

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6032

**Biochemische Wirkungen  
von organischen Metall-  
verbindungen auf *in vitro*  
Zellsysteme:**

**Untersuchungen zur zellulären  
Signaltransduktion und Apoptose**

**F. Zaucke**  
Institut für Toxikologie

November 1997

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**

**Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte**

**FZKA 6032**

**Biochemische Wirkungen von organischen Metallverbindungen  
auf *in vitro* Zellsysteme:  
Untersuchungen zur zellulären Signaltransduktion und Apoptose\***

**Frank Zaucke**

**Institut für Toxikologie**

**\*von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität  
Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1997**

**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**

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen unter dem Einfluß von organischen Zinnverbindungen untersucht. Als Modellsubstanz wurde hier die für die Umwelt relevanteste Verbindung Tributylzinn (TBT) verwendet. Die TBT-induzierte Arachidonsäurefreisetzung wurde untersucht und der hierfür verantwortliche Mechanismus aufgeklärt: TBT induziert über die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) die Freisetzung von Arachidonsäure.

Anschließend wurde die Reaktionsfolge, die zur Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> führte, näher charakterisiert. Die Behandlung mit TBT induzierte über eine sehr schnelle Aktivierung der MAP Kinase Kaskade die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> und schließlich die Freisetzung von Arachidonsäure. Diese Ergebnisse waren bei HL-60 Zellen, P388D<sub>1</sub> Zellen und HeLa Zellen identisch. TBT stimulierte außerdem die Aktivität der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK).

In dieser Arbeit wurde damit erstmals die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen durch organische Metallverbindungen nachgewiesen. Damit kommt zur bereits bekannten Störung der intrazellulären Calciumhomöostase durch organische Metallverbindungen ein neuer Wirkungsmechanismus hinzu, der die calcium-abhängigen Effekte noch verstärken kann. Versuche mit Calciumchelatoren bewiesen, daß für die TBT-induzierte Aktivierung der Proteinkinasen eine intrazelluläre Calciumerhöhung zwar essentiell aber allein nicht ausreichend ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur induzierten Apoptose durchgeführt. Hierbei stand die Untersuchung spezifischer morphologischer Veränderungen, der Fragmentierung der DNA und proteolytischer Prozesse im Vordergrund. Mit verschiedenen mikroskopischen und biochemischen Techniken wurde der organometall-induzierte Zelltod eindeutig als Apoptose charakterisiert. Die Apoptose wurde innerhalb weniger Stunden induziert, und auch hier waren die Effekte von TBT vom untersuchten Zelltyp unabhängig.

Die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen ist verantwortlich für die spezifischen Abbauprozesse nach Behandlung mit TBT. Der Beweis hierfür wurde durch die Vorbehandlung mit Caspase Inhibitoren erbracht. Dies führte zur Aufhebung der metall-induzierten Effekte auf allen Ebenen.

Die Inkubation mit apoptose-induzierenden Konzentrationen von TBT führte zur Aktivierung von Kinasen aus der MAP Kinase Familie. Durch Verwendung von spezifischen Kinase Inhibitoren wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Proteinkinasen und der Induktion der Apoptose hergestellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Induktion der Apoptose durch Organometalle könnte für die bereits beschriebenen immunotoxischen und neurotoxischen aber auch die antiproliferativen Effekte einiger Verbindungen verantwortlich sein. Die hier beschriebene Vielfalt der durch organische Metallverbindungen induzierten tiefgreifenden Reaktionen, führte im Hinblick auf die bereits nachgewiesenen Konzentrationen in der Umwelt zu dem Schluß, daß die weitere Verwendung und Zulassung dieser Verbindungsklasse in Zukunft äußerst kritisch überdacht werden sollte.

## Abstract

### **Biochemical effects of organometal compounds on *in vitro* cell systems: investigations on cellular signal transduction and apoptosis**

In the present study, the effects of organic tin compounds on intracellular signal transduction pathways have been investigated. Tributyltin (TBT) which served as a model substance is not only the most toxic but also the most relevant organotin compound with regard to environmental pollution. The TBT-induced release of arachidonic acid was studied and the responsible mechanism was elucidated. TBT induces the activation of a cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) which finally leads to liberation of arachidonic acid.

The reaction sequence leading to activation of the cPLA<sub>2</sub> was also characterised. Treatment with TBT induced the phosphorylation of cPLA<sub>2</sub> via a rapid activation of the MAP kinase cascade. The effects of TBT were not restricted to a single cell system, as similar results were obtained in HL-60, P388D<sub>1</sub> and HeLa cells. Furthermore, TBT stimulated the activity of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase.

It was demonstrated for the first time that treatment of cells with organic metal compounds leads to an activation of different protein kinases. Thus, an additional mechanism of action besides the well-known disturbance of intracellular calcium homeostasis was found which could contribute to an amplification of calcium-dependent effects induced by organometals. Experiments using calcium chelators have shown that an increase in intracellular calcium concentration is essential but not sufficient for the activation of protein kinases.

In the second part of the thesis the organometal-induced cell death was investigated, with special attention to morphological changes, DNA fragmentation and proteolytic degradation processes. Using different microscopical and biochemical techniques cell death was identified unequivocally as apoptosis. After treatment with TBT apoptosis was induced within hours and was again not dependent on the cell system investigated.

The activation of caspases and endonucleases is responsible for the highly specific degradation processes observed after treatment with TBT. This was demonstrated by pretreatment with specific caspase inhibitors which led to an inhibition of TBT-induced effects.

The incubation of HL-60 cells with apoptosis-inducing concentrations of TBT also led to an activation of members of the MAP kinase family. Experiments with specific kinase inhibitors led to the assumption that apoptosis is connected with activation of these kinases.

The induction of apoptosis by organometals may be the explanation of the described immuno- and neurotoxic as well as the antiproliferative effects of some of these compounds. The observed variety of effects and the fundamental changes induced by organic metal compounds with regard to detected environmental concentrations leads to the conclusion that the further application of these substances should be reflected extremely critical.

## Abkürzungsverzeichnis

A23187	Calciumionophor
AA	Arachidonsäure
AACOCF <sub>3</sub>	Arachidonyltrifluoromethylketon
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEVD	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EICO	Eicosanoide
ERK	extrazellulär regulierte Kinase ( <i>extracellular regulated kinase</i> )
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
FKS	fötales Kälberserum
fMLP	N-Formyl-Methionylleucylphenylalanin
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor
HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICE	<i>Interleukin-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
JNK	c-jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
MAP Kinase	mitogen-aktivierte Protein Kinase ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
M-CSF	Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor
MEK	MAP Kinase Kinase
NAc	N-Acetylcystein
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NL	Neutrallipide
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phosphatidylcholin
PD098059	MAP Kinase Kinase Inhibitor

PDGF	von Blutplättchen gebildeter Wachstumsfaktor ( <i>platelet derived growth factor</i> )
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> (EC 3.1.1.4)
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
sPLA <sub>2</sub>	sekretorische Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C (EC 3.1.4.3)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
SB203580	p38 Kinase Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBT	Tributylzinn
TEL	Triethylblei
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TET	Triethylzinn
TGF	transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin
TPeT	Tripentylzinn
TPT	Tripropylzinn
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
YVAD	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyd
zD-DCB	z-Asp-2,6-dichlorbenzoyloxymethylketon
zVADfmk	z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeines über Organozinnverbindungen	1
1.2	Toxizität von organischen Zinnverbindungen	4
1.3	Zelluläre Effekte	5
1.3.1	Arachidonsäurefreisetzung und Phospholipase A <sub>2</sub>	7
1.3.2	Apoptose	8
1.4	Ziel der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	Chemikalien	11
2.2	Zellkulturen	13
2.2.1	HL-60 Zellen	13
2.2.2	P388D <sub>1</sub> Zellen	14
2.2.3	HeLa tk <sup>-</sup> Zellen	14
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	15
2.2.5	Bestimmung der Zellzahl	15
2.2.6	Vitalitätstest	15
2.3	Untersuchungen zum Arachidonsäurestoffwechsel	15
2.3.1	Markierung und Inkubation	15
2.3.2	Extraktion der Lipide	16
2.3.3	Dünnschichtchromatographie	16
2.3.4	Autoradiographie	17
2.3.5	Auswertung	17
2.4	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration	17
2.5	Färbungen	18
2.5.1	Giemsa-Färbung	18
2.5.2	Färbung mit Propidiumiodid oder DAPI für die Fluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer	19
2.5.3	Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)	19
2.6	Elektronenmikroskopie	19
2.6.1	Transmissionselektronenmikroskopie	19
2.6.2	Rasterelektronenmikroskopie	20
2.7	Proteinanalytik	21
2.7.1	Proteinbestimmung	21
2.7.2	Herstellung von Ganzzellextrakten	21
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.7.4	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (Western Blotting)	22
2.7.5	Immunpräzipitation und Immunkomplex Kinase Assay	23
2.8	Isolierung und Agarosegelelektrophorese apoptotischer DNA Fragmente	24
2.9	Tyrosinphosphatase Assay	25

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	Freisetzung von Arachidonsäure	27
3.2	Regulation der Arachidonsäurefreisetzung	31
3.2.1	Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung	31
3.2.2	Aktivierung der Phospholipase A <sub>2</sub>	37
3.3	Aktivierung von Proteinkinasen	38
3.3.1	Phosphorylierung der MAP Kinase (ERK1/2)	38
3.3.2	Hemmung der durch TBT induzierten Phosphorylierung der MAP Kinase	41
3.3.3	Modifikation der Raf-1 Kinase	43
3.3.4	Calciumabhängigkeit der Proteinkinasen	44
3.3.5	Aktivierung der c-Jun NH <sub>2</sub> -terminalen Kinase (JNK)	46
3.3.6	Effekt von TBT auf Phosphatasen	47
3.4	Untersuchungen zur organometall-induzierten Apoptose	48
3.4.1	Lichtmikroskopische Beobachtungen	48
3.4.2	Elektronenmikroskopische Beobachtungen	51
3.4.2.1	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen	51
3.4.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	55
3.5	Färbungen	57
3.5.1	Giemsa-Färbung	57
3.5.2	Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)	58
3.6	DNA Fragmentierung	61
3.6.1	Induktion der DNA Fragmentierung durch organische Metallverbindungen	61
3.6.2	Hemmung der induzierten DNA Fragmentierung	64
3.7	Zellzyklusanalyse im Durchflußzytometer	66
3.7.1	Bildung eines <i>prä-G1-Peaks</i> während der organometall-induzierten Apoptose	66
3.7.2	Effekt von Caspase Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung	68
3.8	Proteolytische Prozesse	71
3.9	Weitere Untersuchungen zur TBT-induzierten Apoptose	73
3.9.1	Rolle von Calcium bei der TBT-induzierten Apoptose	73
3.9.2	Rolle des Bcl-2 Proteins bei der TBT-induzierten Apoptose	74
3.10	Zusammenhang zwischen der MAP Kinase Aktivierung und der Induktion der Apoptose	75
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
4.1	Untersuchungen zum Arachidonsäurestoffwechsel	79
4.2	Untersuchungen zur organometall-induzierten Apoptose	91
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>107</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines über Organozinnverbindungen

Organische Zinnverbindungen sind bereits seit über 100 Jahren bekannt und generell anthropogenen Ursprungs. Nur geringe Mengen von Methylverbindungen können durch Biomethylierung entstehen (Craig, 1982). 1849 synthetisierte der Chemiker E. Frankland zuerst Dialkylzinndiiodid. Die erste kommerziell registrierte Verbindung wurde 1936 als PVC-Stabilisator eingesetzt. Als schließlich die bioziden Eigenschaften vor allem der trialkylierten Verbindungen erkannt wurden, stiegen sowohl die Anwendungsmöglichkeiten als auch die Produktion stark an. Die jährliche Produktion lag 1950 noch bei wenigen Tonnen und stieg dann permanent auf 35.000 Tonnen im Jahr 1986 an (Maguire, 1987). 1991 wurden allein in der BRD 11.000 Tonnen Organozinnverbindungen hergestellt. Davon entfielen 5.000 Tonnen auf trialkylierte Zinnverbindungen, von denen 900 Tonnen in der BRD verwendet wurden, der Rest war für den Export bestimmt. Die Einsatzmöglichkeiten der Organozinnverbindungen richten sich zunächst nach der Anzahl der Alkylgruppen. Die folgende Tabelle faßt die Anwendungsgebiete zusammen (Tab. 1).

Tab. 1: Anwendungsmöglichkeiten von organischen Zinnverbindungen.

Verbindung	Anwendung
Monoalkylzinnderivate	Ausgangsmaterial bei der Glasbeschichtung; vorwiegend im Gemisch mit Dialkylzinnverbindungen für die dort beschriebenen Einsatzgebiete
Dialkylzinnderivate	Verwendung als PVC-Stabilisatoren auch in Lebensmittelverpackungen; Einsatz als Wurmbekämpfungsmittel, Katalysator, bei der Kautschukhärtung; komplexe Dibutylzinnderivate und andere Verbindungen haben antiproliferative Wirkung und werden als Chemotherapeutika bei Krebs eingesetzt (Gielen, 1993)
Trialkylzinnderivate	Biozide in Holz- und Textilschutzmitteln; Verwendung in Antifouling-Anstrichen, als Desinfektionsmittel, Molluskizid, Insektizid, Fungizid und Pflanzenschutzmittel, auch als Konservierungsstoff in Farben
Tetraalkylzinnderivate	Stabilisatoren für Öle; dienen als Neben- oder Zwischenprodukte bei der Herstellung der anderen Verbindungen

Interessanterweise hängen die bioziden Eigenschaften und auch die Empfindlichkeit verschiedener Organismen gegenüber den trialkylierten Verbindungen von der Länge der Alkylketten ab (Tab. 2). Worauf diese Spezifität beruht, ist allerdings noch unklar (Blunden & Chapman, 1986).

Tab. 2: Unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Organismen gegenüber trialkylierten Zinnverbindungen.

Verbindung	empfindlichste Spezies
Trimethylzinn	Insekten
Triethylzinn	Säuger
Tripropylzinn	gram-negative Bakterien
Tributylzinn	gram-positive Bakterien, Fische, Pilze, Mollusken, Pflanzen
Triphenylzinn	Pilze
Bis-tributylzinnoxid	Mollusken
Tricyclohexylzinn	Milben, Fische

Die vermehrte Produktion und Anwendung dieser Verbindungen führte natürlich auch zu einem vermehrten Eintrag in die Umwelt, der nach Craig (1982) im Jahr 1976 in den USA allein für Antifouling-Farben und Biozide auf bereits 300 Tonnen geschätzt wurde. Dies führte zu einem verstärkten ökotoxikologischen Interesse im Hinblick auf akut oder chronisch toxische Wirkungen. Im Laufe der Jahre wurden deshalb für organische Zinnverbindungen immer empfindlichere Nachweismethoden entwickelt. So können zum Beispiel aus Wasserproben Konzentrationen von bis zu 100 pg/l noch exakt bestimmt werden (Donard *et al.*, 1986). In den letzten Jahren wurden daher auch zahlreiche Untersuchungen zu Vorkommen, Verteilung, Abbau, Akkumulation und Ökotoxikologie der organischen Zinnverbindungen durchgeführt. Einen ausführlichen Überblick über diese Thematik bieten die Übersichtsarbeiten von Fent (1996), Hamasaki *et al.* (1995) und Maguire (1987).

Heute existieren von vielen Standorten auf der ganzen Welt Konzentrationsangaben. Im folgenden werden einige Beispiele genannt, vor allem für die Verbindung Tributylzinn (TBT), die durch ihre Anwendung in Antifouling-Farben eindeutig die für die Umwelt relevanteste ist. Eine der umfangreichsten Arbeiten stammt von Maguire *et al.* (1986), in der an 265 Standorten aus Wasser- und Sedimentproben in Kanada die Gehalte an organischem und anorganischem Zinn bestimmt wurden. Die höchste gemessene Konzentration betrug in dieser Arbeit bei Port Hope, Ontario, 2,34 µg Zinn aus TBT/l. Eine weitere Arbeit von Tas *et al.* (1996) beschreibt einen in den USA gemessenen Spitzenwert von 6,3 µg TBT/l, im Hafen von Bahrain wurden sogar durchschnittliche TBT Konzentrationen von 17,88 µg/l ermittelt (Hasan & Juma, 1992). Diese Mengen entsprechen etwa einer Konzentration im unteren nanomolaren Bereich. In der Regel liegen die Konzentrationen in marinen Hafengebieten zwischen 100 und 500 ng TBT/l. Im Vergleich hierzu sollte allerdings auch der amerikanische Grenzwert (US-EPA Water Quality Criteria) von 10 ng TBT/l berücksichtigt werden, der Erholungsgebiete von kommerziell genutzten Standorten abgrenzt. In einer Studie in den USA lagen in 50% der untersuchten Häfen die Werte über diesem Grenzwert (Seligman *et al.*, 1989). 10% der Proben beinhalten Konzentrationen, die eine chronische Schädigung, insbesondere eine Wachstumshemmung, der

dort lebenden Organismen befürchten lassen. Hier werden Konzentrationen zwischen 50 und 400 ng TBT/l als chronisch, Konzentrationen über 400 ng TBT/l als akut toxisch eingestuft.

Im Süßwasser liegen die Belastungen etwas niedriger und sind deutlich schlechter untersucht. Der in der Literatur (Fent, 1996) angegebene Extremwert von 7,15 µg TBT/l im Ontariosee (Kanada) stellt sicher die Ausnahme dar. Einen großen Beitrag zur Reduktion der Belastung leistete das Verbot der organozinnhaltigen Antifouling-Farben im Bereich der Binnenschifffahrt für Schiffe unter einer Länge von 25 Metern, dem sich die Bundesrepublik als eines der letzten europäischen Länder 1993 anschloß (Gefahrstoffverordnung, 1993). In zwei Häfen des Luzerner Sees konnte die Tributylzinnbelastung von 1988 bis 1993 aufgrund des Verkaufsverbotes in der Schweiz um bis zu 90% reduziert werden (Fent, 1996).

Die Konzentrationen im marinen Sediment liegen um einige Größenordnungen höher (zwischen 1 und 10 mg/kg Trockengewicht), allerdings ist hier die biologische Verfügbarkeit schwer einzuschätzen. Dennoch ist ein stetiges Rücklösen der Verbindungen aus den Sedimenten nicht auszuschließen. Die Halbwertszeit von TBT liegt abhängig von örtlichen Gegebenheiten (Temperatur, Licht, Sauerstoffgehalt und pH Wert) zwischen mehreren Wochen und Monaten. Organische Zinnverbindungen können durch UV Strahlung, aber auch biologisch und chemisch abgebaut werden (Fent, 1996).

Natürlich werden die Zinnverbindungen auch in den im Wasser lebenden Organismen angereichert. So wurden in der marinen Alge *Fucus* und in der Klaffmuschel *Mya arenaria* TBT Konzentrationen zwischen 0,2 µg/g und 36,8 µg TBT/g Trockengewicht gemessen (Bryan & Gibbs, 1991). Dies entspricht Anreicherungsfaktoren von bis zu 500.000 gegenüber dem umgebenden Wasser. Generell werden die höchsten Werte in Organismen erreicht, die aufgrund ihrer Lebensweise enorme Mengen an Wasser filtrieren.

Auch in Fischen können beträchtliche Mengen organischer Zinnverbindungen nachgewiesen werden. Short & Thrower (1987) berichten von TBT Konzentrationen zwischen 69 und 170 µg/kg in Zuchtsalmoniden, in Schottland sind in Fischzuchten sogar zwischen 0,4 und 3,1 mg/kg festgestellt worden (Davies & McKie, 1987). Eine weitere Arbeit (Iwata *et al.*, 1997) zieht bereits die Anreicherung in marinen Säugern als Endglied der Nahrungskette in Betracht. So wurden in der Leber von Tümmlern (*Neophocaena phocaenoides*) mehr als 10 mg Butylzinnionen/kg Frischgewicht gefunden. TBT kann durch Kochen nicht zerstört werden und so über die Nahrungskette auch für den Menschen eine Gefahr darstellen. Für Erwachsene wird ein provisorischer Wert für die annehmbare tägliche Aufnahme (*acceptable daily intake*, ADI) von 3,2 µg Tributylzinnoxid/kg Körpergewicht vorgeschlagen (Schweinfurth & Gunzel, 1987), eine Menge, die im Extremfall bereits in einem Gramm des oben beschriebenen Schottlandlachs enthalten sein kann. Penninks (1993) schlägt für TBT sogar einen zehnfach niedrigeren Wert von 0,25 µg TBT/kg Körpergewicht und Tag als tolerierbare Aufnahmemenge vor. Eine Zusammenfassung der TBT Konzentrationen in verschiedenen Umweltkompartimenten und Organismen liefert die Abb. 1.

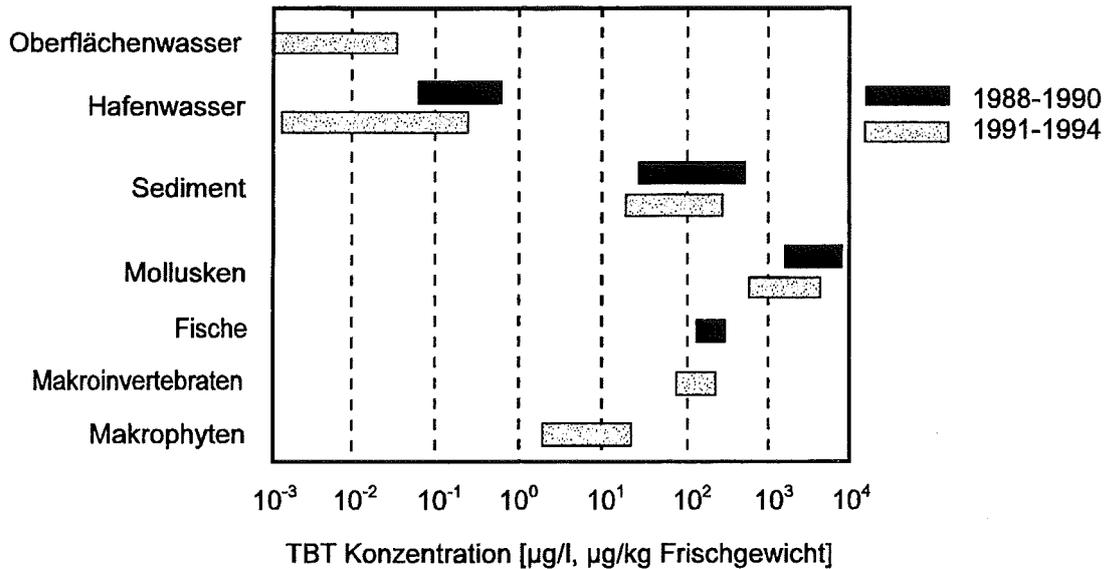


Abb. 1: Zusammenfassung der durchschnittlichen Konzentrationen von Tributylzinn (TBT) in verschiedenen Umweltkompartimenten und Organismengruppen. Vor allem im Hafengewässer sind nach dem Verbot dieser Substanz für bestimmte Schiffsanstriche die Konzentrationen deutlich rückläufig (verändert nach Fent, 1996).

## 1.2 Toxizität von organischen Zinnverbindungen

Nach der Entdeckung der bioziden Eigenschaften der organischen Zinnverbindungen wurden eine Reihe von Untersuchungen zur Toxizität durchgeführt. In einer Übersichtsarbeit faßt Boyer (1989) die Effekte auf Versuchstiere und auch Menschen zusammen.

Nach Applikation von trialkylierten Zinnverbindungen auf die Haut wurden vielfach Irritationen festgestellt, die bis hin zur lokalen Zerstörung der Haut durch dermale Nekrose führen können (Corsini *et al.*, 1996; Middleton, 1982; Pelikan & Cerný, 1969). Vor allem die kurzkettigen Verbindungen Trimethyl- und Triethylzinn sind stark neurotoxisch (Aschner & Aschner 1992; Bondy & Hall, 1986; Kobayashi *et al.*, 1994). Es konnte eine Anreicherung der Verbindungen in verschiedenen Hirnbereichen und die Bildung von Hirnödemen festgestellt werden (Cockerill *et al.*, 1987). Im Tierversuch waren Verhaltensstörungen (Ema *et al.*, 1991), Lernbehinderungen (Cohen *et al.*, 1987), Tremor und schließlich Bewußtlosigkeit die Folge (Reuhl *et al.*, 1985). Vergiftungen bei exponierten Arbeitern führten zu Hyperaktivität, Schlaflosigkeit, Gedächtnisstörungen und Orientierungslosigkeit. Glücklicherweise konnte nach Entfernung des Schadstoffes eine komplette Erholung festgestellt werden. Traurige Berühmtheit erlangte Triethylzinn im „Stalinonunfall“ 1954 in Frankreich (Alajouanine *et al.*, 1958). Bei der Applikation eines oralen Aknemittels, das 150 mg Diethylzinndiodid enthalten sollte, kamen durch Verunreinigungen mit Triethylzinndiodid 102 Menschen zu Tode. Bei der Autopsie der Leichen wurden wiederum Hirnödeme festgestellt. Die etwa 100 Überlebenden hatten

chronische Schäden zu erleiden. Der Grad der Verunreinigung konnte allerdings nicht abgeschätzt werden.

Die Hepatotoxizität der Zinnverbindungen manifestiert sich in einer Atrophie der Hepatozyten und durch fettige Infiltration und Degeneration der gesamten Leber (Krajnc *et al.*, 1984; Yoshizuka *et al.*, 1992). Von längerkettigen Verbindungen wie Tripropyl- und Tributylzinn und auch Triphenylzinn sind vor allem immunotoxische Effekte beschrieben. Es kommt zur Gewichtsreduktion des Thymus, der Milz und der Lymphknoten. Die Anzahl der Thymozyten fällt ab, ihre Proliferation ist gehemmt, und die Induktion der Apoptose konnte festgestellt werden (Bollo *et al.*, 1996; Raffray & Cohen 1991, 1993; Seinen *et al.*, 1977; Smialowicz *et al.*, 1989). Weiterhin existieren einige Arbeiten, die genotoxische Effekte von organischen Zinnverbindungen beschreiben. Jensen *et al.* (1991a) stellten in Lymphozyten Aneuploidien fest. Hamasaki *et al.* (1992) konnten in bakteriellen Testsystemen nach Behandlung mit di- und trialkylierten Verbindungen Mutationen nachweisen. Außerdem wurde Dibutylzinn in verschiedenen Entwicklungsphasen von Rattenembryos und auch in embryonalen Zellkulturen als embryotoxisch eingestuft (Ema *et al.*, 1996; Yonemoto *et al.*, 1993). So wurden auch bei marinen Invertebraten Störungen in der Entwicklung bereits auf Ebene des Morula- und Gastrulastadiums bzw. in ungeschlüpften Larven festgestellt (Cima *et al.*, 1996; Gianguzza *et al.*, 1996).

Bryan *et al.* (1986) führen sogar die Abnahme bestimmter Schneckenpopulationen um Südwestengland auf Tributylzinn aus Antifouling-Farben zurück. Hierfür wird hauptsächlich das Phänomen Imposex verantwortlich gemacht. Als Imposex bezeichnet man die Neubildung von männlichen Geschlechtsorganen (Penis und/oder *Vas deferens*) und Überlagerung der Geschlechtsorgane in weiblichen Tieren (Smith, 1971), was letztendlich zur Unfruchtbarkeit führt. So fanden z.B. Gibbs *et al.* (1987) in Laboruntersuchungen, daß bereits Konzentrationen unter 1 ng Zinn aus TBT/l in *Nucella lapillus*, einem sehr TBT-sensitiven Neogastropoden, Imposex induzieren können. Eine Übersicht zum Thema TBT-induzierter Imposex liefert eine Arbeit von Oehlmann *et al.* (1996).

### 1.3 Zelluläre Effekte

Nachdem die Symptome der toxischen Wirkung dieser Verbindungen weitgehend geklärt waren, konzentrierten sich die Untersuchungen in jüngerer Zeit auf die molekularen Mechanismen der organozinn-vermittelten Toxizität. Schon seit langem ist bekannt, daß Triorganozinnverbindungen die Funktion von Mitochondrien auf vielfältige Weise beeinträchtigen. Dies geschieht entweder durch eine direkte Interaktion mit der Mitochondrienmembran, durch Hemmung des energiekonservierenden Schrittes in der oxidativen Phosphorylierung oder aber durch sekundäre Effekte, die auf eine Störung des Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup>-Austausches zurückzuführen sind (Aldridge, 1976; Selwyn, 1976).

Aggregate von Zinnverbindungen in Membranen konnten von Gray *et al.* (1987) an der Erythrozytenmembran und Cima *et al.* (1996) an der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion mit Membranen ist auch an Erythrozyten beschrieben (Ali *et al.*, 1987). Diese Effekte wurden von Heywood *et al.* (1989) an künstlichen Vesikeln genauer untersucht. Generell können Triorganozinnverbindungen als Ionophor fungieren und so den Austausch verschiedener Anionen gegen OH<sup>-</sup>-Ionen durch biologische Membranen modulieren (Antonenko, 1990; Powers & Beavis, 1991). Eine Verminderung der ATP-Synthese wurde von Snoeij *et al.* (1986a, b) bestätigt, was letztendlich in einer Beeinträchtigung von ATP-abhängigen Ionentransportsystemen resultieren kann. So postulieren Maier & Costa (1990) die Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Chow *et al.* (1992) und Kodavanti *et al.* (1991) die Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen an der Plasmamembran bzw. am sarkoplasmatischen Retikulum. Diese Hemmung kann schließlich zu veränderten Ionenverteilungen führen, wie zum Beispiel einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Ade *et al.*, 1996; Aw *et al.*, 1990; Reader *et al.*, 1993; Ueha *et al.*, 1996) oder einer Erniedrigung des intrazellulären pH Wertes (Ade, 1996; Reader *et al.*, 1994).

Weiterhin beeinflussen organische Zinnverbindungen Bestandteile des Zytoskeletts (Krug *et al.*, 1993), indem sie die Polymerisation des Aktins in Neutrophilen verhindern (Marinovich *et al.*, 1990), Spindelstrukturen zerstören (Jensen *et al.*, 1991b) und zur Disaggregation von Neurotubuli führen (Bondy & Hall, 1986). Außerdem können organische Zinnverbindungen den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren (Marinovich *et al.*, 1996), die Expression der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* (Matsuoka & Igisu, 1996; Zawia & Harry 1993) und die Bildung von Hitzeschockproteinen induzieren (Cochrane *et al.*, 1991; Zhang & Liu, 1992). Allerdings sind die Mechanismen, die zu diesen Reaktionen führen, noch unzureichend untersucht.

Ein für diese Arbeit besonders wichtiger Punkt ist, daß Organometallverbindungen Blutplättchen zur Aggregation veranlassen (Macfarlane, 1981; O'Brien, 1963). Es konnte nachgewiesen werden, daß hierfür die Produktion von Eicosanoiden, speziell des Thromboxans A<sub>2</sub> essentiell ist (Krug & Berndt, 1987). Direkter Vorläufer für die Bildung von Thromboxanen ist die Arachidonsäure, die nach Behandlung von Zellen mit den verschiedensten organischen Metallverbindungen aus Membranphospholipiden freigesetzt wird (Käfer *et al.*, 1992; Krug & Culig, 1991; Krug & Berndt, 1987; Zaucke, 1993). Diese Freisetzungsreaktion bildet so die Grundlage für die Thrombozytenaggregation. Schließlich konnte gezeigt werden, daß organische Zinnverbindungen, wie oben bereits kurz erwähnt, zur Induktion der Apoptose führen können (Aw *et al.*, 1990; Marinovich *et al.*, 1996; Raffray & Cohen 1991). Auf die Grundlagen dieser beiden Prozesse soll im folgenden noch etwas genauer eingegangen werden.

### 1.3.1 Arachidonsäurefreisetzung und Phospholipase A<sub>2</sub>

Arachidonsäure wird meist aus der *sn*-2 Position von Membranphospholipiden durch die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) freigesetzt. Diese Reaktion initiiert die Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen. Somit hat die PLA<sub>2</sub> eine Schlüsselstellung bei der Biosynthese verschiedener inflammatorischer Mediatoren. Ausgezeichnete aktuelle Übersichtsarbeiten über die Enzymologie, die verschiedenen PLA<sub>2</sub> Formen, deren Vorkommen, Spezifität und Regulation findet man in Clark *et al.* (1995) und Dennis (1997). Für die Bildung von Eicosanoiden und die Plättchenaktivierung wird hauptsächlich die zytosolische Form der Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) verantwortlich gemacht. Die folgende Abbildung zeigt ein Modell für die Aktivierung dieser Phospholipase (Abb. 2).

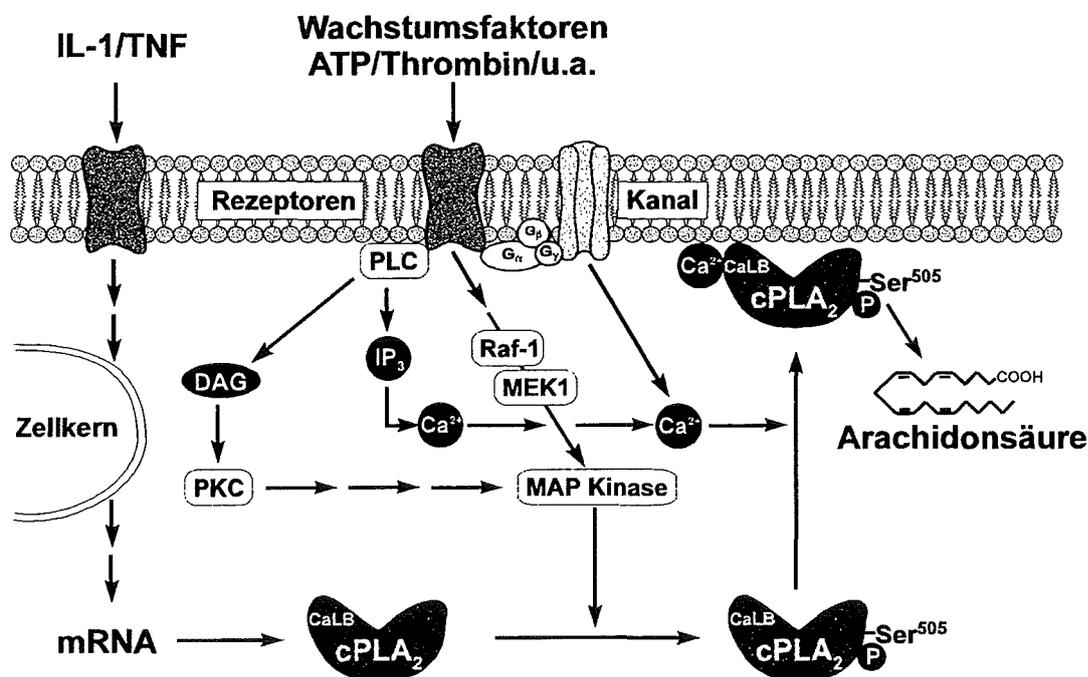


Abb. 2: Hypothetisches Modell für die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Nähere Erläuterungen und Abkürzungen im Text (verändert nach Clark *et al.*, 1995).

Die schnelle Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> wird durch die Phosphorylierung des Enzyms durch die MAP Kinase am Serin 505 und eine gleichzeitige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration erreicht (Lin *et al.*, 1993). Hierbei können verschiedene Signaltransduktionselemente beteiligt sein. Die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP Kinase kann einerseits durch eine Kinase Kaskade nach Stimulierung einer Rezeptortyrosinkinase über die Raf-1 Kinase und die MAP Kinase Kinase (MEK1) erfolgen. Andererseits kann über einen Rezeptor die Phospholipase C (PLC) aktiviert werden, was zu

einer Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) führt. DAG aktiviert dann wiederum die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits die MAP Kinase phosphorylieren kann (Qiu & Leslie, 1994). Außerdem kann die cPLA<sub>2</sub> durch die PKC auch direkt phosphoryliert werden (Xing & Mattera, 1992). Die Calciumerhöhung wird entweder über einen Calciumeinstrom durch Calciumkanäle an der Plasmamembran oder durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern reguliert. Die erhöhte Calciumkonzentration bewirkt dann die Translokation der cPLA<sub>2</sub> über eine calcium-abhängige Lipidbindungsdomäne (CaLB) an die Plasmamembran, wo sich die Substrate für das Enzym befinden (Clark *et al.*, 1991). Für die maximale Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> ist in jedem Fall sowohl die Phosphorylierung als auch der Calciumanstieg nötig (Lin *et al.*, 1993). Schließlich kann die cPLA<sub>2</sub> auch auf transkriptioneller Ebene durch inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-1 (IL-1) oder den Tumornekrose-Faktor (TNF), aktiviert werden (Hoeck *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992a). Diese Regulationsmöglichkeit spielt hauptsächlich bei langanhaltender PLA<sub>2</sub> Aktivierung eine wichtige Rolle.

### 1.3.2 Apoptose

Die Apoptose ist ein streng regulierter Prozeß, der während der Entwicklung, bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, dem normalen Zellturnover, bei hormoninduzierter Gewebsatrophie und der Selektion von Immunzellen eine wesentliche Rolle spielt. Auf der anderen Seite wird die Beteiligung einer fehlregulierten Apoptose bei pathologischen Situationen wie Krebs, AIDS, Alzheimer, rheumatoider Arthritis und Autoimmunkrankheiten diskutiert. Eine Zusammenfassung über die molekularen Mechanismen und vor allem die Bedeutung der Apoptose bei Krankheiten liefern die Arbeiten von Orrenius (1995) und Wyllie *et al.* (1980).

Das Interesse an der Apoptose hat in den letzten Jahren stark zugenommen, wobei man von der bloßen Beobachtung nun zur Aufklärung der Mechanismen übergegangen ist. Eine Schlüsselrolle während der Apoptose spielen sicherlich degradierende Enzyme und zwar vor allem Proteasen (Martins & Earnshaw, 1997; Takahashi & Earnshaw, 1996) und Endonukleasen (Peitsch *et al.*, 1994). Wie diese Enzyme allerdings reguliert oder aktiviert werden, ist noch weitgehend unklar. Eine wichtige Rolle hierbei spielt wahrscheinlich die Verteilung von Calciumionen (McConkey & Orrenius, 1996) und eventuell auch die Entstehung von Sauerstoffradikalen (Jacobson, 1996). Bei der Weiterleitung von intrazellulären Signalen sind fast immer Phosphorylierungsreaktionen involviert. Daher überrascht es nicht, daß auch die Aktivierung von Proteinkinasen und -phosphatasen während der Apoptose beschrieben wurde (Frearson & Alexander, 1996; Gjertsen & Døskeland, 1995). Weiterhin sind bereits bestimmte für die Apoptose essentielle Gene bzw. deren Produkte identifiziert worden (Osborne & Schwartz, 1994). Schließlich wird auch die Beteiligung der Mitochondrien oder zumindest des mitochondrialen Membranpotentials diskutiert (Zamzami *et al.*, 1996).

Dem Prozeß der Apoptose steht der Zelltod durch Nekrose gegenüber. Die wichtigsten Unterschiede sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt (Abb. 3).

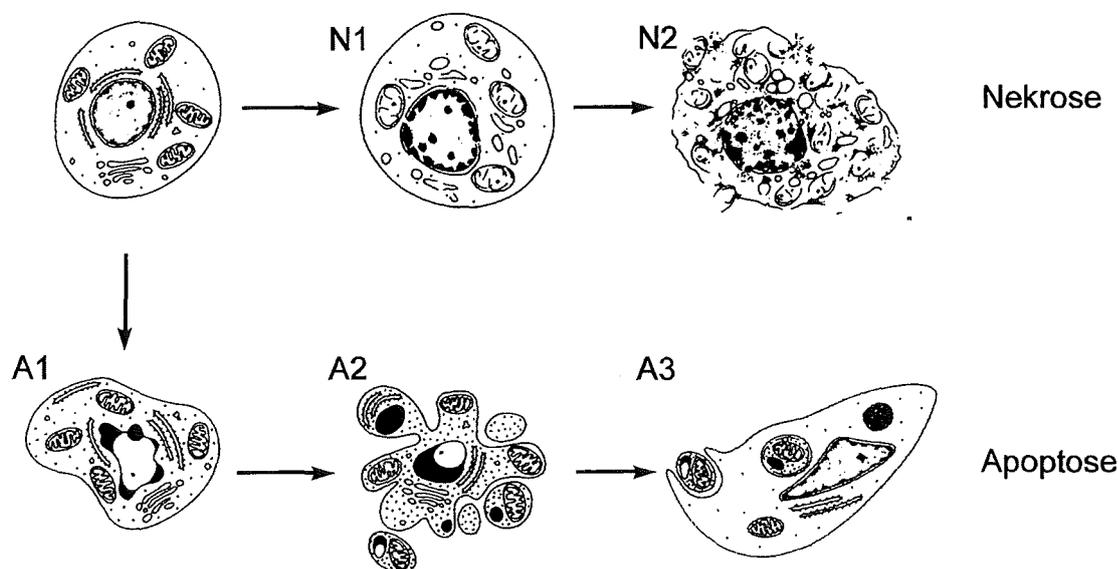


Abb. 3: Schema der ultrastrukturellen Veränderungen und Unterschiede während des Ablaufs von Nekrose und Apoptose. Nähere Erläuterungen im Text (verändert nach Kerr, 1995).

Am Ausgangspunkt beider Prozesse steht eine gesunde Zelle, die auf einen Stimulus auf verschiedene Art und Weise reagieren kann. Die Degeneration während der Nekrose ist durch ein Anschwellen der ganzen Zelle charakterisiert. Diese Volumenzunahme führt dann zu irreversiblen Schäden an der Plasma- und auch an den Organellenmembranen (N1). Schließlich lysiert die Zelle, die Organellen und auch das Chromatin werden in Mitleidenschaft gezogen und der Zellinhalt wird freigesetzt (N2). Dies kann eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Im Gegensatz hierzu schrumpft die Zelle während der Apoptose, die Organellen bleiben intakt, das Chromatin kondensiert und die DNA wird in einer charakteristischen Art und Weise abgebaut (A1). Die Zelle bildet dann Membranausstülpungen (*blebs*) und verpackt sich schließlich selbst in die sogenannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*, A2). Während des gesamten Vorganges bleibt die Integrität der Plasmamembran erhalten. Im Körper werden diese *apoptotic bodies* dann sehr effektiv von Makrophagen phagozytiert (A3). Da es zu keiner Zeit zur Freisetzung des Zellinhaltes kommt, unterbleibt während der Apoptose eine Entzündungsreaktion. Interessanterweise enthalten wahrscheinlich alle Säugerzellen die enzymatische Ausstattung, die den apoptotischen Zelltod ausführt (McConkey & Orrenius, 1994).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß organische Metallverbindungen den Lipidstoffwechsel beeinflussen. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Freisetzung von Arachidonsäure und deren Metabolisierung zu Eicosanoiden. Im ersten Teil der Arbeit sollte aufbauend auf diesen Ergebnissen der Mechanismus der Arachidonsäurefreisetzung unter besonderer Berücksichtigung der Regulation und Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei die intrazelluläre Signaltransduktion über Proteinkinasen, die schließlich zur Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> und der Freisetzung von Arachidonsäure führt. Diese Untersuchungen sollten an HL-60, HeLa und P388D<sub>1</sub> Zellen durchgeführt werden.

HL-60 Zellen sind als Modellsystem zur Untersuchung der Apoptose bereits gut charakterisiert. Im zweiten Teil sollten daher hauptsächlich an diesem Zellsystem die morphologischen und biochemischen Veränderungen während der organozinn-induzierten Apoptose charakterisiert und mit bereits bekannten Mechanismen verglichen werden.

Abschließend sollte die Frage geklärt werden, ob die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, bzw. die hierbei beteiligten Signaltransduktionsprozesse auch bei der Induktion der Apoptose eine Rolle spielen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

A23187, Calciumionophor	Sigma (Deisenhofen, BRD)
[1- <sup>14</sup> C]Arachidonsäure	Amersham (Braunschweig, BRD)
Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF <sub>3</sub> )	Alexis (Grünberg, BRD)
N-Acetylcystein (NAc)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Ammoniumacetat	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
BAPTA-Acetoxymethylester (BAPTA/AM)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Benzamidin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, BRD)
CPP32 Inhibitor (DEVD)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva (Heidelberg, BRD)
Digitonin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Dinitrophenol (DNP)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva (Heidelberg, BRD)
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Serva (Heidelberg, BRD)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Etoposid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Fluo3-Acetoxymethylester (Fluo3/AM)	Calbiochem, (Bad Soden, BRD)
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Genistein	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Giemsa-Färbelösung	Merck (Darmstadt, BRD)
β-Glycerophosphat	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Hexamethyldisilazan	Polysciences Inc. (Warrington, PA, USA)
N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva (Heidelberg, BRD)
ICE Inhibitor I (YVAD)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
ICE Inhibitor III (zD-DCB)	Alexis (Grünberg, BRD)
ICE Inhibitor VI (zVADfmk)	Alexis (Grünberg, BRD)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Natriumfluorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Natriumpyrophosphat	Roth (Karlsruhe, BRD)
Natriumvanadat	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Nonidet P-40 (NP-40)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
PD098059, MAP Kinase Kinase Inhibitor	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Pepstatin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Propidiumiodid	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Quinacrinhydrat	Serva (Heidelberg, BRD)
Ribonuclease A	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
SB203580, p38 Kinase Inhibitor	Alexis (Grünberg, BRD)
Sphingosin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Taxol (Paclitaxel)	Alexis (Grünberg, BRD)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Thapsigargin	Biomol (Hamburg, BRD)
N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethyldiamin (TPEN)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Tri- <i>n</i> -butylzinnchlorid	Merck (Darmstadt, BRD)
Triethylbleichlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Triethylzinnbromid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Tripropylzinnchlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Tripentylzinnchlorid	Aldrich (Steinheim, BRD)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt, BRD)
Triton-X 100	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Trypanblau	Serva (Heidelberg, BRD)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, BRD)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Zinkacetat	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Lösungsmittel, Säuren und Salze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Abschnitt Proteinanalytik (unter 2.7.4) angegeben. Bei Inkubationen mit organischen Metallverbindungen und anderen Chemikalien wurde stets darauf geachtet, daß die Konzentration des Lösungsmittels im Versuchsansatz 0,5% nicht überstieg.

Die Herstellung der Natriumvanadatlösung erfolgte nach Kypta *et al.* (1988). Hierbei wird die entsprechende Menge Natriumvanadat in A. dest. gelöst und anschließend mit HCl auf pH 10 eingestellt. Dabei erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Lösung wird dann so lange im kochenden Wasserbad erhitzt, bis sie wieder farblos wird. Nur diese Vorgehensweise garantiert die entsprechende Oxidationsstufe des Vanadats und somit optimale Hemmeffekte.

## 2.2 Zellkulturen

### 2.2.1 HL-60 Zellen

Die HL-60 Zellen (American Type Culture Collection, ATTC CCL240), die in der Mehrzahl der Versuche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden ursprünglich aus einer 36 Jahre alten Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie isoliert (Collins *et al.*, 1977). Die Zellen stehen am Beginn ihrer Ausdifferenzierung und können mit spezifischen Induktoren in granulozyten- oder monozyten-ähnliche Zellen differenziert werden (Collins, 1987). Undifferenzierte HL-60 Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden daher zweimal in der Woche passagiert und maximal bis zur 15. Passage für Versuche verwendet. Die Zellen wurden standardmäßig mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen in 20 ml Kulturmedium angesetzt.

Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen:

450	ml	RPMI 1640
75	ml	FKS (fötale Kälberserum, für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	L-Glutamin 200 mM
5	ml	Natriumpyruvat 100 mM
5	ml	MEM non essential amino acids
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)

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

Die HL-60 Zellen wurden für die meisten Versuche zu Granulozyten differenziert. Die Differenzierung wurde nach Collins *et al.* (1978) durch Zugabe von DMSO zum normalen Kulturmedium erreicht. Hierzu wurden die Zellen standardmäßig abzentrifugiert ( $200 \times g$ , 5 Minuten, Digifuge GL, Heraeus) und in DMSO-haltigem (1,3%) Kulturmedium in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. Die Zellen konnten dann je nach Fragestellung vom 4. bis 6. Tag für Versuche verwendet werden. Die Differenzierung führt zu einer Reihe von morphologischen aber auch biochemischen Veränderungen. Einerseits verlieren differenzierte HL-60 Zellen ihre Proliferationsfähigkeit, andererseits verändert sich die enzymatische und die Rezeptorausstattung der Zelle. Genau nachzulesen ist eine Zusammenfassung der Ereignisse bei Harris & Ralph (1985). Der Differenzierungsgrad kann mit Hilfe des sogenannten NBT-Tests (Wijermans *et al.*, 1987) bestimmt werden. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit der differenzierten Zellen, Sauerstoffradikale zu bilden und wurde hier stichprobenweise durchgeführt. Versuche zur organozinn-induzierten Apoptose wurden stets mit undifferenzierten HL-60 Zellen durchgeführt, da ausdifferenzierte Zellen letztendlich auch apoptotisch sterben (Martin *et al.*, 1990).

### 2.2.2 P388D<sub>1</sub> Zellen

Bei den P388D<sub>1</sub> Zellen (ATCC TIB63) handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie aus einer DBA/2 Maus. Diese Zellen wurden für Versuche zum Arachidonsäurestoffwechsel und zur Apoptose verwendet. Da diese Zellen adherent wachsen, waren sie für die Einzelzellbeobachtung unter dem Mikroskop besonders geeignet. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich zur Passage (bis maximal Passage 35) mit Hilfe eines Zellschabers von der Unterlage entfernt und mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Kulturmedium neu ausgesät.

