

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6369

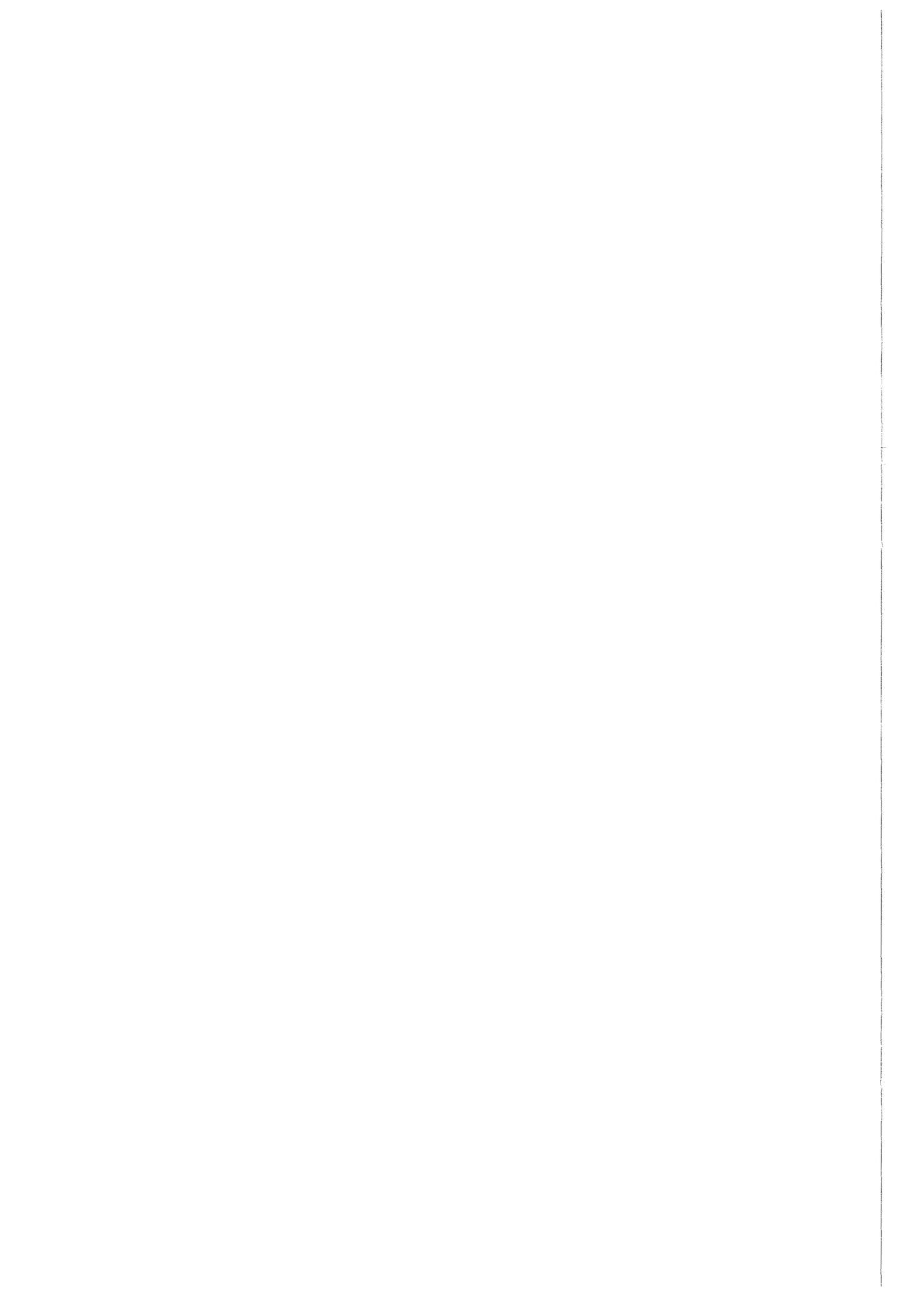
**Alkylphosphocholine –
eine neue Klasse von
Antitumormitteln:**

**Untersuchungen zum biochemischen
Wirkungsmechanismus**

A. Matzke

Institut für Toxikologie und Genetik

Oktober 1999



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6369

**Alkylphosphocholine -
eine neue Klasse von Antitumormitteln:
Untersuchungen zum biochemischen Wirkungsmechanismus***

Astrid Matzke

Institut für Toxikologie und Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1999

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

Alkylphosphocholine (APC) repräsentieren eine neue Klasse von Antitumormitteln. Einige Vertreter dieser Substanzgruppe (z.B. Hexadecylphosphocholin, HePC) werden bereits in der Tumorthherapie eingesetzt. Über den molekularen Mechanismus der antikanzerogenen Eigenschaften der APC ist allerdings noch nicht viel bekannt. Da eine systemische Applikation des HePC wegen hoher Nebenwirkungen nicht möglich ist, wurden **neue** APC als Derivate des HePC mit dem Ziel synthetisiert, Substanzen mit geringeren Nebenwirkungen bei gleichbleibender antineoplastischer Aktivität zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von acht der neuen APC an *in vitro* Zellsystemen humaner Tumorzelllinien untersucht. Bei Toxizitätsstudien in HL-60 Leukämiezellen zeigten drei der neuen APC-Verbindungen im Vergleich zu HePC eine erhöhte Wirksamkeit. Die aktivste Verbindung war R-1-*O*-Phosphocholin-2-*N*-acetyloctadecan (R-N-acetyl), mit der weitere Untersuchungen zum biochemischen Wirkungsmechanismus durchgeführt wurden.

R-N-acetyl wurde abhängig vom Serumgehalt des Kulturmediums langsam von Tumorzellen aufgenommen. R-N-acetyl war metabolisch stabil und konnte nur in geringem Maß von den Zellen abgebaut werden.

Die Effekte der APC auf die intrazelluläre Signaltransduktion wurden näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß APC die Ras/MAP Kinase Kaskade über einen G-Protein gekoppelten Mechanismus aktivieren. In der humanen Mammakarzinom Zelllinie MDA-MB-468 wurde eine Beteiligung des EGF Rezeptors an der APC-induzierten Aktivierung der MAP Kinase ERK gefunden. Zudem induzierten APC konzentrationsabhängig eine rezeptorvermittelte, transiente Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration.

Anschließend wurden Untersuchungen zum programmierten Zelltod durchgeführt. Die Fehlregulation der Apoptose ist charakteristisch für Tumorzellen. Daher sind für die Tumorthherapie Substanzen interessant, die den Zelltod selektiv auslösen und so diesen Defekt kompensieren können.

Mit verschiedenen mikroskopischen und biochemischen Techniken konnte klar gezeigt werden, daß der zytotoxische Effekt der APC *in vitro* auf Apoptose zurückzuführen ist. Die durch APC induzierten apoptotischen Vorgänge waren erst nach Ablauf einiger Stunden meßbar. Die Apoptoseinduktion durch APC war vom untersuchten Zelltyp unabhängig.

Die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen ist verantwortlich für die spezifischen Abbauprozesse nach Inkubation mit APC. Der Beweis hierfür wurde durch Vorbehandlung mit verschiedenen Caspase-Inhibitoren erbracht. Dies führte zur Aufhebung der APC-induzierten Effekte auf allen Ebenen. Abhängig vom Zelltyp konnte durch Überexpression von Bcl-2 die APC-induzierte Apoptose verhindert werden.

Der Todesrezeptor CD95 (Fas/APO-1) konnte als regulatorisches Element identifiziert werden, das ein Ziel der synthetischen Lipide an der Plasmamembran darstellt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der APC öffnen einen neuen Weg für die Synthese von 'maßgeschneiderten' APC für den Einsatz in der Tumorthherapie

Abstract

Alkylphosphocholines - a new class of anticancer drugs: Investigations on the molecular mode of action.

Alkylphosphocholines (APC) represent a new class of anticancer drugs. Although some compounds of this group are already used for tumor therapy (e.g. hexadecylphosphocholine, HePC), not much is known about their molecular mechanisms of anticancerogenic action. HePC is approved for topical treatment of skin metastases of breast cancer, but systemic application is not possible due to gastro-intestinal side effects. Therefore, **new** APC compounds were synthesized with the aim to reduce the side effects of HePC while preserving the antineoplastic activities.

In the present study, the toxic effects of eight new APC compounds on in vitro cell culture systems of human tumor cells were investigated. Three of the new APC showed higher toxic potency than HePC towards HL-60 leukemia cells. The most active compound was R-1-*O*-phosphocholine-2-*N*-acetyl-octadecane (R-N-acetyl), with which further studies were mainly carried out.

The uptake of R-N-acetyl by tumor cells was slow and dependent on the content of foetal calf serum in the culture media. R-N-acetyl was metabolically stable and degradation was only marginal.

The effect of APC on intracellular signal transduction was further specified. It was demonstrated that APC activate the Ras/MAP kinase cascade via a G-protein coupled mechanism. The EGF-receptor was engaged in the activation of the MAP kinase ERK in MDA-MB-468 mammary carcinoma cells. Furthermore, APC induced concentration-dependent a short, transient and receptor-mediated rise in cytosolic free calcium.

