profil einer Zellpopulation. Die Cisplatin-Behandlungsdauer und die Inhibition von Caspasen verändern das phänotypische Apoptose-Profil. A549 wurden für 24 (A) bzw. 48 (B) Stunden mit Cisplatin (50 μM) behandelt und gegebenenfalls mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh (20 μM) präinkubiert. Die phänotypischen Apoptose-Parameter wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Runde Zellkerne werden unterschieden in solche ohne DNA-Kondensation (hell, unten) und mit DNA-Kondensation (Schraffur, oben). Die Einteilung der Kerngröße erfolgt in kleine (schwarz, unten), mittlere (grau, Mitte) und große Kerne (Schraffur, oben). Der Parameter Membranschädigung stellt den Verlust der Plasmamembranintegrität dar. Kerne bezeichnet bei allen Parametern Zellkerne. Die grau gestrichelte Linie zeigt das Profil nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD eines repräsentativen von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Kern definiert. Während der Apoptose-Exekution ist ein Anstieg der fragmentierten Kerne im späten Verlauf zu erwarten, bevor die apoptotischen Zellen die Integrität der Plasmamembran verlieren und auslaufen, wodurch sich die apoptotische Morphologie verliert.

Die Quantifizierung dieser phänotypischen Parameter einer heterogenen Zellpopulation ergibt ein phänotypisches Apoptose-Profil (**Abbildung 3.25**). Nach 24 Stunden (**Abbildung 3.25A**) unterscheidet sich das Profil der Cisplatin-behandelten Zellpopulation deutlich von dem der unbehandelten Kontrolle durch einen Anstieg der Anzahl DNA-kondensierter, fragmentierter und membrangeschädigter Zellkerne. Es treten zudem mehr runde Zellkerne mit DNA-Kondensation in der Zellpopulation auf und der Anteil kleiner Zellkerne nimmt zu, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach 48-stündiger Cisplatin-Behandlung ist das Profil von spätapoptotischen Zellstadien geprägt, da der Anteil membrangeschädigter Zellen und kleiner Zellkerne gegenüber 24-stündiger Cisplatin-Exposition ansteigt (**Abbildung 3.25B**). Der Anteil runder Zellkerne mit DNA-Kondensation bleibt dagegen unverändert, da diese Parameter sowohl auf frühapoptotische, wie auch spätapoptotische Zellen zutreffen. Der Parameter Kernfragmentierung ist dagegen deutlich sensitiver, da er nur auf eine vergleichsweise geringe Anzahl apoptotischer Zellen und eine kurze zeitliche Spanne in der Apoptose-Exekution zutrifft. Er unterscheidet das Profil nach 48 Stunden ebenfalls von dem nach 24-stündiger Behandlung, da die Anzahl fragmentierter Zellkerne leicht abnimmt. Somit spiegelt sich bereits eine unterschiedliche Cisplatin-Behandlungsdauer im phänotypischen Profil wider. Die Zunahme kleiner Zellkerne in der unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden verglichen mit 24 Stunden, ist auf das Erreichen der Konfluenz im Well zurückzuführen, wodurch den einzelnen Zellen weniger Raum zur Ausbreitung in zweidimensionaler Richtung zur Verfügung steht.

Um zu überprüfen, inwiefern sich das phänotypische Apoptose-Profil eignet um Interaktionen von Stoffen aus der bioaktiven Substanz-Bibliothek mit der Ausprägung der apoptotischen Morphologie zu identifizieren, wurde der pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh eingesetzt. Die Hemmung der Caspasen, als bekannte Regulatoren der apoptotischen Morphologie, spiegelt sich deutlich im phänotypischen Profil wider. Sowohl nach 24, wie auch 48 Stunden sind alle Parameter deutlich reduziert gegenüber der jeweiligen Cisplatin-Behandlung (**Abbildung 3.25A, B**). Im Gegenzug steigt der Anteil großer Zellkerne bei Anwendung des Inhibitors gegenüber der reinen Cisplatin-Behandlung und insbesondere der unbehandelten Kontrolle. Dies könnte einerseits auf die geringere Zelldichte zurückzuführen sein, die auf der Caspase-unabhängigen antiproliferativen Wirkung von Cisplatin beruht, wodurch sich die lebenden Zellen stärker ausbreiten können. Andererseits könnte die Zunahme des Anteils großer Zellkerne auch auf die Cisplatin-induzierte Hemmung des Zellzyklus in der G2-Phase hindeuten. Durch die Replikation der DNA in der vorausgehenden S-Phase besitzen Zellen in der G2-Phase den doppelten DNA-Gehalt, was ebenfalls eine Zunahme

der Kerngröße bedingen könnte. Ein Vergleich der Profile mit Caspase-Inhibitor mit denen unbehandelter Zellen in ähnlicher Zelldichte könnte diesbezüglich Aufschluss geben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich das phänotypische Apoptose-Profil einer Zellpopulation als Tool eignet, um softwaregestützt morphologische Veränderungen der Apoptose-Exekution im zeitlichen Verlauf abzubilden und eine Beeinflussung durch bioaktive Substanzen anzuzeigen.

Die Heterogenität in der Reaktion einer Zellpopulation auf einen Apoptose-Stimulus konnte bereits im ersten Teil dieser Arbeit beobachtet werden. Um softwaregestützt diese Heterogenität auf Ebene der Gesamtzellpopulation erfassen zu können, bedarf es der Etablierung möglichst vieler Parameter, die die Bandbreite der zellulären Heterogenität bestmöglich abdecken. Die Kombination der in dieser Arbeit etablierten Parameter ermöglicht es bereits ein apoptotisches Profil zu erstellen, das charakteristisch für verschiedene Behandlungszeitpunkte ist. Die Herausforderung für zukünftige Studien besteht einerseits darin, weitere zelluläre Parameter für die fluoreszenzmikroskopische Erfassung zu etablieren, wie beispielsweise Marker des Zytoplasmas und der Aktivierung von Caspasen, sowie andererseits, die bioinformatische Bildanalyse weiter zu optimieren um aus einem Bild möglichst viele Parameter extrahieren zu können. So ist die Methode, die die softwaregestützte Detektion fragmentierter Zellkerne im Hoechst-Kanal ermöglicht, ein deutlicher Fortschritt. Sie ist jedoch limitiert durch den Abstand, den die einzelnen Kernfragmente maximal voneinander haben dürfen, um einzelne Fragmente einem ursprünglichen Zellkern zuzuordnen zu können. Um diese Limitierung zukünftig überwinden zu können und fragmentierte apoptotische Zellkerne als solche auch bei größerem Abstand der Einzelfragmente erkennen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für angewandte Informatik (IAI, KIT) die Bilderkennung für zukünftige Studien weiter optimiert. Dabei werden Bildbereiche mit Kernfragmenten, die aufgrund ihres Abstands voneinander im Hoechst-Kanal nicht mehr eindeutig einem ursprünglichen Kern zugeordnet werden können, ebenfalls im Durchlichtkanal analysiert. Da apoptotische Zellen durch das Abrunden einen erhöhten Kontrast aufweisen, können auf Durchlichtaufnahmen Informationen zur Gesamtzellform dieser Zellen extrahiert werden. Über die Kombination der Informationen aus Hoechst- und Durchlichtkanal können somit einzelne Kernfragmente auch bei größerem Abstand voneinander, einer Zelle zugeordnet werden (Khan et al., 2014). Das Zusammenspiel von Bioinformatik und molekularer Zellbiologie ermöglicht über solche Ansätze die Etablierung neuer Analysemethoden, die in Zukunft zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen zellulärer Prozesse, wie der Apoptose, anderer Zelltodformen oder der Interaktion von Zellen, beitragen können.

3.2.2 Veränderung des phänotypischen Apoptose-Profiles durch Stoffe der bioaktiven Substanz-Bibliothek

Nach erfolgreicher Etablierung der phänotypischen Apoptose-Marker und ihrer Quantifizierung als phänotypisches Apoptose-Profil, wurde das Prinzip genutzt um Modulatoren der komplexen apoptotischen Morphologie zu identifizieren. Die Analyse der Daten des biochemischen Screens erfolgte dabei auf Veränderungen des phänotypischen Profils der Co-Behandlung gegenüber der Cisplatin-Kontrolle (**Abbildung 3.26**). Dabei konnten drei Substanzen identifiziert werden, deren Zielstrukturen bekannte Regulatoren der apoptotischen Morphologie sind, was das Prinzip validiert: der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, der ROCK1-Inhibitor Y-27632 und der Myosin-Inhibitor Blebbistatin. Alle drei verschieben das phänotypische Profil in Richtung der unbehandelten Kontrolle, d.h. sie verzögern die Apoptose-Exekution. Der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (**Abbildung 3.26B**) ist weniger effektiv als in den vorausgegangenen Versuchen der Caspase-Inhibitor Q-VD (**Abbildung 3.25**), da er den Anteil kondensierter und fragmentierter Zellkerne gegenüber der Cisplatin-Kontrolle nicht verändert. Die Verzögerung der Apoptose-Exekution wird jedoch am erhöhten Anteil runder, kondensierter Kerne und der Reduktion membrangeschädigter Zellen deutlich. Die teilweise Hemmung der Caspasen bewirkt somit eine Akkumulation der Zellen in diesem frühen Stadium, für dessen Erreichen die verbliebene Caspase-Aktivität auszureichen scheint. Die Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten wird für das Membran-Blebbing, wie auch das Auseinanderziehen des Zellkerns bei der Zellkernfragmentierung benötigt (Taylor et al., 2008). Die von Caspasen proteolytisch aktivierte Kinase ROCK1 reguliert über die Phosphorylierung von Myosin die Dynamik des Aktin-Myosin-Zytoskeletts und ist ein bekannter Regulator des Membran-Blebbings, sowie der Fragmentierung des Zellkerns (Coleman et al., 2001; Croft et al., 2005; Taylor et al., 2008). An gleicher Stelle wirkt auch Blebbistatin, das die Aktin-Myosin-Kontraktion hemmt (Croft et al., 2005; Kovács et al., 2004; Orlando et al., 2006). Sowohl der ROCK-Inhibitor, wie auch Blebbistatin reduzieren die Fragmentierung des Zellkerns und verzögern den Verlust der Plasmamembranintegrität (**Abbildung 3.26C, D**).

Das phänotypische Profil vier weiterer Substanzen war auffällig, da es sich durch einen Anstieg runder Zellkerne deutlich von der Cisplatin-Kontrolle abhob (**Abbildung 3.26E-H**). Bei allen vier Substanzen sind die runden Zellkerne häufig durch eine partielle, periphere DNA-Kondensation gekennzeichnet. Interessanterweise kommt es bei drei der Substanzen, Olomoucine, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, *cycline-dependent kinases*), Ouabain, einem Inhibitor der Natrium-Kalium-ATPase und PD 98059, der die Aktivierung der MAP-Kinase ERK hemmt, zu einem Anschwellen des Zellkerns und der Zelle, was der vollständigen Kernkondensation, Kern- und Zellfragmentierung und damit dem Voranschreiten der Apoptose-Exekution entgegen zu wir-

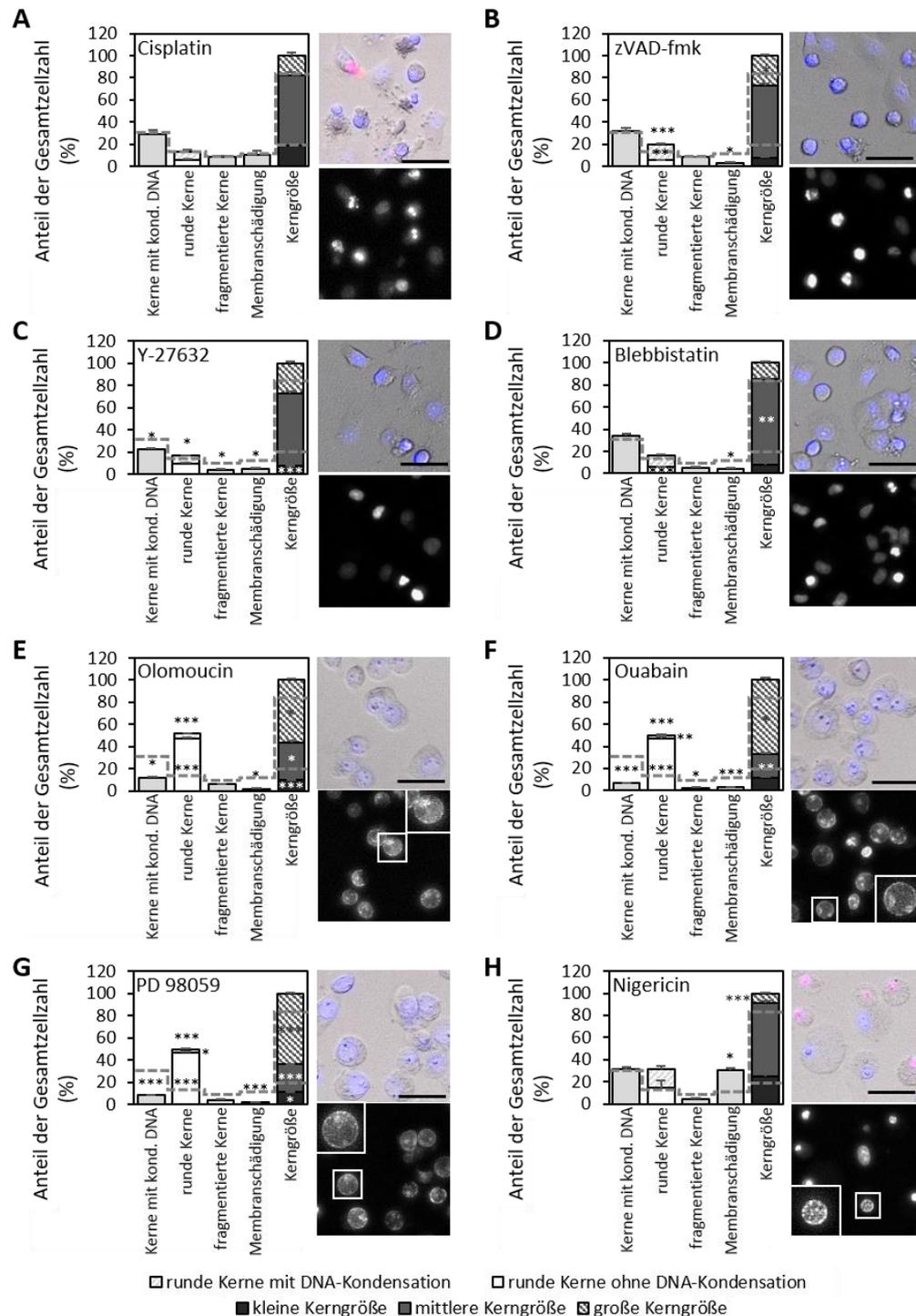


Abbildung 3.26: Veränderung des phänotypischen Apoptose-Profiles durch Co-Behandlung der bioaktiven Substanzen mit Cisplatin. A549 wurden für 30 Minuten mit den entsprechenden Chemikalien (zVAD-fmk 21 μM , Y-27632 40 μM , Blebbistatin 34 μM , Olomoucine 34 μM , Ouabain 17 μM , PD 98059 37 μM , Nigericin 14 μM , B-H) oder DMSO (0,2 %, A) präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Cisplatin (50 μM) behandelt. Die phänotypischen Apoptose-Parameter wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Die grau gestrichelte Linie zeigt das Profil nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte + Mittelwertabweichung von 2 unabhängigen Replikaten (bioaktive Substanzen) bzw. Mittelwert + SD 2 unabhängiger Wiederholungen mit jeweils 24 Replikaten (Cisplatin). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur Cisplatin-Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$. Repräsentative Bildausschnitte: oben Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot); unten Hoechst-Kanal. Maßstab 50 μm .

ken scheint. Auch der Verlust der Plasmamembranintegrität wird von allen drei Substanzen stark reduziert. Nigericin dagegen, ein Kalium-Ionophor, verdoppelt den Anteil membrangeschädigter Zellen und es treten neben den peripher kondensierten, runden Zellkernen auch kleine vollständig kondensierte Kerne auf. Nigericin scheint somit das Voranschreiten des Cisplatin-induzierten Zelltodes zu beschleunigen. Dabei tritt jedoch nur bedingt die Apoptose-typische Morphologie auf, insbesondere auf zytoplasmatischer Ebene kommt es trotz Kondensation des Kerns zum Anschwellen und Abrunden der Zelle, wohingegen die Fragmentierung des Zellkerns und des Zellkörpers ausbleiben.

Es stellt sich die Frage, wie die vier Substanzen mit der Apoptose-Exekution interagieren, sodass es zur Veränderung der apoptotischen Morphologie kommt. Im Falle von Ouabain, Olomoucine und PD 98059 treten die zellmorphologischen Veränderungen auch unabhängig von Cisplatin auf (**Abbildung A.6**). Wie jedoch vorläufige Ergebnisse von Zeitverlaufstudien mit den Substanzen zeigen, wird das Auftreten der morphologischen Veränderungen durch Cisplatin um mehrere Stunden beschleunigt (Daten nicht gezeigt). Es ist daher möglich, dass diese Substanzen selbst als Zelltod-Stimulus mit atypischer Morphologie wirken, gleichzeitig interferieren sie dadurch jedoch mit den Mechanismen, die der Apoptose-Exekution zugrunde liegen, sodass es zur Veränderung der klassischen apoptotischen Zellmorphologie kommt. Für Ouabain wurde diesbezüglich bereits beschrieben, dass es einerseits selbst zytotoxisch wirken kann, sowie die Wirkung verschiedener Apoptose-Stimuli verstärkt (Gonzalez et al., 2014; Pchejetski et al., 2003). Ouabain ist ein bekanntes Herzglykosid, das über die Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase wirkt. Der durch die Hemmung bedingte Einstrom von Natriumionen und Ausstrom von Kaliumionen führt zur Veränderung der zellulären Ionenhomeostase (Panayiotidis et al., 2006). Die Regulation der Ionenhomeostase ist eng gekoppelt an die Regulation des Zellvolumens, was gerade im Apoptose-Kontext von großer Bedeutung ist, da der zytoplasmatische Volumenverlust eines der morphologischen Charakteristika apoptotischen Zelltods darstellt (Bortner & Cidlowski, 2002). Dieser apoptotische Volumenverlust (*AVD, apoptotic volume decrease*) wird über eine Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen ausgelöst, insbesondere Kalium-, Natrium- und Chloridionen scheinen dabei von Bedeutung zu sein (Bortner & Cidlowski, 2014; Nunez et al., 2010; Okada & Maeno, 2001). Die Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen führt schlussendlich zu einem Ausstrom von Wasser, was die apoptotische Volumenreduktion bewirkt. Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt, interessanterweise wurde jedoch eine frühe Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase beobachtet, die an der Initiation des Prozesses beteiligt scheint (Bortner et al., 2001; Bortner & Cidlowski, 2004; Nobel et al., 2000). Der darauffolgende Kalium-Efflux ist neben der Volumenreduktion wiederum auch Voraussetzung für die Akti-

vierung proteolytischer Enzyme, wie Caspasen und Nukleasen, die die apoptotische Morphologie hervorrufen (Ajiro et al., 2008; Bortner et al., 1997; Bortner & Cidlowski, 2007; Cain et al., 2001; Dezaki et al., 2012; Panayiotidis et al., 2006). Die Hemmung der Natrium-Kalium-ATPase mittels Ouabain geschieht somit aus Sicht der Apoptose-Exekution zum falschen Zeitpunkt. Sie steht daher nicht im Einklang mit der apoptotischen Maschinerie, wodurch die Ionenverhältnisse in der Zelle verschoben werden, was zu einem Anschwellen der Zelle und des Zellkerns führen und der apoptotischen Volumenreduktion entgegenwirken könnte. Außerdem wird möglicherweise über die veränderten intrazellulären Ionenkonzentrationen die Aktivierung proteolytischer apoptotischer Enzyme verhindert, was in der Summe die atypische Morphologie erklären kann. Interessant ist jedoch, dass auch der CDK-Inhibitor Olomoucine, der in der eingesetzten Konzentration neben CDKs ebenfalls ERK inhibieren kann, sowie PD 98059, der die Aktivierung von ERK hemmt, ein sehr ähnliches phänotypisches Profil induzierten wie Ouabain. Tatsächlich gibt es eine Verbindung von ERK und der Natrium-Kalium-ATPase, da in Studien gezeigt werden konnte, dass ERK direkt die ATPase phosphorylieren kann (Al-Khalili et al., 2004; Poulsen et al., 2010; Zhong et al., 2004). In den Studien von Al-Khalili und Zhong, die im Kontext von Insulin-Signaltransduktion stattfanden, bewirkte die Phosphorylierung der ATPase durch ERK eine Aktivitätssteigerung, die verstärkte Translokation der Natrium-Kalium-ATPase zur Membran und ihren Einbau in die Membran. Möglicherweise existiert auch im Kontext der Apoptose-Exekution ein bisher unbekannter Zusammenhang zwischen ERK und der Natrium-Kalium-ATPase, was das Auftreten der ähnlichen Zellmorphologie durch die Inhibitoren der Natrium-Kalium-ATPase und ERK erklären könnte. ERK könnte zum Beispiel wichtig sein um die Aktivität der ATPase auch unter propaoptotischen Bedingungen bis zum apoptotischen Volumenverlust aufrecht zu erhalten und gleichzeitig könnte über die Hemmung von ERK die Natrium-Kalium-ATPase gehemmt werden um den apoptotischen Volumenverlust im Verlauf der Apoptose-Exekution einzuleiten.

Nigericin, das als Kalium-Ionophor ebenfalls die intrazelluläre Ionenhomeostase durch den Efflux von Kaliumionen stört, scheint die Apoptose-Exekution zu beschleunigen. Möglicherweise bewirkt der starke Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration eine schnellere Caspase-Aktivierung was das schnellere Voranschreiten der Apoptose-Exekution und somit den früheren Verlust der Plasmamembranintegrität erklären könnte. Gleichzeitig kommt es wie bei Olomoucine, Ouabain und PD 98059 ebenfalls nicht zur Bildung von Apoptotic Bodies, da durch die Störung der Ionenhomeostase ebenfalls der regulierte apoptotische Volumenverlust gestört ist. Der apoptotische Volumenverlust scheint jedoch rein aus Sicht des Volumen-zu-Oberfläche-Verhältnis einer Zelle für die Bildung der Apoptotic Bodies unverzichtbar. Um das gleiche Zellvolumen in einer Vielzahl kleinerer, membranumschlossener Vesikel unterbringen zu können, würde es einer enormen

Vergrößerung der Membranoberfläche bedürfen. Ist die Membranoberfläche jedoch konstant, wie bei einer apoptotischen Zelle, bleibt nur eine Volumenreduktion übrig um den verbliebenen Zellinhalt in Apoptotic Bodies unterzubringen (Nunez et al., 2010). Dieser Sachverhalt könnte erklären, warum bei Störung der Ionenhomeostase und der apoptotischen Volumenreduktion die Auflösung der Zelle in Apoptotic Bodies ausbleibt.

Die Ergebnisse bestätigen die große Bedeutung der Ionenhomeostase als Grundlage für die Ausprägung der apoptotischen Morphologie während der Apoptose-Exekution. Die Komplexität der apoptotischen Morphologie erschwert jedoch die Entschlüsselung ihrer molekularen Grundlagen. Über die Etablierung phänotypischer Marker und deren softwaregestützte Quantifizierung als phänotypisches Apoptose-Profil, können jedoch unvoreingenommen phänotypische Veränderungen auf Einzelzellebene in einer heterogenen Zellpopulation erfasst werden. Durch die Etablierung weiterer Marker, insbesondere zytoplasmatischer, sowie die Optimierung der softwaregestützten Analyse für Zeitverlaufsstudien, kann in Zukunft auch das komplexe Zusammenspiel der apoptotischen Morphologie auf nukleärer und zytoplasmatischer Ebene untersucht werden.

Apoptotischer Zelltod ist aus physiologischer Sicht vorteilhaft, da es durch die Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität nicht zur Freisetzung entzündlicher Faktoren kommt, bevor die apoptotischen Zellen phagozytiert werden. Ein vorzeitiger Verlust der Integrität der Zellmembran hätte somit schwerwiegende Folgen *in vivo*, was eine aktive Regulierung nahelegt. Auch dieser Prozess weist jedoch eine zelltypabhängige Dynamik auf, wie bereits im ersten Teil der Arbeit unter 3.1.3 beschrieben. Um mehr über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erfahren, wurde der Datensatz des Screens der bioaktiven Substanzen in Co-Behandlung mit Cisplatin auf eine Veränderung des Anteils zellmembrangeschädigter Zellen (nachfolgend als membrangeschädigte Zellen bezeichnet) analysiert, bei einem mit der Cisplatin-Kontrolle vergleichbarem Gesamtzelltodlevel. In der Analyse wurden dazu solche Substanzen berücksichtigt, die in Co-Behandlung mit Cisplatin den Anteil der Zellen mit Schädigung der Plasmamembran um mindestens 4 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle verändern ($|z\text{-score}| \geq 4$), den Cisplatin-induzierten Zelltod jedoch nicht beeinflussen (maximal 1,5 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle, $|z\text{-score}| \leq 1,5$). Um starke zytotoxische Effekte der Substanzen selbst auszuschließen, dürfen die Substanzen außerdem bei alleiniger Inkubation maximal eine Zytotoxizität von 15 % der Gesamtzellzahl aufweisen. Die Substanzen, auf die diese Filterkriterien zutreffen, sind in **Abbildung 3.27** in Form einer Heatmap dargestellt. Da sich der Anteil membrangeschädigter Zellen aus den Zelltodstadien spätapoptotisch und sehr spätapoptotisch/nekrotisch zusammensetzt, sind die einzelnen Stadien ebenfalls dargestellt. Die Farbcodierung ist jeweils auf den Wert der Cisplatin-Kontrolle normiert. Auffallend ist, dass lediglich zwei Substanzen sowohl in HeLa, wie auch in A549

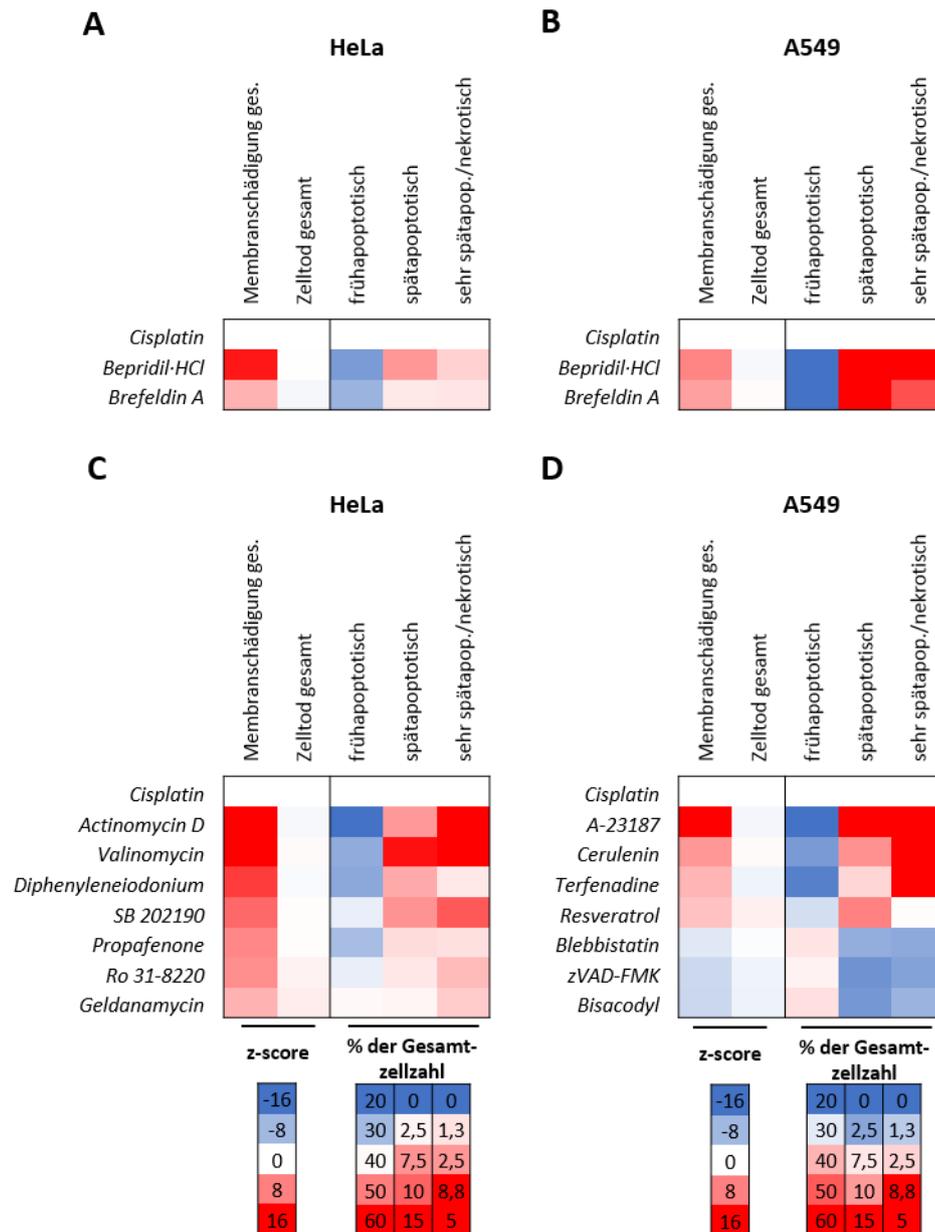


Abbildung 3.27: Veränderung des Anteils membrangeschädigter Zellen durch Co-Behandlung mit bioaktiven Substanzen und Cisplatin bei vergleichbarer gesamtzytotoxischer Wirkung. Dargestellt sind Substanzen der bioaktiven Substanz-Bibliothek, die den Cisplatin-induzierten Gesamtzelltod nicht beeinflussen ($|z\text{-score}| \max. 1,5$), jedoch den Anteil membrangeschädigter Zellen um mindestens 4 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle verändern ($|z\text{-score}| \min. 4$). Um starke zytotoxische Effekte der Substanzen alleine auszuschließen, darf die Zytotoxizität bei alleiniger Inkubation maximal 15 % der Gesamtzellzahl betragen. HeLa (**A, C**) und A549 (**B, D**) wurden für 30 Minuten mit den entsprechenden Substanzen oder DMSO (0,2 %, Cisplatin-Kontrolle) präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit äquitoxischen Konzentrationen von Cisplatin (HeLa: 45 μM , A549: 50 μM) behandelt. Der Gesamtzelltod, sowie die verschiedenen Zelltodstadien wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Replikaten als z-score normiert (Membranschädigung ges. und Gesamtzelltod), sowie als Prozent der Gesamtzellzahl (früh-, spät-, sehr spätapoptotisch/nekrotisch). Die Membranpermeabilisierung ges. ergibt sich durch Addition der Werte von spätapoptotisch und sehr spätapoptotisch/nekrotisch. Die Farbcodierung wurde für jede Zelllinie und jeden Endpunkt auf den Wert der Cisplatin-Kontrolle normiert.

den Verlust der Plasmamembranintegrität beschleunigen (**Abbildung 3.27A und B**). Weitaus mehr Substanzen erhöhen dagegen zelltypspezifisch den Anteil membrangeschädigter Zellen (**Abbildung 3.27C und D**), was vermuten lässt, dass die zugrunde liegenden Mechanismen zelltypabhängig von verschiedenen Signalwegen beeinflusst werden könnten.