Zusammensetzung des Kulturmediums für P388D<sub>1</sub> Zellen:

450	ml	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
50	ml	FKS (fötale Kälberserum, für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert)
5	ml	L-Glutamin 200 mM
5	ml	MEM non essential amino acids
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)

### 2.2.3 HeLa tk<sup>-</sup> Zellen

Bei den HeLa tk<sup>-</sup> Zellen (zur Verfügung gestellt vom Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe) handelt es sich um einen Subklon der parentalen HeLa-Linie (humane Cervixcarcinomzelllinie) mit Defizienz im Thymidinkinase-Gen. Diese Zelllinie war besonders geeignet für die Untersuchungen zur Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>. Die HeLa Zellen wachsen ebenfalls adherent und wurden kurz bevor die Kulturgefäße konfluent bewachsen waren mit einer 0,25%igen Trypsinlösung (Gibco) für 10 Minuten abtrypsinieren. Die Zellen wurden in einer definierten Menge Medium aufgenommen, gezählt und dann mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Kulturmedium neu ausgesät.

Zusammensetzung des Kulturmediums für HeLa Zellen:

450	ml	DMEM
50	ml	FKS (fötale Kälberserum, für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert)
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)

Sofern nicht anders erwähnt, stammten alle Zellkulturgefäße von der Firma Greiner, Frickenhausen. Die Kulturmedien wurden stets steril filtriert (Bottle Top Filter, 22 µM Porenweite, Falcon, Heidelberg). Die Grundmedien und Medienzusätze wurden von Gibco, Eggenstein, bezogen. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank (Typ B5061 EK-02, Heraeus) inkubiert.

## 2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im jeweiligen Standard Kulturmedium mit 10% DMSO als Gefrierschutz zunächst für einen Tag bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Beim Auftauen wurde die Zellsuspension schnellstmöglich im Wasserbad auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Einfriermedium verworfen und die Zellen standardmäßig ausplattiert.

## 2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension bzw. abtrypsiniertes Zellen aus der Kulturflasche entnommen und mit Isoton (Coulter Euro Diagnostics) 1:100 verdünnt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Coulter Counters (Model D<sub>n</sub>, Coulter Electronics Ltd.) in der verdünnten Lösung gezählt.

## 2.2.6 Vitalitätstest

Die Vitalität von HL-60 Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Enzymatische Tests (z.B. die Messung der LDH im Überstand) sind weniger geeignet, da die Metallverbindungen die Aktivität der Enzyme beeinflussen können. Pro Ansatz wurden  $2\text{ ml}$  einer Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Petrischalen ( $35\text{ mm}$  Durchmesser, Greiner) pipettiert. Nach einer Ruhephase von mindestens  $30\text{ Minuten}$  wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz für den entsprechenden Zeitraum inkubiert. Nach der Inkubation wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  aus den Petrischalen entnommen und zu  $100\text{ }\mu\text{l}$  bereits in Eppendorfgläser vorgelegter Trypanblau-Lösung ( $0,5\%$ ig in  $0,9\%$ iger NaCl-Lösung) gegeben. Da das Trypanblau nur in Zellen diffundieren oder transportiert werden kann, deren Membran stark geschädigt ist, ist die Zahl der blauen Zellen identisch mit der Zahl der toten Zellen. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop (Laborlux 12, Leitz) bei einer 160fachen Vergrößerung. Die Vitalität der Kontrollen wurde zum Zeitpunkt 0 auf  $100\%$  gesetzt und die Ergebnisse der Trypanblau-Färbung wurden auf diesen Wert bezogen.

## 2.3 Untersuchungen zum Arachidonsäurestoffwechsel

### 2.3.1 Markierung und Inkubation

Für die Versuche zur Arachidonsäurefreisetzung wurden  $1 \times 10^7$  HL-60 Zellen pro Ansatz benötigt. Die wurden bei  $200 \times g$   $5\text{ Minuten}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in  $50\text{ ml}$  radioaktivem Markierungsmedium resuspendiert. Bei diesem Markierungsmedium handelt es sich um Standardkulturmedium, das je nach Anzahl der Gesamtansätze bis zu  $92,5\text{ kBq}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]Arachidonsäure enthielt (für bis zu  $30$  Ansätze; spezifische Aktivität:  $2,15\text{ Gbq/mmol}$ ).

Für Versuche mit P388D<sub>1</sub> oder HeLa Zellen wurde eine konfluent bewachsene Petrischale (35 mm Durchmesser) pro Ansatz benötigt. Das Markierungsmedium wurde wie oben aus dem entsprechenden Kulturmedium der Zellen hergestellt. Nach Abziehen des Kulturmediums wurde je 1 ml Markierungsmedium in jede Petrischale pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden inkubiert. Dieser Zeitraum gewährleistet eine vollständige Aufnahme und eine gleichmäßige Verteilung der Arachidonsäure in den verschiedenen Lipidklassen der Membran (Froissart *et al.*, 1989; Krug & Culig, 1991). Nach der Markierung wurden die HL-60 Zellen abzentrifugiert (200 × g, 5 Minuten), im Falle der P388D<sub>1</sub> oder HeLa Zellen wurde der Überstand direkt aus der Petrischale abgezogen. Das Pellet bzw. die Petrischale wurde einmal mit Inkubationsmedium gewaschen, um die nicht aufgenommene Arachidonsäure vollständig zu entfernen. Die HL-60 Zellen wurden dann im entsprechenden Volumen (1 ml/Ansatz) Inkubationsmedium aufgenommen und schließlich auf Petrischalen verteilt. Nach mindestens 30-minütiger Ruhephase wurden die Zellen mit den verschiedenen Substanzen inkubiert. Die Dauer der Vorinkubation und die verwendeten Konzentrationen von Inhibitoren bzw. anderen Substanzen ist bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

### 2.3.2 Extraktion der Lipide

Die Lipide wurden nach Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Inhalt einer Petrischale mit einer Transferpipette (Sarstedt) in ein zentrifugierbares Duranglas-Röhrchen (Bender & Hobein) überführt, in das 1,25 ml eiskaltes Chloroform vorgelegt wurden. Es bildeten sich sofort zwei Phasen aus, die mit Hilfe eines Vortex (Bender & Hobein) kurz durchmischt wurden. Die Petrischalen wurden zweimal mit 1,25 ml eiskaltem Methanol gewaschen. Diese Waschlösung wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach erneuter Durchmischung wurden 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml 0,2%ige Ameisensäure zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde nochmals durchmischt und mindestens 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Zur besseren Phasentrennung wurden die Röhrchen 5 Minuten mit 500 × g zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde entnommen und unter Vakuum eingedampft. Die Proben wurden schließlich in 80 µl Chloroform aufgenommen und konnten so unter Stickstoff in verschließbaren Glasröhrchen über Nacht bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 2.3.3 Dünnschichtchromatographie

Die Laufkammern wurden am Tag der Auftragung der Extrakte mit den entsprechenden Laufmitteln gesättigt. Die Dünnschichtplatten (SIL G Polygram, Macherey & Nagel, Nr. 805013) wurden über Nacht in Isopropanol gelegt und für mindestens 30 Minuten bei 110 °C getrocknet. Die in Chloroform aufbewahrten Extrakte wurden nochmals eingedampft, in exakt 50 µl Chloroform aufgenommen und mit Hilfe eines Auftragegerätes (Automatic TLC Sampler III, Camag) aufgetragen. Für die optimale Trennung der Lipide hat sich die Kombination der folgenden Laufmittel bewährt (Krug & Culig, 1991):

**Laufmittel 1:**

Gemisch aus Chloroform / Methanol / Essigsäure / Wasser im Verhältnis 56 : 33 : 9 : 2.

Die Front lief vom Auftragungspunkt 11 cm nach oben, der erste Lauf dauerte etwa 60-70 Minuten. Hier erfolgte die Trennung der Phospholipide. Neutrallipide, freie Fettsäuren und deren Metabolite liefen mit der Front. Zwischen den beiden Läufen wurde die Platte kurz mit einem Fön getrocknet.

**Laufmittel 2:**

Gemisch aus Hexan / Ether / Essigsäure im Verhältnis 80 : 20 : 1

Hier lief die Front bis an den oberen Plattenrand, dieser Lauf dauerte ungefähr 50 Minuten. Hier trennten sich die Neutrallipide, die freien Fettsäuren und deren Metabolite auf.

**2.3.4 Autoradiographie**

Auf die Dünnschichtplatten wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt. Der Film wurde in einer Fototasche 4 Tage bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  exponiert. Alternativ hierzu konnten die Platten für die Dünnschichtchromatographie auf eine *Imaging Plate* (Fuji, Type BAS-III) für den Biobild-Analysator (PhosphoImager, Fujix BAS 1000) mehrere Stunden oder über Nacht aufgelegt werden.

**2.3.5 Auswertung**

Nach Entwicklung der Autoradiographie konnten die Banden anhand entsprechender Standards den verschiedenen Lipiden zugeordnet werden. Die Banden wurden dann aus der Dünnschichtplatte ausgeschnitten und in Szintillationsgefäße (Minis 2000, Zinsser) sortiert. Jedes Gefäß wurde mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick Safe A, Zinsser) gefüllt und gut geschüttelt. Die Proben wurden schließlich im Flüssigkeitsszintillationszähler (1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB) gemessen. Die Ergebnisse, die mit der *Imaging Plate* am Biobild-Analysator erzielt wurden, konnten am Gerät direkt mittels einer dazugehörigen Software (MacBas, Version 1.0) ausgewertet werden. Die Menge an freigesetzter Arachidonsäure wurde dann stets auf die zuvor eingebaute Gesamtmenge (entspricht 100%) bezogen.

**2.4 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration**

Die zytosolische Calciumkonzentration wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo3/AM gemessen. Es handelt sich hierbei um ein Fluoreszeinderivat, dessen Fluoreszenz nach Bindung von Calcium um das 40fache ansteigt. Der Farbstoff wird als Acetoxymethylester zugegeben und dringt so aufgrund seiner Lipophilie ohne vorherige Permeabilisierung der Membran in die

Zellen ein. Im Zytoplasma wird der Ester hydrolysiert, verliert so seine lipophilen Eigenschaften und bleibt in der Zelle gefangen.

Die Beladung der Zellen erfolgte in Standardkulturmedium ohne FKS mit 2  $\mu\text{M}$  Fluo3/AM. Dem Farbstoff wurde zuvor das anionische Detergenz Pluronsäure zugesetzt (0,5%, v/v). Das Medium wurde mit 10 mM HEPES und 4 mM  $\text{NaHCO}_3$  gepuffert und auf pH 7,3 eingestellt. In diesem Medium wurden die Zellen für 30 Minuten im Wasserbad bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen unter stets eiskalten Bedingungen wurden die Zellen schließlich im sogenannten Meßmedium (10 mM HEPES, 4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,3) aufgenommen. Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden), wobei in jedes Well 300  $\mu\text{l}$  mit  $3 \times 10^6$  Zellen gegeben und dann mit den entsprechenden Substanzen inkubiert wurden. Vor der Messung wurden die Zellen noch 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die zytosolische Calciumkonzentration wurde im Fluoreszenzspektrometer (CytoFluor 2300, Millipore, Eschborn) bestimmt. Die Filtereinstellungen lagen für die Anregung bei  $485 \pm 20$  nm und für die Emission bei  $530 \pm 25$  nm. Die freie Calciumkonzentration wurde dann durch die folgende Formel berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

wobei  $k_d$  die Dissoziationskonstante des Farbstoffs (bei Raumtemperatur 450 nM) und F den gemessenen Fluoreszenzwert darstellt.  $F_{\min}$  gibt die Fluoreszenz in ruhenden Zellen ohne Farbstoff an,  $F_{\max}$  den maximalen Fluoreszenzwert, der nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  A23187 und 30  $\mu\text{M}$  Digitonin am Ende jeder Messung ermittelt wurde. Dieses Versuchsprotokoll wurde für Calciumbestimmungen innerhalb der ersten 10-20 Minuten nach der Stimulation verwendet. Für Langzeitmessungen, wie sie im Hinblick auf die Induktion der Apoptose durchgeführt wurden, mußte das Protokoll leicht abgewandelt werden. Die Beladung mit dem Farbstoff erfolgte dann erst nach der Inkubation mit der Metallverbindung, da bei langen Inkubationszeiten der Farbstoff allmählich aus den Zellen herausdiffundieren würde. Um die Calciumkonzentration exakt zum angegebenen Zeitpunkt messen zu können, wurde mit der Farbstoffbeladung bereits 45 Minuten vor der Messung begonnen.

## 2.5 Färbungen

### 2.5.1 Giemsa-Färbung

Die Zellen wurden nach der Behandlung abzentrifugiert, in einer geringen Menge reinem Serum (FKS) aufgenommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde mit dem Fön getrocknet und die Zellen dann für 5 Minuten mit Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit einer stets frisch angesetzten Färbelösung (methanolische Giemsa-Färbelösung (Merck) mit

A. dest. 1:7 verdünnt) für nur 15 Sekunden. Die Objektträger wurden dann mit Wasser gut gespült und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

## **2.5.2 Färbung mit Propidiumiodid oder DAPI für die Fluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer**

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in einer hypotonischen Propidiumiodid-Lösung (50 µg Propidiumiodid/ml in 0,1% Natriumcitratpuffer, pH 7,4 mit 0,1% Triton X-100) oder in DAPI Lösung (5,4 µM DAPI; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,15 M NaCl; 0,1% Triton X-100; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,3) resuspendiert. Hierbei lysiert die Plasmamembran, die Kernmembran bleibt intakt. Die Zellen konnten dann bei 4 °C im Dunkeln bis zur Messung aufbewahrt werden. Die Zellkerne wurden im Durchflußzytometer (PasII, Partec, Münster oder FACStar Plus, Becton & Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm für die DAPI-Färbung bzw. bei 536 nm und 617 nm für Propidiumiodid-Färbung ausgewertet.

## **2.5.3 Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)**

Die Zellen wurden nach der Inkubation einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml Standardmedium aufgenommen. Dieses Medium enthielt den Hoechst-Farbstoff in einer Endkonzentration von 10 µM. Die Färbung erfolgte für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren und schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop (DMIL, Leica, Stuttgart) betrachtet. Die maximale Anregung im UV Bereich erfolgte bei 364 nm die Emission im Blaulicht bei 460 nm (Filterblock A, Leitz, Wetzlar). Mit Hilfe einer CCD-Kamera (Kappa, Gleichen) konnten die mikroskopischen Bilder direkt in den Computer eingezogen und dort weiter verarbeitet werden. Von den unterschiedlich behandelten Zellen wurden mehrere Bildausschnitte abgespeichert und hinterher mindestens 200 Zellkerne ausgezählt und so der Prozentsatz apoptotischer Kerne ermittelt. Als apoptotische Kerne wurden solche gewertet, die bereits deutliche Chromatinkondensation aufwiesen und daher deutlich stärker als Kontrollzellen fluoreszierten.

## **2.6 Elektronenmikroskopie**

### **2.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie**

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden  $50 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz in 10 ml Standardmedium benötigt. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich abzentrifugiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte über Nacht auf Eis in 1%iger

vorgekühlter Glutaraldehydlösung. Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer mit 0,1 M Sucrose gewaschen. Das Pellet wurde in einer geringen Menge 1%iger Agarose resuspendiert. Nach Aushärten der Agarose konnten dann Blöcke mit einer Kantenlänge von maximal 1 mm geschnitten werden. Die folgenden Schritte bis zur Einbettung wurden auf Eis mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Agaroseblöcke wurden erneut wie oben gewaschen. Nun erfolgte für 2 Stunden die Osmiumfixierung mit einer 1%igen Osmiumtetroxidlösung (1,25 ml 4%ige Osmiumtetroxidlösung; 1 ml 0,1 M HCl; 1,94 mg Natriumacetat  $\times$  3H<sub>2</sub>O; 2,94 mg Diethylbarbital; ad. 5 ml A. dest.). Nach zweimaligem Waschen der Blöcke für 10 Minuten in einer wässrigen 0,1 M Sucroselösung, erfolgte für 1 Stunde die Kontrastierung in einer wässrigen 2%igen Uranylacetatlösung. Nach erneutem Waschen in 0,1 M Sucroselösung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (jeweils 10 Minuten 50%, 70%, 80%, 90%, 95% und 2  $\times$  100% Ethanol). Die Einbettung der Probenblöcke erfolgte in dem niederviskosen Einbettungsmedium Spurr (Serva; bestehend aus den 4 Komponenten ERL 4206, D.E.R. 736, NSA und DMAE, die nach Anleitung des Herstellers gemischt wurden). Die Spurrblöckchen wurden auf einem Ultratrimgerät der Firma Reichert getrimmt und anschließend an einem Ultramikrotom (LKB 2088, Bromma) mit einem Diatome-Diamantmesser (Messerwinkel 45°) Schnitte von ca. 80-100 nm Dicke angefertigt. Diese Schnitte wurden mit Xylol-Chloroform Dampf gestreckt und auf die mit Formvar (Plano, Wetzlar) beschichteten Kupfergrids (300 Maschen; Science Services, München) aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 10%igen methanolischen Uranylacetatlösung und einer CO<sub>2</sub>-freien Bleicitratlösung (1,33 g Bleinitrat; 1,76 g Natriumcitrat  $\times$  2H<sub>2</sub>O; 8 ml 1 N NaOH; ad. 50 ml A. dest.) doppelkontrastiert. Die Grids wurden zunächst für 5 Minuten in Uranylacetat inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in wasserfreiem Methanol, dann in 50%igem Methanol und schließlich A. dest., folgte für 5 Minuten die Bleicitratkontrastierung. Abschließend wurden die Grids dreimal mit entgastem A. dest. gewaschen. Das Mikroskopieren der Proben fand an einem Zeiss Elektronenmikroskop (EM 109) bei 80 kV Beschleunigungsspannung statt. Die erzielten Ergebnisse wurden auf Agfa Scientia EM-Planfilm (HJQ7B) dokumentiert. Die speziell für die Transmissionselektronenmikroskopie benötigten Lösungen und Substanzen wurden von Serva, Heidelberg, bezogen.

### 2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung über Nacht auf Eis bei 4 °C fixiert. Hierzu wurde zunächst eine 66,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und eine 66,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Lösung hergestellt und im Verhältnis 27,4 : 72,6 (v/v) gemischt. Eine 25%ige Glutaraldehydlösung wurde dann in diesem Phosphatpuffer (pH 7,2) 1:10 verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit A. dest. gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 35%, 50%, 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol) entwässert. Nach Abnahme des 100%igen Ethanols wurden die Zellen mit Hexamethyldisilazan überschichtet, so daß die Zellen gerade bedeckt waren. Nachdem das

Hexamethyldisilazan verdampft war, wurden die Zellen im Exsikkator getrocknet. Die getrockneten HL-60 Zellen wurden dann auf leitfähige Haftaufkleber ('Leit-Tabs', 12 mm Durchmesser, Plano, Marburg) aufgebracht, auf denen sie direkt bedampft werden konnten. Die adherenten P388D<sub>1</sub> Zellen wurden direkt auf den Membraneinsätzen (25 mm Durchmesser; 0,45 µm Porengröße, Falcon) in 6-Well Platten (Falcon) fixiert, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und schließlich mit Hexamethyldisilazan überschichtet. Die Bedampfung der Proben wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Pejsa und Herrn Neufang vom Institut HVT-HZ im Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt. Die Aufnahmen wurden ebenfalls in diesem Institut mit einem Phillips 525M Rasterelektronenmikroskop erstellt.

## 2.7 Proteinanalytik

### 2.7.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.* (1951). Hierzu wurden die folgenden Lösungen benötigt: A) 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH B) 2% Natriumkaliumtartrat C) 1% CuSO<sub>4</sub> D) 100 µl Lösung B mit 10 ml Lösung A mischen und 100 µl Lösung C dazugeben. Diese Lösung muß stets frisch hergestellt werden.

Eine Eichgerade wurde mit 0-50 mg BSA/ml erstellt. Zu 10 µl Probe wurden dann 490 µl Lösung A und 1 ml Lösung D gegeben. Diese Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Folin-Ciocalteu's Reagenz 1:1 mit A. dest. verdünnt zugegeben und gemischt. Diese Proben wurden für 30-120 Minuten im Dunkeln inkubiert und schließlich im Photometer (U2000, Hitachi) bei 600 nm die Absorption bestimmt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde dann mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt.

### 2.7.2 Herstellung von Ganzzellextrakten

Nach der entsprechenden Inkubation wurden die Zellen entweder abzentrifugiert (HL-60 Zellen) oder das Medium einfach abgezogen (P388D<sub>1</sub> und HeLa Zellen). Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und anschließend direkt in heißem Probenpuffer (160 mM TrisHCl, pH 6,8; 4% SDS; 22,8% Glycerin; 4% β-Mercaptoethanol; 0,08% Bromphenolblau) aufgenommen. Diese Extrakte wurden kurz dreimal 5 Sekunden beschallt (Branson W-250, Einstellung: output control 1, duty cycle 60%), um die DNA zu zerkleinern und konnten dann bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Zur Trennung wurden abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins 7,5 bis 15%ige Trenngele verwendet, das Sammelgel war stets 5%ig. Hierfür wurden die

folgenden Lösungen benötigt: Fertiglösung aus 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe); 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 20% SDS. Diese Lösungen wurden für 10 ml Sammelgel bzw. 30 ml Trenngel gemäß der folgenden Tabelle gemischt (Tab. 3). Die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Gellösung erfolgte erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels. Nach Gießen des Trenngels in die vertikale Apparatur (Sigma) wurde die Oberfläche mit Isopropanol überschichtet und nach der Polymerisierung das Sammelgel zugegeben.

Tab. 3: Zusammensetzung der in dieser Arbeit standardmäßig verwendeten SDS-Gele.

Bestandteile im	Sammelgel		Trenngel	
	5%	7,5%	10%	15%
rotiphorese Gel 30	1,7 ml	7,5 ml	10,0 ml	15,0 ml
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	2,5 ml	-	-	-
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	-	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
20% SDS	0,05 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
A. dest.	5,75 ml	14,55 ml	12,05 ml	7,05 ml
10% APS	0,1 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
TEMED	0,01 ml	0,03 ml	0,03 ml	0,03 ml

Der 10fach konzentrierte Laufpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS; pH 8,3. Unmittelbar vor der Beladung des Gels wurden die Proben für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophoresen liefen meist über Nacht bei einer konstanten Spannung zwischen 100 und 150 Volt. Zur Auflösung der phosphorylierten Formen der MAP Kinase ERK1 und ERK2 lief ein 10%iges Gel solange, bis der 33 kD Marker (SDS-7B, Sigma) aus dem 15 cm langen Trenngel herauslief. Für den Nachweis der modifizierten Formen der Raf-1 Kinase und der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> wurde ein 7,5%iges Trenngel verwendet und so lange laufen gelassen, bis der 88 kD Marker (SDS-7B, Sigma) 11 cm vom Übergang Sammelgel zu Trenngel entfernt war. Als Kontrolle für das Auftragen konstanter Proteinmengen wurde das Gel nach dem Lauf entweder mit einer Coomassie Färbelösung (0,2% SERVA Blau R in 50% Methanol; 7,5% Eisessig; Entfärbung in 50% Methanol; 7,5% Eisessig) oder mittels Silberfärbung (Silver Stain Kit, Sigma) nach Anleitung gefärbt.

#### 2.7.4 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (Western Blotting)

Nach dem Lauf wurden die Proteine aus dem Gel in einer Wet-Blotting Apparatur (Sigma) auf eine PVDF Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Vor der Verwendung wurde die Membran kurz in Methanol getränkt und dann mit Blotpuffer (25 µM Tris; 192 mM Glycin;

10% Methanol) gespült. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins dauerte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran 2 bis 4 Stunden bei 350 mA im Kühlraum unter ständigem Rühren. Nach der Übertragung der Proteine wurde die Membran mit 10%iger Trockenmilch in PBS mit 0,3% Tween 20 (PBS/T) für 15 Minuten zur Absättigung unspezifischer Bindungen geblockt. Danach wurde die Membran 3 mal 10 Minuten mit PBS/T gewaschen und mit dem entsprechenden primären Antikörper (s. Tab. 4) in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für 60 Minuten bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln inkubiert. Alternativ hierzu konnte die Membran auch bei 4 °C über Nacht mit dem Antikörper inkubiert werden. Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal 10 Minuten mit PBS/T gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase) erfolgte in einer Verdünnung von 1:3000 in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für weitere 60 Minuten.

Tab. 4: Verdünnungen und Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

	Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
primär	anti ERK1 (K-23)	1:3.000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti JNK1 (C-17)	1:200 (IP)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti JNK2 (N-18)	1:200 (IP)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti Raf-1 Kinase	1:3.000 (WB)	Dr. S. Stabel, Max Delbrück Laboratorium, Köln
	anti cPLA <sub>2</sub>	1:5.000 (WB)	Lilly Research Laboratories, Indianapolis, USA
	anti bcl-2 (100)	1:2.000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti Lamin B (Ab-1)	1:500 (WB)	Calbiochem, Bad Soden
	anti PARP	1:2.000 (WB)	Boehringer, Mannheim
sekundär	anti Kaninchen-HRP	1:3.000 (WB)	Amersham, Braunschweig
	anti Maus-HRP	1:3.000 (WB)	Dako, Hamburg

WB=Western Blot

IP=Immunpräzipitation

HRP=konjugiert mit Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)

Nach abschließendem Waschen der Membran, erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System (*enhanced chemoluminescence*, Amersham). Hierfür wurden die Nachweislösungen nach Anleitung 1:1 gemischt und die Membran damit für 1 Minute benetzt. Auf die in Frischhaltefolie eingepackte Membran wurde schließlich ein spezieller Film (ECL-Hyperfilm, Amersham) aufgelegt.

### 2.7.5 Immunpräzipitation und Immunkomplex Kinase Assay

Für den Nachweis der Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) wurde eine Immunpräzipitation mit anschließendem Immunkomplex Kinase Assay durchgeführt. Hierzu wurden pro Ansatz 20 × 10<sup>6</sup> HL-60 Zellen benötigt. Nach der Inkubation wurden die Zellen

zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl kaltem Lysispuffer (20 mM Tris pH 7,5; 137 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 10% Glycerol; 2 mM Natriumpyrophosphat; 25 mM β-Glycerophosphat; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM PMSF; je 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin) aufgeschlossen. Dieses Lysat wurde dann bei 0 °C und 13.000 × g in einer Tischzentrifuge (5415C, Eppendorf) zentrifugiert. Nachdem aus dem Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt worden war, wurde dieser direkt in die Immunpräzipitation eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wurde für jedem Ansatz die gleiche, maximal mögliche Proteinmenge, mit je 1,5 µl des JNK1 und JNK2 Antikörpers bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach einer Stunde wurden je Ansatz etwa 30 µl in Lysispuffer gequollene Protein A-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) zugegeben und erneut 1 Stunde lang bei 4 °C rotiert. Die über die spezifischen Antikörper an die Protein A-Sepharose gekoppelten Proteinkinasen wurden zweimal mit 300 µl Lysispuffer und einmal mit 300 µl Kinasepuffer (25 mM HEPES pH 7,4; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM β-Glycerophosphat; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) gewaschen. Für die Kinasereaktion wurden 2 µg GST-c-Jun Fusionsprotein (zur Verfügung gestellt von Dr. D. Wilhelm, IGEN, Forschungszentrum Karlsruhe) und 5 µCi γ-<sup>32</sup>P-ATP (spezifische Aktivität: 370 Mbq/ml; Amersham, Braunschweig) in 25 µl Kinasepuffer gegeben und mit den Immunkomplexen bei 30 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, der Überstand mit dem phosphorylierten Substrat in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und 25 µl Probenpuffer (s.o.) zupipettiert. Die Proben wurden 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in Waschpuffer (5% Trichloressigsäure; 10 mM Natriumpyrophosphat) geschwenkt, getrocknet und für die Autoradiographie ein Röntgenfilm exponiert.

## 2.8 Isolierung und Agarosegelelektrophorese apoptotischer DNA Fragmente

Zum Nachweis der apoptose-spezifischen DNA Fragmentierung wurden 1 × 10<sup>6</sup> HL-60 Zellen oder eine mit P388D<sub>1</sub> oder HeLa Zellen semikonfluent bewachsene Petrischale (Durchmesser 35 mm) pro Ansatz verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 200 × g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets für mindestens 10 Sekunden mit 50 µl Lysispuffer (20 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1% NP-40) behandelt. Anschließend wurde dieses Lysat bei 1.600 × g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände enthielten dann die apoptotischen DNA Fragmente, intakte DNA befand sich im Pellet. Die Extraktion der Fragmente aus dem Pellet wurde mit der gleichen Menge Lysispuffer wiederholt. Das Pellet wurde dann verworfen und mit den vereinigten Überständen weitergearbeitet. Die Überstände wurden mit 10 µl einer 10%igen SDS-Lösung versetzt. Dann folgte für mindestens 2 Stunden der Verdau der RNA mit 20 µl RNase A (Stamm: 20 mg/ml) bei 56 °C. Anschließend wurde bei 37 °C für mindestens 2 Stunden der Proteinverdau mit 25 µl Proteinase K (Stamm: 10 mg/ml) durchgeführt. Nach

Zugabe von 50  $\mu$ l 10 M Ammoniumacetatlösung wurde die DNA mit 500  $\mu$ l Ethanol ausgefällt. Die Präzipitation erfolgte entweder über Nacht bei -20 °C oder für 1 Stunde bei -80 °C. Das Präzipitat wurde dann bei 1.000  $\times$  g für 15 Minuten abzentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde die DNA in 20  $\mu$ l Probenpuffer (10 mM TRIS; 1,0 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen.

Für die Agarosegelelektrophorese wurden die Proben (20  $\mu$ l) mit 5  $\mu$ l Ladepuffer (40% Sucrose; 0,25% Xylencyanol; 0,25% Bromphenolblau) gemischt, für 5 Minuten auf 60 °C erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,8%igen Agarosegel in TAE Puffer (40 mM Tris; 1,14% Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,3), dem zuvor 0,5  $\mu$ g Ethidiumbromid/ml zugegeben worden war. Das Gel lief bei 2-3 V/cm und wurde nach dem Lauf mit destilliertem Wasser so lange entfärbt, bis die Hintergrundfluoreszenz verschwand. Schließlich wurde das Gel am Transilluminator (IL-350-M, Bachofer) unter UV-Licht (312 nm) abfotografiert. Die Fotos wurden dann eingescannt und mit dem bildverarbeitenden Programm Picture Publisher (Micrografx) am Computer invertiert. Hierdurch wurden gerade Banden im niedermolekularen Bereich deutlicher sichtbar.

## 2.9 Tyrosinphosphatase Assay

Zur Untersuchung der Tyrosinphosphataseaktivität wurde von der Firma Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, ein Assaykit bezogen. Pro Ansatz wurden  $20 \times 10^6$  HL-60 Zellen durch Beschallung (s.o.) in 3 ml Probenpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2 mM EDTA; 1 mM Benzamidine; 0,1 mM PMSF; 10  $\mu$ g/ml Pepstatin; 10  $\mu$ g/ml Leupeptin) lysiert. Die partikuläre Fraktion wurde mittels Ultrazentrifugation mit 100.000  $\times$  g für 45 Minuten bei 4 °C (Beckman L3-50, TI-50 Rotor) entfernt. Der Überstand wurde zunächst über eine Sephadex G-25 Säule geschickt, um endogenes Phosphat zu entfernen. Aus dem Überstand wurde außerdem eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Aus dem so erhaltenen Lysat konnte anschließend die Freisetzung von Phosphat aus tyrosinphosphorylierten Peptiden (END(pY)INASL und DADE(pY)LIPQQG, im Kit enthalten) gemessen werden. Die Reaktion wurde in Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Der Nachweis des freigesetzten Phosphates erfolgte über eine Farbreaktion mit einem ebenfalls mitgelieferten Molybdatreagenz, die bei 600 nm im Plattenphotometer (Titertek Multiskan Plus MK II) gemessen wurde. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden mit Werten aus einer Eichkurve verglichen, die aus einem Phosphatstandard in phosphatfreiem Wasser erstellt wurde.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Freisetzung von Arachidonsäure

Früher konnte bereits nachgewiesen werden, daß trialkylierte Zinnverbindungen strukturabhängig die gleichen Wirkungen entfalten können. Dies gilt für die Toxizität, den Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und auch die Freisetzung von Arachidonsäure (Ade *et al.*, 1996; Zaucke, 1993). Da die Vielzahl der verfügbaren Verbindungen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wurde für die meisten Versuche exemplarisch die wirksamste und sicherlich auch für die Umwelt relevanteste Verbindung Tributylzinn (TBT) verwendet. Besonders wichtig erscheinende Ergebnisse wurden dann stichprobenweise auch für andere Verbindungen überprüft. Im ersten Teil der Arbeit wurden aufbauend auf den früheren Befunden, daß verschiedene organische Metallverbindungen die Freisetzung von Arachidonsäure induzieren, zunächst einige Versuche zum Stoffwechsel der Arachidonsäure in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Metallverbindungen auf verschiedene Systeme ähnlich wirken. Hierbei war einerseits die Empfindlichkeit, d.h. die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Freisetzung von Arachidonsäure und andererseits die Substratspezifität der induzierten Reaktion nach Behandlung mit organischen Zinnverbindungen von besonderem Interesse.

Die Fähigkeit von TBT, die Freisetzung von Arachidonsäure zu induzieren, wurde an drei verschiedenen Zellsystemen untersucht. Neben den bereits gut charakterisierten HL-60 Zellen wurden menschliche HeLa Zellen und makrophagenähnliche P388D<sub>1</sub> Zellen aus der Maus verwendet. Die zeit- und konzentrationsabhängige Freisetzung ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 4). In allen drei Systemen konnte TBT die Freisetzung von Arachidonsäure induzieren. Die Konzentrationen, die zur Freisetzung führten, wie auch die Zeitverläufe dieser Reaktion glichen sich in den drei untersuchten Zelllinien. Nach 30-minütiger Behandlung der Zellen mit einer Konzentration von 5 µM TBT war deutlich freie Arachidonsäure vorhanden (Abb. 4, linke Seite). Inkubierte man die Zellen mit einer Konzentration von 10 µM TBT, so war in allen drei Systemen bereits nach 5 Minuten freigesetzte Arachidonsäure nachweisbar (Abb. 4, rechte Seite).

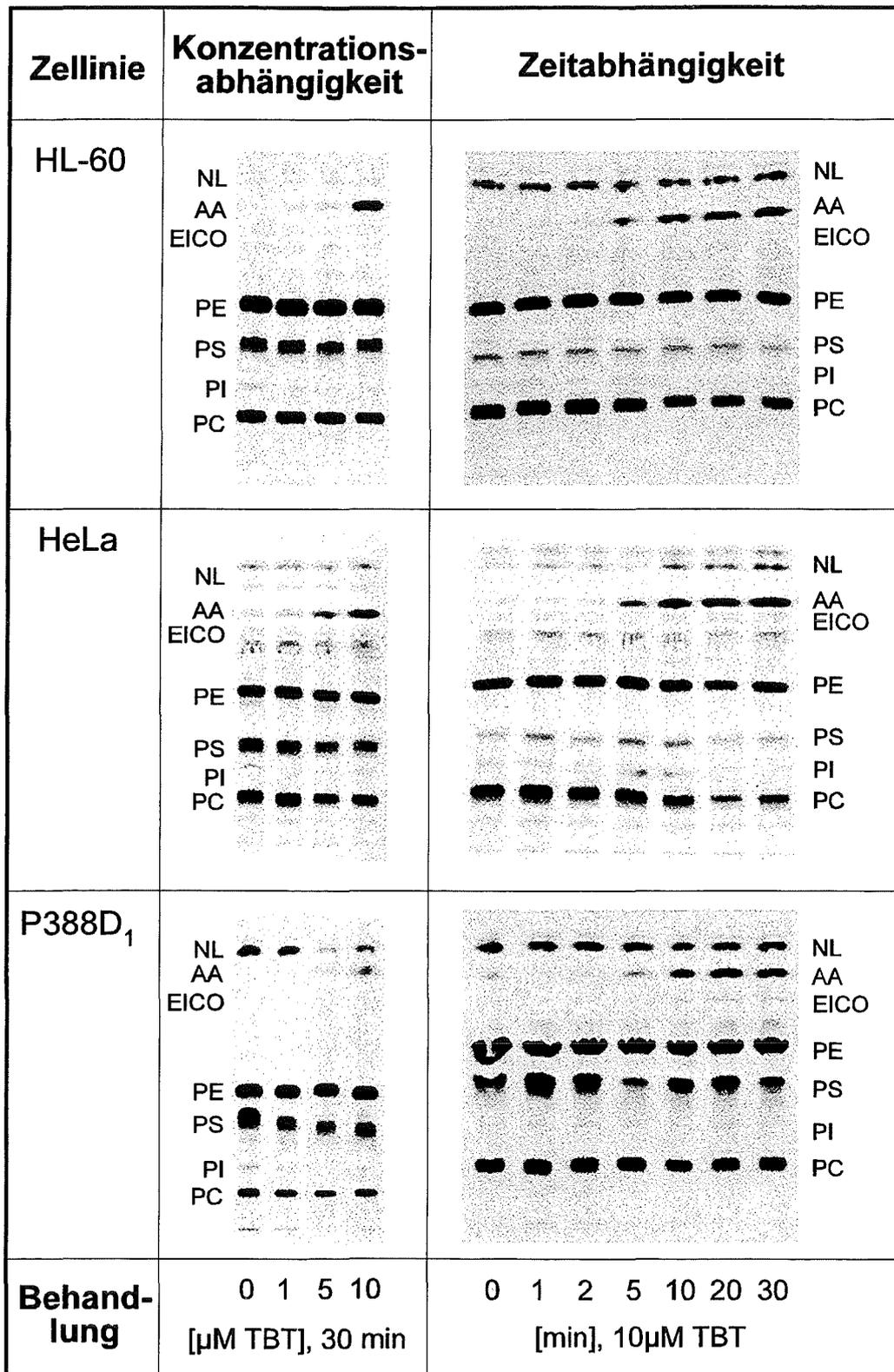


Abb. 4: Konzentrations- und zeitabhängige Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit TBT. Dargestellt sind Autoradiographien der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der zellulären Lipide. Abkürzungen: NL, Neutrallipide; AA, freie Arachidonsäure; EICO, Eicosanoide; PE, Phosphatidylethanolamin; PS, Phosphatidylserin; PI, Phosphatidylinositol. PC, Phosphatidylcholin.

Außerdem wurden die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie quantitativ ausgewertet. Hierzu wurden die Banden aus den Dünnschichtplatten ausgeschnitten und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Dadurch kann festgestellt werden, aus welchen Lipiden die Arachidonsäure freigesetzt wird, was dann Rückschlüsse auf die beteiligte Phospholipase zulässt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind als Differenz des Gehaltes an radioaktiver Arachidonsäure in den verschiedenen Lipiden in Bezug auf die Verteilung in Kontrollzellen dargestellt (Abb. 5A-C).

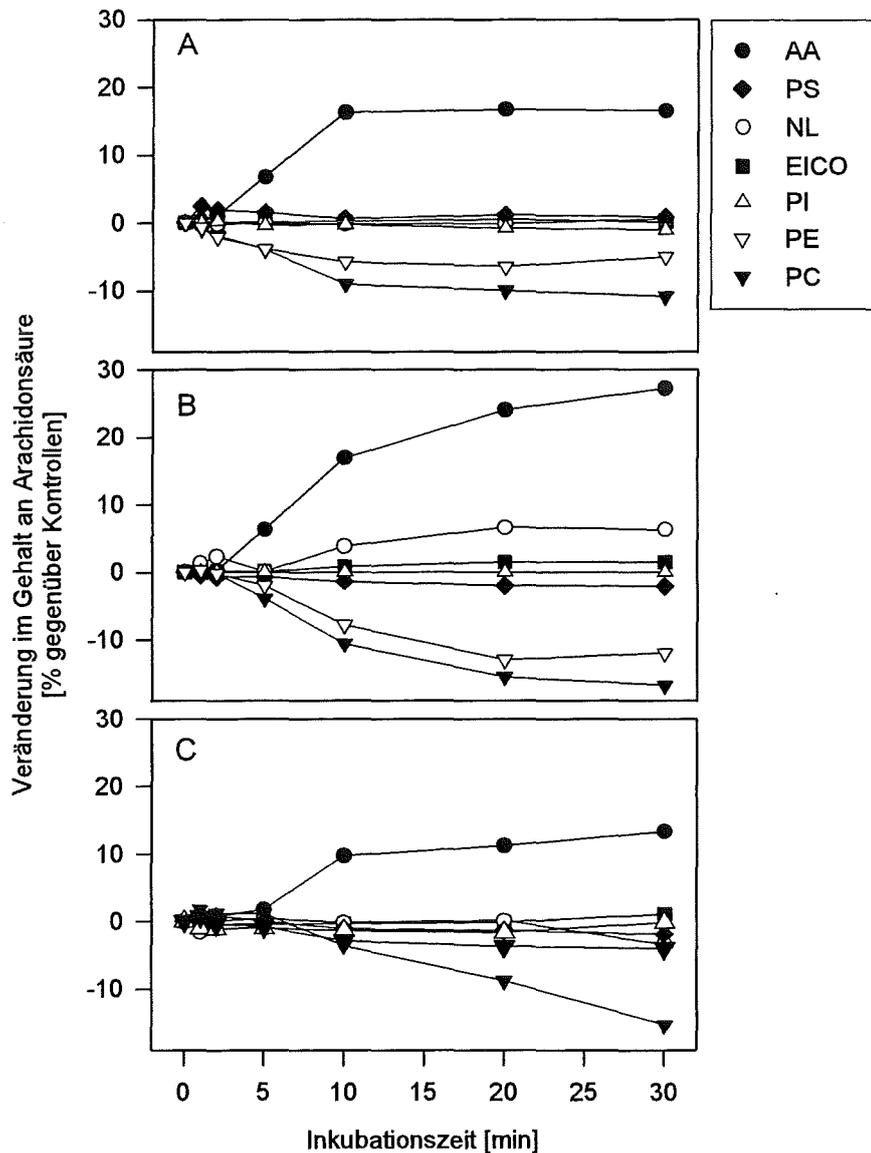


Abb. 5A-C: Verteilung radioaktiver Arachidonsäure in verschiedenen Lipidfraktionen nach Behandlung von HL-60 (A), HeLa (B) und P388D<sub>1</sub> (C) Zellen mit 10  $\mu$ M TBT für die angegebenen Zeitpunkte. Abkürzungen wie in Abb. 4.

In HL-60 Zellen lag bereits nach 5 Minuten freie Arachidonsäure vor (Abb. 5A). Die Menge an freigesetzter Arachidonsäure nahm bis zur 10. Minute stetig zu und blieb dann relativ konstant.

Im gleichen Maße wie die Menge an freier Arachidonsäure anstieg, nahm die radioaktive Markierung in den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) ab. Die Hauptmenge der freien Säure stammte nach 30 Minuten aus PC. In den anderen Lipidfraktionen ergaben sich keine nennenswerten Veränderungen.

Die Behandlung mit TBT führte in HeLa Zellen zu einem ähnlichen Ergebnis (Abb. 5B). Der Gehalt an freier Arachidonsäure nahm auch hier bis zur 10. Minute der Inkubation deutlich zu und ging dann langsam in ein Plateau über. Auch hier stammte die Arachidonsäure hauptsächlich aus PC und PE, während die anderen Fraktionen im wesentlichen unverändert blieben.

In P388D<sub>1</sub> Zellen verlief die Kinetik der Freisetzung ähnlich, die freigesetzte Arachidonsäure stammte jedoch fast ausschließlich aus PE (Abb. 5C). Die Markierung in PC blieb auch nach 30 Minuten fast unverändert. Dies deutete bereits einen Unterschied in der enzymatischen Ausstattung bzw. der Regulation der Arachidonsäurefreisetzung in dieser Zelllinie an.

In einer Reihe von Arbeiten, die zur Freisetzung von Arachidonsäure in Neutrophilen bisher durchgeführt wurden, wurde neben physiologischen Stimuli das Calciumionophor A23187 als Positivkontrolle verwendet (Froissart *et al.*, 1989; Ulich *et al.*, 1990). Diese Substanz induziert auch in HL-60 Zellen die Freisetzung von Arachidonsäure (Käfer *et al.*, 1992; Krug & Culig, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem weiteren Versuch das Calciumionophor und TBT gleichzeitig appliziert. Überraschenderweise führte die gleichzeitige Behandlung mit A23187 und TBT noch zu einer Steigerung der Menge an freier Arachidonsäure gegenüber den Einzelbehandlungen (Abb. 6). Auf die Darstellung einer Autoradiographie wurde hier verzichtet, da ab einer bestimmten Schwärzung des Filmes die Unterschiede nicht mehr sichtbar waren und erst durch die Auswertung im Szintillationszähler deutlich wurden.

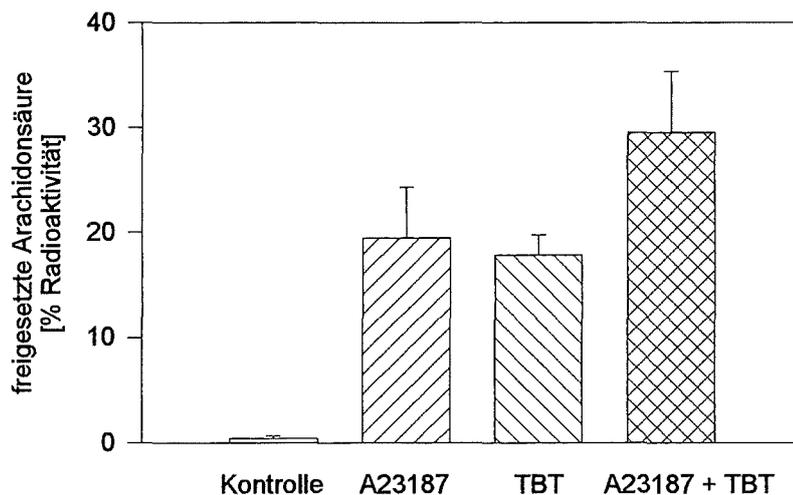


Abb. 6: Freisetzung von Arachidonsäure nach Behandlung von HL-60 Zellen mit dem Calciumionophor A23187 und TBT. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M A23187, 10  $\mu$ M TBT bzw. beiden Substanzen gleichzeitig (n=7).

Diese dramatische Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden kann die Zelle kaum verkraften. In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wird dies deutlich (Abb. 7). Die Behandlung mit TBT führte zum Verlust der Oberflächenstruktur der Zelle, sie war völlig glatt. Die gleichzeitige Behandlung mit A23187 und TBT hinterließ sehr deutliche Spuren in der Membran, ein Großteil der Zellen war dann regelrecht durchlöchert.

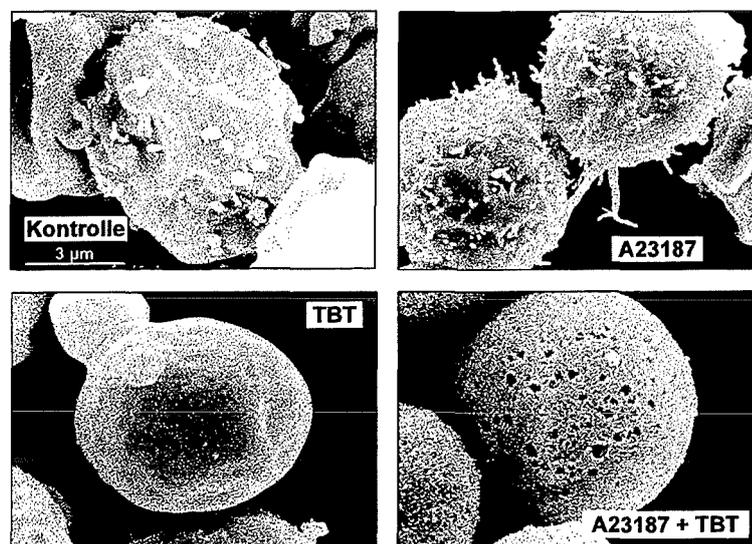


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen, die mit dem Calciumionophor A23187, TBT bzw. beiden Substanzen gleichzeitig für 10 Minuten behandelt wurden. Der bei der Kontrolle angegebene Maßstab gilt für alle Aufnahmen.

## 3.2 Regulation der Arachidonsäurefreisetzung

Um die Regulation der Arachidonsäurefreisetzung zu untersuchen, wurden zunächst Versuche mit verschiedenen Inhibitoren und Substanzen durchgeführt, die bestimmte Prozesse der Signaltransduktion beeinflussen. Im linken Teil der folgenden Abbildungen (Abb. 8-17) ist jeweils die Auswertung aller durchgeführten Versuche dargestellt, rechts daneben ist die Autoradiographie einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der zellulären Lipide nach entsprechender Behandlung exemplarisch abgebildet.

### 3.2.1 Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung

Organische Metallverbindungen induzieren einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der auch für die Freisetzung von Arachidonsäure essentiell sein könnte. Daher wurden zunächst Substanzen eingesetzt, die diese Calciumerhöhung an verschiedenen Angriffspunkten beeinflussen können. EGTA kann durch Chelatieren extrazellulären Calciums einen Einstrom in die Zelle verhindern, Nickel führt durch Blockierung von Calciumkanälen zu einem ähnlichen Effekt. Weiterhin kann durch die Verwendung des intrazellulären Chelators BAPTA/AM eventuell einströmendes oder aus intrazellulären Speichern freigesetztes Calcium

sofort abgefangen werden. Die Effekte dieser Substanzen auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abb. 8, 9, 10).