In the second part of the thesis, the APC-induced programmed cell death was investigated. Deregulation of apoptosis is characteristic for tumor cells. Agents which compensate for this defect and which are able to selectively induce apoptotic cell death of tumor cells are of great interest for tumor therapy. Using different microscopical and biochemical techniques, cell death was identified unequivocally as apoptosis. After treatment with APC, apoptosis was induced within several hours and was 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 APC. This was demonstrated by pretreatment with specific caspase inhibitors which led to an inhibition of APC-induced effects and to the rescue from apoptotic cell death. Furthermore, overexpression of the anti-apoptotic protein bcl-2 was a protection from APC induced cell death dependent on the cell system.

The death receptor CD95 (Fas/APO-1) could be identified as a regulatory element in APC-induced apoptosis, which represents a possible target for APC at the plasma membrane. The new alkylphosphocholine compounds can now be optimized for their capacities to activate CD95 and for the application for tumor therapy.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	3
2.1	Alkylphosphocholine: eine neue Klasse von Antitumormitteln	3
2.2	Antitumorale Wirkung der APC	4
2.3	Effekte der APC auf zellulärer Ebene.....	5
2.4	Synthese neuer APC-Verbindungen	5
2.5	Apoptose	8
2.6	Apoptose und Krebs.....	11
2.7	Zielsetzung der Arbeit.....	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Chemikalien	14
3.2	Zellkulturen.....	15
3.2.1	HL-60 Zellen.....	16
3.2.2	Differenzierung von HL-60 Zellen	16
3.2.3	BJAB Zellen.....	17
3.2.4	MDA-MB-468 Zellen	17
3.2.5	Jurkat T Zellen	18
3.2.6	SKW6 Zellen	18
3.2.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	19
3.2.8	Bestimmung der Zellzahl.....	19
3.2.9	Vitalitätstest	19
3.3	Färbungen	20
3.3.1	Färbung mit DAPI für die Fluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer	20
3.3.2	Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342).....	20
3.3.3	Annexin-V-Fluos Färbung apoptotischer Zellen	20
3.4	Elektronenmikroskopie	20
3.4.1	Transmissionselektronenmikroskopie.....	20
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	21
3.5	Proteinanalytik	22
3.5.1	Proteinbestimmung	22
3.5.2	Herstellung von Ganzzellextrakten.....	22
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.5.4	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (Western Blotting).....	23
3.6	Ras-Aktivitätstest.....	24
3.6.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	25
3.6.2	Transformation kompetenter Bakterien	25
3.6.3	Expression von GST-RBD in <i>E.coli</i>	26

3.6.4	Ras-Assay: Bindung von Ras-GTP an GST-RBD	26
3.7	Immunpräzipitation	26
3.8	Isolierung und Agarosegelelektrophorese apoptotischer DNA Fragmente.....	27
3.9	Untersuchungen zu Aufnahme und Metabolismus von R-N-acetyl.....	28
3.9.1	Extraktion zellulärer Lipide.....	28
3.9.2	Dünnschichtchromatographie.....	28
3.9.3	Kupfersulfat-Färbung der Dünnschichtplatten.....	28
3.9.4	Autoradiographie.....	29
3.9.5	Aufnahmekinetiken mit ¹⁴ C-R-N-acetyl	29
3.10	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	29
3.11	Immunfluoreszenz-Nachweis des Rezeptorcappings des CD95 Rezeptors	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Beeinflussung des Wachstums von HL-60 Zellen durch Alkylphosphocholine.....	31
4.1.1	Wachstumskurven von HL-60 Zellen in Gegenwart von Alkylphosphocholin- Verbindungen.....	31
4.1.2	Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	33
4.2	Aufnahme von APC in die Zelle	34
4.3	Untersuchungen zum Metabolismus von R-N-acetyl in HL-60 Zellen	36
4.4	Untersuchungen zur APC-induzierten zellulären Signaltransduktion.....	39
4.4.1	APC aktivieren die MAP Kinasen ERK1/2	39
4.4.2	Effekt von Pertussis Toxin auf die APC-induzierte ERK Aktivierung.....	42
4.4.3	Aktivierung von p21 Ras.....	43
4.4.4	ERK Aktivierung in MDA-MB-468 Zellen	43
4.4.5	Tyrosinphosphorylierungen durch R-N-acetyl in MDA-MB-468 Zellen	44
4.4.6	Untersuchung zur Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch APC ..	45
4.4.7	Untersuchungen zur Aktivierung der Streßkinasen c-Jun NH ₂ -terminale Kinase und p38 Kinase.....	47
4.4.8	Einfluß der APC auf die intrazelluläre freie Calciumkonzentration	51
4.5	Untersuchungen zur Alkylphosphocholin-induzierten Apoptose	53
4.5.1	Lichtmikroskopische Beobachtungen	53
4.5.2	Elektronenmikroskopische Beobachtungen	54
4.5.3	Kernfärbungen mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)	58
4.5.4	Bildung eines Prä-G ₁ Peaks während der APC-induzierten Apoptose	58
4.5.5	Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie während der APC-Behandlung	61
4.5.6	Induktion der DNA-Fragmentierung durch Alkylphosphocholine	64
4.5.7	Proteolytische Prozesse während der APC-induzierten Apoptose.....	66
4.5.8	Induktion von Apoptose durch Alkylphosphocholine ist ein Zelltyp-unabhängiges Wirkungsprinzip.....	67
4.6	Die Rolle der Caspasen bei der APC-induzierten Apoptose	68

4.6.1	Aktivierung von Caspasen während der APC-induzierten Apoptose.....	69
4.6.2	Effekt der Caspase-Inhibitoren zVADfmk und zD-DCB auf die APC-induzierte Apoptose.....	70
4.6.3	Die Expression des Virustoxin CrmA inhibiert R-N-acetyl induzierte Apoptose	71
4.7	Die Rolle des Bcl-2 Proteins bei der APC-induzierten Apoptose	72
4.8	Beteiligung von CD95 an der APC-induzierten Apoptose	75
4.8.1	Hemmung der APC-induzierten Apoptose in FADD dominant negativen BJAB Zellen	76
4.8.2	APC induzieren ein <i>capping</i> des CD95 Rezeptors	78
5	Diskussion	80
5.1	Toxizität der neuen APC.....	80
5.2	Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴ C-R-N-acetyl	82
5.3	Einfluß von R-N-acetyl auf die intrazelluläre Signaltransduktion	84
5.3.1	Untersuchungen zur Aktivierung der ERK MAP Kinase Kaskade	84
5.3.2	Einfluß der APC auf die intrazelluläre Calciumkonzentration	87
5.4	Apoptose	88
5.4.1	Morphologische Veränderungen.....	88
5.4.2	Vorgänge im Zellkern	89
5.4.3	Quantifizierung apoptotischer Zellen im FACS	89
5.4.4	Fragmentierung der DNA während der APC-induzierten Apoptose	90
5.4.5	Proteolytische Prozesse während der APC-induzierten Apoptose	91
5.5	Mechanismen der Apoptoseinduktion	93
5.5.1	Bcl-2.....	93
5.5.2	Die Rolle des CD95 in der APC-induzierten Apoptose.....	94
5.5.3	Die Rolle der Streßkinasen bei der APC-induzierten Apoptose.....	95
5.6	Effekte der verschiedenen APC im Vergleich	96
5.7	Zeitliche Reihenfolge der apoptotischen Ereignisse nach APC-Behandlung.....	97
5.8	Anmerkung zum Vergleich der neuen APC mit HePC und Et-18-OCH ₃	98
5.9	Bedeutung der Versuche im Hinblick auf weitere APC-Synthesen	98
6	Literatur.....	99

1 Abkürzungen

APC	Alkylphosphocholin(e)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CD95L	CD95 Ligand
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	Digitaler Interferenzkontrast (<i>digital interference contrast</i>)
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNP	Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
Et-18-OCH ₃	1- <i>O</i> -Octadecyl-2- <i>O</i> -methyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
FADD	<i>fas associated death domain</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
Fluo3/AM	Fluo3-Acetoxymethylester
fMLP	N-formyl-Methionylleucylphenylalanin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HePC	Hexadecylphosphocholin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalactosidase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
kb	Kilobasen (1kb = 1.000 bp)
kD	Kilodalton (10 ³ Dalton)
LD ₅₀	halbmaximale letale Dosis
LPA	Lysophosphatidsäure (1-Acyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat)
MAP Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>

Abkürzungen

MEK	MAP Kinase Kinase
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OD	optische Dichte
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS/T	PBS mit 0,3% Tween-20
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PI	Propidiumiodid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RBD	<i>ras binding domain</i>
R-N-acetyl	R-1-O-Phosphocholin-2-N-acetyl-octadecan
RNAse	Ribonuklease
R-NH ₂	R-1-O-Phosphocholin-2-amino-octadecan
R-O-acetyl	R-1-O-Phosphocholin-2-O-acetyl-octadecan
R-OH	R-1-O-Phosphocholin-2-hydroxy-octadecan
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-N-acetyl	S-1-O-Phosphocholin-2-N-acetyl-octadecan
S-NH ₂	S-1-O-Phosphocholin-2-amino-octadecan
S-O-acetyl	S-1-O-Phosphocholin-2-O-acetyl-octadecan
S-OH	S-1-O-Phosphocholin-2-hydroxy-octadecan
SV-40	<i>simian virus 40</i>
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPA	12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wildtyp
zD-DCB	z-Asp-2,6-dichlor-benzoyloxymethylketon
zVADfmk	z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

