

**Forschungszentrum Karlsruhe**

**Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte**

**FZKA 6758**

**Untersuchungen zur Resistenzentwicklung  
von Tumorzelllinien gegenüber  
Apoptose-Induktoren**

**Jörg Trapp**

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe  
genehmigte Dissertation

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
2002**

**Impressum der Print-Ausgabe:**

**Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

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

**ISSN 0947-8620**

# **Untersuchungen zur Resistenzentwicklung von Tumorzelllinien gegenüber Apoptose-Induktoren**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der  
Universität Karlsruhe  
genehmigte  
DISSERTATION

von  
**Jörg Trapp**  
aus  
Göppingen

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2002

Referent: PD Dr. H.F. Krug

Korreferent: Prof. Dr. D. Wedlich

---

## Zusammenfassung

Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Apoptose-Induktoren ist häufig auf eine Veränderung apoptotischer Signaltransduktionwege bzw. auf die Aktivierung von Überlebensmechanismen zurückzuführen. Die vorliegende Arbeit hat daher die Untersuchung eben dieser Signalwege in teilweise resistenten Tumorzellen zum Inhalt. Es wurde beobachtet, dass differenzierte HL-60 Zellen wesentlich insensitiver auf toxische Substanzen reagieren als undifferenzierte. Die Analyse der MAP-Kinase-Kaskaden nach einer Behandlung mit dem Apoptose-Induktor Tributylzinn (TBT), ergab ein deutliches Absinken der Phosphorylierung (Aktivierung) der Stresskinase JNK während der Differenzierung der HL-60 Zellen, aber alle anderen Kinasen (ERK 1/2; p38) zeigten keine Veränderung. Auch die Auslösung der Apoptose sank erheblich ab, was mit einer deutlichen Verringerung der Caspase-Aktivität und einem Anstieg des Überlebensfaktors NFκB erklärbar ist. Eine Hemmung von NFκB in differenzierten HL-60 Zellen führte nach TBT-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der Nekrosen, während die undifferenzierten HL-60 Zellen nahezu ausschliesslich durch Apoptose starben.

Darüber hinaus dienten drei Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) als Modellsystem der Tumorresistenz, denn diese Zellen zeigten in Primärtumorgewebe *in vivo* eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin (CDDP). Die Zelllinie MEXF 276L reagierte sensitiv gegenüber Cisplatin, wohingegen die Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L resistent waren. Die *in vitro* Behandlung ergab dann jedoch, dass sich nur die Zelllinie MEXF 514L wirklich resistent gegenüber Cisplatin verhält. Zur Untersuchung der apoptotischen Signaltransduktionswege wurde der Apoptose-Induktor TBT, aber auch Cisplatin und die Todesrezeptorliganden eingesetzt. Um auf mögliche Aktivierungen von Überlebensmechanismen rückschliessen zu können, wurden Untersuchungen der MAP-Kinase-Kaskaden mit eingeschlossen. Hier konnten allerdings im Phosphorylierungsstatus von ERK, JNK und p38 keine Veränderungen zwischen den MEXF Zelllinien festgestellt werden. Auf eine TBT-Behandlung sprachen nur MEXF 276L Zellen an. Bei den anderen beiden Zelllinien konnte keine Reaktion auf TBT-Exposition beobachtet werden. In keiner der Zelllinien konnte eine Aktivität der Initiator-Caspase-8 oder -10 festgestellt werden, wohingegen die TBT-sensitive Zelllinie einen deutlichen Anstieg der Aktivität der Effektor-Caspase-3 erkennen liess. In den beiden TBT-resistenten Zelllinien wurde dagegen das anti-apoptische Protein Bcl-2 überexprimiert und ist somit die höchstwahrscheinliche Ursache

der Resistenz. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch TBT in MEXF Zellen die Mitochondrien als wichtiges *Target* betroffen sind.

Die Untersuchungen mit Cisplatin als Apoptose-Induktor ergaben, dass in den sensitiven Zelllinien Caspasen eine essentielle Rolle spielen. Daher ist die Cisplatin-Resistenz der Zelllinie MEXF 514L, wie auch schon bei TBT, vermutlich auf eine starke Überexpression von Bcl-2 zurückzuführen.

Da Todesrezeptoren bei der Induktion von Apoptose ein wichtiges Übertragungsmedium sind, wurden die Zellen auf ihre Rezeptorausstattung hin überprüft. CD 95 (Fas-Rezeptor) konnte nur in MEXF 276L Zellen detektiert werden. Nur in diesen Zellen war auch die Induktion der Apoptose mit FasL möglich. TNF-R1 ist nur in MEXF 276L und MEXF 462NL Zellen vorhanden, während TNF-R2 in allen MEXF Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Die spezifische Aktivierung der TNF-Rezeptoren resultierte bei allen drei MEXF Zelllinien, in einer NFκB-Antwort und nicht in der Apoptose.

Die TRAIL-Rezeptoren, TRAIL-R1 und -R2, sowie die Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und -R4 konnten in allen Zellen nachgewiesen werden. In MEXF 276L Zellen wurde vermutlich durch Decoy-Rezeptoren eine TRAIL-induzierte Apoptose verhindert, da hier diese Variante der TRAIL-Rezeptoren überwog. Andererseits konnten die beiden Zelllinien MEXF 462NL sowie die hochresistente Zelllinie MEXF 514L mit den TRAIL-Liganden zur Apoptose angeregt werden, was das enorme Potential dieses Rezeptorweges gerade in Tumorzellen unterstreicht. Dies kann als Hinweis für einen Einsatz in der Tumorthherapie gewertet werden und zeigt die Dringlichkeit auf, Tumorzellen bezüglich ihrer apoptotischen Signalwege zu charakterisieren, um so effektive Wirkorte für neue Zytostatika erkennen zu können.

---

**Abstract****Investigations on the development of resistance against inducers of apoptosis in tumor cell lines**

The development of resistance to apoptotic-inductors can frequently result from a change of apoptotic signal transduction pathways or alternatively via the activation of survival-mechanisms. Therefore, this work dealt with the examination of these signaling pathways in partially resistant tumor cells. It has been observed that differentiated HL-60 cells respond significantly more insensitive to toxic substances than undifferentiated. Analysis of MAP-kinase-cascades after treatment with the apoptosis-inductor Tributyltin (TBT) resulted in a less phosphorylation (activation) status of stresskinase JNK after differentiation HL-60 cells, but the other kinases (ERK 1/2 and p38) did not reveal any changes. The induction of apoptosis also considerably decreased which can be explained by a clear reduction of caspase-activity and a rise in activation of the survival factor NFκB. Inhibition of NFκB in differentiated HL-60 cells led to a distinct rise of necrosis after TBT treatment whilst undifferentiated HL-60 cells nearly exclusively died via apoptosis.

Additionally, three melanoma xenograft cell lines (MEXF) were used as a model system for tumor resistance because these cells revealed in prime tumor tissue *in vivo* a varying sensitivity to the cytostatic drug Cisplatin (CDDP). The cell line MEXF 276L was sensitive to Cisplatin treatment whereas the cell lines MEXF 462NL and MEXF 514L were resistant. However, after *in vitro* treatment only the MEXF 514L cell line was really resistant to Cisplatin. For the examination of apoptotic signal transduction pathways TBT, Cisplatin and the death receptor ligands were tested. To consider possible activation of survival mechanisms MAP-kinase-cascades were also investigated. Nevertheless, no differences in the phosphorylation status of ERK, JNK and p38 between the MEXF cell lines could be detected. Only the MEXF 276L cells were affected by TBT-treatment. The other two cell lines exhibited no reaction to TBT exposition. Activity of the initiator caspases-8 or -10 could not be detected in any cell line whereas the TBT sensitive cells showed a distinct effector caspase-3 activity. The anti-apoptotic protein Bcl-2 was demonstrated to be overexpressed in the two TBT resistant cell lines and is, therefore, the most likely reason for resistance. These results suggest that mitochondria are an important target for TBT in MEXF cells.

Experiments with Cisplatin demonstrated that caspases play an essential role within the sensitive cell lines. Thus Cisplatin as well as TBT resistance in the MEXF 514L cell line is likely due to a strong overexpression of Bcl-2.

Death receptors are the most important elements within the extrinsic induced apoptosis, therefore, cells were investigated for their death receptor expression. CD95 (Fas receptor) could be only detected in MEXF 276L cells, and these cells were solely inducted to apoptosis by FasL. TNF-R1 was only expressed in MEXF 276L and MEXF 462NL cells whereas TNF-R2 could be observed in all three MEXF cell lines. Specific activation of TNF receptors leads to NF $\kappa$ B activation and not to apoptosis in all three MEXF cell lines.

The TRAIL receptors TRAIL-R1 and -R2 as well as the decoy receptors TRAIL-R3 and -R4 could be found in all cells. In MEXF 276L cells TRAIL induced apoptosis was presumably prevented by decoy receptors because this kind of TRAIL receptors predominated. On the other hand the two cell lines MEXF 462NL as well as the high-resistant cell line MEXF 514L could be stimulated to apoptosis by TRAIL ligand which emphasizes the enormous potential of this receptor pathway especially in tumor cells. This can be assessed as a reference for use in tumor therapy and shows the urgency to characterize tumor cells with regard to their apoptotic pathways to identify effective targets for cytostatic drugs.

---

---

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>IX</b>
2.1	Allgemeine Abkürzungen	IX
2.2	Abkürzungen für Aminosäuren	XI
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
3.1	Medikamentenresistenz	1
3.2	Das Zytostatikum Cisplatin (CDDP)	2
3.3	Die umwelt-toxische Verbindung Tributylzinn (TBT)	4
3.4	Signaltransduktionswege	5
3.4.1	Rezeptoren	6
3.4.1.1	Übersicht membranständiger und intrazellulärer Rezeptoren	6
3.4.1.1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	6
3.4.1.1.2	Ligand-gesteuerter Ionenkanal	7
3.4.1.1.3	Katalytische Rezeptoren	7
3.4.1.1.4	Adaptorprotein-gekoppelte Rezeptoren	8
3.4.1.1.5	Intrazelluläre Rezeptoren:	8
3.4.1.2	Todesrezeptoren	9
3.4.2	Caspasen	16
3.4.3	MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Protein Kinasen)	18
3.5	Apoptose	20
3.6	Zielsetzung der Arbeit	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
4.1	Chemikalien und Biochemikalien	23
4.2	Laborgeräte	24
4.3	Zellkulturen	25
4.3.1	HL-60 Zellen	25
4.3.1.1	Differenzierung von HL-60 Zellen	26



4.3.2	MEXF-Zellen	26
4.3.3	Bestimmung der Zellzahl	27
4.3.4	Kryokonservierung von Zellen	28
4.3.5	Auftauen von Zellen	28
<b>4.4</b>	<b>Proteinanalytik</b>	<b>28</b>
4.4.1	Proteinbestimmung (BCA Protein <i>Assay</i> )	28
4.4.2	Herstellung von Ganzzellextrakten	29
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
4.4.4	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	31
4.4.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Antikörper	32
4.4.6	Antikörperentfernung von Western Blot Membranen	34
4.4.7	Färbung von Proteinen (Coomassie-Färbung)	35
<b>4.5</b>	<b>Caspase-3 und Caspase-8 Aktivitäts-Assay</b>	<b>36</b>
<b>4.6</b>	<b>Isolierung apoptotischer DNA und Auftrennung durch Agarosegel-Elektrophorese</b>	<b>38</b>
4.6.1	Isolierung apoptotischer DNA	38
4.6.2	Auftrennung apoptotischer DNA durch Agarosegel-Elektrophorese	39
<b>4.7</b>	<b>Elektroporation von undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen</b>	<b>40</b>
4.7.1	Zur Elektroporation verwendete Plasmide	40
<b>4.8</b>	<b>Luciferase NF<math>\kappa</math>B-Reportergen Assay</b>	<b>41</b>
<b>4.9</b>	<b>Bestimmung der NF<math>\kappa</math>B-DNA Bindeaktivität im Zellkern durch EMSA Assay (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)</b>	<b>42</b>
4.9.1	NF $\kappa$ B und Oct-1 Bindungssequenzen für EMSA	42
4.9.1.1	Präparation der radioaktiv markierten Bindungssequenzen	42
4.9.1.1.1	Hybridisierung der Oligonukleotide	42
4.9.1.1.2	Radioaktive Markierung und Reinigung der hybridisierten Oligonukleotide	42
4.9.2	Präparation von Kernextrakten	43
4.9.3	EMSA Assay (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	44
<b>4.10</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</b>	<b>45</b>
4.10.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz von HL-60 Zellen	46
4.10.2	Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose durch Annexin-V-FITC/ Propidiumiodid Assay bei HL-60 Zellen	46
<b>4.11</b>	<b>Mikrobiologische Techniken</b>	<b>48</b>
4.11.1	Herstellung von Kulturmedium und Agarplatten	48
4.11.2	Kryokonservierung von <i>E.coli</i>	49
4.11.3	Elektroporation von <i>E.coli</i>	49

4.11.4	Selektion rekombinanter Bakterien	50
4.11.5	Amplifizierung und Isolierung von Plasmiden	51
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungen zur TBT induzierten Apoptose in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen</b>	<b>52</b>
5.1.1	Ergebnisse zur TBT-induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen in HL-60 Zellen	52
5.1.1.1	Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 nach TBT Gabe	52
5.1.1.2	Phosphorylierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK)/ Stress-aktivierten Protein Kinase (SAPK) nach TBT Gabe	54
5.1.1.3	Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach TBT Gabe	55
5.1.2	Apoptotische DNA-Leiter nach TBT Gabe in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen als Apoptose-Nachweis	56
5.1.3	Apoptose-Untersuchungen an undifferenzierten als auch differenzierten HL-60 Zellen bezüglich ihrer Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP- <i>cleavage</i> ) nach TBT Gabe	57
5.1.4	Untersuchungen zum Einfluss von NFκB auf das Überleben von undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen	58
5.1.4.1	NFκB Luciferase Reporter-Gen Assay mit undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen nach TBT Exposition	59
5.1.4.2	Inaktivierung von NFκB in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen durch Transfektion mit Inhibitor-Protein IκB	60
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zur Resistenzentwicklung an Cisplatin sensitiven und resistenten Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)</b>	<b>61</b>
5.2.1	Ergebnisse zur TBT-induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)	62
5.2.1.1	Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 nach TBT Gabe in MEXF Zellen	62
5.2.1.2	Phosphorylierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK)/ Stress-aktivierten Protein Kinase (SAPK) nach TBT Gabe in MEXF Zellen	63
5.2.1.3	Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach TBT Gabe in MEXF Zellen	63
5.2.2	Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP- <i>cleavage</i> ) als Apoptose-Nachweis nach TBT Gabe in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)	64
5.2.3	Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP- <i>cleavage</i> ) als Apoptose-Nachweis nach Cisplatin (CDDP) Behandlung in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)	65
5.2.4	Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP- <i>cleavage</i> ) durch Inhibierung von Caspasen nach Cisplatin (CDDP) Behandlung in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)	66
5.2.5	Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)	67
5.2.6	Aktivierung der Caspase-8 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach Behandlung mit TBT	68

5.2.7	Keine Aktivierung der Caspase-10 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach TBT Behandlung	68
5.2.8	Aktivierung der Caspase-3 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach konzentrationsabhängiger TBT Inkubation	69
5.2.9	Untersuchungen zur Ausstattung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit Todes- und <i>Decoy</i> -Rezeptoren	70
5.2.9.1	Todesrezeptoren	70
5.2.9.2	<i>Decoy</i> -Rezeptoren	71
5.2.10	Stimulierung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit Fas-Liganden bezüglich der Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase ( <i>PARP-cleavage</i> )	72
5.2.11	Keine TBT abhängige Fas-Rezeptoraktivierung in MEXF 276L Zellen	73
5.2.12	Keine Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase ( <i>PARP-cleavage</i> ) in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach TNF $\alpha$ Inkubation	74
5.2.13	Aktivierung von NF $\kappa$ B in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) durch TNF Inkubation	74
5.2.14	Stimulierung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit TRAIL ( <i>Tumor Necrosis Factor- Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> )	75
5.2.14.1	Untersuchungen zur Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase ( <i>PARP-cleavage</i> ) nach TRAIL-Inkubation	76
5.2.14.2	Untersuchungen zur Aktivierung von Caspase-8 nach TRAIL-Inkubation	77
5.2.14.3	Untersuchungen zur Aktivierung von Caspase-10 nach TRAIL-Inkubation	77
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
6.1	Unterschiede in der Apoptose von HL-60 und MEXF Zellen	79
6.2	Die Rolle des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und des Überlebensfaktors NF $\kappa$ B	86
6.3	MAP-Kinasen	89
6.4	Die Bedeutung der Signaltransduktionswege in der Resistenz-Entstehung bzw. Desensibilisierung	91
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>97</b>

## 2 Abkürzungen

### 2.1 Allgemeine Abkürzungen

μg	Mikrogramm ( $10^{-6}$ Gramm)
μl	Mikroliter ( $10^{-6}$ Liter)
μM	Mikromolar ( $10^{-6}$ Molar)
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivierendes Protein-1
Apaf-1	<i>apoptosis activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	Rinder Serumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
c	zellulär ( <i>Cellular</i> )
°C	Grad Celcius
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>Counts Per Minute</i> )
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DD	Todesdomäne ( <i>Death Domain</i> )
DED	Todes Effektor Domäne ( <i>Death Effector Domain</i> )
dest.	destilliert
diff.	differenziert
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK	Extrazelluläre Signal regulierte Kinase
<i>et al.</i>	und andere („et alii“)
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE

---

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HO-1	Hämoxigenase-1
HRP	Meerrettichperoxidase
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IκB	Inhibitor von NFκB
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibiting Concentration 50%</i>
ICE	Interleukin 1β <i>Converting Enzyme</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor der IκB Kinase
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton (10 <sup>3</sup> Dalton)
m/v	Masse pro Volumen
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
MEKK	MAP/ERK Kinase Kinase (MAP-Kinase Kinase Kinase)
min	Minute
MKK	MAP Kinase Kinase
MKP	MAP Kinase Phosphatase
mM	Millimolar (10 <sup>-3</sup> M)
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
NIK	NFκB-induzierende Kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PKC	Proteinkinase C
QR	Chinon-Reduktase ( <i>Quinone</i> )
RIP	<i>Receptor Interactive Protein</i>
SAPK	Stress aktivierte Protein Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium</i> )
Std.	Stunde
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin

---

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF-R	<i>Tumor Necrosis Factor-Receptor</i>
TRADD	<i>TNF-R Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNF-R Associated Factor-2</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRAIL-R	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Rezeptor</i>
undiff.	undifferenziert
v/v	Volumen pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-FMK	Z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

## 2.2 Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

---

### 3 Einleitung

Die Gesamtzahl der jährlichen Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland wird bei Männern auf etwa 168.500 Fälle und bei Frauen auf 179.000 geschätzt. Davon erkranken jährlich etwa 2868 Männer und 3357 Frauen neu an malignen Melanomen der Haut, für Leukämien wird die Zahl bei Männern auf 1859 und für Frauen auf 5298 geschätzt (Jahr 1998). Von diesen verstarben 1999 an bösartigen Neubildungen maligner Melanome 1057 Männer und 964 Frauen, bei den Leukämien waren es 3497 Männer und 3523 Frauen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Diese Zahlen verdeutlichen die Wichtigkeit zur Ursachenforschung über die Tumorentstehung. Ein weiterer wichtiger Punkt ist auf therapeutischer Ebene die Resistenzentwicklung von Tumoren. Könnte die Wirksamkeit von Chemotherapeutika gegen maligne Tumoren erhöht und eine Resistenzentwicklung verhindert werden, so wäre dies ein großer Schritt im Kampf gegen Krebs. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei die auch in dieser Dissertation untersuchten Signaltransduktionswege der Zelle (Kong *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2000; Huang & Oliff., 2001; Reed 2001).

#### 3.1 Medikamentenresistenz

Eine Unempfindlichkeit von Tumoren gegenüber Zytostatika kann unterschiedliche Ursachen haben. Einige dieser zur Resistenz führenden Ursachen, werden nachfolgend beschrieben.

Beispiele für Ursachen auf nicht zellulärer Ebene:

- Ein ungeeignetes Applikationsschema (z.B. bei phasenspezifischen Zytostatika mit kurzer Halbwertszeit).
- Unzureichende Konzentrationen des Zytostatikums am Wirkort durch mangelnde Durchblutung des Tumors.
- Eine Therapie mit mehreren Medikamenten gleichzeitig, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung abschwächen (z.B. Asparaginase und Methotrexat).
- Bildung von inaktivierenden Antikörpern (z.B. gegen Asparaginase).

Ursachen auf zellulärer Ebene können unter anderem sein:

- Verringerung des aktiven Transports einer Substanz in die Zelle (Pratt et al., 1994).
- Zunahme des aktiven Transports aus der Zelle heraus. Zum Beispiel die *Multi-Drug-Resistance* (MDR). Hierbei wird über ein P170-Glykoprotein (Effluxpumpe), welches ein transmembranes Transportprotein darstellt, die Substanz aktiv aus der Zelle ausgeschleust. Eine erhöhte Expression des Multi-Drug-Resistance-Genes-1 (MDR1) führt zu einer verstärkten Bildung dieser Effluxpumpe und stellt die häufigste Ursache einer Mehrfachresistenz dar (Mutschler, 1997; Bosch & Croop, 1996).
- Eine enzymatische Deaktivierung des Zytostatikums und Elimination aus der Zelle (z.B. Glutathion-S-Transferasen) (Ishikawa & Ali-Osman, 1993; Ishikawa et al, 1994).
- Quantitative und qualitative Veränderungen der Zielstrukturen. Es können z.B. Zielmoleküle gebildet werden, die zwischen einer physiologischen Substanz und dem Antimetaboliten unterscheiden können. Eine andere Ursache für die Resistenz kann eine vermehrte Produktion des Zielmoleküls darstellen.
- Verstärkte DNA Reparatur (Masuda et al., 1988; Martin, 2001)
- Das Vorkommen zusätzliche Biosynthesewege, auf die das Zytostatikum keinen Einfluss hat.

*Nach Mutschler Arzneimittelwirkungen (1997)*

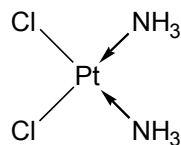
In jüngster Zeit wurde die Rolle Apoptose auslösender Mechanismen (z.B. Caspasen) und die Aktivierung zellulärer Überlebensfaktoren (z.B. NFκB) in der Tumor- und Resistenzentwicklung immer deutlicher. Durch eine verhinderte Apoptose, wie z.B. bei Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, kann der Organismus, die Fähigkeit zur Reaktion auf ein unkontrolliertes Zellwachstum innerhalb der Zelle verlieren, aber auch Chemotherapeutika weniger wirksam werden (Fadeel et al., 1999; Kong et al., 2000; Grossmann & Altieri, 2001; Zörnig et al. 2001). Dazu jedoch mehr in den folgenden Kapiteln.

### **3.2 Das Zytostatikum Cisplatin (CDDP)**

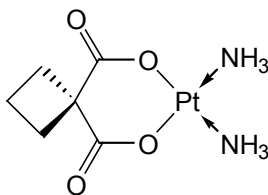
Cisplatin, auch CDDP für cis-Diamin(dichloro)platin (II) genannt, ist ein Chemotherapeutikum und gehört zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika. Cisplatin diffundiert als neutrales Molekül passiv durch die Zellmembran und wird dort durch Hydrolyse gespalten. Die dabei entstehenden kationischen Komplexe können mit der negativ



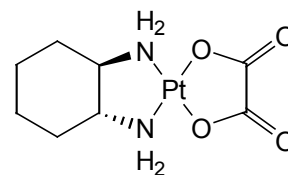
geladenen DNA Bindungen eingehen, was überwiegend zu einer Verbindung zweier Nukleotide eines DNA-Stranges (*intrastrand cross-link*-Bindungen) führt (Eastman, 1983). Hierdurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der Zellteilung (Pinto & Lippard, 1985). Bevorzugter Angriffspunkt des Cisplatin ist hierbei die N-7 Position des Guanins (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985). Bereits vier Stunden nach dem Anlagern von Cisplatin an die DNA, ist jedoch ein Grossteil des Cisplatin im Zellkern nicht mehr nachzuweisen (Molenaar *et al.*, 2000). Indikationen für Cisplatin sind vor allem Gewebe mit einer hohen Zellteilungsrate, wie zum Beispiel Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Prostata-, Hoden-, Blasen-, Bronchial- und Plattenepithelkarzinome, desweiteren Karzinome im Hals- und Kopfbereich sowie Sarkome und Melanome. Allerdings besitzen auch einige gesunde Zellen, wie zum Beispiel Haarfollikelzellen und die blutbildenden Zellen (Myelotoxizität), eine hohe Zellteilungsrate, woraus sich unerwünschte Nebenwirkungen ergeben. Ausserdem zeigt Cisplatin eine hohe Nephro- und Ototoxizität. Cisplatin kann als intravenöse Kurzinfusion, 1 Mal wöchentlich, über einen Zeitraum von drei Wochen mit einer Dosierung von 40-120 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verabreicht werden. Die Behandlung wird je nach klinischem



Cisplatin



Carboplatin



Oxaliplatin

**Abb. 1:** Die Strukturformeln der Zytostatika Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin im Überblick.

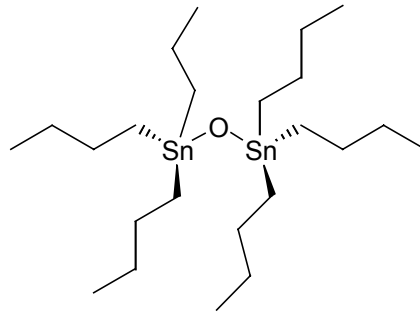
Verlauf nach etwa 4 Wochen wiederholt. Das therapiefreie Intervall wird aufgrund der dosislimitierenden Knochenmarksdepression als schon erwähnte unerwünschte Nebenwirkung des Cisplatin benötigt (Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Kapitel 10). Neben Cisplatin kommen noch weitere Platinderivate zum klinischen Einsatz. Carboplatin, bei dem die Chloridionen des Cisplatin durch einen Cyclobutan-dicarboxylat-Rest ersetzt

wurden und Oxaliplatin. Bei Oxaliplatin wird das zentrale Platinatom von einer Oxalsäure und einen 1,2-Diaminocyclohexankomplex gebunden.

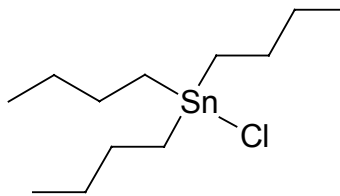
### 3.3 Die umwelt-toxische Verbindung Tributylzinn (TBT)

Tributylzinn ist eine zinnorganische Verbindung und gehört zu den giftigsten anthropogen hergestellten Stoffen (WHO, 1980). Es wird unter anderem als Stabilisator von Kunststoffen oder als Biozid in Holzschutzfarben verwendet. Hauptsächlich wird TBT jedoch in Schiffsanstrichen, sogenannten *Antifoulingfarben*, gegen einen Bewuchs mit Seepocken, Algen oder Muscheln verwendet (Boyer 1989; Fent 1996). Ein Bewuchs des Schiffsrumpfes mit Organismen erhöht drastisch den Wasserwiderstand, was wiederum die Transportkosten in die Höhe treibt. Dem Einsatz von TBT in Schiffsanstrichen kommt somit eine hohe wirtschaftliche Bedeutung zu. Die jährliche Produktion an Organozinn-Verbindungen ist seit den 50er Jahren von 500 Tonnen auf über 50000 Tonnen 1986 angestiegen (Snoeij *et al.*, 1987). Auswirkungen durch diesen massiven Einsatz von TBT, wurde besonders an Lebewesen im aquatischen Ökosystem beobachtet. Hier zeigten sich zum Beispiel Veränderungen des Hormonsystems bei Vorderkiemern (Prosobranchia) durch TBT, was bei diesen normalerweise getrenntgeschlechtlichen Tieren eine Vermännlichung, also die Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane bei weiblichen Schnecken zur Folge hatte. Dieser sogenannte Imposex führte zu einer Unfruchtbarkeit der Tiere und somit zum Aussterben von ganzen Populationen (Bryan *et al.*, 1986). Auf zellulärer Ebene führt TBT unter anderem zu einer Modifikation des Zytoskeletts (Chow & Orrenius, 1994), einer Störung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (Chow *et al.*, 1992; Ade *et al.*, 1996), einem Abbruch der Proteinsynthese, sowie funktionalen Störungen von Mitochondrien (Aldridge & Street, 1970; Snoeij *et al.*, 1986). Es konnte in Zellkulturen eine dosisabhängige Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) oder von Nekrose bei höheren TBT-Konzentrationen nachgewiesen werden (Zaucke *et al.*, 1998).

TBT liegt in fester Form wie z.B. in Schiffsanstrichen als Bis(tributylzinn)oxid vor. Gelangt es ins Meer, wird das Sauerstoffatom durch ein Chlorid ersetzt, und TBT wird zum Tributylzinnchlorid. Auf Grund der hohen Toxizität von TBT und den damit verbundenen Nebenwirkungen auf das ökologische System, hat sich die Internationale Meeresschutzorganisation (IMO) ein globales Verbot von TBT-haltigen Schiffsanstrichen für 2003 zum Ziel gemacht.



Bis(tributylzinn)oxid



Tributylzinnchlorid

**Abb. 2:** Strukturformeln von Bis(tributylzinn)oxid und Tributylzinnchlorid

### 3.4 Signaltransduktionswege

Damit Zellen auf Reize ihrer Umwelt reagieren können, müssen sie diese Reize erkennen und zur Weiterverarbeitung ins Zellinnere weiterleiten. Zum Erkennen der häufig chemischen Reize dienen hierbei meist Rezeptoren. Diese aktivieren eine Signalkette, die oft bis zum Zellkern reicht, was als Signaltransduktion bezeichnet wird und zur Expression von spezifischen Genen führen kann. Neben der Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch Rezeptoren, können diese auch unabhängig davon zum Beispiel durch Strahlung (UV-Strahlung), alkylierende Zytostatika (Cisplatin), Hitzeschock, Hyperosmolarität oder oxidativen Stress initiiert werden. Signaltransduktionswege beeinflussen die Bildung von überlebensnotwendigen Transkriptionsfaktoren oder führen zum gezielten Zelltod (Kong *et al.*, 2000).

### 3.4.1 Rezeptoren

Rezeptoren dienen der Signalerkennung durch Wechselwirkung mit einem Liganden und Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes. Dadurch kommt es häufig zu einer Signalweiterleitung (Signaltransduktion) und somit zur Auslösung eines Effekts. Rezeptoren sind oft Transmembranproteine, die sich in der Doppellipid-Membran der Zellen befinden, mit einer Bindungsstelle auf der extrazellulären Seite, an welche ein Ligand binden kann. Diese Bindung des Liganden führt zu einer Veränderung des Rezeptor-Proteins und überträgt sich bis zur cytoplasmatischen Seite der Membran. Dieser Vorgang führt dann wiederum zu Veränderungen im Inneren der Zelle, die so durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen auf den auf sie ausgeübten Reiz reagiert. Es lassen sich fünf pharmakologisch interessante Rezeptorarten unterscheiden:

#### 3.4.1.1 Übersicht membranständiger und intrazellulärer Rezeptoren

##### 3.4.1.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gehören zu einer großen Gruppe von transmembranären Proteinen, die an verschiedensten Signalübertragungswegen beteiligt sind (Strader *et al.*, 1994 und 1995). Kommt es zur Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Region des Rezeptors, so löst dies eine Konformationsänderung am Rezeptor aus. Aus dieser Konformationsänderung resultiert auf der intrazellulären Seite die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins. Nach der Dissoziation in die  $\alpha$ - bzw.  $\beta\gamma$ -Untereinheit werden die in der Zelle liegenden Effektorproteine aktiviert (Strader *et al.*, 1994).

Alle GPCR bestehen aus sieben hydrophoben,  $\alpha$ -helicalen Transmembrandomänen mit einer Länge von jeweils 25-30 Aminosäuren. Intrazellulär wie auch extrazellulär werden diese sieben Domänen mit je drei hydrophilen Schleifen alternierend miteinander verbunden (Strader *et al.*, 1994). Für die Bindung großer Liganden, wie z.B. Peptide, spielen Bereiche der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, des extrazellulären Aminoterminus und der extrazellulären Transmembrandomänen eine wichtige Rolle. Kleinere Ligandenmoleküle, wie z.B. biogene Amine, binden an Aminosäurereste innerhalb der sogenannten „Tasche“. Als

---

solche wird der extrazelluläre Bereich innerhalb der sieben ringförmig angeordneten Transmembrandomänen bezeichnet (Strader *et al.*, 1995).

Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung der Transmembrandomänen zueinander, was eine intrazelluläre Oberflächenänderung des GPCRs zur Folge hat. Dadurch werden einige Aminosäureabschnitte exponiert, die mit dem G-Protein interagieren und letztlich die Bildung eines ternären Ligand-GPCR-G-Protein Komplexes bewirken (Gilman, 1987; Strader *et al.*, 1994 & 1995; Wess, 1997).

Bei langandauernder Stimulierung durch einen Liganden kommt es zur Inaktivierung des GPCRs durch Desensibilisierung (Watson und Arkinstall, 1994; Freedman und Lefkowitz, 1996).

#### **3.4.1.1.2 Ligand-gesteuerter Ionenkanal**

Bei diesem Rezeptortyp führt eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Öffnungswahrscheinlichkeit bzw. Öffnungsdauer eines Ionenkanals. Als Folge davon kommt es zu einem verringerten oder verstärktem Austausch an kanalspezifischen Ionen. Als Beispiel kann hier der nicotinsche Acetylcholin-Rezeptor der motorischen Endplatte genannt werden. Der Rezeptorkomplex besteht aus 5 Protein-Untereinheiten, die ihrerseits selbst jeweils vier transmembrane Domänen enthalten. Kommt es beim Acetylcholin-Rezeptor zur gleichzeitigen Bindung zweier Acetylcholin-Moleküle an die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten, so bewirkt dies eine Öffnung des Ionenkanals, was den Einstrom von  $\text{Na}^+$  und den Austritt von  $\text{K}^+$  zur Folge hat. Dadurch kommt es zur Membrandepolarisation und Auslösung eines Aktionspotentials (Barnard, 1992; Lüllmann *et al.*, Taschenatlas der Pharmakologie, Seite 64-65).

#### **3.4.1.1.3 Katalytische Rezeptoren**

Dieser Rezeptortyp besitzt in seiner Cytosoldomäne eine Proteinkinase. Bei diesen Rezeptoren kommt es nach Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes zur Autophosphorylierung an der intrazellulären cytoplasmatischen Phosphorylierungsdomäne. Die Kinaserezeptoren besitzen in der Regel Tyrosinkinasen, es kommen jedoch auch einige

Serin- und Threoninkinasen vor. Dies zieht eine Phosphorylierung intrazellulärer an der Signalübertragung beteiligter Proteine nach sich (siehe auch MAP-Kinasen), die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen können. Zu diesem Rezeptortyp gehören zum Beispiel Rezeptoren für Hormone, wie der für epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) oder für das Insulin (Lüllmann *et al.*, Taschenatlas der Pharmakologie, Seite 64-65).