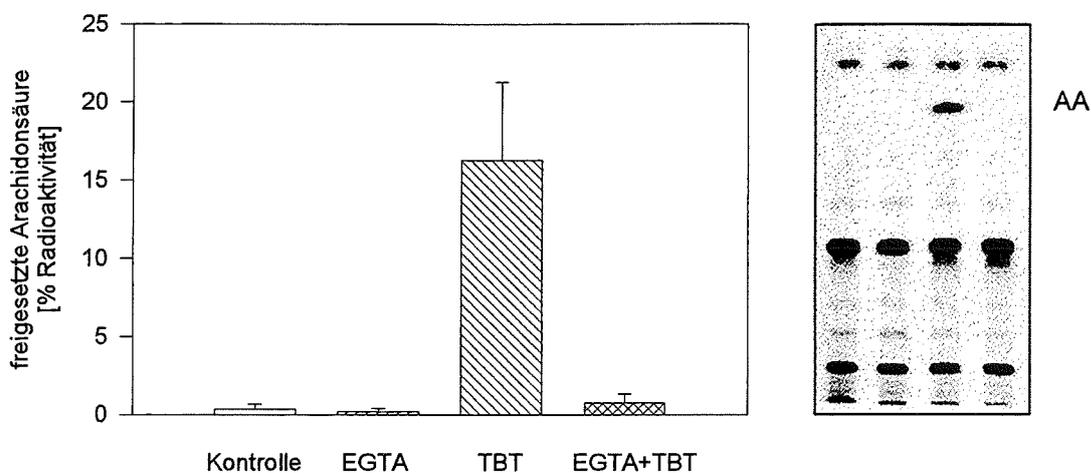


Abb. 8: Effekt der Supplementierung des Mediums mit EGTA auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT in Standardkulturmedium bzw. mit 2 mM EGTA supplementiertem Medium stimuliert (n=3).

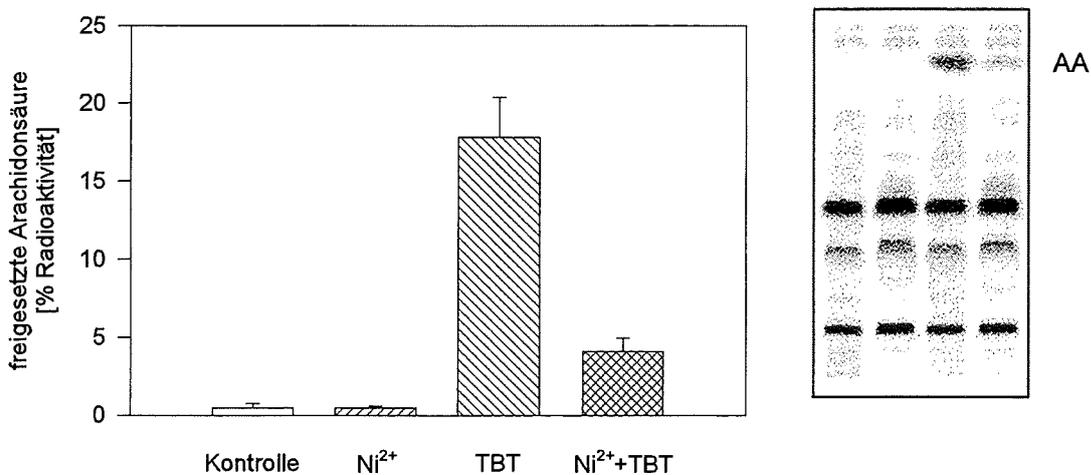


Abb. 9: Effekt von Nickelchlorid auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 1 mM Nickelchlorid vorinkubiert und für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=4).

Die Supplementierung des Standardkulturmediums mit 2 mM EGTA verhinderte die durch TBT stimulierte Freisetzung von Arachidonsäure vollständig (Abb. 8). Die Vorinkubation mit Nickel erniedrigte die Menge der freigesetzten Säure zwar deutlich, dennoch blieben etwa ein Viertel des TBT-stimulierten Effekts erhalten (Abb. 9). Die Vorinkubation mit dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Menge an freier Arachidonsäure. 10  $\mu$ M BAPTA/AM hatten kaum einen Effekt, ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M BAPTA/AM war dann eine deutliche Abnahme zu verzeichnen (auf 21,7 % des stimulierten Wertes), und 50  $\mu$ M BAPTA/AM führte zu einer völligen Hemmung (Abb. 10).

Insgesamt bewirkten somit alle Substanzen, die eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verhindern, eine vollständige Hemmung bzw. eine deutliche Erniedrigung der TBT-induzierten Arachidonsäurefreisetzung.

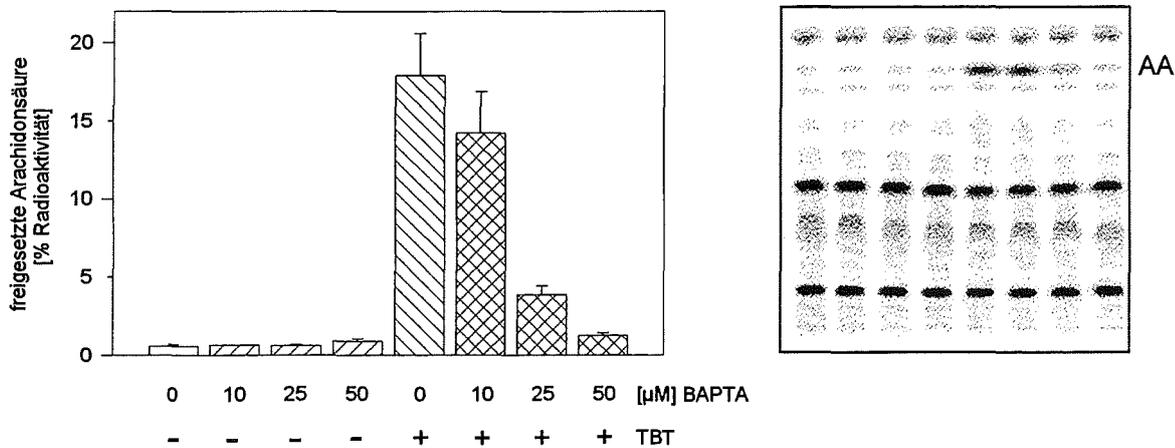


Abb. 10: Effekt des intrazellulären Calciumchelators BAPTA/AM auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit der angegebenen Konzentration BAPTA/AM vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=3).

Um zu untersuchen, ob für die Freisetzung von Arachidonsäure in HL-60 Zellen die cPLA<sub>2</sub> eine wesentliche Rolle spielt, wurden mit Quinacrin und Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF<sub>3</sub>) zwei Inhibitoren dieses Enzyms eingesetzt. Quinacrin und auch das Substratanalogon der Arachidonsäure verringerten die Freisetzung von Arachidonsäure sehr effektiv (Abb. 11, 12).

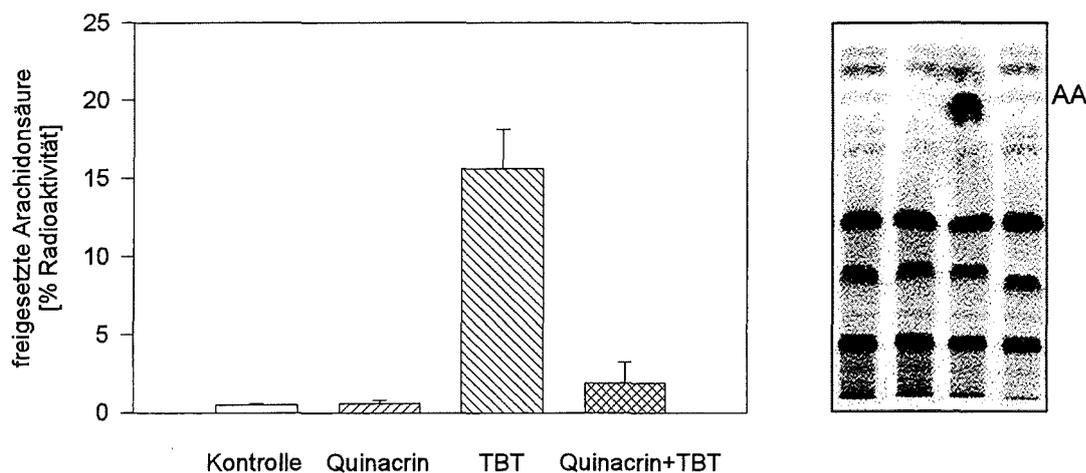


Abb. 11: Effekt von Quinacrin auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 1 mM Quinacrin vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=3).

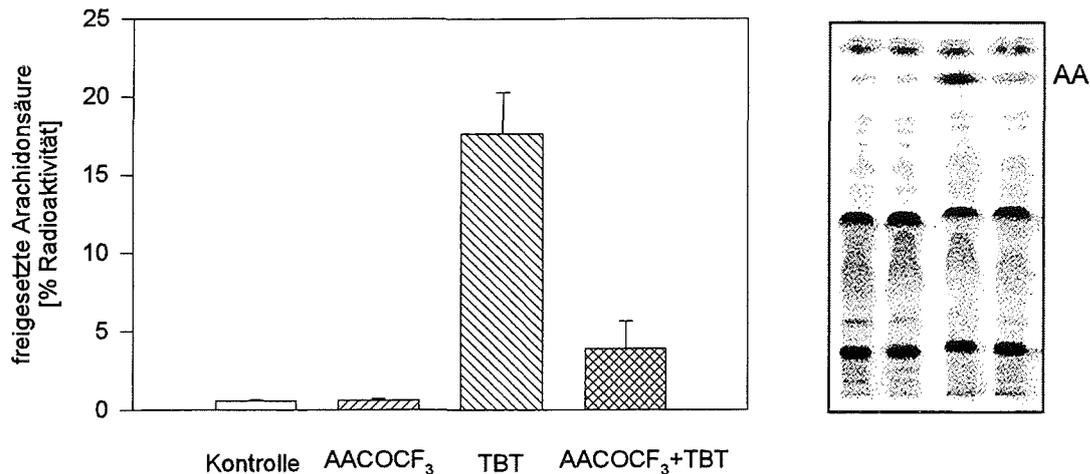


Abb. 12: Effekt von Arachidonyltrifluormethylketon (AACOCF<sub>3</sub>) auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 100  $\mu$ M AACOCF<sub>3</sub> vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=4).

Die cPLA<sub>2</sub> kann über verschiedene Elemente der intrazellulären Signaltransduktion aktiviert werden. Neben der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration spielen Phosphorylierungsreaktionen eine entscheidende Rolle (s. Einleitung, Abb. 2). Im folgenden sollten daher mit Inhibitoren von Kinasen die möglichen Signalwege weiter eingeschränkt werden. Zunächst wurde mit Genistein ein unspezifischer Inhibitor von Tyrosinkinasen verwendet. Die Vorinkubation mit Genistein führte lediglich zu einer bescheidenen Hemmung der TBT-induzierten Arachidonsäurefreisetzung, etwa 60% des TBT-induzierten Effekts blieben erhalten (Abb. 13). Mit Sphingosin, einem Inhibitor der Proteinkinase C und auch der Rezeptortyrosinkinasen konnte die Freisetzung etwas effektiver gehemmt werden (Abb. 14). Die beste Hemmwirkung entfaltete jedoch PD098059, der Inhibitor der MAP Kinase Kinase (MEK). Die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure wurde durch Vorbehandlung mit diesem Inhibitor auf etwa ein Viertel reduziert.

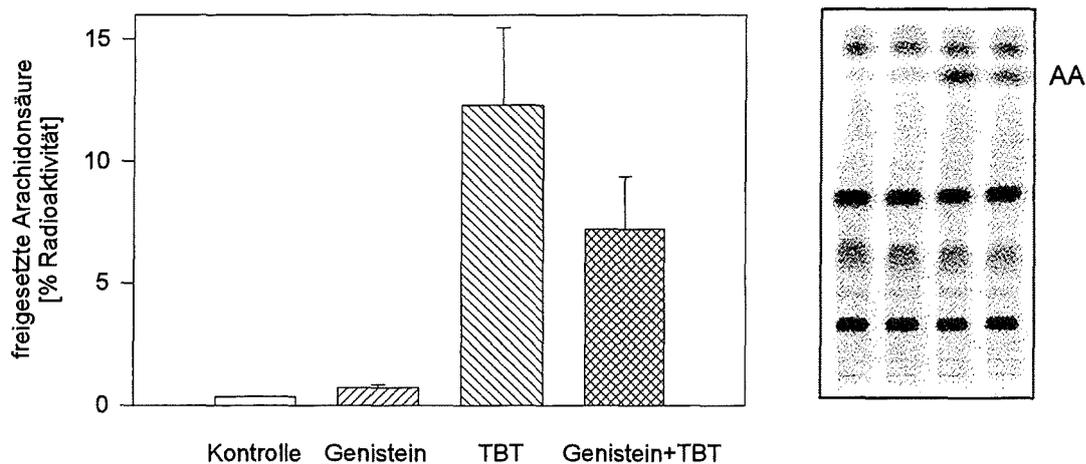


Abb. 13: Effekt von Genistein auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 100  $\mu\text{M}$  Genistein vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu\text{M}$  TBT stimuliert (n=4).

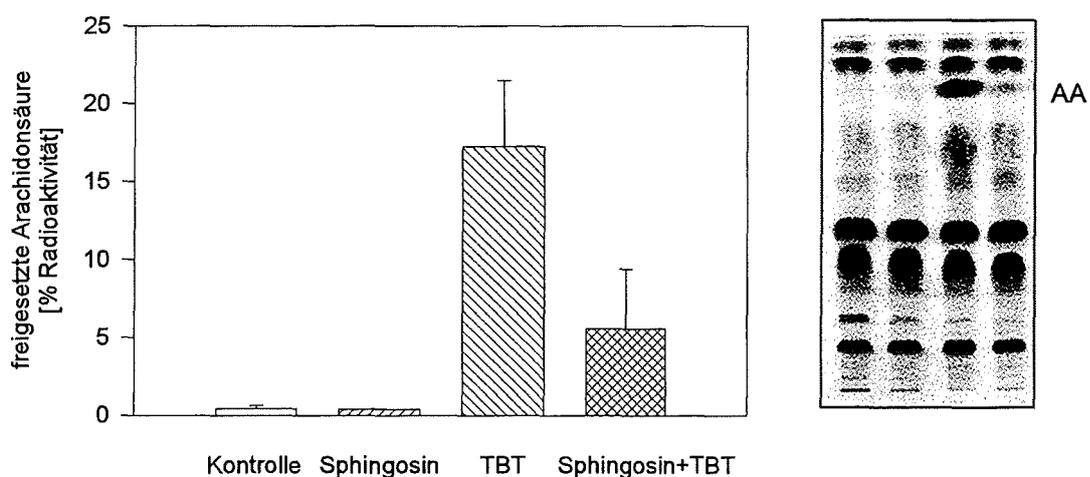


Abb. 14: Effekt von Sphingosin auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 25  $\mu\text{M}$  Sphingosin vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu\text{M}$  TBT stimuliert (n=3).

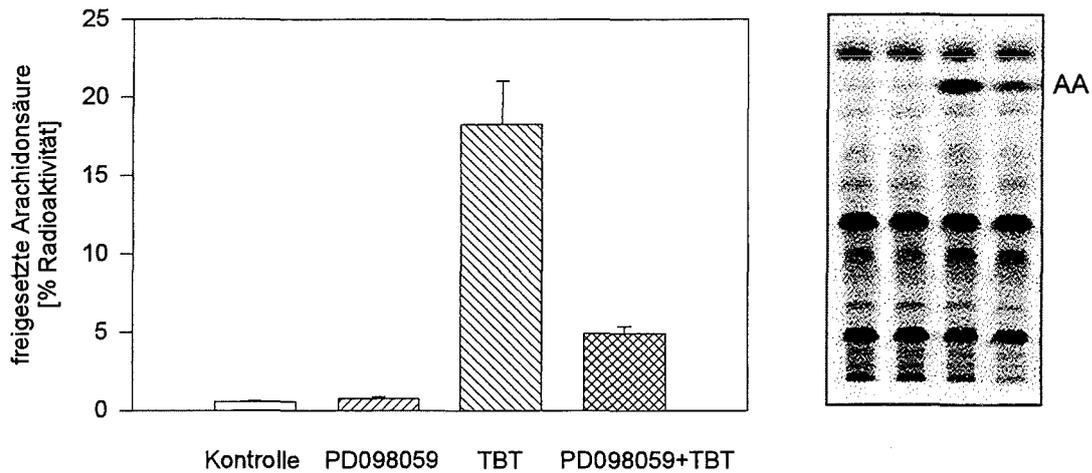


Abb. 15: Effekt von PD098059 auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 50  $\mu$ M PD098059 vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=4).

Weitere Versuche zur Hemmung der Freisetzung von Arachidonsäure wurden schließlich noch mit Dithiothreitol (DTT) und N-Acetylcystein (NAC) durchgeführt. Hiermit sollte zunächst der Effekt von SH-Gruppen Reagenzien auf die TBT-induzierte Arachidonsäurefreisetzung untersucht werden, da organische Zinnverbindungen mit SH-Gruppen interagieren können. DTT könnte TBT abfangen und so zelluläre SH-Gruppen schützen. Im Vergleich zur eingesetzten TBT Menge wurde mit einem hundertfachen Überschuss an DTT gearbeitet. Andererseits sollte mit NAC, einem Antioxidanz, die Bedeutung eventuell entstehender Radikale untersucht werden. Die Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM DTT und auch mit 30 mM NAC verhinderte die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure vollständig (Abb. 16, 17).

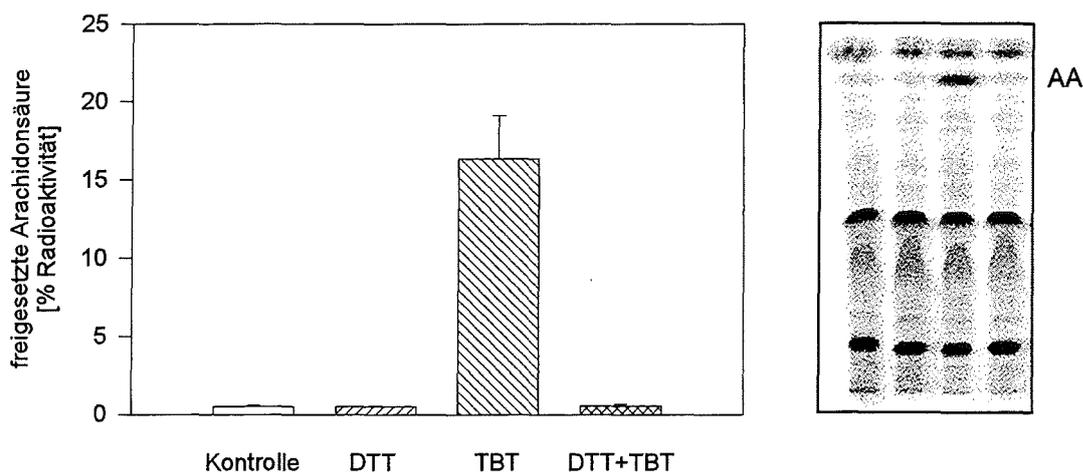


Abb. 16: Effekt von Dithiothreitol (DTT) auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 1 mM DTT vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=4).

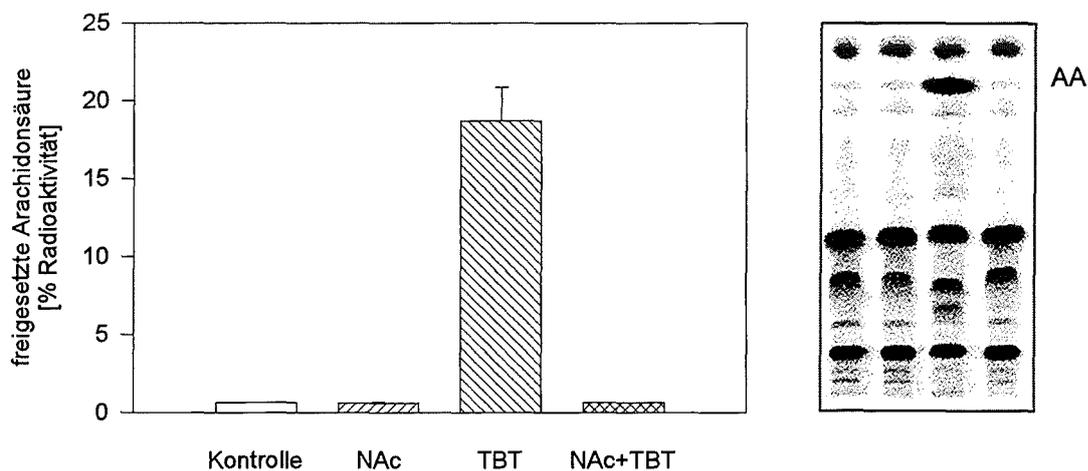


Abb. 17: Effekt von N-Acetylcystein (NAC) auf die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 30 mM NAC vorinkubiert und dann für 10 Minuten mit 10  $\mu$ M TBT stimuliert (n=4).

### 3.2.2 Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>

Ausgehend von der oben beobachteten Substratspezifität und den Ergebnissen der Hemmversuche sollte nun untersucht werden, ob die Arachidonsäurefreisetzung auf die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> zurückzuführen ist. Für die maximale Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> ist neben dem intrazellulären Calciumanstieg die Phosphorylierung des Enzyms essentiell (Lin *et al.*, 1993). Diese Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> hat im SDS-Gel eine verminderte Laufgeschwindigkeit des Proteins zur Folge und kann so nachgewiesen werden. Die Behandlung von HeLa Zellen mit TBT führte zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> (Abb. 18). Bei der oberen Bande handelt es sich um die phosphorylierte, aktive Form (cPLA<sub>2</sub>-P), bei der unteren um die unphosphorylierte, inaktive Form des Enzyms

(cPLA<sub>2</sub>). Aufgrund der oben gezeigten Ähnlichkeiten in der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit (Abb. 4) bzw. der Substratspezifität der Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 5) ist stark anzunehmen, daß TBT auch in HL-60 Zellen zu einer Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> führt.

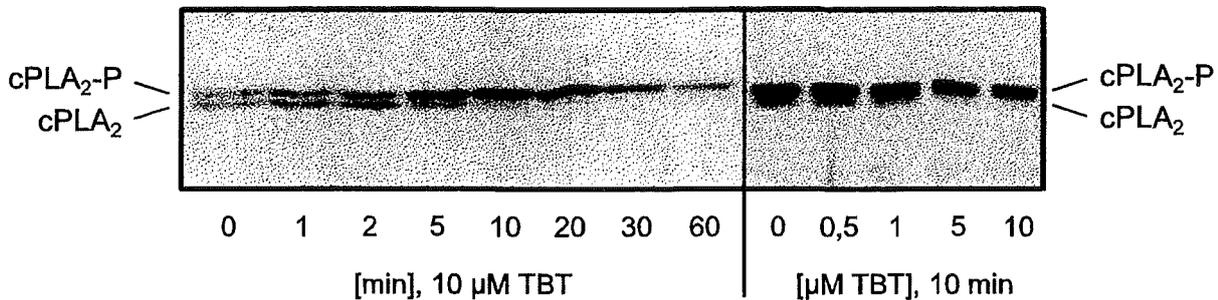


Abb. 18: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) in HeLa Zellen nach Stimulierung mit TBT. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten bzw. mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden Ganzellextrakte hergestellt und mittels eines 7,5%igen SDS-Gels aufgetrennt. Der Nachweis der cPLA<sub>2</sub> erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper.

In Extrakten aus unbehandelten Kontrollzellen waren jeweils zwei deutliche Banden zu erkennen, wobei das Verhältnis der beiden Formen zueinander unterschiedlich sein kann. Nach Stimulierung der Zellen mit TBT war bei einer Behandlungszeit von 5 Minuten die obere Bande bereits stärker ausgeprägt. Nach 20 Minuten ist die unphosphorylierte Form kaum mehr nachweisbar. Im hier dargestellten Untersuchungszeitraum kam es nicht zu einer Rückregulation, d.h. zu einer Dephosphorylierung des Enzyms.

Die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> durch TBT war außerdem konzentrationsabhängig. Ab einer Konzentration von 5 µM TBT lag die cPLA<sub>2</sub> nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten größtenteils phosphoryliert vor.

### 3.3 Aktivierung von Proteinkinasen

#### 3.3.1 Phosphorylierung der MAP Kinase (ERK1/2)

Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, daß die cPLA<sub>2</sub> direkt durch die MAP Kinase aktiviert werden kann (Lin *et al.*, 1993). Die teilweise Hemmung der TBT-induzierten Arachidonsäurefreisetzung durch Inhibitoren von Tyrosinkinase und vor allem durch den Inhibitor der MAP Kinase Kinase PD098059 legten auch hier die Beteiligung von Proteinkinasen nahe. Nachdem demonstriert werden konnte, daß die organischen Zinnverbindungen die Freisetzung von Arachidonsäure und auch die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> induzieren können, sollte daher nun untersucht werden, ob auch die MAP Kinase durch TBT aktiviert wird. In dieser Arbeit ist mit MAP Kinase stets die zuerst entdeckte Form gemeint, die auch als extrazellulär regulierte Kinase (*extracellular regulated kinase*) ERK bezeichnet wird. Hiervon existieren in den meisten Zellen zwei Isoformen mit einem

Molekulargewicht von 44 bzw. 42 kD, die auch als ERK1 und ERK2 bezeichnet werden. Die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 erfolgt ebenfalls durch Phosphorylierung und kann wie auch bei der cPLA<sub>2</sub> durch eine verminderte Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel gezeigt werden. Mit einem geeigneten Antikörper können sogar die beiden Isoformen und die phosphorylierten Moleküle gleichzeitig nachgewiesen werden. Als Beispiel eines physiologischen Stimulus in HL-60 Zellen wurde zunächst die Stimulierung dieser Kinasen nach Behandlung mit dem Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) gezeigt (Abb. 19).

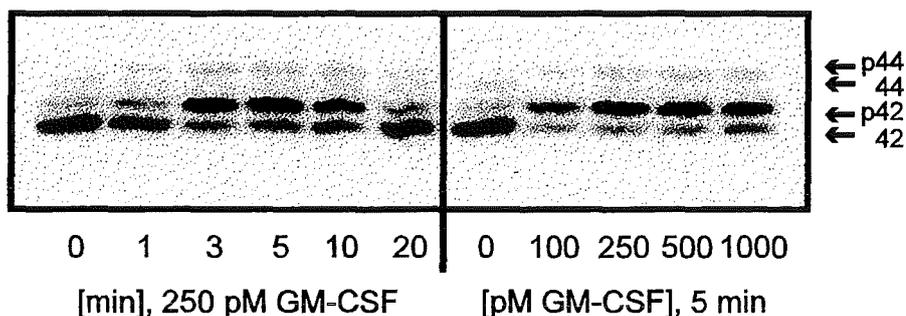


Abb. 19: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen durch den Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Die Phosphorylierung der MAP Kinasen wurde nach Auftrennung von Ganzzellextrakten in einem 10%igen SDS-Gel mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen, der beide Isoformen erkennt. Die rechts angegebenen Zahlen 42 und 44 geben das Molekulargewicht der Isoformen an, wobei es sich bei p42 und p44 jeweils um die phosphorylierte, aktive Kinase handelt.

Die Aktivierung der MAP Kinase verlief nach Behandlung von HL-60 Zellen mit GM-CSF zeit- und konzentrationsabhängig. Innerhalb einer Minute wurde bereits eine Zunahme in der Menge der phosphorylierten 42 kD schweren ERK2 (p42) festgestellt. Nach 3 und 5 Minuten lag das Enzym zu mehr als 50% im phosphorylierten Zustand vor. Nach 20 Minuten war der Ausgangszustand fast wieder erreicht. Die Aktivierung der MAP Kinase fand bereits ab einer Konzentration von 100 pM GM-CSF statt.

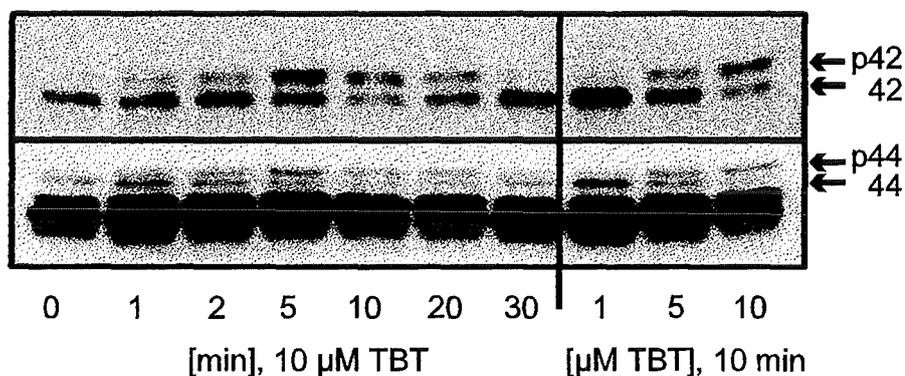


Abb. 20: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen durch TBT.

Die Behandlung von HL-60 Zellen mit TBT führte zu einer ähnlichen Aktivierung (Abb. 20). Innerhalb einer Minute waren Veränderungen im Phosphorylierungszustand von ERK2 nachweisbar. Allerdings ist in HL-60 Zellen das ERK2 Signal immer deutlich stärker. Im unteren Teil der Abbildung wurde der Film etwas länger exponiert. Dadurch wurde deutlich, daß die Aktivierung der ERK1 dem gleichen Zeitverlauf folgte. Im rechten Teil der Abbildung ist die Konzentrationsabhängigkeit dieser Reaktion dargestellt. Die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  TBT führte innerhalb von 10 Minuten noch nicht zu einer Aktivierung. Ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  TBT nahm jedoch das Verhältnis von phosphorylierter zu unphosphorylierter Form stark zu. Dieser Effekt setzte sich bei noch höheren Konzentrationen fort.

Neben TBT wurden auch andere organische Metallverbindungen untersucht. Die Behandlung mit Triethyl-, Tripropyl- und Tripentylzinn induzierte strukturabhängig die Phosphorylierung der MAP Kinase (Daten nicht gezeigt). Auch die Behandlung mit der organischen Bleiverbindung Triethylblei (TEL) führte zu einer Aktivierung. Allerdings verlief hier die Reaktion etwas langsamer, erst nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten war eine deutliche Zunahme der phosphorylierten Form zu erkennen. Außerdem führten mit 50 bis 100  $\mu\text{M}$  TEL erst deutlich höhere Konzentrationen zu einem vergleichbaren Effekt (Abb. 21).

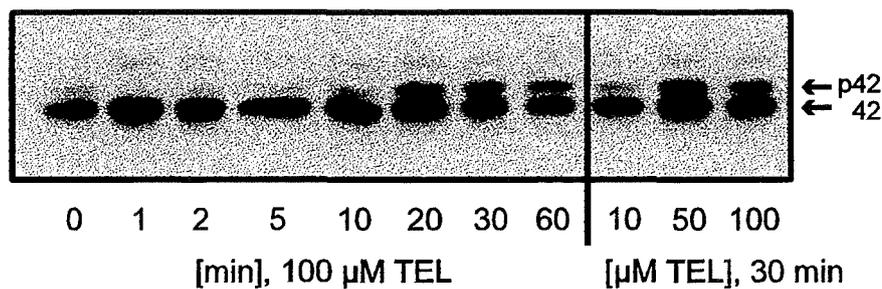


Abb. 21: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen durch TEL.

Die Phosphorylierung der MAP Kinase nach TBT Behandlung führte über die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> schließlich zu einer enormen Freisetzung an Arachidonsäure. Daher wurde untersucht, ob die Behandlung mit Arachidonsäure selbst auch zu einer Phosphorylierung der MAP Kinase führen kann. Bereits nach einer Inkubationszeit von 1 Minute konnte die Aktivierung festgestellt werden. Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure reichten aus, um nach 5 Minuten eine Aktivierung zu induzieren (Abb. 22).

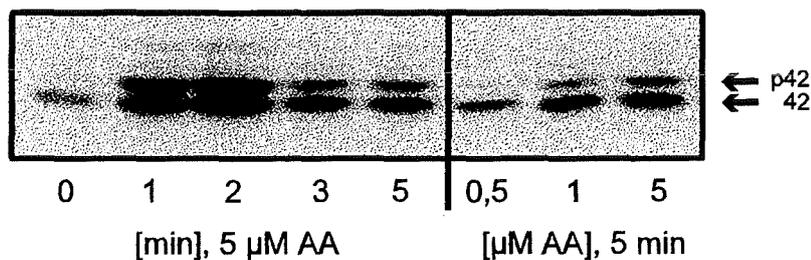
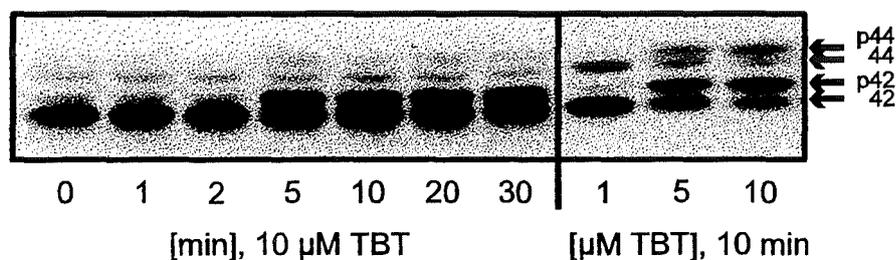


Abb. 22: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen durch Arachidonsäure (AA).

Die Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung mit TBT wurde auch in HeLa und P388D<sub>1</sub> Zellen nachgewiesen, was ein zelltypunabhängiges Wirkungsprinzip nahelegt. Im Gegensatz zu HL-60 Zellen ist in HeLa Zellen das Verhältnis von ERK1 zu ERK2 eher ausgeglichen, in P388D<sub>1</sub> Zellen ist wie in HL-60 Zellen fast nur die ERK2 nachweisbar (Abb. 23). Die Zeitverläufe und die Konzentrationen, die zur Aktivierung der MAP Kinase führten, waren wiederum in allen untersuchten Zellsystemen nahezu identisch.

#### A) HeLa Zellen



#### B) P388D<sub>1</sub> Zellen

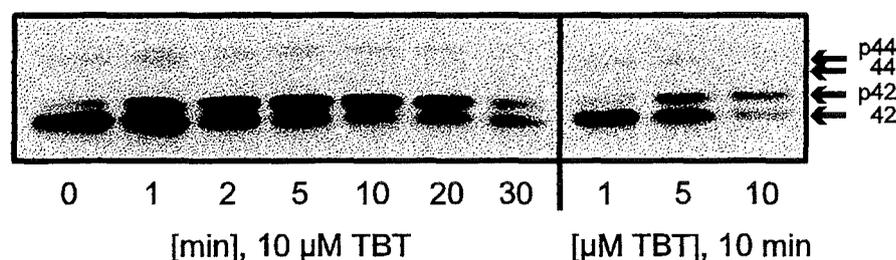


Abb. 23: Zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase in HeLa (A) und P388D<sub>1</sub> Zellen (B) durch TBT.

### 3.3.2 Hemmung der durch TBT induzierten Phosphorylierung der MAP Kinase

In diesem Abschnitt wurden verschiedene Inhibitoren und Substanzen untersucht, die auf der Ebene der Arachidonsäurefreisetzung zu einer Hemmung des TBT-induzierten Effekts führten. Von besonderem Interesse war hier der Inhibitor der MAP Kinase Kinase PD098059. Die Vorinkubation mit diesem spezifischen Inhibitor unterdrückte die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung völlig.

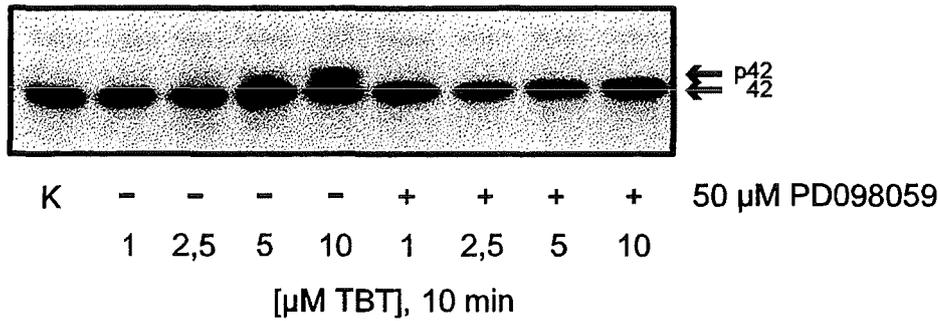


Abb. 24: Effekt des MEK Inhibitors PD098059 auf die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 50 μM PD098059 für 30 Minuten vorinkubiert und dann wie angegeben mit TBT stimuliert.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, daß auch das als cPLA<sub>2</sub> Inhibitor verwendete Quinacrin sehr effizient die TBT-induzierte MAP Kinase Phosphorylierung hemmen kann. Dies bedeutet, daß dieser Inhibitor bereits auf Ebene der MAP Kinase, also oberhalb der cPLA<sub>2</sub>, die Signaltransduktion beeinträchtigt und erklärt, warum nach einer Quinacrinvorbehandlung die Zellen keine Arachidonsäure mehr freisetzen können. Die Vorbehandlung blockierte außerdem die durch gleichzeitige Applikation von A23187 und TBT erreichte Aktivierung völlig.

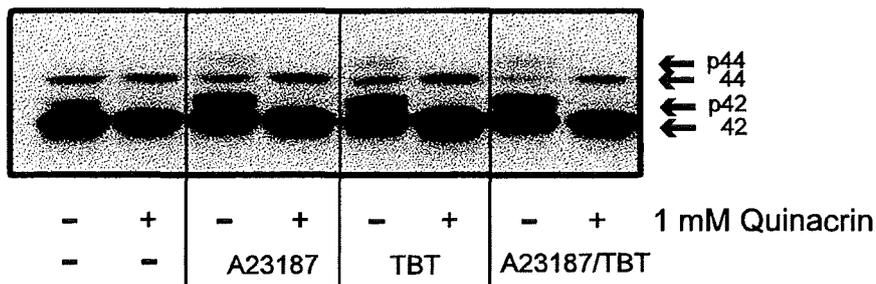


Abb. 25: Effekt des PLA<sub>2</sub> Inhibitors Quinacrin auf die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 mM Quinacrin für 10 Minuten vorinkubiert und dann mit 10 μM A23187, 10 μM TBT bzw. beiden Substanzen gleichzeitig für 10 Minuten stimuliert.

Für die Freisetzung von Arachidonsäure wurde die Bedeutung einer intrazellulären Calciumerhöhung bereits demonstriert (Abb. 8, 9, 10). Daher wurden nun auch mit den beiden Calciumchelatoren EGTA und BAPTA/AM auf Ebene der MAP Kinase Aktivierung Versuche durchgeführt. Im linken Teil der Abb. 26 ist die durch A23187, TBT und GM-CSF induzierte MAP Kinase Aktivierung dargestellt. Eine Supplementierung des Mediums mit 2 mM EGTA verhinderte die A23187- und TBT-induzierte Phosphorylierung völlig. EGTA verhinderte in diesen Konzentrationen auch die Freisetzung von Arachidonsäure (Abb. 8). Dagegen blieb die durch GM-CSF induzierte Aktivierung erhalten. Im rechten Teil der Abb. 26 sind die Ergebnisse nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit BAPTA/AM dargestellt. Die TBT-induzierte Aktivierung blieb durch 10 μM BAPTA/AM unbeeinflusst. Ab einer Konzentration von 25 μM BAPTA/AM führte die Vorinkubation mit dem Chelator jedoch zumindest zu einer teilweisen

Hemmung der Phosphorylierung. Diese Konzentrationsabhängigkeit spiegelt die Ergebnisse bei der Freisetzung von Arachidonsäure in Abb. 10 wider.

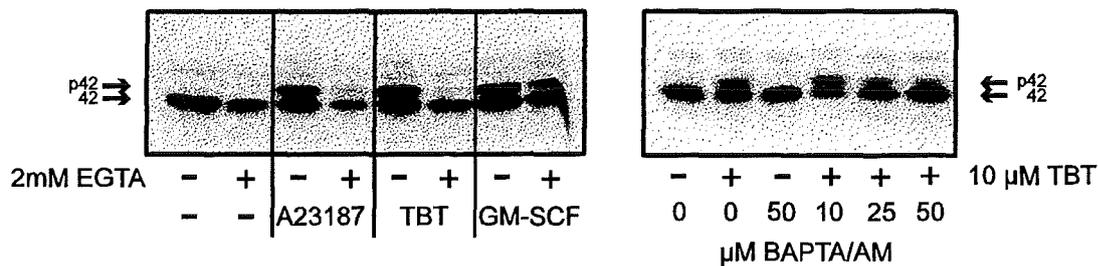


Abb. 26: Einfluß der beiden Calciumchelatoren EGTA und BAPTA/AM auf die induzierte MAP Kinase Aktivierung in HL-60 Zellen. Im linken Teil der Abbildung sind die Ergebnisse nach Supplementierung des Mediums mit 2 mM EGTA dargestellt, im rechten Teil nach 30-minütiger Vorinkubation mit den angegebenen Konzentrationen BAPTA/AM. Die Stimulierung erfolgte mit 10 µM A23187, 250 pM GM-CSF bzw. 10 µM TBT für 10 Minuten.

Abschließend konnte auch für die beiden Substanzen DTT und NAc nachgewiesen werden, daß sie die durch TBT induzierte Aktivierung der MAP Kinase verhindern (Abb. 27). DTT wirkte bereits ab einer Konzentration von 250 µM und NAc hemmte in einer Konzentration von 15 mM sehr effektiv.

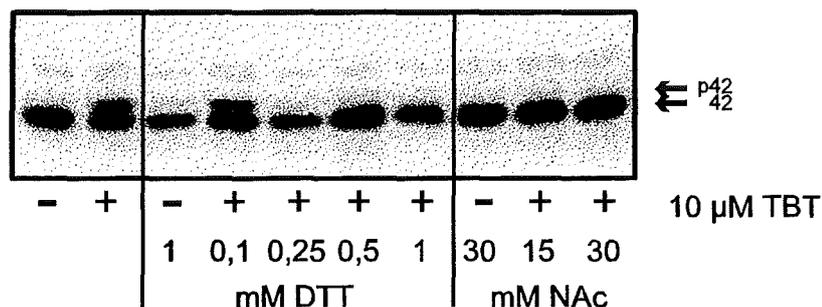


Abb. 27: Effekt von DTT und NAc auf die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen DTT und NAc vorinkubiert und anschließend für 10 Minuten mit 10 µM TBT stimuliert.

### 3.3.3 Modifikation der Raf-1 Kinase

Wie zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt, liegt oberhalb der MAP Kinasen ERK1/2 die MEK1/2. Diese wird direkt von der Raf-1 Kinase aktiviert. Die Regulation der Raf-1 Kinase ist sehr kompliziert und noch nicht gut verstanden. Eine Übersicht hierzu findet man bei Morrison & Cutler (1997). Dennoch ist bekannt, daß eine Aktivierung oft zu einer Modifikation der Kinase führt, die wiederum im SDS-Gel nachgewiesen werden kann. Um den Signalweg, der schließlich zur Freisetzung von Arachidonsäure führt, noch etwas weiter nach oben zu verfolgen, wurde untersucht, ob TBT auch zur Modifikation der Raf-1 Kinase führt. In Abb. 28 ist eine Zeitabhängigkeit der Raf-1 Kinase Modifikation dargestellt. Diese Modifikation folgte der gleichen Kinetik wie die Arachidonsäure Freisetzung, die cPLA<sub>2</sub> Aktivierung und auch die MAP Kinase Phosphorylierung. In unbehandelten Zellen lag nur eine relativ diskrete Bande vor, die sich mit ansteigender Inkubationszeit immer weiter auseinanderzog. Am deutlichsten war

dieses Verwischen der ursprünglich sehr scharfen Bande nach einer Inkubationszeit von 10 bis 20 Minuten zu erkennen.

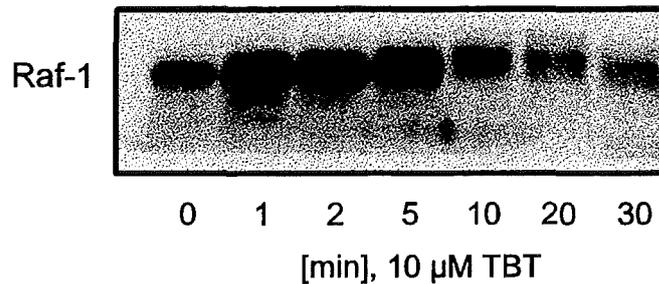


Abb. 28: Modifikation der Raf-1 Kinase in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 10 µM TBT. Die Modifikation der Raf-1 Kinase wurde nach Auftrennung von Ganzzelextrakten in einem 7,5%igen SDS-Gel mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

### 3.3.4 Calciumabhängigkeit der Proteinkinasen

Wie bereits oben gesehen, führt die Behandlung von HL-60 Zellen mit dem Calciumionophor A23187 zu einer enormen Freisetzung von Arachidonsäure. Die Menge der freigesetzten Arachidonsäure nach TBT bzw. A23187 Behandlung war durchaus vergleichbar (Abb. 6). Außerdem führt die Behandlung mit beiden Substanzen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Eine interessante Frage war daher, ob der TBT-induzierte Calciumeinstrom bereits allein ausreicht, um die Aktivierung der Kinase Kaskade zu bewirken. Im folgenden wurden die Effekte dieser beiden Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen auf die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration untersucht und miteinander verglichen. Eine Konzentration zwischen 50 und 100 nM A23187 reichte bereits aus, um einen deutlichen Calciumanstieg in HL-60 Zellen zu induzieren (Abb. 29, links). Innerhalb von 2 Minuten stieg die Calciumkonzentration sehr steil von Werten um 50 nM auf etwa 250 bis 350 nM an, anschließend blieb der gemessene Wert relativ konstant. Auch die Behandlung mit 5 und 10 µM TBT führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Allerdings wurden hier nur Werte zwischen 100 und 200 nM erreicht, und der Anstieg verlief wesentlich langsamer (Abb. 29, rechts).

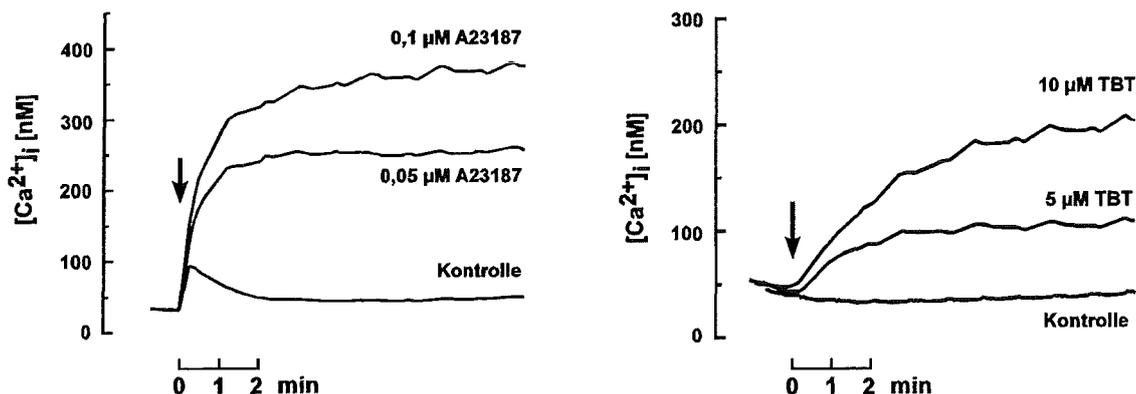


Abb. 29: Messung der intrazellulären Calciumkonzentration in HL-60 Zellen nach Behandlung mit dem Calciumionophor A23187 bzw. TBT in den angegebenen Konzentrationen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe.

In der folgenden Abbildung ist dargestellt, wie sich die Behandlung mit diesen beiden Substanzen auf der Ebene der Kinase auswirkt (Abb. 30).

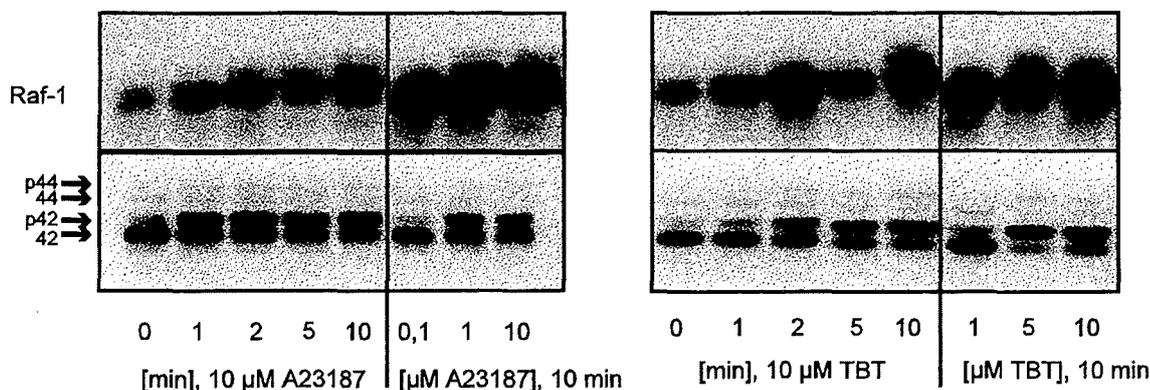


Abb. 30: Effekt des Calciumionophors A23187 und TBT auf die Modifikation der Raf-1 Kinase und die Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.

Überraschenderweise führte auch die Behandlung mit A23187 auf der Ebene der Kinasen zu deutlichen Effekten. Die Modifikation der Raf-1 Kinase bzw. die Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  A23187 verlief sehr schnell. So waren auch hier innerhalb einer Minute Veränderungen im Phosphorylierungszustand der MAP Kinase sichtbar (Abb. 30, links). Die Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  A23187 bewirkte jedoch auch nach 10 Minuten keine Aktivierung der MAP Kinase, obwohl nach dieser Inkubationszeit eine enorme Calciumerhöhung zu verzeichnen war (Abb. 29, rechts). Im Gegensatz hierzu führte die Inkubation bereits mit 5  $\mu\text{M}$  TBT nach 10 Minuten, bzw. 10  $\mu\text{M}$  nach 2 und 5 Minuten zu deutlichen Effekten (Abb. 30, rechts), obwohl zu diesen Zeitpunkten die intrazelluläre Calciumkonzentration noch relativ niedrig war (Abb. 29, links). Schließlich konnte am Beispiel des GM-CSF noch nachgewiesen werden, daß die Aktivierung der MAP Kinase in HL-60 Zellen völlig unabhängig von einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ablaufen kann (Abb. 31). Hierfür wurde mit

500 pM GM-CSF eine Konzentration verwendet, die sicherlich innerhalb kürzester Zeit zur Aktivierung der MAP Kinase führt (vgl. Abb. 19).