Da der gesamtinduzierte Zelltod der Co-Behandlung auf einem mit der Cisplatin-Kontrolle vergleichbaren Level ist, ist es unwahrscheinlich, dass der erhöhte Anteil membrangeschädigter Zellen auf eine höhere Apoptose-Initiation zurückzuführen ist. Vielmehr müssen die Substanzen in Co-Behandlung Signalwege beeinflussen, die an der Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität beteiligt sind. Mit Blick auf die für beide Zelllinien gemeinsamen Zielstrukturen der Substanzen, die zu einer Beschleunigung der Membranschädigung führen, fällt die Interferenz mit der zellulären Calcium- und Kaliumkonzentration durch die Substanzen Bepidil, Valinomycin, Propafenon und A-23187 auf. Valinomycin, ein Kaliumionophor, führt zu einem Kaliumefflux. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist der Abfall der Kaliumkonzentration Voraussetzung für die Caspase-Aktivierung, weshalb ein verstärkter Kaliumausstrom die Apoptose-Exekution und somit die Schädigung der Plasmamembran beschleunigen könnte. Propafenon, das spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle hemmt, könnte ebenfalls durch eine Interferenz mit der Kaliumhomeostase zur Beschleunigung der Apoptose-Exekution und dadurch der verstärkten Membranpermeabilität beitragen. Zur Beeinflussung der Calciumkonzentration kommt es durch A-23187, ein Calciumionophor, und Bepidil, das Natrium-Calcium-Austauscher blockiert. Der Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, als mögliche Konsequenz von A-23187 und Bepidil, ist ebenfalls für die Apoptose-Exekution von Bedeutung, da er zur Aktivierung Calcium-abhängiger Nukleasen und Calcium-abhängiger Proteasen, den Calpainen, führt (Dezaki et al., 2012; Pinton et al., 2008). Diese Substanzen bewirken somit möglicherweise eine frühere Aktivierung dieser proteolytischen Enzyme, wodurch die Apoptose-Exekution beschleunigt wird, an deren Ende der Verlust der Plasmamembranintegrität steht. Wie bereits unter Kapitel 3.1.3 angesprochen, bilden Mikrotubuli des Zytoskeletts während der Apoptose-Exekution ein Netzwerk um die Plasmamembran, das an der Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität beteiligt ist (Atkin-Smith & Poon, 2016; Oropesa-Avila et al., 2013). Dieses apoptotische Mikrotubuli-Netzwerk (AMN, *apoptotic microtubule network*) schützt die Plasmamembran als physische Barriere vor dem proteolytischen Abbau, bis die apoptotische Zelle *in vivo* phagozytiert wird. Durch eine frühere Aktivierung von Caspasen und Calpainen durch die Interferenz mit den intrazellulären Ionenkonzentrationen, könnte es schneller zur Degradierung des apoptotischen Mikrotubuli-Netzwerks kommen, wodurch die Zelle früher die Integrität der Plasmamembran verliert. Eine Beschleunigung der Caspase-Aktivierung könnte ebenfalls durch eine schnellere Permeabilisierung

der äußeren Mitochondrienmembran und der damit verbundenen Aktivierung von Caspase-9 über die Freisetzung von Cytochrom c erfolgen. Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran wird vom Gleichgewicht der anti- und pro-apoptischen Bcl-2 Proteine reguliert (Bhola & Letai, 2016). Für die Substanz Cerulenin konnte von Ho et al. gezeigt werden, dass das antiapoptische Bcl-2-Protein Bcl-xL durch Cerulenin depletiert wird, ohne jedoch andere Bcl-2-Proteine zu beeinflussen, und darüber den intrinsischen Apoptose-Signalweg fördert (Ho et al., 2007). Andere Substanzen, wie beispielsweise die Kinase-Inhibitoren SB 202190 (p38) und Ro 31-8220 (PKC) zeigen in HeLa, dass die Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität möglicherweise von aktiv regulierten Prozessen abhängig scheint, da die Hemmung der Kinasen zu einem vorzeitigen Integritätsverlust führt. Eine weitere Möglichkeit, die eine Beschleunigung des Verlusts der Plasmamembranintegrität bewirken könnte, ist eine vorzeitige Energiedepletion der apoptotischen Zelle, die den unter Energieaufwand aktiv regulierten Prozessen entgegenwirken würde, was beispielsweise der Wirkung des Flavoprotein-Inhibitors Diphenyleneiodonium zugrunde liegen könnte. Obwohl Diphenyleneiodonium häufig als NADPH-Oxidase-Inhibitor eingesetzt wird, ist ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den Zitratzyklus bekannt (Riganti et al., 2004). Der Effekt durch Terfenadin, das am membranständigen Histamin-Rezeptor, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR, *G protein-coupled receptor*) wirkt, lässt vermuten, dass die Apoptose-Exekution in Krebszellen durch extrazelluläre Signale in ihrer Geschwindigkeit moduliert werden kann, was von großer Bedeutung für die Tumortherapie ist.

Der erhöhte Verlust der Plasmamembranintegrität ist bei allen identifizierten Substanzen sowohl auf die Erhöhung des Anteils spätapoptotischer, sowie sehr spätapoptotischer/nekrotischer Zellen zurückzuführen. Die Verhältnisse zwischen diesen beiden Zelltodstadien unterscheiden sich jedoch bei den einzelnen Substanzen, was durch eine unterschiedliche Relevanz der biologischen Zielstrukturen der jeweiligen Substanzen bedingt sein könnte. Zukünftige Zeitverlaufsstudien mit den identifizierten Substanzen könnten somit differenzierter Aufschluss geben über den Zeitpunkt, ab dem der beschleunigte Verlust der Membranintegrität durch die jeweilige Substanz auftritt und welche Phase der verschiedenen Zelltodstadien (früh-, spät-, sehr spätapoptotisch/nekrotisch) maximal beschleunigt wird. Darüber könnten weitere Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen gezogen werden.

Neben einer Beschleunigung des Verlusts der Plasmamembranintegrität bei vergleichbarem Gesamtzelltod mit der Cisplatin-Kontrolle, konnte in A549 auch eine Verzögerung durch drei Substanzen beobachtet werden. Die Verzögerung der Apoptose-Exekution durch Hemmung der Aktin-Myosin-Kontraktion durch Blebbistatin, sowie der Caspasen durch zVAD-fmk ist bereits durch die Veränderung des phänotypischen Apoptose-Profiles aufgefallen (**Abbildung 3.26**). Bisacodyl,

das als laxatives Medikament bei Obstipation eingesetzt wird, reduzierte ebenfalls das Auftreten membrangeschädigter Zellen. Obwohl Bisacodyl bereits seit den 60er-Jahren vermarktet wurde, ist der genaue Wirkmechanismus nicht bekannt (Zeniou et al., 2015). Es konnte jedoch in Zellen des Darmepithels der Zusammenhang von Bisacodyl und einer verminderten Expression von Aquaporinen festgestellt werden, die indirekt über eine Freisetzung von Prostaglandinen zu erfolgen scheint und bereits zwei Stunden nach Gabe des Medikaments erfolgte (Ikarashi et al., 2016, 2011; Izzo et al., 1998). Aquaporine spielen wiederum als membranständige Wasserkanäle eine wichtige Rolle bei zellvolumenregulatorischen Prozessen, da sie einen schnellen Transfer von Wasser über die Plasmamembran ermöglichen (Day et al., 2014). Auch das Schrumpfen einer apoptotischen Zelle über den regulatorischen Volumenverlust erfordert einen schnellen Wasserausstrom aus der Zelle. Eine Beteiligung von Aquaporinen an diesem Prozess ist daher naheliegend, was in Studien von Jablonski et al. bestätigt werden konnte (Jablonski et al., 2007, 2004). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von Aquaporinen nicht nur die apoptotische Volumenreduktion, sondern auch die Apoptose-Exekution inhibiert wird. Da Aquaporine neben dem Darm auch in einer Vielzahl weiterer Organe exprimiert werden, darunter auch die Lunge (Day et al., 2014), könnte Bisacodyl in A549 die Apoptose-Exekution über eine mögliche Wechselwirkung mit Aquaporinen verlangsamen, was am verzögerten Verlust der Plasmamembranintegrität sichtbar wird. Dafür spricht ebenfalls die Beobachtung in A549, dass bei Co-Behandlung von Cisplatin mit Bisacodyl verstärkt apoptotische Zellen auftreten, die zwar bereits durch DNA-Kondensation gekennzeichnet sind, im Vergleich zu Cisplatin-behandelten Zellen jedoch noch nicht den apoptotischen Volumenverlust zeigen (**Abbildung A. 7**).

Da in HeLa nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung mit etwa 3 % PI-positiver Zellen nur ein sehr geringer Anteil an Zellen bereits die Plasmamembranintegrität verloren hat, konnten im Gegensatz zu A549 keine Substanzen identifiziert werden, die diesen Anteil deutlich senken.

Die Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität apoptotischer Zellen ist das entscheidende Kriterium, das Apoptose als nicht-entzündliche Form des Zelltods kennzeichnet. In dieser Arbeit konnte sowohl eine Beschleunigung, wie auch eine Verlangsamung dieses Prozesses durch Interaktion mit verschiedenen zellulären Prozessen beobachtet werden, die eine aktive Regulierung dieses Prozesses unterstreichen. Insbesondere die Beobachtung der kürzlich erschienenen Studie von Rogers et al., dass in einer apoptotischen Zelle der Verlust der Plasmamembranintegrität aktiv durch das Caspase-Spaltprodukt des Proteins DFNA5 (*deafness associated tumor suppressor*) hervorgerufen werden kann (Rogers et al., 2017), zeigt neue Aspekte in der Regulierung der Zellmembranintegrität apoptotischer Zellen auf. Es scheinen somit nicht nur Mechanismen zu existieren, die die Integrität der Plasmamembran während der Apoptose-Exekution aktiv aufrechterhal-

ten, wie beispielsweise die Bildung des apoptotischen Mikrotubuli-Netzwerks, sondern darüber hinaus auch Mechanismen, die den Verlust der Plasmamembranintegrität aktiv beschleunigen können, wie es z.B. über den Expressionslevel des Proteins DFNA5 erfolgen könnte. Die physiologische Relevanz dieser Mechanismen ist von großer Bedeutung, da sie einerseits sicherstellen, dass Apoptose eine nicht-entzündliche Form des Zelltods darstellt. Andererseits vernetzen sie Apoptose mit Aspekten nekrotischen Zelltods, da über den vorzeitigen Verlust der Plasmamembranintegrität und die damit verbundene Freisetzung pro-inflammatorischer intrazellulärer Bestandteile, sogenannter DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), auch eine gezielte Aktivierung des Immunsystems erfolgen kann. Dies könnte beispielsweise im Kontext von Pathogeninfektionen, z.B. durch Viren, von großer Bedeutung sein (Rogers et al., 2017).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieses Kapitels insbesondere auf eine bedeutende Rolle der zellulären Ionenhomeostase und der Veränderung von Ionenkonzentrationen in der Regulation der apoptotischen Morphologie und Apoptose-Exekution hin. In den nachfolgenden Kapiteln steht die Modulation, d.h. die Verringerung oder Erhöhung der Gesamtrate Cisplatin-induzierter Apoptose im Vordergrund der Analyse, unter Verwendung des etablierten Hochdurchsatzverfahrens zur Detektion apoptotischer Zellen. Klinisch relevante Wechselwirkungen von Arzneimitteln mit Cisplatin, sowie die Identifizierung von Signalwegen, die die Cisplatin-induzierte Apoptose beeinflussen können, sollen dadurch untersucht werden.

3.2.3 Modulation des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Lungen- und Cervixkarzinomzellen

Obwohl Cisplatin bereits seit 1979 als Medikament zur Tumorthherapie zugelassen ist, sind die molekularen Grundlagen seiner zytotoxischen Wirkung bisher nicht komplett verstanden (Wheate et al., 2010). Ein umfassendes Verständnis über Signalwege, die die Wirkung von Cisplatin verstärken oder abschwächen können, ist einerseits zur Vorbeugung von Resistenzentwicklungen und andererseits für die individuelle Abstimmung der Tumorthherapie auf den Patienten, von großer Bedeutung. Um Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose zu identifizieren, wurde der Datensatz des Screens der bioaktiven Substanz-Bibliothek auf Substanzen analysiert, die den Cisplatin-induzierten Zelltod verstärken oder vermindern. **Abbildung 3.28** zeigt die Effekte der Substanzen auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Jeder Datenpunkt entspricht dabei einer Substanz mit der jeweiligen Effektstärke (z-score normalisierter Mittelwert der beiden Replikate). **Abbildung 3.28A** zeigt alle Substanzen, deren Effekte reproduzierbar waren, d.h. deren Wert in beiden Wiederholungen für mindestens eine Zelllinie die folgenden Kriterien erfüllte: Für einen zelltoderhöhenden Effekt müssen die Werte beider Wiederholungen einen z-score von mindestens 1,5 aufweisen, für eine

zelltodvermindernde Wirkung darf der z-score entsprechend maximal -1,5 betragen. Substanzen, deren Wert in beiden Wiederholungen zwischen -1,5 und 1,5 lag, wurden als nicht zelltodmodulierend eingestuft (kein Effekt). Von 1120 Substanzen modulierten 640 nach diesen Kriterien den Cisplatin-induzierten Zelltod. Im nächsten Schritt der Analyse wurden unter den zelltod erhöhenden und -vermindernden Substanzen solche ausgeschlossen, die eine Eigenzytotoxizität zeigten

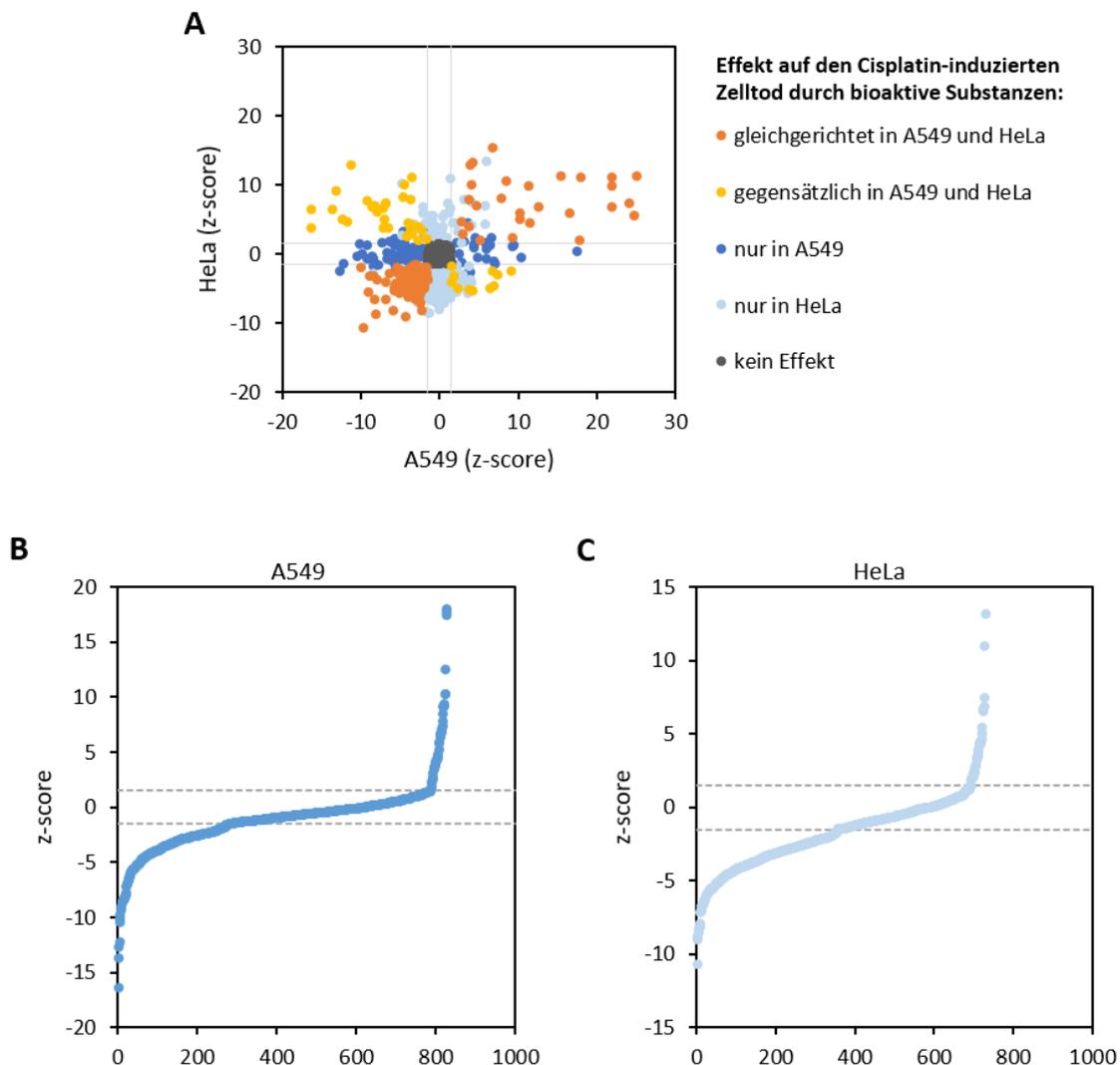


Abbildung 3.28: Modulation des Cisplatin-induzierten Zelltods durch bioaktive Substanzen in humanen Krebszellen. **A** Eine Erhöhung des Zelltods liegt vor, wenn der Effekt in beiden Wiederholungen größer 1,5 (z-score > 1,5) ist, bei einer Erniedrigung des Zelltods analog kleiner -1,5 (z-score < -1,5). Ohne Effekt sind Substanzen, deren z-score in beiden Wiederholungen zwischen -1,5 und 1,5 liegt ($-1,5 \leq \text{z-score} \leq 1,5$). **B, C** Die Analyse je Zelllinie fand unter Ausschluss von Substanzen statt, die selbst eine zytotoxische Wirkung zeigen (Zelltod in alleiniger Behandlung mit den bioaktiven Substanzen größer 15 % der Gesamtzellzahl). A549 und HeLa wurden für 30 Minuten mit den bioaktiven Substanzen der Bibliothek oder DMSO (0,2 %) präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit äquitoxischen Konzentrationen von Cisplatin (A549: 50 μM , HeLa: 45 μM) behandelt. Der Gesamtzelltod wurde mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Replikaten als z-score normiert.

(Zelltod > 15 % bei alleiniger Behandlung). Die verbliebenen Substanzen sind in **Abbildung 3.28B** und **C** je Zelllinie nach Effektstärke aufgetragen. In beiden Zelllinien reduzieren deutlich mehr Substanzen den Cisplatin-induzierten Zelltod (A549: 279, HeLa: 357), als solche die ihn verstärken (A549: 43, HeLa: 35) (**Abbildung A.8**), die Anzahl der Zelltod-vermindernden und -verstärkenden Substanzen ist jedoch in beiden Zelllinien ähnlich. Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod entsprechend der genannten Kriterien reduzieren, werden nachfolgend als Suppressoren bezeichnet, Substanzen die analog den Cisplatin-induzierten Zelltod erhöhen werden Sensibilisatoren genannt.

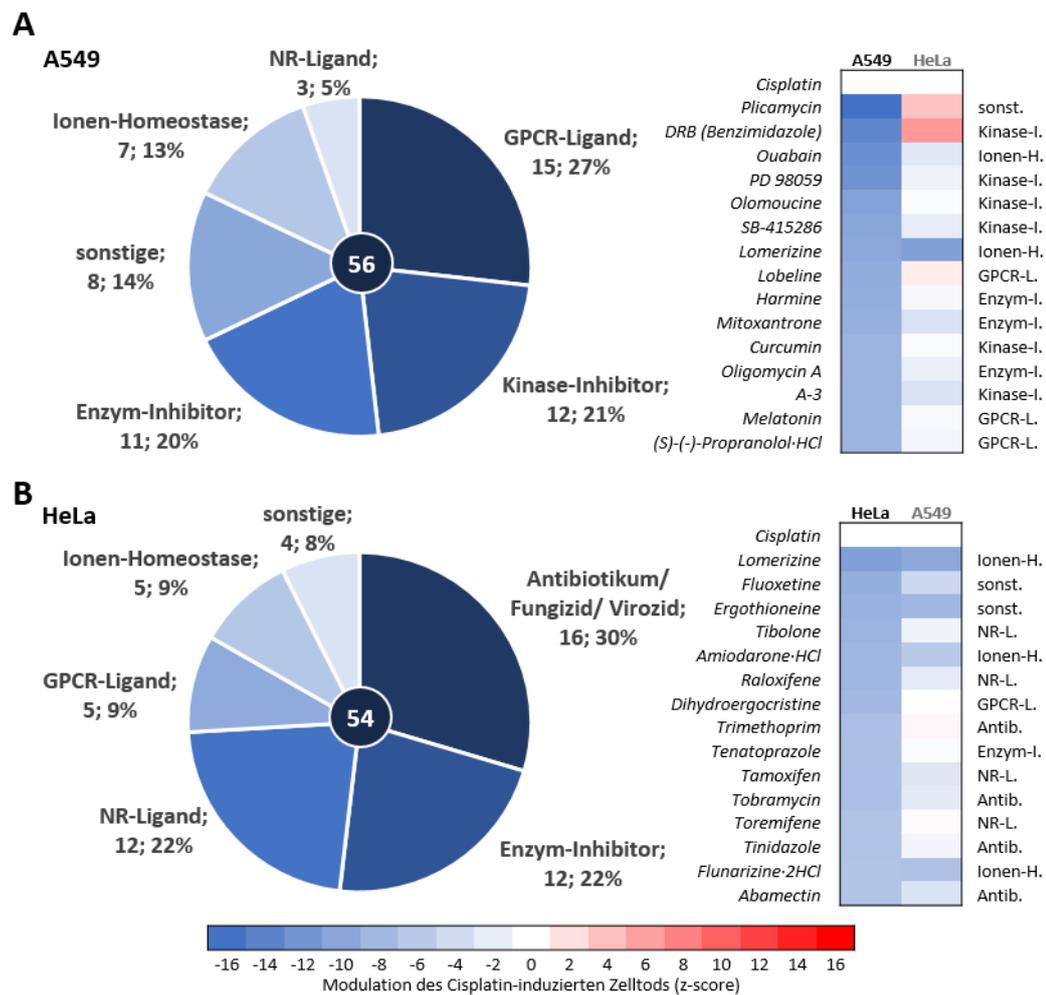


Abbildung 3.29: Suppressoren des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen und ihre funktionelle Gruppierung. Datengrundlage sind bioaktive Substanzen der Bibliothek, die den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens 5 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle (z-score ≤ -5) verringern, unter Ausschluss von Substanzen, die selbst eine zytotoxische Wirkung (Zelltod > 15 % der Gesamtzellzahl) zeigen. Die Kuchendiagramme zeigen die Zielstrukturen aller identifizierter Substanzen je Zelllinie (**A** A549, **B** HeLa), die Heatmaps die 15 stärksten Effektoren (Mittelwert der zwei unabhängigen Replikate) in Form einer Farbcodierung des z-scores (vollständige Auflistung aller Substanzen siehe Anhang). Die Heatmaps zeigen die Werte der Substanzen auch in der jeweils anderen Zelllinie. GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, NR: nukleärer Rezeptor.

Die Substanzen mit den stärksten Effekten, die den Zelltod um mindestens 10 % ($|z\text{-score}| \geq 5$) erhöhen oder vermindern, wurden entsprechend ihrer biologischen Zielstrukturen in **Abbildung 3.29** bzw. **Abbildung 3.30** funktionell klassifiziert. Die jeweils 15 effektstärksten Substanzen sind ebenfalls als Heatmap abgebildet (eine vollständige Auflistung der Substanzen ist in **Abbildung A.9** bzw. **Abbildung A.10** gegeben). Unter den Suppressoren sind in beiden Zelllinien die funktionellen Klassen von GPCR-Liganden, Enzym-Inhibitoren, Liganden von nuklären Rezeptoren (NR) und Substanzen, die durch Interaktion mit Ionenkanälen die zelluläre Ionenhomeostase beeinflussen (**Abbildung 3.29**). Während in A549 GPCR-Liganden stärker vertreten sind, ist in HeLa die An-

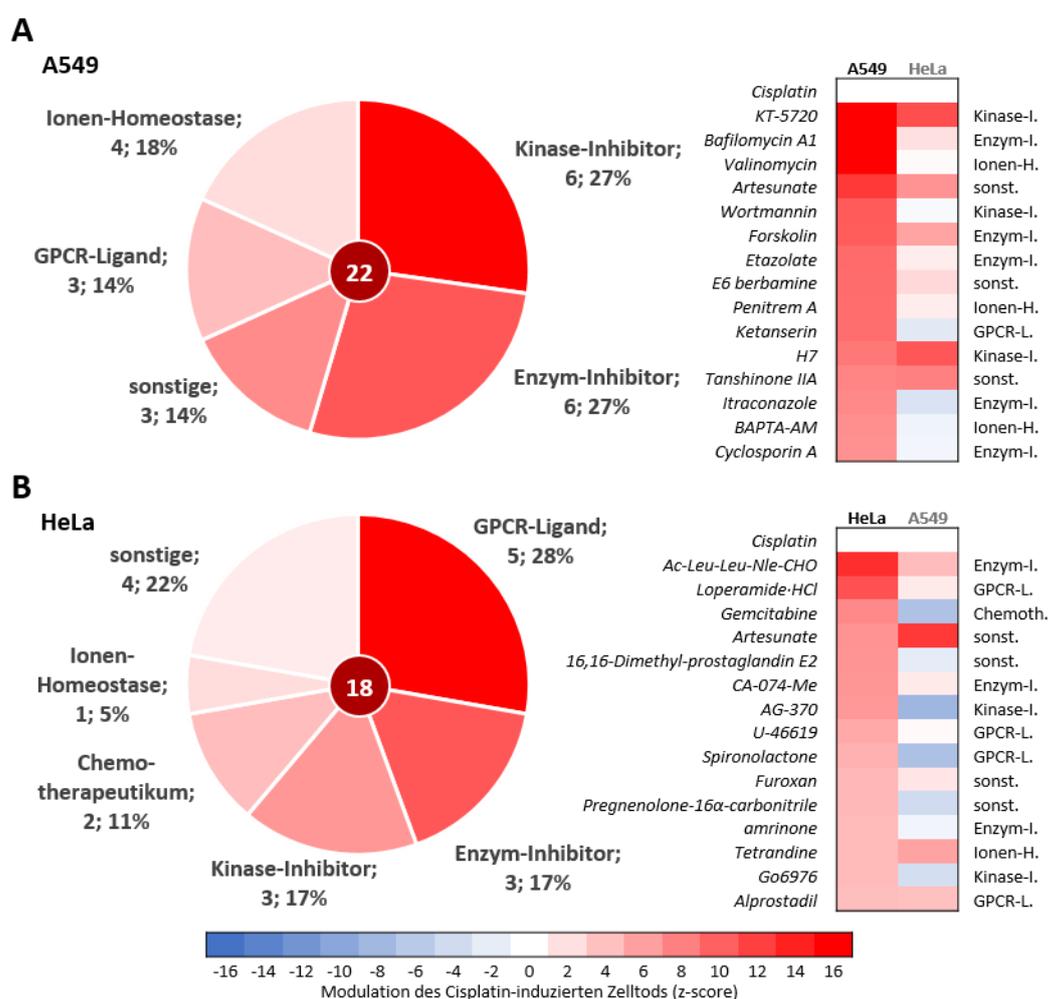


Abbildung 3.30: Sensibilisatoren des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen und ihre funktionelle Gruppierung. Datengrundlage sind bioaktive Substanzen der Bibliothek, die den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens 5 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle ($z\text{-score} \geq 5$) erhöhen, unter Ausschluss von Substanzen, die selbst eine zytotoxische Wirkung (Zelltod $> 15\%$ Gesamtzellzahl) zeigen. Die Kuchendiagramme zeigen die Zielstrukturen aller identifizierter Substanzen je Zelllinie (**A** A549, **B** HeLa), die Heatmaps die 15 stärksten Effektoren (Mittelwert der zwei unabhängigen Replikate) in Form einer Farbcodierung des z-scores (vollständige Auflistung siehe Anhang). Die Heatmaps zeigen die Werte der Substanzen auch in der jeweils anderen Zelllinie. GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor.

zahl der NR- Liganden größer. In A549 konnte des Weiteren eine Gruppe von Substanzen als Kinase-Inhibitoren identifiziert werden, wohingegen in HeLa eine Gruppe von Antibiotika, Antifungiziden und Viroziden den Zelltod hemmt. Viele der Substanzen zeigen in beiden Zelllinien eine ähnliche Wirkweise, was eine grundlegende, zelltypunabhängige Interferenz mit der Cisplatin-induzierten Apoptose nahelegt. Es sind jedoch auch zelltypspezifische Effekte zu beobachten, da die beiden stärksten Suppressoren in A549 eine entgegengesetzte Wirkung in HeLa haben. Auch die Sensibilisatoren können in beiden Zelllinien funktionell Kinase- und Enzyminhibitoren, GPCR-Liganden und Ionenkanalmodulatoren zugeordnet werden (**Abbildung 3.30**). Die Kinase-Inhibitoren sind wie bereits bei den Suppressoren auch bei den Sensibilisatoren stärker in A549 vertreten, wohingegen die GPCR-Liganden nun stärker in HeLa auftreten. Interessanterweise zeigen einige der in HeLa sensibilisierenden Substanzen eine gegenteilige Wirkung in A549, darunter auch zwei Chemotherapeutika. Da die Kombination verschiedener Chemotherapeutika häufig in der Tumorthherapie zur Steigerung des Therapieerfolgs eingesetzt wird und um die Entstehung von Resistenzen zu vermeiden, wird das Ansprechen der Zellen auf die Kombination von Cisplatin mit einem weiteren Zytostatikum unter Kapitel 3.2.4 gesondert analysiert.