#### **3.4.1.1.4 Adaptorprotein-gekoppelte Rezeptoren**

Diese Rezeptoren besitzen keine Phosphatase- oder katalytische Kinaseaktivität. Kommt es zur Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes wird hierdurch vermutlich eine Aggregation von Rezeptormolekülen bewirkt. Durch diese Aggregation wird eine Signalweiterleitung über Adaptorproteine ausgelöst, die nun an eine cytosolische Domäne des Rezeptors binden können. Ein solches Bindeprotein ist zum Beispiel FADD (*Fas Associated Death Domain*) beim Fas-Rezeptor, einem Apoptose auslösenden Todesrezeptor (Walczak & Krammer, 2000). Hierdurch können Caspasen aber auch Kinasen aktiviert werden, die Veränderungen in der Zelle wie z.B. die DNA-Fragmentierung bewirken (Yang *et al.*, 1997). Zu diesem Rezeptortyp gehören auch die sogenannten Todesrezeptoren, die später noch intensiver erläutert werden.

#### **3.4.1.1.5 Intrazelluläre Rezeptoren:**

Für hydrophobe Signalstoffe wie zum Beispiel Steroide stellt die Zellmembran kein Hindernis dar. Sie können die Zellmembran passieren und an spezifische cytoplasmatische Rezeptoren binden. Zu den intrazellulären Rezeptoren gehören die Steroidhormon-Rezeptoren (z.B. Glucocorticoid-, Mineralocorticoid-, Androgen-, Oestrogen-, Gestagen- und Vitamin-D-Rezeptoren), die Retinoid-Rezeptoren und die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren. Freie intrazelluläre Rezeptoren verteilen sich häufig gleichmässig über das Cytoplasma und den Zellkern. Bindet jedoch ein Hormon an den Rezeptor, so geht dieser in eine aktive Form über. Dies erhöht seine unspezifische Affinität zur DNA auf das Zehnfache. Diesen Hormon-Rezeptor-Komplex findet man immer im Kern. Der aktivierte Rezeptor erkennt nun eine bestimmte Consensussequenz und lagert sich am zugehörigen *Enhancer* an, wodurch der

---

entsprechende Promotor aktiviert wird und die Transkription einsetzt (Lewin, Molekularbiologie der Gene, Kapitel 29).

### 3.4.1.2 Todesrezeptoren

Todesrezeptoren gehören zur Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren (TNF-R) / Nerven-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (NGF-R = *Nerve Growth Factor Receptor*). Zu dieser ständig wachsenden Rezeptor-Familie gehören unter anderem TNF-R1 (P55/CD120a), TNF-R2 (75), TNF-R3 (TNF-RP), LT- $\alpha$ R, Ox40, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB, p75 NGF-R, GIT-R, Rank, TRAMP (DR3 /WSL1/LARD/APO-3), Fas (CD95/APO-1), TRAIL-R1 (DR4/APO-2), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2), TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) (Sartorius *et al.*, 2001; Zörnig *et al.*, 2001). Mitglieder dieser Familie sind sogenannte Typ 1 Membranproteine, d.h. sie durchspannen die Zellmembran nur einmal, der N-Terminus befindet sich auf der Aussenseite und der C-Terminus im Cytosol. Sie zeichnen sich durch Homologien ihrer zwei bis fünf Cystein-reichen extrazellulären Domänen aus (Walczak & Krammer, 2000). Ein funktioneller Rezeptor dieser Superfamilie bildet typischerweise ein trimeren oder multimeren Komplex und wird von Disulfid-Brücken stabilisiert. Allerdings existieren neben den transmembranen Rezeptoren auch einige löslichen Formen. Diese Rezeptoren sind durch unterschiedliches *Splicing* entstanden, bei denen der transmembrane Teil durch das *Splicing* entfernt wurde. Als solcher von der Membran losgelöster Rezeptor kommen zum Beispiel der Fas-, TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptor vor (Hughes & Crispe, 1995; Papoff *et al.*, 1999; Sartorius *et al.*, 2001).

Eine Untergruppe dieser Rezeptorfamilie sind die sogenannten Todesrezeptoren. Die aktivierenden Todesrezeptoren besitzen auf der intrazellulären Seite eine Todesdomäne (DD = *Death Domain*), durch welche die Zelle zur Apoptose veranlasst werden kann. Hierzu gehören die Rezeptoren TNF-R1, Fas, TRAMP, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Sartorius *et al.*, 2001).

Allerdings gibt es innerhalb dieser Familie auch Rezeptoren, die diese Todesdomäne verloren haben, wie die Rezeptoren TNF-R2, TRAIL-R3 und TRAIL-R4 (Budd, 2002, Ashkenazi & Dixit, 1999, Sartorius *et al.*, 2001). TRAIL-R3 und TRAIL-R4 gehören zu den sogenannten *Decoy*-Rezeptoren (engl. *Decoy* = Falle). Diese Rezeptoren konkurrieren um Liganden, die eine TRAIL-induzierte Apoptose auslösen können. Somit wird vermutet, dass auf diesem

Weg eine Resistenz gegen die TRAIL induzierte Apoptose erreicht wird, was jedoch bisher noch nicht bewiesen werden konnte (Ashkenazi & Dixit, 1999; Leverkus *et al.*, 2000).

### Fas-Rezeptor (CD95/APO-1)

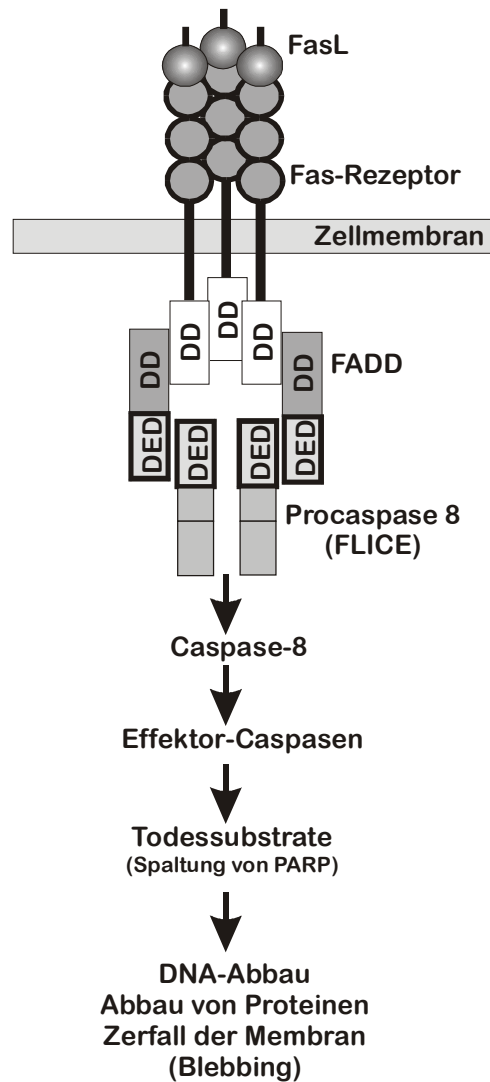
Fas ist ein häufig vorkommendes glykolysiertes Zelloberflächen-Protein mit einer Grösse von etwa 45 bis 52 kDa (335 Aminosäuren). Es handelt sich dabei um einen Typ 1 Transmembranrezeptor.

Kommt es zur Bindung des Liganden (FasL), so führt dies zu einer Oligomerisierung des Rezeptors. Als Monomer oder Dimer ist Fas nicht in der Lage Apoptose auszulösen. Es zeigte sich, dass eine Trimerisierung des Rezeptors für eine Auslösung der Apoptose am wahrscheinlichsten ist (Chan *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2000; Banner *et al.*, 1993). Der Fas-Rezeptor beinhaltet keinerlei katalytische Kinase oder Phosphatasemotive, sondern die Signalweiterleitung findet über Adaptorproteine statt. Hierzu hat Fas eine 80 Aminosäuren intrazelluläre Bindedomäne, die als Todesdomäne (DD = *Death Domain*) bezeichnet wird (Itoh *et al.*, 1993). An diese Todesdomäne bindet FADD (*Fas-Associated Death Domain*). FADD selber hat eine Todes Effektor Domäne (DED = *Death Effector Domain*), an die eine analoge Region der Procaspase-8 (FLICE) bindet. Dieser entstandene Komplex wird nun als DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) bezeichnet (Kischkel *et al.*, 1995). Mit diesem DISC kommt es nun zur proteolytischen Autoaktivierung von Caspase-8, womit nun zwei unterschiedliche Kaskaden von Caspasen aktiviert werden können, die letztendlich zur Apoptose führen (Scaffidi *et al.*, 1998). Durch aktive Caspasen werden zum Beispiel Todessubstrate wie Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) oder Lamine abgebaut (Nagata, 1997; Gupta, 2001). Caspasen werden später unter 1.4.2 noch genauer erläutert.

Zwei unterschiedliche Fas-vermittelte Signalantworten:

Bei Untersuchungen zur Fas-vermittelten Apoptose in verschiedenen Zelltypen musste festgestellt werden, dass es hierbei zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege gibt. Es wird daher nach Zellen vom Typ 1 und Typ 2 unterschieden (Scaffidi *et al.*, 1998). In Typ 1 Zellen folgt nach Einleitung der Apoptose eine starke Aktivierung der Caspase-8 durch den DISC-Komplex. Danach erfolgt ziemlich schnell ein Schneiden und somit die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (lange bevor ein Abfall des Membranpotentials der Mitochondrien beobachtet werden kann), was letztendlich zur Apoptose führt.





**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Fas-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweges. Verwendete Abkürzungen: FasL (Fas-Ligand); DD (*Death Domain*); FADD (*Fas-Associated Death Domain*); DED (*Death Effector Domain*); FLICE (*FADD-like ICE*); PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase).

In Typ 2 Zellen dagegen läuft der Apoptose-auslösende Signalweg über die Mitochondrien. Dieser Weg stellte sich als sehr wichtig in der Auslösung von Apoptose durch Chemotherapeutika heraus (Gross *et al.*, 1999). Bei diesen Typ 2 Zellen ist die Bildung des DISC-Komplexes stark reduziert und die Aktivierung von Caspasen geschieht im Anschluss an einen Abfall des Membranpotentials der Mitochondrien. Daher sind in diesem Zelltyp die Mitochondrien für die Signalweiterleitung verantwortlich. Die Aktivierung der Mitochondrien geschieht über Bid (*BH3-Interacting Domain Death Agonist*), einem pro-apoptischen BH 3 *only*/Bcl-2 Familienmitglied. Bid wird durch die Caspase-8 geschnitten, die in geringer Menge vom DISC aktiviert wurde. Das verkleinerte Bid wandert zu den Mitochondrien und

bewirkt dort neben dem Abfall des Membranpotentials unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C. Das freigesetzte Cytochrom C bindet an Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) und löst eine Oligomerisierung von Apaf-1 aus. Aus diesem Komplex bildet sich durch das Anbinden der Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom, wofür ATP notwendig ist. Die Procaspase-9 wird dann autokatalytisch geschnitten und aktiviert ihrerseits durch schneiden der Procaspase-3 die Caspase-3. Hierdurch wird ein Schneiden der Todessubstrate herbeigeführt (z.B. PARP und Lamin), wodurch es zur Apoptose kommt (Nagata, 1997; Scaffidi *et al.*, 1998; Gupta, 2001; Sartorius *et al.*, 2001).

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in beiden Zelltypen eine gleichmäßige Aktivierung der Mitochondrien stattfindet, nachdem diese durch FasL stimuliert wurden. In beiden Zelltypen konnte durch eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 die apoptotischen Eigenschaften der Mitochondrien blockiert werden. Allerdings nur in Typ 2 Zellen und nicht in Typ 1 Zellen inhibierte eine Bcl-2 Überexpression die Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-3 genauso wie die Apoptose (Matzke *et al.*, 2001; Sartorius *et al.*, 2001).

#### TNF-Rezeptoren (*Tumor Necrosis Factor-Receptors*)

TNF ist ein Zytokin das überwiegend von Makrophagen sowie T-Zellen produziert wird und an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten beteiligt ist, zu denen auch inflammatorische Prozesse gehören. Es stimuliert die Proliferation, die Differenzierung und leitet die Apoptose ein. TNF übermittelt seine biologische Funktion mit Hilfe zweier bisher bekannter Rezeptoren, den Rezeptoren TNF-R1 (P55/CD120a) und TNF-R2 (P75). Beide Rezeptoren zeigen signifikante Homologien ihrer extrazellulären Domänen, jedoch unterscheiden sie sich bedeutend in ihrer intrazellulären Domäne, da TNF-R2 keine Todesdomäne (DD) hat (Gupta, 2001). TNF-R1 scheint der wichtigere der beiden Rezeptoren zu sein und TNF-R2 eine unterstützende Hilfsfunktion für TNF-R1 zu haben, indem es die Menge an TNF für den TNF-R1 Rezeptor reguliert (Tartaglia *et al.*, 1993). Obwohl beide Rezeptoren eine Antwort auf eine entzündliche Reaktion verstärken und sich beide die Fähigkeit teilen, den pleiotrophen Transkriptions-Faktor NFκB zu aktivieren, kann nur TNF-R1 alleine eindeutig Apoptose vermitteln. TNF-R2 dagegen steuert überwiegend das Überleben der Zelle, auch wenn berichtet wurde, dass TNF-R2 Apoptose vermitteln könnte (Pimentel-Muinos & Seed, 1999). TNF-Rezeptoren besitzen keinerlei enzymatische Aktivität. Daher müssen sie, um Signal weiterleiten zu können, andere Moleküle dafür rekrutieren.

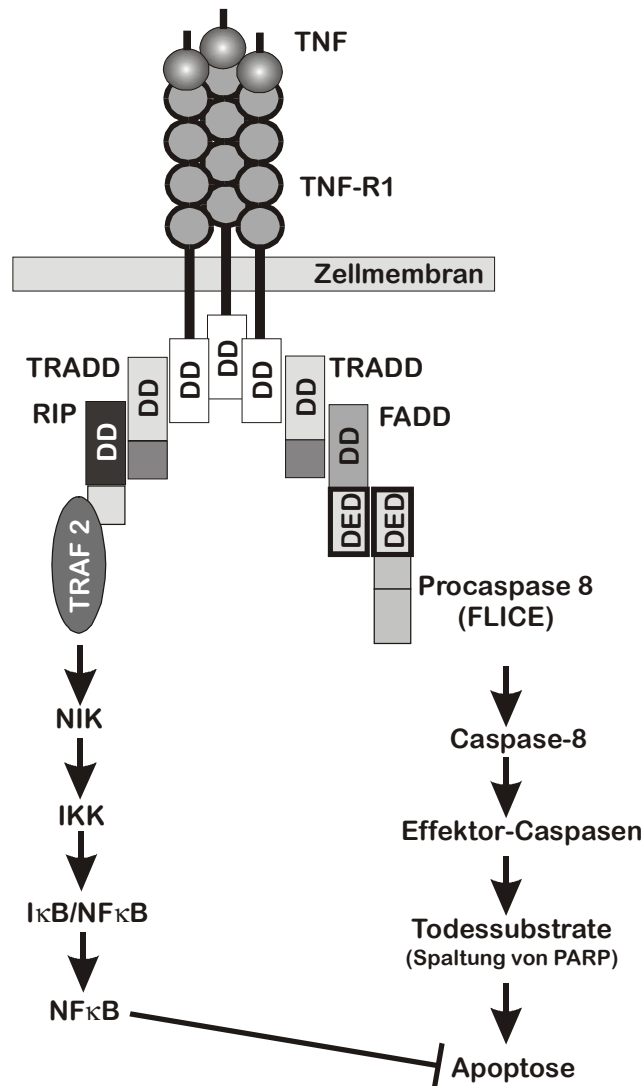
---

Bindet TNF an TNF-R1, so zieht dies eine Trimersation des Rezeptors und die Vereinigung der Todesdomänen nach sich (Banner *et al.*, 1993). Im Anschluss erfolgt das Binden von TRADD (*TNF-R Associated Death Domain*). TRADD dient als Andockstelle für eine Reihe weiterer Adaptor-Moleküle wie FADD (*Fas-Associated Death Domain*), TRAF-2 (*TNF-R Associated Factor-2*) und RIP (*Receptor Interactive Protein*). RIP führt zu einer Aktivierung von NFκB (Nuklärer Faktor κB), wohingegen FADD den Apoptose-auslösenden Signalweg über Caspasen vermittelt. TRAF-2 und RIP aktiviert die NFκB-induzierende Kinase (NIK). Diese aktiviert den Inhibitor der IκB Kinase (IKK). IKK phosphoryliert IκB (Inhibitor κB) und führt somit zu dessen Abtrennung und Freisetzung von NFκB, dass daraufhin in den Zellkern wandert und eine Reihe von Genen aktiviert (Gupta, 2001).

In menschlichen T-Zellen wird RIP für einen TNF-R2 induzierten Zelltod benötigt und nicht für die Aktivierung von NFκB. In ruhenden oder aktivierten T-Zellen, die nicht Interleukin 2 (IL-2) ausgesetzt waren, aktiviert TNF NFκB durch TNF-R2 und einen TRAF-2 abhängigen Signalweg. Allerdings, in aktivierten T-Zellen, die mit IL-2 behandelt wurden, wurde RIP induziert, und es wird angenommen, dass somit eine Verbindung des TNF-R2-TRAF-2 Komplex zu FADD geschaffen wird (Gupta, 2001).

In vielen Untersuchungen über NFκB konnte gezeigt werden, dass NFκB eine anti-apoptotischen Wirkung haben kann. Zum Beispiel waren Fibroblasten und Makrophagen von NFκB defizienten Mäusen empfänglich für eine TNF induzierte Apoptose, wohingegen Fibroblasten und Makrophagen von normalen Mäusen resistent gegenüber Apoptose waren (Beg & Baltimore, 1996). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass durch das Einbringen einer Mutante von IκB, wodurch NFκB im Cytoplasma gehalten wurde, Zellen sensitiv für eine TNF induzierte Apoptose wurden (Wang *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996). All diese Studien zeigen die anti-apoptotischen Eigenschaften von NFκB. Allerdings konnten auch pro-apoptotische Eigenschaften von NFκB nachgewiesen werden. Zum Beispiel wurde durch NFκB die Menge an Fas-Ligand (FasL) hochreguliert und so eine Fas vermittelte Apoptose gefördert (Kasibhatla *et al.*, 1999).

Eine Stimulierung von TNF-R1 durch TNF kann mindestens zwei Signalwege innerhalb einer Zelle aktivieren. Der eine Weg führt zur Apoptose, während der andere zum Überleben der Zelle beiträgt. Wenn beide Wege aktiv sind, so führt dies zur Zellteilung und trägt dem Überleben bei. Verschiebt sich aber dieses Gleichgewicht, so wird die Zelle letztendlich zu Grunde gehen. Jedoch sind die Mechanismen, die eine Verschiebung dieses Gleichgewichts bewirken, bisher noch größtenteils unbekannt (Heyninck & Beyaert, 2001).

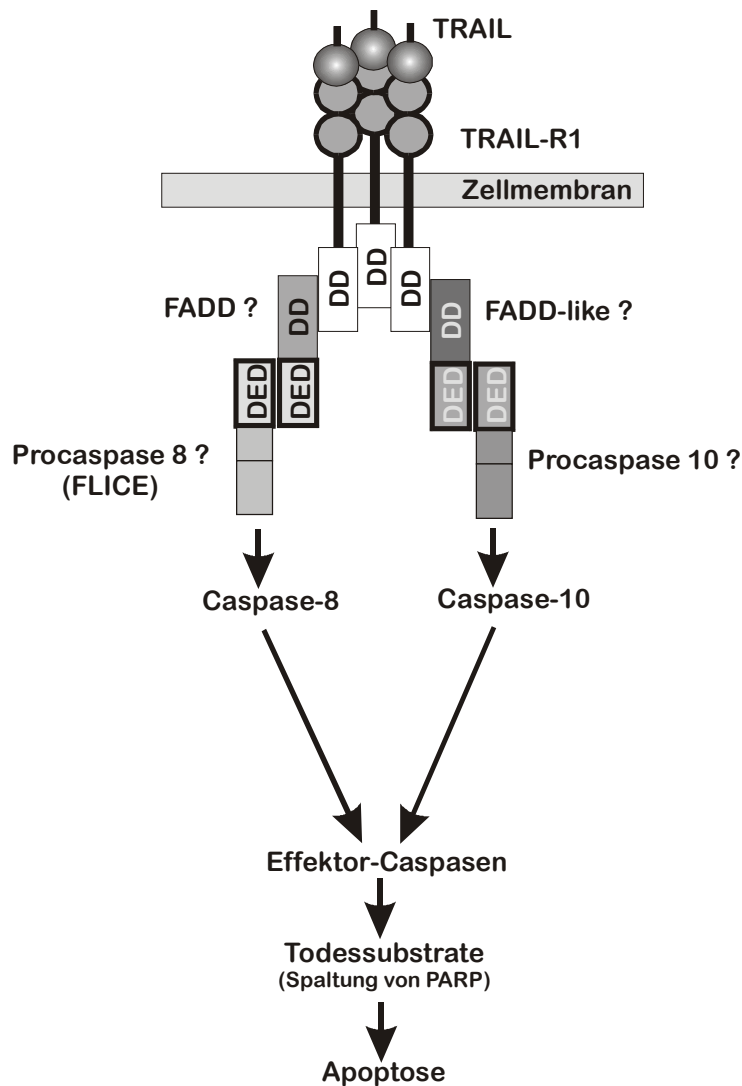


**Abb. 4:** Schematische Darstellung der TNF-R1 vermittelten Signaltransduktionswege. Verwendete Abkürzungen: FasL (Fas-Ligand); DD (*Death Domain*); TRADD (*TNF-R Associated Death Domain*); FADD (*Fas-Associated Death Domain*); RIP (*Receptor Interactive Protein*); DED (*Death Effector Domain*); FLICE (*FADD-like ICE*); TRAF2 (*TNF-R Associated Factor-2*); NIK (NFκB-induzierende Kinase); IKK (IκB Kinase); IκB (Inhibitor κB); NFκB (Nuklärer Faktor κB); PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase).

## TRAIL-Rezeptoren

TRAIL-Rezeptoren (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Receptors*) sind eine relativ neue Unterfamilie der TNF-Rezeptoren. Es werden vier TRAIL-Rezeptoren unterschieden: TRAIL-R1 (DR4/APO-2), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2), sowie TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2). Nur bei den Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 handelt es sich um Todesrezeptoren. Die Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 werden

als *Decoy*-Rezeptoren bezeichnet (engl. *Decoy* = Falle), da sie Teile ihrer Todesdomäne verloren haben und somit nicht mehr in der Lage sind, ein durch TRAIL vermitteltes Signal zur Apoptose weiter zu vermitteln. Stattdessen führt eine Überexpression dieser Decoy-Rezeptoren zu einer Resistenz gegenüber einer TRAIL vermittelten Apoptose durch ein „wegfangen“ der Liganden (Ashkenazi & Dixit, 1999).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der TRAIL-R1 vermittelten Signaltransduktionswege. Verwendete Abkürzungen: FasL (Fas-Ligand); DD (*Death Domain*); FADD (*Fas-Associated Death Domain*); DED (*Death Effector Domain*); FLICE (*FADD-like ICE*); PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase).

Bei der TRAIL vermittelten Apoptose-Signalweiterleitung durch die Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 scheint es zwei mögliche Wege zu geben. Der eine Signalweg entspricht dem von Fas (siehe Fas-Rezeptor). Bei dem zweiten möglichen Weg bindet FADD oder ein FADD ähnliches Molekül (FADD-like) an die DD des Rezeptors. Die DED von FADD bindet nun

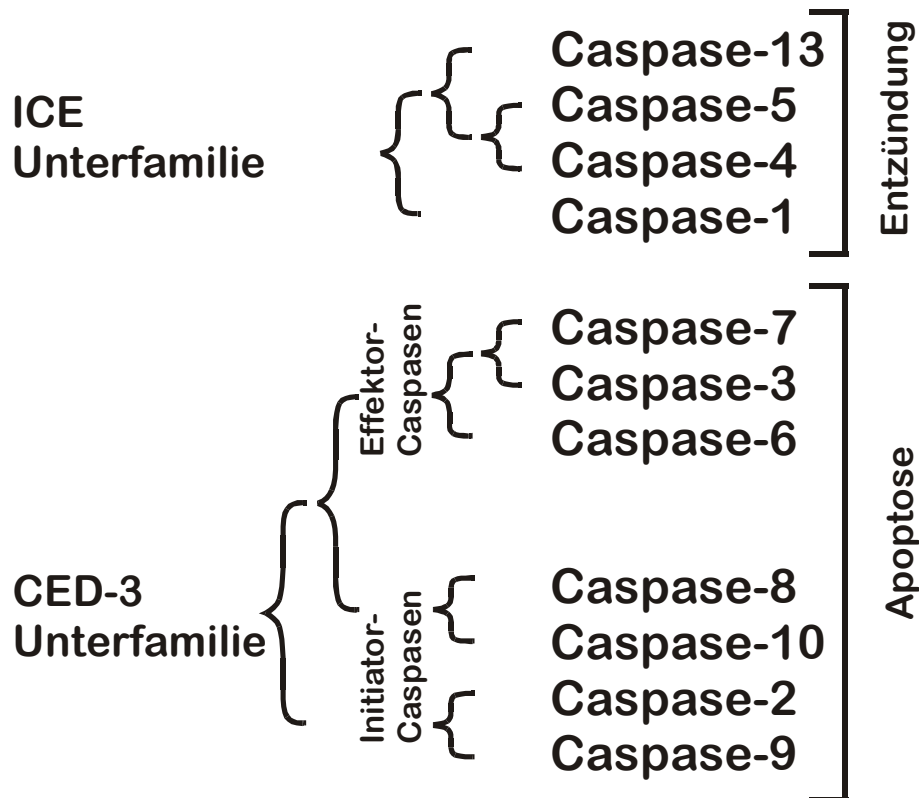
jedoch an die Procaspase-10 und bildet mit ihr ebenfalls einen DISC aus. Über die proteolytische Autoaktivierung von Caspase-10 können nun ebenfalls Effektor-Caspasen wie z.B. die Caspase-3 aktiviert werden und dadurch zur Apoptose führen. Ob der eine oder der andere Weg eingeschlagen wird, ist Zelltyp abhängig. Während in einigen Zellen nur einer der beiden Wege vorkommt, ergänzen sich in anderen Zellen beide zu einer gemeinsamen Signalweiterleitung (Kischkel *et al.*, 2001).

### 3.4.2 Caspasen

Die Cystein Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen: „C“ steht für Cystein und „aspase“ für Aspartat-schneidend), scheinen die wesentlichen Effektoren des programmierten Zelltodes zu sein. Sie stellen die Hauptkomponenten einer kaskadenartig wirkenden Todesmaschinerie dar und treiben die Zelle irreversibel in den Tod. Ein Nachweis über die Aktivierung von Caspasen stellt somit ein wichtiges Merkmal zur Bestimmung von Apoptose dar. Die Aktivierung von Caspasen tritt schon lange vor den morphologischen Veränderungen der Zelle, wie z.B dem *Blebbing*, auf.

Bei der ersten entdeckten Caspase handelt es sich um das „Interleukin-1 $\beta$  *Converting Enzyme*“ (ICE; Caspase-1) welches für den Umbau von Pro-Interleukin in seine aktive Form verantwortlich ist und bei Entzündungen eine Rolle spielt. Ungefähr zur gleichen Zeit wurde im Nematoden *Caenorhabditis elegans* ein genetischer Signalweg für den Zelltod beschrieben (Ellis *et al.*, 1991). Eines der Gene, die hierbei entdeckt wurden, war das *ced-3* Gen, welches ein Protein codiert, das essentiell für den programmierten Zelltod war. Als *ced-3* sequenziert wurde, stellte es sich als homolog zu dem in Säugern gefundenen ICE heraus (Miura *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 1996). Obwohl die Caspase-1 offensichtlich keine Rolle im Zusammenhang mit dem Zelltod spielt, wurde sie als erstes Mitglied einer Familie von Proteasen identifiziert, die unterschiedliche Rollen bei Entzündungen und dem Zelltod spielen (Zimmermann *et al.*, 2001).

Bisher wurden bei Säugern 14 unterschiedliche Caspasen entdeckt, wobei hiervon 11 Caspasen für den Menschen von Bedeutung zu sein scheinen. Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass sich diese Genfamilie in zwei Unterfamilien unterteilen lässt: Die Caspasen der ICE-Unterfamilie, die sich für Entzündungen verantwortlich zeigen, sowie die Caspasen der CED-3 Unterfamilie, die mit für den Zelltod verantwortlich sind (Abb. 6).



**Abb. 6:** Die Caspase-Familie und ihre Unterteilungen

Caspasen besitzen große Homologien in ihren Aminosäure-Sequenzen, ihrer Struktur und ihrer Substratspezifität. Alle Caspasen werden inaktiv als Proenzyme synthetisiert und bestehen aus drei Untereinheiten. Erstens der N-terminalen Prodomäne, zweitens einer großen Untereinheit, die ein konserviertes QACXG Motiv mit einem katalytisch aktiven Cystein-Zentrum enthält, und drittens einer kleinen C-terminalen Untereinheit. Zwischen diesen Untereinheiten befinden sich Asp-X Schnittstellen. Caspasen sind höchst spezifische Proteasen, die nur nach Asparaginsäureresten (Asp) schneiden. Caspasen selbst werden durch zwei proteolytische Spaltungen aktiviert. Als erstes kommt es zu einem Schnitt zwischen der großen und der kleinen Untereinheit. Im zweiten Schritt wird dann die Prodomäne abgetrennt. Die aktive Caspase ist ein Tetramer, bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten, wobei die beiden großen Untereinheiten die beiden kleinen flankieren (Walker *et al.*, 1994).

Die Prodomänen der Caspasen variieren in ihrer Länge und Sequenz. Lange Prodomänen sind wichtig für den Beginn einer apoptotischen oder inflammatorischen Signal-Kaskade. Sie beinhalten Sequenz-Motive, die wichtig für Interaktionen mit Aktivatormolekülen sind. Dies ist zum Beispiel die Todes-Effektordomäne (DED) oder die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD). Die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) sind generell „Upstream“ gegenüber

den Apoptose Effektor-Caspasen (Caspase -3, -6, -7) mit kurzen Prodomänen. Caspasen lassen sich auch nach ihrer spezifischen Tetrapeptid-Struktur (P<sub>4</sub>-P<sub>1</sub>), nach der sie ihr Substrat schneiden, in drei Gruppen unterteilen:

Die Gruppe I beinhaltet die Caspasen-1, -4, -5, die spezifisch eine Konsensus-Sequenz bei den Aminosäuren WEHD schneiden und beeinflussen die Reifung bestimmter Zytokine während inflammatorischer Reaktionen. Die Gruppe II bilden die Caspasen-2, -3, -7. Ihre spezifische Konsensus-Sequenz ist DEXD, wobei das X bei den Caspasen-3 und -7 für V (Valin) steht und bei der Caspase-2 für H (Histidin). Diese Caspasen führen hauptsächlich zur Spaltung von Todessubstraten (Sequenz DXXD). Die dritte Gruppe (III) bilden die Caspasen-6, -8 und -9. Ihre bevorzugte spezifische Konsensus-Sequenz lautet (I/V/L)EXD, wobei die Caspase-6 VEHD, die Caspase-8 LETD und die Caspase-9 LEHD als Konsensus-Sequenz haben. Sie vermitteln hauptsächlich eine Aktivierung von Gruppe II oder anderer Gruppe III Caspasen.

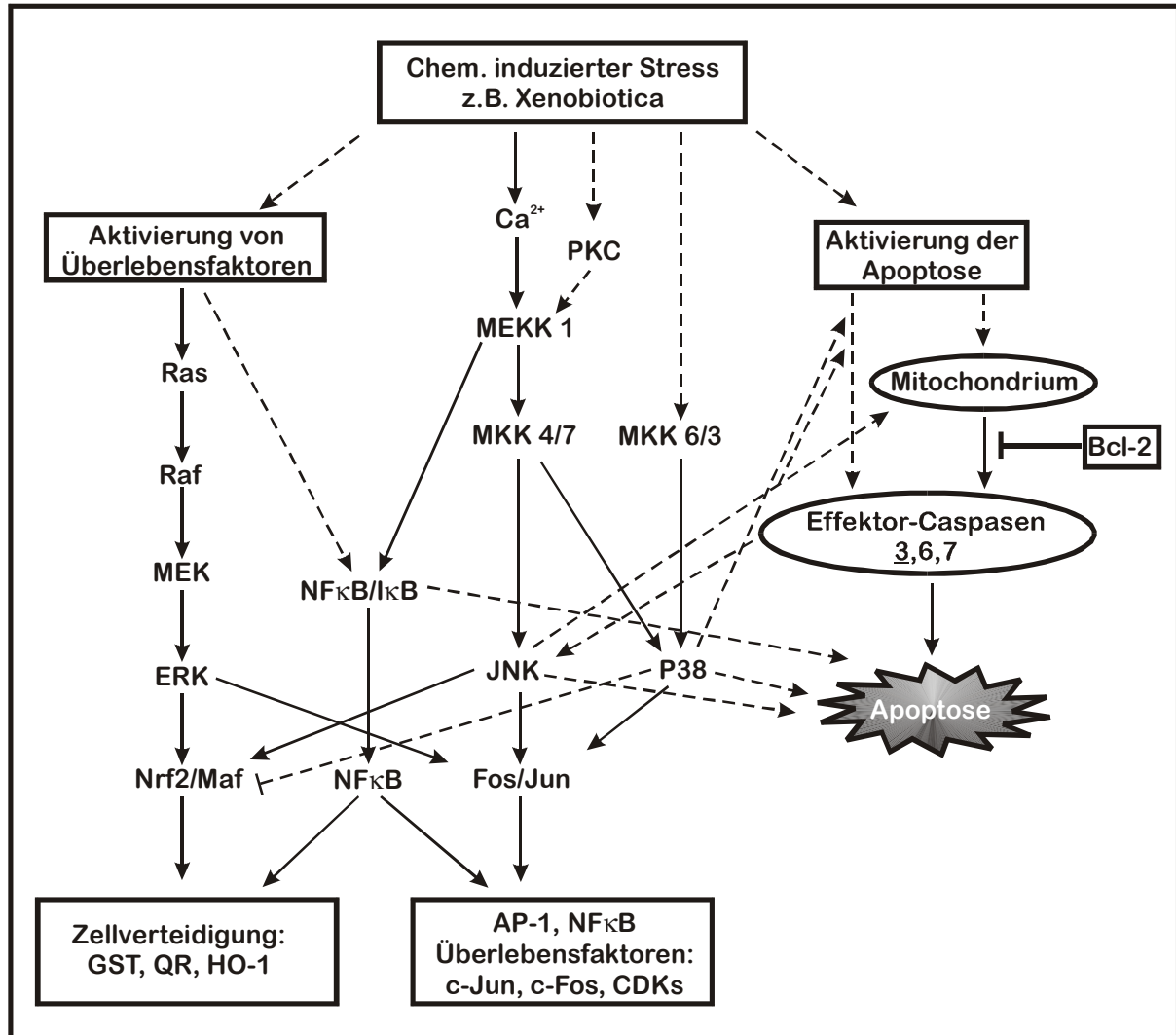
Todessubstrate die durch Effektor-Caspasen geschnitten werden, sind zum Beispiel PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase), die beide zur Reparatur von DNA beitragen. Aber auch zelluläre Strukturproteine wie Aktin (Zytoskelett) und Lamin (Zellkernhülle), oder Regulatoren des Zellzyklus wie das Retinoblastoma Protein (Rb) und die Proteinkinase C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ). In der Summe all dieser Effekte wird ein kontrollierter Zelltod (Apoptose) bewirkt (Nicholson & Thornberry, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001; Stegh & Peter, 2001).