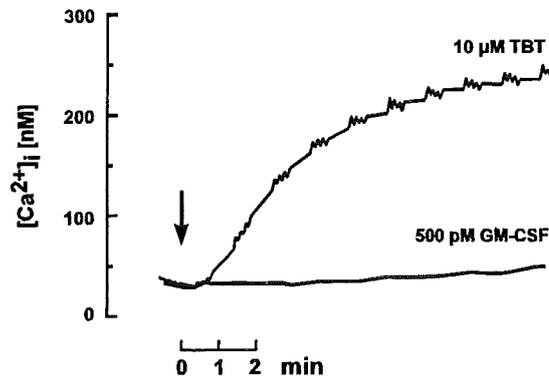


Abb. 31: Messung der intrazellulären Calciumkonzentration in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 500 pM GM-CSF bzw. 10 µM TBT. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe.

### 3.3.5 Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK)

Insgesamt war es relativ unwahrscheinlich, daß TBT spezifisch und ausschließlich die MAP Kinasen ERK1/2 aktiviert. Es wurde daher mit der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) exemplarisch ein weiteres Mitglied der MAP Kinase Familie untersucht. Der Nachweis der Aktivierung erfolgte in einem Immunkomplex Kinase Assay. Die Inkubation mit TBT führte auch hier zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung der JNK (Abb. 32). Die Aktivierung war nach Behandlung mit einer Konzentration von 5 µM TBT bereits nach 5 Minuten zu erkennen. Die Aktivität der JNK stieg über den gesamten Untersuchungszeitraum permanent an. Auch die Inkubation mit einer vergleichsweise niedrigen Konzentrationen von 1 µM TBT führte zu einer Aktivierung der JNK, die jedoch deutlich verzögert verlief und erst nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden nachweisbar war.

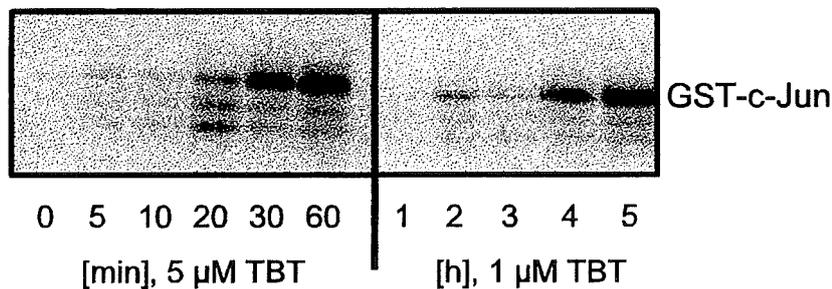


Abb. 32: Kinetik der Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen TBT. Die JNK wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die beiden Isoformen JNK1 und JNK2 immunpräzipitiert. Die Aktivität der JNK wurde dann mittels Immunkomplex Kinase Assay als Phosphorylierung des GST-Fusionsproteins GST-c-Jun nachgewiesen.

### 3.3.6 Effekt von TBT auf Phosphatasen

Als möglicher Mechanismus, der zur Aktivierung von Kinasen führen könnte, die selbst wiederum durch Phosphorylierung aktiviert werden, wurde die Hemmung von Tyrosinphosphatasen in Betracht gezogen. Zur Untersuchung dieses Aspektes wurde ein kommerziell erhältlicher Phosphatase Assay durchgeführt. Hierbei wird aus zytoplasmatischen Extrakten zunächst endogenes Phosphat eliminiert. Nach Zugabe von spezifischen tyrosinphosphathaltigen Substraten wird dann durch die Aktivität der in diesem Extrakt befindlichen Phosphatasen Phosphat freigesetzt.

Die Inkubation des Extraktes mit dem Substrat führte im Vergleich zur Inkubation des Extraktes ohne Substrat zu einer deutlichen Erhöhung der freien Phosphatmenge (Abb. 33). Wurde der Extrakt zusätzlich mit Natriumfluorid, einem Inhibitor von Serin/Threoninphosphatasen, inkubiert, so konnte kein Hemmeffekt beobachtet werden. Dagegen führte die Inkubation mit Natriumvanadat, einem potenten Inhibitor der Proteintyrosinphosphatasen zur Hemmung der im Extrakt befindlichen Phosphatasen. Diese beiden Kontrollen bestätigten die Spezifität des Assays für Proteintyrosinphosphatasen. Die Inkubation des Extraktes mit TBT in einem Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  beeinflusste die Aktivität dieser Phosphatasen nicht. Die Inkubation mit TBT erfolgte für 10 Minuten, da spätestens hier ein deutlicher Anstieg im Phosphorylierungszustand der MAP Kinasen zu verzeichnen war.

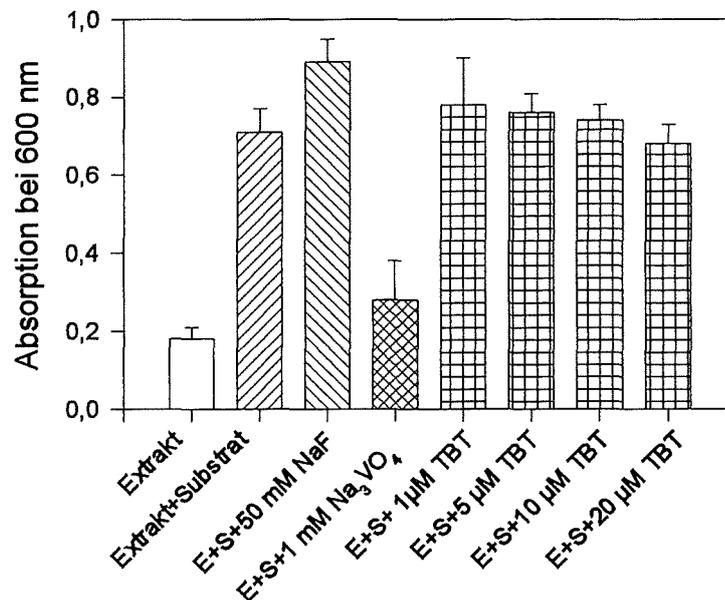


Abb. 33: Effekt von TBT auf die Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen in HL-60 Zellen. Zunächst wurden zytoplasmatische Extrakte von HL-60 Zellen hergestellt. Diese wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen von TBT für 10 Minuten inkubiert. Der Nachweis des durch die Aktivität der zellulären Phosphatasen freigesetzten Phosphates erfolgte photometrisch bei einer Absorption von 600 nm. Abkürzungen: E, Extrakt; S, Substrat (n=3).

### 3.4 Untersuchungen zur organometall-induzierten Apoptose

#### 3.4.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose sind sicherlich am einfachsten zu erkennen. Hierzu gehören vor allem die Bildung von Membranausstülpungen (*blebs*) und letztendlich das Abschnüren von apoptotischen Körperchen (vgl. Abb. 3). Diese Veränderungen können bereits deutlich im Lichtmikroskop beobachtet werden. Die folgenden Abbildungen zeigen diese Vorgänge nach Behandlung von HL-60 bzw. P388D<sub>1</sub> Zellen mit TBT. Zunächst sind die Veränderungen in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT dargestellt (Abb. 34A-F).

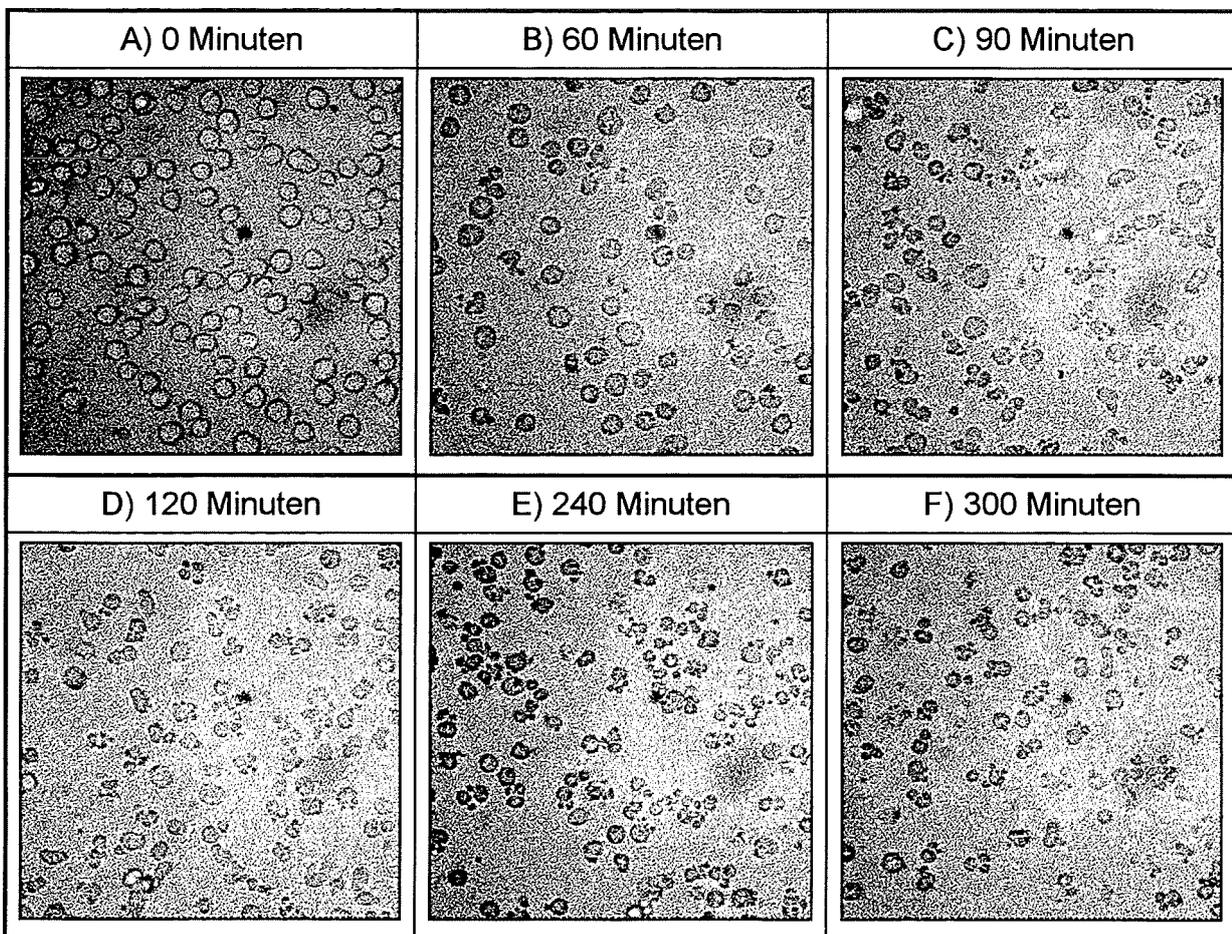


Abb. 34A-F: Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT für die angegebenen Inkubationszeiten. Die Zellen wurden bei etwa 160facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop kontinuierlich beobachtet. Da HL-60 Zellen in Suspensionskultur wachsen, ist in den einzelnen Bildern nicht der gleiche Bildausschnitt dargestellt.

Die unbehandelten Kontrollzellen waren völlig rund (Abb. 34A). Nach 60 Minuten waren bereits die ersten Veränderungen erkennbar, die Zellen bildeten zum Teil hier schon Ausstülpungen (Abb. 34B). Mit länger werdender Inkubationszeit wurden die Effekte immer deutlicher. Nach 90 und 120 Minuten waren kaum noch runde Zellen zu finden, viele Zellen

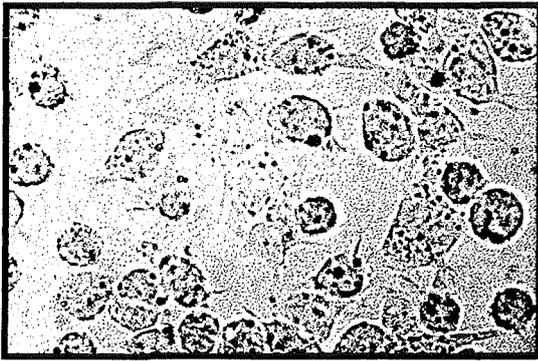
---

bestanden bereits aus mehreren Bläschen, die sich dann auch abschnürten. Die Zellen waren außerdem auch etwas kleiner geworden (Abb. 34C, D). Nach einer Inkubationszeit von 240 und 300 Minuten schwammen zahlreiche abgelöste *apoptotic bodies* im Medium herum (Abb. 34E, F). Da in der Zellkultur natürlich keine Makrophagen vorhanden sind, die diese Bruchstücke rechtzeitig phagozytieren könnten, kommt es zum Teil auch zum Verlust der Membranintegrität. Diese Zellen bzw. deren Bruchstücke, sind dann zwar trypanblau positiv, aber nicht als nekrotisch zu bezeichnen. Man spricht daher auch mittlerweile von sekundärer Nekrose.

Aufgrund ihrer Adhärenz eigneten sich die P388D<sub>1</sub> Zellen im Gegensatz zu HL-60 Zellen sehr gut für Einzelzellbeobachtungen. Die Behandlung mit 5 µM TBT induzierte in P388D<sub>1</sub> Zellen morphologische Veränderungen, die eindeutig als apoptotisch zu bezeichnen waren (Abb. 35), wie spätere Untersuchungen sicherstellten.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, daß TBT in einem bestimmten Konzentrationsbereich die Apoptose induziert. Erhöht man die Konzentration, so laufen die Vorgänge zunächst schneller ab. Eine weitere Erhöhung führt dann zu nekrotischen Erscheinungen. Bei P388D<sub>1</sub> Zellen induzierte auch die Behandlung mit einer Konzentration von 5 µM TBT noch eindeutig die Apoptose, wie spätere Untersuchungen sicherstellten.

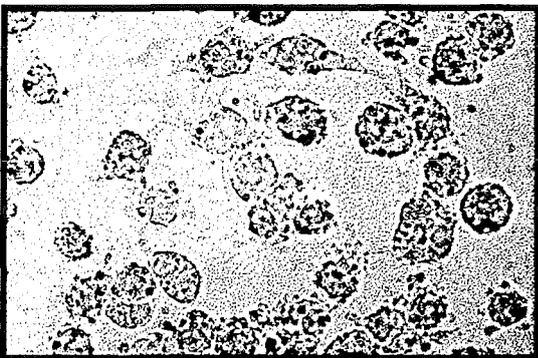
A) 0 Minuten



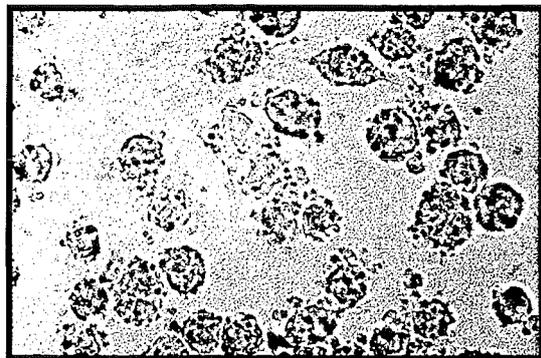
B) 10 Minuten



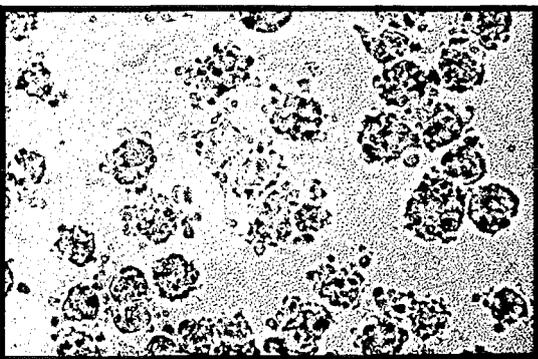
C) 20 Minuten



D) 30 Minuten



E) 45 Minuten



F) 60 Minuten

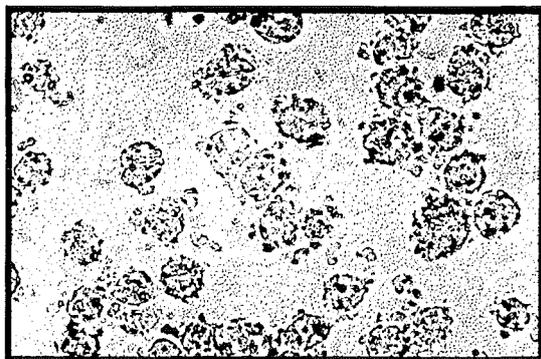
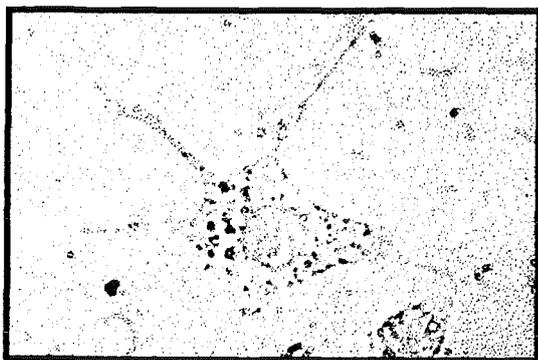


Abb. 35A-F: Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen in P388D<sub>1</sub> Zellen nach Behandlung mit 5  $\mu$ M TBT für die angegebenen Inkubationszeiten. Die Zellen wurden bei etwa 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop kontinuierlich beobachtet. Die einzelnen Aufnahmen zeigen exakt den gleichen Bildausschnitt.

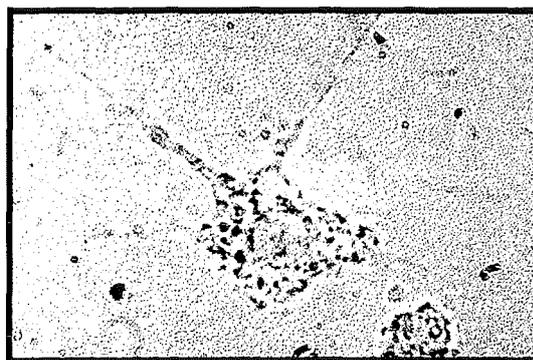
Hier waren bereits ab einer Inkubationszeit von 10 Minuten die ersten Veränderungen zu beobachten. Die Zellen zogen ihre Ausläufer zusammen und rundeten sich insgesamt etwas ab (Abb. 35B). Nach 20 Minuten waren kaum mehr Ausläufer vorhanden, die Zellen wurden langsam runzlicher oder bildeten bereits erste Bläschen (Abb. 35C). Nach 30 Minuten waren fast an jeder Zelle die charakteristischen Ausstülpungen zu erkennen (Abb. 35D). Nach 45 und 60 Minuten verstärkte sich dieser Effekt noch, einzelne Bläschen waren sogar schon abgeschnürt

(Abb. 35E, F). Während des gesamten Vorgangs lösten sich kaum Zellen von der Unterlage ab. In Abb. 36 ist eine einzelne Zelle bei etwa 1.000facher Vergrößerung dargestellt. Zu Beginn der Inkubation war die Zelle flach ausgebreitet und bildete einige Ausläufer (Abb. 36A). Diese Vergrößerung zeigt eindrucksvoll, wie sich die Zelle dann zurückzog und zahlreiche Ausstülpungen auch an ihren Ausläufern bildete (Abb. 36B). Nach 45 und 60 Minuten war der Zellkörper von Bläschen übersät (Abb. 36C, D).

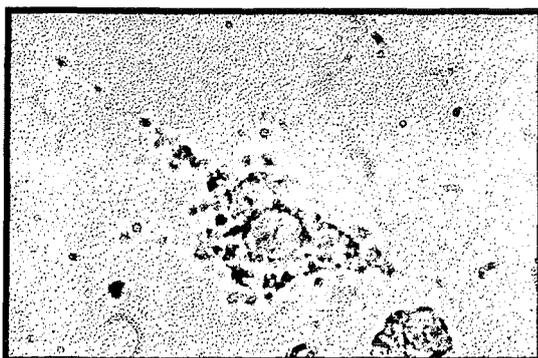
A) 0 Minuten



B) 25 Minuten



C) 45 Minuten



D) 60 Minuten

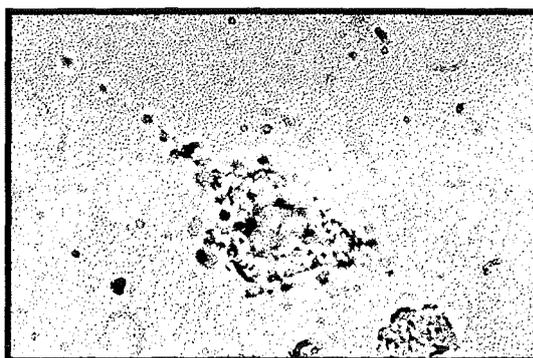


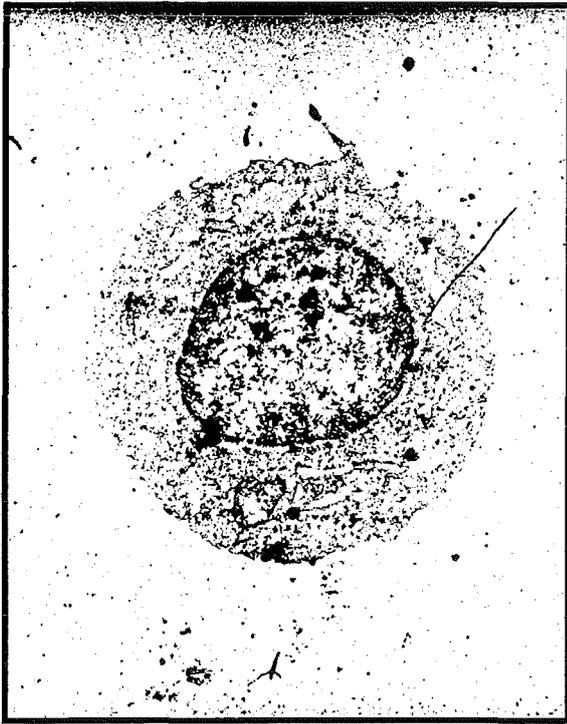
Abb. 36A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen einer einzelnen P388D<sub>1</sub> Zelle nach Behandlung mit 5  $\mu$ M TBT für die angegebenen Inkubationszeiten. Die Zelle wurden bei etwa 1.000facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop kontinuierlich beobachtet.

### 3.4.2 Elektronenmikroskopische Beobachtungen

#### 3.4.2.1 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Noch deutlicher ließen sich die morphologischen Veränderungen natürlich mit elektronenmikroskopischen Techniken erkennen. Allerdings handelt es hierbei um Momentaufnahmen einzelner Zellen. Im folgenden sind zunächst transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen dargestellt.

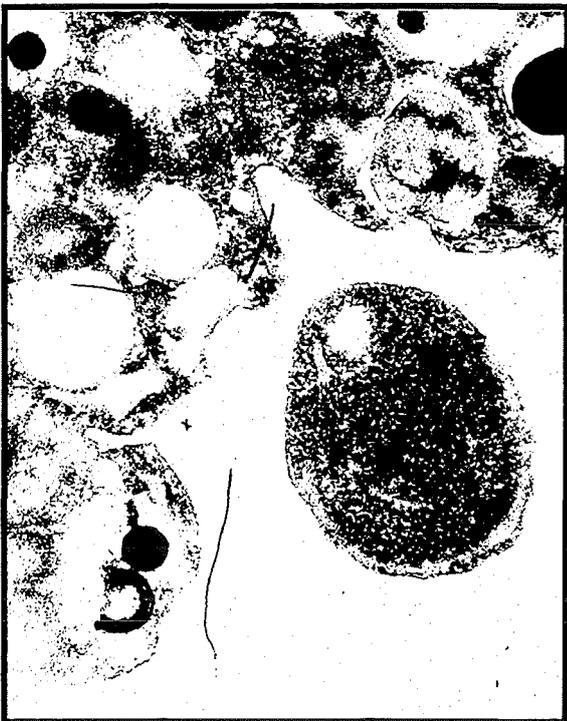
A) unbehandelte Kontrolle



B) Behandlung mit 34  $\mu$ M Etoposid



C) Behandlung mit 34  $\mu$ M Etoposid



D) Behandlung mit 1  $\mu$ M A23187



Abb. 37A-D: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten HL-60 Zellen (A) und nach 5-stündiger Behandlung mit 34  $\mu$ M Etoposid (B, C) und 1  $\mu$ M A23187 (D). Die Vergrößerungen waren 7.000fach (A, B, D) bzw. 20.000fach (C).

Die HL-60 Zellen sind normalerweise völlig rund und haben einen relativ großen Kern (Abb. 37A). Die Behandlung mit verschiedenen apoptose-induzierenden Substanzen resultierte in deutlichen Veränderungen. So führte die Behandlung mit Etoposid, einem Topoisomeraseinhibitor und Standardinduktor der Apoptose in HL-60 Zellen zur Bildung zahlreicher Ausstülpungen und auch apoptotischen Körperchen (Abb. 37B). Der Kern der Zelle war nicht mehr zu erkennen, höchstens stark kondensierte Bruchstücke, wovon hier auch gerade eines in eine Ausstülpung verpackt wurde. Die Ausschnittvergrößerung verdeutlicht, daß das bereits abgeschnürte Körperchen noch von einer Membran umschlossen war (Abb. 37C). Sehr ähnlich sahen auch Zellen aus, die durch Behandlung mit dem Calciumionophor A23187 in die Apoptose getrieben werden. Die Zelle zerfiel regelrecht in mehrere Einzelteile, auch hier waren die Zellbruchstücke noch von Membranen umschlossen (Abb. 37D).

Die Inkubation mit TBT führte zu ähnlichen Erscheinungsformen. Die behandelten Zellen hatten kondensierte und bereits zerfallene Kerne, die von einer deutlich intakten Membran umschlossen waren (Abb. 37E, F, G). Weiterhin konnten Ausstülpungen, die Kernfragmente enthalten (Abb. 37F) und zwei kleine, bereits abgeschnürte Körperchen (Abb. 37G) beobachtet werden. Besonders auffällig war insgesamt die extreme Vakuolisierung der Zelle nach TBT-Behandlung.

Die Behandlung mit Thapsigargin, einem Inhibitor der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und bekannten Apoptoseinduktor in HL-60 Zellen, führte zum gleichen mikroskopischen Bild wie eine Behandlung mit TBT. Auch hier waren die membranumschlossenen Kernfragmente und die starke Vakuolisierung besonders beeindruckend (Abb. 37H).

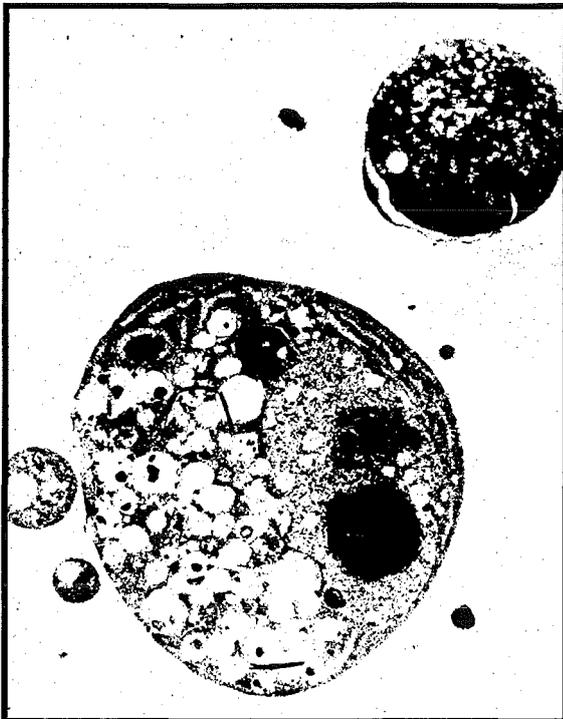
E) Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT



F) Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT



G) Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT



H) Behandlung mit 100 nM Thapsigargin



Abb. 37E-H: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HL-60 Zellen nach 5-stündiger Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT (E, F, G) und 100 nM Thapsigargin (H). Die Vergrößerungen waren 7.000fach (E) bzw. 4.400fach (F, G, H).

### 3.4.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops konnten die Veränderungen an der Zelloberfläche genauer sichtbar gemacht werden. Die Behandlung von HL-60 Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  TBT für 90 Minuten induzierte die Bildung zahlreicher Membranausstülpungen (Abb. 38B). Die behandelte Zelle hatte im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollzelle (Abb. 38A) sämtliche Oberflächenstrukturen verloren.

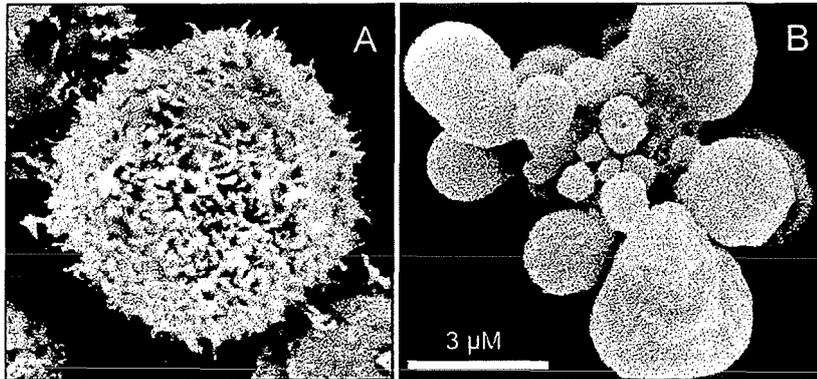
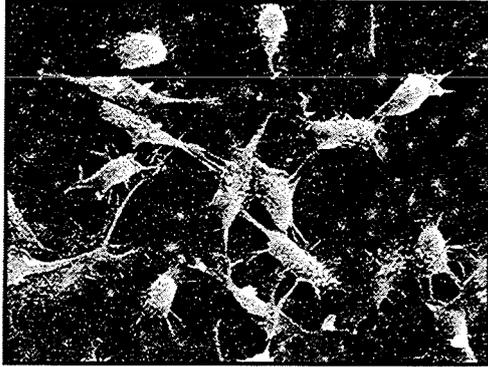


Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten (A) und einer mit 5  $\mu\text{M}$  Triphenylzinn behandelten HL-60 Zelle (B). Die Behandlung erfolgte für 90 Minuten. Der in (B) angegebene Maßstab gilt auch für (A). Diese Abbildung wurde bereits in Krug *et al.* (1996) veröffentlicht.

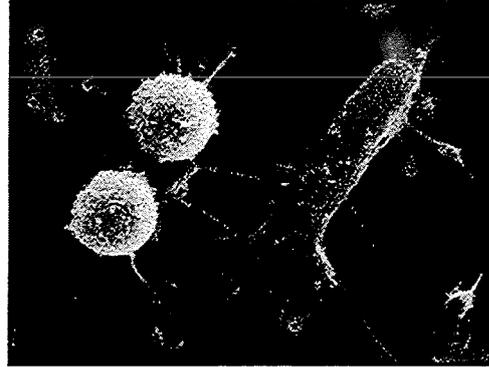
Die adherenten P388D<sub>1</sub> Zellen wurden für die Rasterelektronenmikroskopie direkt auf Membranen kultiviert und konnten dort dann auch fixiert und aufbereitet werden. Dies hatte den Vorteil, daß man die Zellen sozusagen im natürlichen Zustand betrachten konnte.

So wurde in unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 39A, B) besonders deutlich, wie sich die Zellen auf der Unterlage anheften und abflachten. Runde Zellen waren entweder noch nicht angeheftet oder hatten gerade eine Zellteilung hinter sich. Die Zelloberfläche in Kontrollzellen war nicht völlig glatt, sondern strukturiert. Nach der Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  TBT wurden wie bereits im Lichtmikroskop tiefgreifende Veränderungen festgestellt (Abb. 39): Im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 39A, B) waren die mit TBT behandelten Zellen nach 20 Minuten von Membranausstülpungen übersät (Abb. 39C-H). Die Übersichtsabbildung (Abb. 39C) macht deutlich, daß fast alle Zellen betroffen waren. Die Zellen lösten sich während des Vorgangs nicht von der Unterlage ab, zogen allerdings zu Teil ihre Ausläufer ein, die ebenfalls Membranausstülpungen aufwiesen. Als Größenvergleich kann die Membranpore ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) in Abb. 39H verwendet werden.

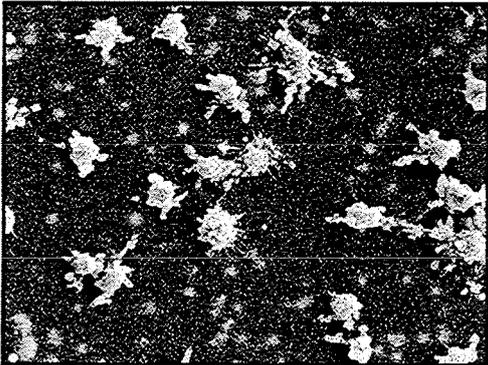
A) Kontrolle, 1.000fach



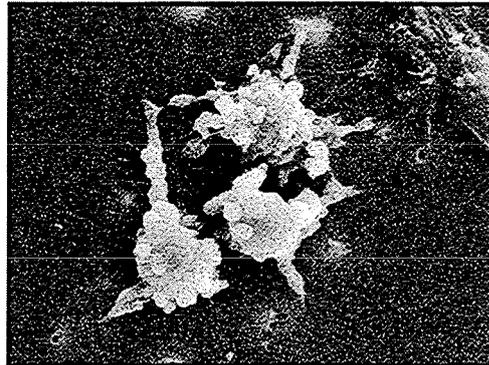
B) Kontrolle, 3.000fach



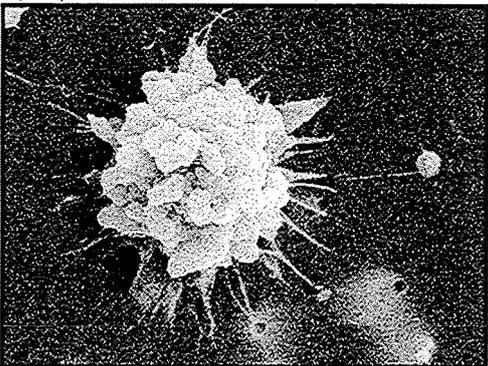
C) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 1.000fach



D) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 3.000fach



E) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 5.000fach



F) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 5.000fach



G) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 3.000fach



H) 5  $\mu$ M TBT, 20 Minuten, 10.000fach

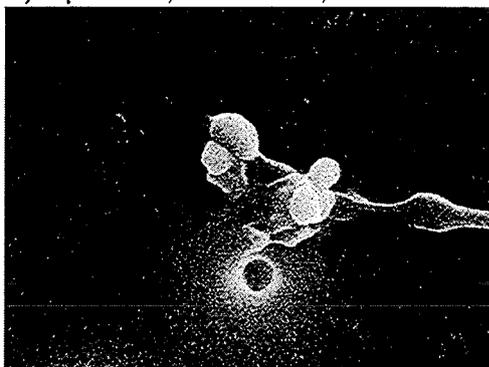


Abb 39A-H: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten (A, B) und mit 5  $\mu$ M TBT für 20 Minuten behandelten P388D<sub>1</sub> Zellen (C-H). Die Vergrößerungen sind in der Abbildung angegeben.

## 3.5 Färbungen

### 3.5.1 Giemsa-Färbung

Zusätzlich zu den rein mikroskopischen Verfahren wurden HL-60 Zellen bzw. deren Kerne noch mit verschiedenen Techniken angefärbt, um die Vorgänge im Kern während der metall-induzierten Apoptose noch besser charakterisieren zu können. Zunächst wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt.

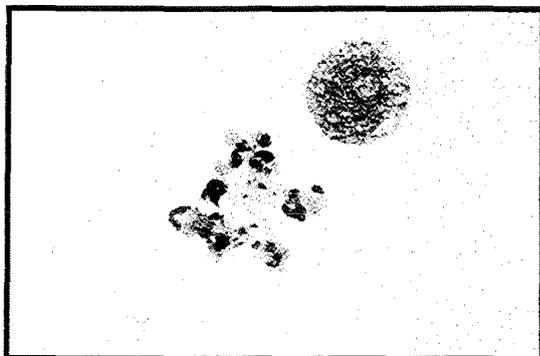
A) unbehandelte Kontrolle



B) Behandlung mit 5 µM TEL



C) Behandlung mit 1 µM TBT



D) Behandlung mit 1 µM TBT



Abb. 40A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten (A) und mit Triethylblei (B) bzw. Tributylzinn (C, D) behandelten HL-60 Zellen nach einer Giemsa-Färbung bei 1.000facher Vergrößerung.

Hier erkennt man erneut den großen runden, fast die ganze Zelle ausfüllenden Kern. In der Abb. 40A wurde außerdem eine mitotische Zelle angefärbt, bei der deutlich die einzelnen Chromosomen zu sehen sind. Die behandelten Zellen unterscheiden sich recht deutlich von den unbehandelten Kontrollen. Einerseits kann man hier die Kondensierung und Auflösung des gesamten Kerns und die Membranausstülpungen erkennen, andererseits wird hier die Volumenabnahme der apoptotischen Zellen deutlich (Abb. 40B, C, D).

### 3.5.2 Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)

Zum Nachweis der Kernfragmentierung eignet sich besonders gut die Anfärbung des gesamten Chromatins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342). In der folgenden Abbildung sind zunächst die Verhältnisse in unbehandelten Kontrollzellen und in mit Etoposid behandelten Positivkontrollen dargestellt. Kerne in Kontrollzellen zeichneten sich durch eine sehr gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz aus (Abb. 41A). In mit Etoposid behandelten Zellen wird die Kondensation des Kernes gegenüber nicht betroffenen Zellen deutlich (Abb. 41B). Die Kondensation führte zu einer Konzentration des Farbstoffs pro Fläche und somit zu einem deutlich stärkeren Fluoreszenzsignal. Auch die Behandlung mit den beiden Metallverbindungen Tributylzinn und Triethylblei hatte die Kondensation des Chromatins zur Folge (Abb. 41C-F).

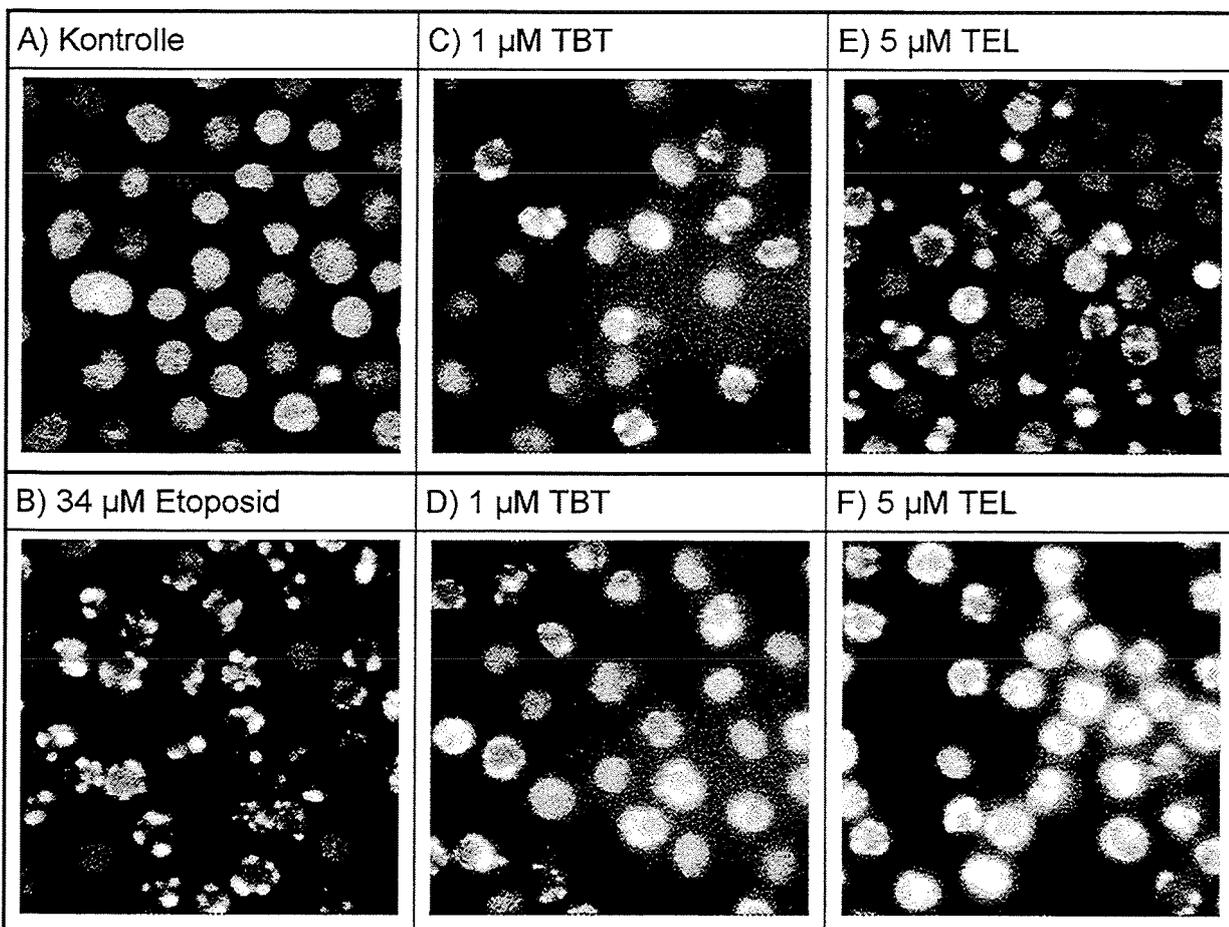


Abb. 41A-F: Kernfärbung in HL-60 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342. Diese Abbildung verdeutlicht die Chromatinkondensation in HL-60 Zellen, die für 5 Stunden mit Etoposid (B), TBT (C, D) und TEL (E, F) behandelt wurden. Diese Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop mit etwa 400facher Vergrößerung erstellt.

Besonders auffällig ist die Bildung von charakteristischen Ringstrukturen (Abb. 41D, F). Das Chromatin wird bereits an die Kernmembran gedrückt, bevor der Kern dann in Einzelteile zerfällt (vgl. auch Abb. 3).

Anschließend wurde der Effekt einer Zinksupplementierung des Kulturmediums auf die induzierte Chromatinkondensation untersucht. Die Supplementierung selbst hatte keinen Effekt auf die Kerne (Abb. 42B). TBT induzierte wie auch Etoposid die Chromatinkondensation (Abb. 42C, E). Diese Effekte wurden durch die Supplementierung des Kulturmediums mit Zink völlig unterbunden (Abb. 42D, F).

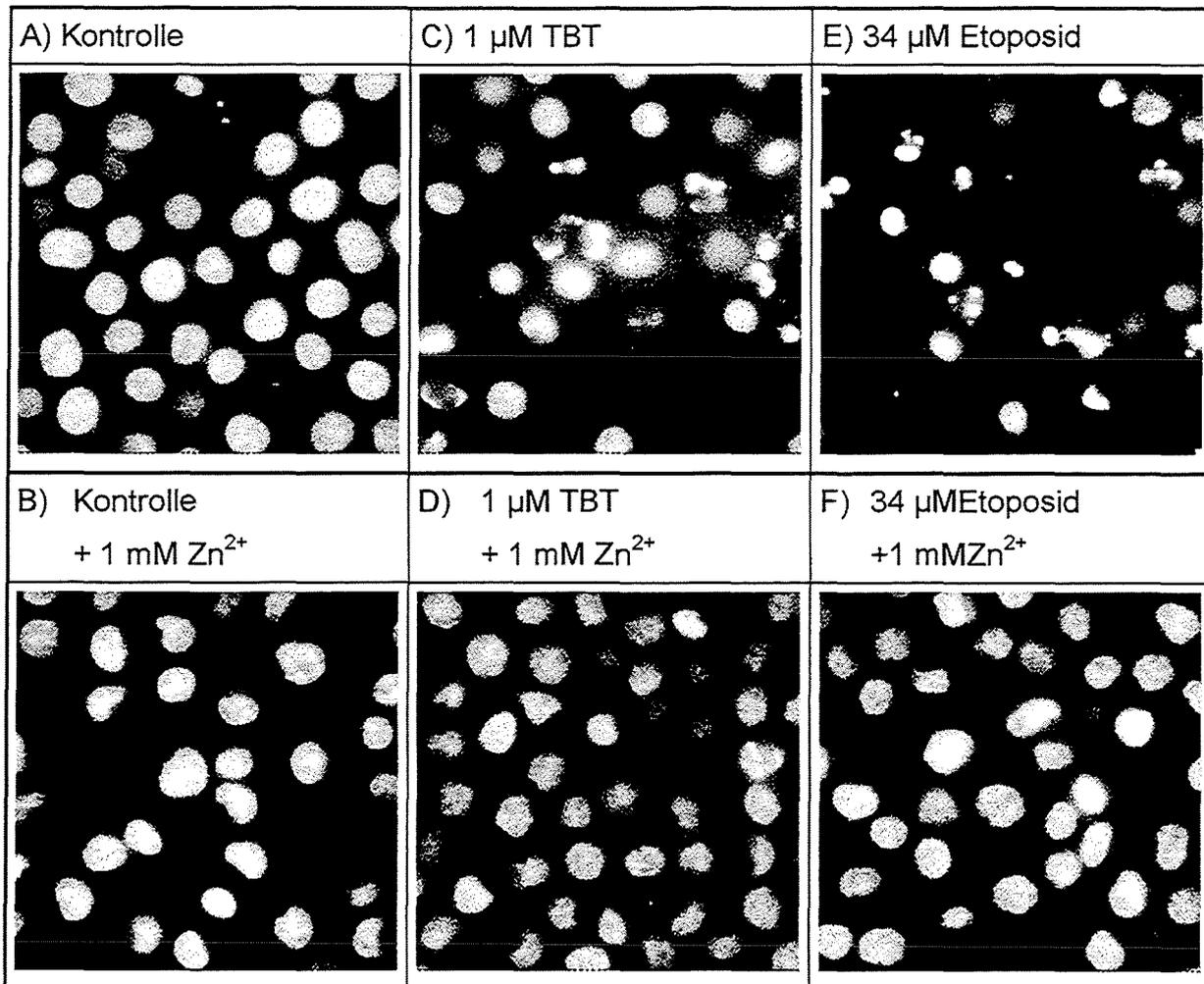


Abb. 42A-F: Effekt der Supplementierung des Mediums mit 1 mM Zn<sup>2+</sup> auf die induzierte Chromatinkondensation. Die Abbildungen in der oberen Reihe (A, C, E) zeigen gefärbte HL-60 Kerne nach 5-stündiger Behandlung in Standardkulturmedium. In den Abbildungen der unteren Reihe (B, D, F) wurden die Zellen entsprechend in zinksupplementiertem Medium inkubiert. Diese Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop mit etwa 400facher Vergrößerung erstellt.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die apoptotischen Körperchen DNA enthalten können (Abb. 43). Im oberen Teil der Abbildung ist nochmals die beschriebene Chromatinkondensation behandelter HL-60 Zellen demonstriert. Daneben erkennt man auch eine Reihe nicht betroffener Zellen. Im unteren Teil der Abbildung ist exakt der gleiche Bildausschnitt im Durchlichtmodus dargestellt. Hier wird hier nochmals die Größe des Kerns in HL-60 Zellen deutlich. Hier waren die Zellen besonders interessant, die sich bereits in der Endphase der Apoptose befanden und neben stark kondensiertem Chromatin bereits deutliche Ausstülpungen gebildet hatten. Diese Ausstülpungen und bereits abgeschnürte

Körperchen waren mit dem Farbstoff anfärbbar (Abb. 43B, D). Allerdings enthielt nicht unbedingt jede Ausstülpung anfärbbare DNA (Abb. 43F).

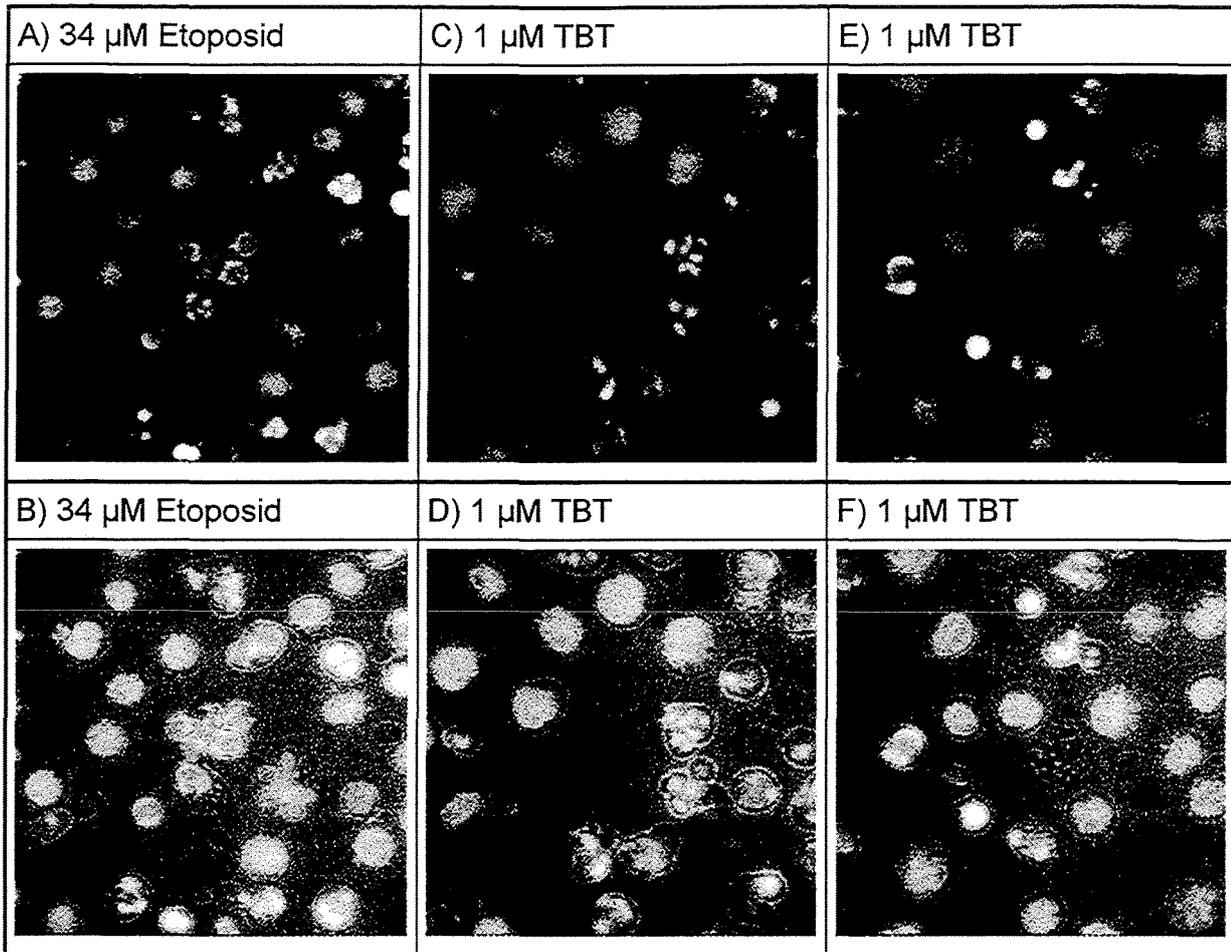


Abb. 43A-F: Gegenüberstellung von fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahmen von etoposid- und TBT-behandelten HL-60 Zellen. Die Inkubationszeit betrug wiederum 5 Stunden. In der oberen Reihe (A, C, E) sind fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von gefärbten Kernen behandelter HL-60 Zellen dargestellt. Exakt der gleiche Bildausschnitt wurde dann zusätzlich im Durchlichtmodus aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop mit etwa 400facher Vergrößerung erstellt.