Die zur Gruppierung der bioaktiven Substanzen festgelegten funktionellen Klassen sind zunächst breit gewählt um eine grobe Einteilung vorzunehmen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich sowohl bei Sensibilisatoren, wie auch bei Suppressoren teilweise die gleichen funktionellen Klassen wiederfinden. Bei genauerer Analyse ergeben sich jedoch unterschiedliche Subgruppen innerhalb dieser funktionellen Klassen. So dominieren in der Klasse der GPCRs in A549 unter den Suppressoren Substanzen, die am Dopamin-Rezeptor wirken (Butaclamol, Clozapin). Mit Blick auf die Sensibilisatoren sind in dieser Klasse jedoch Liganden des Serotonin-Rezeptors (A549: Ketanserin, Ergotamin) und des Prostaglandin-Rezeptors (HeLa: Alprostadil, Dimethylprostaglandin E2) stärker vertreten. Die wissenschaftliche Datenlage ist bisher nicht klar zu den Rollen dieser Rezeptoren hinsichtlich der Apoptose. Eine Beteiligung des Prostaglandin-Rezeptors an verschiedenen Krebsarten, sowie eine mögliche Rolle des Serotonin-Rezeptors in der Apoptose, konnten jedoch bereits in Studien nachgewiesen werden (Lappano & Maggiolini, 2011; Turner et al., 2007). Auch für den Dopamin-Rezeptor gibt es Hinweise auf eine pro-apoptotische Wirkung in Lungenkrebszellen, auf die unter Kapitel 3.2.6 eingegangen wird.

Unter den Enzym-Inhibitoren finden sich mit supprimierendem Effekt in A549 Inhibitoren der Cyclooxygenase (COX) (Ketoprofen, Celecoxib), die eine zentrale Funktion in der Prostaglandinsynthese haben. Diese Beobachtung stimmt mit Studien überein, in denen ebenfalls eine verminderte Sensitivität von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika, wie Cisplatin, bei verminderter COX-Expression oder COX-Hemmung beobachtet wurde (Eichele et al., 2007). In HeLa konnten da-

gegen in der Gruppe der Enzym-Inhibitoren einige Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDAC) (Phenylbutyrat, Vorinostat, Valproinsäure) mit supprimierender Wirkung auf den Cisplatin-induzierten Zelltod gefunden werden. Da über die Acetylierung und Deacetylierung der DNA die Kompaktheit des Chromatins und somit die Zugänglichkeit für die Transkription bestimmt wird, könnte möglicherweise eine veränderte Genexpression für den supprimierenden Effekt ursächlich sein.

Die Zelltypspezifität der beobachteten Effekte wird auch daran deutlich, dass sich unter den 15 stärksten Suppressoren und Sensibilisatoren jeweils nur eine Substanz befindet, die in beiden Zelllinien den gleichen Effekt hervorruft. Lomerizin, ein Calcium-Kanal-Inhibitor, supprimiert in beiden Zelllinien mit ähnlicher Effektstärke den Cisplatin-induzierten Zelltod. Wie bereits unter Kapitel 3.2.2 beschrieben, spielt die Veränderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen eine wichtige Rolle in der Apoptose-Exekution. Ein intrazellulärer Anstieg der Calcium-Konzentration ist dabei nicht nur für die Aktivierung Calcium-abhängiger Nukleasen und Proteasen von Bedeutung, sondern die Freisetzung von Calcium aus dem ER (Endoplasmatisches Retikulum) ist ebenfalls an der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und somit der Caspase-Aktivierung beteiligt (Dezaki et al., 2012; Pinton et al., 2008). Lomerizin könnte somit die Freisetzung von Calcium aus dem ER verzögern, wodurch die Apoptose-Exekution verlangsamt wird und sich der supprimierende Effekt ergeben würde. Artesunat, ein Antimalaria-Medikament, war in beiden Zelllinien unter den stärksten Sensibilisatoren. Eine synergistische Wirkung von Artesunat und Cisplatin wurde auch durch andere Studien bestätigt (Van Huijsduijnen et al., 2013; Wang et al., 2015). Bisher konnten eine verstärkte Bildung von ROS und DNA-Doppelstrangbrüchen durch Artesunat als zugrunde liegende Mechanismen beobachtet werden. Darüber hinaus scheint Artesunat zusätzlich die Expression von RAD51 herabzuregulieren, das für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen wichtig ist (Van Huijsduijnen et al., 2013; Wang et al., 2015). Die Kombination von Artesunat und Cisplatin könnte somit aussichtsreich in der Tumorthherapie sein.

Unter den Suppressoren in A549 sind ebenfalls Ouabain, Olomoucine und PD98059 gelistet, die bereits unter Kapitel 3.2.2 durch eine Veränderung des phänotypischen Apoptose-Profiles auffielen. Über die Klassifizierung des Zelltods, der lediglich auf Hoechst- und PI-Intensität beruht, werden sie den Suppressoren zugeordnet, da aufgrund der atypischen Morphologie geringere DNA-Kondensation auftritt. Erst durch die Erweiterung der Analyse um die unter Kapitel 3.2.2 beschriebenen zusätzlichen phänotypischen Parameter, ist es möglich, die Effekte dieser Substanzen differenzierter zu betrachten. Diese Tatsache zeigt die Bedeutsamkeit Mikroskopie-basierter Analysemethoden auf Einzelzellebene für Toxizitätstest gegenüber sogenannten Bulk-Assays. Bei

Bulk-Assays, wie beispielsweise LDH- oder MTT-Tests, wird lediglich ein Fluoreszenzsignal der gesamten Zellpopulation erfasst, die leicht zu falschpositiven oder –negativen Aussagen führen können, sowie nicht im Stande sind die Heterogenität zellulärer Reaktionen abzubilden.

Keine der supprimierenden Substanzen konnte die antiproliferative Wirkung von Cisplatin aufheben, wodurch eine Zelltod-senkende Wirkung durch reine Interaktion der Substanzen mit Cisplatin und eine dadurch stark verminderte effektive Cisplatin-Konzentration zunächst unwahrscheinlich erscheint. Da die proliferationshemmende Wirkung von Cisplatin im Gegensatz zur Apoptose-Induktion jedoch bereits bei niedrigeren Konzentrationen maximal eintritt (Kapitel 3.1.1), sollte eine mögliche Interaktion der Substanzen in weiteren Studien ausgeschlossen werden. Um dieser Frage nachzugehen und die Wirkweise der Suppressoren in A549 und HeLa näher einzugrenzen, sollte in zukünftigen Studien der Grad der DNA-Schädigung, als Parameter der Apoptose-Initiationsphase, sowie der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials, als Parameter der apoptotischen Exekutionsphase, anhand der im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Assays, weitergehend analysiert werden.

In den folgenden Kapiteln werden einzelne Substanzgruppen der Bibliothek und deren Effekte näher betrachtet, beginnend mit der Wirkung weiterer Zytostatika in Kombination mit Cisplatin, sowie pharmakologisch relevanter Wechselwirkungen von Arzneimitteln mit Cisplatin. Abschließend werden die funktionellen Substanzklassen, die in diesem Kapitel beschrieben wurden, tiefergehend auf eine Anreicherung von Substanzen mit derselben biologischen Zielstruktur in der jeweiligen Klasse analysiert. Darüber kann auf Signalwege rückgeschlossen werden, die an der Cisplatin-induzierten Apoptose beteiligt sind.

3.2.4 Identifizierung von Zytostatika-Interaktionen, die die zytotoxische Wirkung von Cisplatin beeinflussen

Zur Behandlung von Tumoren werden häufig verschiedene Zytostatika kombiniert um den Therapieerfolg zu steigern, Nebenwirkungen möglichst gering zu halten und der Entstehung von Resistenzen vorzubeugen. Da bereits unter den Sensibilisatoren im vorausgegangenen Kapitel zwei Zytostatika vertreten waren, wurden weitere in der bioaktiven Substanzbibliothek vertretenen Zytostatika auf ihre zytotoxischen Effekte in A549 und HeLa analysiert. **Abbildung 3.31A** stellt die zytotoxischen Effekte der Substanzen in Einzelbehandlung, sowie in Co-Behandlung mit Cisplatin für HeLa und A549 dar. Auffällig ist die zelltypspezifische Wirkung vieler Substanzen bereits in Einzelbehandlung. Auch in Co-Behandlung mit Cisplatin gibt es große Unterschiede zwischen den Zelllinien, dabei treten in HeLa deutlich mehr zytotoxizitätssteigernde Effekte durch Co-Behandlung auf. Durch die Tubulin-Inhibitoren Vindesin, Vinorelbin und Paclitaxel, den Topoisomerase-

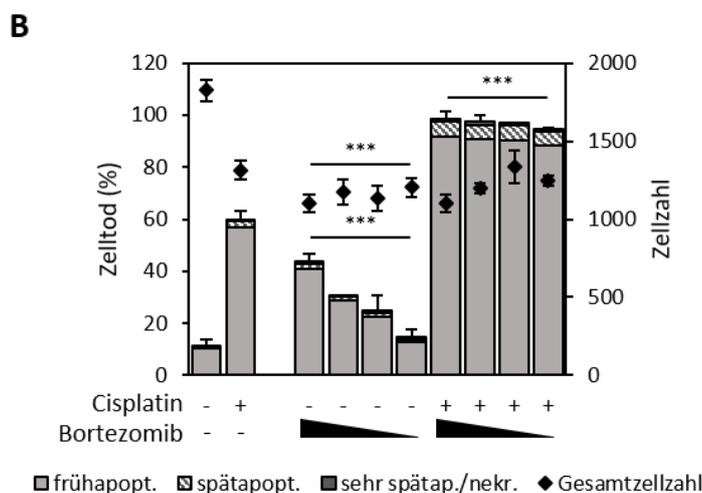
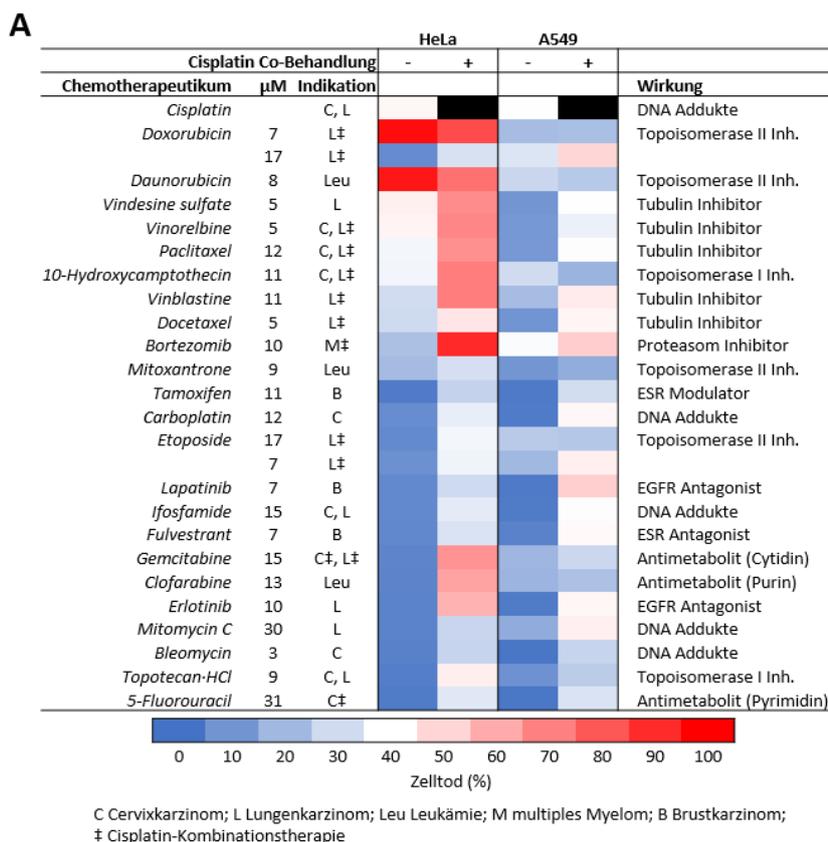


Abbildung 3.31: Interaktion von Cisplatin mit weiteren Zytostatika. **A** Zytotoxische Effekte weiterer in der bioaktiven Substanz-Bibliothek enthaltenen Zytostatika und deren Wechselwirkung mit Cisplatin. Dargestellt sind die Mittelwerte des Zelltods (% der Gesamtzellzahl) von 2 unabhängigen Replikaten der Zytostatika bei alleiniger Behandlung und in Co-Behandlung mit Cisplatin als Heatmap. Für eine äquitoxische Wirkung wurde Cisplatin in A549 mit 50 μM , in HeLa mit 45 μM eingesetzt. **B** Die synergistische Wirkung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib tritt auch in subtoxischer Konzentration auf. HeLa wurden für 30 Minuten mit Bortezomib (10, 2, 1 und 0,1 μM) oder DMSO (0,2 %, -) präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Cisplatin (50 μM) behandelt. Die Gesamtzellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Mittelwertabweichung (des Zelltods bzw. der Gesamtzellzahl) von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 (Kontrollen), 2 (0,1, 1, 2 μM) bzw. 1 (10 μM) Replikate(n). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle ohne Bortezomib wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$.

Inhibitor Hydroxycamptothecin, die Antimetaboliten Gemcitabin und Clofarabin, sowie den EGFR (*epithelial growth factor receptor*)-Antagonisten Erlotinib kommt es in kombinierter Behandlung mit Cisplatin zu einer deutlichen Steigerung der zytotoxischen Wirkung, die in A549 nicht zu beobachten ist. Von diesen Zytostatika wird bereits Gemcitabin in Kombination mit Cisplatin in der Therapie von Cervixkarzinomen eingesetzt. Die anderen Substanzen könnten daher ebenfalls potenziell für eine Kombinationstherapie geeignet sein. Insbesondere Clofarabin und Erlotinib erscheinen interessant, da sie ähnlich wie Gemcitabin in Einzelbehandlung kaum zytotoxisch sind, in Co-Behandlung mit Cisplatin jedoch die Zytotoxizität steigern. In A549 verstärken der Topoisomerase-Inhibitor Doxorubicin und Lapatinib, ein EGFR-Antagonist, die Wirkung von Cisplatin. Doxorubicin wird bereits in Kombination mit Cisplatin in der Klinik zur Behandlung von Lungenkarzinomen eingesetzt, die Ergebnisse in A549 zeigen dabei jedoch eine starke Konzentrationsabhängigkeit. In beiden Zelllinien erhöhen die Tubulin-Inhibitoren Vinblastin und Docetaxel, sowie der Proteasom-Inhibitor Bortezomib die Zytotoxizität. Eine zytotoxizitätssteigernde Wirkung durch Co-Behandlung ist somit weder in HeLa, noch in A549 generell einer bestimmten Wirkstoffgruppe der Zytostatika zuordenbar, da innerhalb einer Wirkstoffgruppe manche Substanzen den induzierten Zelltod steigerten, andere ihn dagegen sogar hemmten, wie z.B. unter den Topoisomerase II-Inhibitoren. Unterschiede in der eingesetzten Konzentration und somit eine verschiedene Wirkstärke der Substanzen könnten ursächlich sein. Des Weiteren werden manche Wirkstoffkombinationen bereits zur Behandlung von Lungen- oder Cervixkarzinomen eingesetzt, zeigten jedoch in den Versuchen dieser Arbeit keine zytotoxizitätssteigernden Effekte. Dies trifft beispielsweise auf die Kombination von Etoposid oder Gemcitabin mit Cisplatin in A549 oder 5-Fluorouracil und Cisplatin in HeLa zu. Auch diese Ergebnisse könnten der Dosisabhängigkeit der Wirkung der jeweiligen Medikamente oder ihrer Verabreichungsreihenfolge geschuldet sein (Crul et al., 2002). Auch wenn *in vivo* gegebenenfalls zusätzlich komplexere Zusammenhänge von Pharmakokinetik und -dynamik berücksichtigt werden müssen, leisten *in vitro*-Verfahren einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung synergistischer Wirkstoffkombinationen und ihrer Zelltypspezifität.

Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib zeigte die stärkste zytotoxizitätssteigernde Wirkung in Kombination mit Cisplatin, insbesondere in HeLa-Zellen. Um zu überprüfen ob dieser sensibilisierende Effekt auf einen Synergismus von Bortezomib und Cisplatin beruht und ob sich dieser Synergismus durch die Veränderung der Bortezomib-Konzentration verstärken lässt, wurde Bortezomib in einem breiteren Konzentrationsbereich mit Cisplatin in HeLa getestet (**Abbildung 3.31B**). Alle getesteten Bortezomib-Konzentrationen von 10 μ M bis 100 nM verstärken die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität. Die Zytotoxizität durch Bortezomib alleine nimmt dabei mit der eingesetzten Konzentration ab, sodass bei einer Kombination von 1 μ M Bortezomib oder geringer mit Cisplatin

die Zytotoxizitätssteigerung nicht mehr durch Addition der Einzeleffekte zu erklären ist, was einen synergistischen Effekt anzeigt. Die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen Bortezomib-Konzentrationen beruhen auf Arbeiten von Michelle Dierolf, die ihre Bachelorarbeit unter meiner Betreuung angefertigt hat.

Bortezomib ist seit 2003 zur Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen und wird auch bereits in Kombination mit Cisplatin in Multi-Wirkstoff-Chemotherapien zur Behandlung von multiplen Myelomen eingesetzt (Kappor et al., 2013; Nooka et al., 2016). Die Steigerung der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität konnte darauf zurückgeführt werden, dass Bortezomib den proteasomalen Abbau des Kupfer-Transporters CTR1 hemmt, der einen Hauptaufnahmeweg von Cisplatin in die Zelle darstellt (Al-Eisawi et al., 2011; Jandial et al., 2009). Cisplatin selbst induziert die Internalisierung und den proteasomalen Abbau des Transporters, wodurch die Aufnahme von Cisplatin begrenzt wird (Holzer & Howell, 2006; Jandial et al., 2009). Jandial et al. konnten zeigen, dass Bortezomib die Cisplatin-induzierte Herabregulation des CTR1 konzentrationsabhängig hemmt und dadurch die Cisplatin-Aufnahme um das bis zu 2,4-fache erhöht. In HeLa könnte außerdem ein weiterer Effekt für den synergistischen Effekt ursächlich sein: HeLa sind durch die Infektion mit einem humanen Papillomvirus (HPV) funktionell p53-defizient, da Onkogene des Virus zum proteasomalen Abbau zellulärer Tumorsuppressorgene, wie p53, führen. Miyamoto et al. konnten jedoch zeigen, dass durch Bortezomib-Behandlung die p53-Expression in HeLa erhöht wurde und in Kombination mit Cisplatin nicht nur *in vitro* die Apoptoserate von HeLa anstieg, sondern auch *in vivo* das Wachstum von Xenograft-Tumoren von HeLa Zellen gehemmt wurde (Miyamoto et al., 2013). An der zytotoxizitätssteigernden Wirkung von Bortezomib könnte ebenfalls eine Verschiebung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine in Richtung Apoptose beteiligt sein, die den intrinsischen Apoptose-Signalweg auslöst und in humanen Krebszelllinien nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome beobachtet wurde (Voortman et al., 2007b). Gleichzeitig könnte diese Beobachtung auch der Zytotoxizität bei alleiniger Bortezomib-Behandlung in HeLa und A549 zugrunde liegen, wie auch die generelle Akkumulation polyubiquitinerter Proteine, die die zelluläre Proteinhomeostase stört und insbesondere in malignen Zellen Apoptose auslöst (Adams, 2004; Voortman et al., 2007a).

Die Ergebnisse zeigen, dass der kombinierte Einsatz verschiedener Zytostatika die zytotoxische Wirkung in Krebszellen deutlich verbessern kann, die Effekte jedoch zelltyp- und konzentrations-spezifisch sind. Die Kombination von Bortezomib und Cisplatin wird bereits in der Tumorthherapie angewandt und zeigt die klinische Relevanz der Ergebnisse. Die Ergebnisse bestätigen andere Studien, die den Einsatz dieser Wirkstoffkombination auch zur Behandlung von Cervixkarzinomen nahelegt. Neben Cervixtumoren könnte diese Kombination insbesondere auch bei weiteren HPV-

positiven Tumoren den Erfolg der Tumorthherapie deutlich verbessern. *In vitro*-Hochdurchsatzmethoden sind ein wichtiges Tool um vor der klinischen Erprobung Informationen zu Konzentrationsverhältnissen in der Kombination verschiedener Zytostatika und dem Ansprechen verschiedener Tumor- und Nicht-Tumorzelllinien zu akquirieren. Informationen zu der klinischen Indikation der Zytostatika wurde aus der Datenbank Drugbank (Wishart et al., 2006) oder dem Portal cancer.org (www.cancer.org) der American Cancer Society bezogen.

3.2.5 Identifizierung von pharmakologisch relevanten Arzneimittel-Interaktionen mit Cisplatin

Die Interaktion verschiedener Arzneimittel ist von großer pharmakologischer Relevanz, da sie die Wirkung der einzelnen Arzneimittel und somit den Therapieerfolg gravierend beeinflussen kann. Insbesondere Krebspatienten sind einem erhöhten Risiko von Arzneimittel-Interaktionen ausgesetzt, da sie während einer Chemotherapie nicht nur verschiedene Zytostatika, sondern auch weitere Medikamente zur unterstützenden Behandlung von z.B. Nebenwirkungen erhalten. Hinzu kommt, dass ca. 60 % der Krebspatienten älter als 65 Jahre sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit für altersbedingte Erkrankungen und damit verbundene Medikamentengabe steigt. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 80 % der Krebspatienten über 65 Jahren Begleiterkrankungen haben (Blower et al., 2005). Klinische Studien zu möglichen Interferenzen von Arzneimitteln sind sehr komplex und teuer, weshalb die Etablierung von *in vitro*-Modellen zur Vorhersage möglicher Arzneimittel-Interaktionen vorteilhaft ist. Grundsätzlich kann es bei der Interaktion von Arzneimitteln zu negativer und positiver Interferenz kommen, aus der sich eine Verschlechterung oder Verbesserung einer Therapie ergibt. Insbesondere im Hinblick auf die Tumorthherapie können die Auswirkungen einer verminderten Therapieeffizienz, hervorgerufen durch eine negative Interferenz, drastische Auswirkungen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten haben. Im Gegensatz dazu ist die positive Interferenz von nicht-zytostatischen Arzneimitteln mit einem Zytostatikum ein wünschenswerter Effekt, da sie zu einer Verbesserung des Therapieerfolgs führen kann. Im Zellkulturmodell bedeutet eine negative Interferenz eine Reduktion der Cisplatin-induzierten Apoptose in Krebszellen, wodurch bei Übertragung auf den Krebspatienten die Therapieeffizienz und somit schlussendlich die Überlebenswahrscheinlichkeit verringert wird. Umgekehrt führt eine positive Interferenz in Form einer Verstärkung Cisplatin-induzierter Apoptose im Zellkulturmodell übertragen auf den Patienten zu einer Steigerung der Therapieeffizienz und erhöhter Überlebenswahrscheinlichkeit. Um im Kontext einer Cisplatin-Behandlung klinisch relevante negative und positive Interferenz von Arzneimitteln mit Cisplatin zu untersuchen, wurden die FDA-zugelassenen Medikamente der bioaktiven Substanz-Bibliothek auf ihre Wechselwirkung mit der Cisplatin-indu-

zierten Apoptose analysiert. Dabei wurden Medikamente berücksichtigt, die den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens zwei Standardabweichungen gegenüber der Cisplatin-Kontrolle (Mittelwert $|z\text{-score}| \geq 2$, jeder Einzelwert $|z\text{-score}| \geq 1,5$) verändern und keine Eigentoxizität (Zelltod $< 15\%$ der Gesamtzellzahl) aufweisen. Unter diesen Medikamenten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. David Czock des Universitätsklinikums Heidelberg solche identifiziert, die eine hohe Verschreibungshäufigkeit in der Klinik und aufgrund ihrer Indikation eine hohe Wahrscheinlichkeit der Co-Medikation mit Cisplatin aufweisen (**Abbildung 3.32**). Eine negative Interferenz mit der Wirkung von Cisplatin wurde durch die Medikamente Aspirin® (Acetylsalicylsäure), Fluoxetin, Paroxetin und Promethazin hervorgerufen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod in beiden Zelllinien supprimierten. Die stärkste negative Interferenz induzierte dabei Fluoxetin in HeLa, sowie Paroxetin in A549. Im Gegensatz dazu führte Loperamid in HeLa zu einer positiven Interferenz mit Cisplatin. Auch wenn die klinischen Plasmaspiegel (Quelle Universitätsklinikum Heidelberg) für die identifizierten Medikamente unter den *in vitro* eingesetzten Konzentrationen liegen, ist die tatsächliche Konzentration der Medikamente im Tumorgewebe *in vivo* nur schwer vorhersehbar. Da sich die Vaskularisierung von Tumorgewebe stark von Normalgewebe unterscheidet hinsichtlich der Anzahl, Größe und Form der Blutgefäße, die zudem eine erhöhte Permeabilität aufweisen (Jain, 1987; Ruoslahti, 2002; Siemann, 2011), könnte die Konzentration der Medikamente im Tumorgewebe auch über deren Plasmakonzentrationen liegen. Die erhöhte Permeabilität der Blutgefäße, sowie eine veränderte Flussgeschwindigkeit, könnten z.B. zu einer Akkumulation und damit höheren Konzentration im Tumorgewebe führen. Darüber hinaus könnte insbesondere in älteren Krebspatienten auch die altersbedingte Abnahme der Leber- und Nieren-

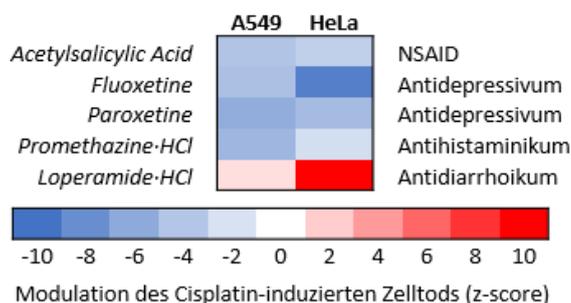


Abbildung 3.32: Klinisch relevante Interferenz von Arzneimitteln mit Cisplatin. Gezeigt ist die Modulation des Cisplatin-induzierten Zelltods bei Co-Behandlung der Arzneimittel mit Cisplatin. Die Auswahl basiert auf manueller Selektion von Medikamenten, die in der bioaktiven Substanz-Bibliothek enthalten sind und den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens 2 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle ($|z\text{-score}| \geq 2$) verändern, eine hohe Verschreibungshäufigkeit in der Klinik und eine hohe Wahrscheinlichkeit der Co-Medikation mit Cisplatin aufweisen. Dargestellt sind in der Heatmap die Mittelwerte von 2 unabhängigen Replikaten als Farbcodierung.

funktion und eine damit einhergehende Reduktion der Medikamenten-Metabolisierung und Ausscheidung, zu erhöhten Plasma- und Gewebekonzentrationen beitragen (Blower et al., 2005).

Die Wahrscheinlichkeit einer Co-Medikation von Aspirin und Cisplatin in der Klinik ist hoch: Aspirin gehört zur Gruppe der NSAID (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) und ist aufgrund seiner analgetischen, antiinflammatorischen und antikoagulierenden Wirkung eines der weltweit am häufigsten eingesetzten Medikamente (Blower et al., 2005; Cheng et al., 2014). Die supprimierende Wirkung durch Aspirin auf den Cisplatin-induzierten Zelltod lässt sich möglicherweise über eine antioxidative Eigenschaft des Aspirins selbst erklären, die einer Cisplatin-bedingten Erhöhung der Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) entgegenwirken könnte (Brozovic et al., 2010; L Galluzzi et al., 2012; Shi et al., 1999). Da ROS auch als Ursache Cisplatin-induzierter Nebenwirkungen wie Nephro- und Ototoxizität gelten, wurde die Kombination von Cisplatin und Salicylaten in Tumormodellen in Ratten getestet, die zu einer Verminderung der Nebenwirkungen führte, jedoch ohne die Anti-Tumor-Wirkung des Cisplatins zu beeinflussen (Li et al., 2002; Minami et al., 2004; Ulubaş et al., 2003). In weiteren Studien, in denen Cisplatin und Aspirin als fusioniertes Medikament getestet wurde, konnte sogar eine zytotoxizitätssteigernde Wirkung der Kombination beobachtet werden (Cheng et al., 2014; Pathak et al., 2014). Die Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) durch Aspirin, wodurch weniger pro-inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden und die daraus resultierende Reduktion Tumor-assoziiertes Entzündungsreaktionen, könnten auf Ebene des Gesamtorganismus ursächlich sein. Ebenso scheint die Aufnahme und intrazelluläre Akkumulation der Platinverbindung durch Fusion mit Aspirin deutlich verbessert zu sein, weshalb niedrigere Konzentrationen eingesetzt werden können (Cheng et al., 2014; Pathak et al., 2014). Die Kombination von Cisplatin und Aspirin scheint somit aufgrund dieser Studien durchaus klinisches Potenzial zu haben, die Konzentration der Medikamente könnte dabei jedoch ausschlaggebend sein wie die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Ergebnisse einer weiteren *in vitro*-Studie nahelegen, bei der unter Verwendung einer deutlich höheren Konzentration von Aspirin im millimolaren Bereich und einer deutlich niedrigeren Konzentration von Cisplatin im nano- bis micromolaren Bereich ein synergistischer Effekt beobachtet wurde (Yueling et al., 2010). Auch wenn die Datenlage somit bisher kontrovers erscheint, könnte jedoch insbesondere die COX-2 eine wichtige Rolle in Cisplatin-induzierter Apoptose in Krebszellen spielen. In einer Studie von Eichele et al. wurde die Induktion der COX-2 durch Cisplatin in HeLa und A549 beobachtet, die zur Cisplatin-induzierten Apoptose beitrug (Eichele et al., 2007). Da in der vorliegenden Arbeit nicht nur Acetylsalicylsäure, sondern auch weitere COX-Inhibitoren die Cisplatin-induzierte Apoptose supprimierten (Kapitel 3.2.3), scheint eine pro-apoptotische Wirkung der COX-2 wahrscheinlich. Da eine negative Interferenz von Cisplatin und Aspirin somit auch

in vivo nicht ausgeschlossen werden kann, sollte im Falle eines schlechten Ansprechens auf eine Chemotherapie mit Cisplatin überprüft werden, ob der Patient möglicherweise Aspirin oder andere COX-Hemmer verabreicht bekommt. Zudem ist Aspirin frei verkäuflich, was auch die Möglichkeit eröffnet, dass nicht-stationäre Krebspatienten Aspirin ohne das Wissen des behandelnden Arztes einnehmen könnten.