### **3.4.3 MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Protein Kinasen)**

Die MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) stellen eine weitere Möglichkeit innerhalb der Zelle dar, um einen Reiz weiterleiten zu können (Abb.7). Hierzu gehört unter anderem der ERK- (Extrazelluläre Signal regulierte Kinase), der JNK/SAPK- (Jun-N-terminale Kinase/ Stress aktivierte Protein Kinase) und der p38-Kinase-Signalweg. Der Erk-Signalweg wird durch Mitogene, wie Wachstumsfaktoren, oder durch Phorbolster aktiviert. Die Signalwege von JNK/SAPK und p38-Kinase dagegen sind Reaktionen der Zelle auf Stressfaktoren. All diese Signalwege leiten ihre Signale in mehreren Stufen weiter. Dazu werden die einzelnen Signalproteine jeweils durch ihren Vorgänger phosphoryliert und somit aktiviert. Alle MAP-Kinasen (MAPK) werden durch die Phosphorylierung an einem Threonin



(T) und Tyrosin (Y) (Dual-Phosphorylierung) aktiv. Diese beiden Phosphorylierungsstellen sind durch eine spezifische Aminosäure voneinander getrennt, um so bei der Phosphorylierung zwischen den einzelnen MAP-Kinasen unterscheiden zu können. Bei der ERK1/2 handelt es sich um ein T-E-Y (Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin), bei JNK/SAPK um ein T-P-Y (Threonin-Prolin-Tyrosin) und bei der p38-Kinase um ein T-G-Y (Threonin-



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der durch Xenobiotika induzierbaren Signaltransduktionswege (nach Kong *et al.*, 2000). Xenobiotika können einerseits zur Aktivierung von MAP-Kinasen sowie des NFκB-Weges führen, und somit eine mögliche Überlebensantwort der Zelle darstellen. Andererseits können sie aber auch zur Aktivierung von Caspasen, die den Zelltod vermitteln und die Apoptose einleiten beitragen. Glutathion-S-Transferasen (GST), Chinon Reduktase (QR) und Hämoxigenase-1 (HO-1), dienen der Entgiftung der Zelle von chemischen Substanzen wie zum Beispiel Xenobiotika. Über die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Aktivierendes Protein-1) und NFκB (Nukleärer Faktor kappa B) werden Gene aktiviert, die den Zellzyklus (z.B. CDK's: *Cyclin Dependent Kinases*) oder Reaktionen steuern können, die zum Überleben der Zelle wichtig sind (z.B. c-Jun oder c-Fos) (Kong *et al.*, 2000).

Glycin-Tyrosin) Phosphorylierungsmotiv. Nach dieser Doppelphosphorylierung werden Substrate (Transkriptionsfaktoren), wie zum Beispiel c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 oder ATF-2, um einige zu nennen, durch Phosphorylierung an ihren Serin/Threonin Resten, denen immer ein Prolin folgt, aktiviert. Auf diese Weise können Zellen zur Proliferation, zur Differenzierung, zum Zelltod aber auch zum Überleben angeregt werden (Anderson & Tolkovsky, 1999; Widmann *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000).

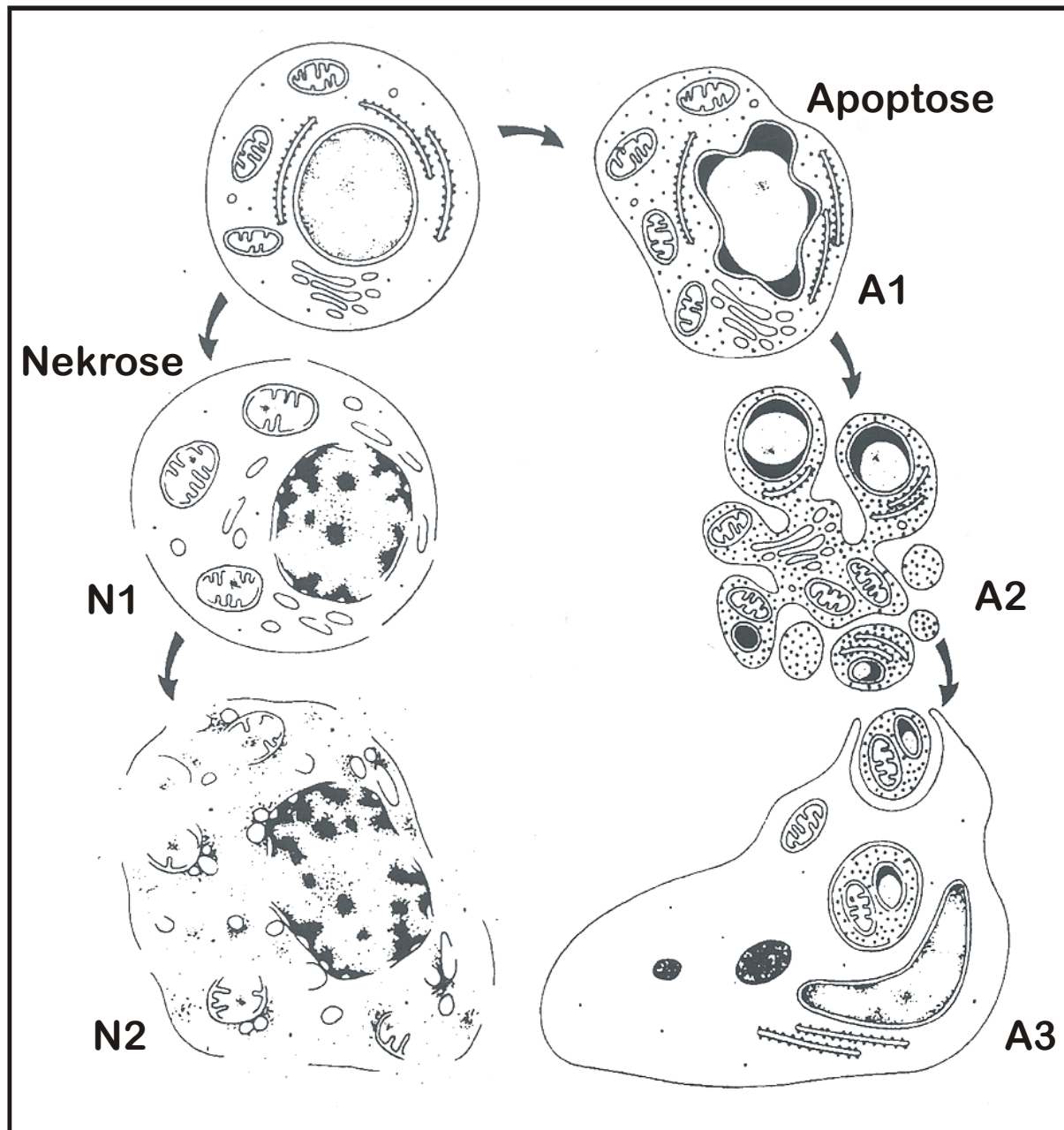
MAP-Kinasen selber werden durch die MAP-Kinase Kinase (MAPKK, MKK oder MEK [MAP/ERK Kinase]), durch die beide Phosphorylierungen katalysiert werden, aktiv. Diese wiederum wird ihrerseits durch die MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK, MKKK oder MEKK) aktiviert, welche vereinfacht durch ein kleines G-Protein, wie zum Beispiel Ras oder Rac, dass mit einem Rezeptor in Verbindung steht (ERK-Signalweg mit EGF- oder PDGF-Rezeptor) oder über äussere Stressfaktoren, wie zum Beispiel UV-Strahlung oder Hitze-Stress (JNK/SAPK- oder p38-Signalweg), aktiviert wurde (Treisman 1996; Kong *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2001).

MAP-Kinasen werden durch inaktivierende Proteinphosphatasen negativ reguliert. Hierzu gehören die Threonin/Tyrosin-spezifischen Phosphatasen, Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen und die Tyrosin-spezifischen Phosphatasen. Diese werden auch als MAP Kinase Phosphatasen (MKP) bezeichnet (Keyse 2000).

### **3.5 Apoptose**

Geschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen werden in einem gesunden Organismus durch gezielten Selbstmord, auch „programmierter Zelltod“ oder Apoptose genannt, vernichtet. Diese sogenannte Apoptose darf nicht mit der Nekrose verwechselt werden, da diese Prozesse sich untereinander morphologisch unterscheiden, verschiedene Ursachen und Folgen für den Organismus haben. Nekrose ist ein meist „passiver“ Zelltod, wohingegen Apoptose „aktiv“ von der Zelle durchgeführt wird. In einigen Fällen kann Nekrose auch durch Todesrezeptoren induziert werden (Los *et al.*, 2002). Zu einer Nekrose kommt es z.B. in Folge von mechanischen Verletzungen, Infektionen, Hyperthermie oder Hypoxie und zeichnet sich durch massive Volumenzunahme des Zytoplasmas und ein Anschwellen der Zytoplasmabestandteile aus. Dadurch kommt es zu einer Schädigung von Zell- als auch Organellen-Membran. Gleichzeitig kommt es zur Kondensation und Schädigung des Chromatins (Abb. 8/ N1). Zu einem späteren Zeitpunkt lysiert die ganze Zelle, wodurch der

Zellinhalt an die Umgebung abgegeben wird (Abb. 8/N2). Durch die Freisetzung des Zellinhalts werden Zellen des Immunsystems angelockt und so eine entzündliche Reaktion ausgelöst.



**Abb. 8:** Schematischer Vergleich von Nekrose und Apoptose. Bei der Nekrose schwillt die Zelle stark an und lysiert, wodurch es zur Freisetzung von Zellbestandteilen kommt (N1-N2). Dadurch wird im Gegensatz zur Apoptose, eine entzündliche Reaktion ausgelöst. Bei der aktiv von der Zelle durchgeführten Apoptose bleibt die Zellmembran dagegen intakt. Abbauprodukte durch den eingeleiteten Zelltod, werden in den sogenannten apoptotischen Körperchen verpackt (A2). Diese werden von Makrophagen aufgenommen und verdaut (nach Kerr, 1995).

Bei der aktiv von der Zelle durchgeführten Apoptose dagegen werden Enzyme wie Caspasen innerhalb der Zelle aktiviert, wodurch die Zelle zum Selbstmord veranlasst wird. Zu Beginn der Apoptose schrumpfen Zytoplasma und Zellkern. Das Chromatin beginnt entlang der Kernmembran zu kondensieren (Abb. 8/ A1) und die genomische DNA wird in Fragmente mit spezifischer Größe gespalten (apoptotische DNA-Leiter). Zu einem späteren Zeitpunkt bilden sich Ausstülpungen (*Blebs*) der Plasma- und Kernmembran, die sich als sogenannte apoptotische Körperchen (*Apoptotic Bodies*) abzuschnüren beginnen (Abb. 8/ A2). Durch diese Verpackung von Zellbestandteilen während der Apoptose ohne Beschädigung der Zellmembran, wird eine Freisetzung inflammatorischer Substanzen verhindert. Auf der Cytoplasmamembran werden nun apoptose-spezifische Marker exponiert, die von Makrophagen erkannt werden können. Durch diese werden nun die apoptotischen Körperchen phagozytiert (Abb. 8/ A3) und verdaut (Kerr, 1995; Grimm, 2001).

### **3.6 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, an Tumorzelllinien mögliche Veränderungen der apoptotischen Signaltransduktionswege und die Aktivierung von Überlebensfaktoren aufzuklären. Dadurch sollen Rückschlüsse auf eine denkbare Desensibilisierung gegenüber apoptose-auslösenden Substanzen ermöglicht werden. Hierzu wird einerseits das Zellsystem der HL-60 Zellen eingesetzt, für die in Vorarbeiten an unserem Institut beobachtet werden konnte, dass undifferenzierte und zu Granulozyten ausdifferenzierte HL-60 Zellen einen starken Unterschied in ihrer Antwort auf eine TBT-Behandlung aufzeigen. Desweiteren wurden drei Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) als Modell ausgewählt. Von diesen stammt die Zelllinie MEXF 276L von einem in der klinischen Behandlung Cisplatin (CDDP) sensitiven, die Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L dagegen stammen von Cisplatin resistenten Tumoren ab. Auch hier sollen pro- und anti-apoptotische Mechanismen innerhalb der Zelle auf mögliche Veränderungen hin untersucht werden, da der ausbleibende Zelltod bei der Resistenzentwicklung eine große Rolle zu spielen scheint. Mit Hilfe der Erkenntnis der molekularen Mechanismen, die zu einer solchen Medikamenten-Resistenz führen, könnten zukünftig gezielt neue Substanzen im Kampf gegen Krebs entwickelt werden.

---

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Biochemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anisomycin	Sigma, Deisenhofen
Annexin-V-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
Anti-Human Fas (Fas-Inhibitor)	UPSTATE BIOTECHNOLOGY, USA
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Trypton	Difco, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
CHAPS	Sigma, Deisenhofen
Cis-Dichlorodiammine Platin (II) (Cisplatin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Serva, Heidelberg
4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin (BCA)	Pierce, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fas Ligand (human) + <i>Enhancer</i>	Alexis, Grünberg
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Difco, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
IGEPAL CA-630 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
<i>Killer</i> TRAIL™	Alexis, Grünberg
Kupfersulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

---

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ribonuklease A	Sigma, Deisenhofen
rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
TRIS-hydrochlorid (TRIS/HCl)	Roth, Karlsruhe
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS/Base)	Roth, Karlsruhe
Tri- <i>n</i> -butylzinnchlorid (TBT)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
Z-VAD-FMK (Allg. Caspase Inhibitor)	R&D Systems, Wiesbaden

## 4.2 Laborgeräte

Bild-Dokumentationssystem:	Gel Print 2000i, MWG-Biotech, Ebersberg
Brutschrank:	Model B5061 EC-CO2, Heraeus, Fellbach
Dampfsterilisator:	Vapoklav 500, H & P Labortechnik, München
Elektrophorese-Kammer	
- für Agarose-Gele:	Horizontal Gel Electrophoresis System H3, BRL, USA
- für Polyacrylamid-Gele:	Gelkammer (16,5x22cm), Sigma, Deisenhofen
Elektroporator:	Multiporator, Eppendorf, Hamburg
FACS-Gerät:	Flow Cytometer BD LSR, Becton Dickinson, Heidelberg
Inkubator:	Minitron AI72, Infors AG, Schweiz
Luminometer:	Lumat LB 9501, Berthold, Wildbad
Mikroskop:	Eclipse TS100, Nikon, Japan
Photometer:	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg
Plattenlesegerät:	Microplate Reader Versamax, Molecular Devices, USA
Sterilbank:	LaminAir HB2460, Heraeus, Fellbach

---

Ultraschall-Gerät:	Sonifer 250, Branson, USA
Wasserbad:	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Western-Blot Apparatur:	Standart Blotter, Sigma, Deisenhofen
Zellzählgerät:	CASY 1 Cell Counter Modell TT, Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen:	Digifuge GL, Heraeus, Fellbach Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg RC5C, Sorvall-Instruments, Bad Homburg

### 4.3 Zellkulturen

Die für die Kultivierung von Zellen verwendeten Zellkulturgefäße stammten von der Firma Greiner in Frickenhausen. Medien sowie Medienzusätze wurden von Life Technologies, Karlsruhe, bezogen und als fertiges Kulturmedium mit einem Sterilfilter (Bottle Top Filter, 0,22 $\mu$ M Porenweite) der Firma Millipore mit Sitz in Bedford, USA, sterilfiltriert. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Zellkulturen (HL-60, sowie MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus, Fellbach) kultiviert.

#### 4.3.1 HL-60 Zellen

Diese ursprünglich aus einer 36 Jahre alten Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie isolierten Zellen (Collins *et al.* 1977), wurden über die American Type Culture Collection (ATCC CCL240) bezogen. HL-60 Zellen stehen am Anfang ihrer Ausdifferenzierung und können somit noch durch die Anwendung von entsprechenden Induktoren in Granulozyten oder Monozyten differenziert werden (Collins 1987). In undifferenzierter Form wachsen sie permanent als Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. HL-60 Zellen wurden zweimal pro Woche mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  in 20 ml sterilfiltriertem Kulturmedium angesetzt und für Versuche maximal bis zur 15. Passage verwendet.

### Zusammensetzung des HL-60 Kulturmediums

RPMI 1640 .....	450ml
FKS (fötale Kälberserum, für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert) .....	75ml
L-Glutamin (200mM).....	7,5ml
Natriumpyruvat (100mM) .....	5ml
MEM ( <i>non essential amino acids</i> ).....	5ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 <sup>4</sup> U/ml).....	2,5ml

#### **4.3.1.1 Differenzierung von HL-60 Zellen**

Um Veränderungen in den Signaltransduktionswegen von HL-60 Zellen während ihrer Differenzierung bestimmen zu können, wurden für die Versuche neben undifferenzierten Zellen auch HL-60 Zellen verwendet, welche durch Zugabe von DMSO zu Granulozyten differenziert wurden (Collins *et al.* 1978). Hierzu wurde dem Kulturmedium 1,3% DMSO hinzugegeben und die Zellen am Tag 3 ½ für Versuche verwendet. Als Folge ihrer Differenzierung kommt es bei HL-60 Zellen neben dem Verlust ihre Fähigkeit zur Proliferation zu einer Veränderung der Enzym- und Rezeptorausstattung (Harris & Ralph 1985). Unter dem Mikroskop konnte im Zuge der Differenzierung eine deutliche Verkleinerung der Zelle beobachtet werden.

#### **4.3.2 MEXF-Zellen**

MEXF-Zellen (Melanom Xenograft Freiburg) wurden über die Klinik für Tumorbiologie in Freiburg bezogen, welche Tumorproben im Rahmen von Biopsien entnommen hatten und diese zur Etablierung thymusaplastischen Nacktmäusen subkutan implantierten. Die etablierten Tumorzellen konnten dann durch eine an der Maus durchgeführten Biopsie entnommen und nach Aufreinigung kultiviert werden.

Die in diesen Versuchen eingesetzten Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L unterschieden sich in ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin (CDDP) während der klinischen Behandlung. Während der ursprüngliche Patient der MEXF 276L Zelllinie, ein 23 jähriger Mann, auf eine Cisplatin-Behandlung positiv ansprach, erwies sich der Tumor



eines 63 Jährigen für die MEXF 462NL Zelllinie als resistent und der einer 40 jährigen Frau als Zelllinie mit der Bezeichnung MEXF 514L sogar als hochresistent gegenüber Cisplatin. Bei allen drei MEXF Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellkulturen, die bis zur Semikonfluenz kultiviert wurden und je nach Zweck im Versuch verwendet oder zur weiteren Zucht passagiert wurden. Die Versuchsansätze wenn nicht anders vermerkt wuchsen in 50ml Gewebekulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bis zu einer Zelldichte von etwa  $6 \times 10^6$  Zellen. Sollten Zellen passagiert werden, so wurden diese mit Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM EDTA-4 Na; Firma Life Technologies, Karlsruhe) von ihrem Untergrund abgelöst. Um den Trypsinverdau zu stoppen, wurde der Zellsuspension steriles Kulturmedium hinzugegeben und für 5 Minuten bei  $350 \times g$  zentrifugiert. Nach Resuspendierung des Pellets in Kulturmedium konnte die Zellzahl bestimmt und  $0,5 \times 10^6$  Zellen erneut zur Proliferation angesetzt werden.

#### Zusammensetzung des MEXF Kulturmediums

RPMI 1640 .....	450ml
FKS (fötale Kälberserum, für 30 Minuten bei $56^\circ\text{C}$ hitzeinaktiviert) .....	75ml
L-Glutamin (200mM).....	7,5ml
Natriumpyruvat (100mM) .....	5ml
MEM ( <i>non essential amino acids</i> ).....	5ml
Penicillin/Streptomycin-Lösung ( $10^4$ U/ml).....	2,5ml

#### **4.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden MEXF Zellen trypsiniert bzw. HL-60 Zellen direkt entnommen, danach 1:1000 mit Isoton II (Beckman Coulter, Krefeld) verdünnt und die Zellzahl mit Hilfe eines CASY 1 Cell Counter bestimmt.

Die Bestimmung der Zellzahl von MEXF Zellen musste sehr schnell erfolgen, da diese Zellen stark zur Aggregation neigen und dann eine genaue Bestimmung der Zellzahl nicht mehr möglich ist.

#### 4.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurde die Zellsuspension des einzufrierenden Zelltyps in seinem jeweiligen Kulturmedium mit zusätzlichen 10% DMSO als Gefrierschutz gegen die Bildung von Eiskristallen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Da sich mit DMSO die zerstörerische Bildung von Eiskristallen nicht vollständig verhindern lässt, darf eine Einfriergeschwindigkeit von  $-1^{\circ}\text{C}$  in der Minute nicht überschritten werden. Hierzu wurde die zum Einfrieren fertige und in Kryoröhrchen befindliche Zellsuspension in ein Einfriergefäß (Cryo  $1^{\circ}\text{C}$  „Freezing Container“, NALGENE™ Labware, USA) überführt. Somit konnte die Einfriergeschwindigkeit optimiert werden. Nach dem Einfrierprozess bei zunächst  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht, wurden die gefrorenen Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  überführt.

#### 4.3.5 Auftauen von Zellen

Zum schnellstmöglichen Auftauen von Zellen wurden diese nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff sofort in ein auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgeheiztes Wasserbad überführt. Da sich im Einfriermedium 10% DMSO befand, musste sofort ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen für 5 Minuten bei  $350 \times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium zur weiteren Kultivierung resuspendiert.

### 4.4 Proteinanalytik

#### 4.4.1 Proteinbestimmung (BCA Protein Assay)

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde nach Smith *et al.* (1985) vorgegangen. Hierzu wurden zunächst für eine Standard-Eichgerade definierte Proteinlösungen hergestellt. In PBS wurden aufsteigenden Mengen (0/ 1/ 5/ 10/ 15/ 20/ 25/ 30  $[\mu\text{g}/10\mu\text{l}]$ ) an Rinderserumalbumin (BSA) gelöst und jeweils  $10\mu\text{l}$  auf eine 96-Well Platte überführt. Von den zu messenden Proben wurden im Anschluss ebenfalls  $10\mu\text{l}$  Probe auf dieselbe 96-Well Platte überführt. Allen Proben, als auch Proteinlösungen wurden dann  $200\mu\text{l}$  des BCA-Reagenz hinzugegeben

und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Plattenlesegerätes, welches die gemessenen Probenwerte mit denen der Eichgerade ins Verhältnis setzt, bei 562nm bestimmt werden (Programm SOFTmax<sup>®</sup>PRO von Molecular Devices, USA).

#### 10x PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*)

10x Fertiglösung von Life Technologies, Karlsruhe

CaCl<sub>2</sub> (anhyd.) ..... 1,0 g/l

KCl..... 2,0 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2,0 g/l

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O ..... 1,0 g/l

NaCl..... 80,0 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O..... 21,6 g/l

Zur Erstellung einer 1x PBS-Puffer Lösung wurde die PBS 10x Fertiglösung 1:10 mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt.

#### Ansetzen des BCA-Reagenz:

Mischung von 50 Teilen Lösung A mit einem Teil von Lösung B

Lösung A= BCA-Grundlösung (Pierce, Illinois, USA)

Lösung B= 4% CuSO<sub>4</sub>-Lösung (gelöst in dH<sub>2</sub>O)

### **4.4.2 Herstellung von Ganzzellextrakten**

Zur Gewinnung von Ganzzellextrakten, wurden nach Beendigung der Inkubationszeit (z.B. 2 Stunden mit TBT) die Zellen geerntet. Bei den HL-60 Suspensionszellen geschah dies, indem die Zellen samt Medium abgezogen und anschließend für 5 Minuten bei 350 g herunterzentrifugiert wurden. Die adhärennten MEXF Zellen wurden mit einem Zellschaber (Firma Nunc, Wiesbaden) vom Untergrund ins Medium abgelöst und anschließend wie die oben beschriebenen Suspensionszellen durch Zentrifugation isoliert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 60°C heißem Probenpuffer

resuspendiert. Um die in den Proben befindliche DNA zu zerkleinern, wurden die Proben mit 10 Pulsen eines Ultraschallgerätes (Einstellung: Duty Cycle 30%, Output Control 3) behandelt. Anschließend konnten die aufgearbeiteten Zellextrakte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert werden.

Probenpuffer:

160mM.....Tris/HCl (pH 6,8)  
4% (m/v)..... SDS  
22,8% (v/v).....Glycerol  
2% (v/v)..... 2-Mercaptoethanol  
0,08% (m/v).....Bromphenolblau  
gelöst in dest.  $\text{H}_2\text{O}$

#### **4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Eine Auftrennung zu untersuchender Proteine nach ihrer Größe erfolgte per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Durch die Anwesenheit des anionischen Detergenz SDS wird eine Zerstörung der Quartärstruktur von Proteinen erreicht. Desweiteren lagert sich SDS an die hydrophoben Regionen des Proteins an, wodurch es zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine kommt. Somit wird eine Auftrennung der Proteine nicht durch ihre Eigenladung beeinflusst, sondern nur durch die Größe des Proteins. Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wurde zusätzlich zum eigentlichen Trenngel mit einem Sammelgel gearbeitet.

Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamid-Fertiglösung verwendet (rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30, Firma Roth), die neben 30% Acrylamid bereits mit 0,8% Bisacrylamid versetzt war. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden wie in folgender Tabelle (Tab. 1) beschrieben angesetzt. Nach dem Giessen des Trenngels (30ml) in eine vertikale Apparatur (Sigma) mit 1mm Spacern, wurde dieses sofort mit 1ml Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche für das folgende Sammelgel zu erhalten und die Polymerisation abgewartet. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Isopropanol verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Vor beginnender Polymerisation des Sammelgels, wurde ein Proben-Kamm in das Sammelgel gedrückt und wiederum die Polymerisation abgewartet.

Es wurden jeweils 50µl Probe, sowie 30µl sogenannter „*Prestained Marker*“ (BENCHMARK Prestained Protein Ladder, Invitrogen) aufgetragen und über Nacht eine Spannung von 95 Volt angelegt.

**Tab. 1:** Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele:

<b>Zusammensetzung</b> <b>Geldichte</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>		
	<b>5%</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
rotiphorese® Gel 30	1,70 ml	7,50 ml	10,00 ml	15,00 ml
0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	2,50 ml	- ml	- ml	- ml
1,5M Tris/HCl (pH 8,8)	- ml	7,50 ml	7,50 ml	7,50 ml
20% SDS	0,05 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
dH <sub>2</sub> O	5,75 ml	14,55 ml	12,05 ml	7,05 ml
10% APS	0,10 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml
TEMED	0,01 ml	0,03 ml	0,03 ml	0,03 ml

Laufpuffer:

25mM..... TRIS/Base  
 192mM..... Glycin  
 1% (m/v)..... SDS  
 gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.4.4 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Proteine wurden im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese elektrophoretisch auf eine Membran (Immobilon™-P Transfer Membranes, Millipore) übertragen (Towbin *et al.*, 1979), um diese nachfolgend mit einem spezifischem Antikörper gegen die nachzuweisenden Proteine bestimmen zu können.

Die Membran wurde zunächst in drei Schritten gereinigt. Nach einer Reinigung mit Methanol, erfolgte ein Waschschriff mit dest. H<sub>2</sub>O und im Anschluss mit Western Blot-Puffer. Die Membran wurde dann mit dem zu *blottenden* Gel luftblasenfrei in eine Gelhalterungskassette überführt und im Anschluss in eine mit Western Blot-Puffer gefüllte Western-Blot Apparatur (Standart Blotter, Sigma) transferiert, wobei hierbei auf die richtige Polung geachtet werden

musste (vereinfacht: Kathode [-]→Blot-Papier→Gel→Membran→Blot-Papier →Anode [+]). Je nach Größe der zu transferierenden Proteine, wurde zwischen 2 bis 4 Stunden bei einer Stromstärke von 380mA *geblottet*. Um eine ungleichmässige Erwärmung der bei 4°C vorgekühlten Blotkammer zu vermeiden, geschah das *Blotten* unter ständigem Rühren.

#### Western Blot-Puffer:

25mM..... Tris/Base

192mM.....Glycin

10% (v/v)..... Methanol

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

#### **4.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Antikörper**

Nach erfolgter Übertragung der Proteine auf eine Membran, wurde diese für zunächst 5 Minuten mit PBS/T gewaschen und im Anschluss über Nacht in einer Milchpulver-PBS/T Lösung geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Bei phosphospezifischen Antikörpern durfte kein PBS/T verwendet werden, um durch die im Puffer enthaltenen Phosphatbindungen den phosphospezifischen Antikörper nicht zu beeinflussen. In diesem Fall wurde statt PBS/T, TBS/T sowohl zum Ansetzen der Blocklösung als auch der Antikörperverdünnungen verwendet (siehe folgende Tabelle). Bei der Verdünnung des primären Antikörpers musste desweiterm beachtet werden, das einige Antikörper mit einer 5%igen BSA-Pufferlösung angesetzt werden mussten. Besonderheiten im Umgang der einzelnen Antikörper, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Die Membran wurde mit der Antikörperlösung in eine Folie eingeschweisst und für 4 Stunden auf einem Schüttler unter leichter Bewegung inkubiert. Im Anschluss erfolgten 3 Waschschrte von 15, 10 und nochmals 10 minütiger Dauer mit jeweils neuem PBS/T oder TBS/T je nach Antikörper. So sollte unspezifisch gebundener Antikörper entfernt werden, der eine klare Bande beim späteren Nachweis verhindert hätte. Mit dem sekundären Antikörper (anti-Mouse IgG, anti-Rabbit IgG oder anti-Goat IgG), welcher mit Meerrettichperoxidase konjugiert war, wurde genauso wie mit dem primären Antikörper verfahren. Zwei Sunden Inkubationszeit folgten dieselben drei Waschschrte. Der Nachweis der Proteine fand dann im Anschluss durch das ECL-System (*enhanced chemoluminescence*) von Amersham statt.

Hierbei wurden die beiden sich im Set befindlichen Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Minute auf die Membran gegeben. Diese Membran wurde dann in Frischhaltefolie verpackt und in eine Filmkassette überführt. Hier konnte dann ein spezieller Film (Hyperfilm™-ECL, Amersham, Freiburg) aufgelegt und belichtet werden.

**Tab. 2:** Antikörper sowie ihre Anwendung im Überblick

Antikörper		Verdünnung und Sonstiges	Bezugsquelle
<i>primär</i>	anti Bcl-2 (100)	1:500, <b>M,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti Fas (C-20)	1:500, <b>R,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti TNF-R1 (H-5)	1:500, <b>M,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti TNF-R2 (D-2)	1:500, <b>M,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti TRAIL-R1 (DR4)	1:500, <b>R,A,C</b>	Oncogene, Cambridge
	anti TRAIL-R2 (DR5)	1:500, <b>R,A,C</b>	Oncogene, Boston
	anti TRAIL-R3, N-Term.	1:500, <b>G,A,C</b>	Calbiochem, San Diego
	anti TRAIL-R4 (DcR2)	1:500, <b>R,A,C</b>	Oncogene, Cambridge
	anti ERK 1 (K-23)	1:1000, <b>G,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti P-ERK 1/2 (E10)	1:1000, <b>M,a,E</b>	New England Biolabs, Beverly
	anti p38 (H-147)	1:1000, <b>R,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti P-p38 MAP-Kinase	1:1000, <b>R,a,E</b>	New England Biolabs, Beverly
	anti P-SAPK/JNK	1:1000, <b>R,a,E</b>	New England Biolabs, Beverly
	anti JNK2 (D-2)	1:1000, <b>R,A,C</b>	Santa Cruz, Heidelberg
	anti PARP	1:2000, <b>R,B,D</b>	Boehringer, Mannheim
	anti Caspase-8	1:5000, <b>H,A,C</b>	Calbiochem, Schwalbach
	anti Caspase-10	1:1000, <b>M,F,C</b>	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
<i>sekundär</i>	anti <i>Mouse</i> -HRP	1:2000	Dako, Hamburg
	anti <i>Rabbit</i> -HRP	1:2000	Amersham, Braunschweig
	anti <i>Goat</i> -HRP	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
	anti <i>Chicken</i> -HRP	1:2000	UPSTATE, USA

**A:** Über Nacht geblockt in 5% Milchpulver/ PBS/ 0,3 % Tween 20  
**a:** Über Nacht geblockt in 5% Milchpulver/ TBS/ 0,1 % Tween 20  
**B:** Über Nacht geblockt in 10% Milchpulver/ PBS/ 0,3 % Tween 20  
**C:** Antikörper und waschen in PBS/ 0,3 % Tween 20  
**D:** Antikörper und waschen in TBS/ 0,1 % Tween 20  
**E:** Antikörper in 5% BSA, waschen in TBS/ 0,1 % Tween 20  
**F:** 1h blocken 5% Milchpulver/ PBS/ 0,3 % Tween 20; 1 Antikörper in 2% Milchpulver/ PBS/ Tween über Nacht; 2 Antikörper in 5% Milchpulver/ PBS/ Tween  
**HRP:** Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)

Sekundärer Antikörper

**M:** Maus (*Mouse*)  
**R:** Kaninchen (*Rabbit*)  
**G:** Ziege (*Goat*)  
**H:** Huhn (*Chicken*)

1x PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*)

Zusammensetzung siehe unter 2.4.1.

PBS/Tween 20-Puffer (PBS/T)

Einer 1x PBS-Puffer Lösung wurden 0,3 % Tween 20 Detergenz hinzugegeben.

10x TBS-Puffer (*TRIS Buffered Saline*)

200mM..... TRIS/Base

1,5M..... NaCl

pH 7,4

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

Zur Erstellung einer 1x TBS-Puffer Lösung wurde der 10x TBS-Puffer 1:10 mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt.

TBS/Tween 20-Puffer (TBS/T)

Einer 1x TBS-Puffer Lösung wurden 0,1 % Tween 20 Detergenz hinzugegeben.

Blockpuffer

5% oder 10% Milchpulver gelöst in PBS/T bzw. TBS/T.

#### **4.4.6 Antikörperentfernung von Western Blot Membranen**

Um auf eine Membran „geblottete“ Proteine ein weiteres Mal mit Antikörpern behandeln zu können, mussten zuvor die Bindungsstellen vom vorherigen Antikörper befreit werden. Hierzu wurde die Membran für 30 Minuten in einer 60°C heißen sogenannten „*Stripping Solution*“ gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 5 Minuten mit PBS/T gewaschen und weiter wie unter 2.4.5 beschrieben vorgegangen.



---

Stripping Solution

100mM..... 2-Mercaptoethanol  
62,5mM..... TRIS/HCl  
2% (m/v)..... SDS  
pH 6,7  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

PBS/Tween 20-Puffer (PBS/T)

Einer 1x PBS-Puffer Lösung wurden 0,3 % Tween 20 Detergenz hinzugegeben.

**4.4.7 Färbung von Proteinen (Coomassie-Färbung)**

Um eine unspezifische Färbung zum Nachweis von Proteinen durchzuführen, wurden Gele in eine Färbelösung gegeben. Für eine gleichmässige Durchfärbung wurde etwa 60 Minuten auf einem Schüttler gefärbt. Im Anschluss daran wurde das angefärbte Gel in eine Entfärbelösung überführt und so lange darin gewaschen, bis der Hintergrund des Geles frei von Farbe war. Eine Bilddokumentation des Geles erfolgte dann mit dem Bild-Dokumentations-system Gel Print 2000i (MWG-Biotech., Ebersberg).

Färbelösung

2g ..... Coomassie® Brilliant Blue G250  
475ml ..... Methanol  
100ml ..... Eisessig  
425ml ..... dest. H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung

300ml ..... Methanol  
100ml ..... Eisessig  
600ml ..... dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.5 Caspase-3 und Caspase-8 Aktivitäts-Assay

Die Caspase-8 steht als eine der Initiator-Caspasen bei den signalübertragenden Caspasen innerhalb der Kaskade an oberster Stelle („*UPSTREAM*“). Durch ihre aktive Form wird unter anderem die „*DOWNSTREAM*“ Effektor-Caspase 3 aktiviert.