Außerdem wurde diese Färbung genutzt, um apoptotische Kerne im Fluoreszenzmikroskop auszuzählen (Abb. 44). Auch in Kontrollen waren mit dieser Methode stets bis zu 10% der Zellen als apoptotisch einzustufen. Bereits eine Stunde nach Zugabe des Apoptosestimulus konnten Veränderungen im Kern festgestellt werden. Der Anteil apoptotischer Kerne stieg mit der Inkubationsdauer stetig an. Alle drei hier verwendeten Behandlungen führten in etwa zu einer vergleichbaren Menge von apoptotischen Kernen.

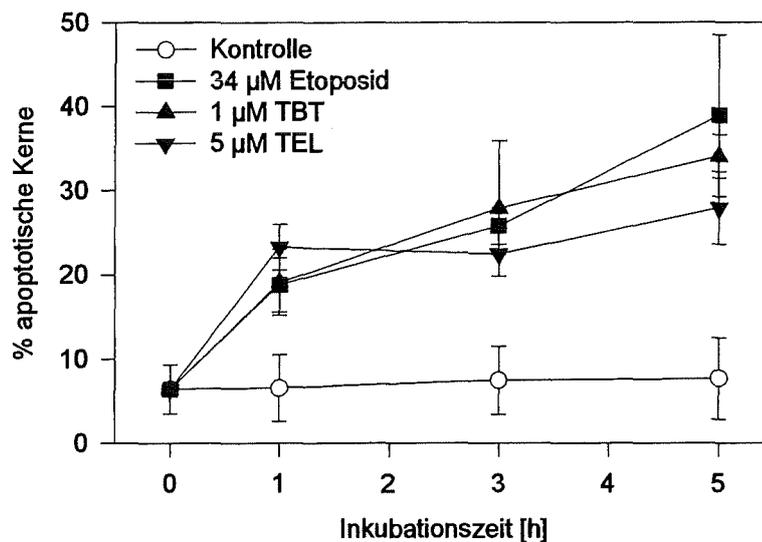


Abb. 44: Prozentsatz apoptotischer Kerne nach Behandlung von HL-60 Zellen mit Etoposid, TBT bzw. TEL für die angegebenen Inkubationszeiten. Als apoptotische Kerne wurden solche gewertet, die bereits fragmentiert waren oder durch die Chromatinkondensation deutlich heller leuchteten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Zählungen an unterschiedlichen Versuchstagen, wobei pro Zählung mindestens 200 Kerne ausgezählt wurden.

## 3.6 DNA Fragmentierung

### 3.6.1 Induktion der DNA Fragmentierung durch organische Metallverbindungen

Während der Apoptose wird jedoch nicht nur das Chromatin kondensiert und die Kerne fragmentiert, sondern es findet auch ein Abbau der DNA statt. Hierbei wird die DNA zunächst in größere Stücke von 50-300 Kilobasenpaare und anschließend in Fragmente von 180-200 Basenpaare (bp) und Vielfache davon zerlegt. Diese Fragmentgröße ergibt sich aus den Abständen zwischen den Nukleosomen, an denen die Endonukleasen angreifen. Die Fragmente können dann mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Es entsteht hierbei das für die Apoptose charakteristische Leitermuster. Es wurde daher untersucht, ob auch die Behandlung mit organischen Metallverbindungen diesen DNA Abbau stimulieren kann. Die Behandlung mit 1 µM TBT induzierte zeit- und konzentrationsabhängig die DNA Fragmentierung (Abb. 45). Bereits nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Stunden konnte die sogenannte DNA Leiter nachgewiesen werden (Spur 4 und 5). Die Fragmente konnten bis zu 8 Stunden nach der Induktion isoliert werden, obwohl sich die Zellen dann fast schon aufgelöst hatten. Bei einer Inkubationszeit von 5 Stunden wurde die DNA Fragmentierung ab einer Konzentration von 0,5 µM TBT sichtbar, bei 1 µM TBT war sie maximal (Spur 14 und 15). Die Inkubation mit 5 µM TBT führte nicht zur Bildung von apoptosespezifischen Fragmenten. Die

Zelle starb bei dieser Konzentration bereits nekrotisch, die DNA wurde zufällig zerlegt (Spur 16).

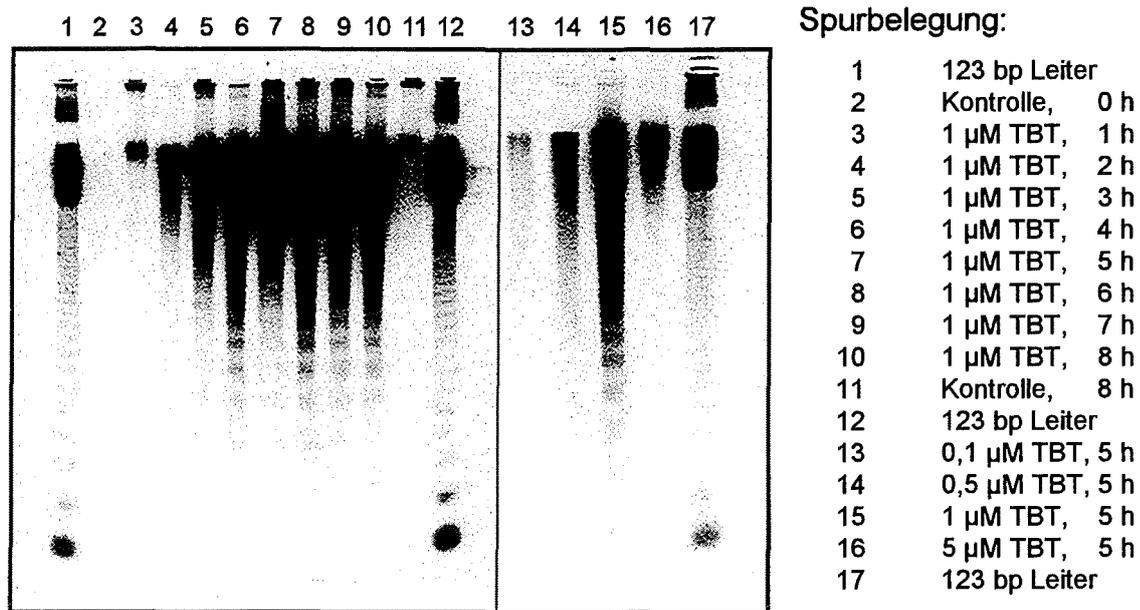


Abb. 45: Zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der DNA Fragmentierung in HL-60 Zellen nach Behandlung mit TBT. Die Zellen wurden wie angegeben inkubiert. Anschließend wurden die DNA Fragmente isoliert, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde ein Marker aufgetragen, der aus Vielfachen von 123 bp besteht (Spur 1, 12, 17).

Bereits die Behandlung für 10 Minuten mit 1 µM TBT reichte aus, um den Prozeß der Apoptose zu induzieren. Auch extensives Waschen der Zellen konnte den Ablauf der Apoptose nicht verhindern (Daten nicht gezeigt).

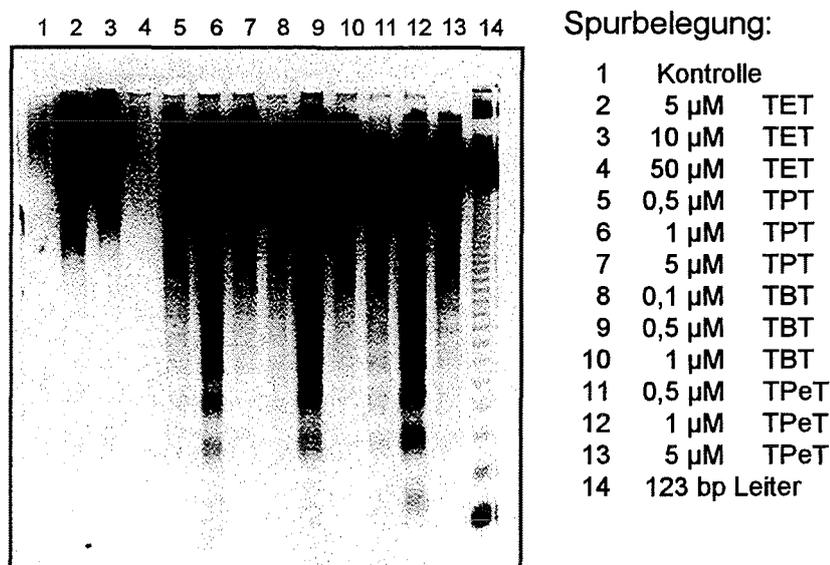


Abb. 46: Induktion der DNA Fragmentierung in HL-60 Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen verschiedener trialkylierter Zinnverbindungen.

Die DNA Fragmentierung konnte in HL-60 Zellen auch durch andere trialkylierte Zinnverbindungen induziert werden (Abb. 46). Hierbei wurde wieder eine Struktur-Wirkungs-Beziehung festgestellt. Mit steigender Kettenlänge nahm die Konzentration ab, die zu einer maximalen DNA Fragmentierung führte. Dieser Trend hielt bis zum TBT an, das sich in diesem System erneut als wirksamste Verbindung herausstellte. Mit noch länger werdender Kette ließen die Effekte wieder etwas nach.

TBT induzierte auch in den anderen in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen die apoptosespezifische DNA Fragmentierung (Abb. 47). Wie bereits erwähnt, ist die Induktion der Apoptose in P388D<sub>1</sub> Zellen stark abhängig von der Konzentration. In diesen Zellen wurde nach einer Behandlung mit 5  $\mu$ M TBT innerhalb 1 Stunde tiefgreifende morphologische Veränderungen festgestellt. Unter diesen Bedingungen wurde auch die DNA Fragmentierung bereits nach 1 Stunde nachgewiesen (Spur 16). Nach Behandlung der Zellen mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M TBT wurden die spezifischen DNA Fragmente frühestens nach 2 Stunden sichtbar (Spur 8). In HeLa Zellen konnten erst ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M TBT und einer Inkubationszeit von 5 Stunden apoptotische DNA Fragmente isoliert werden (Spur C).

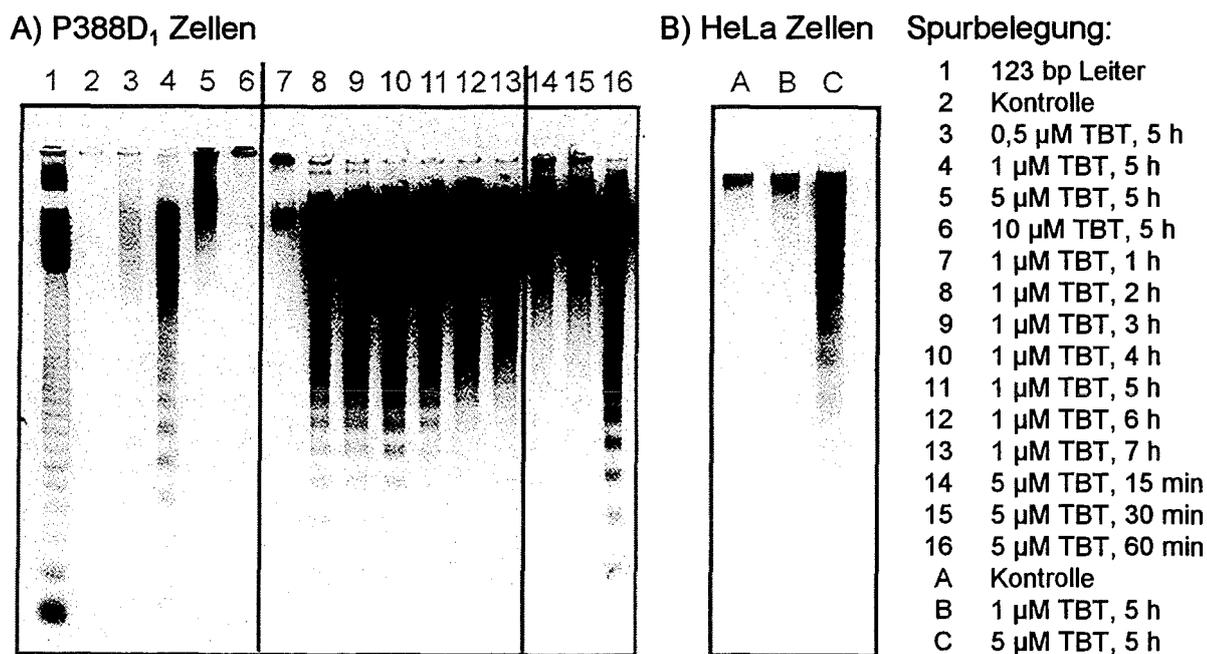


Abb: 47: Induktion der DNA Fragmentierung in P388D<sub>1</sub> (A) und HeLa (B) Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TBT für die angegebenen Inkubationszeiten.

### 3.6.2 Hemmung der induzierten DNA Fragmentierung

An dieser Stelle wurden einige Versuche zur Hemmung der Apoptose auf der Ebene der induzierten DNA Fragmentierung durchgeführt. Zunächst wurde allerdings nachgewiesen, daß die Behandlung mit Etoposid und der Bleiverbindung TEL ebenfalls zur DNA Fragmentierung führt (Abb. 48, Spur 3 bis 5). Die Supplementierung des normalen Kulturmediums mit 1 mM Zink verhinderte die induzierte DNA Degradation vollständig (Abb. 48, Spur 8 bis 13). Auf der anderen Seite induzierte die Inkubation mit dem intrazellulären Zinkchelator TPEN selbst die apoptotische DNA Leiter (Abb. 48, Spur A bis F). Dies verdeutlicht, daß die intrazelluläre Zinkkonzentration eine entscheidende Rolle spielt: hohe intrazelluläre Konzentrationen von Zink verhinderten die Fragmentierung, zu niedrige Konzentrationen führten selbst zur Induktion der Apoptose.

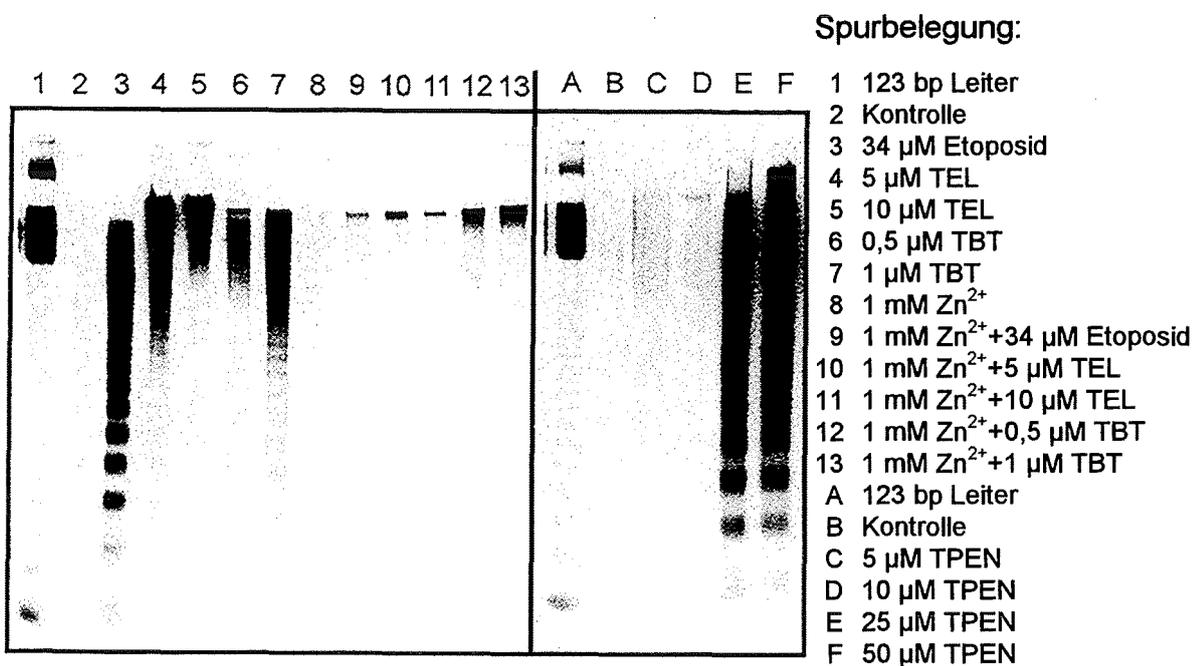


Abb. 48: Einfluß von der intrazellulären Zinkkonzentration auf die DNA Fragmentierung in HL-60 Zellen. Die Inkuabtion mit den Induktoren und TPEN erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen für 5 Stunden.

Die Apoptose ist ein äußerst komplizierter und streng regulierter Vorgang, der einige energieverbrauchende Prozesse beinhaltet. Um dies nachzuweisen, wurden die Zellen mit Dinitrophenol (DNP) vorinkubiert, was zur Verarmung der Zellen an Energie führte. Diese Vorbehandlung verhinderte ebenfalls sehr effektiv die Bildung von DNA Fragmenten. Die Vitalität der Zellen wurde im Trypanblautest weder durch die Vorbehandlung noch durch die 5-stündige Inkubation mit DNP beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

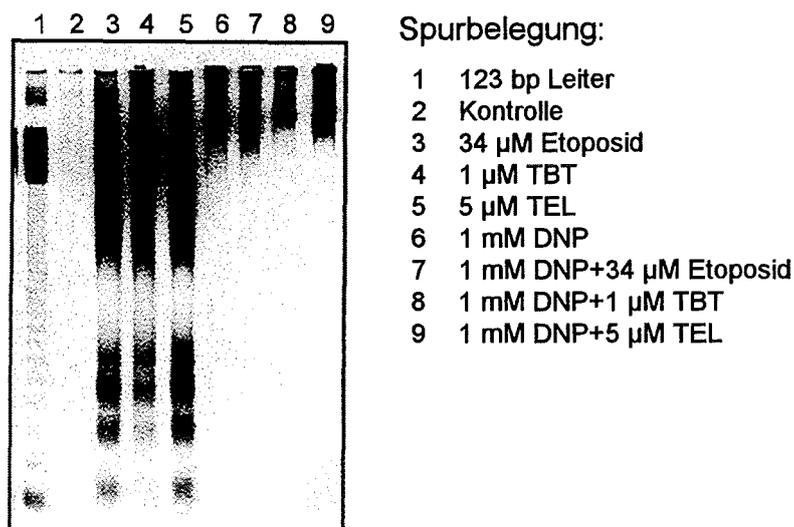


Abb. 49: Hemmung der durch Etoposid, TBT und TEL induzierten DNA Fragmentierung in HL-60 Zellen nach Vorbehandlung mit 1 mM Dinitrophenol (DNP) für 1 Stunde. Die Inkubation mit den Induktoren erfolgte anschließend für 5 Stunden.

Die Hemmung der induzierten DNA Fragmentierung durch Supplementierung des Kulturmediums mit Zink bzw. die Vorbehandlung mit Dinitrophenol läßt allerdings kaum Rückschlüsse auf die beteiligten Mechanismen zu. Im folgenden wurden daher Untersuchungen mit verschiedenen hochspezifischen Inhibitoren von Proteasen durchgeführt, die bei der Apoptose von Bedeutung sind. Es handelt sich hierbei um die sogenannten ICE oder ICE-ähnlichen Proteasen (von *Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*), die mittlerweile auch als Caspasen (von Cystein asparat-spezifische Proteasen) bezeichnet werden. Es wurden zwei verschiedene Caspase Inhibitoren verwendet: z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon (zVADfmk), der auf der Peptidsequenz basiert, die von diesen Proteasen erkannt wird und z-Asp-2,6-dichlorbenzoyloxymethylketon (zD-DCB). Die TBT-induzierte DNA Fragmentierung wurde durch diese beiden Inhibitoren konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 50). 50 µM zVADfmk (Spur 7), bzw. 100 µM zD-DCB (Spur 9) verhinderten die Induktion des DNA-Abbaus völlig.

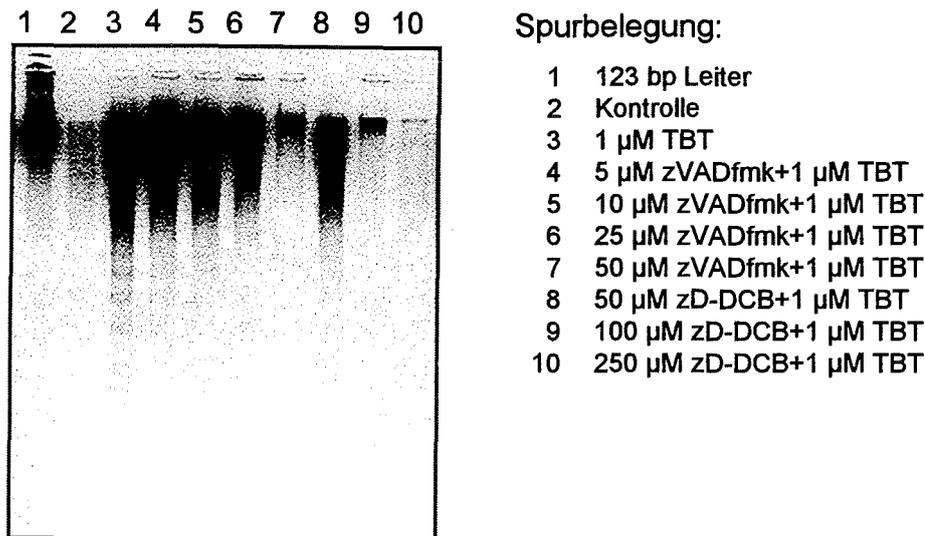


Abb. 50: Hemmung der TBT-induzierten DNA Fragmentierung in HL-60 Zellen durch die beiden Caspase Inhibitoren z-Val-Ala-DL-Asp-fluormethylketon (zVADfmk) und z-Asp-2,6-dichlorbenzoyloxymethylketon (zD-DCB). Die Zellen wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu\text{M}$  TBT für 5 Stunden behandelt.

### 3.7 Zellzyklusanalyse im Durchflußzytometer

#### 3.7.1 Bildung eines *prä-G1*-Peaks während der organometall-induzierten Apoptose

Eine weitere Möglichkeit, um die Bildung apoptotischer Körperchen genauer untersuchen zu können, bietet die Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie. Grundsätzlich wird hier die DNA Menge von einzelnen Kernen gemessen. Je nach Zellzyklusverteilung hat der Kern einen unterschiedlichen DNA Gehalt. Dieser reicht vom diploiden Chromosomensatz in der G1-Phase mit allen möglichen Zwischenstadien in der S-Phase bis zum tetraploiden Chromosomensatz in der G2-Phase. Apoptotische Zellen haben nach Abschnürung apoptotischer Körperchen bereits an DNA Menge verloren und beinhalten weniger DNA als Zellen in der G1-Phase. Daher läßt sich durch Bestimmung des sogenannten *prä-G1*-Peaks die Menge der apoptotischen Zellen quantifizieren. Im folgenden sind nun DNA Histogramme nach 5-stündiger Behandlung von HL-60 Zellen mit Etoposid, TBT und TEL dargestellt (Abb. 51).

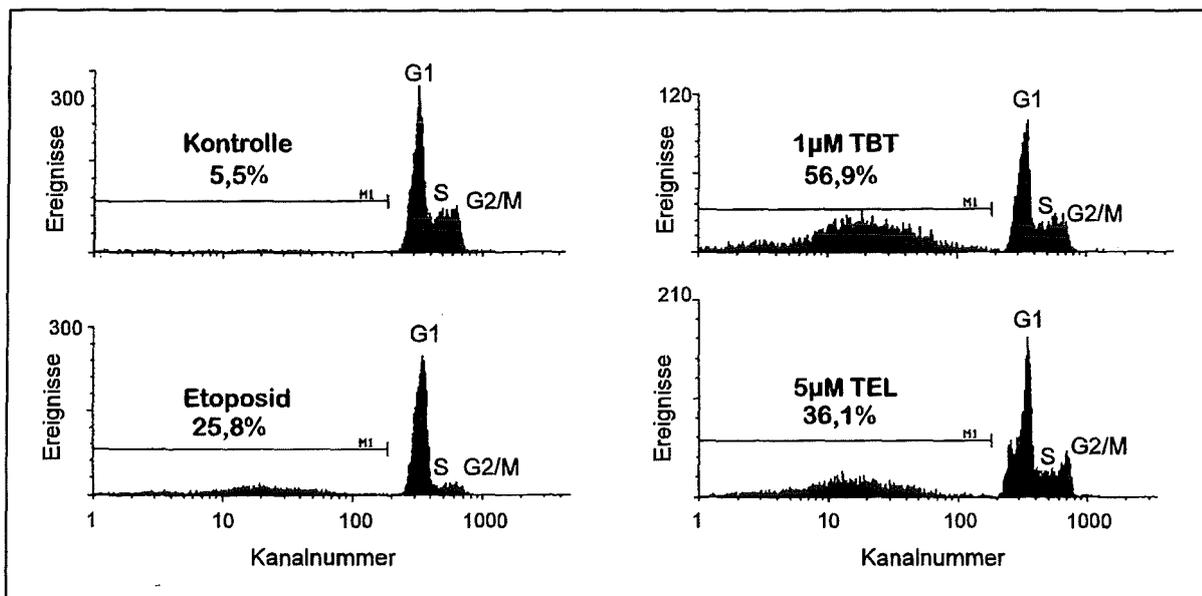


Abb. 51: DNA Histogramme von HL-60 Zellen nach verschiedenen Behandlungen und Färbung mit Propidiumiodid. Die Inkubationszeit betrug stets 5 Stunden. Aufgetragen sind hier die Ereignisse, d.h. gezählte Zellen gegen die Fluoreszenzintensität, die vom Durchflußzytometer (FACStar, Becton & Dickinson) in verschiedenen Kanälen detektiert wurde. Die Prozentzahl oberhalb der mit M1 bezeichneten Markierung gibt direkt den Anteil der Zellen bzw. deren Bruchstücke an, die weniger DNA als eine G1-Phase Zelle enthalten.

Besonders auffällig war nach der Behandlung mit Etoposid das fast vollständige Verschwinden des G-2 Peaks, der *prä-G1-Peak* macht hier 25,8% des Gesamthistogrammes aus. Im Gegensatz hierzu zeigten die Metallverbindungen keine vergleichbare Spezifität für die unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Die Zellen gingen aus allen Phasen heraus gleich wahrscheinlich in die Apoptose. Mit dieser Methode wurde nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  TBT und 5  $\mu\text{M}$  TEL ein Anteil von 56,9% bzw. 36,1% des *prä-G1-Peaks* am Gesamthistogramm detektiert. Bei dieser Darstellung handelt es sich nur um eine Momentaufnahme nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden. In der folgenden Abbildung sind nun die prozentualen Anteile des *prä-G1-Peaks* am Gesamthistogramm zu unterschiedlichen Inkubationszeiten graphisch dargestellt (Abb. 52). Dies verdeutlicht die Zunahme der apoptotischen Zellen während länger werdender Inkubationszeit.

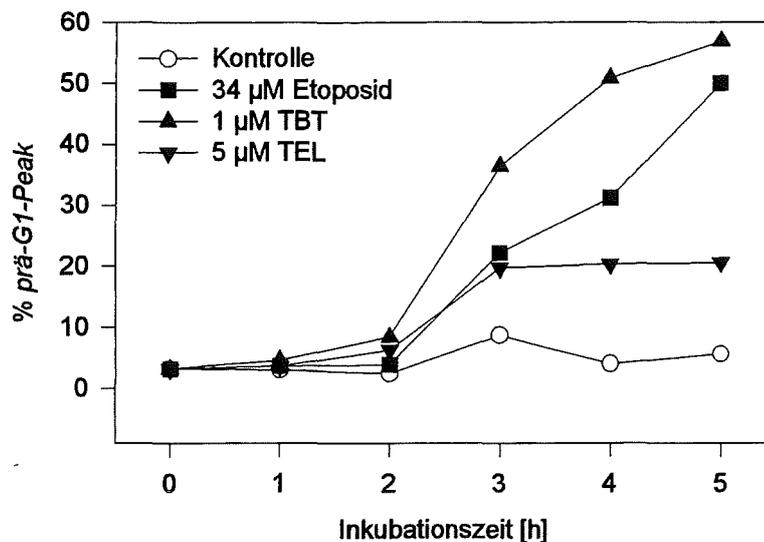


Abb. 52: Prozentualer Anteil des *prä-G1-Peaks* am Gesamthistogramm in HL-60 Zellen nach Behandlung mit Etoposid, TBT bzw. TEL zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach der Färbung mit Propidiumiodid erfolgte die Auswertung im Durchflußzytometer (FACStar, Becton & Dickinson).

Bis zu einer Inkubationszeit von 2 Stunden lagen kaum Zellen im Bezug auf ihren DNA-Gehalt unterhalb des G1-Peaks. Ab der dritten Stunde stieg die Menge apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle steil an. Der *prä-G1-Peak* trat somit deutlich später auf, als die Kondensation des Chromatins festgestellt wurde (vgl. Abb 44).

### 3.7.2 Effekt von Caspase Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung

Im vorherigen Abschnitt wurde dargestellt, daß Caspase Inhibitoren effektiv die Fragmentierung der DNA nach Behandlung mit TBT unterbinden können. Daher wurde nun untersucht, ob auch die Ausbildung des *prä-G1-Peaks* nach Vorinkubation mit diesen Inhibitoren unterbleibt (Abb. 53, 54). Die Behandlung mit den höchsten Konzentrationen der Inhibitoren allein hatte keinen Einfluß auf die Verteilung der Zellen, die Inkubation mit 1 µM TBT führte dagegen zur Verschiebung fast aller Zellen in den *prä-G1-Peak* (89,1% bzw. 87,7%). In beiden Fällen führte die niedrigste gewählte Konzentration des Inhibitors bereits zu einer Verringerung des Anteils im *prä-G1-Peak* auf etwa 69%. Eine weitere Erhöhung der Konzentration der Inhibitoren führte in beiden Fällen zu einer weiteren Reduktion des prozentualen Anteils. Die Behandlung mit 25 µM zVADfmk resultierte in 16,1%, durch die Vorinkubation mit 100 µM zD-DCB konnten mit 4,6% bereits annähernd Kontrollwerte erreicht werden. Die beiden höchsten gewählten Konzentrationen der Inhibitoren verhinderten die Bildung des *prä-G1-Peaks* völlig.

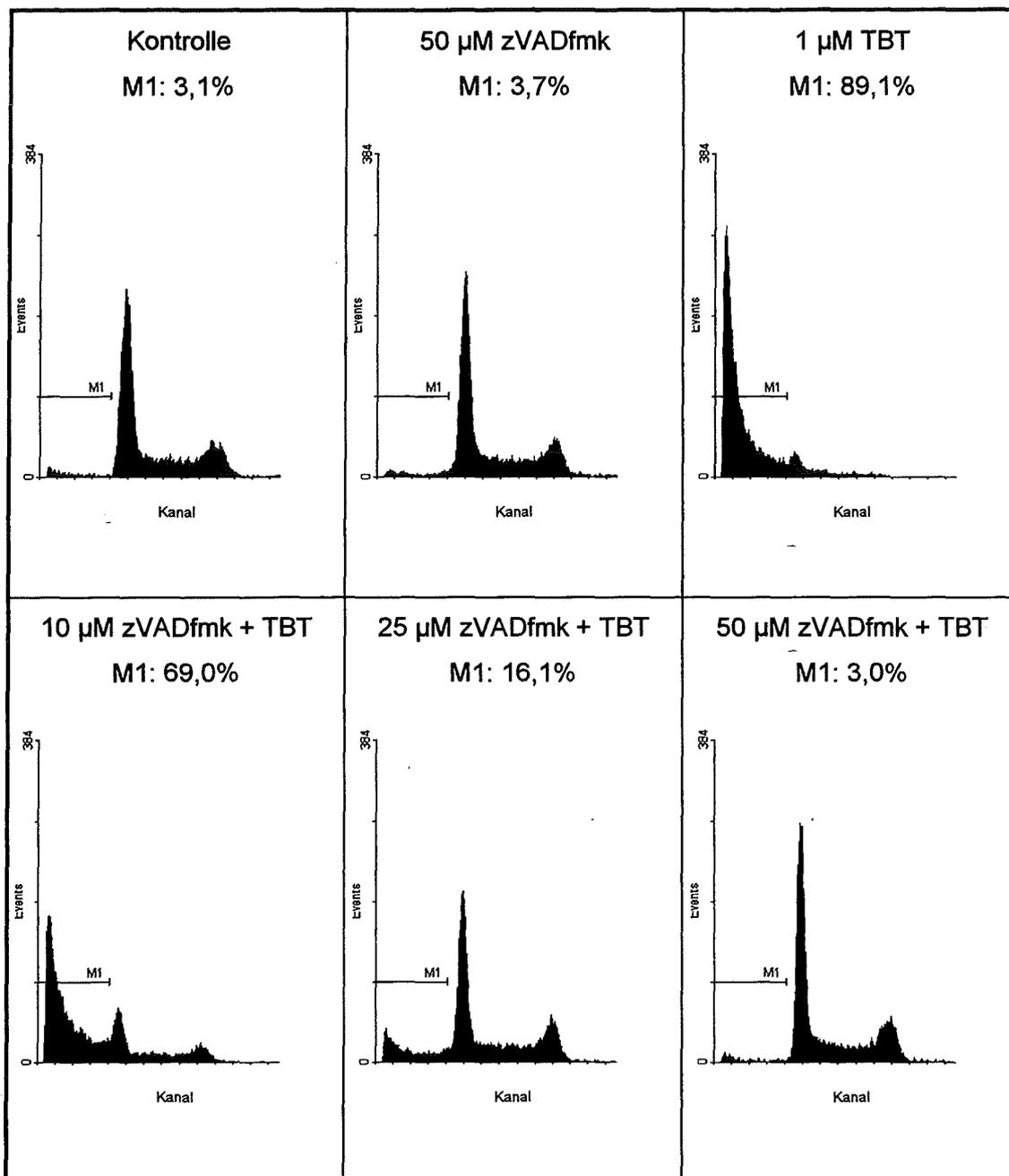


Abb. 53: Effekt des Caspase Inhibitors zVADfmk auf die Zellzyklusverteilung bzw. die Ausbildung eines *prä-G1*-Peaks in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors für 30 Minuten vorinkubiert und dann mit 1  $\mu$ M TBT für weitere 5 Stunden behandelt. Die Auswertung erfolgte nach DAPI-Färbung im Durchflußzytometer (Pasil, Partec). Bei den hier dargestellten Histogrammen handelt es sich um Originalabbildungen aus dem Durchflußzytometer. Aufgetragen sind hier wie in Abb. 51 ebenfalls Zählereignisse (*events*) gegen die Fluoreszenzintensität (Kanal). Der Wert M1 gibt den prozentualen Anteil des *prä-G1*-Peaks am Gesamthistogramm an.

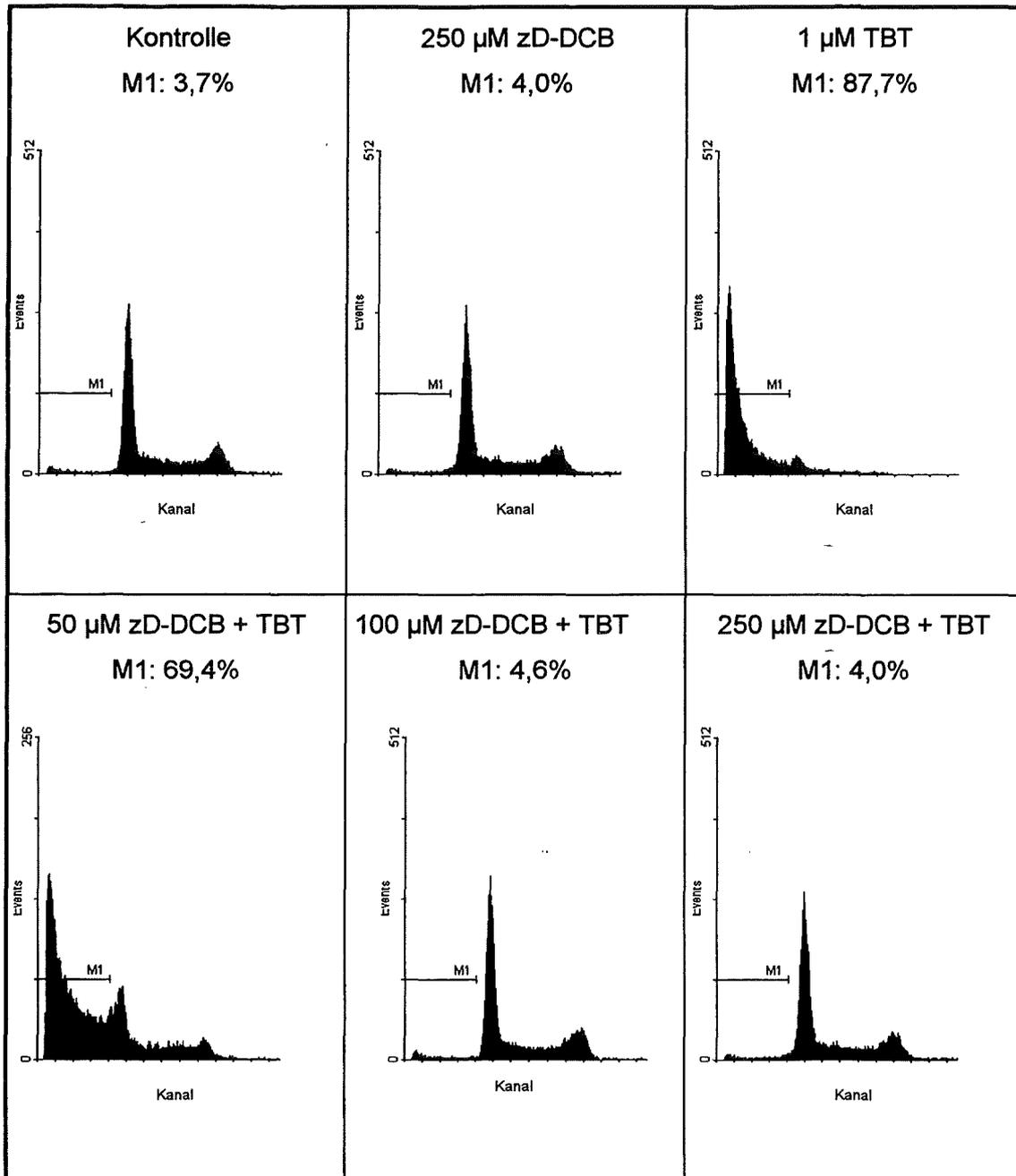


Abb. 54: Effekt des Caspase Inhibitors zD-DCB auf die Zellzyklusverteilung bzw. die Ausbildung eines *prä-G1*-Peaks in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors für 30 Minuten vorinkubiert und dann mit 1  $\mu$ M TBT für weitere 5 Stunden behandelt. Die Auswertung erfolgte nach DAPI-Färbung im Durchflußzytometer (Pasil, Partec). Bei den hier dargestellten Histogrammen handelt es sich um Originalabbildungen aus dem Durchflußzytometer. Aufgetragen sind hier wie in Abb. 51 ebenfalls Zählereignisse (*events*) gegen die Fluoreszenzintensität (Kanal). Der Wert M1 gibt den prozentualen Anteil des *prä-G1*-Peaks am Gesamthistogramm an.

### 3.8 Proteolytische Prozesse

Vom kontrollierten Zellabbau während der Apoptose bleiben auch einige Proteine nicht verschont. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Proteinen identifiziert worden, die im Lauf der Apoptose sehr spezifisch degradiert werden (vgl. Tab. 7). Mit geeigneten Antikörpern können im Western Blot entweder Bruchstücke des abgebauten Proteins oder das Verschwinden einer ganzen Proteinbande nachgewiesen werden. Im folgenden soll dies am Beispiel des Reparaturenzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und der nukleären Lamine demonstriert werden. Die Inkubation mit TBT sowie Etoposid führte zeitabhängig zur Degradation von PARP und Lamin (Abb. 55). Zusätzlich ist ein Ausschnitt des mit Silber gefärbten SDS-Gels abgebildet, der beweist, daß gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Nach Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT verschwand das 116 kD schwere Protein PARP innerhalb von 2 Stunden fast vollständig. Eines der beiden Degradationsprodukte mit einer Molekularmasse von etwa 85 kD konnte dann nachgewiesen werden. Während der Inkubationszeit verringerte sich auch die Menge der unterschiedlichen Lamine. Die Lamine A und C waren nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die Inkubation mit Etoposid führte etwas verzögert zum gleichen Resultat.

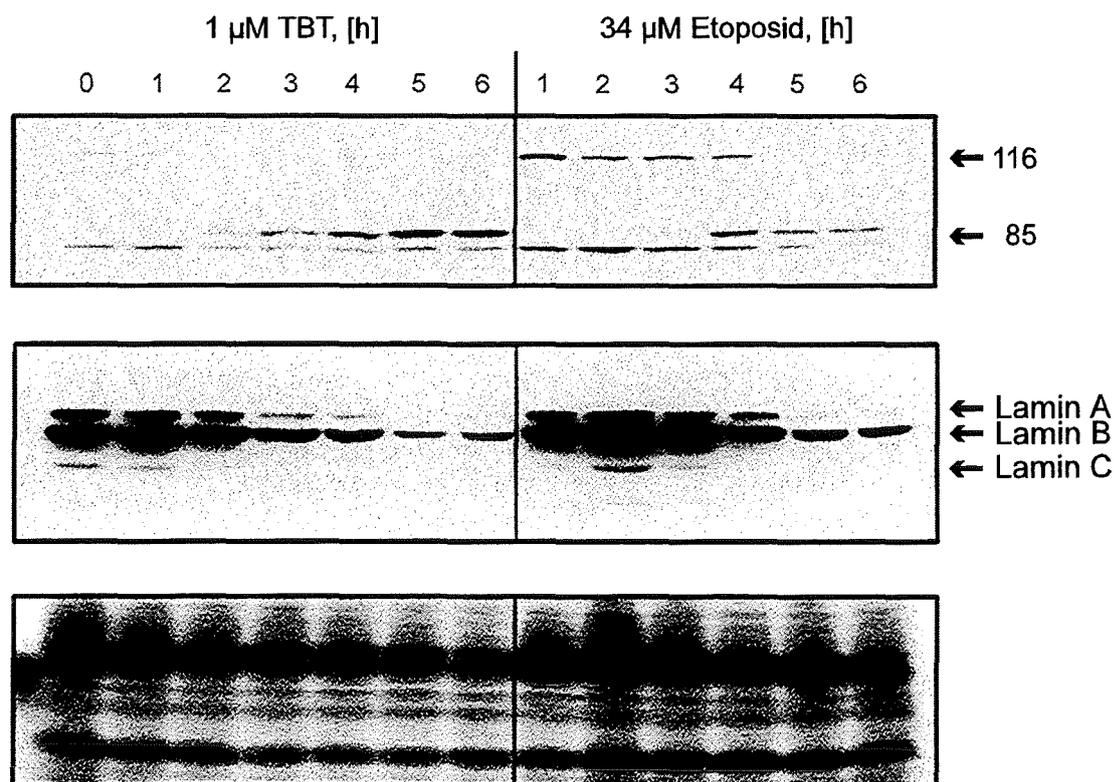
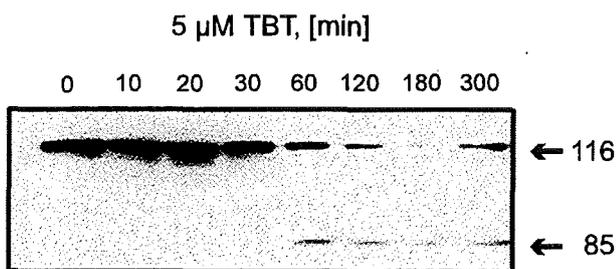


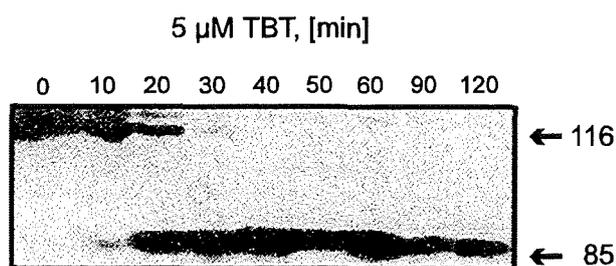
Abb. 55: Zeitabhängige Degradation der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, oben) und nukleärer Lamine (Mitte) nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 1  $\mu$ M TBT und 34  $\mu$ M Etoposid für die angegebenen Inkubationszeiten. Der Nachweis von PARP und der verschiedenen Lamine erfolgte nach Auftrennung von Ganzzellextrakten in einem 7,5 bzw. 10%igen SDS-Gel durch spezifische Antikörper mittels Western Blotting. Im unteren Teil der Abbildung wurde ein Teil des Gels mit Silberfärbung angefärbt, um die gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge zu demonstrieren.

Auch in diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob TBT in den anderen Zellsystemen ebenfalls proteolytische Abbauvorgänge induzieren kann. Vor allem für die HeLa Zellen, in denen die DNA Fragmentierung schwer nachzuweisen war, wurde der Abbau von PARP als zusätzlicher Marker herangezogen, um eine eindeutige Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose zu ermöglichen. Die folgende Abbildung stellt die zeitabhängige Degradation von PARP in HeLa und auch P388D<sub>1</sub> Zellen dar (Abb. 56). In HeLa Zellen konnte, wie auch schon bei der DNA Fragmentierung, erst ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M TBT der Abbau von PARP beobachtet werden (Abb. 56A). Allerdings verlief diese Reaktion überraschend schnell, denn bereits nach 60 Minuten wurden Bruchstücke nachgewiesen. In P388D<sub>1</sub> Zellen konnte hier der gleiche Zusammenhang zwischen eingesetzter Konzentration und Geschwindigkeit der Reaktion wie bei der DNA Fragmentierung und der Bildung von Membranausstülpungen festgestellt werden. Die Inkubation mit 5  $\mu$ M TBT führte bereits innerhalb von 10 Minuten zu den ersten Bruchstücken, nach 40 Minuten war das ursprüngliche Protein nicht mehr nachweisbar (Abb. 56B). Dagegen resultierten aus der Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT erst nach 2 Stunden Abbauprodukte (Abb. 56C).

A) HeLa Zellen



B) P388D<sub>1</sub> Zellen



C) P388D<sub>1</sub> Zellen

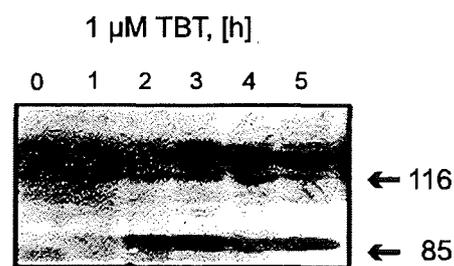


Abb. 56: Zeitabhängiger Abbau der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in HeLa (A) und P388D<sub>1</sub> Zellen (B, C) nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen von TBT.

Der Abbau von PARP kann direkt durch mindestens 5 verschiedene Mitglieder der Caspasefamilie katalysiert werden (Martins & Earnshaw, 1997). Daher war auch hier von besonderem Interesse, ob die beiden zuvor wirksamen Inhibitoren den Abbau von PARP nach Inkubation mit TBT hemmen können. Mit Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehyd (YVAD) und Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd (DEVD) wurden hier zusätzlich zwei Tetrapeptidinhibitoren untersucht. Die Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT führte nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden zu

einem vollständigen Abbau des Proteins PARP. Die Vorbehandlung mit den Inhibitoren zVADfmk und auch zD-DCB führte auch auf dieser Ebene zu einer vollständigen Hemmung der TBT-induzierten Effekte (Abb. 57). Hierbei wurden die gleichen Konzentrationen verwendet, die auch die TBT-induzierte DNA Fragmentierung und Ausbildung des *prä-G1-Peaks* vollständig unterdrücken konnten. Dagegen konnte durch die beiden Tetrapeptidinhibitoren YVAD und DEVD, auch mit für diese Inhibitoren vergleichsweise hohen Konzentrationen, der Abbau von PARP nicht verhindert werden. Diese Substanzen waren auch auf Ebene der DNA Fragmentierung und Zellzyklusverschiebung wirkungslos (Daten nicht gezeigt).