Die Antidepressiva Fluoxetin und Paroxetin werden häufig zusammen mit Krebsmedikamenten verabreicht, um depressive Zustände zu lindern. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 25 % aller Krebspatienten während der Tumorthherapie unter Depressionen leiden (EL Arabey & Abd Allah, 2015; Engelmann et al., 2014). Eine wie in dieser Arbeit beobachtete negative Interferenz mit Cisplatin wäre somit äußerst nachteilig für den Erfolg der Tumorthherapie. Die Studienlage zu möglichen Interaktionen von Cisplatin und Fluoxetin bzw. Paroxetin legt ähnlich wie bei Aspirin eine Zelltyp- und Konzentrationsspezifität nahe: In Haarsinneszellen des Ohrs wurde ein protektiver Effekt von Paroxetin auf Cisplatin-induzierte Zytotoxizität hinsichtlich Nebenwirkungen beschrieben (Vlasits et al., 2012). Die selbe Studie untersuchte den Effekt auch in A549 Zellen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Cisplatin-Behandlung \pm Paroxetin festgestellt wurde. In Abhängigkeit der Cisplatin-Konzentration konnte in dieser Studie jedoch eine leichte Abnahme der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität in Gegenwart von Paroxetin beobachtet werden, die das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt. In Darmkrebszellen konnte dagegen auch eine positive Interferenz von Cisplatin und Fluoxetin beobachtet werden (Engelmann et al., 2014). Die dazu gegensätzliche, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtete, negative Interferenz, könnte über eine antioxidative Wirkung der Substanzen aufgrund ihrer chemischen Struktur erfolgen. So könnten pro-apoptotische ROS abgefangen werden, die durch Cisplatin hervorgerufen werden. Hinweise auf eine antioxidative Wirkung selektiver Serotonin-Aufnahmehemmer, zu denen Fluoxetin und Paroxetin gehören, wurde von Khanzode et al. in Patienten mit schwerer Depression gefunden (Khanzode et al., 2003)

Promethazin, ein Antihistaminikum und Antiemetikum, das gegen Übelkeit und Erbrechen in Folge einer Chemotherapie eingesetzt werden kann (Federico et al., 1990), führte ebenfalls zu einer negativen Interferenz mit Cisplatin-induzierter Zytotoxizität. Auch Promethazin weist aufgrund der chemischen Struktur antioxidative Eigenschaften auf, sodass eine Verminderung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin über die Reduktion Cisplatin-induzierter pro-apoptotischer ROS möglich scheint. Ferner konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Promethazin an Mitochondrien wirken kann und dort das Öffnen der mitochondrialen *permeability transition pore* (PTP) verhindert (Kroemer et al., 2007; Stavrovskaya et al., 2004). Durch eine derartige Interaktion könnte

die Freisetzung der pro-apoptischen mitochondrialen Faktoren verzögert werden, wodurch die Apoptose-Exekution über den mitochondrialen Signalweg gehemmt bzw. verzögert würde.

Loperamid ist ein häufig eingesetztes Antidiarrhoikum und wirkt als Agonist an Opioid-Rezeptoren. Da Diarrhoe zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Chemotherapie zählt, ist die Wahrscheinlichkeit einer Co-Medikation mit Cisplatin hoch. Ursächlich für die sensitivierende Wirkung könnte ein zusätzlicher pro-apoptischer Stimulus über Opioid-Rezeptoren sein: Maneckjee et al. konnten in Lungenkrebszellen eine pro-apoptische Wirkung von Opioiden wie Morphin finden (Maneckjee & Minna, 1994). In einer weiteren Studie konnte unter anderem in Lungen- und Ovarialkrebszellen die pro-apoptische und zellzyklushemmende Wirkung von Loperamid gezeigt werden (Gong et al., 2012). Die Kombination von Loperamid und Cisplatin scheint somit einen synergistischen Effekt zu erzeugen. Diese positive Interferenz könnte damit möglicherweise die Tumorthherapie verbessern, bei gleichzeitiger Linderung von Nebenwirkungen.

Die Kombination mehrerer Medikamente zur Behandlung komplexer Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, ist bereits Standard. Durch die Kombination von Medikamenten, deren Wirkung an verschiedenen zellulären Zielstrukturen ansetzt, kann dabei über synergistische Effekte die Therapieeffizienz gesteigert und das Auftreten von Resistenzen minimiert werden (Zimmermann et al., 2007). Der Einsatz von Medikamenten in neuen Anwendungsgebieten, für die sie ursprünglich nicht entwickelt und zugelassen wurden, wird *drug repositioning* oder *drug repurposing* genannt und ist eine aussichtsreiche Strategie in der Medikament-Entwicklung (Strittmatter, 2014). Ein entscheidender Vorteil dieser Methode gegenüber der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist, dass bereits umfangreiche Informationen zu Bioverfügbarkeit, Sicherheit und Toxizität der Medikamente vorliegen, wodurch zeit- und kostenintensive präklinische und klinische Studien reduziert werden können. Da jedoch die Kombination verschiedener Medikamente in der Klinik für eine Therapie häufig rational getrieben ist, beispielsweise die Kombination zweier Chemotherapeutika zur Krebstherapie, ist die Anzahl der Medikament-Kombinationen, die getestet werden limitiert. Ein unvoreingenommener Ansatz zur Kombination von Medikamenten aus unterschiedlichen therapeutischen Anwendungsbereichen ist daher äußerst vorteilhaft um zunächst *in vitro* unerwartete synergistische Effekte von Medikament-Kombinationen zu entdecken. Hochdurchsatz-Screening-Verfahren kommt dabei eine wichtige Rolle zu (Zimmermann et al., 2007), was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen.

Neben der Bedeutsamkeit synergistische Wirkstoffkombinationen zu entdecken, ist die Identifizierung negativer Interferenzen von Arzneimitteln nicht minder von Bedeutung. Negative Arzneimittel-Interaktionen können nicht nur die therapeutische Effizienz vermindern, sondern zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Letzteres ist einer der Hauptgründe, warum Medikamente

vom Markt genommen werden müssen (Prueksaritanont et al., 2013). Polypharmazie, d.h. die regelmäßige Einnahme von mehreren Medikamenten, erhöht insbesondere bei älteren Patienten und Krebspatienten die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen. Schätzungen und Studien gehen bereits ab einer Einnahme von fünf Medikamenten von einer 50-prozentigen Wahrscheinlichkeit von Arzneimittel-Interaktionen aus (Blower et al., 2005). Die Brisanz dieses Themas hat die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und die europäische European Medicines Agency (EMA) vor einigen Jahren dazu veranlasst neue Leitlinien zur Untersuchung von Arzneimittel-Interaktionen für die pharmazeutische Industrie herauszugeben. Darin wird ein breites Spektrum an *in vitro* und *in vivo* Studien zur Untersuchung und Abschätzung potenzieller Interferenzen von Medikamenten empfohlen und beschrieben (EMA, 2013; FDA, 2012; Prueksaritanont et al., 2013). Der Einsatz und die Weiterentwicklung von Hochdurchsatz-Testverfahren, wie das in dieser Arbeit verwendete, können einen wichtigen Beitrag dazu leisten.

3.2.6 Funktionelle Zielstrukturen-Analyse

Innerhalb der funktionellen Klassen, in die die sensitivierenden oder supprimierenden Substanzen eingeteilt wurden (Kapitel 3.2.3), wurde manuell die Analyse der Zielstrukturen verfeinert um Substanzgruppen mit gleicher biologischer Zielstruktur anzureichern. Im ersten Schritt wurde innerhalb der relativ breiten funktionellen Gruppen, wie GPCR-Liganden oder Kinase-Inhibitoren, nach Substanzen gesucht, die dem gleichen GPCR oder Kinase-Signalweg zugeordnet werden können. Im zweiten Schritt wurden für die identifizierten Signalwege unter allen 1120 Substanzen der Bibliothek alle Substanzen herausgesucht, deren Zielstrukturen in diese Signalwege fallen, unabhängig des Effekts auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Der dritte Schritt diente der Bewertung, wie einheitlich der Effekt der jeweiligen Substanzgruppe eines Signalwegs auf den Cisplatin-induzierten Zelltod ist. Nachfolgend wurden nur solche Substanzgruppen berücksichtigt, die einen möglichst einheitlichen Effekt zeigten, d.h. die Mehrheit der Substanzen reduzierte oder verstärkte den Cisplatin-induzierten Zelltod. **Abbildung 3.33** zeigt die Ergebnisse dieser Analyse. In A549 befanden sich innerhalb der funktionellen Gruppe der GPCR-Liganden 22 Dopamin-Rezeptor-Liganden, von denen 17 eine supprimierende Wirkung auf den Cisplatin-induzierten Zelltod zeigen. Innerhalb der Kinase-Inhibitoren konnten in A549 3 Substanzen identifiziert werden, die dem Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3)-Signalweg zugeordnet werden konnten und alle eine supprimierende Wirkung auf den Zelltod zeigten. In HeLa befanden sich unter den Liganden nukleärer Rezeptoren (NR) 10 Substanzen, die den Estrogen-Rezeptor (ER) als Zielstruktur haben, von denen 9 den Cisplatin-induzierten Zelltod supprimierten (**Abbildung 3.33A**). In der jeweils anderen Zelllinie waren die Effekte hinsichtlich des Dopamin- und Estrogen-Rezeptors ähnlich, jedoch weniger stark

ausgeprägt. Die Effekte durch die Substanzen, die dem GSK-3-Signalweg zugeordnet wurden, waren in HeLa nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse legen somit eine Beteiligung des Dopamin- und Estrogen-Rezeptors, sowie des GSK-3-Signalwegs in Cisplatin-induzierter Apoptose nahe.

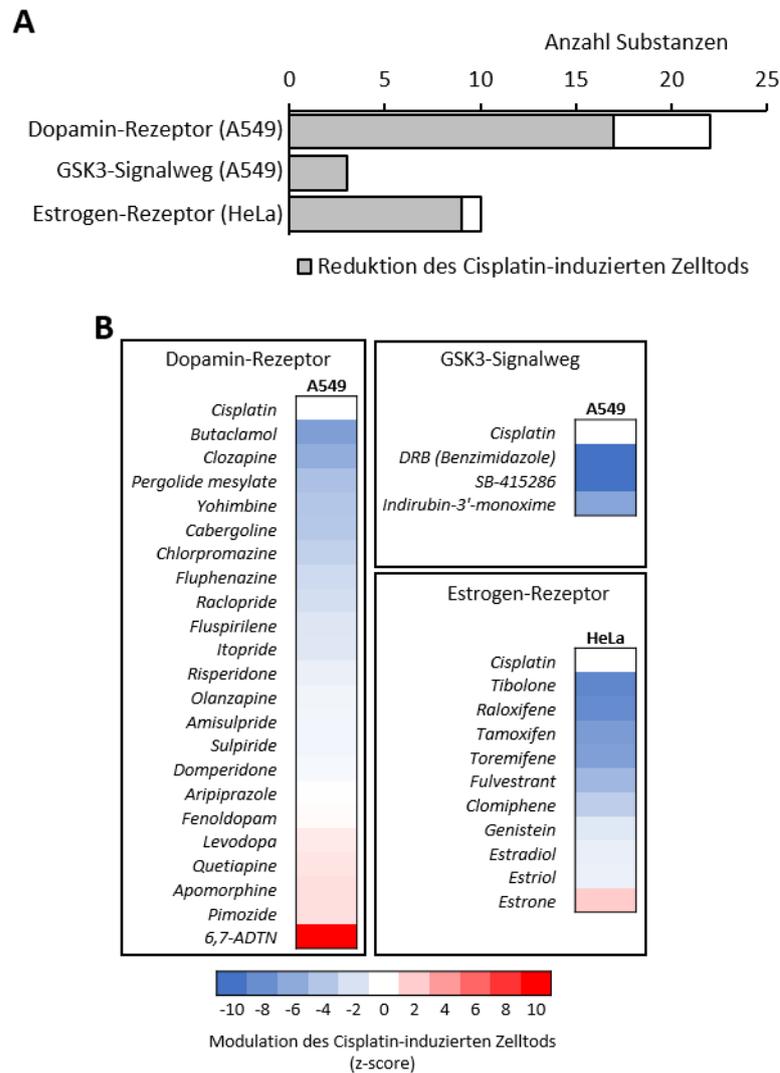


Abbildung 3.33: Manuelle Anreicherungsanalyse zur Identifizierung von Signalwegen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod regulieren. Gezeigt sind Substanzen aus der bioaktiven Substanz-Bibliothek, die sich funktionell der gleichen biologischen Zielstruktur zuordnen lassen und innerhalb dieser funktionellen Klasse überwiegend den Cisplatin-induzierten Zelltod reduzieren. **A** Übersicht der Anzahl an Substanzen pro biologischer Zielstruktur und darunter die jeweilige Anzahl der Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod reduzieren. **B** Detaildarstellung der Substanzen und ihrer Effekte auf den Cisplatin-induzierten Zelltod als Heatmap mit Farbcodierung der Mittelwerte von 2 unabhängigen Replikaten als z-score normiert.

Unter den 22 Dopamin-Rezeptor-Liganden befinden sich überwiegend Rezeptor-Antagonisten, sodass eine Hemmung des Dopamin-Rezeptors die Cisplatin-induzierte Apoptose zu reduzieren scheint. Insbesondere die am stärksten supprimierenden Substanzen sind Dopamin-Rezeptor-Antagonisten (Butaclamol, Clozapin), wohingegen Dopamin-Rezeptor-Agonisten in dieser Gruppe überwiegend den gegenteiligen Effekt haben und den Zelltod erhöhen (6,7-ADTN, Apomorphin, Levodopa) (**Abbildung 3.33B**). Der Dopamin-Rezeptor scheint somit eine pro-apoptische Rolle in Cisplatin-induzierter Apoptose zu spielen. Dieses Ergebnis passt zu neueren Studien, in denen geringe Expressionslevel des Dopamin-Rezeptors in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs gefunden wurden und die Gabe von Dopamin-Rezeptor-Agonisten die Progression von Lungentumoren inhibierte (Hoepfner et al., 2015; Sheikhpour et al., 2013). Von Peng et al. konnte die Expression des Dopamin-Rezeptors 2 in einer Reihe von Lungenkrebszellen nachgewiesen werden, darunter auch A549 (Yang-hong et al., 2011). Des Weiteren stellten Basu et al. eine Korrelation abnehmender Dopamin-Rezeptor-Expression mit zunehmender Malignität verschiedener Tumore fest (Basu & Dasgupta, 2000). Mechanistisch könnte an der pro-apoptischen Wirkung des Dopamin-Rezeptors eine Aktivierung des JNK-Signalwegs beteiligt sein (Luo et al., 1998). Auch wenn die genauen zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege noch unklar sind, könnte der Dopamin-Rezeptor eine wichtige Zielstruktur in der Behandlung von Lungenkarzinomen darstellen.

Drei der Kinase-Inhibitoren mit supprimierendem Effekt in A549 sind dem GSK-3-Signalweg zuzuordnen. Zwei der Substanzen sind direkte Inhibitoren der GSK-3 β (SB-415286, Indirubin-3'-monoxime), die dritte Substanz (Benzimidazol) ist ein Inhibitor der Casein Kinase, die zusammen mit der GSK-3 β am Wnt/ β -Catenin-Signalweg beteiligt ist (**Abbildung 3.33B**). Da in einigen Studien eine Verbindung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zur Apoptose hergestellt werden konnte und die Caspase-abhängige Spaltung von β -Catenin an der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten während der Apoptose beteiligt ist (Brancolini et al., 1997; Chen et al., 2001; Gao et al., 2013; Steinhilber et al., 2000), wurde von Brigitte Schweitzer in ihrer Dissertation eine mögliche Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs als mechanistische Grundlage des supprimierenden Effekts der drei Inhibitoren näher untersucht (Schweitzer, 2015). Der Effekt konnte dabei als Zelltyp- und Stimulus-spezifisch bestätigt werden. Er wird jedoch nicht durch β -Catenin vermittelt. Der Zelltod-senkende Effekt trat des Weiteren nur bei Hemmung der GSK-3 β mittels Inhibitor auf, nicht jedoch bei siRNA-vermittelter GSK-3 β -Depletion. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Depletion mittels siRNA über einen Zeitraum von 48 Stunden erfolgte, wodurch möglicherweise die Funktion der GSK-3 β durch alternative Signalwege übernommen wurde, die entsprechend hochreguliert wurden. Im Gegensatz dazu erfolgt die Hemmung der GSK-3 β mittels Inhibitor direkt, wodurch die Zelle weniger Zeit hat kompensatorische Signalwege zu verstärken. Die direkte Hemmung der

GSK-3 β und der dadurch entstehende Effekt auf ihre Zielproteine scheint somit ursächlich für die Apoptose-supprimierende Wirkung zu sein. Die Anzahl der Zielproteine der GSK-3 β ist mit einigen hundertern sehr groß (Thorne et al., 2014). Darunter scheinen sich jedoch auch Proteine zu befinden, die eine Verbindung der GSK-3 β zur Permeabilisierung der Mitochondrien herstellen, was im Apoptose-Kontext interessant erscheint. Bonora et al. beschreiben, dass die GSK-3 β Bestandteile des *permeability transition pore complex* (PTPC) der Mitochondrien phosphorylieren kann, wodurch die Permeabilisierung der Mitochondrien und somit die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs begünstigt wird (Bonora et al., 2014). Die Hemmung der GSK-3 β könnte somit möglicherweise die Apoptose-Exekution über den intrinsischen Signalweg inhibieren oder verlangsamen, was den Zelltod-supprimierenden Effekt erklären könnte.

Bei den Substanzen mit Wirkung an Estrogen-Rezeptoren handelt es sich um fünf Agonisten (Tibolone, Genistein, Estradiol, Estriol und Estron), vier selektive Estrogen-Rezeptor Modulatoren (SERM) (Raloxifen, Tamoxifen, Toremifen, Clomiphen), die gewebeabhängig agonistisch oder antagonistisch am ER wirken können, sowie einen ER-Antagonisten (Fulvestrant). SERM, wie beispielsweise Tamoxifen und ER-Antagonisten werden vielfach zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt, da Brustkrebs häufig Estrogen-abhängig proliferiert (Chimento et al., 2014; Jia et al., 2015). Obwohl diese Substanzen somit den Behandlungserfolg bei Brustkrebs positiv beeinflussen können, kann durch ihre Anwendung jedoch das Risiko für gynäkologische Tumore, wie Cervixkarzinome, steigen (Gill et al., 1998; Karimi Zarchi et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln diese Wirkung in Zellen des Cervix durch den Apoptose-supprimierenden Effekt in HeLa wider und zeigen die Brisanz der Nebenwirkungen durch diese Substanzen. Die Apoptose-supprimierende Wirkung der Substanzen wird daher im nachfolgenden Kapitel genauer analysiert.

3.2.7 Verifizierung der Rolle des GPER in Cisplatin-induzierter Apoptose

Von den zehn Substanzen, die dem Estrogen-Rezeptor zugeordnet werden konnten, wurden die fünf mit der stärksten supprimierenden Wirkung auf den Cisplatin-induzierten Zelltod in separaten Versuchen erneut getestet, wobei die supprimierende Wirkung bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich dabei um Tibolon, ein Estrogen-Rezeptor-Agonist, Raloxifen, Tamoxifen und Toremifen, die zu den selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) zählen, sowie Fulvestrant, ein Antagonist des Estrogen-Rezeptors. SERM können gewebespezifisch agonistisch oder antagonistisch am Estrogen-Rezeptor wirken. Daraus ergibt sich zunächst ein uneinheitliches Wirkungsmuster der Substanzen (**Abbildung 3.34A**). Seit ca. 20 Jahren ist jedoch neben den klassischen, nukleären Estrogen-Rezeptoren (ER α und ER β) auch ein weiterer Estrogen-Rezeptor bekannt: Der G-Protein-gekoppelte Estrogen-Rezeptor (GPER) (Barton, 2016). Interessanterweise ist

die Wirkweise der identifizierten Substanzen am GPER überwiegend agonistisch (**Abbildung 3.34A**). Auch unter Berücksichtigung aller zehn den Estrogen-Rezeptoren zugeordneten Substanzen ergibt sich für die Wirkung am GPER ein einheitlicheres Bild als an den klassischen ER (**Abbildung A.11**). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das dem Zellkulturmedium zugesetzte Serum Estrogene enthält und auch Phenolrot, der pH-Indikator des Zellkulturmediums, estrogenartig wirkt (Berthois et al., 1986) ergibt sich folgendes Modell zur möglichen Wirkungsweise des GPER im Kontext Cisplatin-induzierter Apoptose (**Abbildung 3.34B**): Der durch Estrogen aktivierte GPER ist an der Cisplatin vermittelten Apoptose beteiligt (**Abbildung 3.34B**, links). Da die GPER-Agonisten aus der bioaktiven Substanzbibliothek eine schwächere GPER-Bindungsaffinität als Estrogen aufweisen (Prossnitz & Arterburn, 2015), kommt es durch Bindungskompetition mit Estro-

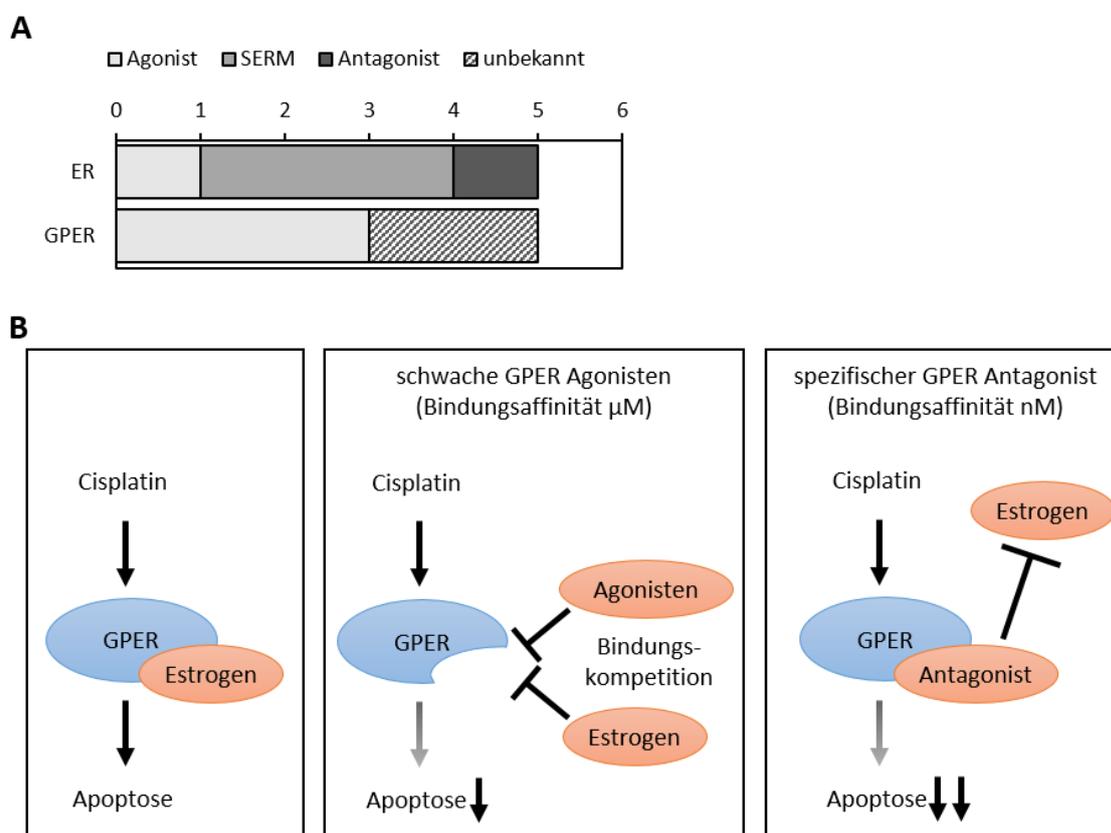


Abbildung 3.34: Modell zur Rolle des G-Protein gekoppelten Estrogen-Rezeptors (GPER) in Cisplatin-induzierter Apoptose. **A** Übersicht der 5 wirkungsstärksten Substanzen aus der bioaktiven Substanz-Bibliothek (Tibolone, Raloxifen, Tamoxifen, Toremifen, Fulvestrant, alle z-score Zelltod in Co-Behandlung > 5 , **Abbildung 3.33**), deren biologisches Ziel der Estrogen-Rezeptor ist und ihre jeweilige Wirkungsweise. Für die Mehrheit dieser 5 Substanzen ist ebenfalls eine Wirkung am GPER bekannt. **B** Links: Der aktivierte GPER vermittelt Cisplatin-induzierte Apoptose. *In vitro* stammt das Estrogen aus dem im Zellkulturmedium supplementierten FCS. Mitte: Durch schwache Agonisten (identifizierte Substanzen aus der bioaktiven Substanz-Bibliothek) kommt es zur Bindungskompetition am GPER, wodurch die Cisplatin-induzierte Apoptose abgeschwächt wird. Rechts: Der spezifische GPER-Antagonist inhibiert den GPER was zur Hemmung Cisplatin-induzierter Apoptose führt. SERM: selektiver Estrogen-Rezeptor Modulator. ER: Estrogen-Rezeptor- α/β .

gen zu einer schwächeren GPER-Aktivierung, wodurch die Cisplatin-induzierte Apoptose vermindert wird (**Abbildung 3.34B**, Mitte). Ein spezifischer GPER-Antagonist mit ähnlicher Bindungsaffinität wie Estrogen müsste die Cisplatin-induzierte Apoptose nach diesem Modell deutlich hemmen (**Abbildung 3.34B**, rechts). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der GPER-Antagonist G36 verwendet. G36 ist ein spezifischer GPER-Antagonist mit hoher Bindungsaffinität für den GPER, ohne jedoch an den klassischen ER α/β zu wirken (Dennis et al., 2011). HeLa wurden mit G36 entsprechend dem Screen der bioaktiven Substanz-Bibliothek vorinkubiert und anschließend mit

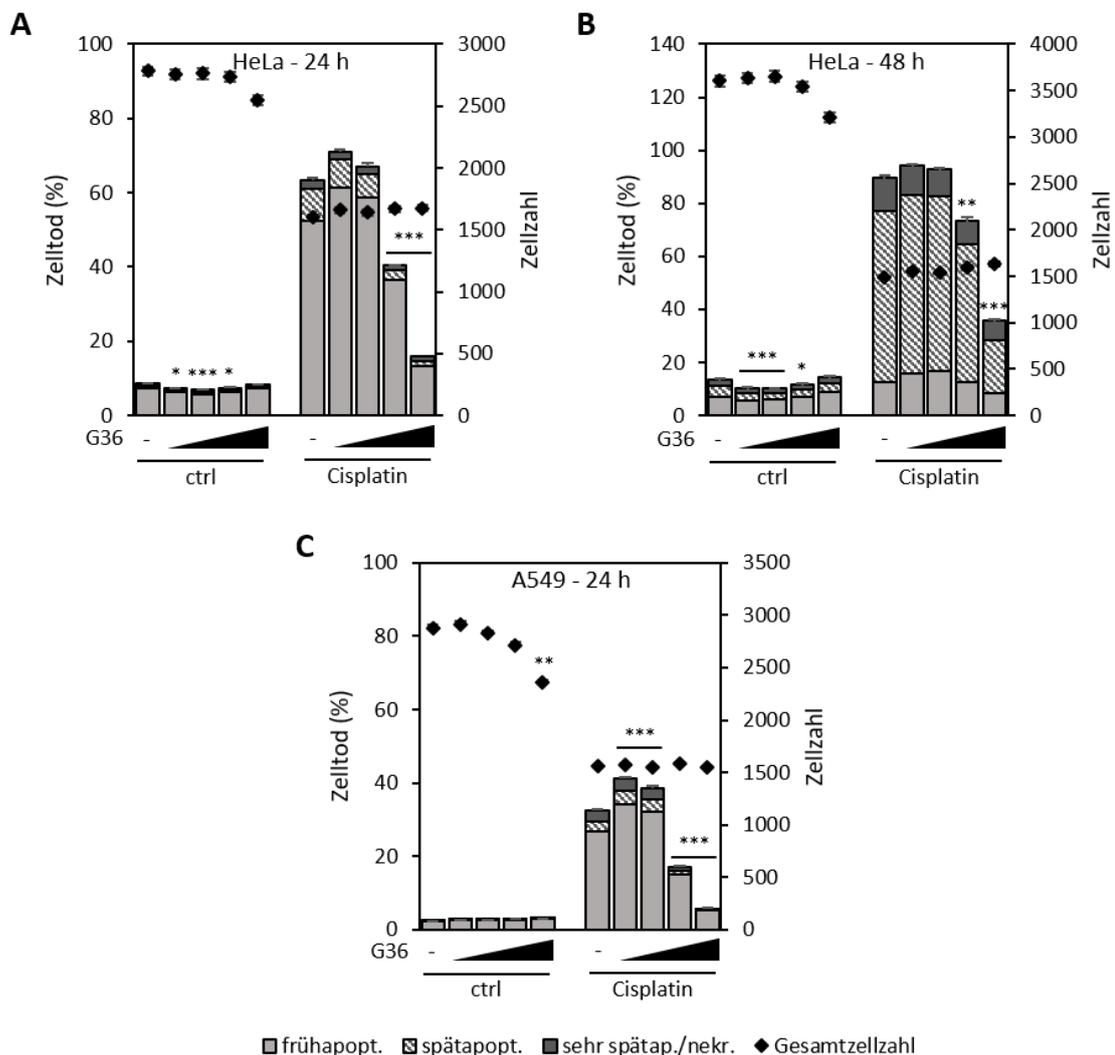


Abbildung 3.35: Hemmung des GPER reduziert den Cisplatin-induzierten Zelltod in HeLa und A549. HeLa und A549 wurden für 30 Minuten mit dem spezifischen GPER-Antagonisten G36 (0,1, 1, 10, 25 μM) präinkubiert, DMSO (0,2 %) diente als Kontrolle (-). Anschließend erfolgte die Behandlung mit Cisplatin (50 μM) für 24 (**A**, **C**) oder 48 (**B**) Stunden. Die Gesamtzellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Zelltod bzw. Gesamtzellzahl) von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle ohne Antagonisten wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Cisplatin zur Apoptose-Induktion behandelt (**Abbildung 3.35A, B**). Der GPER-Antagonist hemmt die Cisplatin-induzierte Apoptose konzentrationsabhängig in HeLa, sowohl nach 24-stündiger, wie auch 48-stündiger Co-Behandlung. Der antiproliferative Effekt des Cisplatin wird dabei nicht beeinflusst. Um die Zelltypspezifität dieses Effekts zu überprüfen, wurden auch A549 mit dem GPER-Antagonisten und Cisplatin co-behandelt, wobei sich die Ergebnisse aus HeLa bestätigten (**Abbildung 3.35C**). Lediglich in der höchsten getesteten G36-Konzentration scheint der GPER-Antagonist in A549 bei alleiniger Behandlung geringfügig antiproliferativ zu wirken. Die Cisplatin-induzierte apoptotische Morphologie wurde durch den GPER-Antagonisten nicht beeinflusst (**Abbildung 3.36**). Die aufgestellte Hypothese zur pro-apoptotischen Rolle des GPER an Cisplatin-induzierter Apoptose konnte somit durch diese Ergebnisse bestätigt werden.