Sowohl der Caspase-3, als auch der Caspase-8 Assay beruht auf der Eigenschaft der Caspasen spezifische Amminosäuresequenzen zu schneiden. Die Caspase-8 schneidet nach der Sequenz IETD (Ile-Glu-Thr-Asp) und Caspase-3 nach DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). Dies wird ausgenutzt, indem IETD und DEVD gebunden mit dem Chromophor p-Nitroanilin als Substrat zugesetzt wird (IETD-pNA und DEVD-pNA). Liegt eine aktive Caspase vor, so kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des Substrates. Dadurch wird p-Nitroanilin freigesetzt und absorbiert Licht, welches bei 405nm Transmission in einem Plattenlesegerät (Microplate Reader Versamax, Molecular Devices) gemessen und quantifiziert werden kann.

##### Versuchsdurchführung:

Nach Inkubation der MEXF-Zellen mit TBT wurden diese mit einem Zellschaber (NUNC, Wiesbaden) geerntet und die Zellsuspension für 4 Minuten bei 4°C und 350g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit einem Lysispuffer resuspendiert und zum Lysieren für 20 Minuten auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 20800 x g zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in eine 96-Well-Platte (NUNC, Wiesbaden) überführt, in welcher bereits 25µl Reaktionslösung, die das Caspase-Substrat beinhaltet, vorgelegt waren. Die Platte mit den Proben inkubierte anschliessend für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Danach wurde die 96-Well-Platte mit einem Plattenlesegerät (Microplate Reader Versamax, Molecular Devices) bei 405nm gemessen.

##### Caspase-3 Lysispuffer (nach Budd *et al.* 2000)

100mM..... HEPES, pH 7,4  
 2mM.....DTT  
 0,1% (m/v).....CHAPS  
 0,1% (m/v).....Saccharose  
 gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

---

---

Caspase-8 Lysispuffer (nach Budd *et al.* 2000)

20mM..... TRIS/Base, pH7,2  
150mM..... NaCl  
1mM..... DTT  
1% (v/v) ..... Triton X-100  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

2x Reaktionspuffer

50mM..... HEPES, pH 7,4  
100mM..... NaCl  
0,1% (m/v) ..... CHAPS  
10mM..... DTT  
10% ..... Saccharose  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

Caspase-3 Substrat I Lösung, Colorimetrisch

5mM Caspase-3 Substrat I (colorimetrisch, Ac-DEVD-pNA) von Calbiochem (Schwalbach),  
gelöst in DMSO.

Caspase-8 Substrat I Lösung, Colorimetrisch

5mM Caspase-8 Substrat I (colorimetrisch, Ac-IETD-pNA) von Calbiochem (Schwalbach),  
gelöst in DMSO

Reaktionslösung

25µl.....2x Reaktionspuffer  
5µl.....Caspase-3 oder -8 Substrat Lösung  
0,25µl..... DTT (1M)

## 4.6 Isolierung apoptotischer DNA und Auftrennung durch Agarosegel-Elektrophorese

### 4.6.1 Isolierung apoptotischer DNA

Als Apoptose-Nachweis wurde die hierfür spezifische DNA-Fragmentierung untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  der zu untersuchenden Zellen nach ihrer Inkubation zunächst mit PBS gewaschen und bei  $350 \times g$  für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in  $50\mu\text{l}$  Lysispuffer resuspendiert und etwa 10 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 5 Minuten bei  $1600 \times g$  zentrifugiert. Der so erhaltenen Überstand enthielt die apoptotischen DNA-Fragmente, während sich im Pellet unter anderem noch die intakte DNA befand. Die Extraktion der DNA-Fragmente wurde am Pellet ein weiteres Mal mit der gleichen Menge Lysispuffer wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden mit  $10\mu\text{l}$  einer 10%igen SDS-Lösung versetzt. Dann wurden  $20\mu\text{l}$  RNase A (Stammlösung:  $20\text{mg/ml}$ , Sigma) hinzugegeben und für 2 Stunden bei  $56^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Nun erfolgte ein 2 stündiger Verdau der Proteine mit  $25\mu\text{l}$  Proteinase K (Stammlösung:  $10\text{mg/ml}$ , Sigma) bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach der Zugabe von  $50\mu\text{l}$   $10\text{M}$  Ammoniumacetat wurde die DNA mit  $500\mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol gefällt und für 15 Minuten bei  $1500 \times g$  abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde dann mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 15 Minuten bei  $1500 \times g$  abzentrifugiert und im Anschluss luftgetrocknet. Die Lösung der DNA erfolgte durch die Aufnahme in  $20\mu\text{l}$  Probenpuffer.

#### Lysispuffer

50mM..... TRIS/HCl

20mM..... EDTA

1%(v/v)..... NP-40

pH 7,5

gelöst in dest.  $\text{H}_2\text{O}$

#### Probenpuffer

10mM..... TRIS/Base

1mM..... EDTA

pH 8,0

gelöst in dest.  $\text{H}_2\text{O}$

### 1x PBS-Puffer

Siehe unter 2.4.1

## **4.6.2 Auftrennung apoptotischer DNA durch Agarosegel-Elektrophorese**

20µl der wie unter 2.6.1 beschrieben erhaltenen apoptotische DNA-Proben, wurden mit 5µl Ladepuffer gemischt, für 10 Minuten im Wasserbad bei 60°C erhitzt und umgehend in Eiswasser abgeschreckt. Eine Auftrennung der apoptotischen DNA-Fragmente erfolgte dann durch ein 1,8%iges Agarosegel. Die Herstellung des Gels erfolgte durch das Lösen von 1,8% Agarose in TAE-Puffer und anschliessendem kurzen Aufkochen. Vor dem Giessen des Gels wurde nach Abkühlung auf etwa 60°C noch 0,5µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, um eine DNA-Fluoreszenz unter UV-Licht (302 nm) zu erreichen. Die Auftrennung erfolgte nach Beladung des Gels bei einer anliegenden Spannung von 2-3 Volt/cm. Um die Hintergrund-Fluoreszenz des Gels durch das Ethidiumbromid zu verringern, wurde das Gel vor der Bild-Dokumentation zunächst in dest. H<sub>2</sub>O entfärbt. Anschliessend konnte die DNA-Leiter auf dem UV-Tisch durch das Bild-Dokumentationsystem (siehe 2.2) erfasst werden.

### DNA-Ladepuffer

40%(m/v) ..... Saccharose  
0,25%(m/v) ..... Xylencyanol  
0,25%(m/v) ..... Bromphenolblau  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

### TAE-Puffer

40mM..... TRIS/Base  
1mM..... EDTA  
1,14%(v/v) ..... Eisessig  
pH 8,3  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.7 Elektroporation von undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen

Zunächst wurden die Zellen durch 5 minütige Zentrifugation bei 350 x g geerntet und in HL-60 Medium mit nur 0,5 % fötales Kälberserum resuspendiert. Anschliessend wurde die Zellzahl mit dem CASY 1 Cell Counter bestimmt. Für die Transfektion wurden  $2.5 \times 10^6$  Zellen benötigt. Daher wurde eine für Transfektion benötigte Menge an HL-60 Zellen für 5 Minuten bei 350 x g zentrifugiert und zu einer Endkonzentration von  $2.5 \times 10^6$  in hypoosmolaren Elektroporationspuffer von Eppendorf resuspendiert. 800µl dieser Zellsuspension wurden in eine Eppendorf 4mm Elektroporations-Küvette überführt und mit 20µg Plasmid-DNA vermischt (Gewinnung der Plasmide siehe 2.11.5).

Die Elektroporation erfolgte dann bei folgender Geräteeinstellung:

Mode:.....Eukaryotic cells

Voltage: .....760V

Time Constant: .....60µs

Cuvette Gap: .....4mm

Number of Pulses: .....1

Nach dem elektrischen Impuls wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Zellen in 5 ml HL-60 Medium überführt und für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

##### 4.7.1 Zur Elektroporation verwendete Plasmide

Zur Bestimmung der Transfektions-Effizienz:

pEGFP-N1-Vektor von Clontech (Heidelberg)

Als NFκB-Inhibitor:

Das Plasmid IκBα-gl.t7-neo stammt von der Arbeitsgruppe um Falk Weih am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) des Forschungszentrum Karlsruhe. Das genaue Insert ist beschrieben in der Veröffentlichung von Vallabhapurapu *et al.*, 2001. Allerdings befand sich das Insert in den Versuchen zu dieser Doktorarbeit in einem pMEX<sub>neo</sub> I Vektor und wurde in dessen Multiplen Klonierungs Region (MCS=Multiple Cloning Site) zwischen den

---

Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI eingefügt. Es wird eine mutierte Form von I $\kappa$ B $\alpha$  überexprimiert, bei der die beiden Serin-Reste an Position 32 und 36 zu jeweils einem Alanin mutiert sind. Dadurch kann dieses mutierte I $\kappa$ B $\alpha$  nicht phosphoryliert und somit nicht abgebaut werden, wodurch es einen potenten NF $\kappa$ B-Inhibitor darstellt.

#### NF $\kappa$ B Reporter-gen-Assay:

3Enh.-TK-Luc-Plasmid von Nicole Israel (Israel *et al.*, 1992)

### **4.8 Luciferase NF $\kappa$ B-Reporter-gen Assay**

Hierbei handelt es sich um einen Chemilumineszenz-Assay zur quantitativen Bestimmung der Luciferase- und somit Promoter-Aktivität in transfizierten Zellen mit Hilfe eines Luminometers. Die translatierte Luciferase aus *Photinus pyralis* katalysiert eine ATP abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, wodurch es zur Emission von Licht bei 562 nm kommt, welches gemessen werden kann.

Zur Durchführung des NF $\kappa$ B-Reporter-gen Assays wurde mittels Elektroporation das 3Enh.-TK-Luc Luciferase Expressions-Plasmid (Israel *et al.* 1992) sowohl in undifferenzierte als auch in differenzierte HL-60 Zellen transfiziert (siehe 2.7). Die quantitative Messung wurde mit Hilfe des Luciferase Reporter-gen Assay, *constant light signal* von Roche durchgeführt.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationzeiten mit TNF- $\alpha$  oder TBT behandelt. Um eine Signalunterdrückung bei der Lichtmessung durch das Luminometer zu vermeiden, mussten sich die HL-60 Zellen in einem Phenolrot-freiem Medium befinden. Daher wurden die Zellen im Anschluss an die Inkubation für 5 Minuten bei  $350 \times g$  zentrifugiert und in 100 $\mu$ l Phenolrot freiem Medium resuspendiert. Diesen 100 $\mu$ l Zellsuspension wurden dann 100 $\mu$ l an Luciferase-Substratreagenz bei Zimmertemperatur hinzugegeben, die unter anderem einen Lysispuffer und das Luciferin enthielt. Zusätzlich enthielt das Substratreagenz noch AMP, um eine Inhibierung der Luciferase durch das bei der Reaktion entstehende Oxyluciferin zu vermeiden. So konnte eine stabile Lichtemission über mehrere Stunden erreicht werden (das Signal bleibt für eine Stunde nahezu konstant und hat eine Halbwertszeit von 3 Stunden). Fünf Minuten nach Zugabe des Luciferase-Substratreagenz konnte die Lichtemission mit dem Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold) gemessen werden.

## 4.9 Bestimmung der NFκB-DNA Bindeaktivität im Zellkern durch EMSA Assay (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

### 4.9.1 NFκB und Oct-1 Bindungssequenzen für EMSA

Igκ<sub>up</sub>            5' GATCCAGAGGGGACTTTCCCAGAGGA 3'

Igκ<sub>down</sub>        5' GATCTCCTCTGGGAAAGTCCCCTCTG 3'

Oct-1<sub>up</sub>        5' GATCCTGTCTGAATGCAAATCACTAGAAA 3'

Oct-1<sub>down</sub>     5' GATCTTTCTAGTGATTTGCATTCTGACTG 3'

#### 4.9.1.1 Präparation der radioaktiv markierten Bindungssequenzen

##### 4.9.1.1.1 Hybridisierung der Oligonukleotide

Von jedem Oligonukleotid wurden 200 pmol mit 200 µl TE-Puffer und 2 µl 5M NaCl-Lösung gemischt und für 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Die dabei erhaltenen doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden im Anschluss bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

##### 1x TE-Puffer:

100mM        Tris/Base (pH 8,0)

1mM         EDTA

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

##### 4.9.1.1.2 Radioaktive Markierung und Reinigung der hybridisierten Oligonukleotide

2 pmol des hybridisierten Oligonukleotides wurde mit 10 µl dest. H<sub>2</sub>O, 2 µl REACT 2-Puffer (10x) (GIBCO/ Life Technologies, Karlsruhe), 3 µl α<sup>32</sup>P-dCTP (10 mCi/ml; Amersham, Freiburg), 2 µl dNTP-Mix (jedoch ohne dCTP) (PEQLAB, Erlangen) und 0,5 U *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) (GIBCO/ Life Technologies, Karlsruhe) gemixt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10µl Blue Dextran (5 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) wurde das Reaktionsgemisch auf eine 1 ml Sephadex G-50-Säule (Sigma, Deisenhofen) aufgetragen und die so aufgereinigten Proben mit 1x TE-Puffer eluiert.



---

Mit einem Szintilationszähler wurde die Zerfallsrate von 1 µl der zuvor aufgereinigten Lösung bestimmt.

dNTP-Mix:

Je 0,5 µg dATP, dGTP und dTTP gelöst in 10mM Tris (pH 7,5)

1x TE-Puffer:

100mM Tris/Base (pH 8,0)

1mM EDTA

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.9.2 Präparation von Kernextrakten

Nachdem semikonfluent gewachsenen MEXF-Zellen für unterschiedliche Zeiten (30', 60', 120', 24 h) mit humanem TNF $\alpha$  (50 ng/ml) inkubiert worden waren, wurden die Kulturen mit einem Zellschaber geerntet und für 5 Minuten bei 350 x g abzentrifugiert. Danach wurden die Pellets in 400µl Puffer-A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die intakten Kerne wurden nach Zugabe von 25µl 10% NP-40 und kräftigem Mischen durch Zentrifugieren bei 20800 x g für 2 Minuten vom Zytoplasma abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 60µl Puffer-C hinzugegeben und diese Mischung für 15 Minuten bei 4°C auf dem Eppendorf-Schüttler leicht geschüttelt. Danach wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei 20800 x g und 4°C das Kernpellet vom Kernextrakt abgetrennt. Die Quantität des Kernextraktes wurde wie in 2.4.1 beschrieben bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Puffer-A

10mM HEPES (pH 7,9)

10mM KCl

0,1mM EDTA

0,1mM EGTA

2,5mM DTT

Protease Inhibitor „Cocktail“ (25x) (Roche, Mannheim)

Puffer-C

20mM HEPES (pH 7,9)

25% Glycerol

0,4M NaCl

1mM EDTA

2,5mM DTT

Protease Inhibitor „Cocktail“ (25x) (Roche, Mannheim)

**4.9.3 EMSA Assay (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

5µg an Kernproteinen wurden mit Puffer-C zu einem Volumen von 5 µl ergänzt. Hierzu wurden dann 4 µl an (5x) Bindungs-Puffer, 3µl an dIdC Homopolymer (Sigma, Deisenhofen) sowie 5µl dest. H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Diesen Proben wurden dann jeweils 2µl α<sup>32</sup>Phosphor-markiertes Oligonukleotid (etwa 20000-60000 cpm) hinzugegeben und diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben nach Zugabe von 2µl (10x) Ladepuffer auf einem Polyacrylamid-Gel (5%) aufgetragen und elektrophoretisch bei 150 Volt (3-4h) und (0,25x) TBE-Laufpuffer aufgetrennt.

Puffer-C

20mM HEPES (pH 7,9)

25% Glycerol

0,4M NaCl

1mM EDTA

2,5mM DTT

Protease Inhibitor „Cocktail“ (25x) (Roche, Mannheim)

5x Bindungs-Puffer

50mM Tris/HCl

250mM NaCl

5mM EDTA

25% Glycerol

---

Ladepuffer

10mM	EDTA
10%	Glycerin
0,1%	SDS
0,02%	Bromphenolblau

TBE-Laufpuffer

22,5mM Tris/Borat
0,5mM EDTA

#### 4.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Durchflusszytometer sind opto-elektronische Messsysteme, die optische Signale wie Lichtstreuung und Fluoreszenz detektieren. Hierzu wird ein Messaufbau verwendet, der in allen Durchflusszytometern ähnlich ist. Grundsätzlich bestehen diese Geräte aus drei Elementen:

- Der Lichtquelle, die bei modernen Geräten aus einem Laser wie zum Beispiel einem Argon-Laser (488 nm) besteht. Laser haben die früher üblichen Quecksilber- oder Xenondampf-Lampen abgelöst.
- Der Durchflusszelle, bei der es sich um die Analyseküvette des Durchflusszytometers handelt. Hier werden die einzelnen Zellen mit Flüssigkeit umspült, perlschnurartig hintereinander aufgereiht und nacheinander durch den Laserstrahl geführt.
- Dem opto-elektronischen Messsystem, durch das die Fluoreszenz- und Streulichtwerte jeder einzelnen die Durchflusszelle passierenden Zelle quantifiziert werden. Dieses Detektionssystem besteht aus einer Reihe von optischen Filtern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge voneinander trennen und den Detektoren (Lichtverstärkerröhren) zuleitet. Durch diese Lichtverstärkerröhren wird das Licht in elektrische Impulse umgewandelt und nachverstärkt. Die Höhe des erzeugten Impulses korreliert mit der Stärke des Lichtsignals. Digitalisiert können die Daten dann an einen Rechner weitergeleitet und bearbeitet werden. Neben den sechs Fluoreszenzdetektoren besitzen moderne Geräte noch zwei Detektoren für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der Zellen. Hiermit kann die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und die Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht) bestimmt werden. Mit diesen zusätzlichen Daten ist es zum Beispiel

möglich, die drei Hauptleukozyten-populationen Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten voneinander zu unterscheiden.

Voraussetzung für eine durchflusszytometrische Analyse ist jedoch, dass die Zellen mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Diese können dann mit der sich im Durchflusszytometer befindlichen Lichtquelle angeregt werden und das emitierende Fluoreszenzlicht gemessen werden.

#### **4.10.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz von HL-60 Zellen**

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden HL-60 Zellen mit einem pEGFP-N1 Vektor (CLONTECH, Heidelberg) nach unter 2.7 beschriebenen Protokoll transfiziert. Im Durchflusszytometer konnte dann 24 und 48 Stunden nach der Transfizierung und Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> die Effizienz der Transfizierung gemessen werden. Hierzu wurden im Durchflusszytometer 10000 Zellen gezählt und über die Fluoreszenz-4, welche das emitierende Licht bei 510 nm bestimmt, die Zellen mit pEGFP-N1 Vektor gemessen. Somit konnte dann der prozentuale Anteil an mittels Elektroporation transfizierten HL-60 Zellen ermittelt werden.

#### **4.10.2 Unterscheidung und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose durch Annexin-V-FITC/ Propidiumiodid Assay bei HL-60 Zellen**

Um zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können wurden die Zellen sowohl mit Propidiumiodid als auch mit Annexin-V-FITC behandelt. Propidiumiodid (PI) kann nur an DNA binden und ist nicht membrangängig. Somit kann PI in die Zelle nur eindringen und die DNA „anfärben“, wenn die Membran löchrig, die Zelle also nekrotisch ist oder zerstört. Annexin-V-FITC bindet an das membranständige Lipid Phosphatidylserin (PS). PS ist bei intakten Zellen auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert und verhindert so ein Binden von Annexin-V-FITC. Bei apoptotischen Zellen dagegen verlagert die Zelle Phosphatidylserin auf die Aussenseite der Membran und ermöglicht so das Binden von Annexin-V-FITC. Da Annexin-V-FITC jedoch auch in nekrotische Zellen eindringen und somit an PS binden kann,

---

ist mit dieser Färbung keine Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose möglich. Daher muss stets mit Propidiumiodid gegengefärbt werden, um die nekrotischen Zellen abzugrenzen. Im Durchflusszytometer wurde das FITC gekoppelte Annexin-V bei Fluoreszenz-1 (FL-1; entspricht 530 nm) gemessen. Propidiumiodid dagegen wird bei FL-6, was 610 nm Emission entspricht, gemessen. Vor der Messung muss das Durchflusszytometer jedoch auf die Eigenfluoreszenz der Zellen durch eine ungefärbte Probe, auf PI durch eine nur PI gefärbte Probe und Annexin-V-FITC durch eine nur mit Annexin-V-FITC gefärbten Probe geeicht bzw. kompensiert werden. Zudem wird eine Kontrollmessung mit einer Propidiumiodid/ Annexin-V-FITC doppelgefärbten Positivkontrolle durchgeführt, um die voreingestellten Kompensationen der einzelnen Fluoreszenzen zu überprüfen und wenn nötig eine Feinkorrektur durchzuführen.

Sollte der Einfluss von NFκB als mögliche Ursache für eine verminderte Sensitivität gegenüber TBT untersucht werden, so waren die Zellen zusätzlich mit einem IκB exprimierenden Plasmid (IκBa-gl.t7-neo; siehe 2.7.1) transfiziert. Dadurch konnte NFκB irreversibel inhibiert werden und somit keine Transkription von Überlebensfaktoren erfolgen. In diesem Falle wäre eine erhöhte Apoptose-Rate nach TBT Gabe zu erwarten.

Für die Untersuchung wurden je Probe  $1 \times 10^6$ /ml undifferenzierte oder differenzierte HL-60 Zellen für 2 Stunden mit unterschiedlichen TBT-Konzentrationen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 5 Minuten bei  $350 \times g$  zentrifugiert und mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wie zuvor, wurden die Zellen in 100µl Ca-Bindungspuffer resuspendiert. Calcium<sup>2+</sup> ist für das Binden von Annexin-V an PS wichtig. Den Proben wurden dann 5µl Annexin-V-FITC und 1µl an Propidiumiodid-Stammlösung hinzupipetiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln und auf Eis wurde das Volumen der Proben von 100µl auf 1ml mit Ca-Bindungspuffer erhöht. Die Proben konnten nun sofort im Durchflusszytometer gemessen werden.

#### 1x PBS-Puffer

Siehe unter 2.4.1

#### Propidiumiodid-Stammlösung

1 mg/ml Propidiumiodid gelöst in PBS-Puffer.

Calcium-Bindungspuffer

10mM..... HEPES

140mM..... NaCl

5mM..... CaCl<sub>2</sub>

pH 7,4

gelöst in dest. H<sub>2</sub>O**4.11 Mikrobiologische Techniken****4.11.1 Herstellung von Kulturmedium und Agarplatten**

Für die Anzucht von *E.coli*-Stämmen vom Typ DH5 $\alpha$  wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei 4°C gelagert. LB-Agar wurde ebenfalls durch Autoklavieren sterilisiert und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C in sterile Einweg-Petrischalen gegossen. Diese wurden nach dem vollständigen Erstarren bei 4°C gelagert. In Abhängigkeit des transfizierten Plasmids wurde zur Selektion von rekombinanten DH5 $\alpha$  das LB-Medium oder der LB-Agar mit Ampicillin im Verhältnis 1:1000 (v/v) oder Kanamycin im Verhältnis 1:100 (v/v) im noch warmen Zustand (~50°C) versetzt.

LB-Medium

1% (m/v)..... Bacto-trypton

1% (m/v)..... NaCl

0,5% (m/v)..... Hefe-Extract

gelöst in dest. H<sub>2</sub>OLB-Agar

1,5% (m/v) Agar in LB-Medium

Ampicillin-Lösung50 mg/ml in dest. H<sub>2</sub>O; sterilfiltriert (0,22  $\mu$ m Porenweite)

---

### Kanamycin-Lösung

100x Kanamycin Fertiglösung (10000µg/ml) von Life Technologies

#### **4.11.2 Kryokonservierung von *E.coli***

850µl *E.coli* DH5α wurden mit 150µl (15%, v/v) sterilem Glycerol vermischt und in flüssigem Stickstoff bei –196°C schockgefroren sowie gelagert.

#### **4.11.3 Elektroporation von *E.coli***

Eine einzelne Bakterienkolonie des *E.coli*-Stammes DH5α wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von einer Agarplatte abgenommen. Damit wurden 2,5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Inkubator (Minitron AI72, Infors AG) bei Schütteln (200 rpm) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden weitere 20 ml angeimpft und so lange wiederum im Schüttler inkubiert, bis die optische Dichte OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,5 bis maximal 0,6 erreicht hatte. Die Bakteriensuspension wurde in 2 sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 5000 x g. Das so entstandene Pellet wurde in 20 ml sterilem eiskaltem dest. H<sub>2</sub>O vorsichtig resuspendiert und erneut für 20 Minuten bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde erneut mit 20 ml eiskaltem dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und für 10 min bei 4°C und 5000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1,5ml eiskaltem dest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Eis abgekühlt. Die so weitgehend oberflächlich von Ionen befreiten *E.coli* Bakterien konnten nun in einer ebenso ionenfreien Lösung elektroporiert werden. Die häufigen Waschschrte zur Befreiung von Ionen waren wichtig, um bei der Elektroporation einen elektrischen Durchschlag und somit eine Zerstörung der Bakterien zu vermeiden. Durch kurz angelegte Hochspannungspulse konnten nun gezielt Löcher in der Zellhülle verursacht werden, durch die dann die DNA aufgenommen wurde. 100µl der so gewonnenen Bakteriensuspension wurden mit 1µl (1µg/µl) DNA in eine Elektroporations-Küvette (Eppendorf) mit einem Elektrodenabstand von 1mm überführt und in den Elektroporator (Multiporator, Eppendorf) gestellt. Die Elektroporation erfolgte nun bei folgender Einstellung:

Mode: .....Prokaryotic cells  
Voltage: .....1700V  
Time Constant: .....5ms  
Cuvette Gap: .....1mm  
Number of Pulses: .....1

Nach der Elektroporation wurden die transformierten *E.coli* umgehend in 1ml S.O.C.-Medium überführt und für eine Stunde in den Inkubator bei 37°C und leichtem Schütteln gegeben.

#### S.O.C.-Medium

2 % (m/v) ..... Bacto-Trypton  
0,5% (m/v) ..... Hefe Extrakt  
10mM..... NaCl  
2,5mM..... KCl  
10mM..... MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
10mM..... MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
20mM..... Glucose  
gelöst in dest. H<sub>2</sub>O

#### **4.11.4 Selektion rekombinanter Bakterien**

Im Anschluss an die Elektroporation wurden 200µl Aliquot transformierter *E.coli*-DH5α auf Selektions-Agarplatten, welche Ampillicin oder Kanamycin entsprechend dem transfizierten Plasmids enthielten, zur Selektion ausgestrichen. So konnte sichergestellt werden, dass einzig erfolgreich transfizierte *E.coli*-DH5α, die das jeweilige Plasmid mit Resistenzgen enthielten, überlebten und diese zur Amplifizierung des Plasmids verwendet wurden.



---

#### 4.11.5 Amplifizierung und Isolierung von Plasmiden

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurden erfolgreich transfizierte *E.coli* vermehrt und anschließend die Plasmide mit einem Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert.

Hierzu wurde zunächst ein Selektionsausstrich auf Agarplatten mit Antibiotikum entsprechend dem Resistenzgen durchgeführt und für die spätere Isolierung eine einzelne Kolonie gepickt. Mit dieser Kolonie wurden dann 300ml LB-Antibiotikum-Medium angeimpft und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 200rpm wachsen gelassen. Die Bakterien wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 6000 x g /4°C für 15 Minuten geerntet. Das so gewonnene Pellet wurde zunächst in 10ml Puffer P1 resuspendiert, nach Zugabe von Puffer P2 vorsichtig durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 10ml des auf 4°C gekühlten Puffers P3 hinzugegeben und umgehend durch vorsichtiges Schütteln gemischt, um das Bakterienlysat zu neutralisieren. Es folgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis, um eine vollständige Fällung von genomischer DNA, Proteinen, Zelltrümmer und SDS zu erreichen. Diese unerwünschten Bestandteile wurden durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 20000 x g /4°C abgetrennt und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, im Anschluss erneut für diesmal 15 Minuten bei 20000 x g /4°C zentrifugiert. Das Aufreinigen und Gewinnen der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Qiagen-tip 500 Säulen, welche zuvor durch 10 ml des beiliegenden Puffers QBT equilibriert wurden. Auf diese Säulen wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA überführt, die dann an die Säulenmembran binden konnte. Es folgten 2 Reinigungsschritte der DNA mit jeweils 30ml Puffer QC, welcher nacheinander auf die Säule gegeben wurde und durch die Gravitation die Säule durchfloss. Nun konnte die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert und nach Zugabe des 0,7 fachen Eluat-Volumens Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt werden. Im Anschluss wurde für 30 Minuten bei 15000 x g /4°C zentrifugiert und das erhaltene Pellet nach dem Verwerfen des Überstandes mit 5ml 70%igem Ethanol gereinigt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 15000 x g, das Verwerfen des Überstandes und anschließendes Trocknen der DNA. Die so gewonnene Plasmid-DNA konnte nun in 100 µl sterilem dest. H<sub>2</sub>O gelöst werden.

## **5 Ergebnisse**

Untersuchungen über HL-60 Zellen belegen, dass eine Differenzierung dieser Zelllinie zu einer Desensibilisierung gegenüber TBT führt (Tomsche, 2001). Daher war diese Zelllinie Gegenstand dieser Untersuchungen, um daraus auf mögliche Resistenzmechanismen Rückschlüsse führen zu können.

### **5.1 Untersuchungen zur TBT induzierten Apoptose in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen**

HL-60 Zellen wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Induktor 3 ½ Tage lang zu Granulozyten differenziert und mit undifferenzierten HL-60 Zellen bezüglich ihrer Signaltransduktionswege und Neigung zur Apoptose nach Gabe von Tributylzinn (TBT) untersucht.

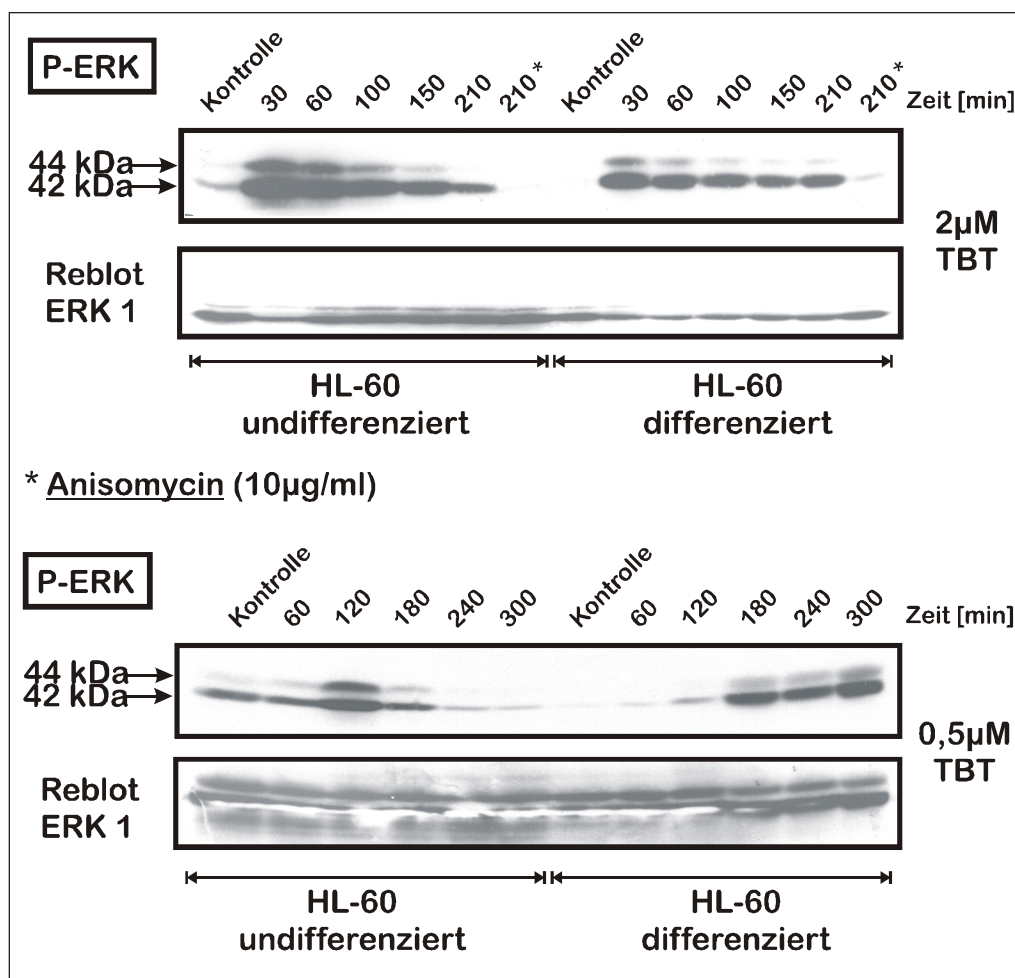
#### **5.1.1 Ergebnisse zur TBT-induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen in HL-60 Zellen**

Arbeiten in unserer Abteilung haben gezeigt, dass TBT in undifferenzierten HL-60 Zellen zur Aktivierung der MAP-Kinasen führen kann (Zaucke & Krug, 1996). Daher sollten HL-60 Zellen auf eine Veränderung dieser Aktivierung während der Differenzierung untersucht werden.