2 Einleitung

2.1 Alkylphosphocholine: eine neue Klasse von Antitumormitteln

Alkylphosphocholine (APC) sind Phosphocholinester aliphatischer Alkohole und repräsentieren eine neue Klasse von Antitumormitteln. APC sind als synthetische Phospholipide und Analoga des 2-Lysophosphatidylcholins natürlichen Bestandteilen zellulärer Membranen nachempfunden. Ursprünglich wurden APC als Substratanaloga bzw. als Antimetabolite phospholipidmodifizierender Enzyme mit dem Ziel synthetisiert, sie zu Phospholipid-Metabolismusstudien einzusetzen. In diesen Experimenten wurde man rasch auf die antineoplastischen Eigenschaften der APC aufmerksam. Mit Hilfe der bei diesen Studien gewonnenen Erkenntnisse über die Metabolisierbarkeit von Phospholipiden in Zellen konnte dann eine Gruppe von Alkylphosphocholinen synthetisiert werden, von denen man annahm, daß sie sich aufgrund ihrer schlechten Verstoffwechslung im Tumorgewebe bzw. in Tumorzellen anreichern und dort zum Zelltod führen würden (Unger & Eibl 1986, Kötting *et al.* 1988).

Ein prominentes Mitglied der Gruppe der Alkylphosphocholine ist 1-*O*-Octadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (Et-18-OCH₃, Abb. 1), ein Etheranalogon des 2-Lysophosphatidylcholins (Arnold *et al.* 1967). In den 80er Jahren ist Hexadecylphosphocholin (HePC, Abb. 1) von der Göttinger Gruppe um Eibl und Unger als Antitumormittel entwickelt worden (Eibl & Unger 1986; Kötting 1987). Es vereinigt spezifische antitumorale und immunmodulatorische Eigenschaften in sich (Eibl & Unger 1990, Eibl *et al.* 1992).

Im Gegensatz zu klassischen Antitumormitteln gehören APC zu den antineoplastischen Substanzen, die nicht direkt auf die Bildung oder Funktion der zellulären Replikationsmaschinerie wirken. APC sind nicht mutagen und wirken in erster Linie an der Zellmembran (Noseda *et al.* 1988), wo sie über die Beeinflussung membranständiger Enzyme bzw. Systeme das Wachstumsverhalten von Zellen bis zum Zelltod verändern können. Damit unterscheiden sie sich von den meisten anderen Antitumormitteln, die direkt an DNA binden oder mit DNA wechselwirken.

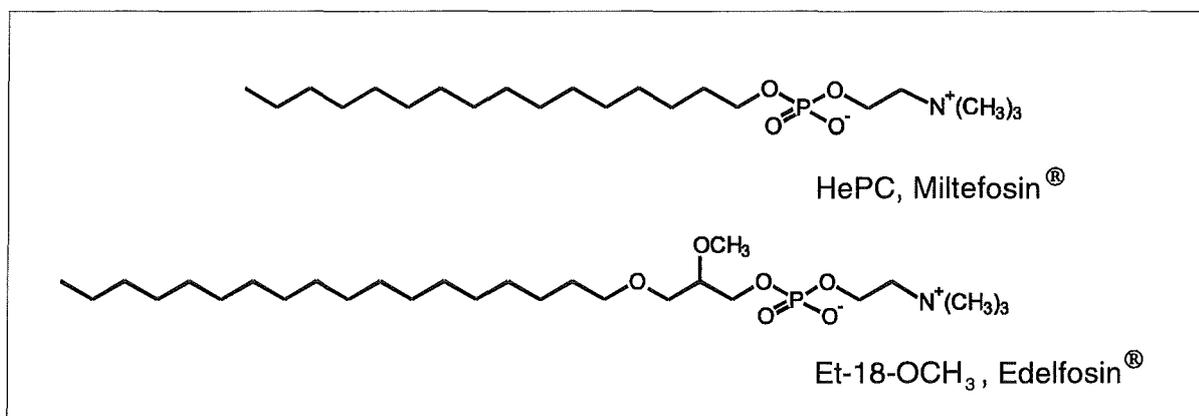


Abb. 1: Struktur von Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosin[®]) und 1-*O*-Octadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (Et-18-OCH₃, Edelfosin[®]).

2.2 Antitumorale Wirkung der APC

Die antineoplastische Wirkung der APC, die bereits in Zellkulturexperimenten beobachtet worden war, konnte dann auch im Tierexperiment bestätigt werden (Scherf *et al.* 1987). So zeigte z. B. HePC antitumorale Aktivitäten gegenüber autochtonen Mammakarzinomen *in vivo*, die sogar die Wirkung klassischer Antitumormittel wie beispielsweise Cyclophosphamid übertrafen (Berger *et al.* 1984, Unger *et al.* 1989). Die antitumoralen Wirkungen der APC wurden weiter beschrieben und umfassen die Aktivierung von Makrophagen, eine Verlangsamung der Tumorzellinvasion *in vivo*, verminderte Tumormetastasierung, das Schrumpfen von Tumoren und die Störung der Tumorentwicklung, sowie Differenzierung von Tumorzellen und selektive Hemmung der Tumorzellproliferation (zusammengefaßt in Berdel *et al.* 1985, Andreesen 1988).

Das breite Spektrum der antiproliferativen Wirkungen von APC gegen Tumorzelllinien wie auch gegen frisch explantierte Tumoren ist beeindruckend. In der Ratte wirkt HePC gegen Dimethylbenzanthrazen (DMBA)-induzierte (Hilgard *et al.* 1988) und Methylnitrosoharnstoff (MNU)-induzierte (Muschiol *et al.* 1987), sowie gegen transplantierte Mammakarzinome (Scherf *et al.* 1987). Et-18-OCH₃ zeigte hohe therapeutische Aktivitäten gegenüber dem Wachstum allogeneischer Tumoren in Mäusen (Berdel *et al.* 1981), gegenüber isolierten Leukämiezellen aus Patienten (Andreesen *et al.* 1982) sowie gegenüber humanen Tumorzelllinien aus Brust, Lunge, Niere und Prostata (Ashagabley *et al.* 1996). Eine umfassende Studie von Herrmann & Neumann (1987) berichtet von der Wirksamkeit des BM 41.440, einem Thioether-Analogon von Et-18-OCH₃, gegen Primärkulturen humaner Tumorzellen aus Lunge, Adenocarcinoma, Ovarien, dem Gastrointestinaltrakt und der Niere.

1993 kam Hexadecylphosphocholin unter dem Namen Miltefosin[®] als erster Vertreter dieser neuen Substanzklasse von Antitumorwirkstoffen auf den deutschen Markt. Gegenwärtig wird HePC zur topischen palliativen Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebspatientinnen angewendet (Unger *et al.* 1988, 1989). Miltefosin[®] ist derzeit in 11 Ländern zugelassen. Da HePC auch in beeindruckender Weise gegen Leishmaniasis-Infektionen wirkt, ist derzeit die Zulassung für die orale Applikation in Vorbereitung (Kuhlencord *et al.* 1992, Unger *et al.* 1998).

In neuester Zeit ist mit Perifosin[®], einem HePC-Analogon mit einer heterozyklischen Struktur im polaren Kopf, ein neues APC in der klinischen Prüfung. In präklinischen Untersuchungen zeigte Perifosin[®] in verschiedensten Tumormodellen hohe Aktivität, die mit einer starken Hemmung der Proteinkinase C einhergeht (Hilgard *et al.* 1997).

Et-18-OCH₃ ist unter dem Namen Edelfosin[®] bekannt. Edelfosin[®] wird in klinischen Studien bereits bei Leukämien zum *ex vivo* Knochenmarkspurgung vor der autologen Transplantation eingesetzt (Dietzfelbinger *et al.* 1993, Koenigsmann *et al.* 1996, Vogler & Berdel 1993).

2.3 Effekte der APC auf zellulärer Ebene

Zunehmendes Interesse an der Gruppe der APC führte dazu, daß die biologischen Wirkungsweisen dieser Verbindungen auf zellulärer Ebene näher untersucht wurden.

Der primäre Angriffsort der APC ist die Plasmamembran von Tumorzellen, in der die Alkylphosphocholine aufgrund ihrer schlechten Metabolisierbarkeit akkumulieren (Fleer *et al.* 1992). Mittlerweile verdichten sich die Hinweise, daß eine Weiterverteilung der APC innerhalb der Zellen stattfindet. So wird nach HePC-Behandlung die Substanz auch in der subzellulären Membranfraktion detektiert (Henke *et al.* 1996). Im Gegensatz zu vielen anderen Antitumormitteln binden APC nicht an DNA, gehen auch keine Wechselwirkung mit der DNA ein und sind daher nicht mutagen. Die molekularen Angriffspunkte von APC innerhalb der Zelle sind jedoch bis heute noch nicht bekannt, so daß eine Optimierung der APC hinsichtlich eines spezifischen molekularen Targets bisher nicht stattfinden konnte.