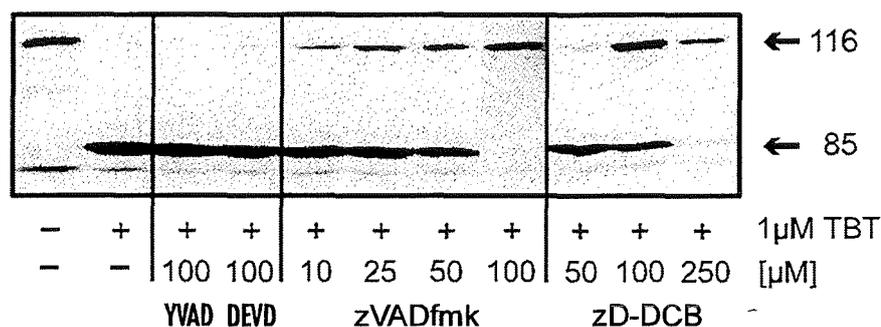


Abb. 57: Effekt verschiedener Caspase Inhibitoren auf den TBT-induzierten Abbau von PARP in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert und dann für 5 weitere Stunden mit 1 μM TBT behandelt.

### 3.9 Weitere Untersuchungen zur TBT-induzierten Apoptose

#### 3.9.1 Rolle von Calcium bei der TBT-induzierten Apoptose

In der Literatur wird oft berichtet, daß die Induktion der Apoptose oder aber der ordnungsgemäße Ablauf bestimmter Prozesse, z.B. die Aktivierung von Endonukleasen, von einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist (Übersichten bei McConkey & Orrenius, 1996; Nicotera & Rossi, 1994). Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit Konzentrationen von 5 und 10 μM TBT konnte innerhalb weniger Minuten ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Dies bedeutet, daß TBT in der Lage ist, den Calciumhaushalt der Zelle zu beeinflussen. Hier sollte untersucht werden, ob die Behandlung von HL-60 Zellen mit apoptoseinduzierenden Konzentrationen von TBT ebenfalls Auswirkungen auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hat. Das Ergebnis der Messungen ist in Abb. 58 dargestellt. Der Ruhewert liegt in HL-60 Zellen um etwa 70 nM. Behandelt man die HL-60 Zellen mit 1 μM TBT, so kann zunächst ein langsamer Anstieg festgestellt werden. Nach 4 Stunden hat sich die intrazelluläre Calciumkonzentration nahezu verdoppelt.

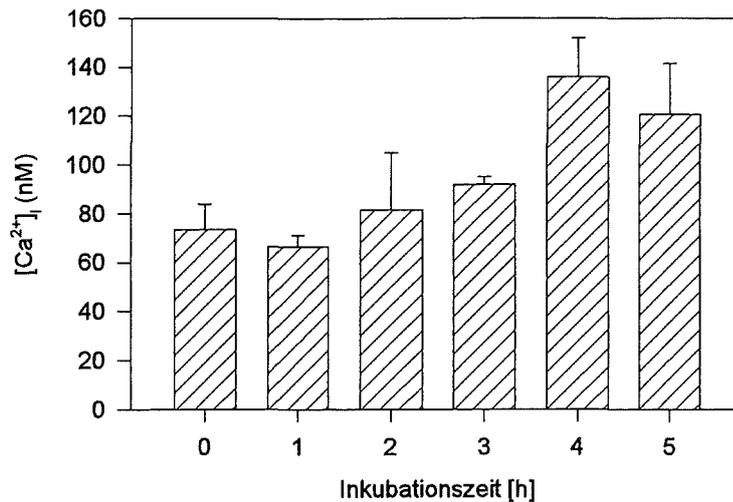
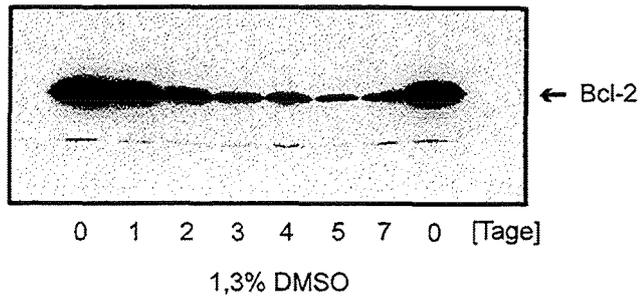


Abb. 58: Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 1 µM TBT für die angegebenen Zeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

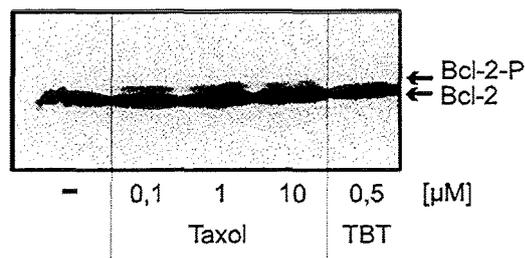
### 3.9.2 Rolle des Bcl-2 Proteins bei der TBT-induzierten Apoptose

Ein weiterer Aspekt, der vor allem in HL-60 Zellen besonders interessant schien, ist der Gehalt der Zellen am bcl-2 Genprodukt. Es ist bekannt, daß der Gehalt an diesem Protein während der Differenzierung der Zellen in verschiedene Richtungen stetig abnimmt (Delia *et al.*, 1992). Außerdem wurde gezeigt, daß HL-60 Zellen, die in Richtung Neutrophile differenziert werden, schließlich apoptotisch sterben (Martin *et al.*, 1990). Auf der anderen Seite wurde kürzlich berichtet, daß die Inkubation mit Taxol in lymphoiden Zellen zur Inaktivierung des Bcl-2 Proteins durch Phosphorylierung führt (Halдар *et al.*, 1995). Diese Modifikation wurde in enge Verbindung mit der Induktion der Apoptose gebracht (Blagosklonny *et al.*, 1996; Halдар *et al.*, 1996). Diese Befunde wurden zunächst in HL-60 Zellen überprüft, bevor dann untersucht werden sollte, ob nach TBT der Bcl-2 Gehalt abnimmt, oder eine Phosphorylierung stattfindet. Der Gehalt des Bcl-2 Proteins nahm während der Differenzierung kontinuierlich ab (Abb. 59A). Die 24-stündige Behandlung mit Taxol führte zu einer Modifikation des Proteins. Bei gleicher Behandlung induzierten diese Konzentrationen von Taxol in HL-60 Zellen auch die DNA Fragmentierung und die Proteolyse von PARP (Daten nicht gezeigt). Hier erkennt man, daß das Protein nach 24-stündiger TBT Behandlung nicht modifiziert wurde (Abb. 59B). In diesem Versuch wurden die Zellen nur mit einer TBT Konzentration von 0,5 µM inkubiert, um zu garantieren daß sich die Mehrheit der Zellen noch mitten in der Apoptose befindet. Bei einer 24-stündigen Inkubation mit 1 µM TBT hätten sich die Zellen bereits zum Großteil aufgelöst. Die Inkubation mit 1 µM TBT führte im Untersuchungszeitraum bis zu 8 Stunden weder zu einer Abnahme des Bcl-2 Gehaltes noch zu einer Modifikation (Abb. 59C).

## A) Differenzierung in Richtung Granulozyten



## B) Behandlung mit Taxol



## C) Behandlung mit TBT

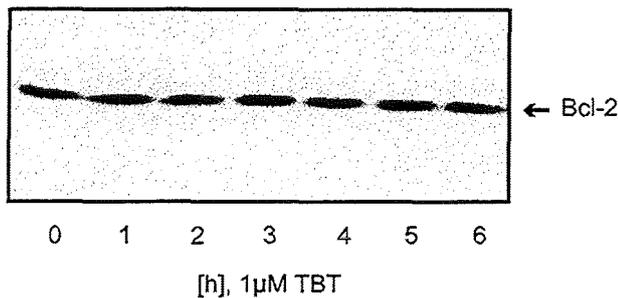


Abb. 59A-C: Nachweis des Bcl-2 Proteins in HL-60 Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen. (A) Die Zellen wurden durch Zugabe von 1,3% DMSO zum Kulturmedium in Richtung Granulozyten differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen aus der Kulturflasche entnommen. (B) Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Taxol bzw. 0,5  $\mu\text{M}$  TBT behandelt. Mit Bcl-2-P ist die phosphorylierte Form des Proteins gekennzeichnet. (C) Die Zellen wurden für die angegebenen Inkubationszeiten mit 1  $\mu\text{M}$  TBT behandelt. Der Nachweis des Bcl-2 Proteins erfolgte nach Auftrennung von Ganzzelextrakten in einem 15%igen SDS-Gel mit einem monoklonalen Antikörper im Western Blot.

### 3.10 Zusammenhang zwischen der MAP Kinase Aktivierung und der Induktion der Apoptose

Abschließend wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der MAP Kinase Kaskade mit nachfolgender Arachidonsäurefreisetzung und der Induktion der Apoptose gibt. Hierzu mußte zunächst gezeigt werden, daß TBT in diesen niedrigen Konzentrationen auch in undifferenzierten HL-60 Zellen die Freisetzung von Arachidonsäure induzieren kann. Früher wurde beschrieben (Bonser *et al.*, 1981), daß undifferenzierte HL-60 nicht in der Lage sind, Arachidonsäure freizusetzen. Generell fiel die Menge freigesetzter Arachidonsäure in undifferenzierten Zellen auch tatsächlich schwächer aus. Allerdings nahm hier nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  TBT die Menge an freier Säure nach 120 bis 150 Minuten zwar nicht drastisch aber nachweislich zu (Abb. 60). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war hier außerdem eine Metabolisierung der Arachidonsäure in Eicosanoide zu festzustellen.

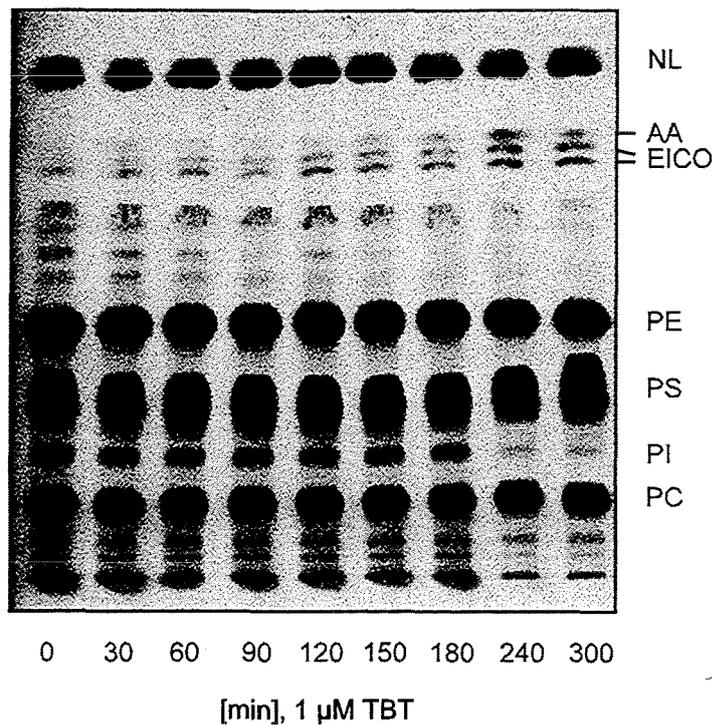


Abb. 60: Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden von undifferenzierten HL-60 Zellen nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  TBT für die angegebenen Inkubationszeiten. Abgebildet ist die Autoradiographie einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der Lipide. Abkürzungen: NL, Neutrallipide; AA, freie Arachidonsäure; EICO, Eicosanoide; PE, Phosphatidylethanolamin; PS, Phosphatidylserin; PI, Phosphatidylinositol. PC, Phosphatidylcholin.

Die Freisetzung von Arachidonsäure war auch hier mit einer Aktivierung der MAP Kinase verbunden (Abb. 61). Allerdings konnte die Aktivierung erst nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden nachgewiesen werden. Außerdem blieb sie über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten.

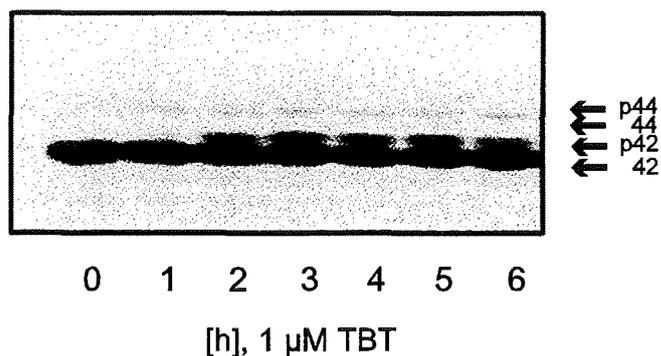


Abb. 61: Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung von undifferenzierten HL-60 Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  TBT für die angegebenen Zeiten.

Die Inkubation mit den zu Beginn dieser Arbeit identifizierten Inhibitoren gestaltete sich sehr schwierig. Viele Substanzen, die eine Freisetzung von Arachidonsäure oder die Aktivierung der MAP Kinase effektiv verhindern konnten, induzierten in den hierfür notwendigen Konzentrationen bei langen Inkubationszeiten selbst die Apoptose (Sphingosin, BAPTA/AM

und Nickel) oder waren bereits akut toxisch (Quinacrin, AACOCF<sub>3</sub>). Der unspezifische Inhibitor Genistein und die Substanzen EGTA und NAc konnten die TBT-induzierte Apoptose nicht verhindern (Daten nicht gezeigt). Um eine eindeutige Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen MAP Kinase Aktivierung und Induktion der Apoptose machen zu können, wurde daher hier der Effekt des spezifischen Inhibitors der MAP Kinase Kinase PD098059 untersucht. Zusätzlich wurde mit SB203580 ein spezifischer Inhibitor der p38 Kinase verwendet. Die Inhibitoren allein führten auch bei langen Inkubationszeiten nicht zu einer Schädigung der Zellen, die Inkubation mit 1  $\mu$ M TBT induzierte dagegen deutlich die Fragmentierung der DNA (Abb. 62). Eine Vorinkubation mit jeweils einem der beiden Inhibitoren führte lediglich zu einer schwachen Hemmung der induzierten Fragmentierung, allerdings konnte bei gleichzeitiger Applikation die Ausbildung der apoptotischen DNA Leiter fast völlig unterdrückt werden.

	-	+	-	-	-	+	+	+	1 $\mu$ M TBT
	-	-	+	-	+	+	-	+	50 $\mu$ M PD098059
M	-	-	-	+	+	-	+	+	25 $\mu$ M SB203580

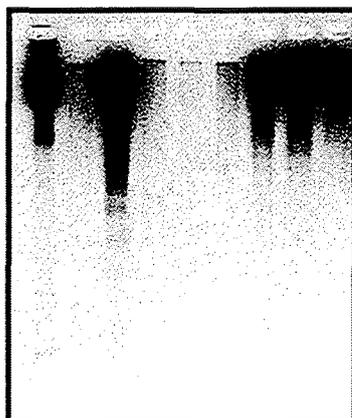


Abb. 62: Effekte der beiden Inhibitoren PD098059 und SB203580 auf die TBT-induzierte DNA Fragmentierung. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren vorinkubiert und dann für weitere 5 Stunden mit 1  $\mu$ M TBT behandelt. M=Marker (123 bp Leiter).

Dieses Ergebnis konnte in der Zellzyklusanalyse identisch reproduziert werden (Abb. 63). Die Inhibitoren selbst hatten, auch in Kombination, keinen Effekt auf die Ausbildung eines *prä-G1-Peaks*. Dagegen induzierte die Behandlung mit TBT fast die Verschiebung des gesamten Histogrammes in diesen Bereich. Die Vorinkubation der Zellen mit einem der beiden Inhibitoren führte wie auch auf Ebene der DNA Fragmentierung zu einem schwachen aber bereits erkennbaren Hemmeffekt. Die Vorbehandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren reduzierte deutlich den prozentualen Anteil des *prä-G1-Peaks* am Gesamthistogramm.

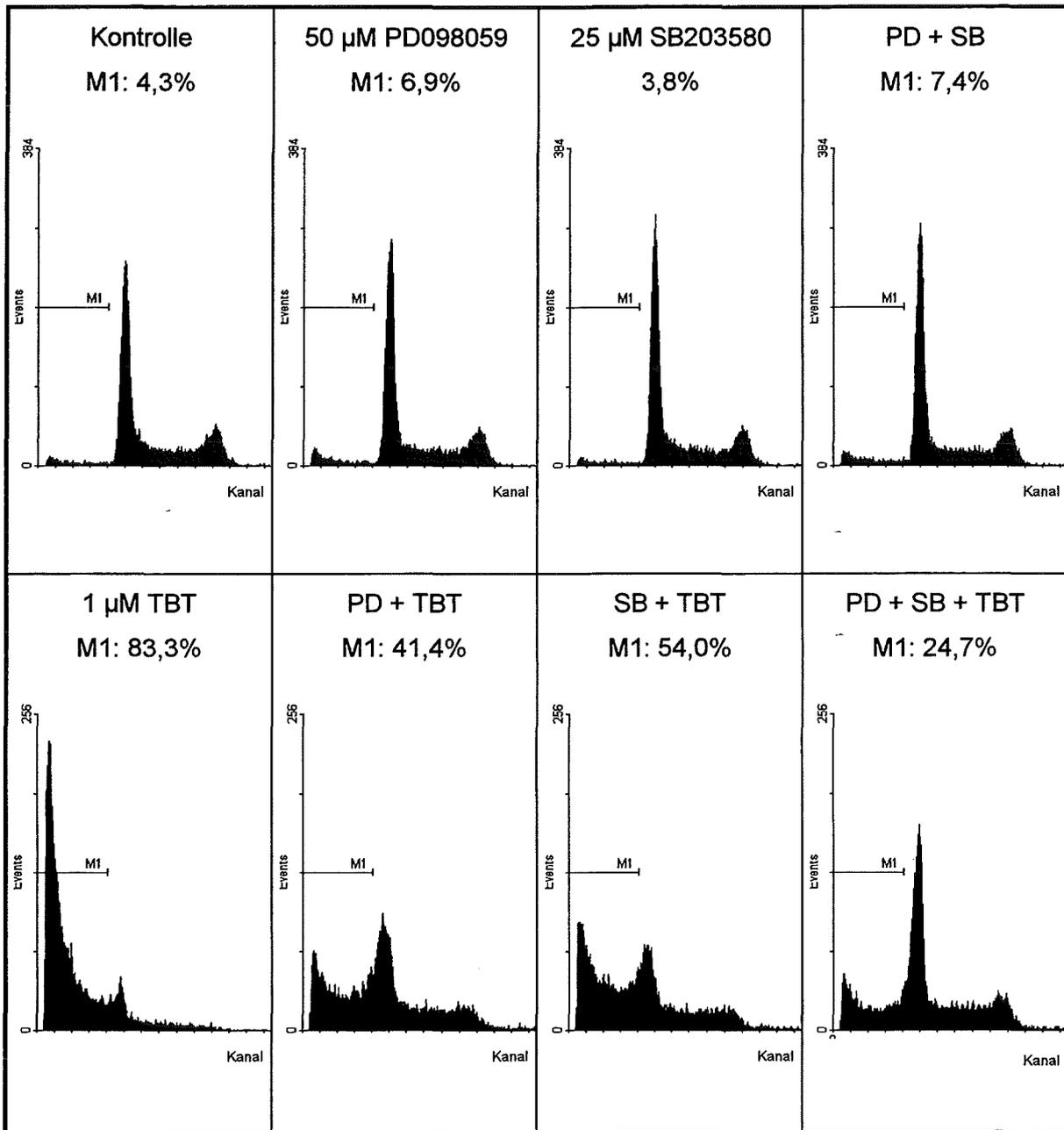


Abb. 63: Effekte der beiden Inhibitoren PD098059 und SB203580 auf die TBT-induzierte Bildung des *prä-G1-Peaks* in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen (PD=50  $\mu$ M PD098059; SB=25  $\mu$ M SB203580) des Inhibitors für 30 Minuten vorinkubiert und dann für weitere 5 Stunden behandelt mit TBT (TBT=1  $\mu$ M). Die Auswertung erfolgte nach DAPI-Färbung im Durchflußzytometer (Pasci, Partec). Bei den hier dargestellten Histogrammen handelt es sich um Originalabbildungen aus dem Durchflußzytometer. Aufgetragen sind hier wie in Abb. 51 ebenfalls Zählereignisse (*events*) gegen die Fluoreszenzintensität (Kanal). Der Wert M1 gibt den prozentualen Anteil des *prä-G1-Peaks* am Gesamthistogramm an.

## 4 Diskussion

Organische Metallverbindungen sind generell anthropogenen Ursprungs. Bedingt durch ihre Anwendungsmöglichkeiten als Biozide, Desinfektionsmittel, Holzschutzmittel und den sogenannten Antifouling-Farben kam es in den letzten Jahren zu einem verstärkten Eintrag von trialkylierten Organozinnverbindungen in die Umwelt. Die hohe Toxizität dieser Verbindungen brachte jedoch auch einige Probleme mit sich, wie die in der Einleitung beschriebenen Effekte belegen. Es wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zur Toxizität der Organometalle vor allem an Ratten und auch an Zellkulturen *in vitro* durchgeführt. Für die akut toxische Wirkung wurde hauptsächlich eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich gemacht. Hierbei handelt es sich um einen generellen Mechanismus, über den viele Substanzen ihre toxische Wirkung vermitteln. Allerdings sind in jüngerer Zeit auch spezifische Effekte und zahlreiche mögliche Angriffspunkte der Verbindungen beschrieben worden. In dieser Arbeit sollte zum einen die Beeinflussung der Signaltransduktion mit der Freisetzung von Arachidonsäure aus zellulären Lipiden als Endpunkt genauer untersucht werden. Zum anderen sollte die durch organische Metallverbindungen induzierte Apoptose näher charakterisiert werden.

### 4.1 Untersuchungen zum Arachidonsäurestoffwechsel

Der erste Teil der Arbeit basiert auf den Beobachtungen von Macfarlane (1981) und O'Brien (1963), die festgestellt haben, daß alkylierte Quecksilber- und Zinnverbindungen die Aggregation von Blutplättchen induzieren können. Voraussetzung für diese Reaktion ist die Bereitstellung von Arachidonsäure, die nach Behandlung mit verschiedenen Metallverbindungen dokumentiert ist (Käfer *et al.*, 1992; Krug & Berndt, 1987; Zaucke, 1993). Zu einer Anhäufung freier Arachidonsäure in der Zelle können prinzipiell mehrere Mechanismen führen. Der Gehalt der Zellen an freier Arachidonsäure wird sehr streng reguliert. Für diese Regulation sind die Enzyme des sogenannten LANDS-Zyklus verantwortlich, in dem ständig Fettsäuren deacyliert und schließlich wieder reacyliert werden (Lands, 1979). Krug beschrieb bereits 1992, daß organische Metallverbindungen gerade diesen Zyklus beeinflussen. Es wäre also durchaus möglich, daß die Anhäufung einer freien Fettsäure auf die Hemmung ihrer Reacylierung zurückzuführen ist. Dieser Effekt wurde für die beiden Quecksilberverbindungen Thimerosal (Kaefer *et al.*, 1988) und Methylquecksilber (Hornberger & Patscheke, 1990) beschrieben. Eine zweite Möglichkeit ist die aktive Freisetzung von Arachidonsäure aus den Lipiden, also eine Deacylierungsreaktion durch Phospholipasen. Außerdem ist noch eine unspezifische Interaktion der Metalle mit den Membrankomponenten denkbar, die zu einer Hydrolyse von Phospholipiden führen könnte.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, daß die Behandlung mit der organischen Zinnverbindung Tributylzinn (TBT) zu einer Anhäufung von freier Arachidonsäure führt. Neben

den bereits gut charakterisierten HL-60 Zellen wurden in diese Untersuchung die HeLa und die P388D<sub>1</sub> Zelllinie mit einbezogen. Durch den Vergleich dieser drei Zellsysteme sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um einen allgemeinen Wirkungsmechanismus handelt oder ob den Arachidonsäurestoffwechsel betreffend zellspezifische Unterschiede existieren.

Die Freisetzung von Arachidonsäure war in ihrer Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit unabhängig vom untersuchten Zellsystem (Abb. 4). Auch die Menge an freigesetzter Säure war in allen drei Systemen vergleichbar. Die Konzentration, ab der innerhalb von 10 Minuten freie Arachidonsäure detektiert werden konnte, lag bei 5 µM TBT. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit 10 µM TBT wurden 10-20% der zuvor eingebauten Säure wieder freigesetzt. Für die hier verwendeten Konzentrationen von TBT konnte bereits gezeigt werden, daß der Wiedereinbau der Arachidonsäure gehemmt ist (Ade *et al.*, 1997). Dennoch würde diese Hemmung allein nicht ausreichen, um die hier gemessenen Mengen zu erklären. Im Vergleich hierzu konnte in HL-60 Zellen mit der Quecksilberverbindung Thimerosal gezeigt werden, daß die alleinige Hemmung des Wiedereinbaus nur zu einer geringen Menge an freier Arachidonsäure führt (Krug & Culig, 1991). Betrachtet man die Gesamtheit der markierten Lipide, so läßt sich die Herkunft der freien Arachidonsäure feststellen. Hierbei konnten zelltypspezifische Unterschiede festgestellt werden (Abb. 5A-C). In HL-60 und HeLa Zellen verlief die Reaktion sehr ähnlich. Die Freisetzung von Arachidonsäure erfolgte hauptsächlich aus den beiden Membranphospholipiden Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC). In P388D<sub>1</sub> Zellen dagegen war fast ausschließlich PE die Quelle freigesetzter Arachidonsäure. Die Lipidzusammensetzung der verschiedenen Zelllinien unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich, was aus den Lipidextrakten der unbehandelten Kontrollzellen deutlich wird. Die Substratspezifität der Reaktion deutete einerseits auf die Beteiligung von bestimmten Phospholipasen hin und andererseits auf eine unterschiedliche enzymatische Ausstattung der Zellen. Die Menge an freier Säure und die Substratspezifität führte außerdem zu dem Schluß, daß es sich um eine Freisetzungsreaktion handelt und daß eine direkte Interaktion der Metallverbindungen mit den Membranlipiden unwahrscheinlich ist.

Es soll hier noch erwähnt werden, daß die freie Arachidonsäure nicht nur nach der Metabolisierung in Eicosanoide Wirkungen entfalten kann. Sie kann auch selbst *als second messenger* fungieren z.B. bei der Regulation von Ionenkanälen und Kinasen (Piomelli & Greengard, 1990; Nishizuka, 1992). Die freigesetzte Arachidonsäure wurde hier zwar nicht quantifiziert, kann jedoch im Vergleich mit der nach A23187 Behandlung freigesetzten Menge abgeschätzt werden. Wie die Abb. 6 verdeutlicht, kann die Behandlung mit TBT in HL-60 Zellen zu einer durchaus vergleichbaren Anhäufung freier Arachidonsäure führen. So fanden Ramesha & Ives (1993) sowie Winkler *et al.* (1993) in Neutrophilen nach Stimulation mit dem Calciumionophor eine Konzentration von 25 µM Arachidonsäure. Diese Konzentration würde sicherlich zur Aktivierung verschiedener Prozesse ausreichen (vgl. auch Abb. 19). Außerdem entstehen bei der Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden immer auch Lysolipide,

die einerseits detergentienähnliche Wirkungen haben (Chang *et al.*, 1987) und andererseits Vorläufer des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) sein können. Auf diese Mediatoren wird an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen.

### *Aktivierung von Phospholipasen*

Prinzipiell können mehrere Phospholipasen über hintereinandergeschaltete Reaktionen für die Bereitstellung freier Arachidonsäure verantwortlich sein. Allerdings sprechen nach der Behandlung mit TBT mehrere Befunde für eine direkte Freisetzung aus Phospholipiden durch eine Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Vor allem die oben beschriebene Substratspezifität für PC und PE legen die Beteiligung dieser Phospholipase nahe (Dennis, 1987). In den anderen Lipidfraktionen konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Diese Ergebnisse spiegeln die Substratanforderungen für die PLA<sub>2</sub> wider. Außerdem konnte mittels HPLC-Analytik gezeigt werden, daß nach Behandlung mit Organometallen neben Arachidonsäure keine andere Fettsäure aus Phospholipiden freigesetzt wird (Ade *et al.*, 1997). Hinzu kamen Versuche mit den Inhibitoren Quinacrin und AACOCF<sub>3</sub>, auf die später noch genauer eingegangen wird.

In jüngerer Zeit wurden eine Reihe von verschiedenen Formen der PLA<sub>2</sub> entdeckt. In einer aktuellen Übersichtsarbeit faßt Dennis (1997) diese wachsende Superfamilie der verschiedenen PLA<sub>2</sub> Formen zusammen. Es stellte sich zunächst die Frage, ob die TBT-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure durch eine sekretorische (sPLA<sub>2</sub>) oder eine zytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) katalysiert wird. Die Aktivierung einer sPLA<sub>2</sub> hätte zwar auch zu einer Freisetzung von Arachidonsäure geführt, allerdings wären auch andere freie Fettsäuren zu erwarten gewesen. Die sPLA<sub>2</sub> bevorzugt als Substrate die Phospholipide in der Reihenfolge PE, PS >> PC und benötigt aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisation Calciumkonzentrationen im millimolaren Bereich für optimale Aktivität. Die Freisetzung von Arachidonsäure war zwar auch hier calciumabhängig, millimolare Calciumkonzentrationen wurden jedoch nach Behandlung mit TBT in den Zellen nicht erreicht. Aufgrund von Experimenten mit dem Inhibitor AACOCF<sub>3</sub>, der selektiv die cPLA<sub>2</sub> gegenüber der sPLA<sub>2</sub> hemmt (Riendau *et al.*, 1994) und effektiv die TBT-induzierte Arachidonsäurefreisetzung verhindern konnte (Abb. 12), wurde schließlich die cPLA<sub>2</sub> für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht.

Tab. 5: Einteilung der bisher bekannten Phospholipase A<sub>2</sub> Typen in verschiedene Gruppen und deren Vorkommen, verändert nach Dennis (1997). sPLA<sub>2</sub>, sekretorische PLA<sub>2</sub>; cPLA<sub>2</sub>, zytosolische PLA<sub>2</sub>.

Gruppe	Vorkommen	Typ	Größe (kD)	Calcium-abhängigkeit
I	Kobra Pankreas von Schwein und Mensch	sPLA <sub>2</sub>	13-15	mM
II	Schlangengift humane Synovialflüssigkeit und Plättchen	sPLA <sub>2</sub>	13-15	mM
III	Bienengift, Eidechsen	sPLA <sub>2</sub>	16-18	mM
IV	RAW264.7 Zellen, humane U937 Zellen und Plättchen, Rattenniere	cPLA <sub>2</sub>	85	<μM
V	Lunge, Herz, P388D <sub>1</sub> Zellen	sPLA <sub>2</sub>	14	mM
VI	P388D <sub>1</sub> Zellen, CHO Zellen	cPLA <sub>2</sub>	80-85	keine
VII	humanes Plasma	sPLA <sub>2</sub>	45	keine
VIII	Rinderhirn	cPLA <sub>2</sub>	29	keine
IX	marine Schnecken	sPLA <sub>2</sub>	14	<mM

In P388D<sub>1</sub> Zellen wurden bereits mehrere verschiedene PLA<sub>2</sub> Formen identifiziert (Tab. 5). Hierbei konnte vor allem die Arbeitsgruppe um Dennis nachweisen, daß auch verschiedene PLA<sub>2</sub> Formen mit unterschiedlichen Spezifitäten und Calciumabhängigkeiten gleichzeitig an der Freisetzung von Arachidonsäure beteiligt sind (Balsinde *et al.*, 1994; Balsinde & Dennis, 1996). Die Vielfalt der hier beschriebenen Phospholipasen könnte auch die Ursache für die unterschiedliche Reaktion der P388D<sub>1</sub> Zellen auf die Behandlung mit TBT sein. Hier erfolgte die Freisetzung von Arachidonsäure lediglich aus PE, die anderen Lipidfraktionen wurden kaum beeinflusst (Abb. 5C). In den anderen beiden untersuchten Zelllinien ist wahrscheinlich nur die cPLA<sub>2</sub> aus der Gruppe IV vorhanden. Diese calciumabhängige, 85 kD schwere cPLA<sub>2</sub> konnte mittlerweile aus verschiedenen Zelllinien gereinigt und kloniert werden, z.B. auch aus den mit den HL-60 Zellen verwandten U937 Zellen (Clark *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1991).

#### Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird die cPLA<sub>2</sub> einerseits durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration an die Membran transloziert und andererseits durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert. Hinzu kommt noch die Regulation auf transkriptioneller Ebene, die allerdings hauptsächlich bei langanhaltender Aktivierung eine Rolle spielt. Für die Translokation der PLA<sub>2</sub> an die Membran wird zelltypspezifisch eine intrazelluläre Calciumkonzentration von etwa 300 bis 500 nM diskutiert (Clark *et al.*, 1991; Rehfeldt *et al.*, 1993). Um einen Einblick in diesen Weg der Regulation zu erhalten, wurde die Abhängigkeit der PLA<sub>2</sub> Aktivierung von Calcium untersucht. Die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> läßt sich auf der Ebene der freigesetzten Arachidonsäure sehr gut untersuchen. Eine solche Abhängigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die TBT-induzierte Freisetzung ließ sich durch die Supplementierung des Kulturmediums mit EGTA sehr effektiv verhindern (Abb. 8). Die

Hemmung einer metall-induzierten Arachidonsäurefreisetzung durch Komplexierung des extrazellulären Calciums konnte bereits früher gezeigt werden (Käfer & Krug, 1994). Einen weiteren Hinweis für die Wichtigkeit eines Calciumeinstromes aus dem extrazellulären Raum bei der TBT-induzierten Arachidonsäurefreisetzung lieferte die Hemmung der Freisetzung durch Blockade von Calciumkanälen mit Nickelionen (Abb. 9). Schließlich konnte auch das Abfangen des eingeströmten Calciums durch den intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM die Freisetzung konzentrationsabhängig unterdrücken (Abb. 10). Die Calciumabhängigkeit dieser Reaktion wurde zunächst auch als Ursache der A23187-induzierten Freisetzung von Arachidonsäure angesehen.

Zusätzlich wird die Aktivität der cPLA<sub>2</sub> durch Phosphorylierung reguliert. Diese kovalente Modifikation des Enzyms kann aufgrund der verminderten Laufgeschwindigkeit der phosphorylierten Form in der SDS-Gelelektrophorese demonstriert werden. In HeLa Zellen lag die cPLA<sub>2</sub> in unbehandelten Zellen etwa zu gleichen Teilen in der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form vor (Abb. 18). Die Anwesenheit einer phosphorylierten PLA<sub>2</sub> auch in unstimulierten Zellen wurde als Grund für die Freisetzung von Arachidonsäure durch Substanzen, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen, vermutet. Clark *et al.* (1995) berichten, daß durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration von 100 auf 300 nM die Aktivität der cPLA<sub>2</sub> bis zu 10fach erhöht wird. Ishimoto *et al.* (1996) messen der Calciumerhöhung sogar größere Bedeutung bei, als einer zusätzlichen Aktivierung durch Phosphorylierung. Durch die Calciumerhöhung nach Behandlung mit dem Ionophor könnte die bereits phosphorylierte Fraktion an die Membran verlagert werden und dort Arachidonsäure freisetzen. TBT induzierte ebenfalls einen Calciumeinstrom in die Zelle (Abb. 29; Ade *et al.*, 1996) und könnte so zum gleichen Ergebnis führen.

Der Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen war ein Versuch, bei dem die Zellen gleichzeitig mit TBT und dem Calciumionophor behandelt wurden. Nach der gleichzeitigen Behandlung von HL-60 Zellen mit TBT und A23187 ließ sich entgegen den Erwartungen eine Steigerung der Arachidonsäurefreisetzung gegenüber der bereits enormen Freisetzung nach den entsprechenden Einzelbehandlungen in der Größenordnung eines additiven Effektes nachweisen (Abb. 6). Da aber nach Behandlung mit A23187 die Calciumkonzentration in HL-60 Zellen innerhalb kürzester Zeit auf einen kaum zu steigenden Wert anstieg, wurde vermutet, daß die TBT-induzierte Calciumerhöhung nur eine untergeordnete Rolle spielt, und TBT eher über einen zusätzlichen Mechanismus wirkt. Ueha *et al.* (1996) konnten bereits bei der Untersuchung der akuten Toxizität von TBT in Neuronen zeigen, daß die Behandlung mit Ionomycin im Vergleich zu TBT einen deutlich höheren Calciumanstieg induziert, jedoch in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch war. TBT dagegen konnte sogar in nominell calciumfreiem Medium die Zellvitalität senken.

Im Hinblick auf die induzierte Signaltransduktion wurden ebenfalls ähnliche Effekte beobachtet. So führte die gleichzeitige Stimulierung von menschlichen Thrombozyten mit A23187 und

Phorbolestern zu einer deutlichen Steigerung der Arachidonsäurefreisetzung gegenüber den Einzelbehandlungen (Halenda *et al.*, 1985). Die Kombination von A23187 und Wachstumsfaktoren führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Es konnte nach Behandlung von Epithelzellen mit A23187 und TGF- $\alpha$  (Liu *et al.*, 1993) oder Makrophagen mit A23187 und CSF-1 (Xu *et al.*, 1994) ebenfalls eine Steigerung des A23187-induzierten Effekts nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um überadditive, synergistische Effekte, denn die Behandlung mit TPA bzw. den Wachstumsfaktoren allein hatte keinen Effekt auf die Menge freier Arachidonsäure, konnte aber die A23187-induzierte Freisetzung deutlich verstärken. Die Behandlung mit TPA und den Wachstumsfaktoren führte interessanterweise auch nicht zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was nochmals die Notwendigkeit einer optimalen Calciumkonzentration unterstreicht. Auch für das Zusammenwirken der beiden physiologischen Stimulatoren fMLP und GM-CSF wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben (Durstin *et al.*, 1994). Die Behandlung mit GM-CSF allein führte auch hier kaum zu einem Effekt, sie konnte aber die fMLP-induzierte Arachidonsäurefreisetzung nahezu vervierfachen.

Es wurde hier bereits vermutet, daß der eine Stimulus für eine erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle sorgt, und der zweite Stimulus für die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> durch Phosphorylierung verantwortlich ist. TBT induziert vielleicht durch die Erhöhung der Calciumkonzentration im Gegensatz zu TPA und den Wachstumsfaktoren selbst die Freisetzung von Arachidonsäure. Dennoch wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß TBT die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> induziert und zusammen mit der Calciumerhöhung, die durch A23187 erreicht wird, zu einer maximalen Arachidonsäurefreisetzung führt (Zaucke & Krug, 1996a, b).

In der vorliegenden Arbeit konnte dann auch tatsächlich nachgewiesen werden, daß die Behandlung mit TBT zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> durch Phosphorylierung führt (Abb. 18). Der Zeitverlauf der TBT-induzierten Phosphorylierung stimmte mit dem der Arachidonsäurefreisetzung gut überein (vgl. Abb. 4). Nach 5 Minuten war die Aktivierung bereits zu erkennen, nach 10 Minuten lag fast ausschließlich die phosphorylierte cPLA<sub>2</sub> vor. Zu diesem Zeitpunkt war dann auch die Menge der freigesetzten Arachidonsäure maximal. Eine längere Inkubationszeit führte zu keiner weiteren Steigerung der Menge von freier Säure. Auch der Phosphorylierungszustand der cPLA<sub>2</sub> war nicht mehr zu steigern. Auch die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit stimmten auf der Ebene der cPLA<sub>2</sub> Aktivierung und der Arachidonsäurefreisetzung überein. Die 10-minütige Inkubation mit 5  $\mu$ M TBT führte zu einer nachweisbaren Freisetzung von Arachidonsäure und zu einer Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub>. Die Geschwindigkeit der Phosphorylierung gleicht der Aktivierung durch physiologische Stimuli, auf jeden Fall kann eine Regulation auf transkriptioneller Ebene durch TBT ausgeschlossen werden.

### Regulation der cPLA<sub>2</sub> und Aktivierung durch die MAP Kinase

Nachdem die Aktivierung der Phospholipase durch Phosphorylierung eindeutig bewiesen war, und somit die Freisetzung der Arachidonsäure erklärt werden konnte, sollte die Signaltransduktion weiter nach oben verfolgt werden, um den möglichen Angriffspunkt des TBT genauer charakterisieren zu können. Im Hinblick auf den Mechanismus der cPLA<sub>2</sub> Aktivierung durch TBT stellte sich die Frage, welche anderen Stimuli generell dieses Enzym induzieren. Hierzu existieren eine Reihe von Untersuchungen in verschiedenen Zellsystemen, die in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind (Tab. 6). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, kann die langanhaltende Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> auch auf Transkriptionsebene erfolgen.

Tab. 6: Verschiedene Stimuli, die zur Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> führen können, verändert und ergänzt nach Clark *et al.* (1995). Die Abkürzungen können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

Stimulus	Zelltyp	Regulation	Referenz
EGF	MEPM Zellen	transkriptionelle Aktivierung	Chepenik <i>et al.</i> , 1994
	Rat-2 Zellen	Phosphorylierung	Lin <i>et al.</i> , 1992b
	NEF Zellen	Phosphorylierung	Schalkwijk <i>et al.</i> , 1995
bFGF	Endothelzellen	Phosphorylierung	Sa <i>et al.</i> , 1995
GM-CSF	humane Neutrophile	Phosphorylierung	Nahas <i>et al.</i> , 1996
IFN- $\alpha$	HeLa Zellen	Phosphorylierung	Flati <i>et al.</i> , 1996
IgE	MCI Mastzellen	Phosphorylierung	Currie <i>et al.</i> , 1994
IL-1 $\alpha$	WI-38 Zellen	Phosphorylierung, transkriptionelle Aktivierung	Lin <i>et al.</i> , 1992a
M-CSF	humane Monozyten	transkriptionelle Aktivierung	Nakamura <i>et al.</i> , 1992
PAF	humane Neutrophile	Phosphorylierung	Krump <i>et al.</i> , 1995
PDGF	Rat-2 Zellen	Phosphorylierung	Lin <i>et al.</i> , 1992b
TGF- $\alpha$	Mauskeratinozyten (HEL-30)	Phosphorylierung	Kast <i>et al.</i> , 1993
Thrombin	humane Plättchen	Phosphorylierung	Kramer <i>et al.</i> , 1993
TNF	humane Neutrophile	Phosphorylierung,	Waterman & Sha'afi, 1995
	HeLa Zellen	transkriptionelle Aktivierung	Hoeck <i>et al.</i> , 1993

Von den hier aufgeführten Induktoren der cPLA<sub>2</sub> sind die Signaltransduktionsmechanismen größtenteils bekannt. Neben der bereits mehrfach erwähnten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration konnte in zahlreichen Untersuchungen die zusätzliche Aktivierung durch Proteinkinasen demonstriert werden. Dies wurde einerseits durch Behandlung mit Phorbolestern und andererseits über Stimulierung von Rezeptortyrosinkinasen mit Wachstumsfaktoren nachgewiesen (Bonventre *et al.*, 1990; Goldberg *et al.*, 1990; siehe Tab. 6). Diese Behandlungen führten tatsächlich zu einer Phosphorylierung des Enzyms, die in den meisten Fällen an einem Serinrest stattfand. Eine Ausnahme war die Tyrosinphosphorylierung nach TGF (Kast *et al.*, 1993), wobei noch ungeklärt ist, ob diese Phosphorylierung wirklich die Aktivität steigert. Einen Hinweis für die Wichtigkeit der Phosphorylierung lieferten auch in der vorliegenden Arbeit zunächst Versuche zur Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung nach Behandlung mit

Inhibitoren von Kinasen. Die Freisetzung von Arachidonsäure konnte zumindest teilweise durch Vorinkubation mit den Inhibitoren Genistein und Sphingosin gehemmt werden (Abb. 13, 14).

1993 konnte von Lin *et al.* und Nemenoff *et al.* demonstriert werden, daß die gereinigte cPLA<sub>2</sub> ein Substrat für die MAP Kinase ist. Die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> führte einerseits zu einer 2-3fachen Aktivierung und andererseits zu der auch hier demonstrierten Verlangsamung des Enzyms in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 18). Außerdem findet die Phosphorylierung am Serin 505 statt, das sich in einer Pro-Leu-Ser-Pro Sequenz befindet (Lin *et al.*, 1993). Diese Sequenz ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die MAP Kinase (Alvarez *et al.*, 1991). Durch Austausch des Serins gegen ein Alanin wurde die Aktivierung und Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> und damit auch der elektrophoretische *mobility shift* verhindert. Allerdings wurde auch beschrieben, daß eine Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> allein nicht ausreicht, um zur Freisetzung von Arachidonsäure zu führen (Lin *et al.*, 1992b). Die cPLA<sub>2</sub> enthält zwar noch andere potentielle Phosphorylierungsstellen, z.B. für die PKC und PKA, deren Phosphorylierung führte jedoch kaum zu einer Steigerung der Aktivität (Lin *et al.*, 1993; Nemenoff *et al.*, 1993). In einer neuen Arbeit fanden Kramer *et al.* (1996) interessanterweise, daß in thrombin-stimulierten Plättchen die cPLA<sub>2</sub> auch durch die p38 Kinase, einem weiteren Mitglied der MAP Kinase Familie, aktiviert werden kann. So ließ sich z.B. auch die TNF-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> in Neutrophilen durch einen Inhibitor der p38 Kinase verhindern, durch den MEK Inhibitor PD098059 jedoch nicht (Waterman *et al.*, 1996).

Im Gegensatz hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Hemmung der TBT-induzierten Freisetzung von Arachidonsäure mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD098059 untermauert, daß die MAP Kinase auch in HL-60 Zellen an der TBT-induzierten Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> beteiligt ist (Abb. 15). Im folgenden wurde in HL-60 Zellen zunächst die Aktivierung der MAP Kinase durch GM-CSF nachgewiesen (Abb. 19), um den Verlauf der Aktivierung nach einem physiologischen Stimulus abschätzen zu können. Wie in Tab. 6 angegeben, kann dieser Faktor in Neutrophilen auch zu einer Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> führen (Nahas *et al.*, 1996). Nach der Behandlung mit GM-CSF blieb jedoch eine intrazelluläre Calciumerhöhung aus (Abb. 31), weshalb dann auch keine Freisetzung von Arachidonsäure stattfand (Daten nicht gezeigt). In Abb. 20 ist die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung mit TBT dargestellt. Die Aktivierung, die wiederum als *mobility shift* nachgewiesen werden konnte, verlief sehr schnell. Wie nach der Behandlung mit GM-CSF konnte bereits nach wenigen Minuten eine starke Aktivierung festgestellt werden. Der Zeitverlauf und auch die Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung decken sich wiederum mit der Freisetzung von Arachidonsäure und der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub>. Dies konnte dann auch für die MAP Kinase aus HeLa und P388D<sub>1</sub> Zellen reproduziert werden (Abb. 23). Hieraus kann einerseits gefolgert werden, daß wahrscheinlich auch in HL-60 und P388D<sub>1</sub> Zellen eine Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> stattfindet und andererseits zur Freisetzung von Arachidonsäure ein vom Zelltyp unabhängiger Signalweg benutzt wird. Außer TBT konnten auch andere organische

Zinnverbindungen (Daten nicht gezeigt) und in höheren Konzentrationen die Bleiverbindung Triethylblei (TEL) die Aktivierung der MAP Kinase induzieren (Abb. 21). TEL führte nicht nur auf der Ebene der MAP Kinase zu einer verzögerten Aktivierung sondern auch bei der Freisetzung von Arachidonsäure (Daten nicht gezeigt). Dies deutet erneut auf einen Zusammenhang zwischen organometall-induzierter MAP Kinase Aktivierung und Arachidonsäurefreisetzung hin. Aber auch Arachidonsäure selbst induzierte die MAP Kinase (Abb. 22). Dies konnten auch Rao *et al.* (1994) feststellen, die hierfür zum Teil auch die entstehenden Metabolite verantwortlich machen konnten. Die Menge der freigesetzten Säure wurde zwar nicht quantifiziert, könnte aber durchaus zu einer Verstärkung des Metalleffekts führen. Für die Aktivierung der MAP Kinase kann die Arachidonsäure jedoch nicht allein verantwortlich sein, denn die Freisetzung fand frühestens nach 10 Minuten statt, die Aktivierung der MAP Kinase bereits nach 2-5 Minuten. Außerdem konnte die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung mit dem cPLA<sub>2</sub> Inhibitor AACOCF<sub>3</sub> nicht verhindert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Vorbehandlung mit dem als cPLA<sub>2</sub> Inhibitor verwendeten Quinacrin hemmte überraschenderweise die TBT-induzierte Aktivierung der MAP Kinase (Abb. 25). Dies führt zu dem Schluß, daß der Inhibitor zwar die Arachidonsäurefreisetzung hemmen kann, allerdings nicht erst auf der Ebene der cPLA<sub>2</sub>, sondern bereits an einem früheren Schritt der TBT-induzierten Signaltransduktion. Dem Quinacrin wird auch eine calciumantagonistische Wirkung zugeschrieben (Filippov *et al.*, 1989). Das könnte einerseits bedeuten, daß die Hemmung der cPLA<sub>2</sub> auf die Hemmung der intrazellulären Calciumerhöhung zurückzuführen ist. Andererseits wäre dies ein Hinweis, daß auch die Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung mit den Metallen calciumabhängig sein könnte. Daher wurden auch in dieser Arbeit Versuche zur TBT-induzierten MAP Kinase Aktivierung mit den beiden Calciumchelatoren EGTA und BAPTA/AM durchgeführt. Die Supplementierung des Mediums mit EGTA konnte die A23187- und auch die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung völlig unterdrücken. Auf der anderen Seite blieb die GM-CSF-induzierte Aktivierung erhalten (Abb. 26). Wie bereits erwähnt, führte die Behandlung mit GM-CSF nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und ist aus diesem Grund wahrscheinlich unempfindlich gegenüber der Behandlung mit EGTA. Auch die Vorinkubation mit BAPTA/AM konnte die TBT-induzierte MAP Kinase Aktivierung konzentrationsabhängig wie die Arachidonsäurefreisetzung verhindern (vgl. Abb. 10 und Abb. 26). Diese Befunde deuten darauf hin, daß auch zur Aktivierung der MAP Kinase nach Behandlung mit TBT ein gewisser Calciumeinstrom nötig ist. In der Literatur gibt es sogar Hinweise für eine rein calciumabhängige Aktivierung der Kinase Kaskade. Rosen *et al.* (1994) berichteten, daß eine Membrandepolarisation in PC12 Zellen bereits ausreicht, um die MAP Kinase Kaskade über Ras zu aktivieren. An menschlichen Fibroblasten konnten Huang *et al.* (1995) nachweisen, daß in völliger Abwesenheit von Wachstumsfaktoren extrazelluläres Calcium allein die MAP Kinase induzieren kann. Schließlich beschrieben Chao *et al.* (1992, 1994) calciumabhängige und -unabhängige Wege in der Aktivierung der MAP Kinase. Die Aktivierung durch Thapsigargin konnte hier durch EGTA verhindert werden, die durch EGF

induzierte dagegen nicht. Eine mögliche calciumabhängige Aktivierung könnte auch die Effekte des Calciumionophors erklären. Durch diese Hemmversuche wurde in der vorliegenden Arbeit bewiesen, daß auch bei der metall-induzierten Aktivierung der MAP Kinase das Calcium eine mitentscheidende Rolle spielt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zusätzlich Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration durchgeführt. Hier wurde festgestellt, daß die durch TBT induzierte Calciumerhöhung allein nicht ausreicht, um die MAP Kinase zu aktivieren. Denn mit Hilfe des Calciumionophors (50 bis 100 nM) wurde innerhalb kürzester Zeit eine intrazelluläre Calciumkonzentration zwischen 200 und 400 nM erreicht (Abb. 29), die aber noch nicht genügte, um die MAP Kinase zu aktivieren (Abb. 30). Konzentrationen von 5 und 10 µM TBT führten ebenfalls sofort nach Zugabe zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Anstieg verlief jedoch deutlich flacher, auch lagen die erreichten Konzentrationen weit unter denen, die durch A23187 Behandlung induziert wurden (Abb. 29). Dennoch konnten Konzentrationen von 5 und 10 µM TBT eine deutliche Aktivierung der MAP Kinase bewirken (Abb. 30). Dies bedeutet, daß die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nach TBT Behandlung zwar notwendig aber nicht ausreichend für die Aktivierung der MAP Kinase ist. Krug *et al.* (1996) schlagen folglich auch im Zusammenhang mit der Toxizität von Organometallverbindungen vor, daß die induzierte Calciumerhöhung im wesentlichen zu einer Verstärkung anderer Mechanismen beiträgt.