##### **5.1.1.1 Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 nach TBT Gabe**

Um den Einfluss von TBT auf die Möglichkeit einer Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK's) an undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen konzentrations- und zeitabhängig mit dem zuvor genannten Apoptoseinduktor TBT exponiert. Die Zell-Lysate wurden mit einem phosphorspezifischen Antikörper gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 im Western-Blot untersucht (Abb. 9). Bei der Exposition mit 2µM TBT wurde zusätzlich eine Probe mit Anisomycin als

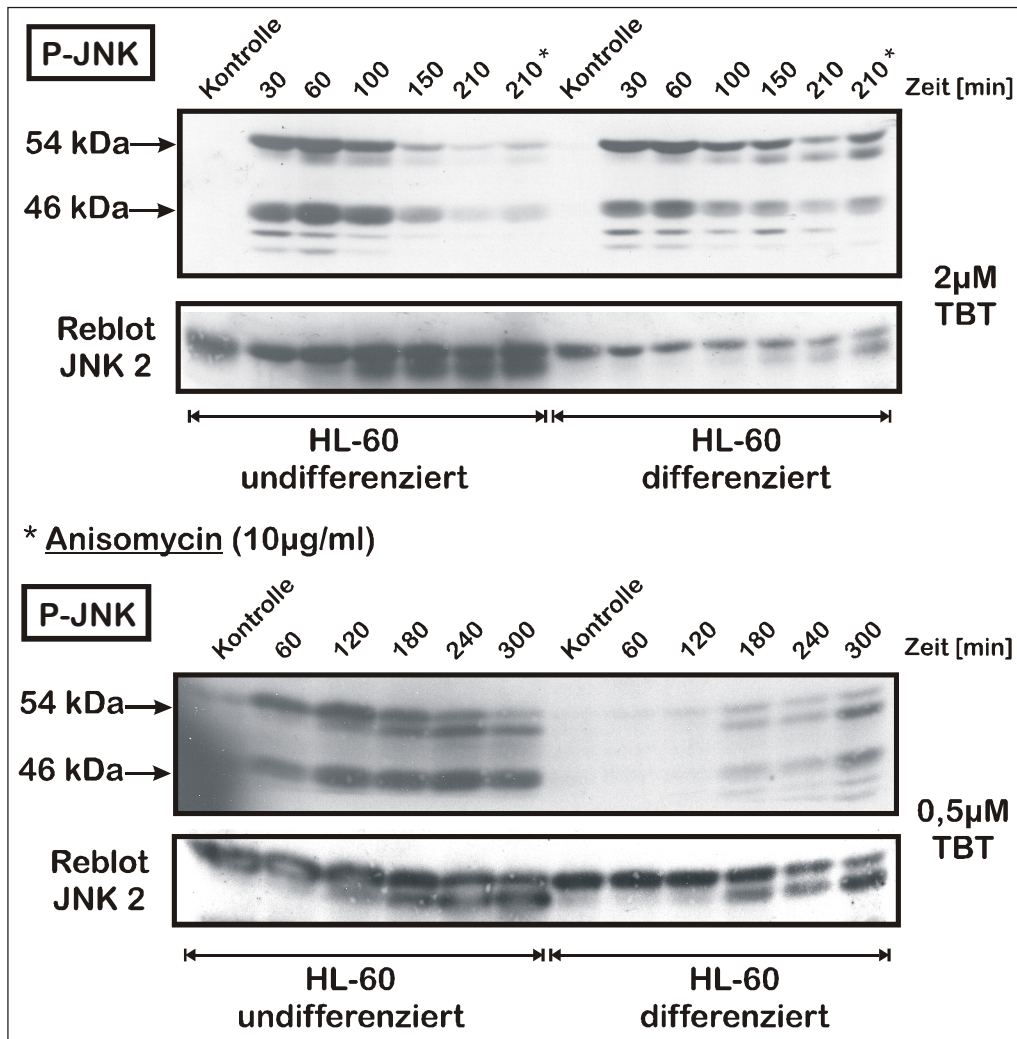
MAP-Kinase Induktor (Meier *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2000) zur Kontrolle eingesetzt. Bei hoher TBT Konzentration wurde ein Maximum der Phosphorylierung von ERK 1 (44kDa) und ERK 2 (42kDa) bereits nach 30 Minuten erreicht mit einem transienten Verlauf über die gemessenen 210 Minuten. Zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Proteinmenge verglichen mit dem *Reblot*. Eine Phosphorylierung von ERK 1/2 durch Anisomycin konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit 0,5 $\mu$ M TBT zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen im Bezug auf das Maximum der Phosphorylierung. Während die undifferenzierten Zellen eine transiente Phosphorylierung mit einem Maximum bei nach 120 Minuten zeigten, war bei den differenzierten Zellen nach 120 Minuten kaum ein Signal zu erkennen. Erst nach 180 Minuten konnte eine stetig stärker werdende Phosphorylierung nachgewiesen werden.



**Abb. 9:** Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von ERK 1 (44kDa) und ERK 2 (42kDa) nach TBT Gabe in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein.

### 5.1.1.2 Phosphorylierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK)/ Stress-aktivierten Protein Kinase (SAPK) nach TBT Gabe

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung der Stresskinasen JNK 1 und JNK 2 wurden mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers im Western-Blot durchgeführt. Nach zeit- und konzentrationsabhängiger Exposition mit TBT (Abb. 10), ergab sich bei undifferenzierten als auch differenzierten HL-60 Zellen nach 60 Minuten und 2µM TBT Gabe ein Maximum der



**Abb. 10:** Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von JNK 1 (46kDa) und JNK 2 (54kDa) nach TBT Gabe in undifferenzierten sowie differenzierten HL-60 Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das JNK 2 Gesamtprotein.

Phosphorylierung mit anschließendem transienten Verlauf. Allerdings zeigten sich bei der folgenden Dephosphorylierung deutliche Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen. Während bei undifferenzierten Zellen bereits nach 150 Minuten der Großteil an JNK dephosphoryliert war, konnte bei differenzierten Zellen nach 210 Minuten noch ein deutliches Signal beobachtet werden. Auch die Anisomycin Kontrolle führte bei

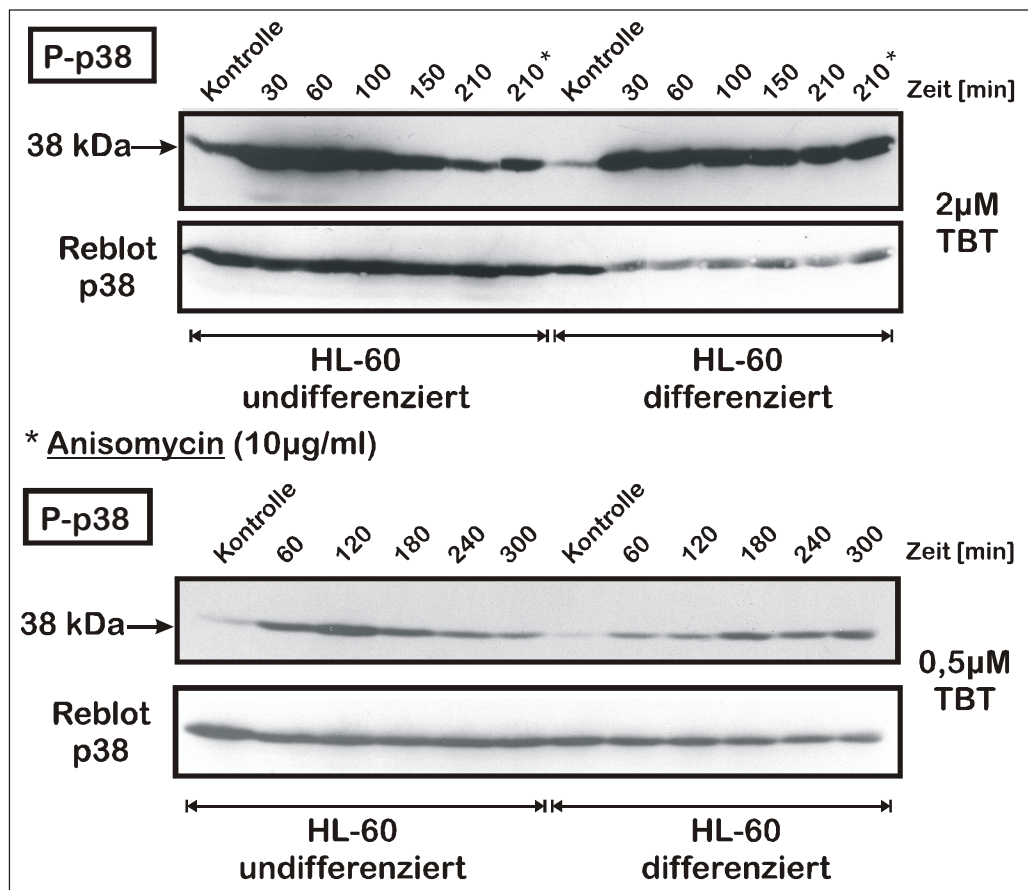
---

undifferenzierten Zellen nur zu einer schwachen Phosphorylierung, während die differenzierten Zellen eine deutliche Phosphorylierung zeigten.

Deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen nach 2 $\mu$ M TBT Exposition, konnte nach Gabe von 0,5 $\mu$ M TBT gemacht werden. Während die undifferenzierten Zellen eine deutliche Phosphorylierung mit einem Maximum nach 120 Minuten und nur schwach transienten Verlauf zeigten, wurde in differenzierten Zellen erst nach 180 Minuten eine sehr schwache Phosphorylierung der Stresskinasen JNK 1/2 beobachtet.

### **5.1.1.3 Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach TBT Gabe**

Als weiteren Vertreter der MAP-Kinase Familie wurde die p38-Kinase mit einem phosphospezifischen Antikörper im Western-Blot auf ihre Phosphorylierung nach zeit- und konzentrationsabhängiger TBT Behandlung untersucht (Abb. 11). Nach Behandlung mit 2 $\mu$ M TBT konnte bei undifferenzierten HL-60 Zellen eine maximale Phosphorylierung nach 30 Minuten mit anschliessendem transienten Rückgang beobachtet werden. Bei differenzierten HL-60 Zellen war das Maximum der p38 Phosphorylierung ebenfalls nach 30 Minuten zu beobachten, allerdings blieb diese Phosphorylierung über den anschliessenden Zeitraum konstant erhalten. Anisomycin führte sowohl in den undifferenzierten als auch in den differenzierten Zellen ohne signifikante Unterschiede zu einer Phosphorylierung von p38. Bei 0,5 $\mu$ M TBT verschob sich das Maximum der Phosphorylierung bei undifferenzierten Zellen auf 120 Minuten mit ebenfalls anschliessendem transienten Verlauf. Die Phosphorylierung von p38 bei differenzierten Zellen, blieb wie bei höherer TBT Konzentration auf konstantem Niveau. Die Stärke der Phosphorylierung war bei niedriger TBT Konzentration jedoch deutlich geringer.

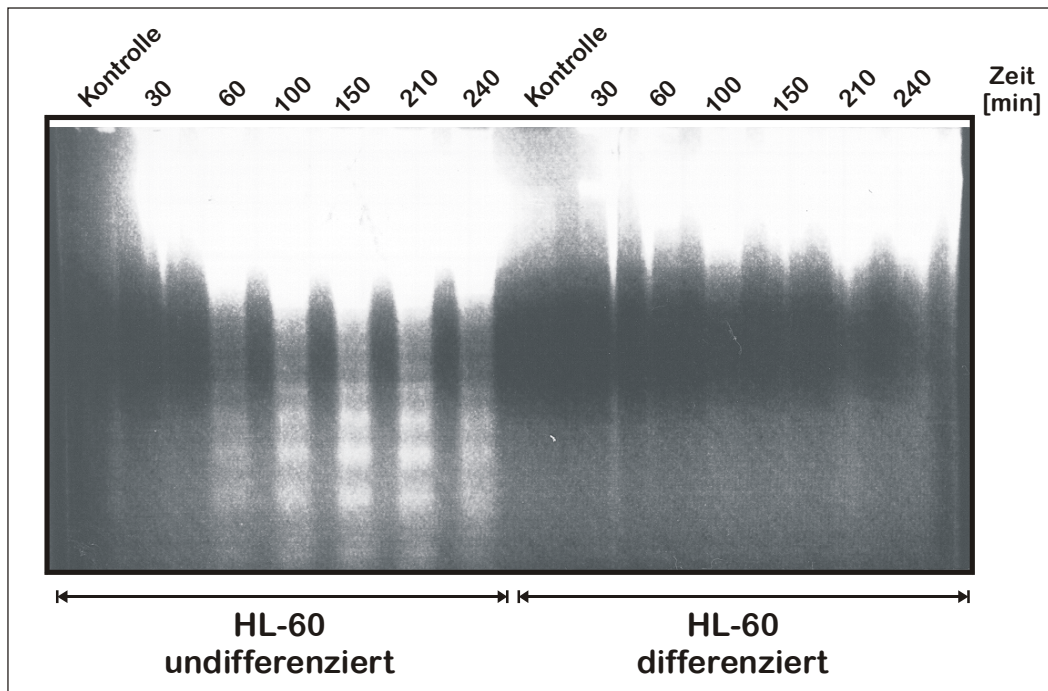


**Abb. 11:** Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von p38 (38kDa) nach TBT Gabe in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das p38 Gesamtprotein.

Neben MAP-Kinasen als Anhaltspunkt für eine Desensibilisierung von differenzierten HL-60 Zellen gegenüber TBT, wurde auch die Apoptose nach TBT Behandlung in dieser Zelllinie als weiterer Marker untersucht.

### 5.1.2 Apoptische DNA-Leiter nach TBT Gabe in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen als Apoptose-Nachweis

Die Untersuchungen zu einer zeitabhängig induzierten DNA-Fragmentierung (apop. DNA-Leiter) nach TBT Exposition (2 μM), ergab signifikante Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen (Abb. 12). Während undifferenzierte Zellen nach 60 minütiger TBT Behandlung eine deutliche DNA-Fragmentierung zeigten, konnte in differenzierten Zellen über den gesamten Zeitraum keine Fragmentierung beobachtet werden.



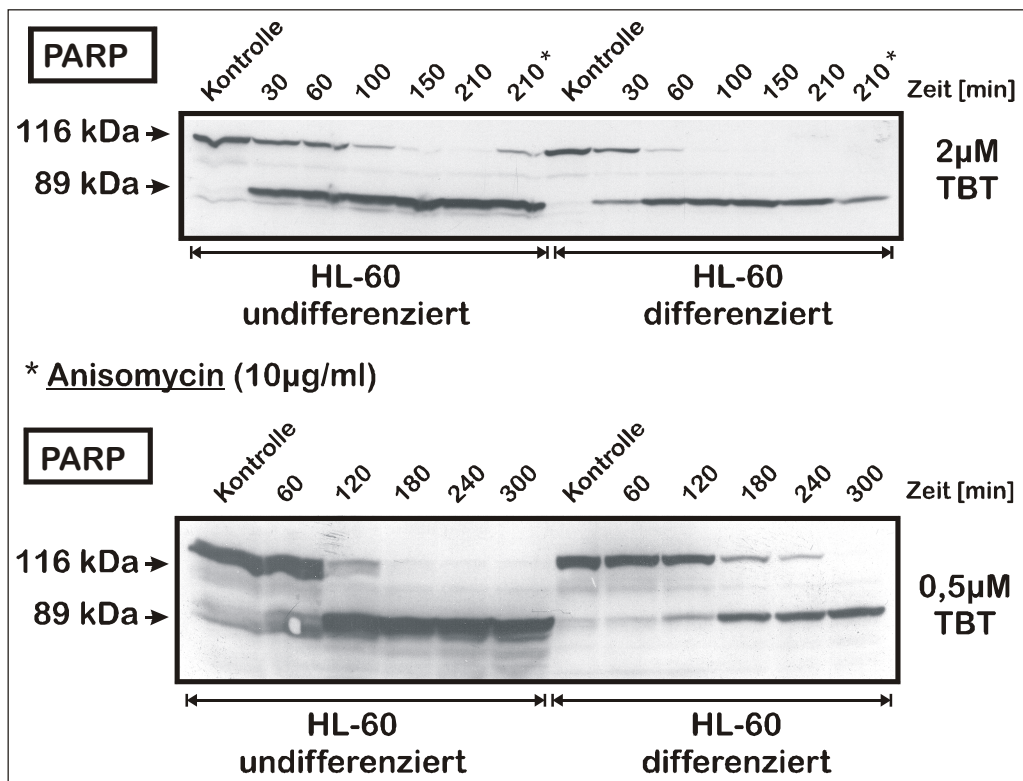
**Abb. 12:** Apoptotische DNA-Leiter in undifferenzierten HL-60 Zellen nach zeitabhängiger TBT Exposition ( $2\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu differenzierten Zellen.

### 5.1.3 Apoptose-Untersuchungen an undifferenzierten als auch differenzierten HL-60 Zellen bezüglich ihrer Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-*cleavage*) nach TBT Gabe

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein wichtiges DNA-Reparaturenzym in Zellen. Nach eingeleiteter Apoptose wird ein etwa 116 kDa großes Protein durch Caspasen, in zwei kleinere Stücke mit je 89 und 24 kDa geschnitten (*cleavage*) und gehört somit zu den Todessubstraten. Jedoch ist dieser Parameter nur bedingt als Endpunkt der Apoptose anzusehen, da auch während der Nekrose Bruchstücke von PARP nachweisbar sind (Gobeil *et al.*, 2001). Daher wurde die Apoptose mit der Untersuchung mehrere Endpunkte detektiert.

Dieses PARP-*cleavage* wurde mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. HL-60 Zellen zeigten deutliche Unterschiede in der Spaltung von PARP in Bezug auf Differenzierung und TBT Konzentration nach TBT Gabe (Abb. 13). Bei hohen TBT Konzentrationen ( $2\mu\text{M}$ ) war PARP in differenzierten HL-60 Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen deutlich schneller vollständig geschnitten. Dieses Bild kehrte sich jedoch bei niedrigerer Konzentration an TBT ( $0,5\mu\text{M}$ ) um. Nun konnte bei undifferenzierten

Zellen eine schnellere vollständige Spaltung von PARP beobachtet werden. Anisomycin führte sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten Zellen zum PARP-cleavage.



**Abb. 13:** Zeit- und konzentrationsabhängige Spaltung von PARP in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen nach TBT Exposition.

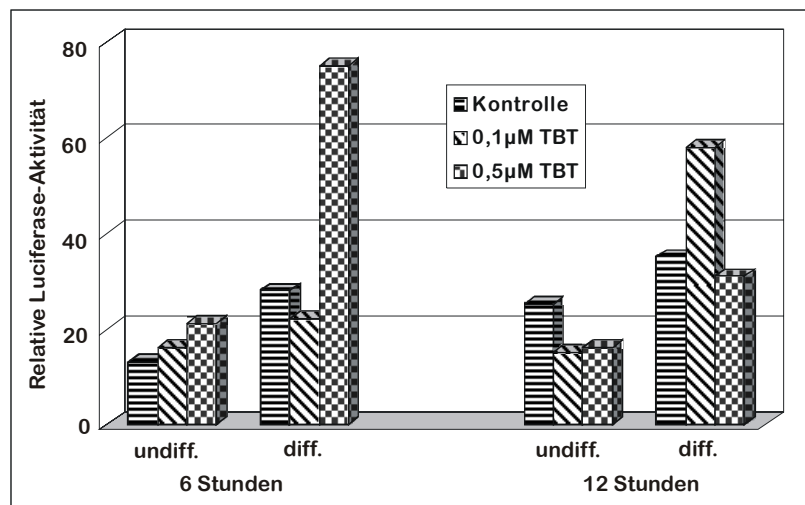
#### 5.1.4 Untersuchungen zum Einfluss von NFκB auf das Überleben von undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen

Der nukleäre Faktor kappa B (NFκB) spielt in der Entwicklung von Resistenzen bzw. dem Überleben von Zellen durch Aktivierung von Genen die z.B. für anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 kodieren, eine entscheidende Rolle (Baichwal & Baeuerle, 1997; Schwartz *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1999; Mayo & Baldwin, 2000). Daher sollte der Einfluss von NFκB in HL-60 Zellen als Antwort auf TBT Behandlung untersucht werden.



#### 5.1.4.1 NFκB Luciferase Reporter-Gen Assay mit undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen nach TBT Exposition

Nach Transfektion von undifferenzierten als auch differenzierten HL-60 Zellen mit einem NFκB Luciferase Reporter-Gen, konnten deutliche Unterschiede in der Aktivierung von NFκB in Abhängigkeit der Reifestadiums beobachtet werden (Abb. 14). Während in differenzierten Zellen eine Zeit- und Dosisabhängigkeit für TBT-Behandlung festgestellt werden konnte, zeigten undifferenzierte Zellen im 12 stündigen Messzeitraum keinerlei NFκB Aktivität nach TBT Zugabe. Nach 6 Stunden Inkubation mit 0,5μM TBT war in differenzierten Zellen ein Maximum an Luciferase-Aktivität messbar. Während dieses Signal nach 12 Stunden praktisch wieder verschwunden war, konnte allerdings mit noch niedrigerer TBT Konzentration [0,1μM TBT] bei differenzierten Zellen das Maximum an Luciferase-Aktivität gerade zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden.



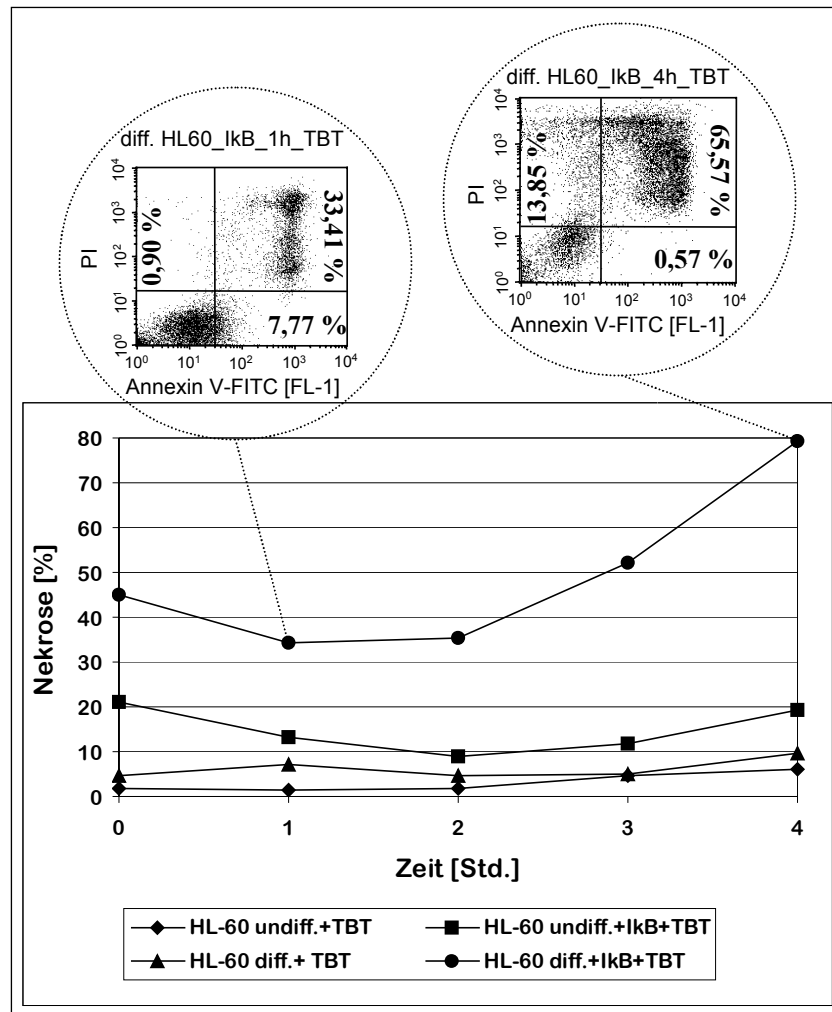
**Abb. 14:** NFκB Luciferase Reporter-Gen Assay mit undifferenzierten (undiff.) und differenzierten (diff.) HL-60 Zellen nach TBT Behandlung in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration. Aufgetragen sind die Maximas der gemessenen Luciferase-Aktivitäten nach 6 und 12 Stunden in einer 12 stündigen Messreihe.

---

#### 5.1.4.2 Inaktivierung von NF $\kappa$ B in undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen durch Transfektion mit Inhibitor-Protein I $\kappa$ B

Zur Festigung der in 3.1.4.1 dargestellten Ergebnisse des NF $\kappa$ B Luciferase Reporter-Gen Assay's, wurde in undifferenzierten (undiff.) als auch differenzierten (diff.) HL-60 Zellen ein Plasmid transfiziert, welches den Inhibitor von kappaB (I $\kappa$ B) exprimiert. In unstimulierten Zellen befindet sich NF $\kappa$ B gekoppelt an Proteine des Inhibitors von kappaB. Soll NF $\kappa$ B aktiviert werden, so wird I $\kappa$ B an spezifischen Serin-Resten in Folge einer Signalkaskade phosphoryliert. Dadurch kann I $\kappa$ B ubiquitiniert und im Anschluss abgebaut werden. NF $\kappa$ B liegt nun frei im Cytosol vor und kann in den Zellkern wandern, wo es an entsprechende Gen-Regionen bindet und Proteine zum Schutze der Zelle produziert werden (Schwartz *et al.*, 1999). Es wurde eine mutierte Form von I $\kappa$ B $\alpha$  in die Zellen transfiziert und überexprimiert. Bei diesem I $\kappa$ B $\alpha$  sind die Serin-Reste an den Positionen 32 und 36 jeweils zu Alanin mutiert. Dadurch kann dieses I $\kappa$ B nicht phosphoryliert und nachfolgend auch nicht abgebaut werden. Es stellt dadurch einen potenten NF $\kappa$ B-Inhibitor dar (Vallabhapurapu *et al.*, 2001). Durch FACS-Messungen (Annexin V-FITC / Propidiumiodid Assay) wurde die Anzahl der Nekrosen ermittelt. Eine prozentuale Darstellung in Abhängigkeit von Zellstadium und Zeit nach 0,5 $\mu$ M TBT Behandlung ist in Abbildung 15 dargestellt. Die nicht transfizierten Kontroll-Zellen zeigten sowohl im undiff. als auch im diff. Stadium im FACS-Gerät einen nur sehr schwachen Anstieg an Nekrosen als auch Apoptosen im Zeitraum über 4 Stunden. Dagegen war in transfizierten Zellen, besonders in diff. HL-60 Zellen, ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Beide transfizierten Zellstadien zeigten zunächst einen Rückgang der Nekrosen innerhalb der ersten 1 bis 2 Stunden nach TBT Gabe. Während sich bei transfizierten undiff. Zellen nach 4 Stunden der prozentuale Anteil an Nekrosen wieder auf etwa das Ausgangsniveau erhöht hatte, stiegen die Nekrosen in den diff. Zellen massiv an. Von 45,16 % zu Beginn auf 79,42 % nach 4 Stunden bei den diff. HL-60 Zellen. Im Vergleich dazu konnte in undiff. Zellen ein geringer Abfall von 21,25 % auf 19,15 % nach 4 Stunden festgestellt werden..

Es konnte zudem beobachtet werden, dass sowohl undiff. als auch diff. HL-60 nach Transfektion ihre Proliferation einstellten.



**Abb. 15:** NFκB Inhibierung in undifferenzierten als auch differenzierten HL-60 Zellen durch Überexpression von mutiertem IκB und die Auswirkungen auf eine zeitabhängige Exposition mit TBT (0,5μM). Aufgetragen sind die prozentualen Nekrosen in Abhängigkeit von Zellstatus (diff. bzw. undiff.) und Zeit.

## 5.2 Untersuchungen zur Resistenzentwicklung an Cisplatin sensitiven und resistenten Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

Bei den hier für die Untersuchungen verwendeten Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) wurde TBT zur Apoptose-Induktion eingesetzt. So sollten Veränderungen der Zelle bezüglich ihrer Signaltransduktionswege und des Apoptose-Verhaltens untersucht werden. Diese Veränderungen können eine Ursache für die Resistenzentwicklung in Zellen sein (Strasser *et al.*, 1997; Macnamara *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2001; Grossman & Altieri, 2001). MEXF 276L ist eine Zelllinie, die aus einem Patienten stammte, bei dem der Tumor sensitiv auf Cisplatin ansprach. Bei den Tumoren der

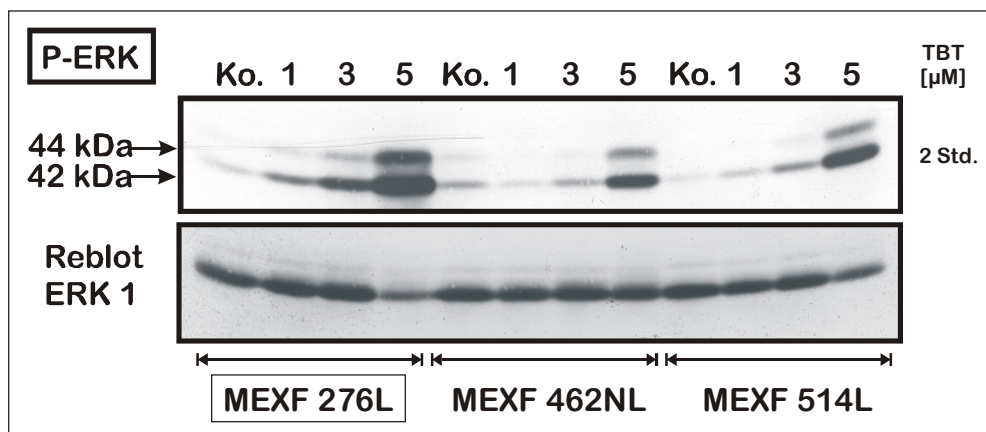
beiden anderen Zelllinien, MEXF 462NL und MEXF 514L, wurde in der klinischen Behandlung eine Resistenz gegenüber Cisplatin festgestellt.

## 5.2.1 Ergebnisse zur TBT-induzierten Aktivierung von MAP-Kinasen in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

### 5.2.1.1 Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 nach TBT Gabe in MEXF Zellen

Für Untersuchungen ob unter dem Einfluss von TBT eine Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK's) stattfindet, wurden die drei Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L über einen Zeitraum von 2 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen (1/3/5 $\mu$ M) von TBT exponiert (Abb. 16). In allen drei Zelllinien konnte mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form von ERK 1 (44kDa) und ERK 2 (42kDa) im Western-Blot eine maximale Phosphorylierung nach Behandlung mit 5 $\mu$ M TBT festgestellt werden. Zwischen den einzelnen Zelllinien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Als Ladekontrolle wurde nach „strippen“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.

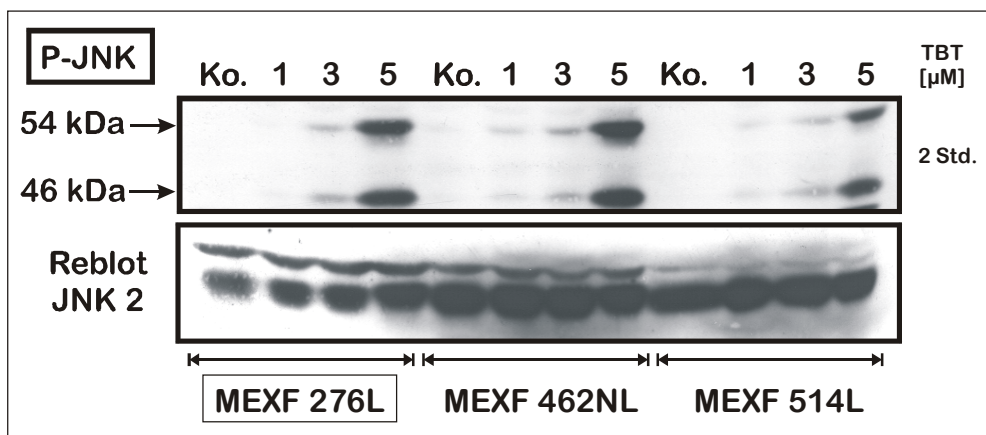


**Abb. 16:** Phosphorylierungs-Status von ERK 1 (44kDa) und ERK 2 (42kDa) nach 2 stündiger Behandlung mit unterschiedlichen TBT-Konzentrationen in MEXF-Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein.

### 5.2.1.2 Phosphorylierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK)/ Stress-aktivierten Protein Kinase (SAPK) nach TBT Gabe in MEXF Zellen

Ebenso wie schon ERK, wurde auch die Jun-N-terminalen Kinase (JNK) bzw. Stress-aktivierten Protein Kinase (SAPK), auf eine Aktivierung nach TBT Behandlung untersucht. Auch hier wurden alle drei Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L über einen Zeitraum von 2 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1/3/5 $\mu$ M) an TBT behandelt (Abb. 17). Es konnte in allen drei Zelllinien eine maximale Phosphorylierung nach 5 $\mu$ M TBT Exposition festgestellt werden. Für die Untersuchungen wurde ein phosphospezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte Form von JNK 1 (46kDa) und JNK 2 (54kDa) im Western-Blot verwendet. Zwischen den einzelnen Zelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Nach dem „strippen“ der Membran, wurde als Ladekontrolle ein Reblot mit einem Antikörper gegen das JNK 2 Gesamtprotein durchgeführt.



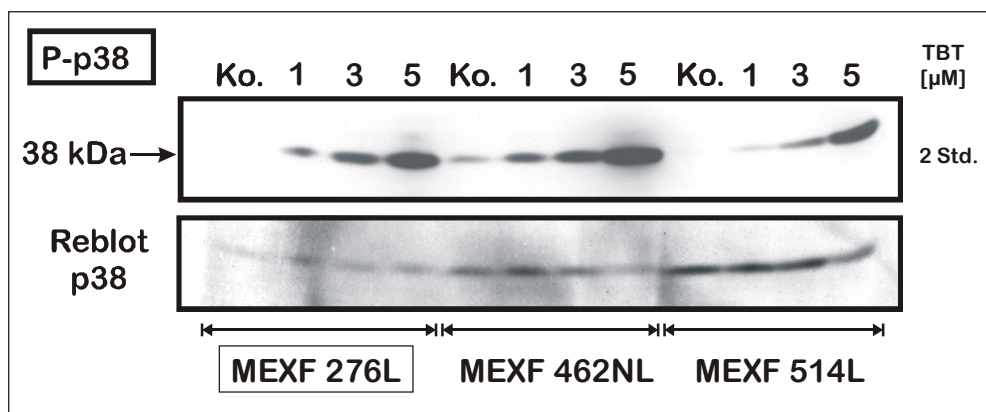
**Abb. 17:** Phosphorylierungs-Status von JNK 1 (46kDa) und JNK 2 (54kDa) nach 2 stündiger TBT Behandlung mit steigenden Konzentrationen in MEXF-Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen das JNK 2 Gesamtprotein.

### 5.2.1.3 Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach TBT Gabe in MEXF Zellen

Als letzter Vertreter der MAP-Kinasen, wurde die Stress-aktivierte p38-Kinase auf eine Phosphorylierung nach TBT Behandlung untersucht. Wie schon bei den Untersuchungen über eine Aktivierung von ERK und JNK, wurden alle drei Zelllinien (MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L) über einen Zeitraum von 2 Stunden mit einer steigenden

Konzentration (1/3/5 $\mu$ M) an TBT behandelt (Abb. 18). In allen drei Zelllinien wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die phosphorylierte Form von p38 (38kDa) im Western-Blot eine maximale Phosphorylierung nach 5 $\mu$ M TBT Gabe festgestellt. Unter den einzelnen MEXF Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

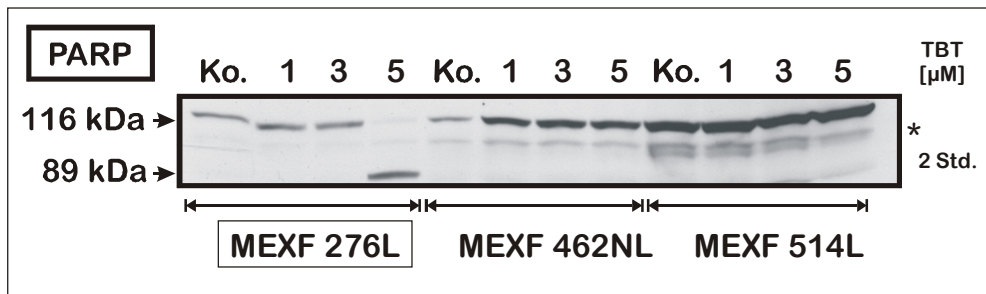
Zur Ladekontrolle wurde nach „strippen“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das p38 Gesamtprotein durchgeführt.



**Abb. 18:** Phosphorylierungs-Status von p38 (38kDa) nach 2 stündiger konzentrationsabhängiger TBT Exposition in MEXF-Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das p38 Gesamtprotein.

### 5.2.2 Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-cleavage) als Apoptose-Nachweis nach TBT Gabe in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

Um Erkenntnisse über das Apoptose-Verhalten der MEXF-Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L nach TBT Exposition zu erhalten, wurden alle drei Zelllinien über einen Zeitraum von 2 Stunden mit 1, 3 und 5 $\mu$ M TBT behandelt (Abb. 19). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die von einem in klinischer Behandlung Cisplatin-sensitiven Tumor abstammenden Zelllinie MEXF 276L, auch hier als einzige der drei Zelllinien sensitiv auf TBT reagierte und eine Spaltung von PARP zeigte. Die beiden anderen MEXF-Zelllinien zeigten keinerlei PARP-cleavage.



**Abb. 19:** TBT induziertes PARP-cleavage in MEXF 276L Zellen nach 2 Stunden bei 5 μM TBT. Die Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L verhielten sich resistent gegenüber der TBT Exposition. In diesem Gel sind bereits zwischen den PARP-Banden einige unspezifische Banden zu erkennen (\*), die später ebenfalls noch eine Rolle spielen.