Die beiden bekanntesten und am besten untersuchten APC sind sicherlich HePC und Et-18-OCH₃. Die bisher gewonnenen Ergebnisse bezüglich der antitumoralen Wirkung dieser beiden APC deuten auf membranabhängige, stoffwechsellinhibitorische, zelldifferenzierende und zytostatische Mechanismen hin. Eine Übersicht über die Effekte der APC auf der molekularen Ebene geben Brachwitz & Vollgraf (1995). APC beeinflussen die Signaltransduktion auf Ebene der Phospholipase C, der Protein Kinase C und bewirken eine Änderung des Phosphatidylinositol- und Calcium-Metabolismus. Anscheinend gibt es keine strikten strukturellen Anforderungen für die antitumorale Aktivität der APC. Nach heutigem Wissensstand ist als strukturelle Voraussetzung für die höhere oder niedrigere Sensitivität gegenüber APC auf zellulärer Ebene nur eine 'Lyso-Phosphatidylcholin-ähnliche' Struktur und eine schlechte Metabolisierbarkeit zu sehen. Bei der *in vivo* Sensitivität sind zusätzlich die Unterschiede in der Plasmaproteinbindung der einzelnen APC zu berücksichtigen. So ist z.B. Et-18-OCH₃ zwar im Zellkultursystem sehr effektiv, es kann jedoch *in vivo* kein ausreichender Serumspiegel erreicht werden. Dies wird dadurch begründet, daß im Serum Et-18-OCH₃ nicht nur an Albumin bindet, sondern auch in beträchtlichem Umfang an Lipoproteine. Da Lipoproteine (z. B. in der Leber) einem raschen *turnover* unterliegen, besteht für den Organismus die Möglichkeit, Et-18-OCH₃ rasch zu metabolisieren. Im Gegensatz zu Et-18-OCH₃ bindet HePC fast ausschließlich an Albumin, was seinen höheren Serumspiegel und die längere Halbwertszeit erklärt (Kötting *et al.* 1992a).

2.4 Synthese neuer APC-Verbindungen

In den 80er Jahren konnte mit HePC ein antineoplastisch wirkendes Zytostatikum entwickelt werden (Eibl & Unger 1990, Eibl *et al.* 1992), das in Zellkultorexperimenten vielversprechende Ergebnisse zeigte. Die Lysolipidstruktur des HePC ermöglicht nach oraler Applikation eine hohe Resorptionsrate im Gastrointestinaltrakt. Von dort aus gelangt HePC

über die Lymphe direkt in den Blutkreislauf, wo es vorwiegend an Albumin bindet (Kötting *et al.* 1992b). Mit radioaktiv markiertem HePC konnte nach oraler Verabreichung in Mäusen eine gleichmäßige Verteilung des HePC über den ganzen Körper beobachtet werden. Höchste Akkumulationen der Radioaktivität fanden in Leber, Lunge und Nieren statt (Breiser *et al.* 1987).

Bei der systemischen Applikation von HePC zeigten sich jedoch leider im Tierversuch als auch in ersten klinischen Studien starke gastrointestinale und renale Nebenwirkungen (Hilgard *et al.* 1988, Verweij *et al.* 1992, 1993). HePC wird daher heute nur zur topischen Behandlung von Hautmetastasen bei Patientinnen mit Mammakarzinomen eingesetzt (Unger *et al.* 1988, Verweij *et al.* 1992, 1993).

Eine Reihe von neuen HePC Derivaten (Abb. 2) sind daher mit dem Ziel entwickelt worden, die Nebenwirkungen im Vergleich zu HePC zu vermindern. Durch Einfügen von verschiedenen funktionellen Gruppen wurden die neuen APC wieder an die Struktur der natürlich vorkommenden Lysolecithine angenähert. Aufgrund dieser Funktionalisierung in der 2-Position konnte von einem veränderten (beschleunigten) Ab- oder Umbau innerhalb der Zellen ausgegangen werden. Dies wurde für die Wechselwirkung mit Phospholipase C und Sphingomyelinase gezeigt (Massing & Eibl 1994b). Gleichzeitig sollte jedoch die antineoplastische Potenz des HePC erhalten bleiben oder sogar verbessert werden (Massing & Eibl 1994a, Massing *et al.* 1997).

Aber nicht nur die Abschwächung der Nebenwirkungen stand beim Design der neuen APC im Vordergrund. Durch die Annäherung der Struktur an natürliche Lysolipide bestand auch die Hoffnung, daß die neuen APC auf breiter Ebene mit 'lipidabhängigen' Systemen (membranständige Proteine wie beispielsweise Kanäle, Rezeptoren, Adhäsionsproteine, Transportproteine etc.) besser in Wechselwirkung treten und diese in ihrer Aktivität spezifischer als z.B. HePC beeinflussen könnten. Die Ergebnisse wären eine verbesserte Wechselwirkung mit einem oder mehreren spezifischen APC-Targets.

Es sollte also ein Mittelweg zwischen einer substratähnlichen Phospholipidstruktur und gleichzeitiger schlechter Metabolisierbarkeit gefunden werden.

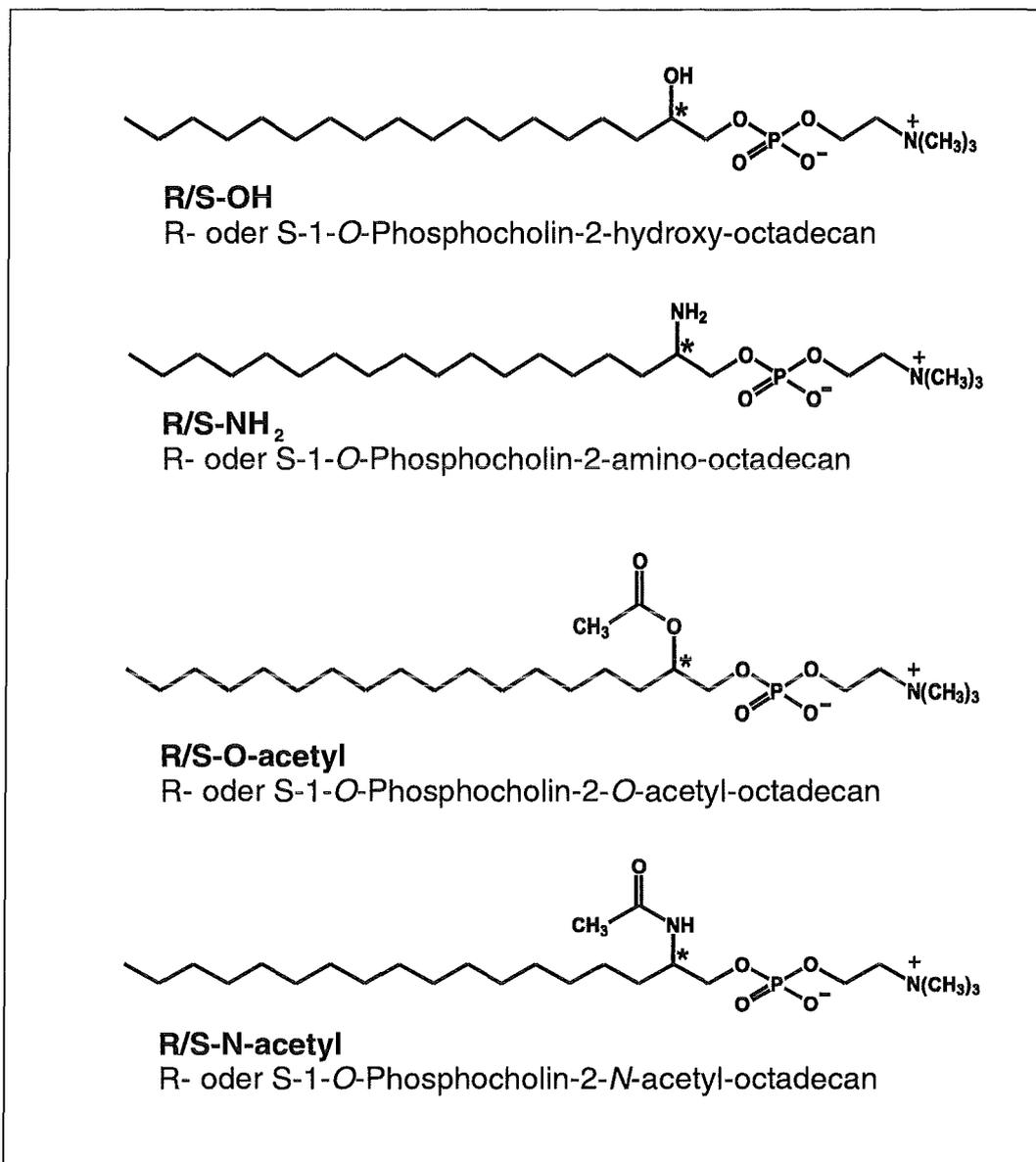


Abb. 2: Struktur und Abkürzungen der neu synthetisierten APC.