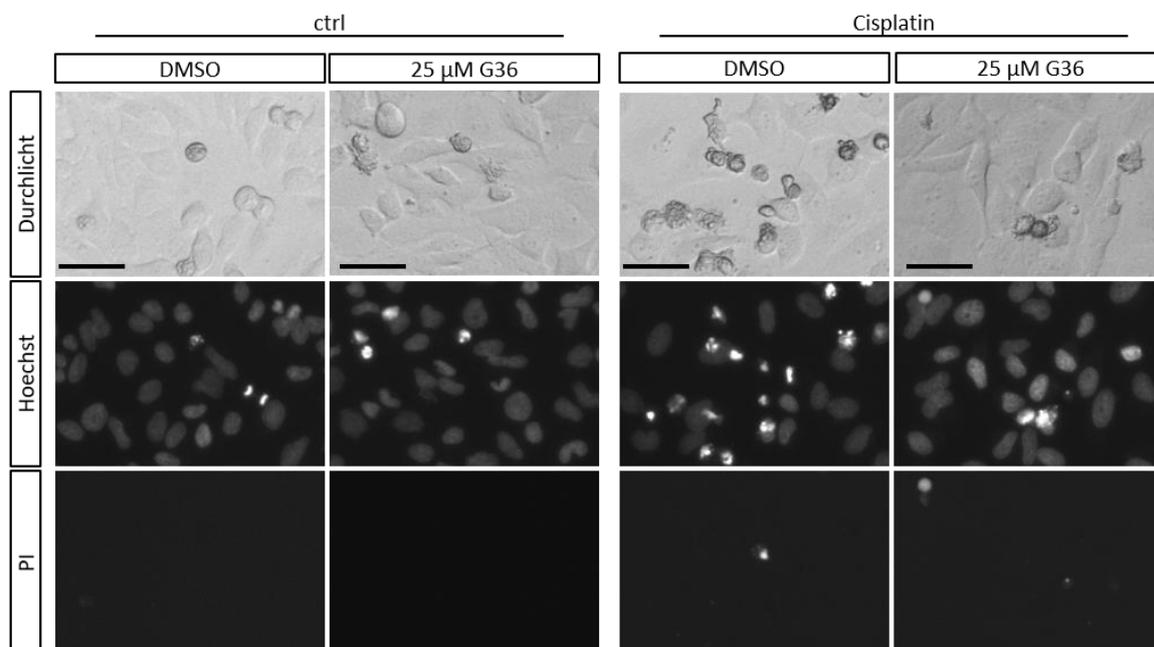


Abbildung 3.36: Hemmung des GPER reduziert Cisplatin-induzierte Apoptose. HeLa wurden für 30 Minuten mit dem spezifischen GPER-Antagonisten G36 oder DMSO (0,2 %) präinkubiert und anschließend mit Cisplatin (50 µM) für 24 Stunden behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der für die quantitative Auswertung in **Abbildung 3.35** verwendeten Versuche. Maßstab 50 µm.

Um zu überprüfen, ob die Rolle des GPER in der Apoptose Stimulus-spezifisch ist, wurden HeLa neben Cisplatin auch mit Etoposid und Staurosporin, weiteren mechanistisch unterschiedlichen Apoptose-Stimuli, und dem GPER-Inhibitor behandelt (**Abbildung 3.37**). Bei Etoposid handelt es sich um einen Topoisomerase II-Inhibitor. Die Topoisomerase II induziert transiente DNA-Doppelstrangbrüche um superspiralisierte DNA zu entspannen, sowie um die Topologie verknoteter oder

verketteter DNA-Moleküle wiederherzustellen. Durch Etoposid kommt es jedoch nicht zur Religation der Stränge, weshalb die DNA-Doppelstrangbrüche persistieren, was zur Schädigung der DNA und Apoptose-Induktion führt (Montecucco et al., 2015). Die Wirkung von Staurosporin beruht dagegen nicht auf einer direkten Schädigung der DNA, da Staurosporin ein unspezifischer Kinase-Inhibitor ist. Durch die Hemmung einer Vielzahl von Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen und die daraus resultierende Störung zellulärer Signaltransduktionskaskaden, induziert es ebenfalls Apoptose (Omura et al., 1994). Interessanterweise trat die Apoptose-reduzierende Wirkung durch Hemmung des GPER nur bei Cisplatin, nicht jedoch bei Etoposid oder Staurosporin auf. Die Versuche in A549, sowie die Versuche zur Stimulus-Spezifität wurden von Patricia Muschong als Teil eines Forschungs-Praktikums unter meiner Betreuung durchgeführt.

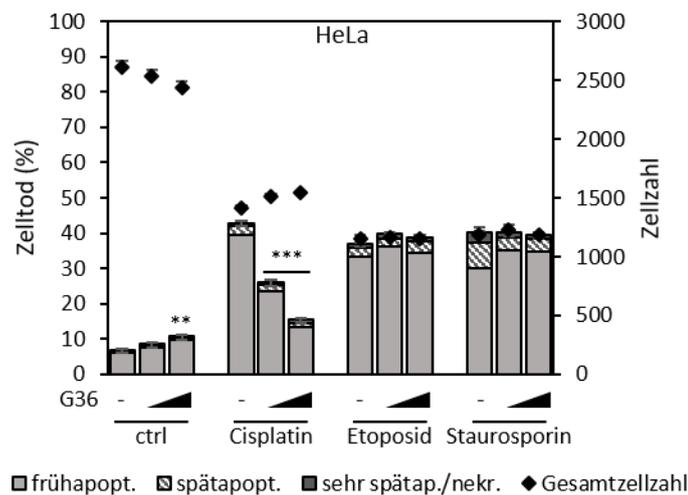


Abbildung 3.37: Die Apoptose-vermittelnde Rolle des GPER ist abhängig vom Apoptose-Stimulus. HeLa wurden für 30 Minuten mit dem spezifischen GPER-Antagonisten G36 (10, 25 μM) präinkubiert, DMSO (0,2 %) diente als Kontrolle (-). Anschließend erfolgte die Behandlung mit Cisplatin (50 μM), Etoposid (250 μM) oder Staurosporin (0,1 μM) für 24 Stunden. Die Gesamtzellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Zelltod bzw. Gesamtzellzahl) von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Replikaten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$).

Da in den Versuchen mit Etoposid oder Staurosporin keine Hemmung der Apoptose-Exekution durch den GPER-Antagonisten festzustellen war, scheint die pro-apoptotische Rolle des GPER Stimulus-spezifisch für Cisplatin zu sein. Es stellt sich die Frage, an welcher Stelle dies mechanistisch geschehen könnte. Bisher ist kein direkter Zusammenhang von Cisplatin und dem GPER etabliert,

der die Zelltod-reduzierende Wirkung durch Hemmung des GPER erklärt. Möglicherweise ist jedoch die MAP-Kinase ERK ein Schlüsselmolekül, da in Studien, in denen ebenfalls eine pro-apoptische Rolle des GPER festgestellt wurde, der Zusammenhang mit der Aktivierung der MAP-Kinase ERK hergestellt werden konnte. Die Aktivierung von ERK basiert dabei auf einer durch den GPER-induzierten Transaktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR, *epithelial growth factor receptor*) (Prossnitz et al., 2008; Prossnitz & Arterburn, 2015). Von Zhang et al. konnte kürzlich gezeigt werden, dass dies auch in Cervixkarzinomzellen, darunter HeLa, zutrifft (Zhang et al., 2015). Der Zusammenhang dieser GPER-vermittelten ERK-Aktivierung mit Cisplatin-induzierter Apoptose ergibt sich möglicherweise über die Tatsache, dass die Aktivierung von ERK durch Cisplatin bekannt ist und die ERK-Aktivierung dabei eine pro-apoptische Rolle spielen kann (Wang et al., 2000). Möglicherweise kommt es somit nach Cisplatin-Behandlung bei Estrogen-aktiviertem GPER über verschiedene Signalwege zur ERK-Aktivierung, was eine stärkere Aktivierung der ERK zur Folge haben könnte. Bei Hemmung des GPER würde dagegen ein Teil dieser ERK-Aktivierung entfallen, wodurch sich die pro-apoptische Wirkung möglicherweise abschwächen könnte. Möglicherweise kommt es durch Cisplatin auch zu einer Erhöhung der GPER-Expression, wodurch sich die pro-apoptische Wirkung der ERK verstärken könnte. Zur genaueren Analyse dieser Zusammenhänge sollte in weiteren Studien die Aktivierung der ERK und die GPER-Expressionslevel untersucht werden. Da der GPER-Inhibitor als sehr spezifisch gilt, ist ein unspezifischer Effekt unwahrscheinlich. Diese Möglichkeit sollte jedoch in weiteren Experimenten mittels siRNA gegen den GPER ausgeschlossen werden.

Die Identifizierung von Signalwegen, die an Cisplatin-induzierter Apoptose beteiligt sind, ist *in vitro* der erste Schritt für ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen. Dies ist wiederum von großer Bedeutung für die Tumorthherapie mit Cisplatin. Je mehr Informationen zu beteiligten Signalwegen zur Verfügung stehen, umso besser kann eine Therapie an den genetischen Hintergrund eines Patienten angepasst werden. Da die Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung des GPER an Cisplatin-induzierter Apoptose *in vitro* nahelegen, stellt sich die Frage, inwiefern sich dieser Sachverhalt auf Tumorpatienten übertragen lässt und der GPER-Expressionslevel möglicherweise den Behandlungserfolg einer Cisplatin-Therapie beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen wurden die Expressionslevel des GPER in Cisplatin-behandelten Cervixkarzinompatienten analysiert und mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert. Ein hoher GPER-Expressionslevel würde im Kontext der *in vitro* Versuche mit einem besseren Ansprechen auf die Cisplatin-Therapie einhergehen, was sich in einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit widerspiegeln könnte. Die Daten zur GPER-Expression und zum Überleben der Patienten wurde aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA) bezogen. Die Analyse der Daten wurde von

Victor Gourain (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) durchgeführt. Von allen Cervixkarzinom-Patienten, die eine Cisplatin-Therapie durchlaufen hatten, waren für 31 Patienten Überlebensinformationen verfügbar. Die zugehörige GPER-Expression, die auf mRNA-Sequenzierung von Tumorgewebe beruht, ist in **Abbildung 3.38A** dargestellt. Patienten, die neben Cisplatin auch eine Bestrahlungstherapie erhalten hatten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Um Unterschiede in

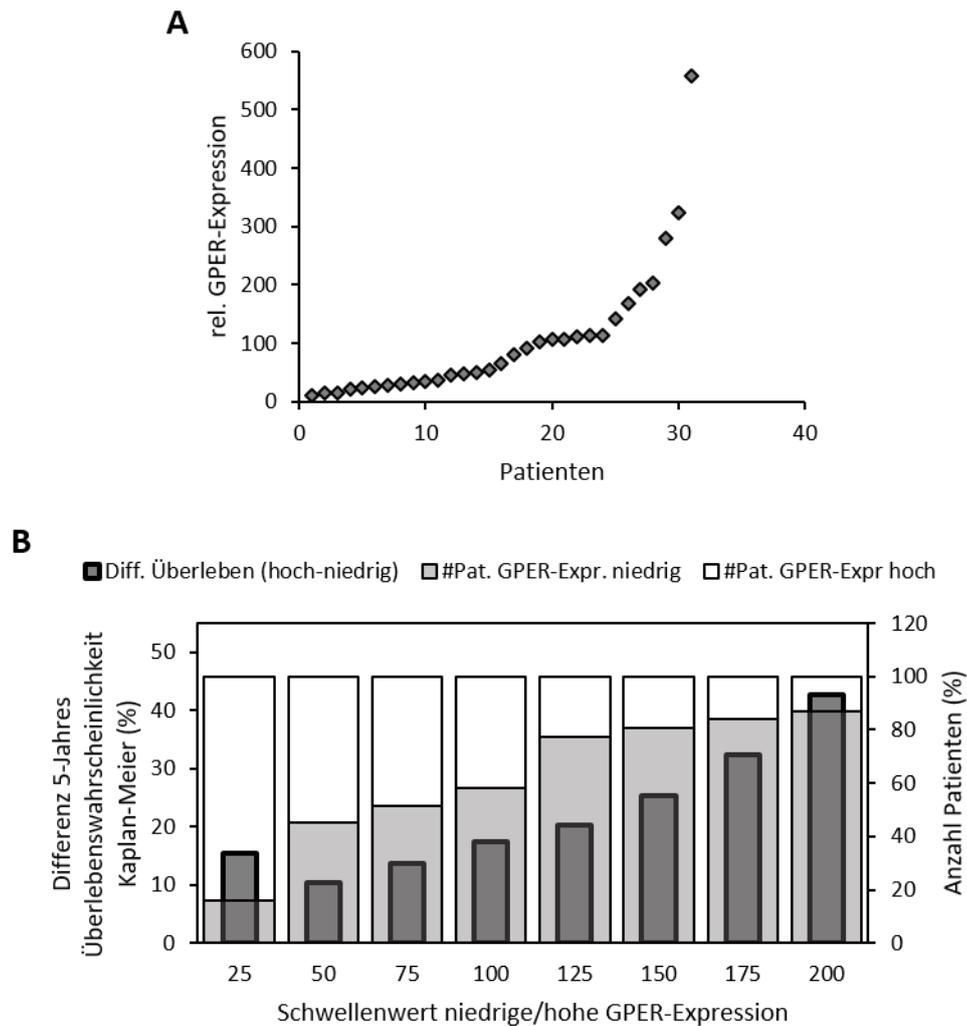


Abbildung 3.38: Hohe GPER-Expressionslevel korrelieren positiv mit einer höheren 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit bei Cervixkarzinom nach Cisplatin-Therapie. Die Analyse wurde mit Patientendaten aus der Datenbank The Cancer Genome Atlas (TCGA) durchgeführt (Auswahlkriterien: Krebsart: cervical squamous cell carcinoma (CESC); Behandlung: Cisplatin, kombinierte Bestrahlungstherapie ausgeschlossen; Überlebensinformation des Patienten verfügbar, n=31. **A** Darstellung der relativen GPER-Expressionslevel der Cervixkarzinompatienten, bestimmt aus mRNA-Sequenzierung von Tumorgewebe. **B** Anhand der GPER-Expressionslevel wurde der Patientenpool in niedrige bzw. hohe GPER-Expression unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte (25 - 200, 25er Schritte). Die Verteilung der Patienten auf die beiden Gruppen ist für jeden Schwellenwert in hellgrau bzw. weiß dargestellt. Für jeden Schwellenwert wurde die Differenz der 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit beider Gruppen (Gruppe hohe GPER-Expression - Gruppe niedrige GPER-Expression) nach Kaplan-Meier berechnet (dunkelgraue Balken).

der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen Patienten mit hoher und niedriger GPER-Expression zu analysieren, wurde der Patientenpool anhand verschiedener Schwellenwerte der GPER-Expression in hohe und niedrige GPER-Expression eingeteilt. Für beide Gruppen wurde anschließend die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) berechnet und die Differenz der 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit gebildet (**Abbildung 3.38B**). Dabei ist die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit umso höher, je höher auch der Schwellenwert der GPER-Expression ist. Dies könnte bedeuten, dass bei Patienten mit hoher GPER-Expression die Cisplatin-Therapie erfolgreicher ist, da der GPER analog zum *in vitro*-Modell an der Cisplatin-induzierten Apoptose der Krebszellen beteiligt ist bzw. sie begünstigt (**Abbildung 3.39**). Die Ergebnisse dieser Analyse unterstützen somit die vorausgegangenen *in vitro* Studien zur Rolle des GPER in Cisplatin-induzierter Apoptose und legen eine klinische Relevanz des GPER bei der chemotherapeutischen Behandlung von Cervixkarzinomen mit Cisplatin nahe.

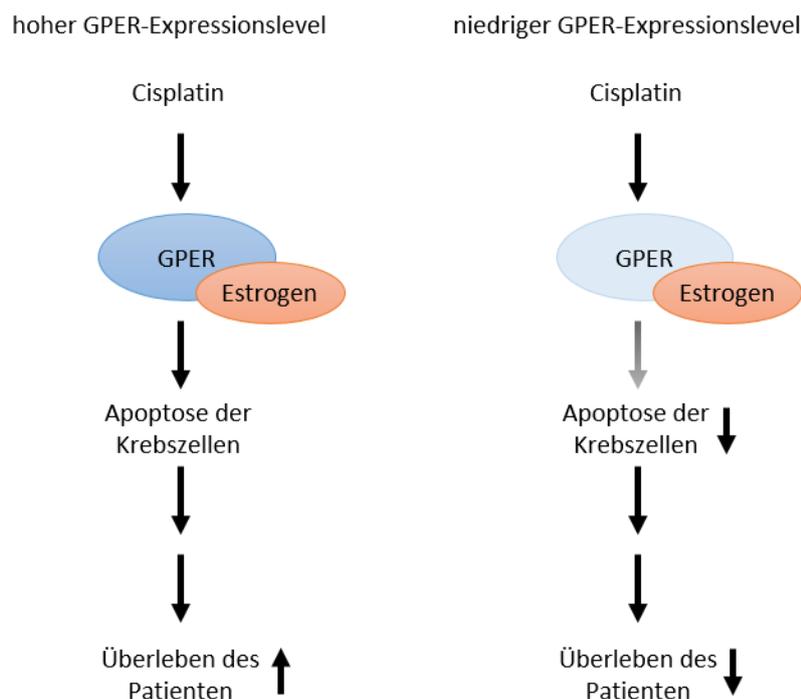


Abbildung 3.39: Mögliche Rolle des GPER in Cisplatin-induzierter Apoptose bei Cervixkarzinom. Cervixkarzinompatienten mit hohem GPER-Expressionslevel haben eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit, da die Cisplatin-Therapie aufgrund der pro-apoptotischen Wirkung des GPER effektiver ist, verglichen mit Patienten mit niedrigem GPER-Expressionslevel.

Die Studienlage zur Bedeutung des GPER in verschiedenen Tumorarten ist bisher uneinheitlich und im Kontext einer Chemotherapie mit Cisplatin wenig erforscht. In einer Studie konnte kürzlich eine begünstigende Rolle der GPER-Expression für die Rezidiv-freie 2-Jahres-Überlebensrate in Patienten mit Ovarialkarzinom beschrieben werden, die ebenfalls eine Chemotherapie mit Platinverbindungen erhalten hatten (Ignatov et al., 2013). Die Autoren der Studie stellten des Weiteren eine Abnahme der GPER-Expression mit zunehmender Tumorprogression fest, was eine Tumorsupprimierende Wirkung des GPER nahelegt und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Auch weitere Studien untersuchten einen Zusammenhang der GPER-Expression mit der Tumorprogression: Dabei konnte eine niedrige GPER-Expression in Brustkrebsgewebe, verglichen mit entsprechendem nicht-malignen Gewebe des Patienten, mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert werden (Poola et al., 2008). Dabei wurde auch der Status des häufig in Brustkrebs stark exprimierten klassischen ER α berücksichtigt, jedoch kein Unterschied zwischen ER α -positiven und -negativen Proben gefunden. Wei et al. beobachteten ebenfalls in einer *in vivo*-Studie mit Xenografts GPER-positiver Brustkrebszellen, die vor der Implantation mit einem GPER-Agonisten stimuliert wurden, eine Hemmung der Tumorphiliferation gegenüber der nicht-stimulierten Kontrolle (Wei et al., 2014). Neben diesen Studien, die auf verschiedene Weise eine Tumorsupprimierende Rolle des GPER nahelegen, existieren auch gegenteilige Studien, die eine schlechte Prognose in Abhängigkeit der GPER-Expression aufzeigen: In ER-positiven Brusttumoren, die häufig mit Tamoxifen behandelt werden, konnte eine Beteiligung des GPER an der Entwicklung einer Tamoxifen-Resistenz festgestellt werden. Dies wurde auf die Tatsache zurückgeführt, dass Tamoxifen an den klassischen ERs antagonistisch wirkt, am GPER jedoch eine agonistische Wirkung hat (Chimento et al., 2014; Luo et al., 2014). Neben Brustkrebs konnte auch in weiteren Tumorarten eine hohe GPER-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert werden, darunter Ovarial-, Lungen- und Pankreaskrebs, sowie Tumore des Endometriums (Filardo et al., 2006; Glass et al., 2011; Petrie et al., 2013; Rao Jala et al., 2012; Smith et al., 2009, 2007).

Die Rolle des GPER in der Tumorentstehung und -progression scheint somit von weiteren Faktoren abhängig zu sein. Dazu könnte der Expressionslevel der klassischen Estrogen-Rezeptoren ER α und ER β beitragen. Generell gilt der GPER als Mediator schneller, nicht-genomischer Estrogen-Effekte, wohingegen die klassischen ERs als nukleäre Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren agieren. Dabei können GPER und ERs sowohl unabhängig voneinander agieren, wie auch synergistisch oder antagonistisch (Filardo & Thomas, 2012; Prossnitz & Arterburn, 2015). Die relative Aktivität des GPER in Bezug auf die klassischen ER könnte möglicherweise für die beobachteten Unterschiede der verschiedenen Studien ursächlich sein. Individuelle Unterschiede der Estrogenlevel in Serum und Gewebe stellen einen weiteren Faktor dar, der die beobachteten Unterschiede der

Rolle des GPER begründen kann, zumal bekannt ist, dass Estrogenlevel in Geweben deutlich höher sein können als im Serum (Prossnitz & Arterburn, 2015). Auch wenn die Studienlage zur klinischen Relevanz des GPER in der Entstehung, Progression und Therapie verschiedener Tumore somit bisher komplex ist, zeigt dies jedoch deutlich, dass der GPER unter bestimmten Bedingungen eine prognostisch positive oder negative Rolle spielen kann, die bei der Tumorthherapie nicht vernachlässigt und in zukünftigen Studien adressiert werden sollte. Die klinische Relevanz dieses Rezeptors verdeutlicht insbesondere die Tatsache, dass viele Substanzen, die als Anti-Estrogene eingesetzt werden, agonistisch am GPER wirken (Prossnitz & Barton, 2009). Da die Ergebnisse dieser Arbeit eine pro-apoptotische Rolle des GPER an Cisplatin-vermittelter Apoptose nahelegen, sollte dieser Sachverhalt in weiteren Studien mit klinischen Daten und Tumorgewebe untersucht werden um die gewonnenen Erkenntnisse in der Tumorthherapie anwenden zu können.

4 ABSCHLIESENDE DISKUSSION

Apoptose stellt einen fundamentalen Prozess multizellulärer Organismen dar, da sie die kontrollierte Degradierung und Eliminierung von Zellen ermöglicht. Ohne diesen effektiven Zelltodmechanismus ist paradoxerweise kein Leben möglich, da Apoptose der Gegenspieler der Zellproliferation ist. Schätzungen gehen davon aus, dass der tägliche Zellumsatz in einem erwachsenen menschlichen Körper etwa 10 Milliarden Zellen beträgt, die durch Apoptose sterben und durch neu entstandene Zellen kompensiert werden um die Gewebhomeostase aufrecht zu erhalten (Elmore, 2007; Renehan et al., 2001). Insbesondere die Eliminierung gealterter und geschädigter Zellen, die beispielsweise irreparable DNA-Schäden aufweisen, ist von großer Bedeutung. Werden solche Zellen nicht eliminiert, können sich DNA-Schäden manifestieren. Resultierende Mutationen können wiederum die Entartung der Zelle zur Folge haben und stellen damit den ersten Schritt der Kanzerogenese dar. Aber nicht nur im adulten Organismus ist Apoptose essentiell, auch bereits während der Embryonalentwicklung trägt Apoptose zur Formung von Organen und Geweben bei, wie beispielsweise die Separation der Finger durch Apoptose der Zellen im Interdigitalraum (Suzanne & Steller, 2013). Apoptose ist somit ein Prozess, der während der gesamten Lebensdauer eines multizellulären Organismus von großer Bedeutung ist. Eine Störung oder Dysfunktion in der Regulation der Apoptose ist daher äußerst schädlich und hat pathophysiologische Konsequenzen. Krebszellen entwickeln durch Mutationen häufig Mechanismen, womit sie die normale Apoptoseregulation umgehen können und die dadurch zum unkontrollierten Wachstum der Zellen beitragen. Um diese Zellen über Apoptose eliminieren zu können, müssen zur Tumorthherapie Substanzen eingesetzt werden, die beispielsweise stark genotoxisch wirken, wie Cisplatin. Durch die massive Schädigung der DNA und die darüber ausgelöste DNA-Schadensantwort führt Cisplatin zur Apoptose. Der Einsatz von Cisplatin wird jedoch stark limitiert durch Nebenwirkungen, sowie die Entstehung von Resistenzen. Ein möglichst detailliertes Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Apoptose-Initiation und Exekution beitragen, ist daher von großer Bedeutung für die Optimierung und Weiterentwicklung der Tumorthherapie.

4.1 Die Charakterisierung der Cisplatin-induzierten Apoptose auf Einzelzellebene zeigt die Heterogenität zellulärer Reaktionen

Ein bedeutender Unterschied, der Apoptose von anderen Zelltodformen unterscheidet, ist die apoptotische Morphologie der Apoptose-Exekution. Erst dadurch ist es möglich, eine Zelle von innen heraus abzubauen, ohne dass es dabei zur Freisetzung des zellulären Inhalts in das umliegende Gewebe kommt, was durch eine Entzündungsreaktion zur Gewebeschädigung führen würde. Interessanterweise konnten in zeitkinetischen Untersuchungen dieser Arbeit Unterschiede in der Ausprägung der apoptotischen Morphologie beobachtet werden: Ein Teil der Zellen wies alle morphologischen Stadien der Apoptose-Exekution auf, vom Abrunden der Zelle über Membran Blebbing, Zellkernkondensation und Volumenreduktion der Zelle, bis hin zur Fragmentierung des Zellkerns und dem Auflösen der Zelle in Apoptotic Bodies. Andere apoptotische Zellen zeigten hingegen keine Kernfragmentierung und Bildung von Apoptotic Bodies (Kapitel 3.1.7). Dass die Apoptose-Exekution eine Heterogenität aufweist, wurde auch an weiteren analysierten Endpunkten deutlich. Zum einen an der unterschiedlichen Dynamik im Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials (Kapitel 3.1.5 und 3.1.6) und zum anderen an den Unterschieden in der zeitlichen Dauer der Exekutionsphase einer Zelllinie, die über die Zeitspanne zwischen Auftreten der Kernkondensation und dem Verlust der Plasmamembranintegrität in Kapitel 3.1.3 bestimmt wurde. Derartige Unterschiede innerhalb einer Gesamtzellpopulation können sich in zellindividuellen Faktoren begründen, wie beispielsweise dem zellulären Proteom oder Genom. Andererseits könnten auch von außen kommende Faktoren hierzu zusätzlich einen Beitrag leisten. Dies legen die Beobachtung der Interaktion apoptotischer Zellen in Kapitel 3.1.8 nahe. Die heterogene Reaktion einer Zellpopulation auf einen Apoptose-Stimulus könnte *in vivo* unter physiologischen Bedingungen den Vorteil haben, dass die geordnete Aufnahme apoptotischer Zellreste durch Phagozyten sichergestellt ist und die Apoptoserate nicht die Phagozytoserate überschreitet. Dennoch ist gerade diese Heterogenität im Kontext einer Tumorthherapie fatal, da der Erfolg der Therapie und somit das Überleben des Patienten davon abhängt, dass alle Tumorzellen eliminiert werden. Kommt es dabei durch zellindividuelle Unterschiede in der Reaktion auf den chemotherapeutischen apoptotischen Stimulus zum Überleben einzelner Tumorzellen, ist die Tumorthherapie langfristig nicht erfolgreich und es kommt zum Rezidiv. In der Tumorthherapie kommt erschwerend hinzu, dass Tumore häufig eine genetische Heterogenität innerhalb des Tumors entwickeln, die ursächlich für ein unterschiedliches Ansprechen der Krebszellen auf die Therapie sein kann. Es stellt sich jedoch die Frage, wie es auch in genetisch eng verwandten Zellpopulationen, wie z.B. in den in dieser Arbeit verwendeten Krebszelllinien HeLa und A549, die schlussendlich aus einer oder einer kleinen Anzahl von Zellen hervorgegangen sind, zur Heterogenität in der Apoptose-Exeku-

tion kommen kann. In einer Studie von Spencer et al. konnte festgestellt werden, dass die Zeitspanne zwischen einem apoptotischen Stimulus und dem Eintreten der Apoptose-Exekution in Schwesterzellen stark korreliert, die Korrelationsstärke jedoch mit zunehmender Zeit nach der Zellteilung abfällt. Auch wenn die genetische Information von Mutter- auf Tochterzelle vererbt wird, wurden in dieser Studie Unterschiede in der Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine für die schnell auftretende Divergenz in der Reaktion eng verwandter Zellen festgestellt (Spencer et al., 2009). Interessanterweise konnte in einer weiteren Studie kürzlich beobachtet werden, dass nicht nur das Erreichen eines Proteinlevels für dessen pro-apoptotische Wirkung entscheidend ist, sondern auch wann dieser Level im zeitlichen Verlauf nach dem Apoptose-Stimulus erreicht wird (Paek et al., 2016). Am Beispiel der Cisplatin-induzierten Stabilisierung von p53 konnten die Autoren der Studie zeigen, dass eine schnelle p53-Akkumulation nach Cisplatin-Behandlung bereits bei einem niedrigeren p53-Level ausreichend war um die Apoptose-Exekution einzuleiten. Wurde derselbe Level an p53 dagegen erst im späteren Verlauf der Behandlung erreicht, war er nicht mehr ausreichend für eine pro-apoptotische Wirkung und es bedurfte eines höheren p53-Levels um Apoptose auszulösen. Die Dynamik dieses pro-apoptotischen p53-Levels konnten Paek et al. auf den Anstieg der Expression anti-apoptotischer Proteine durch Cisplatin im zeitlichen Verlauf zurückführen, die damit der pro-apoptotischen Wirkung des p53 entgegenwirken und die Erhöhung des p53-Schwellenwerts erklären.

Diese Studien zeigen, wie wichtig die Analyse von Zellpopulationen auf Einzelzellebene ist um heterogene Zellreaktionen zu erfassen. Im nächsten Schritt kann daraus abgeleitet werden, welche Aspekte der Heterogenität biologisch oder klinisch relevante Informationen enthalten, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu entschlüsseln (Singh et al., 2010). Ein Großteil des existierenden Wissens über die molekularen Zusammenhänge, die einer zellulären Reaktion, wie beispielsweise der Apoptose, zugrunde liegen, basiert jedoch auf Zellpopulations-mittelnden Techniken. Auch wenn ein Populations-Mittelwert den Großteil einer Zellpopulation repräsentiert, können dabei jedoch Unterschiede in der Reaktion von Subpopulationen maskiert und dadurch Schlussfolgerungen verfälscht werden (Altschuler & Wu, 2010; Snijder & Pelkmans, 2011). Die Analyse dieser Heterogenität zellulärer Reaktionen rückt daher immer stärker in den Fokus der Forschung. Sie wird jedoch erst durch die Entwicklung von Methoden ermöglicht, die die Analyse einer Gesamtzellpopulation auf Einzelzellebene im zeitlichen Verlauf realisieren (Mattiuzzi Usaj et al., 2016). Die in der vorliegenden Arbeit etablierten und angewandten fluoreszenzmikroskopischen Methoden sind ein wichtiger Schritt um in zukünftigen Studien die zelluläre Heterogenität im Kontext der Apoptose tiefergehend zu untersuchen.