### 5.2.3 Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-cleavage) als Apoptose-Nachweis nach Cisplatin (CDDP) Behandlung in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

Die Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L wurden ebenfalls bezüglich ihrer Apoptose Induktion durch Cisplatin (CDDP) untersucht. Hierbei sollten die von der Tumorbiologie in Freiburg durchgeführten Untersuchungen bezüglich Cisplatin in diesen drei Zelllinien überprüft werden. Dort wurden in einer 96-Lochplatte Monolayer der MEXF-Zellen mit einem Propidium-Iodide Assay bezüglich ihres IC<sub>50</sub> Wertes (*Inhibiting Concentration*) nach Cisplatin Gabe analysiert. Hierbei ergaben sich folgende IC<sub>50</sub> Werte:

IC<sub>50</sub>MEXF 276L = 0,313 μg/ml CDDP

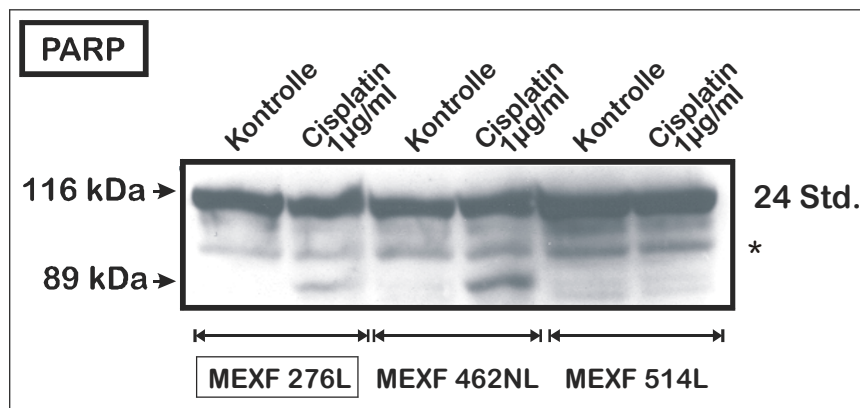
IC<sub>50</sub>MEXF 462 NL = 0,144 μg/ml CDDP

IC<sub>50</sub>MEXF 514L = 1,262 μg/ml CDDP (Werte Tumorbiologie Freiburg)

Diese Ergebnisse waren erstaunlich, da der Patienten-Tumor der MEXF 462 NL Zelllinie in klinischer Behandlung resistent gegenüber Cisplatin war.

Eigene Versuche bestätigten diese Ergebnisse (Abb. 20). Alle 3 Zelllinien wurden 24 Stunden lang mit 1 μg/ml Cisplatin behandelt und anschließend im Western-Blot bezüglich ihres PARP-cleavage untersucht. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Zelllinie MEXF 276L, als auch die Zelllinie MEXF 462NL eine Spaltung von PARP als Zeichen von

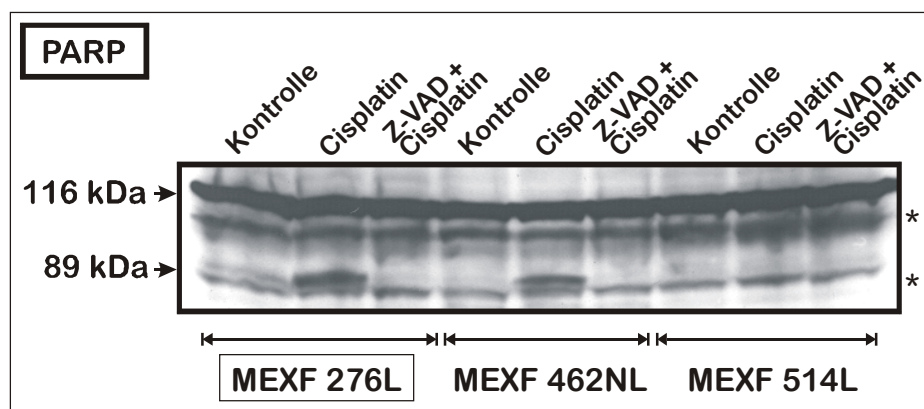
Apoptose zeigte. Die MEXF 514L Zelllinie hatte dagegen keinerlei Anzeichen eines PARP-*cleavage*, war also resistent gegenüber der Cisplatin Behandlung.



**Abb. 20:** Cisplatin (1µg/ml) induziertes PARP-*cleavage* in MEXF 276L und MEXF 462NL Zellen nach 24 stündiger Behandlung. MEXF 514L Zellen zeigten sich resistent gegenüber Cisplatin. \*: unspezifische Banden.

#### 5.2.4 Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-*cleavage*) durch Inhibierung von Caspasen nach Cisplatin (CDDP) Behandlung in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

Um den Einfluss von Caspasen auf eine Cisplatin vermittelte Apoptose (Seki *et al.*, 2000) in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) zu untersuchen, wurden MEXF Zellen mit 50µM des generellen Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK (R&D Systems, Wiesbaden) 90 Minuten lang



**Abb. 21:** Caspasen abhängige Spaltung von PARP in MEXF 276L und MEXF 462NL Zellen nach 24 stündiger Cisplatin Behandlung. Durch 90 minütige Vorinkubation der Zellen mit 50µM des Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK, konnte eine Spaltung von PARP verhindert werden. MEXF 514L war resistent gegen Cisplatin. \*: unspezifische Banden.

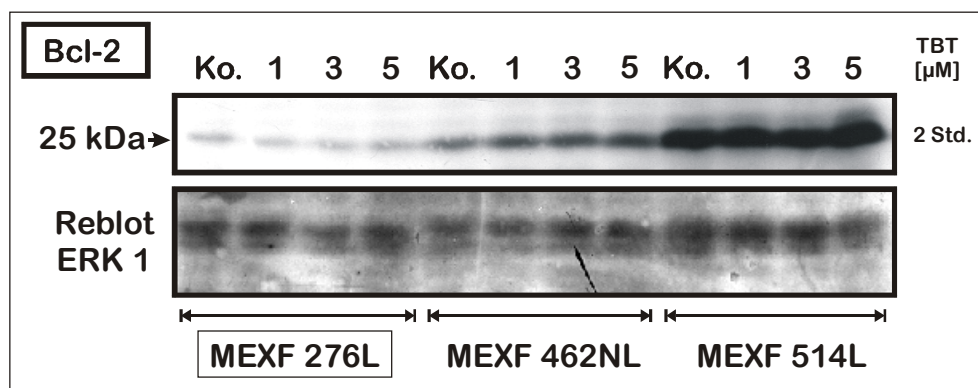


vorinkubiert. Danach wurden die Zellen 24 Stunden lang mit 1 µg/ml Cisplatin behandelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide für Cisplatin sensitive Zelllinien MEXF 276L und MEXF 462NL (siehe 3.2.3) nach Inhibierung der Caspasen, keinerlei PARP-*cleavage* im Vergleich zu ihren Cisplatin Positiv-Kontrollen aufwiesen (Abb. 21). Die Zelllinie MEXF 514L war resistent gegenüber einer Cisplatin Behandlung und zeigte kein PARP-*cleavage*.

### 5.2.5 Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF)

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Überexpression von Bcl-2 Zellen vor induzierter Apoptosis wie z.B. durch Cisplatin schützen kann (Xie *et al.*, 1996; Mollinedo *et al.*, 1997; Mano *et al.*, 1999; Rabinovitch *et al.*, 1999). Bcl-2 kann die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindern (siehe Abb. 7), und so wirkungsvoll eine mitochondriale Aktivierung von Apoptose auslösenden Caspasen inhibieren (Vander Heiden & Thompson, 1999).

In Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF), konnte im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Bcl-2, eine deutliche Überexpression in den Zelllinien MEXF 514L und eine etwas schwächere in MEXF 462NL nachgewiesen werden. MEXF 276L Zellen hatten



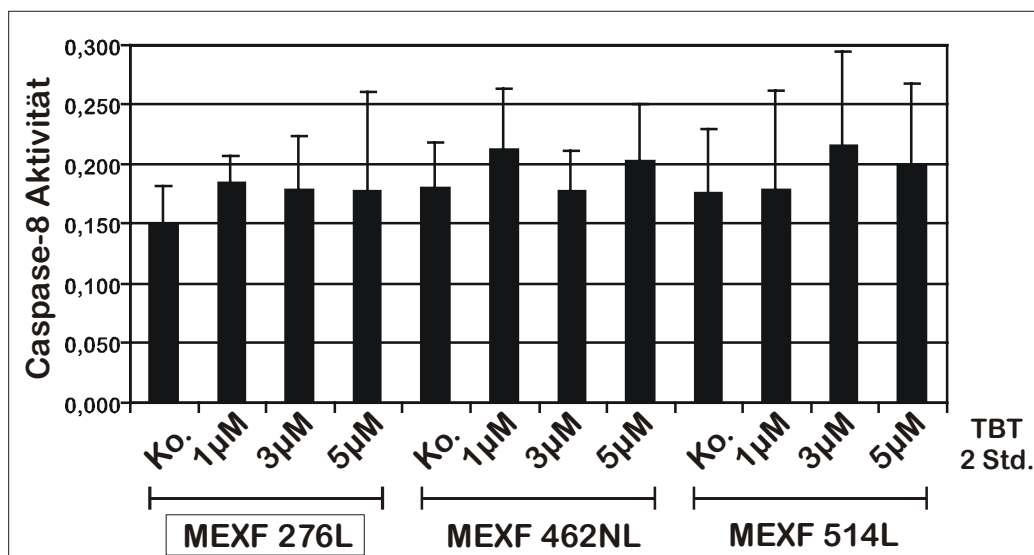
**Abb. 22:** Bcl-2 Expression in den Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L (Western-Blot). Die Expressionsstärke war unabhängig von der TBT Exposition. Reblot: Ladekontrolle mit einem ERK 1 Antikörper gegen das Gesamtprotein.

dagegen eine nur sehr schwache Bcl-2 Expression. Die Stärke der Bcl-2 Expression war unabhängig von der 2 stündigen TBT Behandlung (Abb. 22).

Als Ladekontrolle wurde nach „*strippen*“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.

### 5.2.6 Aktivierung der Caspase-8 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach Behandlung mit TBT

Mit Hilfe des Caspase-8 Aktivitäts-Assays konnte in den untersuchten Melanoma Xenograft Zelllinien nach 2 stündiger konzentrationsabhängiger TBT Behandlung keine eindeutige Caspase-8 Aktivierung nachgewiesen werden. Die Messungen wurden in 3 voneinander unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Es wurde der Mittelwert berechnet und der statistische Fehler bestimmt (Abb. 23).



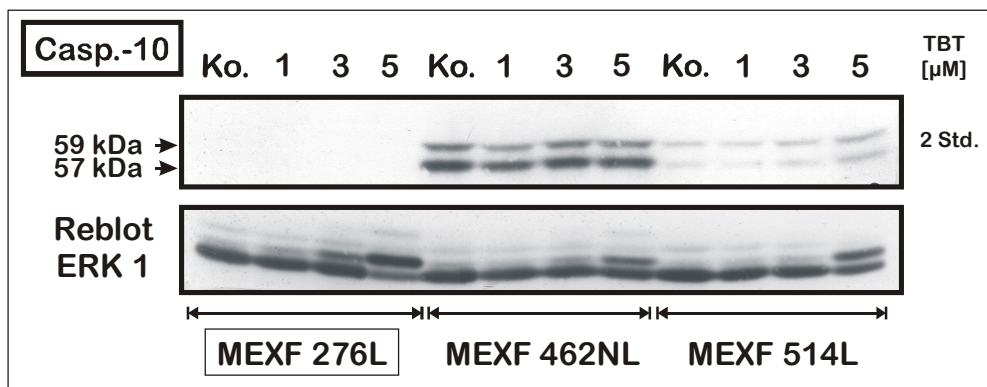
**Abb. 23:** Caspase-8 Aktivitäts-Test mit Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach 2 stündiger TBT Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen. Es wurden 3 unabhängige Messungen durchgeführt und daraus die Standardabweichung berechnet.

### 5.2.7 Keine Aktivierung der Caspase-10 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach TBT Behandlung

Im Western-Blot Versuch wurde die Rolle der Caspase-10 nach 2 stündiger TBT Exposition in Melanoma Xenograft Zelllinien untersucht. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen

an TBT (1/3/5 $\mu$ M) eingesetzt und mit einem Antikörper gegen die ungeschnittene Procaspase-10 deren Aktivierung überprüft. Eine Aktivierung hätte das Verschwinden der 57/59 kDa Banden zur Folge. MEXF 276L Zellen besitzen keine Caspase-10, da auch in der Kontrolle keine Doppelbande der Procaspase-10 nachgewiesen werden konnte. In MEXF 462NL Zellen ist die Procaspase-10 zwar vorhanden, wurde aber nach TBT Stimulierung der Zellen nicht geschnitten und somit nicht aktiv. Bei der MEXF 514L Zelllinie ist die Procaspase-10 nur sehr schwach vorhanden. Wie bei den MEXF 462NL Zellen wird auch hier die Procaspase-10 nach TBT Exposition nicht aktiviert (Abb. 24).

Zur Ladekontrolle wurde nach „strippen“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.

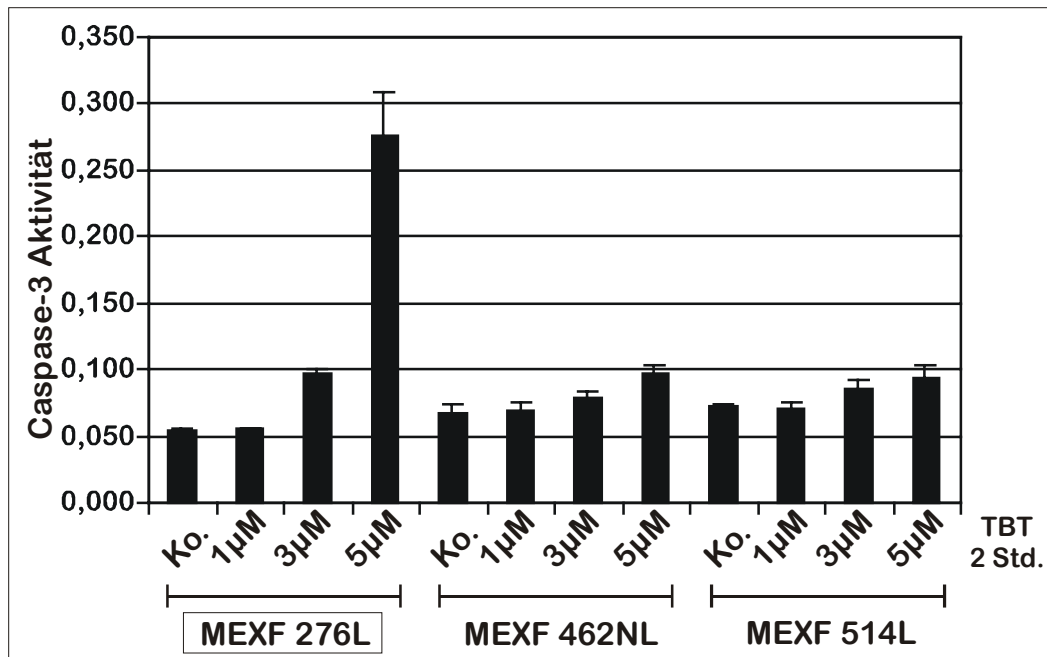


**Abb. 24:** Keine Caspase-10 Aktivierung in Melanoma Xenograft Zelllinien nach 2 stündiger TBT Exposition. Eine Aktivierung der Caspase-10 ist durch den Verlust der Procaspase-10 Banden (57/59 kDa) gekennzeichnet. In MEXF 276L Zellen konnte keine Procaspase-10 nachgewiesen werden. Reblot: Zur Ladekontrolle wurde ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.

### 5.2.8 Aktivierung der Caspase-3 in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach konzentrationsabhängiger TBT Inkubation

Untersuchungen in einem Caspase-3 Aktivitäts-Assay, deuteten auf deutliche Unterschiede zwischen den Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L hin. Nach 2 stündiger TBT Exposition mit unterschiedlichen TBT Konzentrationen (1/3/5 $\mu$ M), konnte bei MEXF 276L Zellen und 5 $\mu$ M TBT eine deutliche Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 25). Bei den Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L wurde die Caspase-3 Aktivität nur sehr gering mit zunehmender TBT Konzentration erhöht. Zur Bestimmung der Werte, wurden 3 voneinander unabhängige Messungen an

unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Von den Messergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt.

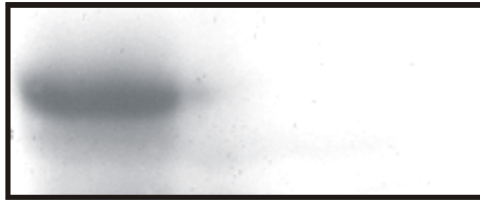


**Abb. 25:** Caspase-3 Aktivitäts-Test mit Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach 2 stündiger TBT Exposition. Es wurden 3 unabhängige Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

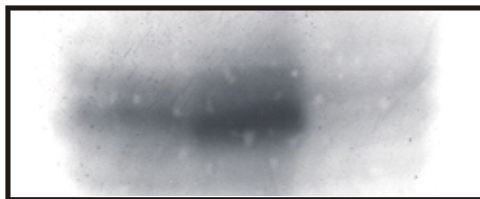
## 5.2.9 Untersuchungen zur Ausstattung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit Todes- und *Decoy*-Rezeptoren

### 5.2.9.1 Todesrezeptoren

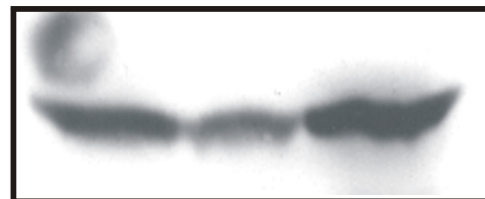
Untersuchungen zur Rezeptorausstattung der Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot, zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien (Abb. 26). Fas-Rezeptoren konnten nur in MEXF 276L Zellen gefunden werden. TNF-R1 wurde in MEXF 462NL sehr stark und in MEXF 276L etwas geringer exprimiert. TNF-R2 konnte in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch ist er in MEXF 462NL im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien geringer vorhanden. Die Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 konnten in allen drei Zelllinien ohne signifikante Unterschiede identifiziert werden.

**Fas (~ 48 kDa):**

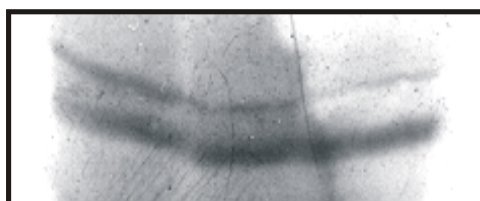
MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
--------------	---------------	--------------

**TNF-R1 (~ 55 kDa):**

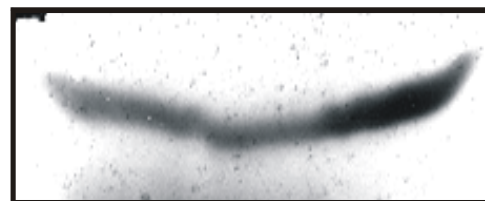
MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
--------------	---------------	--------------

**TNF-R2 (~ 75 kDa):**

MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
--------------	---------------	--------------

**TRAIL-R1 (~ 55 kDa):**

MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
--------------	---------------	--------------

**TRAIL-R2 (~ 55 kDa):**

MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
--------------	---------------	--------------

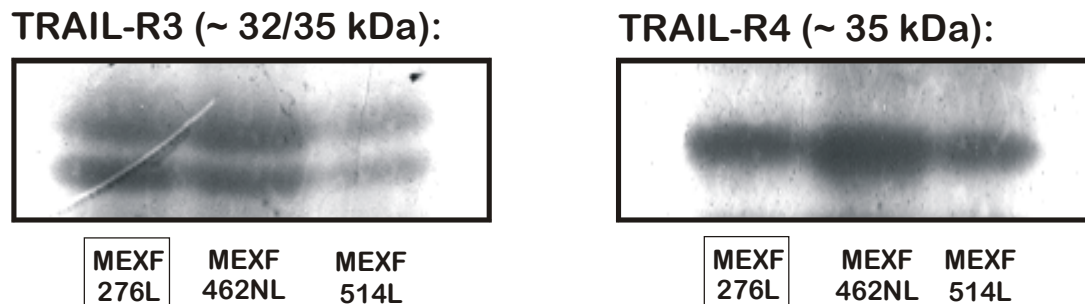
**Abb. 26:** Untersuchungen zur Zellausstattung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit Todesrezeptoren durch spezifische Antikörper.

### 5.2.9.2 Decoy-Rezeptoren

Decoy-Rezeptoren stehen unter Verdacht Apoptose verhindern zu können, indem sie die Liganden der Todesrezeptoren „wegfangen“ und so eine Einleitung der Signaltransduktion verhindern. Dies sind im Falle von TRAIL, die TRAIL Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 (Ashkenazi & Dixit, 1999).

Western-Blots zur *Decoy*-Rezeptorausstattung der Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L mit spezifischen Antikörpern gegen die Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4, zeigten Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den untersuchten Zelllinien (Abb. 27). TRAIL-R3 konnte in allen drei Zelllinien nachgewiesen

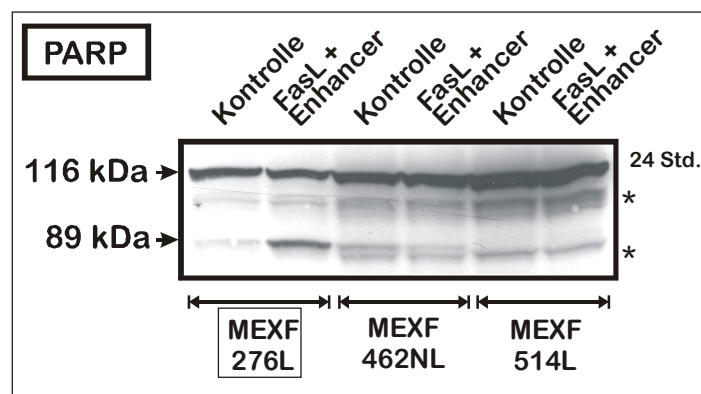
werden. Allerdings ist dieser Rezeptor in MEXF 514L Zellen nur sehr gering vorhanden. TRAIL-R4 konnte ebenfalls in allen drei Zelllinien gefunden werden, jedoch hatten MEXF 462NL Zellen die stärkste Expression für diesen Rezeptor.



**Abb. 27:** Untersuchungen zur Zellausstattung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit *Decoy*-Rezeptoren durch spezifische Antikörper.

### 5.2.10 Stimulierung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit Fas-Liganden bezüglich der Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-*cleavage*)

Wie sich unter Punkt 3.2.9.1 herausstellte, sind nur MEXF 276L Zellen mit einem Fas Rezeptor ausgestattet. Um dieses Ergebnis zu verstärken, wurden alle drei untersuchten Melanoma Xenograft Zelllinien 24 Stunden lang zusätzlich mit 100 ng/ml Fas-Liganden



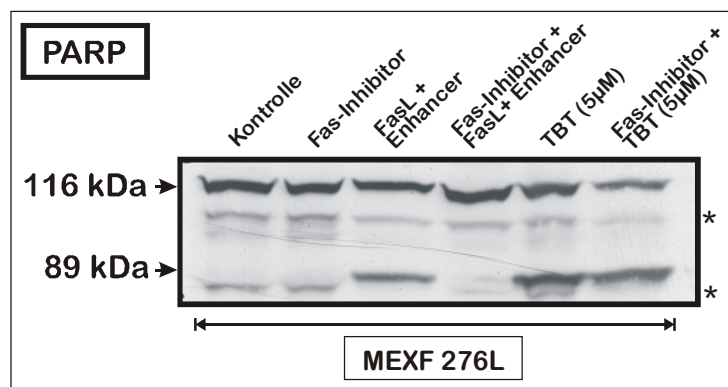
**Abb. 28:** Induzierung von PARP-*cleavage* in MEXF 276L Zellen durch 100ng/ml Fas-Liganden (FasL) + 1µl/ml Enhancer nach 24 Stunden. In MEXF 462NL und MEXF 514L konnte keine Spaltung von PARP nachgewiesen werden.

\*: unspezifische Banden.

(FasL) mit 1µl/ml dazugehörigen Enhancer behandelt. Wie zu erwarten war, demonstrierte nur die Fas positive Zelllinie MEXF 276L eine Spaltung von PARP (Abb. 28). Die Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L zeigten als Fas negative Zelllinien dagegen keinen PARP-*cleavage*.

### 5.2.11 Keine TBT abhängige Fas-Rezeptoraktivierung in MEXF 276L Zellen

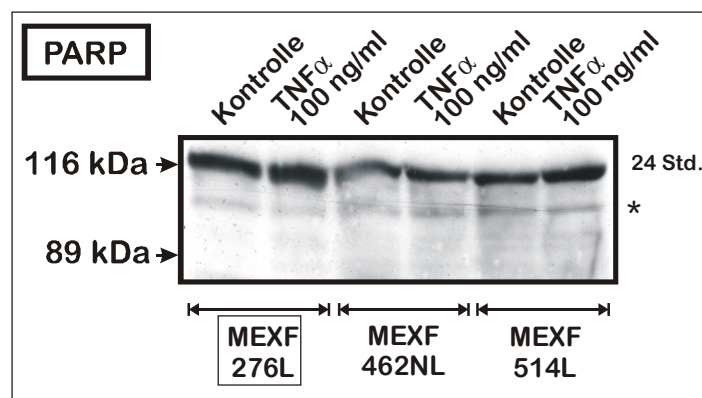
Um eine mögliche Aktivierung des Fas-Rezeptors mit dazugehöriger Signalkaskade durch TBT feststellen zu können, wurde die Fas positive Melanoma Xenograft Zelllinie MEXF 276L mit 1µg/ml Fas inhibierenden Antikörper für 1 Stunde vorbehandelt (neutralisierendes Anti-Human Fas, Upstate, USA). Danach wurde diese Probe 24 Stunden lang mit 100ng/ml Fas Liganden (FasL) sowie 1µl/ml des dazugehörigen Enhancers behandelt um die Wirksamkeit des Fas Inhibitors zu überprüfen. Im anschliessenden Western-Blot konnte keine Spaltung von PARP festgestellt werden (Abb. 29). Eine Kontrolle mit FasL und Enhancer, wies dagegen eine deutlich Spaltung von PARP nach 24 Stunden auf. Zur Überprüfung einer möglichen Toxizität des Inhibitors, wurde ebenfalls eine Probe nur mit Fas Inhibitor untersucht. Dies hatte keine Spaltung von PARP zur Folge. Um nun ein Fas abhängiges PARP-*cleavage* nach TBT Gabe zu untersuchen, wurde eine Probe als Kontrolle für 2 Stunden mit 5µM TBT behandelt und zeigte eine deutliche Spaltung von PARP. In der für 1 Stunde mit Fas-Inhibitor vorbehandelten und anschliessend für 2 Stunden mit TBT behandelten Probe, konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe festgestellt werden. Die Spur dieser Probe lief etwas breiter, wodurch der Eindruck eines schwächeren Signals entstehen könnte. Allerdings ist sowohl die Bande bei 116kDa als auch bei 89kDa etwas schwächer ausgeprägt, so dass von keiner Abschwächung des Signals nach Inhibitor und TBT Gabe gesprochen werden kann.



**Abb. 29:** Keine Erniedrigung des PARP-*cleavage* nach Fas Inhibierung und TBT Exposition in MEXF 276L Zellen im Western-Blot. \*: unspezifische Banden.

### 5.2.12 Keine Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-*cleavage*) in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) nach TNF $\alpha$ Inkubation

Um die Rolle der Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 zu untersuchen (vergleiche 3.2.9.1), wurden die Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L, 24 Stunden lang mit 100ng/ml humanem TNF $\alpha$  (Pharmingen, Heidelberg) exponiert. Keine der Zelllinien zeigte im anschliessenden Western-Blot eine Spaltung von PARP (Abb. 30).



**Abb. 30:** Kein PARP-*cleavage* in Melanoma Xenograft Zelllinien nach 24 stündiger TNF $\alpha$  (100ng/ml) Exposition. \*: unspezifische Banden.

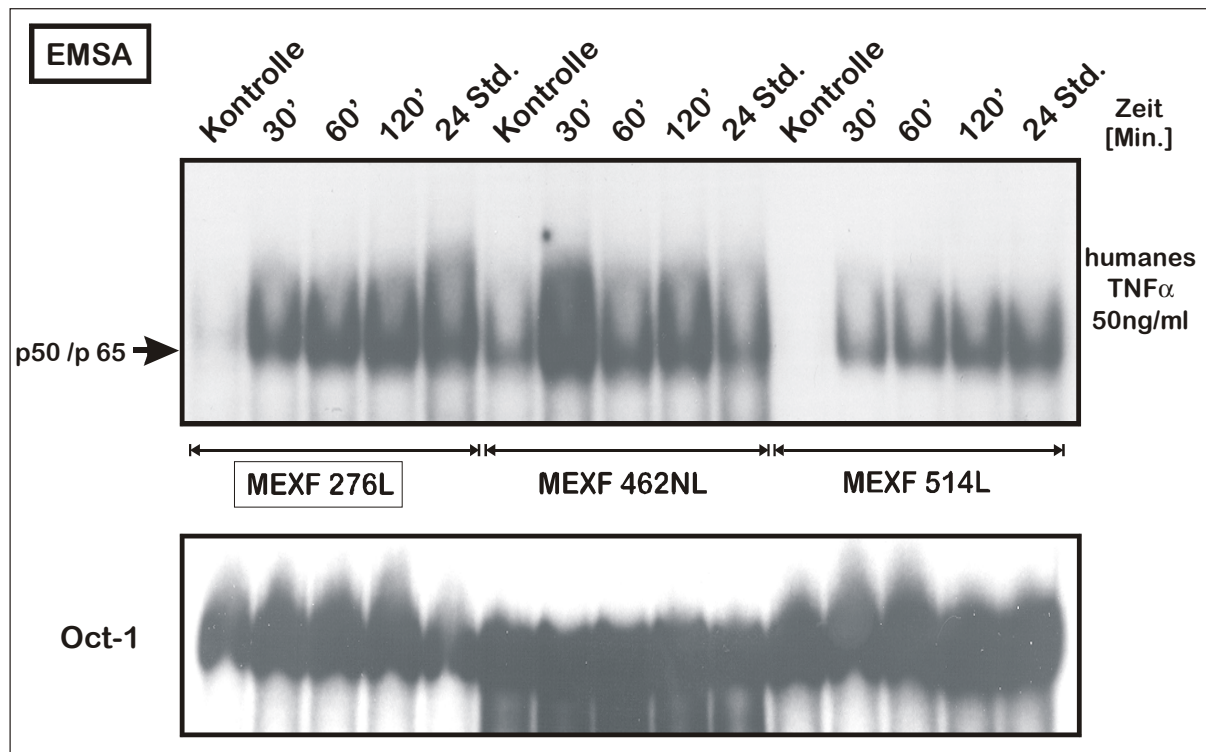
### 5.2.13 Aktivierung von NF $\kappa$ B in Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) durch TNF Inkubation

Da durch TNF $\alpha$  Gabe in den Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L keine Apoptose ausgelöst werden konnte (siehe 3.2.12), jedoch über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 ebenfalls der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert werden kann (Baud & Karin, 2001), wurde die DNA-Bindefähigkeit von NF $\kappa$ B im EMSA Test (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) überprüft. Hierzu wurden alle drei MEXF Zelllinien über einen Zeitraum von 30, 60 und 120 Minuten, sowie 24 Stunden mit 50ng/ml humanem TNF $\alpha$  (Pharmingen, Heidelberg) exponiert. Von diesen Proben wurden Kernextrakte präpariert und von diesen anschliessend 5 $\mu$ g an Kernproteinen auf ihre NF $\kappa$ B DNA-Bindefähigkeit untersucht. MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen,



zeigten bereits alle nach 30 Minuten eine deutliche Aktivierung von NF $\kappa$ B, die über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden erhalten blieb (Abb. 31 oben).

Zusätzlich wurden die Proben auf ihre DNA-Bindefähigkeit zum Transkriptionsfaktor Oct-1 untersucht, um so die Qualität der Proben als Ladekontrolle festzustellen. Die Proben zeigten untereinander ein gleichmässiges Signal, was auf eine erfolgreich Isolierung der Kernextrakte hindeutet (Abb. 31 unten).



**Abb. 31:** Untersuchungen zur TNF $\alpha$  (50ng/ml) induzierten DNA-Bindung von NF $\kappa$ B nach zeitabhängiger Exposition durch EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) in Melanoma Xenograft Zelllinien. Zur Ladekontrolle wurden die Proben zusätzlich mit einer Oct-1 „Sonde“ überprüft.

#### 5.2.14 Stimulierung von Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) mit TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

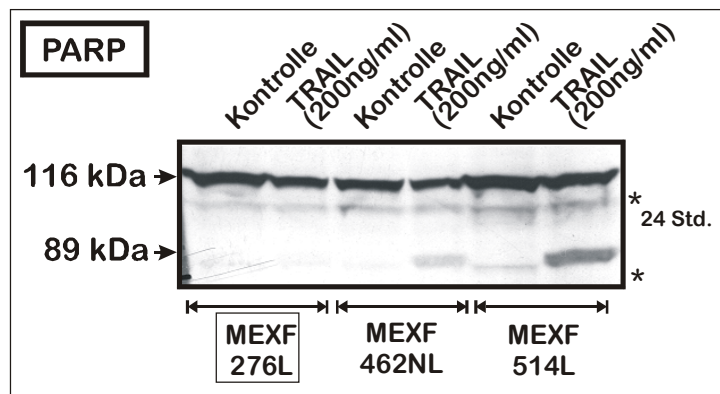
Untersuchungen zur Rezeptorausstattung der verwendeten Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L ergaben, dass alle drei Zelllinien mit den Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2, sowie den Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 ausgestattet sind (siehe 3.2.9.1 und 3.2.9.2). Um die Zelllinien auf eine TRAIL

(*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden diese für 24 Stunden mit 200ng/ml TRAIL (*Killer TRAIL*, Alexis) behandelt (3.2.14.1).

Ausserdem wurden die untersuchten Zelllinien auf eine TRAIL induzierte Aktivierung der Caspasen -8 und -10 im Western-Blot Versuch analysiert (3.2.14.2 und 3.2.14.3), da beide Caspasen als Initiator-Caspasen nach TRAIL Stimulierung in Frage kommen (Kischkel *et al.*, 2001).

#### 5.2.14.1 Untersuchungen zur Inaktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-*cleavage*) nach TRAIL-Inkubation

Nach 24 stündiger Behandlung der Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L mit TRAIL, konnte im Western-Blot eine Spaltung von PARP und somit ein Anzeichen für Apoptose in den Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L festgestellt werden, wobei das PARP-*cleavage* in den MEXF 514L Zellen am stärksten war (Abb. 32). In MEXF 276L Zellen konnte durch TRAIL keine Spaltung von PARP induziert werden.