* zeigt das Chiralitätszentrum an. Die Verbindungen liegen jeweils enantiomerenrein in R- oder S-Konfiguration vor.

An der 2-Position wurden verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt: Hydroxy- Amino- Ester und Amidfunktionen. Damit die apolare Kettenlänge des HePC erhalten bleibt, wurde die Kohlenwasserstoffkette der neuen Verbindungen um zwei Methylengruppen verlängert, woraus sich eine Octadecylphosphocholin-Struktur ergibt.

Zudem wurden die neuen Verbindungen enantiomerenrein hergestellt und lagen als R- oder S-Stereoisomere vor. Da natürlich vorkommende Phospholipide R-konfiguriert sind, kann davon ausgegangen werden, daß die Enzyme des Phospholipid-Stoffwechsels bevorzugt die R-Isomere als Substrate erkennen, was für Phospholipase C, Sphingomyelinase und Phospholipase A₂ gezeigt werden konnte (Massing & Eibl 1994b, Hildenbrand 1998). Die S-konfigurierten Isomere könnten sich daher durch bessere Halbwertszeiten innerhalb der Plasmamembranen auszeichnen. Zudem ist dadurch die Möglichkeit gegeben, zwischen

spezifischen, enzymassoziierten und unspezifischen, enzymunabhängigen Vorgängen zu differenzieren.

2.5 Apoptose

Der Zelltod kann auf zwei verschiedene, biochemisch und morphologisch unterscheidbare, Arten stattfinden (Abb. 3): Apoptose oder Nekrose.

Der nekrotische Zelltod folgt auf starke Umwelttraumata wie z.B. Hyperthermie, Hypoxie oder lytische virale Infektion. Nekrose ist gekennzeichnet durch eine drastische Volumenzunahme und starkes Anschwellen des Zytoplasmas, was zu irreversiblen Schäden der Plasma- und auch Organellenmembranen führt (Nekrose 1). Das Chromatin und die Organellen werden ebenfalls geschädigt, schließlich lysiert die Zelle (Nekrose 2) und der Zellinhalt wird freigesetzt. Zugleich ist ein entzündlicher Prozeß für Nekrosen charakteristisch. Immunzellen sammeln sich an den geschädigten Körperzellen und phagozytieren deren Reste. An sich hilft die damit einhergehende Entzündung, einen Infektionsherd zu begrenzen und Zelltrümmer zu beseitigen, aber die von den Immunzellen abgegebenen Stoffe können benachbartem gesundem Gewebe schaden.

Im Gegensatz dazu steht die Apoptose, der sog. programmierte Zelltod. Apoptose ist die physiologische Art des Zelltodes, in dem die betroffene Zelle aktiv durch Bereitstellung der nötigen endogenen Enzyme sowie Energie beteiligt ist. Apoptotische Zellen sind durch charakteristische biochemische und morphologische Veränderungen gekennzeichnet. So schrumpfen die Zellen während der Apoptose, die Organellen bleiben intakt, das Chromatin kondensiert und die DNA wird in Fragmente spezifischer Größe zerkleinert (Apoptose 1). In einem späteren Stadium der Apoptose bilden die Zellen Membranausstülpungen (*blebs*) und verpacken sich selbst in die sogenannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*, Apoptose 2). Die Integrität der Plasmamembran bleibt während des ganzen Vorganges intakt (Wyllie 1980). Unter *in vivo* Bedingungen werden apoptotische Zellen und die apoptotischen Körperchen von gesunden Zellen in ihrem Umfeld oder von allgegenwärtigen Freßzellen des Immunsystems aufgenommen und abgebaut (Apoptose 3). Da bei der Apoptose der Zellinhalt nicht freigesetzt wird, kommt es zu keiner Entzündungsreaktion.

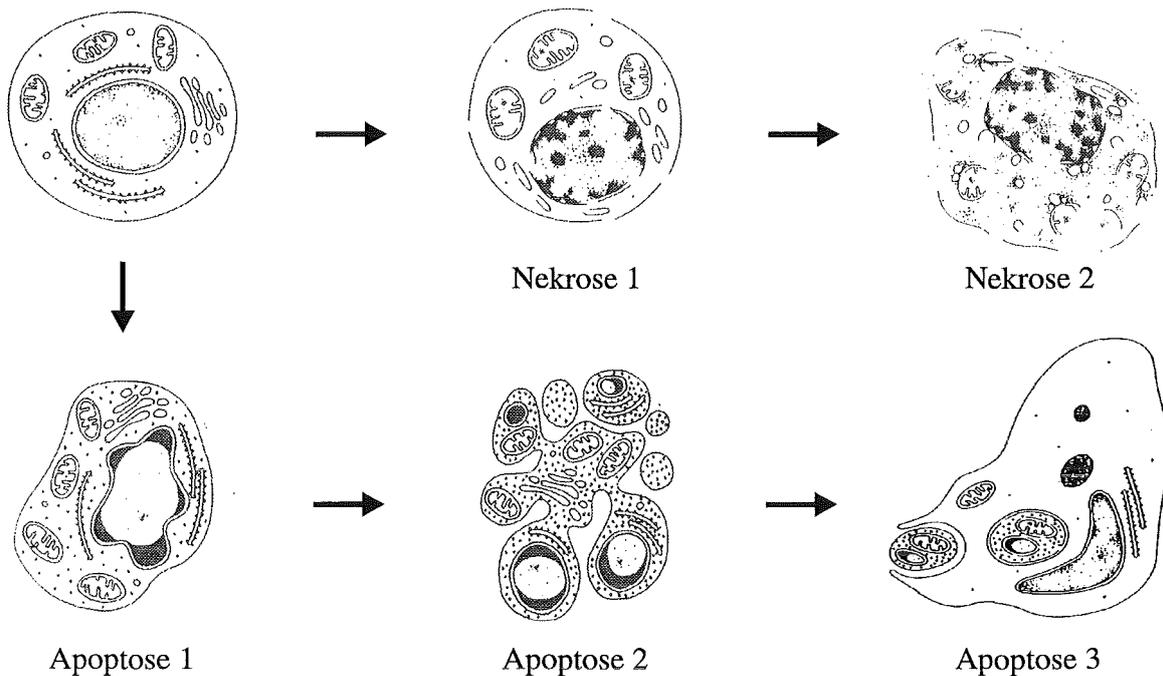


Abb. 3: Schema der ultrastrukturellen Veränderungen während des Ablaufs des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes (verändert nach Kerr, 1995). Nähere Erläuterungen im Text.

Unter *in vitro* Bedingungen, z.B. im Zellkultursystem, in dem keine Makrophagen anwesend sind, kommt es zu einem Phänomen der Sekundärnekrose (Cotter *et al.* 1992).

Die Apoptose ist ein streng regulierter Prozeß, der während der Entwicklung, bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, dem normalen *Zellturnover* und bei der Selektion von Immunzellen eine wichtige Rolle spielt. Zwei Beispiele von vielen für Apoptose beim Menschen sind die Erneuerung der Zotten der Darmwand und auch die Regeneration der Zellen der Haut. Während diese Zellen nach außen vorrücken sterben sie ab und werden abgestreift.

Das Interesse an Apoptose hat in jüngster Zeit stark zugenommen. Mittlerweile steht nicht mehr die bloße Beobachtung der morphologischen Veränderungen im Vordergrund, sondern die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen. Den Kern der Apoptose-Maschinerie bilden degradierende Enzyme wie Proteasen und Endonukleasen. Eine Gruppe von Proteasen, die Caspasen (Cystein Aspartat-spezifische Proteasen), liegen in gesunden Zellen als inaktive Zymogene vor, können nach Induktion von Apoptose schnell durch Proteolyse aktiviert werden und zerlegen dann überlebensnotwendige zelluläre Proteine (Henkart 1996). Die Aktivität der Caspasen kann über Plasmamembranrezeptoren reguliert werden. So ist die Caspase-Aktivierung durch den sog. Todesrezeptor CD95 (Fas/APO-1) gut beschrieben (Dixit 1998).

CD95 Rezeptor kommt in vielen verschiedenen Zellen vor (Nagata & Goldstein 1995). Nach der Aktivierung von CD95 durch den entsprechenden Liganden (CD95L) aggregieren die Rezeptormoleküle. Der CD95 Rezeptor enthält keine katalytischen Kinase- oder Phosphatasemotive, sondern die Signalweiterleitung wird über Adaptorproteine vermittelt.

CD95 Rezeptor enthält eine 80 Aminosäure große Bindedomäne für solche Adaptorproteine in der zytoplasmatischen Region. Diese Domäne wird als 'Todesdomäne' bzw. *death domain* bezeichnet und ist für die Induktion der Apoptose notwendig (Itoh & Nagata 1993). Ein solches Adaptorprotein, das an die Todesdomäne von CD95 bindet ist FADD (*fas associated death domain*) (Abb. 4). Nach der Aggregation der intrazellulären Todesdomänen des CD95 mit FADD wird mit Caspase-8 ein weiteres regulatorisches Schlüsselprotein rekrutiert. Dieser Komplex wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet (Kischkel *et al.* 1995). Die Bildung eines solchen DISC führt dann zur weiteren Aktivierung von Caspasen und somit zum Abbau von Todessubstraten wie Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) oder Laminen.