### *Aktivierung der MAP Kinase*

Die MAP Kinase wird durch Phosphorylierung von benachbarten Threonin und Tyrosin aktiviert (Übersicht in Robinson & Cobb, 1997). Diese Reaktion erfolgt durch die bispezifische Kinase MEK, die ihrerseits ein Substrat für eine Serin/Threonin-spezifische Kinase darstellt. Hierfür kommt vor allem die Raf-1 Kinase in Frage (Howe *et al.*, 1992; Kyriakis *et al.*, 1992). Zum Abschluß der Untersuchungen zur Induktion der Kinase Kaskade, die schließlich zur Freisetzung von Arachidonsäure führt, wurde untersucht, ob die Aktivität der Raf-1 Kinase ebenfalls durch TBT beeinflusst wird. Die Regulation der Raf-1 Kinase ist sehr komplex (Morrison & Cutler, 1997). Ihre Aktivierung kann zu zahlreichen Modifikationen des Proteins führen, die vor allem abhängig vom Zelltyp aber auch vom Induktor sind. Eine Zusammenfassung über die Rolle der Raf-1 Kinase in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren liefert eine Übersicht von Rapp (1991). In der vorliegenden Arbeit sollte nicht genauer auf die Regulation oder die unterschiedlichen Modifikationsmöglichkeiten eingegangen werden. Ausgehend von den Beobachtungen, daß TBT zu einer Aktivierung der MAP Kinase führen konnte, und diese Aktivierung durch den spezifischen MEK Inhibitor hemmbar war, konnte allerdings nach TBT Behandlung schließlich auch die Modifikation der Raf-1 Kinase nachgewiesen werden (Abb. 28, Zaucke & Krug, 1996b). Überraschenderweise führte auch die Behandlung mit dem Calciumionophor zu einer Modifikation der Raf-1 Kinase, und es wurden auch hier die gleichen Calciumabhängigkeiten wie für die MAP Kinase gefunden. Wie oben erwähnt, gibt es bereits Hinweise für eine rein calciumabhängige Aktivierung dieser Kinase Kaskade. Die bis hier

gesammelten Ergebnisse führten schließlich zu einer hypothetischen Reaktionsabfolge für die TBT-induzierte Arachidonsäurefreisetzung.

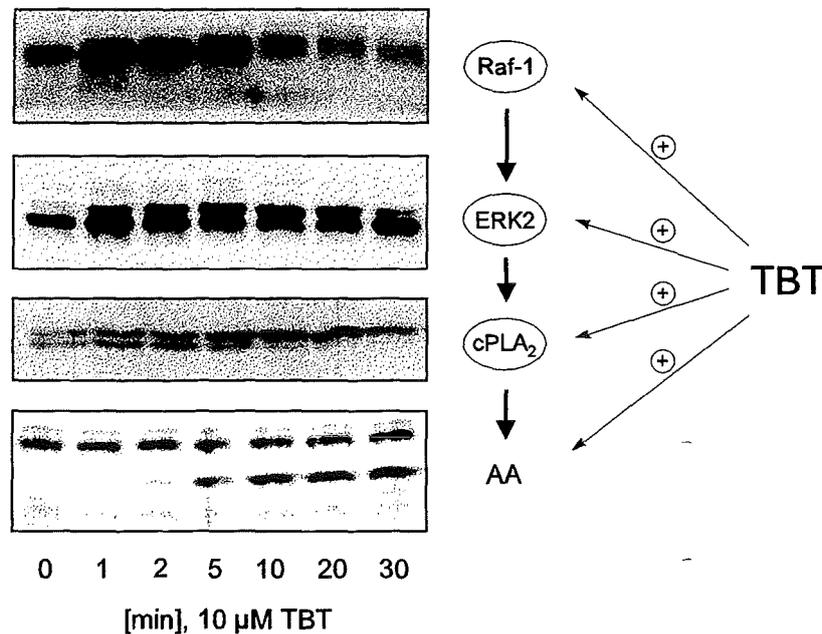


Abb. 64: Hypothetischer zeitlicher Reaktionsablauf bei der TBT-induzierten Freisetzung von Arachidonsäure. Über die Raf-1 Kinase und die MAP Kinase (ERK2) wird die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) phosphoryliert und aktiviert, was schließlich zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA) führt.

Der Mechanismus, der nach TBT Behandlung zur Modifikation der Raf-1 Kinase führt, ist allerdings noch unklar. Es wurde jedoch bereits mehrfach demonstriert, daß die Aktivierung der hier untersuchten Kinase Kaskade auch in der Signaltransduktion einiger unphysiologischer Stimuli beteiligt ist. Sachsenmaier *et al.* (1994) berichteten, daß Wachstumsfaktorrezeptoren und die anschließende Signaltransduktion über die hier beschriebene Kinase Kaskade nach Bestrahlung von HeLa Zellen mit UVC-Strahlung aktiviert wird. Dieser Signalweg wird auch für die UV-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 verantwortlich gemacht (Radler-Pohl *et al.*, 1993). Neben UV-Strahlung kann auch ionisierende Strahlung die Aktivierung der Raf-1 Kinase induzieren (Kasid *et al.*, 1996). Asbest führte über eine spezifische Phosphorylierung des EGF Rezeptors ebenfalls zur Aktivierung der MAP Kinase Kaskade (Zanella *et al.*, 1996). Es liegen bereits erste Hinweise vor, daß auch TBT in HeLa Zellen zumindest teilweise über den EGF Rezeptor zur Aktivierung der Kinasen führt (Knebel & Zaucke, unveröffentlicht). Auch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> löst die Phosphorylierung des EGF Rezeptors und die Bildung von Komplexen aus Adapterproteinen aus, die das Rezeptorsignal an die Kinase Kaskade weiterleiten (Rao, 1996). In weiteren Arbeiten wird die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Aktivierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich gemacht (Cantoni *et al.*, 1996; Guyton *et al.*, 1996). Auch bei der Aktivierung durch Röntgenstrahlung und Phorbolster sind Radikale beteiligt (Stevenson *et al.*, 1994). Dies könnte auch ein möglicher Mechanismus für die TBT-induzierte Signaltransduktion sein, denn die

Vorinkubation mit dem Antioxidanz N-Acetylcystein konnte neben der Freisetzung von Arachidonsäure (Abb. 17) auch die Aktivierung der MAP Kinase sehr effektiv hemmen (Abb. 27).

Musmeci *et al.* (1992) beschreiben, daß Zinnatome mit geeigneten Ligandenatomen wie z.B. Schwefelatomen aus Thiolgruppen, heterozyklischen Stickstoffatomen aus Aminosäuren und Sauerstoffatomen aus Phosphodiestergruppen Komplexe bilden können. Eine weitere Möglichkeit für den molekularen Mechanismus könnte also die direkte Interaktion von TBT mit Thiolgruppen bestimmter Moleküle sein (Saxena, 1987). Zahlreiche Effekte von Zinnverbindungen konnten durch Zugabe eines Überschusses von Thiolreagenzien verhindert werden (Chow & Orrenius, 1994; Galli *et al.*, 1993; Marinovich *et al.*, 1990). Auch Nicotera *et al.* (1992) sehen in der Modifikation von Thiolen einen wichtigen Angriffspunkt in der Toxizität von Metallen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls durch Zugabe von DTT die Freisetzung von Arachidonsäure und die MAP Kinase Aktivierung verhindert (Abb. 16, 27).

Schließlich könnte TBT auch durch eine direkte Interaktion mit verschiedenen Membranrezeptoren zur Auslösung der jeweils receptorspezifischen Signalweiterleitung führen. Eine direkte Aktivierung des EGF Rezeptors wurde auch von Zanella *et al.* (1996) für die Wirkung von Asbestfasern vorgeschlagen.

Durch die Interaktion mit den katalytischen Zentren von Enzymen könnte die Aktivität bestimmter Enzyme beeinflusst werden. Neben der Aktivierung von Kinasen könnte auch eine Hemmung der entsprechenden Phosphatasen zu einem erhöhten Phosphorylierungszustand und somit zu erhöhter Aktivität führen. Die Hemmung von Phosphatasen wird als genereller molekularer Mechanismus für die durch Oxidantien und UV-Strahlung aktivierte Signaltransduktion postuliert (Hecht & Zick, 1992; Knebel *et al.*, 1996). Diese Behandlungen führten so ebenfalls zur Aktivierung von Kinasen. Die durch den Tumorpromotor Arsenit stimulierte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 konnte dagegen durch die spezifische Hemmung einer bestimmten Phosphatase erklärt werden (Cavigelli *et al.*, 1996). Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Tyrosinphosphataseassay konnte im Gegensatz zur Behandlung mit Vanadat, einem irreversiblen Inhibitor von Tyrosinphosphatasen, jedoch keine Hemmung der Phosphataseaktivität durch TBT nachweisen (Abb. 33). Dies könnte allerdings auch auf die Assaybedingungen zurückzuführen sein, denn im Assaypuffer sind ebenfalls große Mengen DTT enthalten. Die reduzierenden Bedingungen im Assay könnten außerdem eventuell entstehende Radikale abfangen. Gegen eine generelle Hemmung von Phosphatasen spricht allerdings auch, daß die Behandlung mit TBT in HL-60 Zellen nicht unspezifisch zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine wie z.B. nach Vanadat führte (Daten nicht gezeigt). Exemplarisch für eine weitere Kinase aus der MAP Kinase Familie wurde in dieser Arbeit auch die Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) in HL-60 Zellen durch TBT gefunden (Abb. 32). Mittlerweile wurde in HeLa Zellen auch die Aktivierung der

p38 Kinase und somit der dritten gut untersuchten MAP Kinase durch TBT Behandlung nachgewiesen (Knebel, pers. Mitteilung).

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend vom Endpunkt Arachidonsäurefreisetzung die Signaltransduktion oberhalb dieser Reaktion untersucht. Es wurde bewiesen, daß die Behandlung von HL-60 Zellen mit TBT über die Aktivierung der MAP Kinase Kaskade die cPLA<sub>2</sub> induziert. Die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> und die Freisetzung von Arachidonsäure könnte eine mögliche Erklärung für die Aggregation von Plättchen und die in der Einleitung beschriebenen entzündlichen Reaktionen nach Behandlung mit organischen Metallverbindungen sein.

Die TBT-induzierte Aktivierung von Kinasen aus der MAP Kinase Familie kann noch zahlreiche zusätzliche Effekte auslösen, denn die cPLA<sub>2</sub> ist nur ein mögliches Substrat der MAP Kinase. Die MAP Kinase Kaskade übermittelt unter physiologischen Bedingungen eine Reihe von extrazellulären Signalen zum großen Teil bis in den Kern und steuert die zelluläre Antwort. Hierbei aktiviert die MAP Kinase neben der cPLA<sub>2</sub> eine Reihe weiterer Kinasen und Transkriptionsfaktoren (Übersichten bei Blenis, 1993; Blumer & Johnson, 1994; Robinson & Cobb, 1997). Durch die Aktivierung verschiedener MAP Kinasen könnten sicherlich auch eine Reihe von Beobachtungen erklärt werden, die nach Behandlung mit organischen Zinnverbindungen gemacht worden sind, wie z.B. die Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB und die verstärkte Expression von *c-jun* und *c-fos*.

## 4.2 Untersuchungen zur organometall-induzierten Apoptose

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die TBT-induzierte Apoptose zunächst auf rein morphologischer Ebene untersucht. Anschließend wurden mögliche Mechanismen, die hier beteiligt sein könnten, eingehender untersucht. Hierbei waren vor allem die zahlreichen Degradationsprozesse von besonderem Interesse. Für diese Untersuchungen wurden hauptsächlich HL-60 Zellen verwendet, da in dieser Zelllinie durch eine Vielzahl anderer Stimuli ebenfalls die Apoptose induziert werden kann. Die hier erzielten Ergebnisse wurden dann mit zuvor gemachten Beobachtungen verglichen.

In einer Reihe von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß verschiedene Metallverbindungen die Apoptose induzieren können. Neben Arbeiten über hexavalentes Chrom (Blankenship *et al.*, 1994) und Lithium (Madiehe *et al.*, 1995) existieren auch Untersuchungen zur organometall-induzierten Apoptose durch Methylquecksilber (Kunimoto, 1994) und organische Zinnverbindungen (Aw *et al.*, 1990; Bollo *et al.*, 1996; Marinovich *et al.*, 1996; Raffray *et al.*, 1993; Raffray & Cohen, 1993; Viviani *et al.*, 1995; Zaucke *et al.*, 1995; Zaucke & Krug, 1997). Diese Arbeiten konzentrieren sich jedoch hauptsächlich auf morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen und lassen den Mechanismus der organozinn-induzierten Apoptose weitgehend offen.

Zu Beginn der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Konzentrationen von TBT ermittelt, die zu einer maximalen Induktion der Apoptose führen. Hier soll angemerkt werden, daß unphysiologische Stimuli prinzipiell in der Lage sind, abhängig von der eingesetzten Konzentration den nekrotischen oder den apoptotischen Zelltod zu induzieren. Lennon *et al.* (1991) beschrieben in HL-60 Zellen für Natriumazid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV Strahlung, Ethanol, Hitze und das Calciumionophor eine solche Konzentrations- bzw. Dosisabhängigkeit. Pellicciari *et al.* (1996) gehen noch weiter und beschreiben für Etoposid abhängig von der eingesetzten Konzentration unterschiedliche Apoptosewege. Eine Dosisabhängigkeit konnte auch für TBT bestätigt werden. In HL-60 Zellen kann mit Konzentrationen zwischen 500 nM und 1 µM innerhalb von 5 bis 24 Stunden die Apoptose induziert werden. Höhere Konzentrationen führten innerhalb weniger Stunden zur Nekrose (Zaucke *et al.*, 1995), niedrigere konnten von den Zellen für mehrere Tage problemlos verkraftet werden. In den anderen hier untersuchten Zellsystemen lagen die effektiven Konzentrationen etwa um den Faktor 2-5 höher.

### *Morphologische Veränderungen*

Das sogenannte *blebbing* der Zellen dient neben der Umverteilung des Zellinhaltes auch zur Neuordnung der Zytoplasmamembran. Dies ist während der Apoptose notwendig, da mit Phosphatidylserin ein Phospholipid auf der Außenseite der Membran präsentiert wird, das normalerweise nur innen zu finden ist. Durch dieses Signal macht die Zellen unter physiologischen Bedingungen Makrophagen auf sich aufmerksam, die so zur Phagozytose angeregt werden und die Zelle und deren Bruchstücke beseitigen (Fadok *et al.*, 1992). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von HL-60 und P388D<sub>1</sub> Zellen verdeutlichen die überraschende Geschwindigkeit, mit der TBT die tiefgreifenden Veränderungen bewirkt (Abb. 34, 35, 36). Vor allem bei den adherenten P388D<sub>1</sub> Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet, wie die Membranausstülpungen zum Teil herausgeschoben und wieder eingezogen wurden. Es war erkennbar, daß die Zelle hier aktiv beteiligt ist und nicht wie eine nekrotische Zelle einfach anschwillt und platzt. Für die Bildung von *blebs* werden Veränderungen im Calcium- und/oder Thiolhaushalt verantwortlich gemacht, die sich schließlich auf Bestandteile des Zytoskeletts auswirken (Jewell *et al.*, 1982; Orrenius *et al.*, 1989). So konnten Cotter *et al.* (1992b) durch Versuche mit Cytochalasin B zeigen, daß die Aktinpolymerisation Voraussetzung für das apoptotische *blebbing* ist. Die Notwendigkeit einer kontrollierten Aktinpolymerisation und -depolymerisation ist auch für die Apoptose in HL-60 Zellen beschrieben (Levee *et al.*, 1996). Daß TBT sowohl Auswirkungen auf den Calcium- und Thiolhaushalt (Chow *et al.*, 1992; Reader *et al.*, 1993) als auch auf Bestandteile des Zytoskeletts haben kann (Jensen *et al.*, 1991b; Krug *et al.*, 1993; Marinovich *et al.*, 1990; 1996), wurde mehrfach beschrieben. In letzter Zeit wurde das *blebbing* der Zellen auch immer mehr als Marker für die Induktion der Apoptose verwendet, da es häufig mit der Kern- und DNA Fragmentierung korreliert (Kerr & Harmon, 1991).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die lichtmikroskopischen Befunde. Vor allem in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen waren die Membranausstülpungen besonders gut zu erkennen. Im Transmissionselektronenmikroskop waren auch die Veränderungen im Zellinneren sichtbar (Abb. 34A-H). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelle konnten nach allen Behandlungen deutliche apoptotische Merkmale erkannt werden. Nach allen Behandlungen war die starke Vakuolisierung der Zelle besonders auffallend. Dieser Anblick wurde von Bøe *et al.* (1991) als zytoplasmatisches „Kochen“ bezeichnet und kennzeichnet die Aktivität der Zelle während der ablaufenden Degradationsreaktionen (Wyllie *et al.*, 1980). Auf diese Abbaureaktionen wird später noch genauer eingegangen.

### Vorgänge im Zellkern

Besonders gut waren hier außerdem die kondensierten und bereits fragmentierten Kerne zu erkennen. Insgesamt konnten nach der Behandlung mit TBT aber auch Thapsigargin nur selten völlig fragmentierte Zellen wie nach der Behandlung mit Etoposid oder A23187 beobachtet werden. Auch Dini *et al.*, 1996 beschreiben in U937 Zellen abhängig vom Induktor der Apoptose mehrere Arten der Kernfragmentierung und begründet dies mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Substanzen im Hinblick auf die Interaktion mit Bestandteilen des Zytoskeletts. In Abb. 40B und 40D erkennt man nach der Giemsa Färbung neben der Verdichtung und Fragmentierung des Kerns auch das Schrumpfen der apoptotischen Zellen. Dies ist auf einen Verlust von intrazellulärer Flüssigkeit und bestimmten Ionen zurückzuführen (Lockshin & Beaulaton, 1981).

Die Vorgänge im Kern wurden in dieser Arbeit zunächst durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 verfolgt. Die Ereignisse im Kern beginnen mit einem Zusammenbruch der Chromatinstruktur in einige größere Bruchstücke (Wyllie *et al.*, 1980). Dies konnte auch nach der Behandlung mit Organometallen (Abb. 41) demonstriert werden. Wie dieser Prozeß letztendlich ausgelöst wird, ist noch nicht genau bekannt. Allerdings konnte in den verschiedensten Zelltypen eine auffallende Ähnlichkeit im Ablauf festgestellt werden. Nach einer weiteren Verdichtung des Chromatins bilden sich dann charakteristische halbmondförmige Bereiche an der Kernmembran aus. Im Fluoreszenzbild erscheinen diese dann als Ringstrukturen (Abb. 41B, D, E). Der Kern zerfällt schließlich in Einzelteile, die aber immer noch von einer intakten Membran umschlossen sind.

Dies konnte in den besonders beeindruckenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Behandlung mit TBT und Thapsigargin beobachtet werden (Abb. 37E, H). Die Kernfragmente werden schließlich in die Ausstülpungen verpackt und abgeschnürt (Wyllie *et al.*, 1980). Dies ist einerseits in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt (Abb. 37B, F) und andererseits in Hoechst 33342 gefärbten Zellen im Durchlichtmodus zu erkennen (Abb. 43B, D).

Die Zusammensetzung der abgeschnürten apoptotischen Körperchen kann sehr unterschiedlich sein. Manche dieser *apoptotic bodies* können ein oder mehrere Kernfragmente enthalten, andere nur zytoplasmatische Bestandteile (Wyllie *et al.*, 1980). Die Kernkondensation und die anschließende Fragmentierung verläuft relativ schnell. Wenn dieser Prozeß erst einmal in Gang gesetzt wurde, kann er innerhalb von nur 1 Stunde abgeschlossen sein (Lazebnik *et al.*, 1993). Eine Übersicht über die Vorgänge im Kern während der Apoptose findet man bei Corcoran *et al.* (1994) und Earnshaw (1995). Die Auszählung von apoptotischen Kernen bewies, daß bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde mit Etoposid, TBT oder TEL kondensierte Kerne nachzuweisen waren (Abb. 44). Dies deutet darauf hin, daß die Apoptose direkt nach der Zugabe dieser Substanzen ausgelöst wird.

Eine weitere Methode, um einerseits zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden zu können und andererseits den Ablauf und die Hemmung der Apoptose untersuchen zu können, bietet die Durchflußzytometrie (Dive *et al.*, 1992). Mit dieser Methode sind durch Fluoreszenzfärbung der DNA die apoptotischen Zellen zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal apoptotischer Zellen ist aufgrund eines partiellen DNA Verlusts durch die Aktivität von Endonukleasen und anschließender Diffusion der niedermolekularen DNA Fragmente aus der Zelle niedriger als von Kontrollzellen (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). Dieser Effekt führt dann zum Auftreten des sogenannten *prä-G1-Peaks*. In dieser Arbeit wurden Zellzyklusverteilungen von HL-60 Zellen nach Behandlung mit Etoposid, TBT und TEL durchgeführt. Nach Behandlung mit den Organometallverbindungen konnte in den hier verwendeten Konzentrationen keine zellzyklusspezifische Abhängigkeit festgestellt werden, d.h. die Zellen gingen aus den verschiedenen Zyklusphasen gleich wahrscheinlich in die Apoptose. Diese Unabhängigkeit konnte auch von Cotter *et al.* (1992a) für verschiedene Chemotherapeutika gezeigt werden. Terui *et al.* (1995) berichten dagegen in HL-60 Zellen von einer erhöhten Empfindlichkeit in der S-Phase gegenüber der induzierten Apoptose durch A23187, Actinomycin D oder Cycloheximid. Nach der Behandlung mit Etoposid wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein Verschwinden des G2/M-Peaks beobachtet. Dies ist auf die Wirkungsweise des Inhibitors der Topoisomerase zurückzuführen. Hier kommt es in der S-Phase zur Bildung von DNA Komplexen, die schließlich zur Apoptose führt. Diese Zellzyklusabhängigkeit konnte prinzipiell von Endresen *et al.* (1996) bestätigt werden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, daß auch diese Zellzyklusphasenspezifität von der Konzentration des eingesetzten Induktors abhängt, wobei hohe Konzentrationen eher zu unspezifischen Effekten führten. Es kann hier nicht ausgeschlossen werden, daß auch niedrigere Konzentrationen von TBT bei längerer Inkubationszeit ähnlich zyklusspezifisch reagieren könnten, wie dies bereits für andere Organometalle beschrieben wurde (Käfer & Krug, 1997). Das Auftreten des *prä-G1-Peaks* konnte erst nach 3 Stunden deutlich nachgewiesen werden (Abb. 52). Im Vergleich zur Kondensation des Chromatins, die bereits nach einer Stunde festgestellt wurde, war diese Reaktion deutlich verzögert. Dies bestätigt die zeitliche Abfolge der Reaktionen im Kern: zuerst

---

wird das Chromatin kondensiert, dann erfolgt der DNA Abbau, sowie die Verpackung und Abschnürung von *apoptotic bodies*.

### DNA Fragmentierung

Von Wyllie wurde bereits 1980 die Fragmentierung der DNA und das Auftreten des spezifischen Leiternusters im Agarosegel als *das* charakteristische Ereignis der Apoptose beschrieben. Heute gehen die Meinungen allerdings auseinander, ob diese charakteristische Degradation der DNA für den Ablauf der Apoptose essentiell ist, oder es sich nur um einen weiteren Endpunkt handelt (Eine Übersicht zu dieser Thematik liefern Bortner *et al.*, 1995). Man ist sich jedoch grundsätzlich einig, daß der Nachweis der DNA Fragmentierung ein sicherer Hinweis für die Apoptose ist. Auf jeden Fall ist mit der Fragmentierung der DNA ein Zustand erreicht, ab dem es für die Zelle kein Zurück mehr gibt (Bortner *et al.*, 1995). TBT und andere organische Zinn- oder Bleiverbindungen führten in HL-60 Zellen zeit- und konzentrationsabhängig zur apoptosespezifischen Fragmentierung der DNA (Abb. 45, 46). Auch hier wurde nachgewiesen, daß die Effektivität der verschiedenen trialkylierten Zinnverbindungen von ihrer Struktur abhängig und durch TBT auch in anderen Zelllinien die Apoptose induziert wird (Abb. 47). Für die DNA Fragmentierung während der Apoptose werden eine Reihe verschiedener Endonukleasen verantwortlich gemacht, über deren Regulation allerdings noch weitgehend Unklarheit herrscht (Peitsch *et al.*, 1994). Als mögliche Mechanismen werden hier eine intrazelluläre Calciumerhöhung oder Veränderungen des intrazellulären pH Wertes diskutiert. Dies wären wiederum mögliche Angriffspunkte für organische Metallverbindungen, für die ebenfalls Struktur-Wirkungsbeziehungen nachgewiesen wurden (Ade, 1995; Ade *et al.*, 1996). Der Sinn der DNA Fragmentierung unter physiologischen Bedingungen wird hauptsächlich darin vermutet, die Aufnahme der DNA durch phagozytierende Zellen zu erleichtern (Peitsch *et al.*, 1994). Daher konnten auch nach der Behandlung mit TBT die DNA Bruchstücke zeitlich erst nach den morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Die Effekte von TBT konnten nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auch durch extensives Waschen nicht mehr rückgängig gemacht werden. Dies kann bedeuten, daß entweder das apoptotische Signal sehr schnell generiert wird oder TBT in dieser Zeit bereits vollständig in die Zelle aufgenommen wurde und das Signal erst intrazellulär entsteht.

### Proteolyse

Während der Apoptose findet neben der DNA Fragmentierung auch eine charakteristische Degradation bestimmter Proteine statt. Einige der vom Abbau betroffenen Proteine sind in Tab. 7 zusammengefaßt. Für den Abbau dieser Proteine werden die sogenannten ICE (von *Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*; Cerretti *et al.*, 1992) und ICE-verwandten Proteasen verantwortlich gemacht, die in jüngster Zeit auch unter der Bezeichnung Caspasen zusammengefaßt werden (Übersicht: Martins & Earnshaw, 1997; Takahashi & Earnshaw, 1996).

Bisher konnte an jeder Form der induzierten Apoptose die Beteiligung von Caspasen nachgewiesen werden.

Tab. 7: Zusammenstellung einiger potentieller Substrate von Proteasen der ICE Familie (Caspasen) während der Apoptose, ergänzt und verändert nach Schwartz & Milligan (1996).

Protein	Funktion	Lokalisation
Pro-IL1 $\beta$	Vorläufer des aktiven Zytokins	Zytoplasma
ICE	Vorläufer der aktiven Protease	Zytoplasma
CPP-32	Vorläufer der aktiven Protease	Zytoplasma
Fodrin	Zytoskelett	Zytoplasma
Actin	Zytoskelett	Zytoplasma
Proteinkinase C- $\delta$	Signaltransduktion	Zytoplasma
DNA-abhängige Proteinkinase	DNA Reparatur	Kern
Retinoblastoma Protein	Zellzyklus	Kern
Lamin	Chromatinstruktur	Kern
PARP	DNA Reparatur	Kern

Die Aktivierung dieser Proteasen ist neben den morphologischen Veränderungen eines der ersten Ereignisse während der Apoptose. Die spezifische Spaltung von Poly-(ADPribose)-Polymerase (PARP) wurde von Kaufmann *et al.* (1993) als früher Marker für die Apoptose vorgeschlagen, Lazebnik *et al.* (1994) konnten nachweisen, daß hierfür eine Protease aus der Caspasefamilie verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel der Proteine Lamin und PARP demonstriert werden, daß Caspasen auch während der TBT-induzierten Apoptose aktiviert werden (Abb. 55). Außerdem wurde die Spaltung von PARP auch in HeLa und P388D<sub>1</sub> Zellen demonstriert (Abb. 56). Dies deutet auch bei der Induktion der Apoptose durch TBT auf einen zelltypunabhängigen Mechanismus hin. Welche Bedeutung die spezifische Degradation der verschiedenen Proteine während der Apoptose hat, ist noch weitgehend unbekannt. Für das nukleäre Lamin konnte allerdings bereits gezeigt werden, daß dessen Abbau die Vorgänge im Kern während der Apoptose erleichtert (Rao *et al.*, 1996). Mutationen in der caspase-spezifischen Spaltsequenz des Lamins führten zu einer verzögerten Apoptose. Auch in vorliegenden Arbeit fand die Degradation von Lamin in HL-60 Zellen zeitgleich zu den Vorgängen im Kern statt. Welche der bisher mindestens 10 entdeckten Caspasen (Martins & Earnshaw, 1997) allerdings zuerst während der Apoptose aktiviert wird, und wie diese Aktivierung erfolgt, ist ebenfalls noch weitgehend unklar.

Experimente in zellfreien Systemen konnten in letzter Zeit einige Hinweise liefern. Besonders interessant auch in Hinblick auf die TBT-induzierte Apoptose ist der Zusammenhang zwischen Mitochondrien und der Apoptose. Zamzami *et al.* (1996) fanden in einem zellfreien System bestehend aus Mitochondrien und Kernen nach der Öffnung von Kanälen am Mitochondrium in den Kernen die typischen Anzeichen der Apoptose. Die Öffnung der Kanäle führte zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten an der Mitochondrienmembran und einer Reduktion des Membranpotentials. Diese Reduktion ist nach Zamzami *et al.* (1995) ebenfalls ein

allgemeines Prinzip bei der Apoptose. Susin *et al.* (1996) konnten außerdem nachweisen, daß durch mitochondriale Membranporen eine 50 kD große Protease austreten kann. Von Zamzami *et al.* (1996) wurde ein 10 kD Protein beschrieben, der apoptose-induzierender Faktor (AIF), der in isolierten Kernen ebenfalls die Apoptose auslösen kann.

Diese Beobachtungen weisen auf einen möglichen Mechanismus der TBT-induzierten Apoptose hin. Es konnte schon vor vielen Jahren gezeigt werden, daß trialkylierte Zinnverbindungen die mitochondrialen Funktionen beeinflussen. Aldridge *et al.* (1976) beschrieben das Anschwellen der Mitochondrien und die Hemmung der ATP Synthese. Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung wurde von Kauppinen *et al.* (1988) auch für TEL beschrieben. Gray *et al.* (1987) konnten in Membranen Aggregate von Zinnverbindungen nachweisen, auch hier war TBT aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die aktivste Zinnverbindung. Cima *et al.* (1996) fanden diese Aggregate sogar in der inneren Mitochondrienmembran. Schließlich konnten Zazueta *et al.* (1994) kürzlich an isolierten Mitochondrien beweisen, daß Triphenylzinn ebenfalls zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials führt. Hierfür wird wiederum eine Interaktion der Zinnverbindung mit Thiolgruppen verantwortlich gemacht, die zur Öffnung einer unspezifischen Pore führen könnte. TBT könnte also durch direkte Interaktion mit der Mitochondrienmembran oder über das mitochondriale Potential die Apoptose induzieren, der Nachweis dazu steht aber noch aus.

### *Regulation der Apoptose*

Zunächst wurden einige Versuche mit Zink durchgeführt, von dem bereits seit 1983 bekannt ist, daß es die Apoptose verhindern kann (Duke *et al.*, 1983). Die Wirkung des Zink basiert wahrscheinlich auf einer Interaktion mit dem Chromatin, beeinflußt aber nicht die auslösenden Ereignisse der Apoptose. Sunderman (1995) faßt die kritische Rolle der intrazellulären Zinkkonzentration zusammen. In der vorliegenden Arbeit verhinderte die Supplementierung des Mediums mit Zink einerseits die Chromatinkondensation (Abb. 42) und andererseits die Bildung von DNA Fragmenten nach Behandlung mit TBT (Abb. 45). Dies gibt einen Hinweis auf die bei der TBT-induzierten Apoptose beteiligten Endonukleasen, die zum Teil zinksensitiv sind (Peitsch *et al.*, 1994). Takahashi *et al.* (1996) beschrieben, daß auch der Abbau von Lamin nach Zinksupplementierung nicht mehr stattfindet. Der ausbleibende Laminabbau könnte den Kern vor degradierenden Enzymen schützen. Allerdings konnte die spezifische Spaltung von PARP hier und auch in der vorliegenden Arbeit in HL-60 Zellen durch die Zinksupplementierung nicht beeinträchtigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu konnten Wolf *et al.* (1997) kürzlich nachweisen, daß Zink die Apoptose oberhalb von Proteasen hemmen kann. Insgesamt muß hieraus geschlossen werden, daß Zink nicht nur die Aktivität der Endonukleasen sondern auch bestimmter Proteasen beeinflußt. Auf der anderen Seite führte eine Erniedrigung der freien intrazellulären Zinkkonzentration durch Komplexierung des Zinks mit TPEN zur Induktion der Apoptose (Abb. 45). Martin *et al.* (1991) konnten in HL-60 Zellen, die unter zinkdefizienten

Bedingungen kultiviert wurden, ebenfalls Apoptose feststellen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer genau regulierten intrazellulären Zinkkonzentration.

Auch die Vorbehandlung mit Dinitrophenol konnte die TBT-induzierte DNA Fragmentierung hemmen (Abb. 49). Dies konnte Kaufmann bereits 1989 für die durch Inhibitoren von Topoisomerasen induzierte Apoptose in HL-60 Zellen zeigen. Die Apoptose ist ein stark energieverbrauchender Prozeß. Es ist durchaus vorstellbar, daß bei Energiemangel einige Prozesse nicht mehr ablaufen können. So berichten Kass *et al.* (1996), daß für die Chromatinkondensation und für die Bildung von apoptotischen Körperchen, jedoch nicht für die DNA Fragmentierung ATP gebraucht wird. Andererseits ist ein erniedrigter ATP Gehalt mittlerweile ein anerkannter Hinweis für die Apoptose, wobei nicht klar ist, ob die Erniedrigung die Ursache oder die Folge der Apoptose ist (Richter *et al.*, 1996). Garland & Halestrap (1997) konnten durch die Behandlung mit Dinitrophenol die Apoptose auslösen. Dies deutet darauf hin, daß die Regulation des intrazellulären ATP Gehalts während der Apoptose eine ähnlich kritisch Rolle spielt wie die Regulation der Zinkkonzentration.

#### *Rolle des Calciums bei der Apoptose*

Die erste Untersuchung, die belegt, daß die Induktion der Apoptose mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration einhergeht stammt von Kaiser & Edelman (1977). In zahlreichen weiteren Untersuchungen wurde bewiesen, daß eine Vielzahl von apoptose-induzierenden Substanzen zunächst zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen. Im Hinblick auf die organozinn-induzierte Apoptose schien dieser Aspekt besonders interessant, denn auch hier wurde als Mechanismus von mehreren Autoren ausschließlich die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Betracht gezogen (Aw *et al.*, 1990; Raffray *et al.*, 1993; Viviani *et al.*, 1995). Diese Erhöhung könnte dann zur Aktivierung von calciumabhängigen Proteasen und Endonukleasen führen. Hinzu kommt, daß die Komplexierung von extrazellulärem Calcium häufig die Induktion der Apoptose verzögert oder sogar verhindert. Die Arbeiten von McConkey & Orrenius (1996) und Nicotera & Rossi (1994) fassen die Rolle des Calciums während der Apoptose zusammen. Auch in HL-60 Zellen führte die Behandlung mit dem Calciumionophor A23187 zur Apoptose (Matsubara *et al.*, 1994), was auch in der vorliegenden Arbeit anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt wurde (Abb. 37D). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration in HL-60 Zellen durchgeführt. Die Behandlung mit 1  $\mu$ M TBT führte ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Abb. 58). Allerdings war die Calciumkonzentration erst nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden mit Werten um 140 nM im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich erhöht. Der zeitliche Verlauf und die erreichte Konzentration sprechen eher gegen eine Beteiligung der Calciumerhöhung bei der TBT-induzierten Apoptose. Die wichtigsten und charakteristischen Schritte der Apoptose waren schon nach 2 bis 3 Stunden in vollem Gange oder sogar bereits abgeschlossen. Zu diesen

Zeitpunkten war noch keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nachweisbar. Auch Lennon *et al.* (1992) stellten in HL-60 Zellen zwar eine Calciumerhöhung während der Apoptose fest, kamen aber zu dem Schluß, daß diese Erhöhung eher eine Konsequenz der Apoptose als ihr Auslöser ist. Barry & Eastman (1992) zeigten, daß selbst die ionomycin-induzierte Apoptose nicht vom extrazellulären Calcium sondern eher von einer Veränderung des pH Wertes abhängig ist. Eine intrazelluläre Ansäuerung ist auch für die Apoptose nach Behandlung mit Etoposid essentiell (Barry *et al.*, 1993). Nach der Behandlung von HL-60 Zellen mit Etoposid konnten Bertrand *et al.* (1993) keine Veränderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration nachweisen. Diese Arbeitsgruppe und Grant *et al.* (1995) konnten sogar mit den Calciumchelatoren EGTA und BAPTA/AM in HL-60 Zellen die Apoptose induzieren.

### *Rolle des Bcl-2 Proteins bei der Apoptose*

Das Genprodukt des „Überlebensgens“ bcl-2 steht in engem Zusammenhang mit der Apoptose. Das Bcl-2 Protein fungiert als Antioxidanz und kontrolliert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Hockenberry *et al.*, 1993). Es ist an der Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindert dort den Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Das Bcl-2 Protein war aus mehreren Gründen für die Untersuchung der Apoptose in HL-60 Zellen interessant. Zunächst wurde von Martin *et al.* (1990) nachgewiesen, daß HL-60 Zellen nach der Differenzierung zu Neutrophilen apoptotisch sterben. Delia *et al.* (1992) fanden, daß während der Differenzierung der Bcl-2 Proteingehalt kontinuierlich abnimmt. Auf der anderen Seite konnte in HL-60 Zellen durch Überexpression von Bcl-2 die mit der Differenzierung assoziierte Apoptose (Benito *et al.*, 1995; Naumovski & Cleary, 1994), aber auch die induzierte Apoptose durch verschiedene Stimuli verhindert werden (Ibrado *et al.*, 1996). Chen *et al.* (1995) konnten in HL-60 Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung und TNF- $\alpha$  innerhalb weniger Stunden keine bcl-2 mRNA mehr nachweisen. Tang *et al.* (1996) stellten in W256 Zellen nach Behandlung mit einem Lipxygenaseinhibitor innerhalb einer Stunde das völlige Verschwinden des Bcl-2 Proteins fest. Die Differenzierung in Richtung Granulozyten mit 1,3% DMSO war auch in der vorliegenden Arbeit innerhalb von 5-7 Tagen mit einer deutlichen Abnahme des Proteins verbunden (Abb. 59A). Die Behandlung mit der standardmäßig eingesetzten Konzentration von 1  $\mu$ M TBT führte dagegen innerhalb von 6 Stunden zu keiner Veränderung der Menge dieses Proteins (Abb. 59C).

Die Inaktivierung von Bcl-2 durch Phosphorylierung nach Behandlung mit Taxol, die ebenfalls mit der Induktion der Apoptose korreliert, wurde erst kürzlich von Haldar *et al.* (1995, 1996) beschrieben. Die 24-stündige Behandlung mit Taxol führte auch in dieser Arbeit zu einer deutlichen Modifikation des Proteins. Blagosklonny *et al.* (1996) konnten ebenfalls in HL-60 Zellen zeigen, daß es sich hierbei um eine Phosphorylierung handelt. In der vorliegenden Arbeit unterblieb dagegen diese Modifikation nach Inkubation mit einer Konzentration 0,5  $\mu$ M TBT.

Innerhalb von 24 Stunden kam es auch hier nicht zu einer Abnahme der Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 59B). Die Behandlung mit TBT führte also weder zu einem Abbau noch zu einer Phosphorylierung des Bcl-2 Proteins. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß andere Proteine aus der Bcl-2 Familie beteiligt sind, die Regulation ausschließlich auf mRNA Ebene stattfindet oder die freie Menge an Bcl-2 Protein über eine Dimerisierung mit anderen Proteinen reguliert wird. So diskutiert Kumar (1997) für das Bcl-2 Protein und die Aktivität von Caspasen ebenfalls ein empfindliches Gleichgewicht. Außerdem wurden von Strasser *et al.* (1995) auch von Bcl-2 unabhängige Mechanismen beschrieben.

### *Rolle der Caspasen bei der Apoptose*

Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren sollte die Frage geklärt werden, ob während der TBT-induzierten Apoptose Caspasen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden zunächst mit YVAD und DEVD zwei Tetrapeptidinhibitoren verwendet, die auf der Spaltsequenz basieren, die von den Caspasen erkannt wird (Nicholson *et al.*, 1995). YVAD und DEVD sind spezifische Inhibitoren der Caspase 1 bzw. der Caspase 3, die früher auch ICE bzw. CPP32 bezeichnet wurden (Martins & Earnshaw, 1997). Diese beiden Inhibitoren hatten auf der Ebene des PARP Abbaus auch in sehr hohen Konzentrationen keinen Effekt (Abb. 57). Dies konnte in HL-60 Zellen von Drexler (1997) bestätigt werden, der das Ausbleiben des Hemmeffektes mit der schlechten Aufnahme der Verbindungen in die Zelle erklärt. Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit zwei neue Inhibitoren verwendet, die durch Einführung einer hydrophoben Gruppe deutlich besser membrangängig sind, allerdings auch eine Reihe verschiedener Caspasen unspezifisch hemmen können (Henkart, 1996). Mit den beiden Inhibitoren zVADfmk und zD-DCB konnte in der vorliegenden Arbeit der Abbau von PARP konzentrationsabhängig verhindert werden (Abb. 57). Die Vorbehandlung mit den Inhibitoren konnte auch die TBT-induzierte DNA Fragmentierung unterdrücken (Abb. 50). Das Ausbleiben der DNA Fragmentierung wurde auch von Mashima *et al.* (1995) in U937 Zellen nach Behandlung mit einer Vielzahl von Induktoren nachgewiesen. Die Spaltung von PARP führt zu einer Trennung der DNA Bindedomäne von der katalytischen Domäne und hemmt so die Aktivität des Enzyms (Nicholson *et al.*, 1995). Die Hemmung der DNA Fragmentierung könnte auf die negative Regulation der  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonuklease durch Poly-ADP-Ribosylierung zurückzuführen sein (Tanaka *et al.*, 1984). Mit dem Abbau von PARP fällt das negativ regulatorische Element weg und die Endonuklease wird aktiv. Die Hemmung des PARP Abbaus verhindert dagegen die Aktivierung der Endonuklease. Die Unterdrückung des *prä-G1-Peaks* ist höchstwahrscheinlich auch auf diese Hemmung der Endonukleasen zurückzuführen (Abb. 53, 54). Es ist unumstritten, daß die Aktivierung von Caspasen mit zu den frühesten Ereignissen während der Apoptose gehört (Takahashi & Earnshaw, 1997). Dennoch konnten McCarthy *et al.* (1997) das *blebbing* an der Plasmamembran im Gegensatz zu dieser Arbeit durch Caspase Inhibitoren nicht verhindern (Daten nicht gezeigt). Enari *et al.* (1996) berichten für die Fas-induzierte Apoptose, daß Caspasen ähnlich wie Kinasen sequentiell aktiviert werden,

wobei eine Protease die nächste durch proteolytische Spaltung aktiviert. Unklarheit besteht allerdings noch darüber, welche Caspase am Anfang einer solchen Reaktionssequenz liegt und wie diese reguliert wird. Die Möglichkeit der direkten Aktivierung von Caspasen durch Signaltransduktionsprozesse an der Plasmamembran wurde kürzlich für die Fas- und TNF-induzierte Apoptose beschrieben. Boldin *et al.* (1996) und Muzio *et al.* (1996) konnten nachweisen, daß nach Bindung von Fas und TNF Komplexe aus Rezeptoren und Proteinen gebildet werden, an die schließlich die Caspase 8 bindet und aktiviert wird. Ein möglicher Angriffspunkt für TBT wäre hier wiederum die direkte Interaktion mit Rezeptoren, die in der vorliegenden Arbeit bereits bei der TBT-induzierten Signaltransduktion diskutiert wurde. Eine rezeptorunabhängige Aktivierung von Caspasen fanden Kluck *et al.* (1997) und Yang *et al.* (1997). Diese beiden Arbeiten demonstrieren eine bcl-2-abhängige Aktivierung durch den Austritt von Cytochrome c aus den Mitochondrien. Der auch in dieser Arbeit verwendete Inhibitor zVADfmk konnte die Aktivität der Caspase hemmen, jedoch nicht den Austritt des Cytochroms. TBT könnte ebenfalls durch eine Schädigung der Mitochondrien den bereits oben erwähnten Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials hervorrufen und schließlich über die Freisetzung von Cytochrom c die Caspasen aktivieren.

#### *Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Kinasen und der Induktion der Apoptose*

Für einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> und der Induktion der Apoptose gibt es in der Literatur bereits mehrere Hinweise. In L1210 Zellen konnte durch verschiedene Prostaglandine die Apoptose ausgelöst werden (Kim *et al.*, 1993). Die Behandlung von Thymozyten mit ionisierender Strahlung führte ebenfalls zu einer Freisetzung von Arachidonsäure, der Metabolisierung in Eicosanoide und schließlich zur Apoptose, die durch Inhibitoren der Lipxygenase (Korystov *et al.*, 1996) und Inhibitoren der cPLA<sub>2</sub> (Shaposhnikova *et al.*, 1994) verhindert werden konnte. Mac Ewan (1996) macht eine erhöhte Expression der cPLA<sub>2</sub> für eine Verstärkung der Apoptose über den TNF-Rezeptor verantwortlich. Schließlich beschreiben Jäättelä *et al.* (1995) und Ratter *et al.* (1996) eine Beteiligung der PLA<sub>2</sub> in der TNF- und Fas-induzierten Apoptose.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Behandlung mit apoptose-induzierenden Konzentrationen von TBT ebenfalls die Freisetzung und Metabolisierung von Arachidonsäure nachgewiesen (Abb. 60). Gleichzeitig fand eine Aktivierung der MAP Kinase statt (Abb. 61). Im Vergleich zur Behandlung mit höheren Konzentrationen von TBT war diese Reaktion jedoch deutlich verzögert, die Aktivierung konnte erst nach 2 Stunden nachgewiesen werden. Auch Watabe *et al.* (1996) stellten nach Behandlung von U937 Zellen mit Bufalin eine späte und langanhaltende Aktivierung der MAP Kinase fest, die wie auch in dieser Arbeit zeitlich mit der DNA Fragmentierung korrelierte. Durch Antisense cDNA gegen die MAP Kinase Kinase konnten die Autoren sowohl die MAP Kinase Aktivierung als auch die Fragmentierung der DNA verhindert

werden. Diese Befunde legen eine Beteiligung der MAP Kinase Kaskade an der Induktion der Apoptose nahe.

In der vorliegenden Arbeit konnten Versuche mit Inhibitoren der cPLA<sub>2</sub> nicht durchgeführt werden, da Konzentrationen, die zu einer effektiven Hemmung der Arachidonsäurefreisetzung führen, für HL-60 Zellen akut toxisch sind (Daten nicht gezeigt). Allerdings belegen Versuche mit dem MEK Inhibitor PD098059, daß die Apoptose auf der Ebene der DNA Fragmentierung und der Bildung eines *prä-G1-Peaks* auch hier zumindest teilweise von einer Aktivierung der MAP Kinase abhängig ist (Abb. 62, 63).