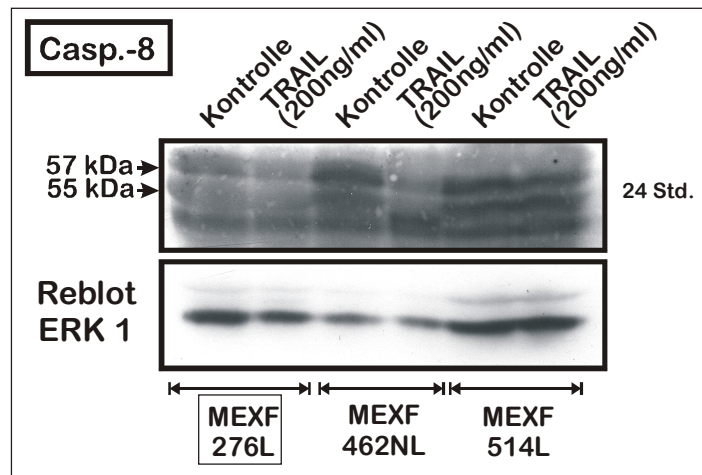
**Abb. 32:** PARP-*cleavage* in MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen nach 24 stündiger TRAIL (200ng/ml) Exposition im Western-Blot.

\*: unspezifische Banden.

### 5.2.14.2 Untersuchungen zur Aktivierung von Caspase-8 nach TRAIL-Inkubation

Nach 24 stündiger TRAIL (200ng/ml) Exposition konnte im Western-Blot mit einem Antikörper gegen die Procaspase-8, in allen untersuchten MEXF Zelllinien die Procaspase-8 nachgewiesen werden. In MEXF 276L Zellen war diese jedoch nur sehr schwach vorhanden. MEXF 276L und MEXF 462NL Zellen, zeigten eine Aktivierung der Caspase-8 durch Spaltung ihrer Procaspase (Verlust der beiden Banden bei 55/57 kDa). In MEXF 514L Zellen wurde die Procaspase-8 zwar nachgewiesen, aber nicht geschnitten und somit nicht aktiviert (Abb. 33).

Als Ladekontrolle wurde nach „strippen“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.



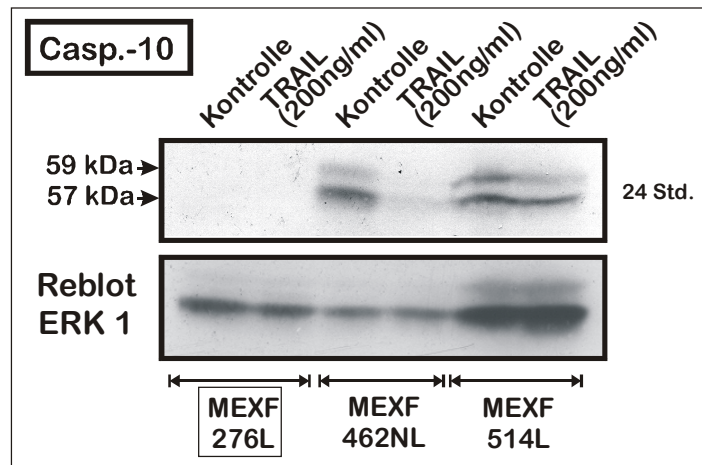
**Abb. 33:** Western-Blot zur Spaltung der Procaspase-8 nach 24 stündiger TRAIL (200ng/ml) Exposition in MEXF Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das ERK1 Gesamtprotein.

### 5.2.14.3 Untersuchungen zur Aktivierung von Caspase-10 nach TRAIL-Inkubation

Die Melanoma Xenograft Zelllinien MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L wurden 24 Stunden lang mit 200ng/ml TRAIL exponiert. Im Anschluss wurde das Gesamtprotein im Western-Blot auf eine Aktivierung der Caspase-10 untersucht. Hierzu wurde ein Antikörper, welcher die Procaspase-10 erkennt, verwendet. Eine Aktivierung der Caspase-10 ist durch den Verlust der beiden Banden bei 57/59kDa gekennzeichnet. In MEXF 276L Zellen konnte keine Procaspase-10 nachgewiesen werden (vergleiche 3.2.7). In MEXF 462NL Zellen zeigte

sich ein eindeutiger Verlust der Banden und somit eine Aktivierung der Caspase-10 nach TRAIL Exposition. MEXF 514L Zellen zeigten dagegen eine nur schwache Aktivierung der Procaspase-10 (Abb. 34).

Als Ladekontrolle wurde nach „strippen“ der Membran, ein Reblot mit einem Antikörper gegen das ERK 1 Gesamtprotein durchgeführt.



**Abb. 34:** Western-Blot zur Spaltung der Procaspase-10 im TRAIL (200ng/ml) vermittelten Signaltransduktions-Weg nach 24 Stunden in MEXF Zellen. Reblot: Ladekontrolle mit Antikörper gegen das ERK1 Gesamtprotein.

---

## 6 Diskussion

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 347500 Menschen neu an Krebs. Die Sterbefälle, die durch die häufigsten Tumorerkrankungen verursacht werden, liegen bei etwa 213000 (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Diese hohe Sterberate, zeigt deutlich die Notwendigkeit für eine Ursachenforschung auf diesem Gebiet. Häufige Gründe sind das Fehlen geeigneter Behandlungsmethoden, oder das Auftreten von Resistenzen. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei die Signaltransduktionswege der Zelle (Kong *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2000; Huang & Oliff, 2001; Reed 2001)

### 6.1 Unterschiede in der Apoptose von HL-60 und MEXF Zellen

Als Modellsystem wurde die leukämische Zelllinie HL-60, sowie Melanoma Xenograft Zelllinien (MEXF) verwendet. Untersuchungen haben gezeigt, dass TBT in undifferenzierten HL-60 Zellen zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen, sowie zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, führen kann (Zaucke & Krug 1996; Zaucke *et al.*, 1998). Desweiteren konnte in einer parallel zu dieser Arbeit fertiggestellten Diplomarbeit festgestellt werden, dass sich undifferenzierte HL-60 Zellen sensitiver gegenüber TBT verhalten als mit DMSO zu Granulozyten differenzierte HL-60 Zellen. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmender Differenzierung bis zum Tag 6, was in etwa der Lebensdauer von diff. HL-60 Zellen entspricht, ein fast vollständiger Verlust der Caspase-8 und -3 Aktivität in HL-60 Zellen stattfindet. Dadurch verlieren differenzierte Zellen einen Großteil ihrer Fähigkeit zur Apoptose und neigen bei 2µM TBT zur Nekrose, was im Annexin-V-FITC/Propidiumiodid Assay am FACS-Gerät ermittelt wurde (Tomsche, 2001).

Die für Resistenzstudien untersuchten MEXF Zelllinien stammen von Tumoren mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Cisplatin (CDDP), einem alkylierenden Zytostatikum, welches zu *intrastrand cross-link*-Bindungen der DNA und somit zu Strangbrüchen führt (Eastman, 1983), ab. Während das Melanom des Patienten der MEXF 276L Zelllinie eine Cisplatin-Sensitivität aufwies, waren die beiden ursprünglichen Melanome der Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L Cisplatin-resistent. Allerdings zeigte sich später, dass das zuvor *in vivo* Cisplatin-resistente Melanom der MEXF 462NL

---

Zelllinie, *in vitro* Sensitiv gegenüber Cisplatin reagiert (persönliche Mitteilung Tumorbiologie Freiburg und eigene Ergebnisse).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Toxizität von TBT an der leukämischen Zelllinie HL-60 und dessen durch DMSO zu Granulozyten differenzierten (diff.) Zelltyp untersucht. Nach einer zeitabhängigen Exposition mit 2 $\mu$ M TBT, konnte nur in undifferenzierten (undiff.) HL-60 Zellen eine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden (Abb. 12). Dies würde den Anschein geben, dass undifferenzierte HL-60 Zellen deutlich sensibler auf TBT reagieren als differenzierte Zellen. Wie schon berichtet neigen differenzierte HL-60 Zellen jedoch nach 2 $\mu$ M TBT Gabe zur Nekrose (Tomsche, 2001). Daher konnte nur in undiff. HL-60 Zellen eine gleichmässige DNA-Fragmentierung erkannt werden. Allerdings zeigt dieses Ergebnis deutlich, dass undiff. HL-60 Zellen im Vergleich zu differenzierten noch in der Lage sind, einen kontrollierten Zelltod durchzuführen.

Um genauere Aussagen zum Apoptoseverhalten von HL-60 Zellen machen zu können, wurden undiff. und diff. HL-60 Zellen neben 2 $\mu$ M TBT mit einer geringen Konzentration von 0,5 $\mu$ M zeitabhängig behandelt und durch PARP-*cleavage* auf ihre Apoptose-Neigung untersucht. In Folge von Apoptose kann PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) als Todessubstrat durch Caspasen, wie die Caspase-3, geschnitten werden (Nagata, 1997). Beim Vergleich von undiff. und diff. HL-60 Zellen, bezüglich einer Spaltung von PARP, konnten deutliche Unterschiede zwischen beiden Zellstadien nach Exposition mit 2 $\mu$ M TBT nachgewiesen werden. Während in undiff. Zellen nach 150 Minuten eine vollständige Spaltung von PARP erkannt werden konnte, war in diff. Zellen PARP bereits nach 100 Minuten vollständig gespalten (Abb. 13 oben). Dieses Bild kehrte sich bei einer niedrigeren Konzentration von 0,5 $\mu$ M TBT vollständig um. Nun wurde in undiff. HL-60 Zellen PARP deutlich früher vollständig geschnitten als in diff. Zellen (Abb. 13 unten). Nach Behandlung mit 2 $\mu$ M TBT waren wiederum die diff. HL-60 Zellen, durch den Verlust von Apoptose auslösenden Caspasen, bereits nekrotisch. Da PARP nicht nur in Folge von Apoptose durch Caspasen (Nagata, 1997), sondern auch durch während der Nekrose freigesetzte Proteasen geschnitten werden kann (Gobeil *et al.*, 2001), erklärt dies die schnellere vollständige Spaltung von PARP in diff. Zellen nach 2 $\mu$ M TBT Behandlung. Gegenüber einer geringen TBT Konzentration von 0,5 $\mu$ M verhalten sich diff. HL-60 Zellen allerdings weniger sensitiv, was durch eine spätere vollständige Spaltung von PARP detektiert werden konnte.

Neben HL-60 Zellen wurden auch MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen auf ein PARP-*cleavage* nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen an TBT

---

untersucht. So konnte festgestellt werden, dass MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen eine deutliche Resistenz gegenüber TBT zeigen. In beiden Zelllinien wurde PARP, trotz TBT Behandlung, nicht geschnitten. Nur MEXF 276L Zellen sind, wie schon für Cisplatin *in vivo*, sensitiv für eine Behandlung mit TBT und weisen eine Spaltung von PARP auf (Abb. 19). Von Stridh *et al.*, (1999) konnte in Jurkat und Hut-78 Zellen, durch den Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK die Verhinderung einer TBT induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Dass PARP nicht geschnitten werden konnte deutet darauf hin, dass in MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen, eine Inhibierung der apoptotischen Signaltransduktionwege, genauer der Caspasen, stattgefunden haben könnte.

Um zu überprüfen, ob TBT Apoptose über Todesrezeptoren oder damit verbundener Adaptorproteine und Caspasen auslösen kann, wurden in MEXF Zellen die Initiator-Caspasen-8 und -10 untersucht. Diese Caspasen stehen nach den Todesrezeptoren an oberster Stelle. Die Spaltung der Procaspase-8 zur Caspase-8 wurde durch einen spezifischen Caspase-8 Aktivitäts-Assay überprüft. Hierbei wird die Aktivität in einer Endpunktbestimmung durch die proteolytische Spaltung des Substrats Ac-IETD-pNA nachgewiesen. Die proteolytische Spaltung führt zur Freisetzung der gebundenen pNA (p-Nitroanilin)-Gruppe. Mittels einer Absorptions-Messung bei 405nm kann so die Caspase-Aktivität bestimmt werden. Alle drei Melanoma Xenograft Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen an TBT behandelt. Anschliessend wurden die Zellen auf ihre Caspase-8 Aktivität untersucht. In keiner der Zelllinien konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine eindeutige Spaltung der Procaspase-8 nachgewiesen werden (Abb. 23).

Da die Initiator-Caspase-8 keine Aktivität zeigte, wurde die ebenfalls mit den Todesrezeptoren in Verbindung stehende Caspase-10 untersucht. Mit einem spezifischen Antikörper gegen die Procaspase-10 wurde im Western-Blot eine Aktivierung überprüft (Abb. 24). Alle drei MEXF Zelllinien wurden wie schon zuvor beim Caspase-8 Aktivitäts-Assay mit TBT behandelt. Die Procaspase-10 wurde in keiner der Zelllinien geschnitten und somit nicht aktiviert. In MEXF 276L konnte keine Procaspase-10 nachgewiesen werden. MEXF 462NL und MEXF 514L Zellen besitzen die Procaspase-10, allerdings ist sie in MEXF 514L Zellen nur wenig vorhanden. Somit konnten keine Anhaltspunkte für eine TBT-Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10 gefunden werden. Daher wurden die Zellen einem Caspase-3 Aktivitäts-Assay unterzogen um so einen Anhaltspunkt für die Spaltung von PARP zu haben (Abb. 25). Auch hier wurden die MEXF Zelllinien mit drei unterschiedlichen TBT Konzentrationen über einen Zeitraum von 2

---

Stunden behandelt. Diesmal wurde die Caspase Aktivität in einer Endpunktbestimmung, durch die proteolytische Spaltung des Substrats Ac-DEVD-pNA nachgewiesen, und anschliessend eine Absorptions-Messung bei 405nm durchgeführt. Nur die TBT sensitive MEXF 276L Zelllinie liefert eine sehr deutliche Aktivierung der Caspase-3 nach Exposition mit der höchsten eingesetzten TBT Konzentration (5µM). Bei dieser Konzentration zeigte diese Zelllinie auch die schon beschriebene Spaltung von PARP. Bei den Zelllinien MEXF 462NL und MEXF 514L war eine nur sehr geringe Aktivierung, mit steigender TBT Konzentration nachzuweisen.

Da die Initiator-Caspasen-8 und -10 nicht aktiv sind, kann eine Aktivierung der Effektor-Caspase-3 auf diesem Weg ausgeschlossen werden. Von Gogvadze *et al.* (2002) wurde eine Freisetzung von Cytochrom C an isolierten Mitochondrien nach TBT-Behandlung nachgewiesen. Wirkt TBT direkt auf die Mitochondrien, kann so über Cytochrom C Freisetzung die Aktivierung der Caspase-3 erreicht werden und das Todessubstrat PARP gespalten werden (Scaffidi *et al.*, 1998). Es muss daher die Signalkette zwischen Mitochondrien und Caspase-3 bei MEXF 462NL und MEXF 514L unterbrochen worden sein. Wie es sich heraus gestellt hat, lag dies mit aller Wahrscheinlichkeit an einer Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Abb 22), welches die Freisetzung von Cytochrom C verhindern kann (Vander Heiden & Thompson,1999). Dieser Gesichtspunkt wird in Kapitel 4.2. genauer erläutert.

Neben dem Apoptoseverhalten nach Gabe des Toxins TBT, wurden die MEXF Zelllinien auf ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin untersucht. Es hatte sich herausgestellt, dass das zuvor Cisplatin-resistente Melanom der MEXF 462NL Zelllinie *in vitro* sensitiv auf Cisplatin reagiert. In einer von der Tumorbilogie in Freiburg durchgeführten Untersuchung wurde festgestellt, dass die IC<sub>50</sub> (*Inhibiting Concentration 50%*) Werte nach Cisplatin Behandlung, für MEXF 276L bei 0,313µg/ml, für MEXF 462 NL bei 0,144µg/ml und für MEXF 514L bei 1,262µg/ml Cisplatin liegen. Dieses Ergebnis konnte durch Western-Blot Versuche bezüglich PARP-*cleavage* bestätigt werden (Abb. 20). Nach Behandlung mit 1µg/ml Cisplatin zeigt sich bei den Zelllinien MEXF 276L und MEXF 462NL eine Spaltung von PARP. Die Cisplatin resistente Zelllinie MEXF 514L zeigte dagegen kein PARP-*cleavage*, was ein Anzeichen für eine Cisplatin-Resistenz darstellt. Dies macht deutlich, dass ein Tumor der *in vivo* (in Maus/Mensch) resistent ist, was für MEXF 462NL gilt (Tumorbilogie Freiburg), diese Resistenz nicht auch *in vitro* zeigen muss. Das Problem ist, *in vivo* einen Serum IC<sub>50</sub> Wirkspiegel zu erreichen oder zu überschreiten, der



für längere Zeit stabil ist. *In vivo* spielen Stabilität und Bioverfügbarkeit eine große Rolle, was in einer Zellkultur durch den fehlenden Gesamtmetabolismus jedoch nicht der Fall ist.

In humanen Osteosarkom Zellen wurde gezeigt, dass Cisplatin Apoptose über die Caspasen -8, -3 und -6 induziert. Die Caspase-8 spielt hierbei als *upstream* gelegene Initiator-Caspase eine Schlüsselrolle (Seki *et al.*, 2000). Die essentielle Rolle von Caspasen in einer Cisplatin induzierten Apoptose konnte auch in den Zelllinien MEXF 276L und MEXF 462NL nachgewiesen werden. Dazu wurden die Cisplatin-sensitiven Zellen vor einer Cisplatin Behandlung mit dem generellen Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK inkubiert. Z-VAD-FMK bindet Irreversibel an das konservierte Pentapeptid-Motiv des aktiven Zentrums von Caspasen, wodurch diese nicht mehr gespalten werden können (Garcia-Calvo *et al.*, 1998). Mit diesem Inhibitor kann eine Spaltung von PARP in den Zelllinien MEXF 276L und MEXF 462NL, nach Cisplatin Gabe verhindert werden.

Ein kontrollierter Zelltod kann in Zellen nicht nur durch toxische Substanzen oder andere schädliche Einflüsse induziert, sondern auch gezielt durch unser Immunsystem aktiviert werden. Apoptose stellt in unserem Körper einen wichtigen Prozess dar. Durch ihn werden beispielsweise geschädigte oder mit Pathogenen infizierte Zellen beseitigt, aber auch in der Embryonalentwicklung die Formgebung des Körpers, durch das Auflösen der Haut zwischen den Zehen und Fingern, beeinflusst. Damit dies geschehen kann, ist eine Reizübermittlung an die Zelle notwendig. Dafür hat die Zelle an ihrer Oberfläche Rezeptoren. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die sogenannten Todesrezeptoren. Ein Verlust dieser Rezeptoren und somit ein „zuwenig“ an Apoptose, kann zur Entstehung von Krebs führen (Sartorius *et al.*, 2001). Todesrezeptoren gehören zur ständig wachsenden Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren (TNF-R) / Nerven-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (NGF-R = *Nerve Growth Factor Receptor*). Zu dieser Rezeptor-Familie gehören unter anderem die Rezeptoren TNF-R1 (P55/CD120a), TNF-R2 (P75), Fas (CD95/APO-1), TRAIL-R1 (DR4/APO-2), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2), TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) die in dieser Arbeit untersucht wurden (Sartorius *et al.*, 2001; Zörnig *et al.*, 2001). Neben der Möglichkeit zur Aktivierung von Apoptose über nachgeschaltete Caspasen können mit ihnen aber auch Überlebensfaktoren wie z.B. NFκB (dazu mehr unter 4.2) oder die Proliferation aktiviert werden (Baud & Karin, 2001).

Fas-Rezeptoren werden auf aktivierten Lymphozyten, als auch in den meisten Geweben, wie z.B. Lunge, Herz und Leber exprimiert. Am häufigsten kann Fas-Ligand (FasL) bei

---

aktivierten Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Erythroblasten und einigen Tumoren gefunden werden. FasL kann durch Aktivierung seines Rezeptors in vielen Zelltypen Apoptose induzieren, was in der Homöostase eine wichtige Bedeutung hat. Aber auch in unserem Immunsystem spielt FasL eine wichtige Rolle. Hier wird beispielsweise der Selbstmord in reifen T-Zellen aber auch in B-Zellen induziert. In vielen Organen wird FasL auf der Oberfläche exprimiert, um so ein Eindringen von mit Fas-Rezeptor ausgestatteten Lymphozyten oder inflammatorischen Zellen zu verhindern (Zörnig *et al.*, 2001).

In den untersuchten MEXF Zelllinien konnte eine Expression des Fas-Rezeptors nur in MEXF 276L Zellen nachgewiesen werden (Abb. 26). Eine Bestätigung dieser Erkenntnis konnte durch Inkubation der Zellen mit FasL erreicht werden, wo wiederum nur in MEXF 276L Zellen eine Apoptose ausgelöst werden konnte (Abb. 28).

Da zu Beginn der Untersuchungen der Fas-Rezeptor nur in der MEXF 276L Zelllinie nachgewiesen werden konnte, und diese Zelllinie auch als einzige ein PARP-cleavage nach TBT-Behandlung zeigte, lag es nahe, den Fas-Rezeptor auf TBT Aktivierung hin zu untersuchen. Dazu wurden MEXF 276L Zellen mit einem inhibitorischen Antikörper behandelt, wodurch eine Aktivierung des Fas-Rezeptors verhindert werden konnte. Zwischen den nur mit 5µM TBT behandelten Kontrollzellen, als auch den Zellen die zuvor mit einem Fas-Inhibitor behandelt wurden, konnte bezüglich der Spaltung von PARP keine Unterschiede gemacht werden (Abb 29). Wie schon berichtet wurde in dieser Zelllinie keine Caspase-8 und -10 Aktivität festgestellt (Abb. 23 & 24), so dass vermutlich eine TBT-induzierte Apoptose über die Mitochondrien erfolgte.

Weitere Mitglieder der Todesrezeptoren die untersucht worden sind, waren die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. TNF (Tumor Nekrose Faktor) ist ein Zytokin, welches von T-Zellen und Makrophagen gebildet wird. Es spielt eine große Rolle bei inflammatorischen Prozessen, indem es die Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst. Nur TNF-R1 ist eindeutig in der Lage Apoptose zu vermitteln. TNF-R2 hat seine Todesdomäne verloren und steuert überwiegend das Überleben der Zelle. Es ist jedoch anzumerken, dass in einer Studie berichtet wurde, dass TNF-R2 Apoptose vermitteln kann (Pimentel-Muinos & Seed, 1999). Beide Rezeptoren können Signalwege für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB induzieren (Baud & Karin, 2001). Eine Rezeptorausstattung mit TNF-R1 zeigen MEXF 276L und etwas stärker MEXF 462NL Zellen. Der TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) ist bei allen drei MEXF Zelllinien vorhanden (Abb. 26). Für eine Funktionsüberprüfung der TNF-Rezeptoren wurden alle MEXF Zelllinien mit humanem TNFα behandelt und im Anschluss auf ein PARP-cleavage getestet, um so Rückschlüsse auf Apoptose führen zu können. In keiner der

---

Zelllinien konnte eine Spaltung von PARP nachgewiesen werden. Somit spielt TNF in diesen Zelllinien als Apoptose-Induktor keine Rolle. Es konnte jedoch in allen drei Zelllinien eine Aktivierung von NFκB durch TNF nachgewiesen werden (Abb. 31; Diskussion Kapitel 4.2).

Eine besonders interessante Familie der Todesrezeptoren bilden die TRAIL-Rezeptoren. TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) kann in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Apoptose induzieren, wohingegen bisher keinerlei Wirkung in normalen Zellen nachgewiesen werden konnte (Zhang *et al.*, 2000 (a); Walzcak & Krammer, 2000). Das legt nahe, TRAIL in der Anti-Tumor Therapie als neues Medikament im Kampf gegen Krebs einzusetzen (Mitsiades *et al.*, 2001). Daher waren die TRAIL-Rezeptoren auch Gegenstand dieser Untersuchungen. Die Apoptose-induzierenden Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2, konnten in allen Melanoma Xenograft Zelllinien detektiert werden (Abb. 26).

Die Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 haben unter den Todesrezeptoren als *Decoy*-Rezeptoren eine Sonderstellung. Sie haben ihre Todesdomäne und dadurch die Fähigkeit zur apoptotischen Signalübermittlung verloren. Allerdings können sie in einigen Fällen, wenn sie im Vergleich zu den TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 deutlich überexprimiert sind, durch das „Wegfangen“ von Liganden eine mögliche Apoptose verhindern oder verringern (Ashkenazi & Dixit, 1999). Es konnte noch eine weitere anti-apoptotische Wirkung der Decoy-Rezeptoren festgestellt werden. Sie sind in der Lage NFκB zu aktivieren, wodurch Apoptose inhibierende Proteine, sogenannte IAP's (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), aktiviert werden. Diese IAP's sind in der Lage die Caspasen-3, -7 und -9 direkt zu inhibieren, wodurch eine Weiterleitung des apoptotischen Signals verhindert werden kann (Degli-Esposti *et al.*, 1997; Griffith & Lynch, 1998; Deveraux & Reed, 1999; Zhang *et al.*, 2000 (b); Baud & Karin, 2001).

Daher erschien es von Bedeutung, auch diese Rezeptoren auf ihre Expression zu untersuchen. Beide Decoy-Rezeptoren sind in allen drei MEXF Zelllinien vorhanden (Abb. 27). Allerdings unterscheiden sie sich untereinander in ihrer Expressionsstärke. Während TRAIL-R3 in den Zelllinien MEXF 276L und MEXF 462NL mit einer deutlichen Expression nachgewiesen werden konnte, ist dieser Rezeptor in der Zelllinie MEXF 514L nur gering vorhanden. Der Rezeptor TRAIL-R4 zeigt in MEXF 462NL Zellen die stärkste Expression, während diese in den beiden anderen Zelllinien etwas geringer ist.

Mit diesen Ergebnissen ist es natürlich wichtig zu wissen, ob auch in MEXF Zellen Apoptose durch TRAIL ausgelöst wird. Dazu wurden die MEXF Zelllinien mit TRAIL inkubiert, welcher sowohl über TRAIL-R1, als auch durch TRAIL-R2 Apoptose induzieren kann. Hier

zeigte sich ein überraschendes Ergebnis (Abb. 32). Die zuvor TBT und Cisplatin sensitive Zelllinie MEXF 276L weist als einzige der untersuchten Zelllinien kein PARP-*cleavage* auf. In dieser Zelllinie sind auch beide Decoy-Rezeptoren stark exprimiert. In der Zelllinie MEXF 462NL führt TRAIL zu einer sehr geringen Spaltung von PARP und wie berichtet, sind auch hier beide Decoy-Rezeptoren stark exprimiert. Dies kann zu einer Reduktion der Liganden und damit zu einer Verringerung der Apoptose-Induktion geführt haben. Die zuvor gegenüber Cisplatin und TBT hochresistente MEXF 514L Zelllinie, zeigt nach TRAIL Inkubation, das stärkste PARP-*cleavage* unter den untersuchten Zelllinien. In dieser Zelllinie ist der Decoy-Rezeptor TRAIL-R3 nur gering vorhanden, so dass vermutlich zu wenig TRAIL „abgefangen“ werden konnte.

Dies sind wichtige Hinweise auf eine Decoy-Rezeptor inhibierte, oder abgeschwächte Apoptose.

Wird eine Aktivierung der den TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 folgenden Initiator-Caspasen-8 und -10 untersucht, so ergibt sich ein interessantes Ergebnis. In der nach TRAIL-Inkubation PARP-*cleavage* negativen MEXF 276L Zelllinie ist eine Spaltung der Procaspase-8 festzustellen (Abb. 33). Dies deutet daraufhin, dass eine Inhibierung der Effektor-Caspasen stattgefunden haben muss. Da diese Zelllinie beide Decoy-Rezeptoren besitzt, kann dadurch eine Inhibierung mittels NF $\kappa$ B und IAP's stattgefunden haben. Die Caspase-10 ist in dieser Zelllinie nicht vorhanden und spielt somit keine Rolle (Abb. 34). In der Zelllinie MEXF 462NL, werden sowohl die Caspase-8 als auch Caspase-10 aktiviert. Was bedeutet, dass über TRAIL tatsächlich beide Caspasen aktiviert werden können (Kischkel *et al.*, 2001). In MEXF 514L Zellen wird nach TRAIL Inkubation nur die Procaspase-10 geschnitten. Dies ist ein deutlicher Beweis, dass auch die Caspase-10, unabhängig von der Caspase-8, eine effektive Apoptose-Induktion vermitteln kann.

## 6.2 Die Rolle des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 und des Überlebensfaktors NF $\kappa$ B

Bcl-2 spielt eine große Rolle in der Regulierung der Cytochrom C Freisetzung durch Mitochondrien. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 eine Freisetzung von Cytochrom C verhindert, wodurch der mitochondrial vermittelte apoptotische Signaltransduktionsweg inhibiert wird. Durch fehlende Cytochrom C Freisetzung, wird eine Aktivierung der *downstream* gelegenden Effektor-Caspase-3 und somit der Apoptose

---

verhindert (Vander Heiden & Thompson, 1999). In einer Studie an Ovarialkarzinomen über Resistenzen in einer Chemotherapie, speziell Cisplatin, konnte festgestellt werden, dass Patienten mit Tumoren die Bcl-2 überexprimieren, eine signifikant höhere Todesrate durch Resistenz zu verzeichnen ist (Mano *et al.*, 1999).

Bei eigenen Untersuchungen zur Expression von Bcl-2 in den Melanoma Xenograft Zelllinien, MEXF 276L, MEXF 462NL und MEXF 514L konnte in allen drei Zelllinien Bcl-2 nachgewiesen werden (Abb. 22). Allerdings unterschieden sich die Zelllinien deutlich in der Stärke der Expression. In der sowohl gegenüber Cisplatin als auch TBT resistenten Zelllinie MEXF 514L konnte eine deutliche Überexpression von Bcl-2 nachgewiesen werden. So kann angenommen werden, dass in dieser Zelllinie die Resistenz bezüglich TBT im wesentlichen auf Bcl-2 zurückzuführen ist. Eine daraus entstandene Cisplatin-Resistenz ist zu vermuten. Ein weiteres Indiz für eine Bcl-2 abhängige Resistenz von MEXF 514L Zellen gegenüber TBT lieferte die Arbeitsgruppe Gogvadze *et al.* (2002). Sie konnten an isolierten Mitochondrien eine Freisetzung von Cytochrom C nach TBT Gabe nachweisen. Da eine Freisetzung über Bcl-2 verhindert werden kann, ist dies ein weiterer Hinweis für eine Bcl-2 vermittelte TBT-Resistenz. Untersuchungen bezüglich der Caspase-Aktivitäten nach TBT Gabe, deuten durch fehlende Aktivität der Initiator-Caspasen -8 und -10 ebenfalls daraufhin (Kapitel 4.1). Die Zelllinie MEXF 462NL zeigt im Vergleich zur Zelllinie MEXF 514L eine verringerte, aber noch immer deutliche, Expression an Bcl-2. Für die Zelllinie MEXF 462NL ist dies ein erster Hinweis auf die Resistenz gegenüber TBT, was durch Untersuchungen zur Caspase-Aktivität bestätigt wurde (Kapitel 4.1). Für Cisplatin scheint die Überexpression an Bcl-2 jedoch keine Rolle zu spielen, da PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) trotzdem gespalten wurde (Abb. 20). Es darf nicht vergessen werden, dass Cisplatin durch *intrastrand cross-link*-Bindungen mit Strangbrüchen zur Folge eigentlich ein DNA schädigendes Zytostatikum ist (Eastman, 1983). Diese Strangbrüche können durch ein funktionsfähiges p53 Protein erkannt werden. p53 kann daraufhin einerseits Reparaturmechanismen einleiten, die den Schaden beheben, andererseits, wenn diese Schädigung zu gross ist, Apoptose einleiten. Daher kann es durch eine Mutation des Tumor Suppressors p53, durch welche er seine Fähigkeit zur Apoptose-Induktion verliert, zur Tumorentstehung aber auch zu Resistenzen kommen (Chang *et al.*, 2000). In MEXF 462NL Zellen konnte ein PARP-*cleavage* nach Cisplatin Behandlung durch den generellen Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK verhindert werden (Abb. 21). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in MEXF 462NL Zellen durch den Tumor Suppressor p53 eine Caspasen-vermittelte Apoptose induziert wurde. MEXF 276L ist die einzige untersuchte Melanoma Xenograft

---

Zelllinie dieser Arbeit, die sowohl sensitiv gegenüber Cisplatin als auch TBT ist. Diese Zellen zeigen eine nur sehr geringe Expression an Bcl-2, wodurch eine Freisetzung von Cytochrom C nicht verhindert werden kann. Dies bestätigt auch eine Untersuchung der Caspase-3 Aktivität nach TBT Gabe, da nur diese Zelllinie eine Aktivierung der den Mitochondrien *downstream* gelegenen Caspase-3 zeigt. Allerdings könnte auch hier wie schon zuvor bei den untersuchten MEXF 462NL Zellen erwähnt, p53 eine Rolle spielen.

Viele Untersuchungen der vergangenen Jahre zeigen, dass der nukleäre Faktor kappa B (NFκB), für das Überleben von Zellen eine wichtige Rolle spielt und durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst werden kann (Baichwal & Baeuerle, 1997; Bender 1998; Mayo & Baldwin, 2000). Daher wurden sowohl undifferenzierte (undiff.), als auch differenzierte (diff.) HL-60 Zellen mit einem NFκB Luciferase-Reporter-Gen transfiziert, um so eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors überprüfen zu können. Während undiff. Zellen nach TBT Gabe keinerlei NFκB Luciferase-Aktivität zeigten, konnte in diff. HL-60 Zellen eine zeit- und dosisabhängige Luciferase-Aktivität festgestellt werden. Nach 0,5μM TBT Exposition war in diff. Zellen ein Maximum der Luciferase-Aktivität nach 6 Stunden zu verzeichnen, wohingegen bei 0,1μM TBT ein Maximum nach 12 Stunden erkannt werden konnte. Dies legt nahe, dass NFκB in zu Granulozyten differenzierten HL-60 Zellen, im Gegensatz zu undiff. Zellen, eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle spielt (Abb. 14).

Ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit von NFκB als Überlebensfaktor in diff. HL-60 Zellen, zeigte sich nachdem NFκB durch Expression einer mutierten, nicht abbaubaren Form von IκBα, inhibiert wurde (Abb. 15). Während die Wild-Typ Formen an undiff. und diff. HL-60 Zellen nach Exposition mit 0,5μM TBT über einen Zeitraum von 4 Stunden keinen signifikanten Anstieg von Nekrosen zeigten, konnte in den NFκB-inhibierten Zellen ein Anstieg an Nekrosen verzeichnet werden. In undiff. Zellen war dieser Anstieg im Vergleich zu den diff. Zellen jedoch deutlich geringer und nach vier Stunden etwa auf Höhe des Ausgangsniveaus bei Stunde 0. Dagegen waren in diff. HL-60 Zellen nach 4 Stunden bereits etwa 80% nekrotisch. Es konnte jedoch eine interessante Beobachtung bei den Zellen mit der mutierten IκBα Variante gemacht werden. Sowohl undiff. als auch diff. HL-60 wiesen bis zur ersten und zweiten Stunde nach TBT Exposition einen Rückgang der Nekrosen auf. Danach stiegen die Nekrosen auf die bereits erwähnten Werte nach 4 Stunden an. Dies könnte ein Hinweis auf eine Aktivierung NFκB unabhängiger Überlebensmechanismen sein. Der Wiederanstieg der Nekrosen scheint auf einen Verlust dieser Überlebensmechanismen

---

zurückzuführen zu sein, da etwa zu gleicher Zeit, die vollständige Spaltung von PARP in den undiff. und diff. Wild-Typ HL-60 Zellen festgestellt wurde (Abb. 13).