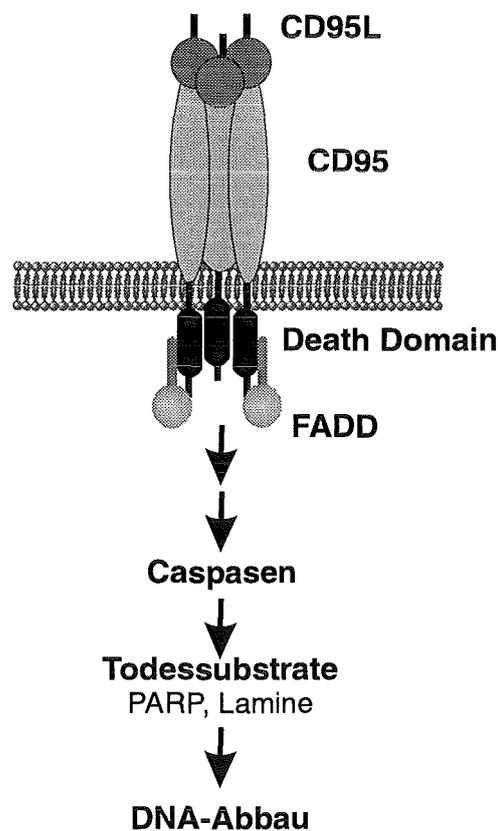


Abb. 4: Schematische Darstellung des CD95 Signalwegs (modifiziert nach Nagata, 1997).

Neben der Aktivierung des CD95 Rezeptors scheinen die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration (McConkey & Orrenius 1996), die Aktivierung von Proteinkinasen und -phosphatasen (Frearson & Alexander 1996), sowie die transkriptionelle Regulation Apoptose-induzierender oder -unterdrückender Proteine (Adams & Cory 1998) und eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (Green & Reed 1998) bei der Regulation der Apoptose von Bedeutung zu sein.

2.6 Apoptose und Krebs

Bis vor kurzem war man der Ansicht, daß die Entstehung von Krebs fast ausschließlich auf einer vermehrten *Zellproliferation* beruht. In den letzten Jahren aber hat sich dieses Bild etwas geändert. Zunehmend gewann auf die Rolle des *Zelltodes* an Bedeutung und brachte so eine neue Perspektive auf, wie Zellpopulationen im Gleichgewicht gehalten werden können. Man erkannte, daß auch Defekte in der Regulation des Zelltodes zur Entartung von Zellen und zur Entwicklung von Tumoren führen können.

Apoptose repräsentiert einen physiologischen Mechanismus, durch den entartete Zellen eliminiert werden können, ohne daß es zu einer Entzündungsreaktion kommt. Zellen, die länger leben als ihre normale Lebensspanne, müssen an sich nicht gefährlich sein. Wenn solche Zellen sich aber vermehren bzw. die Fähigkeit erlangen, sich zu vermehren, weil dieser Mechanismus des Zelltodes versagt, so kann es zu einer Akkumulation entarteter Zellen kommen, die dann dem Organismus erhebliche Schwierigkeiten bereiten können.

Es gibt zwei Arten von Molekülen, die den Zelltod regulieren: Induktoren und Repressoren. Moleküle, die den Zelltod induzieren, begünstigen Apoptose, wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor Myc (Evan *et al.* 1992), das DNA-Reparatur-assoziierte Protein p53 (Yonish-Rouach *et al.* 1991), manche cyclin-abhängigen Kinasen (Shi *et al.* 1994) und die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie Bax und Bak. Zelltod-Repressoren hingegen blockieren oder verzögern Apoptose. Dazu gehören das archaetypische Repressorprotein Bcl-2 (Vaux *et al.* 1988), das chimäre Protein Bcr-Abl, das in chronischen myeloischen Leukämien auftritt (McGahon *et al.* 1994), die sog. *inhibitor of apoptosis*-Proteine (iaps) die ursprünglich in Bakkuloviren gefunden wurden (Duckett *et al.* 1996), das Kuhpockenvirusgift CrmA (Tewari *et al.* 1995) und viele andere.

Es ist offensichtlich, daß das Ausbleiben von Apoptose zwei Gründe haben kann. Ein Zelltod-Repressor kann überexprimiert oder seine Funktion verstärkt werden, so daß die Zellen Bedingungen überleben, unter denen sie normalerweise zugrunde gehen würden. Oder aber ein Zelltod-Induktor kann beispielsweise durch Mutation seine Funktion verlieren, so daß Todessignale innerhalb der Zellen nicht richtig registriert werden können.

Ein prominentes Beispiel für die Überexpression eines Apoptose-Repressors ist das Bcl-2. Bcl-2 wird normalerweise mit niedriger Rate in vielen Geweben exprimiert. Eine t(14:18) Chromosomentranslokation, wie sie beispielsweise in B-Zell-Lymphoma vorkommen kann, führt zur Überexpression von Bcl-2 (Tsujiimoto *et al.* 1985). Grob geschätzt besitzen 50% der Tumore, die im Patienten diagnostiziert werden, abnormal hohe Konzentrationen an Bcl-2. Das verdeutlicht, wie wichtig Bcl-2 in der Entwicklung und/oder Erhaltung von Tumoren ist.

Ein Beispiel für eine Inaktivierung eines Apoptose-induzierenden Proteins ist das p53. p53 ist ein multifunktionelles Tumorsuppressorprotein dessen Aufgabe die Überwachung der Genomintegrität ist (Lane 1992). p53 ist in der Lage, Zellen in der G₁-Phase anzuhalten, an

geschädigte DNA zu binden und DNA-Reparaturenzyme zu rekrutieren. Zusätzlich kann p53 auch die Transkription DNA-reparierender Proteine aktivieren und Apoptose induzieren (Yonish-Rouach *et al.* 1991). Zellen mit Mutationen, die p53 inaktivieren, können immer und immer wieder den Zellzyklus durchlaufen, unter Bedingungen, unter denen in gesunden Zellen Apoptose oder aber Reparatursysteme auf den Plan gerufen worden wären. p53 Mutationen werden in über 50% der humanen Tumore gefunden.

Nachdem die Bedeutung von Mutationen in Genen, die für Apoptose-Induktoren und Repressoren kodieren, deutlich geworden ist, geht die neuere Krebsforschung in die Richtung, bestehende therapeutische Strategien zu verbessern, so daß diesen Defekten Rechnung getragen wird.

Klassische Tumortherapien, wie z.B. Radiotherapie oder die meisten Chemotherapien eliminieren Zellen in dem sie Apoptose auslösen (Lennon *et al.* 1991). Wenn die Tumorzellen auf die Behandlung nicht mit Apoptose reagieren, so haben die Zellen bereits Resistenzen gegen die Auslösung von Apoptose gebildet. Es wird dann vermehrt das Auftreten von Nekrose innerhalb des Tumors beobachtet. Obwohl es sich paradox anhört, ist Nekrose in Tumoren meist ein schlechtes Zeichen. Es bedeutet, daß im Tumor Apoptose nicht mehr ausgelöst werden kann, und eine Behandlung dadurch erschwert ist, bzw. wesentlich höhere Dosen an Therapeutika oder eine längere Therapie nötig sind, die der Patient meist nur schwer verkraftet (Arends *et al.* 1994). Es ist daher in der Tumortherapie von großer Bedeutung, neue Substanzen zu finden, die selektiv den Zelltod auslösen und so die Deregulation der Apoptose in Tumorzellen kompensieren.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit standen acht neue Alkylphosphocholin-Verbindungen zur Verfügung. Sie sollten auf ihre antineoplastische Wirkung hin untersucht werden. Da diese Verbindungen erst kürzlich synthetisiert worden waren, war noch nicht viel über deren Verhalten gegenüber Tumorzellen bekannt.

HePC und Et-18-OCH₃, die bekannten Vertreter der Alkylphosphocholine, werden bereits in der Behandlung von Leukämien und Brustkrebsmetastasen angewendet. Daher wurden für die Untersuchungen mit den neuen APC entsprechende Zellkultursysteme ausgewählt. Zum einen standen verschiedene humane Leukämie-Zelllinien zur Verfügung, allen voran die humane promyeloische Leukämiezelllinie HL-60. Als Vertreter einer Brustkrebs-Zelllinie wurden MDA-MB-468 Zellen gewählt.

Anhand dieser Modellsysteme sollte die Wirkungsweise der neuen Verbindungen untersucht werden. Um Dosis-Wirkungsbeziehungen aufzuklären, sollten zuerst einfache Toxizitätsstudien durchgeführt werden. Die Wirkungen der einzelnen APC sollte untereinander verglichen werden, um den Einfluß von Strukturvariationen auf die Toxizität der jeweiligen Verbindung näher zu beleuchten. Dann sollten die potentesten Vertreter der neuen APC auf ihre antineoplastische Wirkung hin überprüft werden.