4.2 Der Screen einer bioaktiven Substanzbibliothek identifiziert Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose

Über den Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek wurde in dieser Arbeit ein unvoreingenommener Ansatz gewählt um Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose zu identifizieren. Apoptose kann in eine Initiations- und eine Exekutionsphase eingeteilt werden. Die apoptotische Exekutionsphase ist von großer Bedeutung, da sie den proteolytischen Abbau einer Zelle bewerkstelligt und mit der charakteristischen apoptotischen Morphologie einhergeht. Die Regulation der apoptotischen Morphologie der Exekutionsphase ist bisher nicht umfassend geklärt. Sie ist jedoch sehr wichtig um die Integrität der Plasmamembran bis zur Phagozytose apoptotischer Zellen aufrechtzuerhalten. Eine Modulation der apoptotischen Exekution, in Form einer veränderten Morphologie oder dem vorzeitigen Verlust der Plasmamembranintegrität, wurde durch Substanzen hervorgerufen, die mit der zellulären Kalium- und Calciumionenhomeostase interagieren (Kapitel 3.2.2). Der Verlust von Kaliumionen scheint eine wichtige Rolle im Prozess der apoptotischen Volumenreduktion zu spielen und wird für die Aktivierung von Caspasen benötigt (Bortner & Cidlowski, 2007; Cain et al., 2001). Dabei stellt sich die Frage, ob der Kalium-Efflux Auslöser oder Konsequenz der Apoptose-Exekution ist. In zellfreien Studien waren niedrige Kaliumkonzentrationen nicht ausreichend um Caspase-3-ähnliche Enzyme zu aktivieren. Physiologische Kaliumkonzentrationen konnten dagegen die DNA-Kondensation und Fragmentierung von Zellkernen hemmen, die mit dem Überstand permeabilisierter Mitochondrien inkubiert wurden (Yu, 2003). Auch eine Kalium-Depletion durch hypotonische Bedingungen alleine reichte nicht aus, um Apoptose in Zellen auszulösen. In Gegenwart eines Apoptose-Stimulus verstärkten hypotonische Bedingungen jedoch die Apoptose (Bortner et al., 1997). Diese Untersuchungen legen zwar eine Notwendigkeit des Kalium-Effluxes zur Apoptose-Exekution nahe, der aber in Einklang mit weiteren apoptotischen Signalwegen zu stehen scheint. Im Zusammenspiel mit der apoptotischen Veränderung der Kaliumkonzentration könnte auch die intrazelluläre Mobilisierung von Calciumionen eine wichtige Rolle spielen. Der intrazelluläre Anstieg von Calcium scheint nach der Kalium-Efflux-vermittelten Volumenabnahme in apoptotischen Zellen zu erfolgen und wird bei Hemmung des apoptotischen Abfalls der intrazellulären Kaliumkonzentration ebenfalls gehemmt (Ajiro et al., 2008; Dezaki et al., 2012). Da der Anstieg der Calciumkonzentration die Aktivierung Calcium-abhängiger Nukleasen und Proteasen, wie Calpainen, zur Folge hat, trägt er darüber verstärkend zum apoptotischen Abbau bei (Dezaki et al., 2012; Pinton et al., 2008). Calpaine scheinen zudem pro-apoptotische Signalwege zu verstärken, indem sie Bcl-2-Proteine spalten, wie beispielsweise Bid, und dadurch zur Permeabilisierung der Mitochondrien beitragen können (Hajnóczky et al., 2003). Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht entschlüsselt sind, scheint die gezielte Veränderung der

lonenhomeostase ein wichtiger Bestandteil der apoptotischen Maschinerie zu sein, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde.

Die Initiationsphase der Apoptose stellt eine lag-Phase dar, in der sich entscheidet, ob es zur Apoptose-Exekution kommt oder die Zelle überlebt. Entscheidend ist dabei die Summe pro- und anti-apoptotischer Signalwege, die als Antwort auf einen apoptotischen Stimulus wie Cisplatin im Rahmen einer zellulären Stressreaktion ausgelöst werden. Die Identifizierung von Signalwegen, die die apoptotische Initiationsphase beeinflussen können, ist von großer klinischer Relevanz, da ihre Modulation entscheidend zum Erfolg einer Tumorthherapie mit Cisplatin beitragen kann. Darüber hinaus können Mutationen in Krebszellen, die eine veränderte Aktivität dieser Signalwege bewirken, prädiktiv für ein gutes bzw. schlechtes Ansprechen auf eine Cisplatin-Therapie sein. Die in dieser Arbeit verwendete Substanz-Bibliothek enthält neben bioaktiven Substanzen auch FDA-zugelassene Medikamente. Somit war auch die Interaktion von Arzneimitteln, sowie weiteren Zytostatika mit der Cisplatin-induzierten Apoptose von Interesse. Kombinations-Therapien sind in der Tumorthherapie weit verbreitet um die Effizienz zu erhöhen, Nebenwirkungen zu minimieren und einer Resistenzbildung entgegenzuwirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen insbesondere die Kombination von Cisplatin mit Bortezomib, einem Proteasom-Inhibitor, nahe. Diese Kombination zeigte eine synergistische Wirkung, die in Einklang mit anderen Studien steht (Kapitel 3.2.4). Des Weiteren ließ der Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien erkennen, dass der Kombinationseffekt von Cisplatin mit einem weiteren Zytostatikum stark von der Zelllinie abhängig sein kann. Ebenso konnte neben einer gesteigerten Zytotoxizität auch eine Verminderung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin durch Co-Behandlung mit einem weiteren Zytostatikum beobachtet werden. Nicht nur die eingesetzte Konzentration des jeweiligen Zytostatikums mit Cisplatin kann ursächlich für die unterschiedlichen Kombinationseffekte sein, sondern auch die Reihenfolge der Verabreichung, wie die teilweise konträren Ergebnisse von Studien zeigen (Crul et al., 2002). In *in vitro*-Studien mit Cisplatin und weiteren Zytostatika konnte dabei auch beobachtet werden, dass die gleiche Wirkstoffkombination bereits in einer Zelllinie in Abhängigkeit ihrer Verabreichungsreihenfolge synergistische, additive oder sogar antagonistische Effekte hervorrufen kann. Auch wenn die molekularen Wirkungen der Einzelsubstanzen bekannt sind, scheinen die genauen Ursachen bisher ungeklärt, die für eine antagonistische oder synergistische Wirkung einer Kombinationstherapie von Cisplatin mit Zytostatika wie Antimetaboliten, Tubulin- und Topoisomerase-Inhibitoren, verantwortlich sind. Eine Beeinflussung der Bildung oder Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Addukte konnte jedoch als Ursache beobachtet werden (Crul et al., 2002). Da sich die Wirkung einer Kombinationstherapie somit schwer abschätzen lässt, ist es umso wich-

tiger Wirkstoffkombinationen hinsichtlich Konzentration und Verabreichungsreihenfolge im Vorfeld mittels *in vitro*-Hochdurchsatzverfahren zu testen um aussichtsreiche Kombinationen für die Tumorthherapie identifizieren zu können.

Neben der Kombination von Medikamenten, die bereits als Zytostatika in der Tumorthherapie eingesetzt werden, stellt auch der Ansatz des *drug repositionings* eine vielversprechende Strategie in der Entwicklung neuer Tumorthapien dar. Dabei werden Medikamente auf einen Einsatz in neuen therapeutischen Anwendungsgebieten überprüft, für die sie ursprünglich nicht entwickelt wurden (Strittmatter, 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten eine Verstärkung der Cisplatin-induzierten Apoptose durch Kombination mit den Medikamenten Artesunat, einem Medikament zur Malaria-Therapie, und Loperamid, einem Antidiarrhoikum, zeigen (Kapitel 3.2.3 bzw. 3.2.5). Da Loperamid bereits zur Linderung von Nebenwirkungen einer Chemotherapie begleitend zur Tumorthherapie eingesetzt wird, könnte die Kombination mit Cisplatin eine Steigerung der Therapieeffizienz bei gleichzeitiger Verminderung der Nebenwirkungen darstellen. Der große Vorteil des *drug repositionings* zur Entwicklung neuer Therapiestrategien liegt in den bereits vorhandenen Informationen zu Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Toxizität der Medikamente, weshalb die Kosten für klinische Studien deutlich reduziert werden können. Die finanziellen und zeitlichen Einsparung können dabei enorm sein angesichts der Tatsache, dass die Entwicklung eines komplett neuen Wirkstoffs bis zur Markteinführung als Medikament durchschnittlich 13 Jahre dauert und etwa 1,8 Milliarden US\$ kostet (Gupta et al., 2013). Aber nicht nur die Identifizierung positiver Arzneimittel-Interaktionen ist von großer klinischer Bedeutung, sondern auch die Aufdeckung möglicher negativer Interferenzen von Medikamenten. Insbesondere Krebspatienten sind einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Arzneimittel-Interaktionen ausgesetzt, da sie häufig neben den Zytostatika weitere Medikamente zur begleitenden Behandlung von Nebenwirkungen der Chemotherapie erhalten. Darüber hinaus kann aufgrund altersbedingter Begleiterkrankungen die Einnahme zusätzlicher Medikamente erfolgen. Dadurch kann es schwierig sein zu erkennen, ob ein schlechtes Ansprechen auf eine Tumorthherapie auf genetische Ursachen des Tumors selbst oder mögliche Arzneimittel-Interaktionen zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte eine negative Interaktion mit der Cisplatin-induzierten Apoptose durch die Medikamente Aspirin, Fluoxetin, Paroxetin und Promethazin festgestellt werden, die eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Co-Medikation mit Cisplatin in der Klinik aufweisen (Kapitel 3.2.5). *In vitro*-Screening-Verfahren sind somit ein wichtiges Tool zur Identifizierung von Wirkstoff-Kombinationen für die Effizienzsteigerung der Tumorthherapie. Ebenso können damit gleichzeitig mögliche negative Arzneimittel-Interferenzen erkannt werden, die zu einer Verschlechterung der Tumorthherapie führen können.

Versuche im Zellkultursystem stellen dabei einen wichtigen Schritt dar, um die darüber identifizierten Effekte anschließend gezielt *in vivo* auf systemischer Ebene überprüfen zu können.

Um neben der Apoptose-modulatorischen Wirkung einzelner Medikamente auch zelluläre Signalwege zu identifizieren, die die apoptotische Initiationsphase beeinflussen können, wurde eine funktionelle Gruppierung der Substanzen mit den stärksten Effekten auf die Cisplatin-induzierte Apoptose vorgenommen (Kapitel 3.2.3). Eine große funktionelle Klasse stellten dabei GPCR-Liganden dar, die sich in beiden Zelllinien sowohl unter den Suppressoren, wie auch Sensibilisatoren befanden. Da GPCRs mit über 800 Rezeptoren die bei weitem größte Familie von Zelloberflächenmolekülen sind (Gutkind & Dorsam, 2007), ist ihre starke Präsenz nicht verwunderlich. Die Tatsache, dass GPCRs die Zielstruktur von 50-60 % der sich gegenwärtig auf dem Markt befindenden Medikamente darstellen (Gutkind & Dorsam, 2007), verdeutlicht ihren starken Einfluss auf zelluläre Prozesse und die Relevanz hinsichtlich möglicher klinisch relevanter Wechselwirkungen mit Cisplatin. Eine funktionelle Anreicherungsanalyse ergab, dass unter den GPCR-Liganden mit einem supprimierenden Effekt auf die Cisplatin-induzierte Apoptose, vor allem in der Lungenkarzinomzelllinie A549 Antagonisten des Dopamin-Rezeptors stark vertreten waren (Kapitel 3.2.6). Eine sich daraus *in vitro* ableitende pro-apoptotische Rolle des Dopamin-Rezeptors in Cisplatin-induzierter Apoptose könnte auch *in vivo* bei der Therapie von Lungenkarzinomen von Bedeutung sein, da verschiedene Studien geringe Expressionslevel des Dopamin-Rezeptors in Lungentumoren fanden (Basu & Dasgupta, 2000; Hoepfner et al., 2015; Sheikhpour et al., 2013). Weiterführende Experimente dieser Arbeit konnten auch eine pro-apoptotische Rolle des G-Protein-gekoppelten Estrogen-Rezeptors in der Cisplatin-induzierten Apoptose nahelegen (Kapitel 3.2.7). Auch dieser Rezeptor könnte klinisch relevant für die Tumorthherapie mit Cisplatin sein, da die Analyse von Patientendaten hohe GPER-Expressionslevel im Rahmen einer Chemotherapie mit Cisplatin als prognostisch günstig für die Überlebenschancen identifizierte (Kapitel 3.2.7). Aufgrund der klinischen Relevanz sollten daher in zukünftigen Studien die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen tiefergehend untersucht werden, um die gewonnenen Erkenntnisse für die Tumorthherapie nutzen zu können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass an der Regulation der Apoptose verschiedenste zelluläre Mechanismen beteiligt sind, die in der apoptotischen Initiations- oder Exekutionsphase ansetzen können. Dabei konnten Mechanismen identifiziert werden, die sich in das bestehende Wissen zur apoptotischen Regulation einfügen und es darüber hinaus erweitern können. Insbesondere die identifizierte pro-apoptotische Rolle des Dopamin-Rezeptors und des GPER bedürfen weiterführender Analysen um nicht nur die molekularen Zusammenhänge ihrer Wirkung, sondern auch die klinische Relevanz im Kontext einer Cisplatin-Therapie aufzuklären.

Ferner wird die klinische Relevanz Apoptose-modulatorischer Wirkungen von Medikamenten deutlich. Deren Identifizierung kann zur Optimierung der Tumorthherapie beitragen, indem negative Interferenzen von Arzneimitteln vermieden, sowie positive Interferenzen gezielt für die Weiterentwicklung der Tumorthherapie genutzt werden können. Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist die Heterogenität zellulärer Reaktionen innerhalb einer Gesamtzellpopulation, die erst durch die Einzelzellanalyse sichtbar wird. Die Weiterentwicklung von Methoden und bioinformatischen Ansätzen für die Analyse von Zellpopulationen auf Einzelzellebene ist daher für zukünftige Studien von großer Bedeutung. Nur darüber können die molekularen Mechanismen entschlüsselt werden, die der Reaktion einer Gesamtzellpopulation auf zytotoxische Stimuli zugrunde liegen.

LITERATUR

- Adams, J., 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* 4, 349–60. doi:10.1038/nrc1361
- Ajiro, K., Bortner, C.D., Westmoreland, J., Cidlowski, J.A., 2008. An endogenous calcium-dependent, caspase-independent intranuclear degradation pathway in thymocyte nuclei: Antagonism by physiological concentrations of K⁺ ions. *Exp. Cell Res.* 314, 1237–1249. doi:10.1016/j.yexcr.2007.12.028
- Al-Eisawi, Z., Beale, P., Chan, C., Yu, J.Q., Huq, F., 2011. Modulation of cisplatin cytotoxicity due to its combination with bortezomib and the nature of its administration. *Anticancer Res.* 31, 2757–2762.
- Al-Khalili, L., Kotova, O., Tsuchida, H., Ehrén, I., Féraillé, E., Krook, A., Chibalin, A. V., 2004. ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na,K-ATPase by phosphorylation of the α -subunit in human skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 279, 25211–25218. doi:10.1074/jbc.M402152200
- Altschuler, S.J., Wu, L.F., 2010. Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? *Cell* 141, 559–563. doi:10.1016/j.cell.2010.04.033
- Apps, M.G., Choi, E.H.Y., Wheate, N.J., 2015. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr. Relat. Cancer* 22, R219–R233. doi:10.1530/ERC-15-0237
- Atkin-Smith, G.K., Poon, I.K.H., 2016. Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends Cell Biol.* 27, 151–162. doi:10.1016/j.tcb.2016.08.011
- Barton, M., 2016. Not lost in translation: Emerging clinical importance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Steroids* 111, 37–45. doi:10.1016/j.steroids.2016.02.016
- Basu, S., Dasgupta, P.S., 2000. Role of dopamine in malignant tumor growth. *Endocrine* 12, 237–41. doi:10.1385/ENDO:12:3:237
- Bento, A.P., Gaulton, A., Hersey, A., Bellis, L.J., Chambers, J., Davies, M., Krüger, F.A., Light, Y., Mak, L., McGlinchey, S., Nowotka, M., Papadatos, G., Santos, R., Overington, J.P., 2014. The ChEMBL bioactivity database: An update. *Nucleic Acids Res.* 42, 1083–1090. doi:10.1093/nar/gkt1031
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., Garewal, H., 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: Fail-safe protection against carcinogenesis, Mutation Research - Reviews in Mutation Research. doi:10.1016/S1383-5742(02)00009-1
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2496–500. doi:10.1073/pnas.83.8.2496
- Bhola, P.D., Letai, A., 2016. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Mol. Cell* 61, 695–704. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.019
- Blower, P., De Wit, R., Goodin, S., Aapro, M., 2005. Drug-drug interactions in oncology: Why are they important and can they be minimized? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 55, 117–142. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.03.007

- Bonora, M., Wieckowski, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., Pinton, P., 2014. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 0, 1–12. doi:10.1038/onc.2014.96
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2014. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130104–20130104. doi:10.1098/rstb.2013.0104
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 176–188. doi:10.1016/j.abb.2007.01.020
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2004. The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 313–318. doi:10.1007/s00424-004-1266-5
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2002. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ.* 9, 1307–1310. doi:10.1038/sj.cdd.4401126
- Bortner, C.D., Gómez-Angelats, M., Cidlowski, J.A., 2001. Plasma Membrane Depolarization without Repolarization Is an Early Molecular Event in Anti-Fas-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 4304–4314. doi:10.1074/jbc.M005171200
- Bortner, C.D., Hughes, F.M., Cidlowski, J.A., 1997. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 32436–32442. doi:10.1074/jbc.272.51.32436
- Bortner, C.D., Sifre, M.I., Cidlowski, J.A., 2008. Cationic gradient reversal and cytoskeleton-independent volume regulatory pathways define an early stage of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 7219–7229. doi:10.1074/jbc.M707809200
- Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J., Schneider, C., 1997. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β -catenin. *J. Cell Biol.* 139, 759–771. doi:10.1083/jcb.139.3.759
- Broker, L.E., Kruyt, F.A.E., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: A review. *Clin. Cancer Res.* 11, 3155–3162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2223
- Brozovic, A., Ambriović-Ristov, A., Osmak, M., 2010. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 347–359. doi:10.3109/10408441003601836
- Cain, K., Langlais, C., Sun, X.M., Brown, D.G., Cohen, G.M., 2001. Physiological Concentrations of K⁺ Inhibit Cytochrome c-dependent Formation of the Apoptosome. *J. Biol. Chem.* 276, 41985–41990. doi:10.1074/jbc.M107419200
- Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Pérez, J.M., 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 7, 3–18.
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., Łos, M.J., 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 61, 43–58. doi:10.1007/s00005-012-0205-y
- Chen, S., Guttridge, D.C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M.W., Kitajewski, J., Wang, C.Y., 2001. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. *J. Cell Biol.* 152, 87–96. doi:10.1083/jcb.152.1.87
- Cheng, Q., Shi, H., Wang, H., Min, Y., Wang, J., Liu, Y., 2014. The Ligation of Aspirin to Cisplatin Demonstrates Significantly Synergistic Effect to Tumor Cells. *ChemComm* doi:10.1039/c4cc00419a. doi:10.1039/C4CC00419A
- Chimento, A., Casaburi, I., Rosano, C., Avena, P., De Luca, A., Campana, C., Martire, E., Santolla, M.F., Maggiolini, M., Pezzi, V., Sirianni, R., 2014. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 478–489. doi:10.1002/mnfr.201300323
- Chipuk, J.E., Green, D.R., 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 268–75. doi:10.1038/nrm1573

- Ciarimboli, G., 2012. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica (Cairo)*. 2012, 473829. doi:10.6064/2012/473829
- Coleman, M.L., Sahai, E. a, Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3, 339–345. doi:10.1038/35070009
- Cooray, P., Yuan, Y., Schoenwaelder, S.M., Mitchell, C.A., Salem, H.H., Jackson, S.P., 1996. Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem. J.* 318 (Pt 1, 41–7. doi:10.1042/bj3180041
- Croft, D.R., Coleman, M.L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C.L., Olson, M.F., 2005. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J. Cell Biol.* 168, 245–255. doi:10.1083/jcb.200409049
- Crul, M., van Waardenburg, R.C.A.M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2002. DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat. Rev.* 28, 291–303. doi:10.1016/S0305-7372(02)00093-2
- Day, R.E., Kitchen, P., Owen, D.S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A.C., Bill, R.M., Conner, M.T., 2014. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 1492–1506. doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.033
- Delafuente, J.C., 2003. Understanding and preventing drug interactions in elderly patients. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 48, 133–143. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.04.004
- Dennis, M.K., Field, A.S., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Bologa, C.G., Oprea, T.I., Yamaguchi, Y., Hayashi, S.I., Sklar, L.A., Hathaway, H.J., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2011. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 358–366. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.07.002
- Dezaki, K., Maeno, E., Sato, K., Akita, T., Okada, Y., 2012. Early-phase occurrence of K⁺ and Cl⁻ efflux in addition to Ca²⁺ mobilization is a prerequisite to apoptosis in HeLa cells. *Apoptosis* 17, 821–831. doi:10.1007/s10495-012-0716-3
- Doonan, F., Cotter, T.G., 2008. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44, 200–204. doi:10.1016/j.ymeth.2007.11.006
- Eichele, K., Ramer, R., Hinz, B., 2007. Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27, 3032–3044. doi:10.1038/sj.onc.1210962
- EL Arabey, A.A., Abd Allah, A.R., 2015. Antidepressants as a New Approach for Protective Interventions of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *J. Kidney* 1, 1–2. doi:10.4172/2472-1220.1000102
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Oostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., Ravichandran, K.S., 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–6. doi:10.1038/nature08296
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- EMA, 2013. Guideline on the investigation of drug interactions, Guidance Document.
- Engelmann, B.J., Ryan, J.J., Farrell, N.P., 2014. Antidepressants and platinum drugs. *Anticancer Res.* 34, 509–516.
- FDA, 2012. Guidance for industry. Drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations, Guidance Document.
- Federico, M., Sabbatini, R., Piccinini, P., Zironi, S., Piccinini, L., Silingardi, V., 1990. Prevention of cisplatin-induced vomiting in patients with cancer. A pilot study with a multiagent protocol. *Tumori* 76, 278–281.

- Filardo, E.J., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Resnick, M.B., Giri, D., DeLellis, R.A., Steinhoff, M.M., Sabo, E., 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 12, 6359–6366. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0860
- Filardo, E.J., Thomas, P., 2012. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: Its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* 153, 2953–2962. doi:10.1210/en.2012-1061
- Fogarty, C.E., Bergmann, A., 2015. The sound of silence: Signaling by apoptotic cells, 1st ed, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.07.013
- Fuchs, Y., Steller, H., 2015. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 329–344. doi:10.1038/nrm3999
- Fulda, S., Debatin, K.-M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811. doi:10.1038/sj.onc.1209608
- Galluzzi, L., Berghe, T. Vanden, Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., Madeo, F., 2011. Programmed Necrosis : From Molecules to Health and Disease, 1st ed, International Review Of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-386039-2.00001-8
- Galluzzi, L., Blomgren, K., Kroemer, G., 2009. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 481–494. doi:10.1038/nrn2665
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.-L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nuñez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.-U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 22, 58–73. doi:10.1038/cdd.2014.137
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G., 2012. Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circ. Res.* 111, 1198–1207. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268946
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G., 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31, 1869–1883. doi:10.1038/onc.2011.384
- Gao, Y., Liu, Z., Zhang, X., He, J., Pan, Y., Hao, F., Xie, L., Li, Q., Qiu, X., Wang, E., 2013. Inhibition of cytoplasmic GSK-3 β increases cisplatin resistance through activation of Wnt/ β -catenin signaling in A549/DDP cells. *Cancer Lett.* 336, 231–239. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.005
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., Vermeulen, W., 2011. DNA Damage Response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000745–a000745. doi:10.1101/cshperspect.a000745
- Gill, B.L., Simpson, J.F., Somlo, G., McGonigle, K.F., Wilczynski, S.P., 1998. Effects of tamoxifen on the cytology of the uterine cervix in breast cancer patients. *Diagn Cytopathol* 19, 417–422. doi:10.1002/(SICI)1097-0339(199812)19:6<417::AID-DC3>3.0.CO;2-P [pii]

- Glass, J.P., Parasher, G., Arias-Pulido, H., Donohue, R., Prossnitz, E.R., Cerilli, L. a, 2011. Mesothelin and GPR30 staining among a spectrum of pancreatic epithelial neoplasms. *Int. J. Surg. Pathol.* 19, 588–96. doi:10.1177/1066896911409575
- Gong, X.W., Xu, Y.H., Chen, X.L., Wang, Y.X., 2012. Loperamide, an antidiarrhea drug, has antitumor activity by inducing cell apoptosis. *Pharmacol. Res.* 65, 372–378. doi:10.1016/j.phrs.2011.11.007
- Gonzalez, M.J., Miranda-Massari, J.R., Berdiel, M.J., Duconge, J., Rodriguez-Lopez, J.L., Hunninghake, R., Cobas-Rosario, V.J., 2014. High dose intravenous Vitamin C and chikungunya fever: A case report. *J. Orthomol. Med.* 29, 154–156. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Gupta, S.C., Sung, B., Prasad, S., Webb, L.J., Aggarwal, B.B., 2013. Cancer drug discovery by repurposing: Teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 508–517. doi:10.1016/j.tips.2013.06.005
- Gutkind, J.S., Dorsam, R.T., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79–94. doi:10.1038/nrc2069
- Häcker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301, 5–17. doi:10.1007/s004410000193
- Hajnóczky, G., Davies, E., Madesh, M., 2003. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 445–454. doi:10.1016/S0006-291X(03)00616-8
- Herrlich, P., Karin, M., Weiss, C., 2008. Supreme Enlightenment: Damage Recognition and Signaling in the Mammalian UV Response. *Mol. Cell* 29, 279–290. doi:10.1016/j.molcel.2008.01.001
- Ho, T.S., Ho, Y.P., Wong, W.Y., Chi-Ming Chiu, L., Wong, Y.S., Eng-Choon Ooi, V., 2007. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed. Pharmacother.* 61, 578–587. doi:10.1016/j.biopha.2007.08.020
- Hoepfner, L.H., Wang, Y., Sharma, A., Javeed, N., Van Keulen, V.P., Wang, E., Yang, P., Roden, A.C., Peikert, T., Molina, J.R., Mukhopadhyay, D., 2015. Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Mol. Oncol.* 9, 270–281. doi:10.1016/j.molonc.2014.08.008
- Holzer, A.K., Howell, S.B., 2006. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res.* 66, 10944–10952. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1710
- Ignatov, T., Modl, S., Thulig, M., Weißenborn, C., Treeck, O., Ortmann, O., Zenclussen, A., Costa, S., Kalinski, T., Ignatov, A., 2013. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 6, 51. doi:10.1186/1757-2215-6-51
- Ikarashi, N., Baba, K., Ushiki, T., Kon, R., Mimura, A., Toda, T., Ishii, M., Ochiai, W., Sugiyama, K., 2011. The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G887-95. doi:10.1152/ajpgi.00286.2011
- Ikarashi, N., Kon, R., Sugiyama, K., 2016. Aquaporins in the colon as a new therapeutic target in diarrhea and constipation. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17071172
- Izzo, A.A., Gaginella, T.S., Mascolo, N., Capasso, F., 1998. Recent findings on the mode of action of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 403–405.
- Jablonski, E.M., Adrian Mattocks, M., Sokolov, E., Koniaris, L.G., Hughes, F.M., Fausto, N., Pierce, R.H., McKillop, I.H., 2007. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 250, 36–46. doi:10.1016/j.canlet.2006.09.013
- Jablonski, E.M., Webb, A.N., McConnell, N.A., Riley, M.C., Hughes, F.M., 2004. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C975-85. doi:10.1152/ajpcell.00180.2003
- Jain, R.K., 1987. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6, 559–593. doi:10.1007/BF00047468

- Jandial, D.D., Farshchi-Heydari, S., Larson, C.A., Elliott, G.I., Wrasidlo, W.J., Howell, S.B., 2009. Enhanced delivery of cisplatin to intraperitoneal ovarian carcinomas mediated by the effects of bortezomib on the human copper transporter 1. *Clin. Cancer Res.* 15, 553–560. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2081
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-Å., 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 557–568. doi:10.1016/j.beem.2015.04.008
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457. doi:10.2307/2281868
- Kappor, P., Ramakrishnan, V., Rajkumar, S.V., 2013. Bortezomib Combination Therapy in Multiple Myeloma. *Semin. Hematol.* 49, 228–242. doi:10.1053/j.seminhematol.2012.04.010.Bortezomib
- Karimi Zarchi, M., Behtash, N., Sekhavat, L., Dehghan, A., 2009. Effects of tamoxifen on the cervix and uterus in women with breast cancer: experience with Iranian patients and a literature review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 10, 595–598.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–57. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x
- Khan, A., Weiss, C., Schweitzer, B., Hansjosten, I., Mikut, R., Reischl, M., 2014. Multimodal Image Segmentation of Cellular Fragmentation Using Edge Detector and Morphological Operators. *Biomed. Eng. / Biomed. Tech.* 59, 518–521. doi:10.1515/bmt-2014-5008
- Khanzode, S.D., Dakhale, G.N., Khanzode, S.S., Saoji, A., Palasodkar, R., 2003. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 8, 365–70. doi:10.1179/135100003225003393
- Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., Bryant, S.H., 2016. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44, D1202–D1213. doi:10.1093/nar/gkv951
- Köberle, B., Tomicic, M.T., Usanova, S., Kaina, B., 2010. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1806, 172–182. doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004
- Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., Sellers, J.R., 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 35557–63. doi:10.1074/jbc.M405319200
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150
- Krysko, D. V., Berghe, T. Vanden, Parthoens, E., D’Herde, K., Vandenabeele, P., 2008. Chapter 16 Methods for Distinguishing Apoptotic from Necrotic Cells and Measuring Their Clearance. *Methods Enzymol.* 442, 307–341. doi:10.1016/S0076-6879(08)01416-X
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22, 305–9.
- Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gambert, P., Solary, E., 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 3593–3598.
- Lappano, R., Maggiolini, M., 2011. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 47–60. doi:10.1038/nrd3320