Da in MEXF Zellen nach TNF $\alpha$  Behandlung keine Spaltung von PARP nachgewiesen werden konnte (Abb. 30), wurden diese Zellen auf eine TNF-abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung untersucht. Nach unterschiedlichen Expositionszeiten mit TNF $\alpha$ , wurde von den getesteten Melanoma Xenograft Zelllinien Kernextrakte hergestellt und im EMSA TEST (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) auf ihre NF $\kappa$ B DNA-Bindfähigkeit hin überprüft. Wird NF $\kappa$ B aktiviert, wandert es in den Zellkern und kann dort mit Hilfe einer radioaktiven Sonde detektiert werden. Alle drei Zelllinien zeigen sehr schnell eine deutliche Aktivierung von NF $\kappa$ B, die über den gesamten Messzeitraum erhalten blieb. Daher kann angenommen werden, dass TNF Rezeptoren dieser Zelllinien, vermutlich nur eine anti-apoptische Funktionen besitzen und Einfluss auf die Proliferation haben.

### 6.3 MAP-Kinasen

Eine Aktivierung von MAP-Kinasen (ERK, JNK und p38) kann die Expression von Genen wie z.B. c-Fos, c-Jun, GST und QR induzieren und in manchen Zellen zu einer Aktivierung von Schutz- oder Überlebensmechanismen führen (Kong *et al.*, 2000). Potapova (*et al.*, 1997) konnte an Cisplatin resistenten T98G Glioblastoma eine Aktivierung von JNK nachweisen. Eine modifizierte, nicht phosphorylierbare c-Jun dominant negative Variante dieser T98G Zellen zeigte eine erhöhte Sterberate nach Cisplatin Behandlung. Wang *et al.* (1998) führte HeLa Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition in die Apoptose, und konnte dabei eine Aktivierung von ERK, JNK und p38 nachweisen. Die Apoptose konnte von ihm deutlich verstärkt werden, nachdem ERK2 durch einen Inhibitor (PD098059) inhibiert wurde. Allerdings führte eine Inhibition von JNK zu einer Verminderung der Apoptose, während die Inhibition von p38 keine Auswirkungen auf das Überleben der Zellen zeigte.

Weitere Anhaltspunkte, dass die Stresskinasen JNK und p38 auch zur Apoptose führen können, wurden durch folgende Arbeitsgruppen gezeigt: Sanchez-Perez & Perona (1999) beschrieben beispielsweise die Notwendigkeit von JNK für die Induktion einer Cisplatin vermittelten Apoptose und beobachteten eine gleichzeitige p38 Aktivierung mit ähnlichen Kinetiken wie für JNK. Zou *et al.*, (2002) untersuchte eine durch Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>)

---

induzierte Apoptose in PC12 Zellen und konnte mit einem p38 Inhibitor, eine Inhibition des Zelltodes nachweisen.

Eigene Untersuchungen über eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen erbrachte, dass in allen 5 untersuchten Zelllinien eine TBT Behandlung zur Aktivierung von ERK, JNK und p38 führt. Zwischen den einzelnen untersuchten MEXF Zelllinien, konnten bezüglich der Phosphorylierung der MAP-Kinasen keine signifikanten Unterschiede gemacht werden. Alle drei Zelllinien zeigten bei ERK, JNK und p38 nach 2 Stunden Exposition mit der höchsten getesteten Konzentration von 5 $\mu$ M die stärkste Phosphorylierung (Abb. 16, 17 & 18). Somit ist es möglich, bei diesen drei Zelllinien aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf eine pro- oder anti-apoptotische Rolle der MAP-Kinasen zu schließen. Anders verhält sich dies bei HL-60 Zellen. Hier konnten deutliche Unterschiede zwischen den TBT sensitiven und diff. HL-60 Zellen und den weniger sensitiven differenzierten Zellen festgestellt werden. Bei einer geringen Konzentration von 0,5 $\mu$ M TBT konnte in undiff. HL-60 Zellen eine maximale Phosphorylierung von ERK nach 120 min mit anschließendem transienten Verlauf nachgewiesen werden, wohingegen in differenzierten Zellen die Phosphorylierung nach 180 min begann und leicht stärker werdend anhielt (Abb. 9 unten). Es ist schon länger bekannt, dass Unterschiede in der Phosphorylierungsdauer von ERK zu unterschiedlichen Effekten in der Zelle führen. So untersuchte Marshall (1995) Unterschiede zwischen einer anhaltenden und transienten Phosphorylierung von ERK in PC12 Zellen. Er fand heraus, dass eine transiente ERK Aktivierung zur Proliferation der Zelle führt, wohingegen eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Phosphorylierung eine Differenzierung der Zelle zur Folge hatte. Nach Behandlung mit einer stark toxischen Konzentration von 2 $\mu$ M TBT, konnten zwischen beiden Zellstadien keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 9 oben). Es war in undiff. als auch diff. HL-60 Zellen eine schnelle Phosphorylierung von ERK mit anschließendem transienten Verlauf zu erkennen.

Auch bei der Phosphorylierung der Stresskinase JNK konnten zwischen beiden Zellstadien Unterschiede nachgewiesen werden. Nach Exposition mit 2 $\mu$ M TBT zeigten sowohl undiff. als auch diff. HL-60 Zellen bereits nach 30 Minuten eine starke Phosphorylierung von JNK (Abb. 10 oben). Es wurde zwar in undiff. HL-60 Zellen ein im Vergleich zu den diff. HL-60 Zellen transientes Signal beobachtet, allerdings könnte in diff. HL-60 Zellen, durch den Verlust der Möglichkeit Apoptose begehen zu können, ein kontrollierter Abbau von JNK verloren gegangen sein. Ein weiterer Grund könnte die Hemmung von Phosphatasen durch TBT sein. Dies kann zu einem erhöhten Phosphorylierungszustand und dadurch erhöhter Kinaseaktivität führen (Hecht & Zick, 1992; Knebel *et al.*, 1996). Es zeigt aber, dass undiff.



als auch diff. HL-60 Zellen einem deutlichen Stress unterliegen. Im Vergleich dazu konnte bei 0,5 $\mu$ M TBT ein weiterer Beweis für eine Desensibilisierung von diff. HL-60 Zellen gegenüber TBT festgestellt werden (Abb. 10 unten). Während in undiff. Zellen bereits sehr früh eine deutliche Phosphorylierung beobachtet werden konnte, war in diff. Zellen erst später ein schwaches Signal zu sehen. Damit ist anzunehmen, dass JNK in HL-60 Zellen keine anti-apoptotische Funktion besitzt.

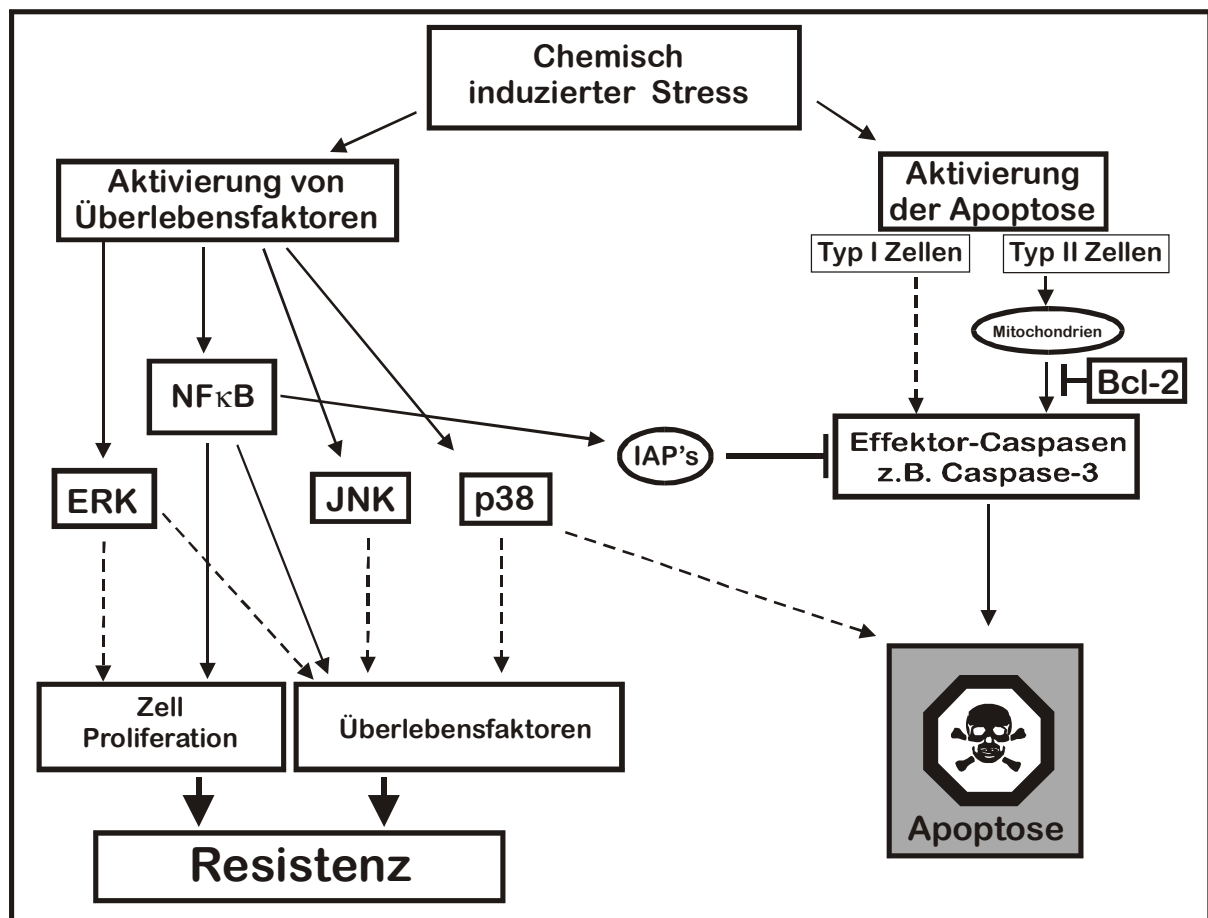
Als letzter Vertreter der MAP-Kinasen wurde die p38-Kinase untersucht. Exposition von undiff. und diff. HL-60 Zellen mit 2 $\mu$ M TBT führte sehr schnell zu einem Maximum an p38 Phosphorylierung (Abb. 11 oben). Während die undiff. HL-60 Zellen einen transienten Phosphorylierungsverlauf zeigten, blieb die Phosphorylierung in den differenzierten Zellen über den ganzen Messzeitraum konstant. Dies ist möglicherweise wiederum darauf zurückzuführen, dass es durch TBT zu einer Hemmung der Phosphatasen gekommen ist, wodurch es zu keiner Dephosphorylierung von p38 kommen konnte.

Bei einer TBT Konzentration von 0,5 $\mu$ M TBT zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach Behandlung mit 2 $\mu$ M TBT (Abb 11 unten). Die Phosphorylierungsstärke war jedoch deutlich geringer. Damit können mit den Ergebnissen der p38 Phosphorylierung keine Rückschlüsse auf eine Desensibilisierung von diff. HL-60 Zellen gemacht werden.

#### **6.4 Die Bedeutung der Signaltransduktionswege in der Resistenz-Entstehung bzw. Desensibilisierung**

Es konnte festgestellt werden, dass MAP-Kinasen in den untersuchten Zelllinien keine anti-apoptotischen Auswirkungen auf die Zellen haben. Allerdings wurde in TBT-desensibilisierten differenzierten HL-60 Zellen eine verminderte JNK Aktivität beobachtet, so dass die MAP-Kinase-Wege sogar eher einen pro-apoptotischen Einfluss haben, wenn die undiff. HL-60 Zellen betrachtet werden. Ichijo (1999) spricht von einem Gleichgewicht der apoptose-auslösenden Caspasen mit NF $\kappa$ B als Überlebensfaktor, welches durch die Stresskinasen JNK und p38 entweder Richtung Zelltod oder Richtung Überleben verschoben werden kann (die untersuchten Signalwege sind in Abb. 35 schematische dargestellt). Durch Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen kann ebenfalls die erhöhte Resistenz differenzierter HL-60 Zellen dargelegt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit zunehmender Differenzierung in HL-60 Zellen ein Verlust der Caspase-8 zu verzeichnen ist

(Tomsche, 2001). Da zusätzlich sowohl in undiff. als auch in diff. HL-60 Zellen keine Caspase-10 nachgewiesen werden konnte (Kischkel *et al.*, 2001), deutet dies auf Caspase-8 als einzige Initiator-Caspase hin und bestätigt die Aussage einer erhöhten Resistenz der differenzierten Zellen, da hier die Caspase-8 ebenfalls fehlt. Einen weiteren Hinweis auf eine zunehmende Desensibilisierung differenzierter HL-60 Zellen liefert die Ausstattung mit Todesrezeptoren. Fas-Rezeptor wird mit zunehmender Differenzierung in HL-60 Zellen herunter reguliert (Salih *et al.*, 2002), während gleichzeitig eine zunehmende Expression des TNF-R2 stattfindet, der eine überwiegend anti-apoptotische Funktion vermittelt (Winzen *et al.*, 1992). Des weiteren konnte eine verstärkte Expression der Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3



**Abb. 35:** Schematischer Überblick über die einzelnen untersuchten Signalwege.

und TRAIL-R4 in differenzierten HL-60 Zellen beobachtet werden, während die Menge an Todesrezeptoren TRAIL-R1 sowie TRAIL-R2 auf gleichem Niveau blieb, so dass auch hier von Desensibilisierung gesprochen werden kann (Shiiki *et al.*, 2000; Lamothe & Aggarwal, 2002). Eine Initiierung der Apoptose (z.B. PARP-cleavage) durch FasL und TRAIL ging mit Ausdifferenzierung der Zellen zu Granulozyten deutlich zurück und liefert so einen weiteren

Beweis für die Desensibilisierung (Shiiki *et al.*, 2000; Salih *et al.*, 2002). Alle Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle 3 dargestellt.

	HL-60 undiff.	HL-60 diff.	MEXF 276L	MEXF 462NL	MEXF 514L
<b>MAP-Kinasen</b>					
ERK	+++	+++	+++	+++	+++
JNK	+++	+	+++	+++	+++
p38	+++	+++	+++	+++	+++
<b>NFκB</b>	k.A.	+++	+++	+++	+++
<b>Bcl-2</b>	n.u.	n.u.	+	++	+++
<b>Rezeptoren:</b>					
Fas	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+++	n.e.	n.e.
TNF-R1	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	+	+++	n.e.
TNF-R2	++ <sup>5</sup>	+++ <sup>5</sup>	+++	++	+++
TRAIL-R1	++ <sup>2</sup>	n.u.	++	++	++
TRAIL-R2	++ <sup>2</sup>	n.u.	++	++	++
TRAIL-R3	n.e. <sup>2</sup>	+++ <sup>3</sup>	+++	+++	+
TRAIL-R4	++ <sup>2</sup>	+++ <sup>3</sup>	++	+++	++
<b>Caspase-Aktivität:</b>					
Caspase-8 / TBT	+++	+	k.A.	k.A.	k.A.
Caspase-8 / TRAIL	n.u.	n.u.	+++	+++	k.A.
Caspase-10 / TBT	n.e. <sup>1</sup>	n.e. <sup>1</sup>	n.e.	k.A.	k.A.
Caspase-10 / TRAIL	n.e. <sup>1</sup>	n.e. <sup>1</sup>	n.e.	+++	+
Caspase-3 / TBT	+++	+	+++	+	+
<b>PARP-cleavage:</b>					
nach TBT	+++	++	+++	-	-
nach Cisplatin	n.u.	n.u.	+	++	-
nach Inhib. & Cispl.	n.u.	n.u.	-	-	-
nach FasL	+++ <sup>4</sup>	+ <sup>4</sup>	+++	-	-
nach TNFα	n.u.	n.u.	-	-	-
nach TRAIL	+++ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	-	+	++
<b>Resistenzen</b>	<b>TBT sensitiv</b>	<b>TBT desensibilisiert</b>	<b>TBT &amp; Cisplatin sensitiv</b>	<b>TBT resistent, Cisplatin sensitiv</b>	<b>TBT &amp; Cisplatin resistent</b>

+ = schwach  
 ++ = mittel  
 +++ = stark  
 - = kein PARP-cleavage  
 n.u. = nicht untersucht

Inhib. = Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK  
 Cispl. = Cisplatin (CDDP)  
 k.A. = keine Aktivität  
 n.e. = nicht exprimiert

<sup>1</sup>: Kischkel *et al.*, 2001

<sup>2</sup>: Lamothe & Aggarwal, 2002

<sup>3</sup>: Shiiki *et al.*, 2000

<sup>4</sup>: Salih *et al.*, 2002

<sup>5</sup>: Winzen *et al.*, 1992

**Tab. 3:** Tabellarischer Überblick der wichtigsten Ergebnisse dieser Dissertation.

Die Reaktion differenzierter HL-60 Zellen wird offensichtlich durch den Verlust an Caspase-Aktivität und Verschiebung der Rezeptorausstattung zu einer verminderten Apoptose hin

gelenkt. Dies verdeutlicht, dass in Tumorzellen ein kompliziertes Netz verschiedener Signalwege verändert ist und letztlich das Zusammenspiel mehrerer Faktoren über den Zelltod entscheidet. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B kann zum Überleben der Zelle ebenfalls entscheidend beitragen. Dies wurde unter anderem bei differenzierten HL-60 Zellen durch den massiven Anstieg an Nekrosen deutlich, nachdem NF $\kappa$ B inhibiert wurde. Ähnlich konnte auch bei den MEXF-Zellen beobachtet werden, dass durch die unterschiedliche Ausstattung mit TNF-R1 und TNF-R2 eher eine Aktivierung von NF $\kappa$ B die Folge einer TNF-Behandlung war, als die Induktion zur Apoptose (Tab.3).

Eine klare Aussage kann zur Resistenz zweier MEXF Zelllinien gegenüber TBT gemacht werden. In diesen Zellen wurde durch eine starke Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, eine Signalweiterleitung verhindert (Übersicht der wichtigsten Ergebnisse in Tab. 3). Dadurch konnte eine durch TBT-induzierte mitochondriale Apoptose verhindert werden. Für Cisplatin, einem DNA-schädigenden Zytostatikum, ist die Resistenz nicht eindeutig bestimmbar, da auch durch p53 die Apoptose in Folge von DNA-Schäden eingeleitet werden kann. Darauf deuten die Ergebnisse in der TBT resistenten und Cisplatin sensitiven Zelllinie MEXF 462NL hin, da p53 unabhängig von den Mitochondrien die Apoptose auslösen kann.

Eine weitere Möglichkeit der Resistenz bei MEXF-Zellen könnte durch die erhöhte Expression der anti-apoptotischen Decoy-Rezeptoren erklärt werden. Trotz der in einigen Fällen vorhandenen Aktivierung der Initiator-Caspasen wurde keine TRAIL vermittelte Apoptose beobachtet. Dies könnte damit zu erklären sein, dass über Decoy-Rezeptoren das anti-apoptotische Protein IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) aktiviert und somit eine Initiierung der Effektor-Caspasen verhindert wurde. Eines der interessantesten Ergebnisse war jedoch, dass mit TRAIL in der Cisplatin resistenten Zelllinie MEXF 514L Apoptose induziert werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung bestimmter apoptotischer Signaltransduktionswege in Tumorzellen. Darin könnten mögliche Targets für Medikamente erkannt und gezielt ausgenutzt werden. TRAIL-Rezeptoren stellen hierbei eine potente Möglichkeit dar (Walczak & Krammer, 2000).

---

## 7 Literatur

**Ade T, Zaucke F, Krug HF. (1996):**

The structure of organometals determines cytotoxicity and alteration of calcium homeostasis in HL-60 cells.

*Fresenius J. Anal. Chem.* **354**:609-614

**Aldridge WN, Street BW. (1970):**

Oxidative phosphorylation. The specific binding of trimethyltin and triethyltin to rat liver mitochondria.

*Biochem J.* **118**:171-9

**Anderson CN, Tolkovsky AM. (1999):**

A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside.

*J Neurosci.* **19**:664-73

**Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002):**

Krebs in Deutschland, Häufigkeit und Trends

*3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002*

**Ashkenazi A, Dixit VM. (1999):**

Apoptosis control by death and decoy receptors.

*Curr Opin Cell Biol.* **11**:255-60

**Baichwal VR, Baeuerle PA. (1997):**

Activate NF-kappa B or die?

*Curr Biol.* **7**:R94-6

**Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. (1993):**

Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.

*Cell.* **73**:431-45

**Barnard EA. (1992):**

Receptor classes and the transmitter-gated ion channels.

*Trends Biochem Sci.* **17**:368-74

**Baud V, Karin M. (2001):**

Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.

*Trends Cell Biol.* **11**:372-7

**Beg AA, Baltimore D. (1996):**

An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death.

*Science.* **274**:782-4

**Bender KJ. (1998):**

Dissertation: Zwei Mechanismen führen zur UV-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B: Ein DNA-Schaden-abhängiger und ein unabhängiger Prozess.  
*Universität Karlsruhe, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften*

**Bosch I, Croop J. (1996):**

P-glycoprotein multidrug resistance and cancer.  
*Biochim Biophys Acta. 1288:F37-54*

**Boyer IJ. (1989):**

Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals.  
*Toxicology. 55:253-98*

**Budd RC. (2002):**

Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis.  
*J Clin Invest. 109:437-42*

**Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR. (1986):**

The decline of the gastropod *Nucella Lapillus* around south-west England; evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints.  
*J.Mar.Biol.Ass.U.K.66:611-640*

**Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. (2000):**

A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling.  
*Science. 288:2351-4*

**Chang EH, Pirollo KF, Bouker KB. (2000):**

Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies?  
*Mol Med Today 6:358-64*

**Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu Be BE, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. (2001):**

MAP Kinases.  
*Chem Rev. 101:2449-76*

**Chow SC, Kass GE, McCabe MJ Jr, Orrenius S. (1992):**

Tributyltin increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup>, activating a Ca<sup>2+</sup> entry pathway, and inhibiting Ca<sup>2+</sup> efflux.  
*Arch Biochem Biophys. 298:143-9*

**Chow SC, Orrenius S. (1994):**

Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immunotoxicant tributyltin.  
*Toxicol Appl Pharmacol. 127:19-26*

**Chung KC, Kim SM, Rhang S, Lau LF, Gomes I, Ahn YS. (2000):**

Expression of immediate early gene pip92 during anisomycin-induced cell death is mediated by the JNK- and p38-dependent activation of Elk1.  
*Eur J Biochem. 267:4676-84*

- 
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. (1977):**  
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture  
*Nature* **270**:347-349
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. (1978):**  
Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:2458-2462
- Collins SJ. (1987):**  
The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression  
*Blood* **70**:1233-1244
- Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. (2000):**  
Serine/threonine protein kinases and apoptosis.  
*Exp Cell Res.* **256**:34-41
- Cui W, Yazlovitskaya EM, Mayo MS, Pelling JC, Persons DL. (2000):**  
Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal--regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines.  
*Mol Carcinog.* **29**:219-28
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. (1997):**  
The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain.  
*Immunity.* **7**:813-20
- Deveraux QL, Reed JC. (1999):**  
IAP family proteins--suppressors of apoptosis.  
*Genes Dev.* **13**:239-52
- Eastman A (1983):**  
Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II).  
*Biochemistry* **22**:3927-33
- Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. (1991):**  
Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*.  
*Genetics.* **129**:79-94
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. (1999):**  
Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?  
*Biochem Biophys Res Commun.* **266**:699-717
- Fent K. (1996):**  
Ecotoxicology of organotin compounds.  
*Crit Rev Toxicol.* **26**:1-117

**Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. (1985):**

Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation.

*Biochemistry.* **24**:707-13

**Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1996):**

Desensitization of G-protein coupled receptors.

*Recent. Prog. Horm. Res.* **51**, 319-351

**Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. (1998):**

Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors.

*J Biol Chem.* **273**:32608-13

**Gilman AG. (1987):**

G-proteins: Transducers of receptor-generated signals.

*Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649

**Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. (2001):**

Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases.

*Cell Death Differ.* **8**:588-94

**Gogvadze V, Stridh H, Orrenius S, Cotgreave I. (2002):**

Tributyltin causes cytochrome C release from isolated mitochondria by two discrete mechanisms.

*Biochem Biophys Res Commun.* **292**:904-8

**Griffith TS, Lynch DH. (1998):**

TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms.

*Curr Opin Immunol.* **10**:559-63

**Grimm S. (2001):**

Zellen sind auch nur sterblich.

*BIOforum* **5**:309-311

**Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999):**

BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.

*Genes Dev.* **13**:1899-911

**Grossman D, Altieri DC. (2001):**

Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets.

*Cancer Metastasis Rev.* **20**:3-11

**Gupta S. (2001):**

Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis.

*Life Sci.* **69**:2957-64



**Harris P, Ralph P. (1985):**

Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines

*J. Leukocyte Biol.* 37: 407-422

**Hecht D, Zick Y. (1992):**

Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro.

*Biochem Biophys Res Commun.* 188:773-9

**Heyninck K, Beyaert R. 2001:**

Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex.

*Mol Cell Biol Res Commun.* 4:259-65

**Huang P, Oliff A. (2001):**

Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy.

*Trends Cell Biol.* 11:343-8

**Hughes DP, Crispe IN. 1995:**

A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing.

*J Exp Med.* 182:1395-401

**Ichijo H. (1999):**

From receptors to stress-activated MAP kinases.

*Oncogene.* 18:6087-93

**Inoue S, Salah-Eldin AE, Omoteyama K. (2001):**

Apoptosis and anticancer drug resistance.

*Hum Cell.* 14:211-21

**Israel N, Gougerot-Pocidallo MA, Aillet F, Virelizier JL. (1992):**

Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kappa B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines.

*J Immunol.* 149:3386-93

**Ishikawa T, Ali-Osman F. (1993):**

Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance.

*J Biol Chem.* 268:20116-25

**Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H. (1994):**

GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation.

*J Biol Chem.* 269:29085-93

**Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. (1993):**

Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death.

*J Immunol.* 151:621-7

**Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. (1999):**

Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB.

*J Biol Chem.* 274:987-92

**Kerr JFR. (1995):**

Neglected opportunities in apoptosis research

*Trends in Cell Biology* 5:55-57

**Keyse SM. (2000):**

Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling.

*Curr Opin Cell Biol.* 12:186-92

**Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. (1995):**

Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.

*EMBO J. Nov* 14:5579-88

**Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. (2001):**

Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.

*J Biol Chem.* 276:46639-46

**Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P. (1996):**

Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents.

*EMBO J.* 15:5314-25

**Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. (2000):**

Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis.

*Arch Pharm Res.* 23:1-16

**Laemmli U. (1970):**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4

*Nature* 227: 680-685

**Lamothe B, Aggarwal BB. (2002):**

Ectopic Expression of Bcl-2 and Bcl-xL Inhibits Apoptosis Induced by TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Through Suppression of Caspases-8, 7, and 3 and BID Cleavage in Human Acute Myelogenous Leukemia Cell Line HL-60.

*J Interferon Cytokine Res.* 22:269-79

**Leverkus M, Neumann M, Mengling T, Rauch CT, Brocker EB, Krammer PH, Walczak H. (2000):**

Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes.

*Cancer Res* 60:553-559

**Lewin, B.:**

Molekularbiologie der Gene  
Spektrum Lehrbuch (1998)  
ISBN 3-8274-0234-4

**Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K. (2002):**

Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling.  
*Mol Biol Cell.* **13**:978-88

**Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A.:**

Taschenatlas der Pharmakologie  
Thieme Verlag (1996)  
ISBN 3-13-707703-6

**Macnamara B, Palucka KA, Porwit-MacDonald A. (1999):**

Balance between proliferation and apoptosis in leukemic cell lines resistant to cytostatics.  
*Leuk Lymphoma.* **36**:179-89

**Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, Kita T, Hirata J, Tode T, Ishii K, Nagata I. (1999):**

Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer.  
*Eur J Cancer.* **35**:1214-9

**Martin NM. (2001):**

DNA repair inhibition and cancer therapy.  
*J Photochem Photobiol B.* **63**:162-70

**Marshall CJ. (1995):**

Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.  
*Cell.* **80**:179-85

**Masuda H, Ozols RF, Lai GM, Fojo A, Rothenberg M, Hamilton TC. (1988):**

Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines.  
*Cancer Res.* **48**:5713-6

**Matzke A, Massing U, Krug HF. (2001):**

Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95.  
*Eur J Cell Biol.* **80**:1-10

**Mayo MW, Baldwin AS. (2000):**

The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance.  
*Biochim Biophys Acta.* **1470**:M55-62

**Meier R, Rouse J, Cuenda A, Nebreda AR, Cohen P. (1996):**

Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells.  
*Eur J Biochem.* **236**:796-805

- 
- Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS, Koutras DA, Chrousos GP. (2001):**  
Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases.  
*Trends Endocrinol Metab.* **12**:384-90
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. (1993):**  
Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*.  
*Cell.* **75**:653-60
- Molenaar C, Teuben JM, Heetebrij RJ, Tanke HJ, Reedijk J. (2000):**  
New insights in the cellular processing of platinum antitumor compounds, using fluorophore-labeled platinum complexes and digital fluorescence microscopy.  
*J Biol Inorg Chem.* **5**:655-65
- Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, Modolell M. (1997):**  
Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L).  
*Cancer Res.* **57**:1320-8
- Mutschler, E.:**  
Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1997)  
ISBN 3-8047-1377-7
- Nagata S. (1997):**  
Apoptosis by death factor.  
*Cell.* **88**:355-65
- Nicholson DW, Thornberry NA. (1997):**  
Caspases: killer proteases.  
*Trends Biochem Sci.* **22**:299-306
- O'Brien KA, Muscarella DE, Bloom SE. (2001):**  
Differential induction of apoptosis and MAP kinase signaling by mitochondrial toxicants in drug-sensitive compared to drug-resistant B-lineage lymphoid cell lines.  
*Toxicol Appl Pharmacol.* **174**:245-56
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. (1999):**  
Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor.  
*J Biol Chem.* **274**:38241-50
- Pimentel-Muinos FX, Seed B. (1999):**  
Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation.  
*Immunity.* **11**:783-93
- Pinto AL, Lippard SJ. (1985):**  
Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diammine-dichloroplatinum (II).  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:4616-9

---

**Potapova O, Haghghi A, Bost F, Liu C, Birrer MJ, Gjerset R, Mercola D. (1997):**

The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin.

*J Biol Chem.* 272:14041-4

**Pratt WB, Ruddon RW, Ensminger WD, Maybaum J. (1994):**

The Anticancer Drugs

*New York: Oxford University Press*

**Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynadka K, Ju Q, Edelstein D, Brownlee M, Korbitt GS, Rajotte RV. (1999):**

Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction.

*Diabetes.* 48:1223-9

**Reed JC. (2001):**

Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery.

*Trends Mol Med.* 7:314-9

**Salih HR, Starling GC, Brandl SF, Pelka-Fleischer R, Haferlach T, Hiddemann W, Kiener PA, Nuessler V. (2002):**

Differentiation of promyelocytic leukaemia: alterations in Fas (CD95/Apo-1) and Fas Ligand (CD178) expression.

*Br J Haematol.* 117:76-85

**Sanchez-Perez I, Perona R. (1999):**

Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin.

*FEBS Lett.* 453:151-8

**Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. (2001):**

Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.

*Chembiochem.* 2:20-9

**Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. (1998):**

Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.

*EMBO J.* 17:1675-87

**Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. (1999):**

The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies.

*Surg Oncol.* 8:143-53

**Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N, Tasaka K. (2000):**

Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma.

*Cancer Chemother Pharmacol.* 45:199-206

---

**Shiiki K, Yoshikawa H, Kinoshita H, Takeda M, Ueno A, Nakajima Y, Tasaka K. (2000):**

Potential mechanisms of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells during granulocytic differentiation.

*Cell Death Differ.* 7:939-46

**Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. (2000):**

Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.

*Science.* 288:2354-7

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985):**

Measurement of protein using bicinchoninic acid.

*Anal Biochem.* 150:76-85

**Snoeij NJ, Punt PM, Penninks AH, Seinen W. (1986):**

Effects of tri-n-butyltin chloride on energy metabolism, macromolecular synthesis, precursor uptake and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes.

*Biochim Biophys Acta.* 852:234-43

**Snoeij NJ, Penninks AH, Seinen W. (1987):**

Biological activity of organotin compounds--an overview.

*Environ Res.* 44:335-53

**Stegh AH, Peter ME. (2001):**

Apoptosis and caspases.

*Cardiol Clin.* 19:13-29

**Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. (1994):**

Structure and function of G-protein-coupled receptors.

*Annu. Rev. Biochem.* 63, 101-132

**Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. (1995):**

The familie of G-protein-coupled receptors.

*FASEB J.* 9, 745-754

**Strasser A, Huang DC, Vaux DL. (1997):**

The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy.

*Biochim Biophys Acta.* 1333:F151-78

**Stridh H, Fava E, Single B, Nicotera P, Orrenius S, Leist M. (1999):**

Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production.

*Chem Res Toxicol.* 12:874-82

**Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. (1993):**

Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor.

*J Biol Chem.* 268:18542-8.

**Tomsche, Ariane (2001):**

Diplomarbeit: Untersuchungen zur Signaltransduktion in der Tributylzinn-induzierten Apoptose: Unterschiede während der Differenzierung in leukämischen Zellen (April 2001).  
*Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung*

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979):**

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354*

**Treisman R. (1996):**

Regulation of transcription by MAP kinase cascades.  
*Curr Opin Cell Biol. 8:205-15*

**Vallabhapurapu S, Ryseck RP, Malewicz M, Weih DS, Weih F. (2001):**

Inhibition of NF-kappaB in T cells blocks lymphoproliferation and partially rescues autoimmune disease in *gld/gld* mice.  
*Eur J Immunol. 31:2612-22*

**Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. (1996):**

Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB.  
*Science. 274:787-9*

**Vander Heiden MG, Thompson CB. (1999):**

Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?  
*Nat Cell Biol. 1:E209-16*

**Walczak H, Krammer PH. (2000):**

The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems.  
*Exp Cell Res. 256:58-66*

**Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. (1994):**

Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer.  
*Cell. 78:343-52.*

**Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. (1996):**

TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB.  
*Science. 274:784-7*

**Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. (1998):**

The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival.  
*Biochem J. 333:291-300*

**Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. (1999):**

Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB.  
*Nat Med. 5:412-7*

**Watson S, Arkininstall S. (1994):**

The G-Protein linked receptor,  
Facts Book, Academic Press, London.

**Wess J. (1997):**

G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-Protein recognition.  
*FASEB J. 11, 346-354*

**WHO (World Health Organisation, 1980):**

Tin and organotin compounds: a preliminary review.  
*Environmental Health Criteria 15:1-109*

**Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. (1999):**

Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.  
*Physiol Rev. 79:143-80*

**Winzen R, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Brakebusch C, Kemper O, Resch K, Holtmann H. (1992):**

Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells.  
*J Immunol. 148:3454-60*

**Xie K, Huang S, Wang Y, Beltran PJ, Juang SH, Dong Z, Reed JC, McDonnell TJ, McConkey DJ, Fidler IJ. (1996):**

Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis.  
*Cancer Immunol Immunother. 43:109-15*

**Xue D, Shaham S, Horvitz HR. (1996):**

The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease.  
*Genes Dev. 10:1073-83*

**Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. (1997):**

Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis.  
*Cell. 89:1067-76*

**Zaucke f, Krug HF (1996):**

Induction of MAP kinase cascade by organometal compounds.  
*Metal Ions in Biology and Medicine 4: 107-109*

**Zaucke F, Zöltzer H, Krug HF (1998):**

Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds.  
*Fresenius J. Anal. Chem. 361:386-392*

**Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. (2000) (a):**

Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types.  
*FEBS Lett. 482:193-9*



---

**Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P. (2000) (b):**

Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells.

*J Immunol.* **164**:3961-70

**Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. (2001):**

The machinery of programmed cell death.

*Pharmacol Ther.* **92**:57-70

**Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G. (2001):**

Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.

*Biochim Biophys Acta.* **1551**:F1-37

**Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu X. (2002):**

Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells.

*J Neurosci Res.* **67**:837-43