Die für das veränderte Wachstum der Zellen verantwortlichen regulatorischen Elemente, die eventuell ein Ziel der synthetischen Lipide sein könnten, sollten identifiziert und charakterisiert werden. Gerade im Hinblick auf den späteren Einsatz der neuen Substanzen in der Tumorthherapie ist die genaue Kenntnis der Wirkungsmechanismen auf molekularer Ebene eine notwendige Voraussetzung.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

A23187, Calciumionophor	Sigma (Deisenhofen, BRD)
AG1296	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
AG1478	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Ammoniumacetat	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, BRD)
CD95-Ligand	Alexis (Grünberg, 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)
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Life Technologies (Karlsruhe, BRD)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	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)
N-formyl-Methionylleucylphenylalanin (fMLP)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Glyzerin	Merck (Darmstadt, BRD)
HEPES	Roth (Karlsruhe, BRD)
ICE Inhibitor III (zD-DCB)	Alexis (Grünberg, BRD)
ICE Inhibitor VI (zVADfmk)	Alexis (Grünberg, BRD)
Kupfersulfat, wasserfrei	Merck (Darmstadt, BRD)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Natriumfluorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Natriumvanadat	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid	Boehringer (Mannheim, BRD)
Nonidet P-40 (NP-40)	Calbiochem (Bad Soden, BRD)
Pertussis Toxin (PTX)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Pluronsäure	Molecular Probes (Eugene, USA)
Propidiumiodid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Ribonuklease A	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Taxol (Paclitaxel)	Alexis (Grünberg, BRD)
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Tri- <i>n</i> -butylzinnchlorid (TBT)	Merck (Darmstadt, BR)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt, BRD)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Trypanblau	Serva (Heidelberg, BRD)
Tween-20	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Lösungsmittel, Säuren und Salze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen. Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind im Abschnitt Proteinanalytik angegeben. Die synthetischen Lipide wurden von Dr. U. Massing, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg, synthetisiert. Die Lipide wurden in Ethanol gelöst und bei der Inkubation überstieg die Konzentration des Lösungsmittels im Versuchsansatz nie 0,5%.

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

3.2 Zellkulturen

Soweit nicht anders erwähnt, stammten alle Zellkulturgefäße von der Firma Greiner, Frickenhausen. Die Grundmedien sowie alle Medienzusätze und Antibiotika wurden von Life Technologies, Karlsruhe, bezogen. Die Kulturmedien wurden stets steril filtriert (Bottle Top Filter, 0,22 µm Porenweite, Millipore, Bedford USA). HL-60-Zellen, Jurkat T Zellen, BJAB Zellen und SKW6 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Typ B5061 EK-02, Heraeus) inkubiert. MDA-MB-468 Zellen in Leibovitz's L15-Medium wurden ebenfalls bei 37°C im Brutschrank inkubiert, jedoch ohne CO₂-Begasung, da die Medienzusammensetzung für Kulturbedingungen in normaler Atmosphäre konzipiert wurde.

3.2.1 HL-60 Zellen

HL-60 Zellen (American Type Culture Collection, ATCC CCL240), die für viele Versuche 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 monozyten- oder granulozytenähnliche Zellen differenziert werden (Collins 1987). Undifferenzierte HL-60 Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden daher zwei Mal in der Woche passagiert und standardmäßig mit einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen in 20 ml Kulturmedium angesetzt. HL-60 Zellen wurden maximal bis zur 15. Passage für Versuche verwendet.

Zusammensetzung des Kulturmediums für HL-60 Zellen:

450	ml	RPMI 1640
75	ml	FKS (fötale Kälberserum, 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)

3.2.2 Differenzierung von HL-60 Zellen

Für die Messung der zytosolischen Calciumkonzentration wurden differenzierte HL-60 Zellen verwendet. Durch Zugabe von DMSO zum Kulturmedium können HL-60 Zellen zu Granulozyten differenzieren (Collins *et al.* 1978). Hierzu wurden die Zellen standardmäßig abzentrifugiert ($200 \times g$, 5 Minuten, Digifuge GL, Heraeus) und in Kulturmedium mit 1,3% DMSO in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml aufgenommen. Die Zellen konnten dann vom 4. bis 6. Tag für Versuche verwendet werden. Während der Differenzierung verlieren HL-60 Zellen ihre Proliferationsfähigkeit und die enzymatische und Rezeptorausstattung der Zelle verändert sich. Eine Zusammenfassung der Ereignisse ist in Harris & Ralph (1985) beschrieben. Der Differenzierungsgrad der Zellen konnte mit Hilfe des sogenannten NBT-Tests nach Wijermans *et al.* (1987) bestimmt werden. Der Test beruht auf der Fähigkeit differenzierter Zellen, Sauerstoffradikale zu bilden und wurde hier stichprobenartig durchgeführt. Dazu wurden 2×10^6 Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 0,2%igen NBT-Lösung (Nitro-Blau-Tetrazolium, Boehringer, Mannheim) in PBS und 10 μ l einer 0,05 mg/ml TPA-Lösung (12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat, Sigma, Deisenhofen) wurden die Ansätze 25 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und in der Neubauerkammer ausgezählt. Der Differenzierungsgrad ergab sich aus dem Verhältnis blau-schwarzer Zellen zur Gesamtzellzahl.

3.2.3 BJAB Zellen

Hierbei handelt es sich um eine B-lymphoblastoide Zelllinie humanen Ursprungs. Diese Zelllinie wurde im Labor von V. Dixit (University of Michigan, Ann Arbor, USA) stabil mit einem Expressionsvektor einer dominant negativen Version des *fas associated death domain* Proteins (FADD dn) transfiziert (Chinnaiyan *et al.* 1996). Transfektanten wurden durch Zugabe von Geneticin (G418) zu dem Kulturmedium selektioniert. Als Kontrolle dienten Wildtyp Zellen (BJAB wt), die in Kulturmedium ohne G418 kultiviert wurden.

BJAB Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden zwei Mal in der Woche passagiert und standardmäßig mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in 20 ml Kulturmedium angesetzt. Die Zellen neigen dazu, größere Aggregate zu bilden und wurden daher vor der Passage durch sanftes Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

Zusammensetzung des Kulturmediums für BJAB Zellen:

450	ml	RPMI 1640
50	ml	FKS (fötale Kälberserum, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	L-Glutamin 200 mM
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml)
1	ml	Geneticin (G418) 100 mg/ml

3.2.4 MDA-MB-468 Zellen

MDA-MB-468 Zellen (ATTC, HTB-123, Rockville, USA), die für die Signaltransduktionsversuche verwendet wurden, sind 1977 aus einer 51-jährigen Patientin mit Adenocarcinoma der Brust isoliert worden (Pathak *et al.* 1979). MDA-MB-468 Zellen sind adhärent wachsende Mammakarzinomzellen, die im Brutschrank bei 37°C ohne CO₂-Begasung kultiviert wurden. Das Kulturmedium wurde zwei Mal wöchentlich gewechselt und die Zellen kurz vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Standardmäßig wurden 3×10^6 Zellen pro 20 ml Kulturmedium ausplattiert.

Zusammensetzung des Kulturmediums für MDA-MB-468 Zellen:

450	ml	Leibovitz's L-15
50	ml	FKS (fötale Kälberserum, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	L-Glutamin 200 mM
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml)

3.2.5 Jurkat T Zellen

Jurkat T Zellen wurden von Prof. S. Korsmeyer (Missouri, USA) bezogen. Es handelt sich hierbei um eine leukämische T-Zelllinie humanen Ursprungs, die stabil mit einem Bcl-2 Expressionsvektor (Jurkat bcl-2) bzw. einem Kontrollvektor (Jurkat neo) transfiziert wurden (Armstrong *et al.* 1996). Transfektanten wurden durch Zugabe von Geneticin (G418) zu dem Kulturmedium selektioniert.

Jurkat T Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden zwei Mal in der Woche passagiert und standardmäßig mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in 20 ml Kulturmedium angesetzt. Die Zellen neigen dazu, größere Aggregate zu bilden und wurden daher vor der Passage durch sanftes Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

Zusammensetzung des Kulturmediums für Jurkat T Zellen:

450	ml	RPMI 1640
50	ml	FKS (fötales Kälberserum, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	L-Glutamin 200 mM
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml)
1	ml	Geneticin (G418) 100 mg/ml

3.2.6 SKW6 Zellen

Die B-lymphoblastoid Linie SKW6 humanen Ursprungs wurde von Dr. A. Strasser (Melbourne, Australien) bezogen. Die Zellen waren stabil mit einem Bcl-2 Expressionsvektor (SKW6 bcl-2) oder einem crmA-Expressionsvektor (SKW6 crmA) bzw. einem Kontrollvektor (SKW6 neo) transfiziert. Die Selektion der bcl-2 und neo Transfektanten erfolgte durch Zugabe von Geneticin (G418) zu dem Kulturmedium, die crmA Transfektanten wurden auf Puromycin-Resistenz selektioniert.

SKW6 Zellen wachsen permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden ebenfalls zwei Mal in der Wochen passagiert und standardmäßig mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in 20 ml Kulturmedium angesetzt. Auch diese Zellen neigen dazu, größere Aggregate zu bilden und wurden daher vor der Passage durch sanftes Auf- und Abpipetteren vereinzelt.