Für die Beteiligung verschiedener Kinasen aus der MAP Kinase Familie an der Apoptose gibt es weitere Belege. So konnten Johnson *et al.* (1996) durch Überexpression der MEK Kinase die Apoptose auslösen. Xia *et al.* (1995) beschreiben gegensätzliche Effekte der verschiedenen Mitglieder der MAP Kinase Familie. Nach Entzug des Wachstumsfaktors NGF konnten sie in PC12 Zellen die Induktion der Apoptose bei Hemmung der ERK und anhaltender Aktivierung der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK) und der p38 Kinase beobachten. Die Aktivierung der während der Apoptose letztgenannten Kinasen wurde auch von Ichijo *et al.* (1997) beschrieben. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit auch die TBT-induzierte Apoptose auf der Ebene der DNA Fragmentierung und in der Zellzyklusanalyse durch Vorbehandlung mit dem Inhibitor der p38 Kinase SB203580 teilweise verhindert werden. Besonders überraschend war der noch deutlichere Hemmeffekt bei Vorbehandlung mit beiden Inhibitoren (Abb. 62, 63). Dies deutet auf eine Beteiligung beider Kinasen in der TBT-induzierten Apoptose von HL-60 Zellen hin. Auch die JNK wurde in HL-60 Zellen durch die Behandlung mit 1 µM TBT aktiviert (Abb. 32). Die Aktivierung der JNK verlief, wie auch die Aktivierung der ERK abhängig von der Konzentration. TBT Konzentrationen, die die Apoptose induzieren, führen erst nach 2 Stunden zu einer nachweisbaren Aktivierung der JNK. Seimiya *et al.* (1997) postulieren sogar eine Aktivierung der Caspasen durch die JNK nach Behandlung von U937 Zellen mit Etoposid. JNK Antisenseoligonukleotide konnten einerseits die Expression der JNK und andererseits die Fragmentierung der DNA verhindern. Der auch in dieser Arbeit verwendete Caspase Inhibitor zVADfmk hemmte dagegen die DNA Fragmentierung, nicht aber die JNK Aktivierung. Eine weitere Arbeit, die einen direkten Zusammenhang zwischen der JNK und Induktion der Apoptose beschreibt, stammt von Chen *et al.* (1996). Hier wurde nach Behandlung der Zellen mit UVC- oder γ-Strahlung eine Aktivierung der JNK festgestellt. Außerdem konnte durch Überexpression einer aktiven JNK die Apoptose induziert werden. Abschließend sei noch erwähnt, daß die JNK nach Behandlung mit TNF zwar ebenfalls aktiviert wird, die Beteiligung an der Apoptose jedoch durchaus kontrovers diskutiert wird (Liu *et al.*, 1996). Auf jeden Fall kann aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse für die TBT-induzierte Apoptose eine Beteiligung von Kinasen angenommen werden.

Früher ist man davon ausgegangen, daß die durch Mitogene aktivierte Kinase Kaskade, an deren Ende die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 stehen, hauptsächlich proliferative Prozesse reguliert.

Diesen Kinasen stehen die sogenannten stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) JNK und die p38 Kinase gegenüber, die immer mehr auch mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden. Eine Übersicht hierzu liefert eine Arbeit von Kyriakis & Avruch (1996). Dieses Bild hat sich mittlerweile etwas gewandelt, wie die hier zitierten neueren Arbeiten andeuten. Man geht eher davon aus, daß ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen dem Aktivitätszustand der verschiedenen Kinase Kaskaden besteht (Cosulich & Clarke, 1996). Ein unphysiologischer Stimulus wie TBT kann dieses Gleichgewicht über verschiedene Mechanismen verschieben. Zur Aktivierung verschiedener Kinasen durch TBT kommen noch weitere Signale hinzu wie z.B. die Aktivierung von Caspasen oder die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Zelle hat dann nur die Möglichkeit alle eintreffenden Signale zu integrieren und entsprechend zu reagieren. Im Falle der Behandlung mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  TBT *entscheidet* sie sich für die Apoptose.

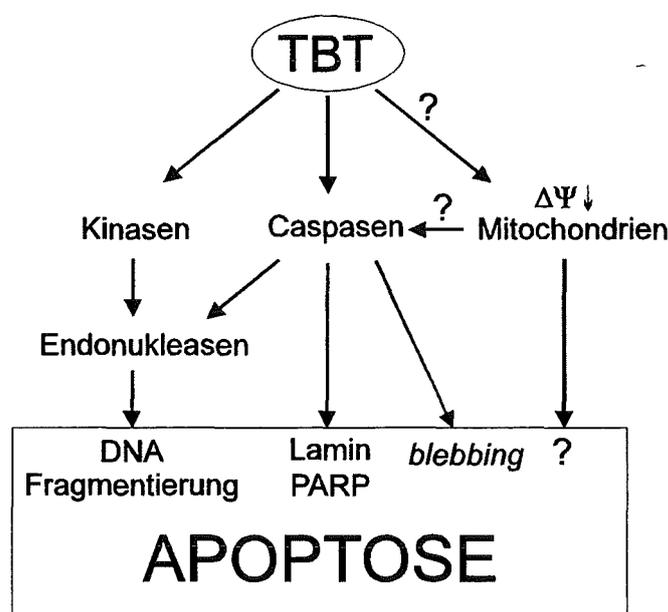


Abb. 65: Zusammenfassendes Modell der Vorgänge während der TBT-induzierten Apoptose. Die Behandlung mit TBT führt über die Aktivierung von Caspasen und Kinasen zum apoptotischen Zelltod. Eine direkte Schädigung von Mitochondrien mit anschließendem Zusammenbruch des Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) wurde diskutiert.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß in HL-60 Zellen nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  TBT innerhalb weniger Stunden alle morphologischen und biochemischen Charakteristika der Apoptose nachweisbar waren. Diese Veränderungen reichen vom *blebbing* an der Plasmamembran über die Kondensierung und Fragmentierung des Kerns bis hin zu apoptose-spezifischen Abbauprozessen der DNA und bestimmter Proteine. Für diese Vorgänge ist hauptsächlich die Aktivierung von Caspasen verantwortlich. Potentielle Angriffspunkte für die Wirkung von TBT sind hierbei Komponenten der Plasmamembran, Bestandteile des Zytoskeletts, Mitochondrien und die intrazelluläre Signaltransduktion (Abb. 65).

Im Hinblick auf die in der Einleitung erwähnten, bereits in der Umwelt nachgewiesenen Konzentrationen, stellt sich hier abschließend die Frage, welche Konzentrationen von TBT bei einer andauernden Exposition noch zur Induktion der Apoptose führen. Dies kann eindeutig nur *in vivo*, d.h. im Tierversuch, experimentell geklärt werden. Allerdings existieren bereits einige Hinweise für die neurotoxische und immunotoxische Wirkung der alkylierten Metallverbindungen. Diese Beobachtungen lassen erahnen, daß der induzierte Zelltod auf Dauer im Organismus zu nachhaltigen Effekten führt. Daher sollte in Zukunft auf jeden Fall die Verwendung dieser Verbindungen in empfindlichen Ökosystemen genau überdacht werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen unter dem Einfluß von organischen Zinnverbindungen untersucht. Als Modellsubstanz wurde hier die für die Umwelt relevanteste Verbindung Tributylzinn (TBT) verwendet. Die TBT-induzierte Arachidonsäurefreisetzung wurde untersucht und der hierfür verantwortliche Mechanismus aufgeklärt: TBT induziert über die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) die Freisetzung von Arachidonsäure.

Anschließend wurde die Reaktionsfolge, die zur Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> führte, näher charakterisiert. Die Behandlung mit TBT induzierte über eine sehr schnelle Aktivierung der MAP Kinase Kaskade die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> und schließlich die Freisetzung von Arachidonsäure. Diese Ergebnisse waren bei HL-60 Zellen, P388D<sub>1</sub> Zellen und HeLa Zellen identisch. TBT stimulierte außerdem die Aktivität der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK).

In dieser Arbeit wurde damit erstmals die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen durch organische Metallverbindungen nachgewiesen. Damit kommt zur bereits bekannten Störung der intrazellulären Calciumhomöostase durch organische Metallverbindungen ein neuer Wirkungsmechanismus hinzu, der die calcium-abhängigen Effekte noch verstärken kann. Versuche mit Calciumchelatoren bewiesen, daß für die TBT-induzierte Aktivierung der Proteinkinasen eine intrazelluläre Calciumerhöhung zwar essentiell aber allein nicht ausreichend ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur induzierten Apoptose durchgeführt. Hierbei stand die Untersuchung spezifischer morphologischer Veränderungen, der Fragmentierung der DNA und proteolytischer Prozesse im Vordergrund. Mit verschiedenen mikroskopischen und biochemischen Techniken wurde der organometall-induzierte Zelltod eindeutig als Apoptose charakterisiert. Die Apoptose wurde innerhalb weniger Stunden induziert, und auch hier waren die Effekte von TBT vom untersuchten Zelltyp unabhängig.

Die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen ist verantwortlich für die spezifischen Abbauprozesse nach Behandlung mit TBT. Der Beweis hierfür wurde durch die Vorbehandlung mit Caspase Inhibitoren erbracht. Dies führte zur Aufhebung der metall-induzierten Effekte auf allen Ebenen.

Die Inkubation mit apoptose-induzierenden Konzentrationen von TBT führte zur Aktivierung von Kinasen aus der MAP Kinase Familie. Durch Verwendung von spezifischen Kinase Inhibitoren wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Proteinkinasen und der Induktion der Apoptose hergestellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Induktion der Apoptose durch Organometalle könnte für die bereits beschriebenen immunotoxischen und neurotoxischen aber auch die antiproliferativen Effekte einiger Verbindungen verantwortlich sein.

Die hier beschriebene Vielfalt der durch organische Metallverbindungen induzierten tiefgreifenden Reaktionen, führte im Hinblick auf die bereits nachgewiesenen Konzentrationen in der Umwelt zu dem Schluß, daß die weitere Verwendung und Zulassung dieser Verbindungsklasse in Zukunft äußerst kritisch überdacht werden sollte.



## 6 Literatur

- Ade T (1995). Der Einfluß von organischen Blei- und Zinnverbindungen auf die Signaltransduktion *in vitro*: Untersuchungen zur Veränderung der zytosolischen freien Calciumkonzentration. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Ade T, Zaucke F & Krug HF (1996). The structure of organometals determines cytotoxicity and alteration of calcium homeostasis in HL-60 cells. *Fres J Anal Chem*, 354: 609-614.
- Ade T, Zaucke F & Krug HF (1997). Organometals induce distinct changes in cytoplasmic  $Ca^{2+}$  followed by arachidonic acid liberation via  $PLA_2$  activation. *Cell Calcium*, eingereicht.
- Alajouanine T, Dérobert L & Thiéffry S (1958). Etude clinique d'ensemble de 210 cas d'intoxication par les sels organiques d'étain. *Rev Neurol*, 98: 85-96.
- Aldridge WN (1976). The influence of organotin compounds on mitochondrial functions. In: *Organotin compounds: New chemistry and applications* (Zuckerman JJ, ed). American Chemical Society, Washington DC, 186-196.
- Ali AA, Upreti RK & Kidwai AM (1987). Interaction of di- and tributyltin chloride with human erythrocyte membrane. *Toxicol Lett*, 38: 13-18.
- Alvarez E, Northwood IC, Gonzalez FA, Latour DA, Seth A, Abate C, Curran T & Davis RJ (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. *J Biol Chem*, 266: 15277-15285.
- Antonenko YN (1990). Electrically silent anion transport through bilayer lipid membrane induced by tributyltin and triethyllead. *J Membr Biol*, 113: 109-113.
- Aschner M & Aschner JL (1992). Cellular and molecular effects of trimethyltin and triethyltin: relevance to organotin neurotoxicity. *Neurosci Behav Rev*, 16: 427-435.
- Aw TY, Nicotera P, Manzo L & Orrenius S (1990). Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*, 283: 46-50.
- Balsinde J, Barbour SE, Bianco ID & Dennis EA (1994). Arachidonic acid mobilization in P388D<sub>1</sub> macrophages is controlled by two distinct  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11060-11064.
- Balsinde J & Dennis EA (1996). Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A<sub>2</sub> enzymes present in P388D<sub>1</sub> macrophages. *J Biol Chem*, 271: 6758-6765.
- Barry MA & Eastman A (1992). Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic  $Ca^{2+}$  and pH. *Biochem Biophys Res Comm*, 186: 782-789.
- Barry MA, Reynolds JE & Eastman A (1993). Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res*, 53: 2349-2357.
- Benito A, Grillot D, Nunez G & Fernandez-Luna JL (1995). Regulation and function of bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *Am J Pathol*, 146: 481-490.
- Bertrand R, Solary E, Jenkins J & Pommier Y (1993). Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I und II inhibitors. *Exp Cell Res*, 207: 388-397.
- Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J & Neckers LM (1996). Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res*, 56: 1851-1854.

- Blankenship LJ, Manning FC, Orenstein JM & Patierno SR (1994). Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 126: 75-83.
- Blenis J (1993). Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5889-5892.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911-917.
- Blumer KJ & Johnson GL (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biol Sci*, 19: 236-240.
- Blunden SJ & Chapman A (1986). Organotin compounds in the environment. In: *Organometallic compounds in the environment - principles and reactions* (Craig PJ, ed). Longman Group Ltd, Harlow/Essex, 111-159.
- Bøe R, Gjertsen BT, Vinternyr OK, Houge G, Lanotte M & Døskeland SO (1991). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res*, 195: 237-246.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV & Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85: 803-815.
- Bollo E, Ceppa L, Cornaglia E, Nebbia C, Biolatti B & Dacasto M (1996). Triphenyltin acetate toxicity: a biochemical and ultrastructural study on mouse thymocytes. *Human Exp Toxicol*, 15: 219-225.
- Bondy SC & Hall DL (1986). The relation of the neurotoxicity of organic tin and lead compounds to neurotubule disaggregation. *Neurotoxicology*, 7: 51-56.
- Bonser RW, Siegel MI, McConnell RT & Cuatrecasas P (1981). The appearance of phospholipase and cyclo-oxygenase activities in the human promyelocytic leukemia cell line HL60 during dimethyl sulfoxide-induced differentiation. *Biochem Biophys Res Comm*, 98: 614-620.
- Bonventre JV, Gronich JH & Nemenoff RA (1990). Epidermal growth factor enhances glomerular mesangial cell soluble phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J Biol Chem*, 265: 4934-4938.
- Bortner CD, Oldenburg NB & Cidlowski JA (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 5: 21-26.
- Boyer IJ (1989). Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, 55: 253-298.
- Bryan GW & Gibbs PE (1991). Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In: *Metal ecotoxicology: concepts and applications* (Newman MC & McIntosh AW, eds). Lewis Publishers, Boca Raton, 323-361.
- 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 UK*, 66: 611-640.
- Cantoni O, Boscoboinik D, Fiorani M, Stäubli B & Azzi A (1996). The phosphorylation state of MAP-kinases modulates the cytotoxic response of smooth muscle cells to hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 389: 285-288.
- Cavigelli M, Li W, Lin A, Su B, Yoshioka K & Karin M (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J*, 15: 6269-6279.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K & Black RA (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science*, 256: 97-100.

- Chang J, Musser JH & McGregor H (1987). Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation. *Biochem Pharmacol*, 36: 2429-2436.
- Chao TS, Byron KL, Lee KL, Villereal M & Rosner MR (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. *J Biol Chem*, 267: 19876-19883.
- Chao TS, Fosters DA, Rapp UR & Rosner MR (1994): Differential raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem*, 269: 7337-7341.
- Chen M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW & Weichselbaum RR (1995). Suppression of bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and ceramide. *Cancer Res*, 55: 991-994.
- Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ & Tan TH (1996). The role of c-jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and  $\gamma$  radiation. *J Biol Chem*, 271: 31929-31936.
- Chepenik KP, Diaz A & Jimenez SA (1994). Epidermal growth factor coordinately regulates the expression of prostaglandin G/H synthase and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> genes in embryonic mouse cells. *J Biol Chem*, 269: 21786-21792.
- Chow SC, Kass GE, McCabe MJ & 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: 143-149.
- Chow SC & Orrenius S (1994). Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immunotoxicant tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 127: 19-26.
- Cima F, Ballarin L, Bressa G, Martinucci G & Burighel P (1996). Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (*Styela plicata*; Tunicata). *Ecotoxicol Environ Saf*, 35: 174-182.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY & Knopf JL (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65: 1043-1051.
- Clark JD, Schievalla AR, Nalefski EA & Lin LL (1995). Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Lipid Mediators Cell Signalling*, 12: 83-117.
- Cochrane BJ, Irby RB & Snell TW (1991). Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp Biochem Physiol*, 98: 385-390.
- Cockerill D, Chang LW, Hough A & Bivins F (1987). Effects of trimethyltin on the mouse hippocampus and adrenal cortex. *J Toxicol Environ Health*, 22: 149-161.
- Cohen CA, Messing RB & Sparber SB (1987). Selective learning impairment of delayed reinforcement autoshaped behavior caused by low doses of trimethyltin. *Psychopharmacology*, 93: 301-307.
- Collins SJ (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, 70: 1233-1244.
- Collins SJ, Gallo RC & Gallagher RE (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic 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.
- Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA & Buttyan R (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 128: 169-181.
- Corsini E, Bruccoleri A, Marinovich M & Galli CL (1996). Endogenous interleukin-1 $\alpha$  is associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 138: 268-274.

- Cosulich S & Clarke P (1996). Apoptosis: does stress kill? *Curr Biol*, 6: 1586-1588.
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F & Green DR (1992a). The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res*, 12: 773-780.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM & Green DR (1992b). Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res*, 52: 997-1002.
- Craig PJ (1982). Environmental aspects of organometallic chemistry. In: *Comprehensive Organometallic Chemistry: The Synthesis, Reactions and Structure of Organometallic Compounds, Vol. 2* (Wilkinson G, Stone FG & Abel EW, eds). Pergamon Press, London, 979-1020.
- Currie S, Roberts EF, Spaethe SM, Roehm NW & Kramer RM (1994). Phosphorylation and activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in MCII mast cells mediated by high-affinity Fc receptor for IgE. *Biochem J*, 304: 923-928.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P & Traganos F (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13: 795-808.
- Davies IM & McKie JC (1987). Accumulation of total tin and tributyltin in muscle tissue of farmed Atlantic salmon. *Mar Pollut Bull*, 18: 405-407.
- Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezella F, Pierotti MA & Della Porta G (1992). Bcl-2 proto-oncogene in normal neoplastic human myeloid cells. *Blood*, 79: 1291-1298.
- Dennis EA (1987). Phospholipase A<sub>2</sub> mechanism: inhibition and role in arachidonic acid release. *Drug Dev Res*, 10: 205-220.
- Dennis EA (1997). The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biol Sci*, 22: 1-2.
- Dini L, Coppola S, Ruzittu MT & Ghibelli L (1996). Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp Cell Res* 223, 340-347.
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*, 1133: 275-285.
- Donard OF, Rapsomanikis S & Weber JH (1986). Speciation of inorganic tin and alkyltin compounds by atomic absorption spectrometry using electrothermal quartz furnace after hydride generation. *Anal Chem*, 58: 772-777.
- Drexler HC (1997). Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 855-860.
- Duke RC, Chervenak R & Cohen JJ (1983). Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 6361-6365.
- Durstin M, Durstin S, Molski TF, Becker EL & Sha'afi RI (1994). Cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub> translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 3142-3146.
- Earnshaw WC (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 337-343.
- Ema M, Itami T & Kawasaki H (1991). Behavioral effects of acute exposure to tributyltin chloride in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 13: 489-493.
- Ema M, Iwase T, Iwase Y, Ohyama N & Ogawa Y (1996). Change of embryonic susceptibility to di-*n*-butyltin dichloride in cultured rat embryos. *Arch Toxicol*, 70: 742-748.
- Enari M, Talanian RV, Wong WW & Nagata S (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 380: 723-276.

- Endresen PC, Prytz PS & Aarbakke J (1996). Cell cycle dependence of drug initiated apoptosis in HL-60 cells. *Int J Oncol*, 8: 91-96.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL & Henson PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148: 2207-2216.
- Fent K (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol*, 26: 1-117.
- Filippov A, Skatova G, Porotikov V, Kobrinsky E & Saxon M (1989).  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistic properties of phospholipase  $\text{A}_2$  inhibitors, mepacrine and chloroquine. *Gen Physiol Biophys*, 8: 113-118.
- Flati V, Haque SJ & Williams BR (1996). Interferon- $\alpha$ -induced phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase  $\text{A}_2$  is required for the formation of interferon-stimulated gene factor three. *EMBO J*, 15: 1566-1571.
- Frearson JA & Alexander DR (1996). Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol Today*, 8: 385-391.
- Froissart P, Unligil P, Aubry H & Proulx P (1989). Modulation by phorbol 12-myristate 13-acetate of arachidonic acid release from rat basophilic leukemia cells stimulated with A23187. *Biochim Biophys Acta*, 1002: 376-381.
- Galli CL, Viviani B & Marinovich M (1993). Cell cultures - a tool for the study of mechanisms of toxicity. *Toxicol In vitro*, 7: 559-568.
- Garland JM & Halestrap A (1997). Energy metabolism during apoptosis. *J Biol Chem*, 272: 4680-4688
- Gefahrstoffverordnung (1993). Anhänge I bis IV zur Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Gefahrstoffverordnung - GefStoffV) vom 26.10.1993 in der 2. Änderungsverordnung vom 19.9.1994. In: *Anlageband zum Bundesgesetzblatt*, Teil I, Nr. 57, 77-78.
- Gianguzza M, Dolcemascolo G, Mansueto C & Pellerito L (1996). Effects of tributyltin (IV) chloride exposure on larvae of *Ciona intestinalis* (Urochordata): An ultrastructural study. *Appl Organomet Chem*, 10: 405-413.
- Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL & Burt GR (1987). The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Ass UK*, 67: 507-523.
- Gielen M (1993). The in vitro antitumour activity of organotin compounds: present status and perspectives. In: *Frontiers of organogermanium, -tin and -lead chemistry*. (Lukevics E & Ignatovich L, eds). Riga, Latvia, 283-299.
- Gjertsen BT & Døskeland SO (1995). Protein phosphorylation in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1269: 187-199.
- Goldberg HJ, Viegas MM, Margolis BL, Schlessinger J & Skorecki KL (1990). The tyrosine kinase activity of the epidermal-growth-factor receptor is required for phospholipase  $\text{A}_2$  activation. *Biochem J*, 267: 461-465.
- Grant S, Freemerman AJ, Gregory PC, Martin HA, Turner AJ, Mikkelsen R, Chelliah J, Yanovich S & Jarvis WD (1995). Induction of apoptotic DNA fragmentation and *c-jun* downregulation in human myeloid leukemia cells by the permeant  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA/AM. *Oncol Res*, 7: 381-392.
- Gray BH, Porvaznik M, Flemming C & Lee LH (1987). Organotin-induced hemolysis, shape transformation and intramembranous aggregates in human erythrocytes. *Cell Biol Toxicol*, 3: 23-38.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q & Holbrook NJ (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *J Biol Chem*, 271: 4138-4142.

- Haldar S, Chintapalli J & Croce CM (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 56: 1253-1255.
- Haldar S, Jena N & Croce CM (1995). Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4507-4511.
- Halenda SP, Zavoico GB & Feinstein MB (1985). Phorbol esters and oleoyl acetoxy glycerol enhance release of arachidonic acid in platelets stimulated by  $Ca^{2+}$  ionophore A23187. *J Biol Chem*, 260: 12484-12491.
- Hamasaki T, Nagase H, Yoshioka Y & Sato T (1995). Formation, distribution, and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury, and arsenic in the environment. *Crit Rev Env Sci Tech*, 25: 45-91.
- Hamasaki T, Sato T, Nagase H & Kito H (1992). The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and rec-assay. *Mutation Res*, 280: 195-203.
- 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.
- Hasan MA & Juma HA (1992). Assessment of tributyltin in the marine environment of Bahrain. *Mar Pollut Bull*, 24: 408-410.
- Hecht D & Zick Y (1992). Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by  $H_2O_2$  and vanadate *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm*, 188: 773-779.
- Henkart PA (1996). ICE family proteases: mediators of all cell death? *Immunity*, 4: 195-201.
- Heywood BR, Molloy KC & Waterfield PC (1989). Organotin biocides XV: modelling the interactions of triorganotins with cell membranes. *Appl Organomet Chem*, 3: 443-450.
- Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL & Korsmeyer SJ (1993). bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75: 241-521.
- Hoeck WG, Ramesha CS, Chang DJ, Fan N & Heller RA (1993). Cytoplasmic phospholipase  $A_2$  activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4475-4479.
- Hornberger W & Patscheke H (1990). Primary stimuli of icosanoid release inhibit arachidonoyl-CoA synthetase and lysophospholipid acyltransferase. *Eur J Biochem*, 187: 175-181.
- Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P & Marshall CJ (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell*, 71: 335-342.
- Huang S, Maher VM & McCormick JJ (1995). Extracellular  $Ca^{2+}$  stimulates the activation of mitogen-activated protein kinase and cell growth in human fibroblasts. *Biochem J*, 310: 881-885.
- Ibrado MA, Huang Y, Fang G, Liu L & Bhalla K (1996). Overexpression of bcl-2 and bcl-x<sub>L</sub> inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*, 56: 4743-4748.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K & Gotoh Y (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275: 90-94.
- Ishimoto T, Arisato K, Akiba S & Sato T (1996). Requirement of calcium influx for hydrolytic action of membrane phospholipids by cytosolic phospholipase  $A_2$  rather than mitogen-activated protein kinase in FcεRI-stimulated rat peritoneal mast cells. *J Biochem*, 120: 1247-1252.
- Iwata H, Tanabe S, Mizuno T & Tatsukawa R (1997). Bioaccumulation of butyltin compounds in marine mammals: the specific tissue distribution and composition. *Appl Organomet Chem*, 11: 257-264.

- Jäättelä M, Benedict M, Tewari M, Shayman JA & Dixit VM (1995). Bcl-x and bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A<sub>2</sub> in breast carcinoma cells. *Oncogene*, 10: 2297-2305.
- Jacobson MD (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biol Sci*, 21: 83-86.
- Jensen KG, Andersen O & Rønne M (1991a). Organotin compounds induce aneuploidy in human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Mutation Res*, 246: 109-112.
- Jensen KG, Önfelt A, Wallin M, Lidums V & Andersen O (1991b). Effects of organotin compounds on mitosis, spindle structure, toxicity and *in vitro* microtubule assembly. *Mutagenesis*, 6: 409-416.
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S & Smith MT (1982). Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science*, 217: 1257-1259.
- Johnson NL, Gardner AM, Diener KM, Lange-Carter CA, Gleavy J, Jarpe MB, Minden A, Karin M, Zon LI & Johnson GL (1996). Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J Biol Chem*, 271: 3229-3237.
- Kaever V, Goppelt-Strübe M & Resch K (1988). Enhancement of eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages by the organic mercury compound thimerosal. *Prostaglandins*, 35: 885-902.
- Käfer A & Krug HF (1994). Effects of organometals on cellular signaling. I. Influence of metabolic inhibitors on metal-induced arachidonic acid liberation. *Environ Health Perspect*, 102: 325-330.
- Käfer A & Krug HF (1997). The effect of organometals on cellular shape and cell cycle. *Main Group Met Chem*, 20: 17-23.
- Käfer A, Zöltzer H & Krug HF (1992). The stimulation of arachidonic acid metabolism by organic lead and tin compounds in human HL-60 leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 116: 125-132.
- Kaiser N & Edelman IS (1977). Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 638-642.
- Kasid U, Suy S, Dent P, Ray S, Whiteside TL & Sturgill TW (1996). Activation of Raf by ionizing radiation. *Nature*, 382: 813-816.
- Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S & Chow SC (1996). Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J*, 318: 749-752.
- Kast R, Fürstenberger G & Marks F (1993). Activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by transforming growth factor- $\alpha$  in HEL-30 keratinocytes. *J Biol Chem*, 268: 16795-16802.
- Kaufmann SH (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res*, 49: 5870-5878.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE & Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker in chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53: 3976-3985.
- Kauppinen RA, Komulainen H & Taipale HT (1988). Chloride-dependent uncoupling of oxidative phosphorylation by triethyllead and triethyltin increases cytosolic free calcium in guinea pig cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem*, 51: 1617-1625.
- Kerr JF & Harmon BV (1991). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Tomei LD & Cope FO, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 5-29.
- Kerr JF (1995). Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol*, 5: 55-57.

- Kim IK, Lee JH, Sohn HW, Kim HS & Kim SH (1993). Prostaglandin A<sub>2</sub> and Δ<sup>12</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Lett*, 321: 209-214.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR & Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275: 1132-1136
- 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: 5314-5325.
- Kobayashi H, Suzuki T, Sato I & Matsusaka N (1994). Neurotoxicological aspects of organotin and lead compounds on cellular and molecular mechanisms. *Toxicol Ecotoxicol News*, 1: 23-30.
- Kodavanti PR, Cameron JA, Yallapragada PR, Vig PJ & Desai D (1991). Inhibition of Ca<sup>2+</sup> transport associated with cAMP-dependent protein phosphorylation in rat cardiac sarcoplasmic reticulum by triorganotins. *Arch Toxicol*, 65: 311-317.
- Korystov YN, Dobrovinskaya OR, Shaposhnikova VV & Eidus LK (1996). Role of arachidonic acid metabolism in thymocyte apoptosis after irradiation. *FEBS Lett*, 388: 238-241.
- Krajnc EI, Wester PW, Loeber JG, van Leeuwen FX, Vos JG, Vassen HA & van der Heijden CA (1984). Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. *Toxicol Appl Pharmacol*, 75: 363-386.
- Kramer RM, Roberts EF, Manetta JV, Hyslop PA & Jakubowski JA (1993). Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in human platelets. *J Biol Chem*, 268: 26796-26804.
- Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ & Jakubowski JA (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) in thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem*, 271: 27723-27729.
- Krug HF (1992). The toxic effects of organometals on the Lands cycle in HL-60 cells. *Appl Organomet Chem*, 6: 297-304.
- Krug HF & Berndt J (1987). Stimulation of arachidonic acid metabolism via phospholipase A<sub>2</sub> by triethyl lead. *Eur J Biochem*, 162: 293-298.
- Krug HF & Culig H (1991). Directed shift of fatty acids from phospholipids to triacylglycerols in HL-60 cells induced by nanomolar concentrations of triethyl lead chloride: involvement of a pertussis toxin-sensitive pathway. *Mol Pharmacol*, 39: 511-516.
- Krug HF, Ade T, Zaucke F & Zöltzer H (1996). Calcium as a mediator and/or amplifier of organometal toxicity. In: *Metal Ions in Biology and Medicine* (Collery P, Corbella J, Domingo JL, Etienne JC & Llobet JM, eds). John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 275-277.
- Krug HF, Käfer A & Dieterich H (1993). The biochemical mechanisms of cellular toxicity of organolead and -tin compounds. In: *Frontiers of organogermanium, -tin and -lead chemistry*. (Lukevics E & Ignatovich L, eds). Riga, Latvia, 273-281.
- Krump E, Pouliot M, Naccache PH & Borgeat P (1995). Leukotriene synthesis in calcium-depleted human neutrophils: arachidonic acid release correlates with calcium influx. *Biochem J*, 310: 681-688.
- Kumar S (1997). The bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CED-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? *Cell Death Differ*, 4: 2-3.
- Kunimoto M (1994). Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm*, 204: 310-317.
- Kypta RM, Hemming A & Courtneidge SA (1988). Identification and characterization of p59<sup>fyn</sup> (a src-like protein kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J*, 7: 3837-3844.

- Kyriakis JM & Avruch J (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays*, 18: 567-577.
- Kyriakis JM, App H, Zhang X, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR & Avruch J (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358: 417-421.
- Laemmli U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lands WE (1979). Selective recognition of geometric and positional isomers of fatty acids *in vitro* and *in vivo*. In: *Geometrical and positional fatty acid isomers* (Emken EA & Dutton HJ, eds). American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, 181-212.
- Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG & Earnshaw WC (1993). Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol*, 123: 7-22.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG & Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371: 346-347.
- Lennon SV, Kilfeather SA, Hallett MB, Campbell AK & Cotter TG (1992). Elevations in cytosolic free  $Ca^{2+}$  are not required to trigger apoptosis in human leukaemia cells. *Clin Exp Immunol*, 87: 465-471.
- Lennon SV, Martin SJ & Cotter TG (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif*, 24: 203-214.
- Levee MG, Dabrowska MI, Lelli JL & Hinshaw DB (1996). Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am J Physiol*, 271: C1981-C1992.
- Lin LL, Lin AY & DeWitt DL (1992a). Interleukin- $1\alpha$  induces the accumulation of cytosolic phospholipase  $A_2$  and the release of prostaglandin  $E_2$  in human fibroblasts. *J Biol Chem*, 267: 23451-23454.
- Lin LL, Lin AY & Knopf JL (1992b). Cytosolic phospholipase  $A_2$  is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 6147-6151.
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A & Davis RJ (1993). cPLA $_2$  is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, 72: 269-278.
- Liu P, Wen M, Sun L & Hayashi J (1993). Activation of phospholipase  $A_2$  and stimulation of prostaglandin  $E_2$  production by transforming growth factor- $\alpha$  in rat thymic epithelial cells requires influx of calcium. *Biochem J*, 293: 109-113.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV & Karin M (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- $\kappa$ B activation prevents cell death. *Cell*, 87: 565-575.
- Lockshin RA & Beaulaton J (1981). Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J*, 13: 659-666.
- Lowry OH, Rosebrough IN, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- MacEwan DJ (1996). Elevated cPLA $_2$  levels as a mechanism by which the p70 TNF and p75 NGF receptors enhance apoptosis. *FEBS Lett*, 379: 77-81.
- Macfarlane DE (1981). The effects of methyl mercury on platelets. Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Mol Pharmacol*, 19: 470-476.
- Madiehe AM, Mampuru LJ & Tyobeka EM (1995). Induction of apoptosis in HL-60 cells by lithium. *Biochem Biophys Res Comm*, 209: 768-774.
- Maguire RJ (1987). Environmental aspects of tributyltin. *Appl Organomet Chem*, 1: 475-498.

- Maguire RJ, Tkacz RJ, Chau YK, Bengert GA & Wong PT (1986). Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada. *Chemosphere*, 15: 253-274.
- Maier WE & Costa LC (1990).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in rat brain and erythrocytes as a possible target and marker, respectively, for neurotoxicity: studies with chlordecone, organotins and mercury compounds. *Toxicol Lett*, 51: 175-188.
- Marinovich M, Sanghvi A, Colli S, Tremoli E & Galli CL (1990). Cytoskeletal modifications induced by organotin compounds in human neutrophils. *Toxicol In vitro*, 4: 109-113.
- Marinovich M, Viviani B, Corsini E, Ghilardi F & Galli CL (1996). NF- $\kappa$ B activation by triphenyltin triggers apoptosis. *Exp Cell Res*, 226: 98-104.
- Martin SJ, Bradley JG & Cotter TG (1990). HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol*, 79: 448-453.
- Martin SJ, Mazdai G, Strain JJ, Cotter TG & Hannigan BM (1991). Programmed cell death (apoptosis) in lymphoid and myeloid cell lines during zinc deficiency. *Clin Exp Immunol*, 83: 338-343.
- Martins LM & Earnshaw WC (1997). Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biol*, 7: 111-114.
- Mashima T, Naito M, Kataoka S, Kawai H & Tsuruo T (1995). Aspartate-based inhibitor of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme prevents antitumor agent-induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 209: 907-915.
- Matsubara K, Kubota M, Adachi S, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Akiyama Y & Mikawa H (1994). Different mode of cell death induced by calcium ionophore in human leukemia cell lines: possible role of constitutive endonuclease. *Exp Cell Res*, 210: 19-25.
- Matsuoka M & Igiu H (1996). Induction of c-fos expression by tributyltin in PC12 cells: involvement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Environ Toxicol Pharmacol*, 2: 373-380.
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS & Evan GI (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the bcl-2 homologue bak. *J Cell Biol*, 136: 215-227.
- McConkey DJ & Orrenius S (1994). Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol*, 4: 370-375.
- McConkey DJ & Orrenius S (1996). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukocyte Biol*, 59: 775-783.
- Middleton MC (1982). Early metabolic changes in rat epidermis and dermis following cutaneous application of irritant doses of tributyltin. *J Invest Dermatol*, 79: 163-166.
- Morrison DK & Cutler RE (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 174-179.
- Musmeci T, Madonia G, Lo Giudice T, Silvestri A, Ruisi G & Barbieri R (1992). Interactions of organotins with biological systems. *Appl Organomet Chem*, 6: 127-138.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME & Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85: 817-827.
- Nahas N, Waterman WH & Sha'afi RI (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) promotes phosphorylation and an increase in the activity of cytosolic phospholipase  $\text{A}_2$  in human neutrophils. *Biochem J*, 313: 503-508.

- Nakamura T, Lin LL, Kharbanda S, Knopf J & Kufe D (1992). Macrophage colony stimulating factor activates phosphatidylcholine hydrolysis by cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub>. *EMBO J*, 11: 4917-4922.
- Naumovski L & Cleary ML (1994). Bcl-2 inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood*, 83: 2261-2267.
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Johnson GL & Heasley LE (1993). Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A<sub>2</sub> by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem*, 268: 1960-1964.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL & Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37-43.
- Nicotera P & Rossi AD (1994). Nuclear Ca<sup>2+</sup>: physiological regulation and role in apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 135: 89-98.
- Nicotera P, Dypbukt JM, Rossi AD, Manzo L & Orrenius S (1992). Thiol modification and cell signalling in chemical toxicity. *Toxicol Lett*, 64/65: 563-567.
- Nishizuka Y (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258: 607-614.
- O'Brien (1963). The effect of the alkyl tins on platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh*, 9: 330-334.
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E & Markert B (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebria aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci Total Environ*, 188: 205-223.
- Orrenius S (1995). Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. *J Intern Med*, 237: 529-536.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G & Nicotera P (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci*, 10: 281-285.
- Osborne BA & Schwartz LM (1994). Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol*, 4: 394-399.
- Peitsch MC, Mannherz HG & Tschopp J (1994). The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol*, 4: 37-41.
- Pelikan Z & Cerný E (1969). Toxic effects of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) on the skin of rats. *Berufsdermatosen*, 17: 305-316.
- Pellicciari C, Bottone MG, Schaack V, Manfredi AA & Barni S (1996). Etoposide at different concentrations may open different apoptotic pathways in thymocytes. *Eur J Histochem*, 40: 289-298.
- Penninks AH (1993). The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide. *Food Addit Contam*, 10: 351-361.
- Piomelli D & Greengard P (1990). Lipoxigenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 583-592.
- Powers MF & Beavis AD (1991). Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. *J Biol Chem*, 266: 17250-17256.
- Qiu ZH & Leslie CC (1994). Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 269: 19480-19487.

- Radler-Pohl A, Sachsenmaier C, Gebel S, Auer HP, Bruder JT, Rapp U, Angel P, Rahmsdorf HJ & Herrlich P (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J*, 12: 1005-1012.
- Raffray M & Cohen GM (1991). Bis(tri-*n*-butyltin)oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. *Arch Toxicol*, 65: 135-139.
- Raffray M & Cohen GM (1993). Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy *in vivo*. *Arch Toxicol*, 67: 231-236.
- Raffray M, McCarthy D, Snowden R & Cohen GM (1993). Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 119: 122-130.
- Ramesha CS & Ives DL (1993). Detection of arachidonoyl-selective phospholipase A<sub>2</sub> in human neutrophil cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1168: 37-44.
- Rao GN (1996). Hydrogen peroxide induce complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*, 13: 713-719.
- Rao GN, Baas AS, Glasgow WC, Eling TE, Runge MS & Alexander RW (1994). Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 269: 32586-32591.
- Rao L, Perez D & White E (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, 135: 1441-1455.
- Rapp UR (1991). Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. *Oncogene*, 6: 495-500.
- Ratter F, Germer M, Fischbach T, Schulze-Osthoff K, Peter ME, Dröge W, Krammer PH & Lehmann V (1996). S-Adenosylhomocysteine as a physiological modulator of Apo-1-mediated apoptosis. *Int Immunol*, 8: 1139-1147.
- Reader S, Marion M & Denizeau F (1993). Flow cytometric analysis of the effects of tri-*n*-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. *Toxicology*, 80: 117-129.
- Reader S, Steen HB & Denizeau F (1994). Intracellular calcium and pH alterations induced by tri-*n*-butyltin chloride in isolated rainbow trout hepatocytes: a flow cytometric analysis. *Arch Biochem Biophys*, 312: 407-413.
- Rehfeldt W, Resch K & Goppelt-Struebe M (1993). Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane association. *Biochem J*, 293: 255-261.
- Reuhl KR, Gilbert SG, Mackenzie BA, Mallett JE & Rice DC (1985). Acute trimethyltin intoxication in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 79: 436-452.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A & Franceschi C (1996). Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*, 378: 107-110.
- Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberté F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D & Street IP (1994). Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub>, blocks production of arachidonic and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biol Chem*, 269: 15619-15624.
- Robinson MJ & Cobb MH (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 180-186.

- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ & Greenberg ME (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of ras. *Neuron*, 12: 1207-1221.
- Sa G, Murugesan G, Jaye M, Ivashchenko Y & Fox PL (1995). Activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *J Biol Chem*, 270: 2360-2366.
- Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P & Rahmsdorf HJ (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, 78: 963-972.
- Saxena AK (1987). Organotin compounds: toxicology and biomedical applications. *Appl Organomet Chem*, 1: 39-56.
- Schalkwijk CG, Spaargaren M, Defize LHK, Verkleij AJ, van den Bosch H & Boonstra J (1995). Epidermal growth factor (EGF) induces serine phosphorylation-dependent activation and calcium-dependent translocation of the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Eur J Biochem*, 231: 593-601.
- Schwartz LM & Milligan CE (1996) Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *Trends Neurosci*, 19: 555-562.
- Schweinfurth H & Gunzel (1987). Zitiert nach Fent K (1996).
- Seimiya H, Mashima T, Toho M & Tsuruo T (1997). c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272: 4631-4636.
- Seinen W, Vos JG, van Spanje I, Snoek M, Brands R & Hooykaas H (1977). Toxicity of organotin compounds. II. Comparative *in vivo* and *in vitro* studies with various organotin and organolead compounds in different animal species with special emphasis on lymphocyte cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 42: 197-212.
- Seligman PF, Grovhoug JG, Valkirs AO, Stang PM, Fransham R, Stallard MO, Davidson B & Lee RF (1989). Distribution and fate of tributyltin in the United States marine environment. *Appl Organomet Chem*, 3: 31-47.
- Selwyn MJ (1976). Triorganotins as ionophors and inhibitors of ion translocating ATPases. In: *Organotin compounds: New chemistry and applications* (Zuckerman JJ, ed). American Chemical Society, Washington DC, 204-226.
- Shaposhnikova VV, Dobrovinskaya OR, Eidus LK & Korystov YN (1994). Dependence of thymocyte apoptosis on protein kinase C and phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Lett*, 348: 317-319.
- Sharp JD, White DL, Chiou XG, Goodson T, Gamboa GC, McClure D, Burgett S, Hoskins JA, Skatrud PL, Sportsman JR, Becker GW, Kang LH, Roberts EF & Kramer RM (1991). Molecular cloning and expression of human Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 266: 14850-14853.
- Short JW & Thrower FP (1987). Toxicity of tri-*n*-butyl-tin to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, adapted to seawater. *Aquaculture*, 61: 193-199.
- Smialowicz RJ, Riddle MM, Luebecke RW & Copeland CB (1989). Immunotoxicity of tributyltin oxide in rats exposed as adults or pre-weanlings. *Toxicology*, 57: 97-111.
- Smith BS (1971). Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proc Malac Soc Lond*, 39: 377-378.
- Snoeiij NJ, Punt PM, Penninks AH & Seinen W (1986a). 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: 234-243.

- Snoeij NJ, van Rooijen, Penninks AH & Seinen W (1986b). Effects of various inhibitors of oxidative phosphorylation on energy metabolism, macromolecular synthesis and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes. A regulating role for the cellular energy state in macromolecular synthesis and cyclic AMP production. *Biochim Biophys Acta*, 852: 244-253.
- Stevenson MA, Pullock SS, Coleman CN & Calderwood SK (1994). X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*, 54: 12-15.
- Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH & Cory S (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J*, 14: 6136-6147.
- Sunderman FW (1995). The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci*, 25: 134-142.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M & Kroemer G (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic factor. *J Exp Med*, 184: 1331-1341.
- Takahashi A & Earnshaw WC (1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Gen Develop*, 6: 50-55.
- Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann Sh & Earnshaw WC (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 $\alpha$  but not CPP32: multiple interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8395-8400.
- Tanaka Y, Yoshihara K, Itaya A, Kamiya T & Koide SS (1984). Mechanism of the inhibition of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J Biol Chem*, 259: 6579-6585.
- Tang DG, Chen YQ & Honn KV (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5241-5246.
- Tas JW, Keizer A & Opperhuizen A (1996). Bioaccumulation and lethal body burden of four triorganotin compounds. *Bull Environ Contam Toxicol*, 57: 146-154.
- Terui Y, Furukawa Y, Kikuchi J & Saito M (1995). Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle. *J Cell Physiol*, 164: 74-84.
- Ueha T, Oyama Y & Tomiyoshi F (1996). Cytotoxic action of tri-n-butyltin on dissociated rat cerebellar neurones: a flow-cytometric study. *Pharmacol Toxicol*, 78: 404-408.
- Ulich TR, Busser K & Longmuir KJ (1990). Cytokine- and calcium ionophore A23187-mediated arachidonic acid metabolism in neutrophils. *Cytokine*, 2: 280-286.
- Viviani B, Rossi AD, Chow SC & Nicotera P (1995). Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology*, 16: 19-26.
- Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, Yoshida T, Kuroiwa Y & Nakaya K (1996). The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J Biol Chem*, 271: 14067-14073.
- Waterman WH & Sha'afi RI (1995). A mitogen-activated protein kinase independent pathway involved in the phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in human neutrophils stimulated with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Comm*, 209: 271-278.
- Waterman WH, Molski TF, Huang CK, Adams JL & Sha'afi RI (1996). Tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> are abrogated by an inhibitor of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils. *Biochem J*, 319: 17-20.

- Wijermans PW, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Imandt LM, de Waal FC & Langenhuijsen MM (1987). Quantitative enzyme determination: a parameter for leukemic cell differentiation. *Leukemia Res*, 11: 641-648.
- Winkler JD, Sung CM, Hubbard WC & Chilton FH (1993). Influence of arachidonic acid on indices of phospholipase A<sub>2</sub> activity in the human neutrophil. *Biochem J*, 291: 825-831.
- Wolf CM, Morana SJ & Eastman A (1997) Zinc inhibits apoptosis upstream of ICE/CED-3 proteases rather than at the level of an endonuclease. *Cell Death Differ*, 4: 125-129.
- Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 555-556
- Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68: 251-306.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ & Greenberg ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270: 1326-1331.
- Xing M & Mattera R (1992). Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase A<sub>2</sub> by G-proteins and Ca<sup>2+</sup> in HL60 granulocytes. *J Biol Chem*, 267: 25966-25975.
- Xu XX, Rock CO, Qiu ZH, Leslie CC & Jackowski S (1994). Regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> phosphorylation and eicosanoid production by colony-stimulating factor 1. *J Biol Chem*, 269: 31693-31700.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP & Wang X (1997). Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275: 1129-1132.
- Yonemoto J, Shiraiishi H & Soma Y (1993). In vitro assessment of teratogenic potential of organotin compounds using rat embryo limb bud cells. *Toxicol Lett*, 66: 183-191.
- Yoshizuka M, Hara K, Haramaki N, Yokoyama M, Mori N, Doi Y, Kawahara A & Fujimoto S (1992). Studies on the hepatotoxicity induced by bis-(tributyltin)-oxide. *Arch Toxicol* 66, 182-187.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssière JL, Petit X & Kroemer G (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*, 181: 1661-1672.
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M & Kroemer G (1996). Mitochondrial control of apoptosis. *J Exp Med*, 183: 1533-1544.
- Zanella CL, Posada J, Tritton TR & Mossman BT (1996). Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 56: 5334-5338.
- Zaucke F (1993). Struktur-Wirkungs-Beziehungen trialkylierter Zinnverbindungen bei der Toxizität und ihren biochemischen Wirkungen in HL-60 Zellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Zaucke F & Krug HF (1996a). Induction of protein kinase signalling cascade by organometals in human HL-60 granulocytes. *Eur J Cell Biol*, 69: 114.
- Zaucke F & Krug HF (1996b). Induction of the MAP kinase cascade by organometal compounds. In: *Metal Ions in Biology and Medicine* (Collery P, Corbella J, Domingo JL, Etienne JC & Llobet JM, eds). John Libbey Eurotext, Montrouge, France, 107-109.
- Zaucke F & Krug HF (1997). Induction of apoptosis in human HL-60 granulocytes by the organic tin compound tri-*n*-butyltin (TBT). *Eur J Cell Biol*, 72: 145.
- Zaucke F, Zöltzer H & Krug HF (1995). Cell damage and apoptosis induced by organometals. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 376: S170.

## Literatur

---

- Zawia NH & Harry GJ (1993). Trimethyltin-induced c-fos expression: adolescent vs neonatal rat hippocampus. *Toxicol Appl Pharmacol*, 121: 99-102.
- Zazueta C, Reyes-Vivas H, Bravo C, Pichardo J, Corona N & Chávez E (1994). Triphenyltin as inductor of mitochondrial membrane permeability transition. *J Bioenerg Biomembr*, 26: 457-462.
- Zhang H & Liu AY (1992). Tributyltin is a potent inducer of the heat shock response in human fibroblasts. *J Cell Physiol*, 153: 460-466.