- Leist, M., Jäättelä, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589–598. doi:10.1038/35085008
- Li, G., Sha, S.-H., Zotova, E., Arezzo, J., Van de Water, T., Schacht, J., 2002. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab. Invest.* 82, 585–596. doi:10.1038/labinvest.3780453
- Liddiard, K., Taylor, P.R., 2015. Shape-shifting macrophages. *Nat. Publ. Gr.* 21, 119–120. doi:10.1038/nm.3798
- Liu, L., Xing, D., Chen, W.R., 2007. Calpain mediates AIF-regulated caspase-independent pathway in cisplatin-induced apoptosis. *Proc. SPIE* 6826, 68261R–68261R–8. doi:10.1117/12.760234
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2405–2419. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.011
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Luo, H., Yang, G., Yu, T., Luo, S., Wu, C., Sun, Y., Liu, M., Tu, G., 2014. GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts. *Endocr. Relat. Cancer* 21, 355–369. doi:10.1530/ERC-13-0237
- Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R., Roth, G.S., 1998. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 3756–64. doi:10.1074/jbc.273.6.3756
- Maneckjee, R., Minna, J.D., 1994. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ.* 5, 1033–1040.
- Mattiazzi Usaj, M., Styles, E.B., Verster, A.J., Friesen, H., Boone, C., Andrews, B.J., 2016. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 26, 598–611. doi:10.1016/j.tcb.2016.03.008
- Michels, J., Kepp, O., Senovilla, L., Lissa, D., Castedo, M., Kroemer, G., Galluzzi, L., 2013. Functions of BCL-XL at the interface between cell death and metabolism. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 705294. doi:10.1155/2013/705294
- Minami, S.B., Sha, S.H., Schacht, J., 2004. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear. Res.* 198, 137–143. doi:10.1016/j.heares.2004.07.016
- Miyamoto, Y., Nakagawa, S., Wada-Hiraike, O., Seiki, T., Tanikawa, M., Hiraike, H., Sone, K., Nagasaka, K., Oda, K., Kawana, K., Nakagawa, K., Fujii, T., Yano, T., Kozuma, S., Taketani, Y., 2013. Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 29, 51–7. doi:10.3892/or.2012.2072
- Montecucco, A., Zanetta, F., Biamonti, G., 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 14, 95–108. doi:10.17179/excli2014-561
- Nobel, C.S.I., Aronson, J.K., Van Den Dobbelen, D.J., Slater, A.F.G., 2000. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis* 5, 153–163. doi:10.1023/A:1009684713784
- Nooka, A.K., Kastritis, E., Dimopoulos, M.A., Lonial, S., 2016. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 125, 3085–3100. doi:10.1182/blood-2014-11-568923.IMIDs.
- Norbury, C.J., Hickson, I.D., 2001. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 367–401. doi:10.4061/2010/201367
- Nunez, R., Sancho-Martinez, S.M., Novoa, J.M.L., Lopez-Hernandez, F.J., 2010. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death Differ.* 17, 1665–1671. doi:10.1038/Cdd.2010.96
- Okada, Y., Maeno, E., 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 130, 377–383. doi:10.1016/S1095-6433(01)00424-X

- Olive, P.L., Banàth, J.P., 2009. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 76, 79–90. doi:10.1002/cyto.b.20450
- Omura, S., Sasaki, Y., Iwai, Y., Takeshima, H., 1994. Staurosporine , a Potentially Important Gift from a Microorganism. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 48, 535–548. doi:10.7164/antibiotics.48.535
- Orlando, K.A., Stone, N.L., Pittman, R.N., 2006. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 312, 5–15. doi:10.1016/j.yexcr.2005.09.012
- Oropesa-Avila, M., Fernandez-Vega, A., de la Mata, M., Maraver, J.G., Cordero, M.D., Cotan, D., de Miguel, M., Calero, C.P., Paz, M. V, Pavon, A.D., Sanchez, M.A., Zaderenko, A.P., Ybot-Gonzalez, P., Sanchez-Alcazar, J.A., 2013. Apoptotic microtubules delimit an active caspase free area in the cellular cortex during the execution phase of apoptosis. *Cell Death Dis* 4, e527. doi:10.1038/cddis.2013.58
- Ott, I., Gust, R., 2006. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Pharm. Unserer Zeit* 35, 124–133. doi:10.1002/pauz.200500161
- Paek, A.L., Liu, J.C., Loewer, A., Forrester, W.C., Lahav, G., 2016. Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. *Cell* 165, 631–642. doi:10.1016/j.cell.2016.03.025
- Panayiotidis, M.I., Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2006. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na⁺/K⁺-ATPase please stand up? *Acta Physiol. (Oxf)*. 187, 205–15. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01562.x
- Pathak, R.K., Marrache, S., Choi, J.H., Berding, T.B., Dhar, S., 2014. The prodrug platin-A: Simultaneous release of cisplatin and aspirin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53, 1963–1967. doi:10.1002/anie.201308899
- Pchejetski, D., Taurin, S., Der Sarkissian, S., Lopina, O.D., Pshezhetsky, A. V., Tremblay, J., DeBlois, D., Hamet, P., Orlov, S.N., 2003. Inhibition of Na⁺, K⁺ -ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 735–744. doi:10.1016/S0006-291X(02)03002-4
- Petrie, W.K., Dennis, M.K., Hu, C., Dai, D., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Hathaway, H.J., Prossnitz, E.R., 2013. G Protein-Coupled Estrogen Receptor-Selective Ligands Modulate Endometrial Tumor Growth. *Obstet. Gynecol. Int.* 2013, 1–17. doi:10.1155/2013/472720
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R., 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–18. doi:10.1038/onc.2008.308
- Poola, I., Abraham, J., Liu, A., Marshalleck, J.J., Dewitty, R.L., 2008. The Cell Surface Estrogen Receptor, G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*. 1, 65–78.
- Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., Nissen, P., 2010. Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 584, 2589–2595. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.035
- Prokhorova, E.A., Zamaraev, A. V., Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., Lavrik, I.N., 2015. Role of the nucleus in apoptosis: Signaling and execution. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4593–4612. doi:10.1007/s00018-015-2031-y
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacol. Rev.* 67, 505–40. doi:10.1124/pr.114.009712
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Oprea, T.I., Sklar, L. a, Hathaway, H.J., 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 165–90. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100518
- Prossnitz, E.R., Barton, M., 2009. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 89–97. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.05.001

- Prueksaritanont, T., Chu, X., Gibson, C., Cui, D., Yee, K.L., Ballard, J., Cabalu, T., Hochman, J., 2013. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J.* 15, 629–45. doi:10.1208/s12248-013-9470-x
- Rao Jala, V., Radde, B.N., Haribabu, B., Klinge, C.M., 2012. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer. *BMC Cancer* 12, 1. doi:10.1186/1471-2407-12-624
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., Yaffe, M.B., 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11, 175–89. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.024
- Reinhardt, H.C., Schumacher, B., 2012. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 28, 128–36. doi:10.1016/j.tig.2011.12.002
- Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S., 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322, 1536–8. doi:10.1136/bmj.322.7301.1536
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Costamagna, C., Bosia, A., Ghigo, D., 2004. Diphenyleioldonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 47726–47731. doi:10.1074/jbc.M406314200
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., Alnemri, E.S., 2017. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.* 8, 14128. doi:10.1038/ncomms14128
- Ruoslahti, E., 2002. Specialization of Tumour Vasculature. *Nat. Rev. Cancer* 2, 83–90. doi:10.1038/nrc724
- Sánchez-Alcázar, J.A., Rodríguez-Hernández, Á., Cordero, M.D., Fernández-Ayala, D.J.M., Brea-Calvo, G., Garcia, K., Navas, P., 2007. The apoptotic microtubule network preserves plasma membrane integrity during the execution phase of apoptosis. *Apoptosis* 12, 1195–1208. doi:10.1007/s10495-006-0044-6
- Saraste, A., Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45, 528–537. doi:10.1016/S0008-6363(99)00384-3
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J.C., Howley, P.M., 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5523–7. doi:10.1073/pnas.88.13.5523
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schreck, I., Grico, N., Hansjosten, I., Marquardt, C., Bormann, S., Seidel, A., Kvietkova, D.L., Pieniazek, D., Segerbäck, D., Diabaté, S., van der Horst, G.T.J., Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F., Weiss, C., 2016. The nucleotide excision repair protein XPC is essential for bulky DNA adducts to promote interleukin-6 expression via the activation of p38-SAPK. *Oncogene* 35, 908–918. doi:10.1038/onc.2015.145
- Schweitzer, B., 2015. Identifizierung von chemischen Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose in Lungenkrebszellen. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Sheikhpour, M., Ahangari, G., Sadeghizadeh, M., Deezagi, A., 2013. A novel report of apoptosis in human lung carcinoma cells using selective agonist of D2-like dopamine receptors: A new approach for the treatment of human non-small cell lung cancer. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26, 393–402. doi:10.1177/039463201302600212
- Shi, X., Ding, M., Dong, Z., Chen, F., Ye, J., Wang, S., Leonard, S.S., Castranova, V., Vallyathan, V., 1999. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol. Cell. Biochem.* 199, 93–102. doi:10.1023/A:1006934612368
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–79. doi:10.1038/sj.onc.1206933

- Siemann, D.W., 2011. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat. Rev.* 37, 63–74. doi:10.1016/j.ctrv.2010.05.001
- Singh, D.K., Ku, C.-J.C., Wichaidit, C., Steininger, R.J., Wu, L.F., Altschuler, S.J., 2010. Patterns of basal signaling heterogeneity can distinguish cellular populations with different drug sensitivities. *Mol. Syst. Biol.* 6, 369. doi:10.1038/msb.2010.22
- Skommer, J., Brittain, T., Raychaudhuri, S., 2010. Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. *Apoptosis* 15, 1223–1233. doi:10.1007/s10495-010-0515-7
- Smith, H.O., Arias-Pulido, H., Kuo, D.Y., Howard, T., Qualls, C.R., Lee, S.J., Verschraegen, C.F., Hathaway, H.J., Joste, N.E., Prossnitz, E.R., 2009. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 114, 465–471. doi:10.1016/j.ygyno.2009.05.015
- Smith, H.O., Leslie, K.K., Singh, M., Qualls, C.R., Revankar, C.M., Joste, N.E., Prossnitz, E.R., 2007. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196. doi:10.1016/j.ajog.2007.01.004
- Snijder, B., Pelkmans, L., 2011. Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 119–125. doi:10.1038/nrm3044
- Spencer, S.L., Gaudet, S., Albeck, J.G., Burke, J.M., Sorger, P.K., 2009. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459, 428–32. doi:10.1038/nature08012
- Stavrovskaya, I.G., Narayanan, M. V, Zhang, W., Krasnikov, B.F., Heemskerk, J., Young, S.S., Blass, J.P., Brown, A.M., Beal, M.F., Friedlander, R.M., Kristal, B.S., 2004. Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. *J. Exp. Med.* 200, 211–22. doi:10.1084/jem.20032053
- Steinhusen, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dörken, B., Bommert, K., 2000. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 275, 16345–16353. doi:10.1074/jbc.M001458200
- Strittmatter, S.M., 2014. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Nat. Med.* 20, 590–1. doi:10.1038/nm.3595
- Suzanne, M., Steller, H., 2013. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.* 20, 669–75. doi:10.1038/cdd.2013.11
- Tait, S.W., Green, D.R., 2008. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621–632. doi:10.1038/nrm2952
- Tait, S.W.G., Ichim, G., Green, D.R., 2014. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* 127, 2135–44. doi:10.1242/jcs.093575
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241. doi:10.1038/nrm2312
- Taylor, W.R., Stark, G.R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803–1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- Thorne, C.A., Wichaidit, C., Coster, A.D., Posner, B.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., 2014. GSK-3 modulates cellular responses to a broad spectrum of kinase inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* 11, 58–63. doi:10.1038/nchembio.1690
- Trempelec, N., Dave-Coll, N., Nebreda, A.R., 2013. SnapShot: p38 MAPK signaling. *Cell* 152, 656–656.e1. doi:10.1016/j.cell.2013.01.029
- Turner, J.H., Garnovskaya, M.N., Raymond, J.R., 2007. Serotonin 5-HT1A receptor stimulates c-Jun N-terminal kinase and induces apoptosis in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 391–9. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.12.003

- Ulubaş, D.B., Çimen, M.Y.B., Apa, D.D., Saritaş, E., Muşlu, N., Çimen, Ö.B., 2003. The Protective Effects of Acetylsalicylic Acid on Free Radical Production in Cisplatin Induced Nephrotoxicity: An Experimental Rat Model 545. doi:10.1081/DCT-120024841
- Ura, S., Nishina, H., Gotoh, Y., Katada, T., 2007. Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by MST1 is essential and sufficient for the induction of chromatin condensation during apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 27, 5514–5522. doi:10.1128/MCB.00199-07
- Van Huijsduijnen, R.H., Guy, R.K., Chibale, K., Haynes, R.K., Peitz, I., Kelter, G., Phillips, M.A., Vennerstrom, J.L., Yuthavong, Y., Wells, T.N.C., 2013. Anticancer properties of distinct antimalarial drug classes. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0082962
- Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., Vandenamee, P., 2013. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61, 117–129. doi:10.1016/j.ymeth.2013.02.011
- Vlasits, A.L., Simon, J.A., Raible, D.W., Rubel, E.W., Owens, K.N., 2012. Screen of FDA-approved drug library reveals compounds that protect hair cells from aminoglycosides and cisplatin. *Hear. Res.* 294, 153–165. doi:10.1016/j.heares.2012.08.002
- Voortman, J., Checińska, A., Giaccone, G., 2007a. The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer* 6, 73. doi:10.1186/1476-4598-6-73
- Voortman, J., Checińska, A., Giaccone, G., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A.E., 2007b. Bortezomib, but not cisplatin, induces mitochondria-dependent apoptosis accompanied by up-regulation of noxa in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1046–1053. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0577
- Vorobjev, I.A., Barteneva, N.S., 2016. Multi-parametric imaging of cell heterogeneity in apoptosis analysis. *Methods* 112, 105–123. doi:10.1016/j.ymeth.2016.07.003
- Wang, B., Hou, D., Liu, Q., Wu, T., Guo, H., Zhang, X., Zou, Y., Liu, Z., Liu, J., Wei, J., Gong, Y., Shao, C., 2015. Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51. *Cancer Biol. Ther.* 16, 1548–1556. doi:10.1080/15384047.2015.1071738
- Wang, D., Lippard, S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307–20. doi:10.1038/nrd1691
- Wang, X., Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 39435–39443. doi:10.1074/jbc.M004583200
- Wei, W., Chen, Z.-J., Zhang, K.-S., Yang, X.-L., Wu, Y.-M., Chen, X.-H., Huang, H.-B., Liu, H.-L., Cai, S.-H., Du, J., Wang, H.-S., 2014. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 5, e1428. doi:10.1038/cddis.2014.398
- Wen, L.P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.L., Orth, K., Rosen, G.D., 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 26056–26061. doi:10.1074/jbc.272.41.26056
- Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., Oun, R., 2010. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalt. Trans.* 39, 8113. doi:10.1039/c0dt00292e
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., Woolsey, J., 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 34, D668–D672. doi:10.1093/nar/gkj067
- Yang-hong, P., Jing-ming, Z., Nai-kang, Z., Shan, W., Surgery, T., Medicine, N., Experiment, M., Hospital, G., 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, 975–978.
- Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59. doi:10.1038/nrm2308

- Yu, S.P., 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 70, 363–386. doi:10.1016/S0301-0082(03)00090-X
- Yueling, W., Hongmin, Z., Lin, L., Jiangfen, W., 2010. Effect of aspirin alone or combined with cisplatin on human cervical carcinoma HeLa cells. *J. Med. Coll. PLA* 25, 11–18. doi:10.1016/S1000-1948(10)60011-1
- Zeniou, M., Fève, M., Mameri, S., Dong, J., Salomé, C., Chen, W., El-Habr, E.A., Bousson, F., Sy, M., Obszynski, J., Boh, A., Villa, P., Assad Kahn, S., Didier, B., Bagnard, D., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., Haiech, J., Hibert, M., Kilhoffer, M.-C., 2015. Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells. *PLoS One* 10, e0134793. doi:10.1371/journal.pone.0134793
- Zhang, Q., Wu, Y.-Z., Zhang, Y.-M., Ji, X.-H., Hao, Q., 2015. Activation of G-protein coupled estrogen receptor inhibits the proliferation of cervical cancer cells via sustained activation of ERK1/2. *Cell Biochem. Funct.* 33, n/a-n/a. doi:10.1002/cbf.3097
- Zhong, Z., Kotova, O., Davidescu, A., Ehrén, I., Ekberg, K., Jörnvall, H., Wahren, J., Chibalin, A. V., 2004. C-peptide stimulates Na⁺, K⁺-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2782–2790. doi:10.1007/s00018-004-4258-x
- Zhu, Y., Zhao, L., Liu, L., Gao, P., Tian, W., Wang, X., Jin, H., Xu, H., Chen, Q., 2010. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell* 1, 468–477. doi:10.1007/s13238-010-0048-4
- Zimmermann, G.R., Lehár, J., Keith, C.T., 2007. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov. Today* 12, 34–42. doi:10.1016/j.drudis.2006.11.008

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AMN	<i>apoptotic microtubule network</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
AVD	<i>apoptotic volume decrease</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
c-Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CDK	<i>cycline-dependent kinases</i>
DFNA5	<i>deafness associated tumor suppressor</i>
DSB	<i>double strand break</i>
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
EndoG	Endonuklease G
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ER α	Estrogen-Rezeptor- α
ER β	Estrogen-Rezeptor- β
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FDA	Food and Drug Administration
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPOR	G-Protein-gekoppelter Estrogen-Rezeptor
ICCB	Harvard Institute of Chemistry and Cell Biology
JNK	c-Jun N-terminale Kinase

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MK2	MAP-Kinase aktivierte Proteinkinase 2
MMP	Mitochondrielles Membranpotenzial
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilisation</i>
MST1	<i>Mammalian sterile 20-like kinase 1</i>
NER	Nukleotidexzissionsreparatur
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
ROCK 1	<i>Rho-associated protein kinase 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SERM	selektiver Estrogen-Rezeptor Modulator
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethylester
TNF	Tumornekrosefaktor

A. ANHANG

A.1 Material und Methoden

Tabelle A.1: Zelldichte und Inkubationsvolumina in den verschiedenen Zellkulturgefäßen (WB: Western Blot, FM: Fluoreszenzmikroskopie)

Kulturgefäß	Fläche (cm ²)	Zellzahl	Volumen (µl)
24-Well (WB)	1,9	60000	600
96-Well (FM)	0,32	8000	120

Tabelle A.2: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung	Emission	Konzentration
DAPI	358 nm	461 nm	600 nM
Hoechst	350 nm	450 nm	0,15 µg/ml
PI	536 nm	617 nm	0,25 µg/ml
TMRE	540 nm	595 nm	30 nM

Tabelle A.3: Verwendete Antikörper (IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot)

Antikörper	Epitop	Hersteller	Herkunft	Verdünnung
primäre Antikörper				
γ-H2AX (JBW301)	Ser139	Merck Millipore	mouse monoclonal	1:500
PARP-1 (H-250)		Santa Cruz	rabbit polyclonal	1:1000
PCNA (PC-10)	-	Santa Cruz	mouse monoclonal	1:2000
sekundäre Antikörper				
anti-mouse Alexa Fluor 488 (IF)		Biomol	goat oligoclonal	1:1000
anti-mouse IRDye-700 (WB)		Biomol		1:5000
anti-rabbit IRDye800 (WB)		Biomol		1:2000

Tabelle A.4: Zusammensetzung des 2x Laemmli Puffers für die Zellyse

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

Tabelle A.5: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel (5 %)	
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1))	5 %
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 %
TEMED	0,01 %
APS	0,1 %

Tabelle A.6: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (10 %)	
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1))	10 %
Tris-HCl pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 %
TEMED	0,01 %
APS	0,1 %

Tabelle A.7: Zusammensetzung des Laufpuffers

Laufpuffer	
Tris	25 mM
Glycin	1,2 mM
SDS	0,1 %

Tabelle A.8: Zusammensetzung des Blotpuffers

Blotpuffer	
Tris-BASE	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol	10 %

Tabelle A.9: Zusammensetzung von TBS

TBS	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH 7,4	

Tabelle A.10: Zusammensetzung von TBS-T

TBS-T	
TBS	99,9 % (v/v)
Tween-20 [®]	0,1 % (v/v)

A.2 Charakterisierung des Cisplatin-induzierten Zelltods in humanen Krebszellen

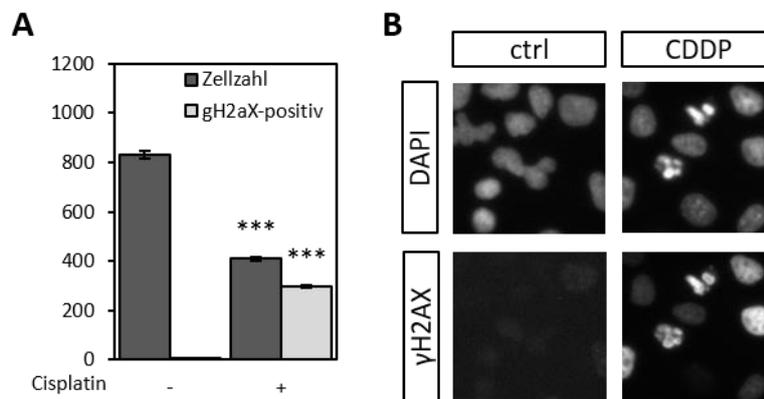


Abbildung A.1: Cisplatin führt zur DNA-Schädigung. A549 wurden für 24 Stunden mit Cisplatin (50 μ M) oder Medium (-) behandelt. Die Entstehung von DSB wurde anschließend mittels immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweises von H2AX-Phosphorylierung detektiert. **A** Quantifizierung der Gesamtzellzahl, sowie γ H2AX-positiver Zellen. **B** Repräsentative Ausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des DAPI- und GFP (γ H2AX)-Kanals, die der Quantifizierung zugrunde liegen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM eines repräsentativen Experiments mit 8 Replikaten von 2 Experimenten. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle wurde mittels Student's t-Test getestet (***) $p < 0,001$.

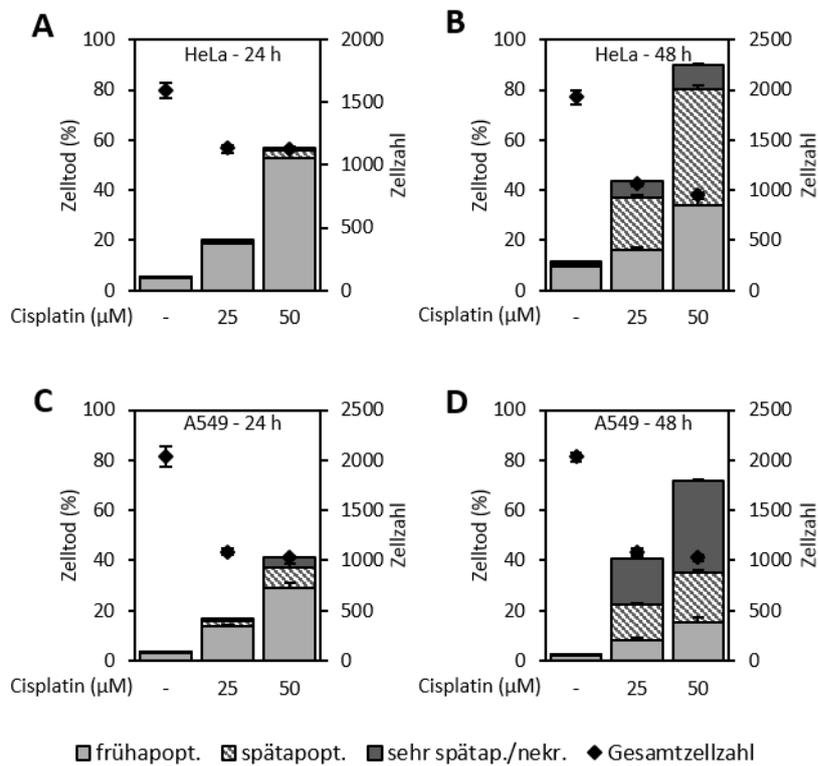


Abbildung A.2: DMSO-Kontrollen der Versuche mit pan-Caspase-Inhibitor Q-VD. HeLa (A, B) und A549 (C, D) wurden entsprechend der Versuche mit Q-VD mit 0,08 % DMSO (entsprechend der höchsten eingesetzten Konzentration Q-VD-OPh) vorinkubiert und für 24 bzw. 48 Stunden mit Cisplatin (25, 50 μM) oder Medium (-) behandelt. Die Gesamtzellzahl und die verschiedenen Zelltodstadien (früh-, spät-, sehr spätapoptische bzw. nekrotische Zellen) wurden mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärben der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von 4 (HeLa) bzw. 2 (A549) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten.

klassischer apoptotischer Phänotyp



HeLa

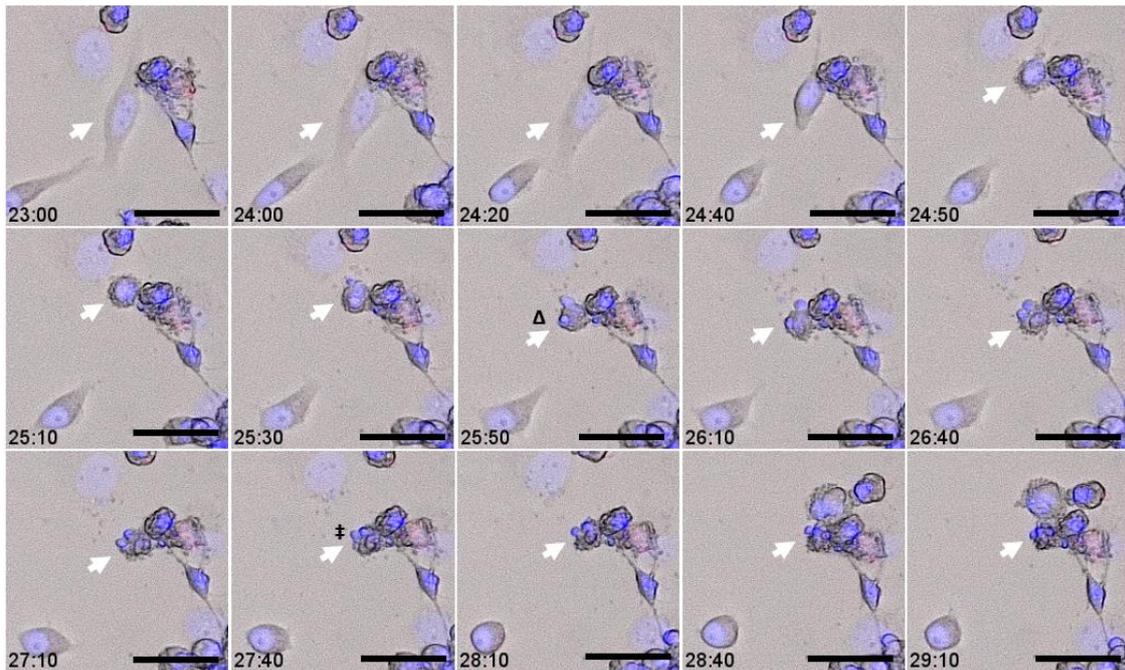


Abbildung A.3: Klassischer apoptotischer Phänotyp (HeLa). Kennzeichnend sind die Fragmentierung des Zellkerns (Δ) nach der DNA-Kondensation und die Auflösung der Zelle in Apoptotic Bodies (\ddagger). Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (nicht abgebildet). HeLa wurden mit Cisplatin (50 μ M) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab 50 μ m.

Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp



HeLa

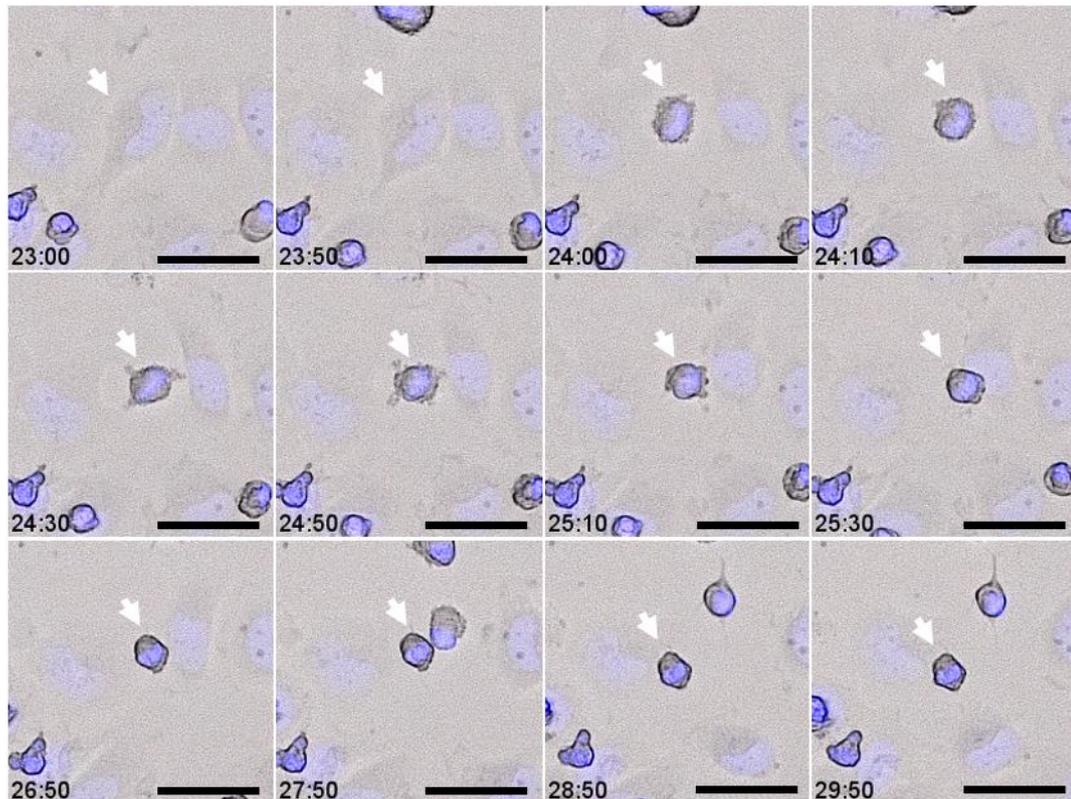


Abbildung A.4: Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp (HeLa). Kennzeichnend sind die persistierende Kondensation des Zellkerns und das Ausbleiben der Kernfragmentierung. Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (nicht abgebildet). HeLa wurden mit Cisplatin (50 μM) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab 50 μm .

Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp mit Kernseparation



HeLa

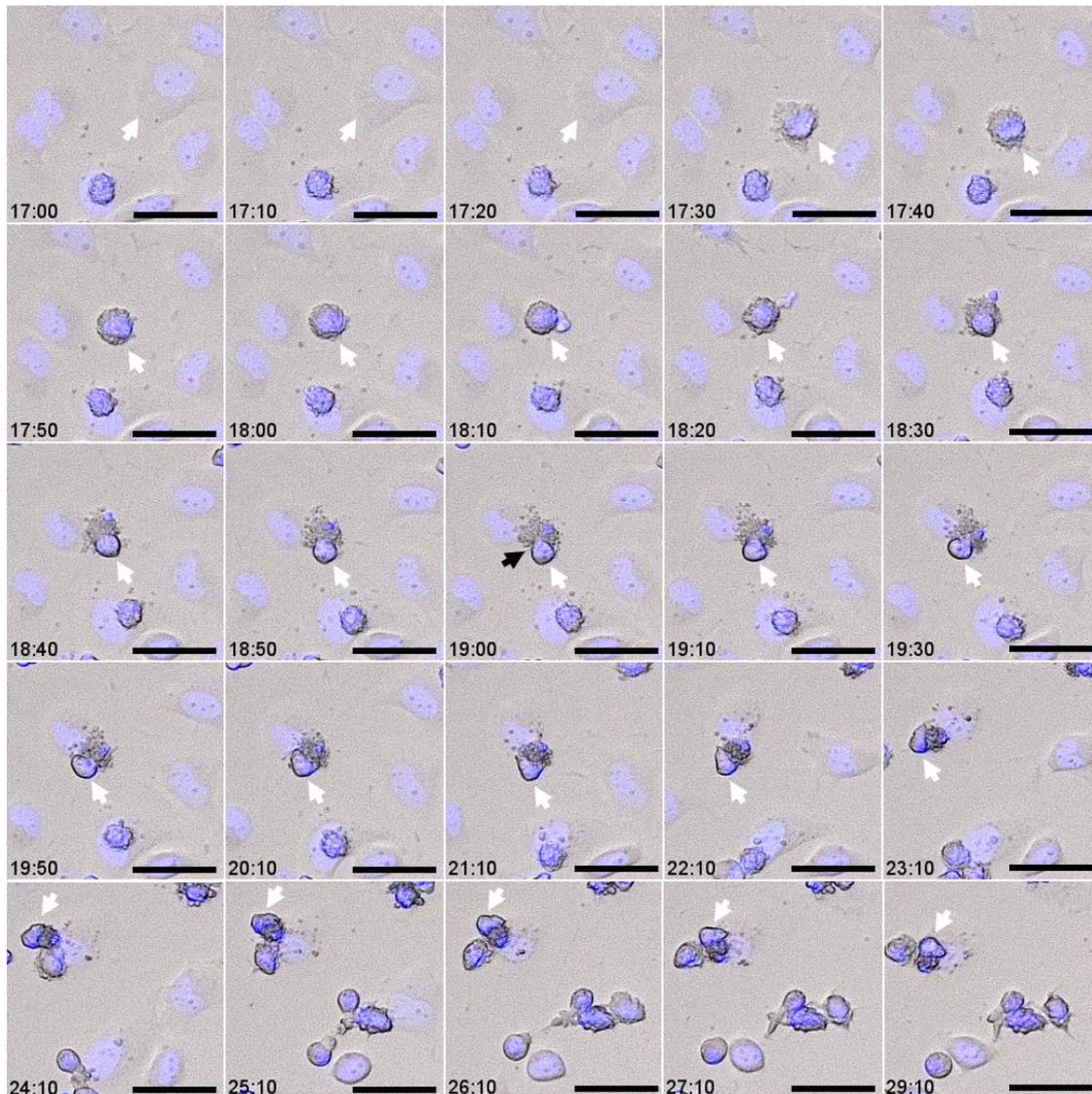


Abbildung A.5: Kernkondensations-dominierter apoptotischer Phänotyp mit Kernseparation (HeLa). Kennzeichnend ist die Separation des kondensierten Zellkerns vom restlichen Zellkörper (schwarzer Pfeil). Im späten Verlauf kommt es zum Verlust der Zellmembranintegrität (nicht abgebildet). HeLa wurden mit Cisplatin ($50 \mu\text{M}$) behandelt und nach Anfärben mit Hoechst und PI mittels Fluoreszenzmikroskopie im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte im Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) im zeitlichen Verlauf nach Cisplatin-Behandlung. Weißer Pfeil: Markierung der beobachteten Zelle. Maßstab $50 \mu\text{m}$.

A.3 Screen einer bioaktiven Substanz-Bibliothek zur Identifizierung von Modulatoren der Cisplatin-induzierten Apoptose

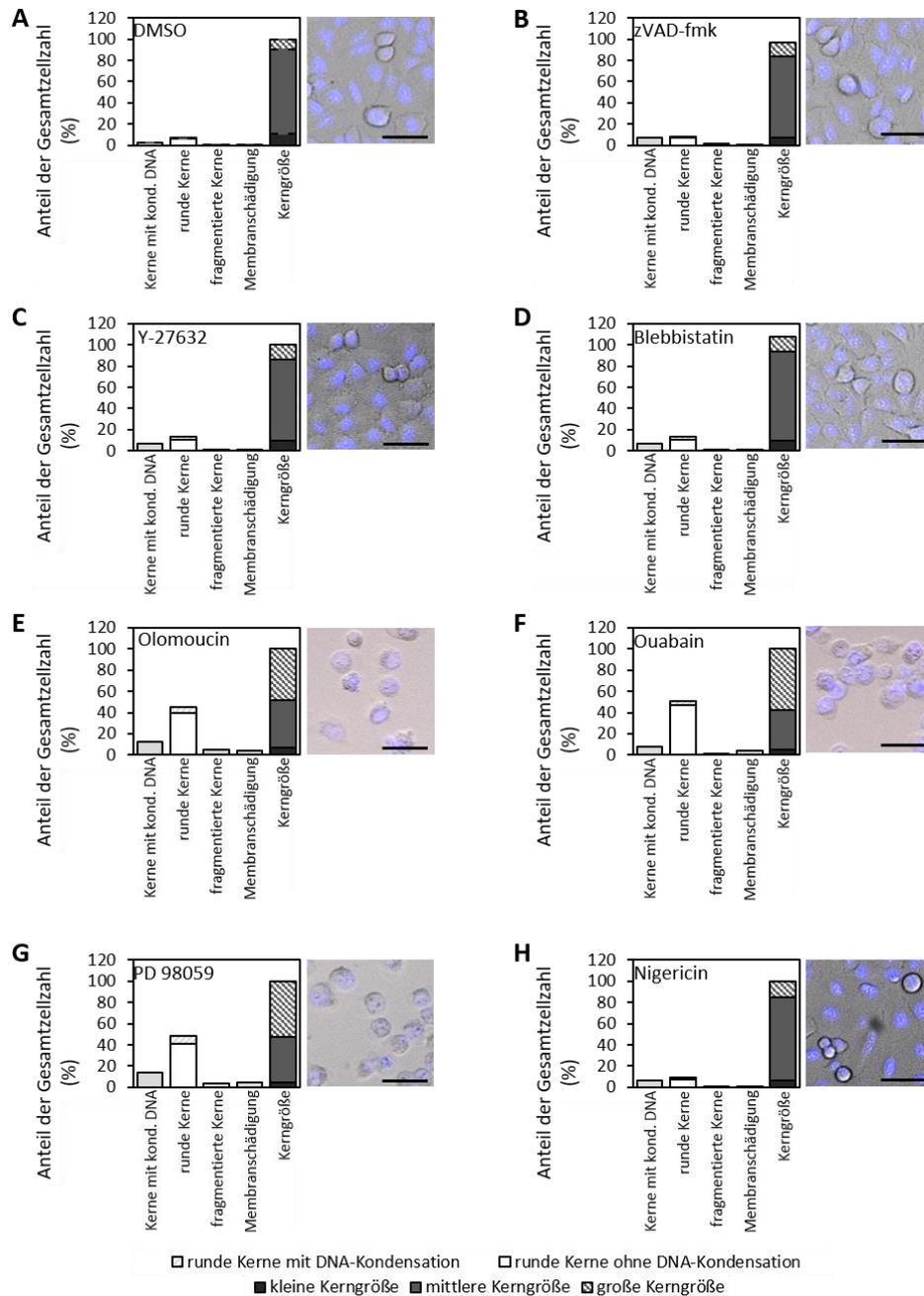


Abbildung A.6: Effekte der bioaktiven Substanzen auf das phänotypische Apoptose-Profil ohne Cisplatin Co-Behandlung. A549 wurden mit den entsprechenden Chemikalien (zVAD-fmk 21 µM, Y-27632 40 µM, Blebbistatin 34 µM, Olomoucine 34 µM, Ouabain 17 µM, PD 98059 37 µM, Nigericin 14 µM, **B-H**) oder DMSO (0,2 %, **A**) inkubiert. 24 Stunden später wurden die phänotypischen Apoptose-Parameter mittels Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie bei Anfärbung der Zellen mit Hoechst und PI bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Werte eines repräsentativen Replikats von 2 unabhängigen Replikaten (bioaktive Substanzen) bzw. Mittelwert + SD eines repräsentativen Experiments mit 24 Replikaten von 2 unabhängigen Experimenten (Cisplatin). Repräsentative Bildausschnitte zeigen das Overlay aus Durchlicht-, Hoechst- (blau) und PI-Kanal (rot) Maßstab 50 µm.

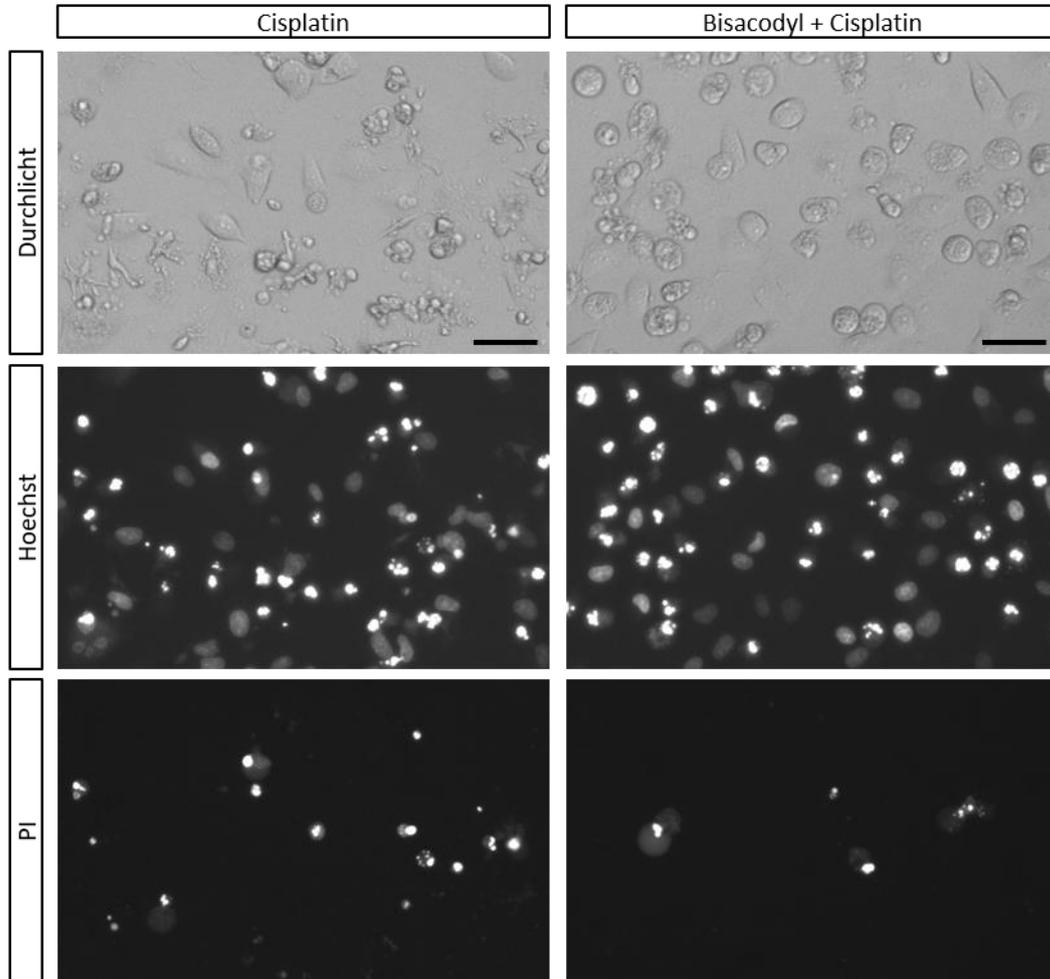


Abbildung A. 7: Bisacodyl verzögert in Co-Behandlung mit Cisplatin den Verlust der Zellmembranintegrität in apoptotischen Zellen. Darüber hinaus erhöht die Co-Behandlung den Anteil apoptotischer Zellen mit DNA-Kondensation, die jedoch noch nicht den apoptotischen Volumenverlust zeigen. A549 wurden für 30 Minuten mit Bisacodyl (11 μM , rechts) oder DMSO (0,2 %, Cisplatin-Kontrolle, links) vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit Cisplatin (50 μM) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Versuche, die der quantitativen Auswertung in **Abbildung 3.27D** zugrunde liegen. Maßstab 50 μM .

Effekt	
gleichgerichtet	149
entgegengesetzt	42
nur A549	173
nur HeLa	276
Effekt nicht bestätigt	228
kein Effekt	252
Summe	1120

A549	gesamt	ohne Eigenzytotoxizität	z-score > 5
Zelltod erhöht	63	43	22
Zelltod erniedrigt	301	279	56
kein Effekt	513		
nicht bestätigt	243		
Summe	1120	322	78

HeLa	gesamt	ohne Eigenzytotoxizität	z-score > 5
Zelltod erhöht	103	35	18
Zelltod erniedrigt	363	357	54
kein Effekt	360		
nicht bestätigt	294		
Summe	1120	392	72

Abbildung A.8: Übersicht der Effekte aller getesteten bioaktiven Substanzen auf den Cisplatin-induzierten Zelltod. Eine Erhöhung des Zelltods liegt vor, wenn der Effekt in beiden Wiederholungen größer 1,5 (z-score > 1,5) ist, bei einer Erniedrigung des Zelltods analog kleiner -1,5 (z-score < -1,5). Ohne Effekt sind Substanzen, deren z-score in beiden Wiederholungen zwischen -1,5 und 1,5 liegen ($-1,5 \leq x \leq 1,5$). Ohne Eigenzytotoxizität sind Substanzen, die in alleiniger Behandlung maximal 15 % Zelltod an der Gesamtzellzahl hervorrufen.

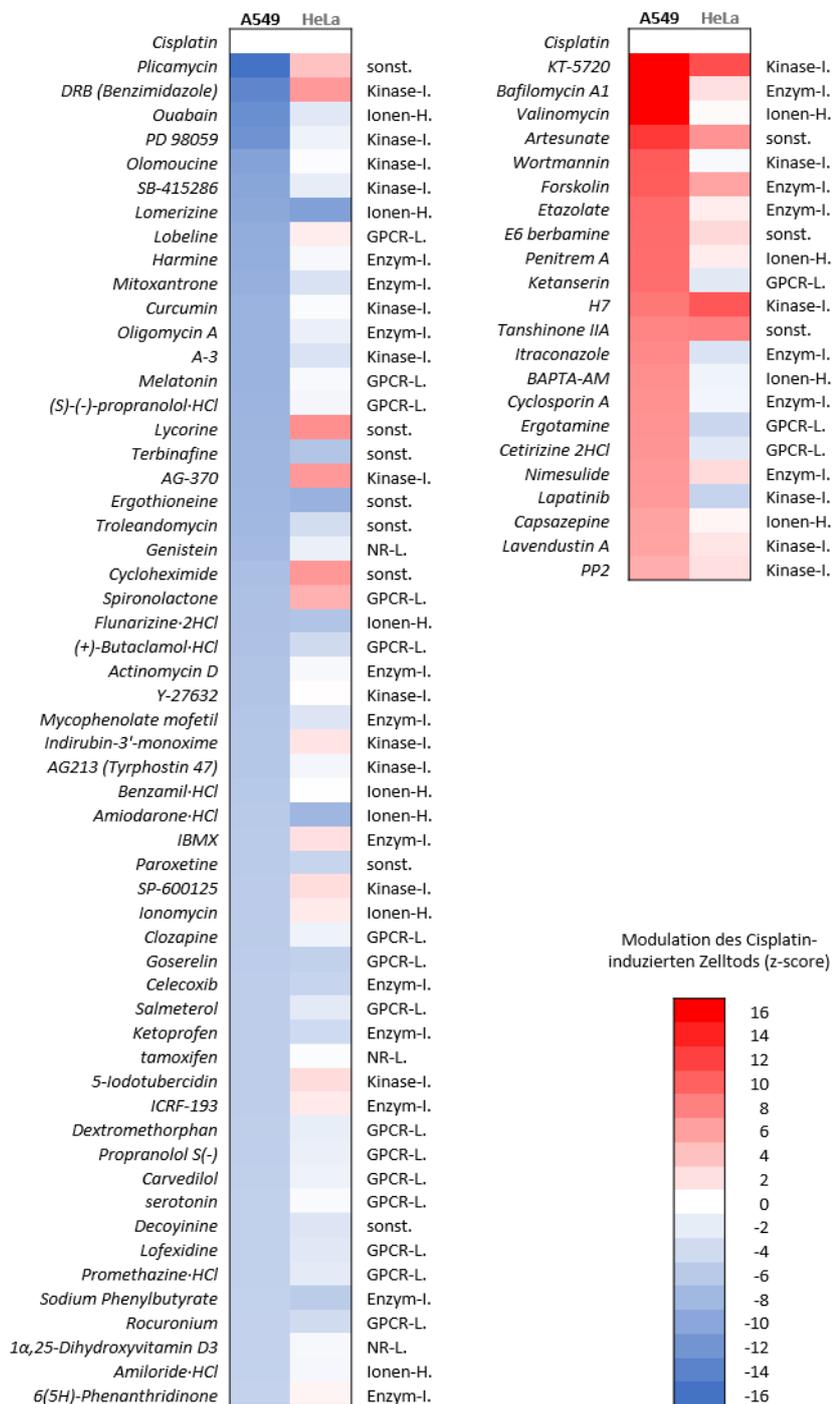


Abbildung A.9: Übersicht aller Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod in A549 modulieren. Datengrundlage sind bioaktive Substanzen der Bibliothek, die den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens 5 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle ($|z\text{-score}| < 5$) verändern, unter Ausschluss von Substanzen, die selbst eine zytotoxische Wirkung (Zelltod $> 15\%$ der Gesamtzellzahl) zeigen. Die Heatmaps stellen die vollständige Darstellung aller Effektoren aus **Abbildung 3.29** als Mittelwert der zwei unabhängigen Replikate in Form einer Farbcodierung des z-scores dar. Die Heatmaps zeigen auch die Werte der Substanzen in HeLa-Zellen. Funktionelle Klassifizierung: Enzym-I: Enzym-Inhibitor, GPCR-L: G-Proteingekoppelter Rezeptor-Ligand, Ionen-H: Ionen-Homeostase, Kinase-I: Kinase-Inhibitor, NR-L: nukleärer Rezeptor-Ligand, sonst.: sonstige.

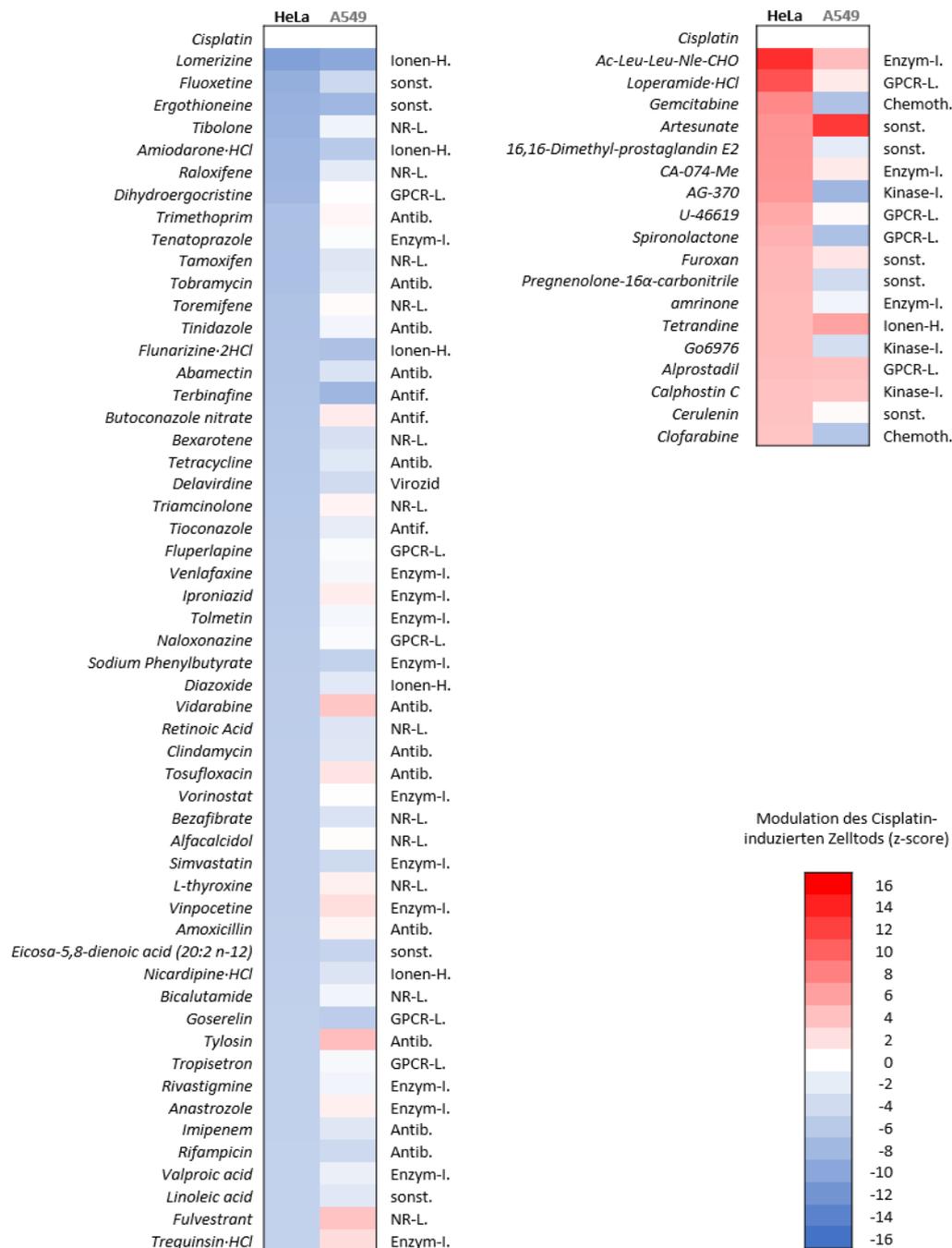


Abbildung A.10: Übersicht aller Substanzen, die den Cisplatin-induzierten Zelltod in HeLa modulieren. Datengrundlage sind bioaktive Substanzen der Bibliothek, die den Cisplatin-induzierten Zelltod um mindestens 5 Standardabweichungen der Cisplatin-Kontrolle ($|z\text{-score}| < -5$) verändern, unter Ausschluss von Substanzen, die selbst eine zytotoxische Wirkung (Zelltod > 15 % der Gesamtzellzahl) zeigen. Die Heatmaps stellen die vollständige Darstellung aller Effektoren aus **Abbildung 3.30** als Mittelwert der zwei unabhängigen Replikate in Form einer Farbcodierung des z-scores dar. Die Heatmaps zeigen auch die Werte der Substanzen in A549-Zellen. Funktionelle Klassifizierung: Antib.: Antibiotikum, Antif.: Antifungizid, Chemoth.: Chemotherapeutikum, Enzym-I.: Enzym-Inhibitor, GPCR-L.: G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Ligand, Ionen-H.: Ionen-Homeostase, Kinase-I.: Kinase-Inhibitor, NR-L.: nukleärer Rezeptor-Ligand, sonst.: sonstige.

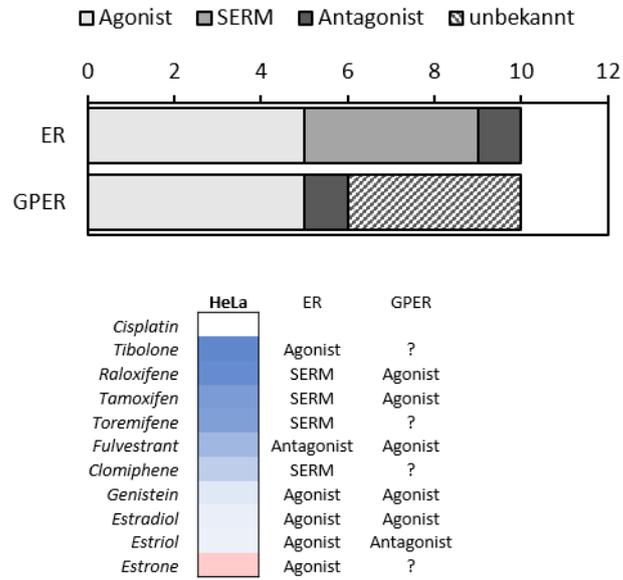


Abbildung A.11: Übersicht aller 10 Substanzen aus der bioaktiven Substanz-Bibliothek, deren biologisches Ziel der Estrogen-Rezeptor ist und ihre jeweilige Wirkungsweise. Für die Mehrheit dieser Substanzen ist eine agonistische Wirkung am GPER bekannt. GPER: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, ER: Estrogen-Rezeptor- α/β , SERM: selektiver Estrogen-Rezeptor Modulator.

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

Hansjosten, I., Rapp, J., Reiner, L., Vatter, R., Peravali, R., Palosaari, T., Joossens, E., Gerloff, K., Macko, P., Whelan, M., Gilliland, D., Ojea-Jimenez, I., Monopoli, M.P., Rocks, L., Garry, D., Dawson, K., Röttgermann, P. J., Murschhauser, A., Rädler, J. O., Tang, S. V. Y., Gooden, P., Lynch, I., Valsami-Jones, E., Diabaté, S., Weiss, C., 2017. Microscopy-based high-throughput assays enable multi-parametric analysis to assess adverse effects of nanomaterials in various cell lines. (*in Vorbereitung*)

Schreck, I.*, Grico, N.*, Hansjosten, I.*, Marquardt, C., Bormann, S., Seidel, A., Kvietkova, D.L., Pieniazek, D., Segerbäck, D., Diabaté, S., van der Horst, G.T.J., Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F., Weiss, C., 2016. The nucleotide excision repair protein XPC is essential for bulky DNA adducts to promote interleukin-6 expression via the activation of p38-SAPK. *Oncogene* 35, 908–918. doi:10.1038/onc.2015.145 * geteilte Erstautorenschaft

Khan, A., Weiss, C., Schweitzer, B., Hansjosten, I., Mikut, R., Reischl, M., 2014. Multimodal Image Segmentation of Cellular Fragmentation Using Edge Detector and Morphological Operators. *Bio-med. Eng. / Biomed. Tech.* 59, 518–521. doi:10.1515/bmt-2014-5008

Posterbeiträge auf Tagungen:

Hansjosten, I., Volkmann, K., Rapp, J., Reiner, L., Vatter, R., Palosaari, T., Joossens, E., Gerloff, K., Whelan, M., Monopoli, M.P., Rocks, L., Garry, D., Dawson, K., Röttgermann, P.J., Murschhauser, A., Rädler, J.O., Lynch, I., Valsami-Jones, E., Diabaté, S., Weiss, C. Microscopy-based high-throughput analysis enables multi-parametric assays to assess adverse effects of nanomaterials in various cell lines. *New Tools and Approaches for Nanomaterials Safety Assessment (NMSA)*, Malaga, Spain, 07 – 09.02.2017.

Hansjosten, I., Weiss, C. A chemical biology and high throughput imaging approach to apoptosis. 4. *Tagung der Experimentellen und Klinischen Pharmakologen und Toxikologen in Baden-Württemberg*, Konstanz, D, 15.07.2016.

Schweitzer, B., Hansjosten, I., Weiss, C. A systems pharmacology approach to identify modulators of CDDP-induced apoptosis. 2. *Treffen der Pharmakologen und Toxikologen in Baden-Württemberg*, Heidelberg, D, 25.07.2014.

Volkman, K., Hansjosten, I., Rapp, J., Diabaté, S., Weiss, C. Developing in vitro and in vivo high throughput screening platforms for hazard prediction of manufactured nanomaterials. 2. Treffen der Pharmakologen und Toxikologen in Baden-Württemberg, Heidelberg, D, 25.07.2014.

Volkman, K., Hansjosten, I., Rapp, J., Lynch, I., Valsami-Jones, E., Diabaté, S., Weiss, C. Developing in vitro and in vivo high throughput screening platforms for hazard prediction of manufactured nanomaterials. 7th International Nanotoxicology Congress (NanoTox 2014), Antalya, Turkey, 23. - 26.04.2014.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Iris Hansjosten
Geburtsdatum und -ort: 08.08.1987, Karlsruhe
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Promotion

Januar 2013 - aktuell
Promotion am Institut für Toxikologie und Genetik,
Molekulare Toxikologie von Gentoxinen und
Nanomaterialien, AG PD Dr. Carsten Weiss
Karlsruher Institut für Technologie

Studium

Oktober 2010 - Oktober 2012
Molekulare Ernährungswissenschaft (M.Sc.)
Universität Hohenheim

Oktober 2007 - Oktober 2010
Ernährungswissenschaft (B.Sc.)
Universität Hohenheim

Schulbildung

Juni 2007
Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Neureut, Karlsruhe

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt dabei:

PD Dr. Carsten Weiss. Carsten, ich danke dir sehr für die Möglichkeit in deiner Arbeitsgruppe promovieren zu können und für dein mir entgegengebrachtes Vertrauen. Ich schätze dein Engagement, deine Anregungen und die vielen interessanten Diskussionen mit dir sehr, durch die du mir eine überaus spannende, lehr- und abwechslungsreiche Promotionszeit ermöglicht hast.

Dr. Silvia Diabaté. Silvia, ich danke dir ebenfalls für die hervorragende und zuverlässige Zusammenarbeit, insbesondere im NanoMILE-Projekt und deine große Hilfsbereitschaft bei Fragen jeglicher Art.

Prof. Dr. Andrea Hartwig für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. David Czock für die freundliche Bereitstellung der Daten und des Wissens zu klinischen Arzneimittel-Interaktionen.

Victor Gourain für die Analyse der Genexpressionsdaten und die zuverlässige und gute Zusammenarbeit.

Ravindra Peravali für die langjährige, gute Zusammenarbeit und den technischen Support im Screening Center.

Dr. Thomas Dickmeis und Dr. Pavel Levkin für die Teilnahme an meinem Thesis-Komitee und den damit verbundenen Anregungen für die Bearbeitung dieses Projekts.

Meinen Bachelor- und Masterstudenten Juliane Rapp, Luisa Reiner, Ruben Vatter, Patricia Muschong und Michelle Dierolf für ihre Mitarbeit und ihr Engagement. Insbesondere gilt

mein Dank Patricia und Michelle, die viele wertvolle Experimente für das Projekt dieser Arbeit durchführten.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre, die hervorragende gegenseitige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft.

Regina Leibe, ich danke dir für die unvergessliche gemeinsame Doktoranden-Zeit und die fantastische gegenseitige Unterstützung. Silvia Andraschko, Jessica Gates und Dorit Matern danke ich für die Unterstützung in der Zellkultur und bei Western Blots. Brigitte Schweitzer danke ich für die Mitarbeit beim Screen der bioaktiven Substanzbibliothek in der Lungenkarzinomzelllinie. Auch allen weiteren aktuellen und ehemaligen Doktoranden und Postdocs gilt mein Dank für die tolle gegenseitige Unterstützung und Zusammenarbeit: Marco Al-Rawi, Zhen An, Stefanie Bormann, Susanne Fritsch-Decker, Marco Dilger, Andreas Gast, Yuya Hayashi, I-Lun Hsiao, Katrin Volkmann und Ane Marit Wågbø.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und natürlich Frank. Eure uneingeschränkte Unterstützung und Rückhalt sind einmalig. Eine so wundervolle Familie zu haben ist unbeschreiblich wertvoll.