Zusammensetzung des Kulturmediums für SKW6 Zellen:

450	ml	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
50	ml	FKS (fötales Kälberserum, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert)
7,5	ml	L-Glutamin 200 mM
2,5	ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml)
1	ml	Geneticin (G418) 100 mg/ml oder
2,5	ml	Puromycin 200 µg/ml
0,5	ml	2-Mercaptoethanol 50 mM

3.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium mit 10% DMSO als Gefrierschutz für einen Tag in einem geschlossenen Styroporbehälter bei -80°C gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurde die Zellsuspension schnellstmöglich im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert, das Einfriermedium verworfen und standardmäßig ausplattiert.

3.2.8 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension bzw. die trypsinisierten Zellen aus der Kulturflasche entnommen und 1:100 in Isoton (Coulter Euro Diagnostics) verdünnt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Coulter Counters (Model D_n, Coulter Electronics Ltd.) in der verdünnten Lösung gezählt.

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurde die Zellzahl mit der Neubauer Kammer unter dem Mikroskop (Wilovert, Hund, Wetzlar) bei 200-facher Vergrößerung bestimmt.

3.2.9 Vitalitätstest

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Jeweils 100 µl der behandelten Zellen oder Kontrollzellen wurden nach der Inkubation aus den Kulturgefäßen entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 100 µl Trypanblau-Lösung (0,5%ig in 0,9%iger NaCl-Lösung) versetzt. Das Trypanblau kann nur in Zellen diffundieren, deren Membran stark geschädigt ist und diese blau anfärben. Die Zahl der blauen Zellen ist somit identisch mit der Zahl der toten Zellen. Die Zählung erfolgte in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop (Wilovert, Hund, Wetzlar) bei einer 200-fachen Vergrößerung. Die Vitalität wurde auf die Gesamtzellzahl bezogen.

3.3 Färbungen

3.3.1 Färbung mit DAPI für die Fluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und ein Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in einer hypotonischen DAPI-Lösung (5,4 mM DAPI; 2 mM MgCl₂; 0,15 M NaCl; 0,1% Triton X-100; 0,1 M Tris/HCl pH 7,3) resuspendiert. Bei dieser Behandlung lysierte die Zellmembran, die Kernmembran blieb jedoch intakt. Die Zellen wurden dann auf Eis im Dunkeln bis zur Messung aufbewahrt. Die Zellkerne wurden im Durchflußzytometer (PasII, Partec, Münster) bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm ausgewertet.

3.3.2 Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)

Die Zellen wurden nach der Inkubation ein Mal mit PBS gewaschen und in 1 ml Kulturmedium, das den Hoechst-Farbstoff in einer Endkonzentration von 10 µM enthielt, aufgenommen. Die Färbung erfolgte für 15 Minuten im 37°C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal gewaschen, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren und schließlich unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss, Jena) betrachtet. Die maximale Anregung im UV Bereich erfolgte bei 360 nm, die Emission im Blaulicht bei 460 nm. Mit Hilfe einer CCD-Kamera (Hamamatsu, Japan) konnten die mikroskopischen Bilder direkt in den Computer eingezogen und dort mit der entsprechenden Software (Openlab 1.8, Improvision, UK) weiter verarbeitet werden.

3.3.3 Annexin-V-Fluos Färbung apoptotischer Zellen

1×10^6 HL-60 Zellen wurden 15 Minuten in HEPES-Puffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl₂) mit 1 µg/ml Propidiumiodid und 2% Annexin-V-Fluos Lösung (Boehringer, Mannheim) angefärbt. Nach einem Waschschrift konnten Annexin-V-Fluos positive Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss, Jena) sichtbar gemacht werden.

3.4 Elektronenmikroskopie

3.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Untersuchung von Zellen im Transmissionselektronenmikroskop wurden pro Ansatz 50×10^6 Zellen in 10 ml Kulturmedium angesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Zur Fixierung wurden die Zellen über Nacht auf Eis mit 1%iger vorgekühlter Glutaraldehydlösung behandelt. Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert und zwei Mal mit 0,1 M Cacodylatpuffer mit

0,1 M Saccharose gewaschen. Das Pellet wurde in einer geringen Menge 1%iger Agarose resuspendiert. Nach dem Aushärten der Agarose wurden kleine Blöckchen mit einer Kantenlänge von maximal 1 mm geschnitten. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Agaroseblöckchen wurden erneut mit Cacodylatpuffer mit Saccharose gewaschen (s.o.). Anschließend 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 3H₂O; 2,94 mg Diethylbarbital; ad. 5 ml Aqua dest.). Die Blöcke wurden erneut gewaschen, diesmal mit einer wäßrigen 0,1 M Saccharoselösung. Dann erfolgte für eine Stunde die zweite Kontrastierung in einer wäßrigen 2%igen Uranylacetatlösung. Nach erneutem Waschen in 0,1 M Saccharoselösung wurden die Proben durch eine aufsteigende Ethanolreihe schrittweise entwässert. Dafür wurden die Proben jeweils 10 Minuten in 50%, 70%, 80%, 90%, 95% und 2 \times 100% Ethanol gestellt. Zur Einbettung wurde ein niederviskoses Einbettungsmedium verwendet (Spurr, Serva, bestehend aus den Komponenten ERL 4206, D:E:R: 736, NSA und DMAE, die nach einem Protokoll des Herstellers gemischt wurden). Die Spurrblöckchen wurden auf einem Ultratrimgerät der Firma Reichert getrimmt. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von idealerweise 80-100 nm wurden anschließend an einem Ultramikrotom (LKB 2088, Bromma) mit einem Diatome-Diamantmesser (Messerwinkel von 45°) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Xylol-Chloroform Dampf gestreckt und auf die mit Formvar (Plano, Wetzlar) beschichteten Kupfergrids (300 Maschen, Science Services, München) aufgebracht. Danach wurden die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat doppelkontrastiert. Dazu wurden die Grids mit den daraufliegenden Schnitten für 5 Minuten mit 10%iger methanolischer Uranylacetatlösung behandelt und je zwei Mal in wasserfreiem Methanol, 50%igem Methanol und Aqua dest. gewaschen. Danach erfolgte für 5 Minuten die Bleikontrastierung in einer CO₂-freien Bleicitratlösung (1,33 g Bleinitrat; 1,76 g Natriumcitrat \times 2H₂O; 8 ml 1 N NaOH; ad. 50 ml Aqua dest.). Anschließend wurden die Grids drei Mal mit entgastem Aqua dest. gewaschen.

Das Mikroskopieren fand an einem Hitachi H700H-ST Transmissionselektronenmikroskop statt und wurden mit der freundlichen Hilfe von Herrn H. Thiele im Labor für Elektronenmikroskopie am Institut für Transurane, EC, GSF, Karlsruhe, aufgenommen. Die erzielten Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten und für die weitere Dokumentation in den Computer eingescannt.

Die speziell für die Transmissionselektronenmikroskopie benötigten Lösungen und Substanzen wurden von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen.

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die zu untersuchenden HL-60 Zellen wurden nach der Inkubation durch Zentrifugation geerntet, mit PBS gewaschen und in einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung über Nacht auf Eis

bei 4°C fixiert. Zur Herstellung dieser Fixierungslösung wurden folgende Schritte durchgeführt: Zunächst wurde eine 66,6 mM KH_2PO_4 und eine 66,6 mM Na_2HPO_4 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 Aqua dest. gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Zellen jeweils 5 Minuten mit 35%, 50%, 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol behandelt. Die Zellen wurden auf ein Grid aufgebracht, luftgetrocknet und anschließend bedampft. Das Auftragen auf die Grids und das Bedampfen wurde freundlicherweise von Herrn H. Thiele im Labor für Elektronenmikroskopie am Institut für Transurane, EC, GSF, Karlsruhe durchgeführt. Die Aufnahmen wurden ebenfalls an diesem Institut mit einem Philips XL40 Rasterelektronenmikroskop erstellt.

3.5 Proteinanalytik

3.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.* (1951). Hierzu wurden folgende Lösungen benötigt: A: 2% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH; B: 2% Natriumkaliumtartrat; C: 1% CuSO_4 ; D: 100 μl der Lösung B mit 10 ml Lösung A vermischt und 100 μl Lösung C. Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

Eine Eichgerade wurde mit steigenden Konzentrationen BSA erstellt (0-50 mg BSA/ml). 10 μl der Probe wurde dann zu 490 μl Lösung A und 1 ml Lösung D gegeben. Diese Mischung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100 μl Folin-Ciocalteu's Reagenz (1:1 mit Aqua dest. verdünnt) versetzt und für weitere 30 bis 120 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 600 nm im Photometer (U2000, Hitachi) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden ermittelt.

3.5.2 Herstellung von Ganzzellextrakten

Nach der entsprechenden Inkubation wurden Suspensionszellen (z.B. HL-60 oder Jurkat) durch Zentrifugation geerntet. Bei adhärent wachsenden Zellen (z.B. MDA-MB-468) konnte das Medium einfach abgezogen werden. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und anschließend direkt in 60°C heißem Probenpuffer (160 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4% SDS; 22,8% Glycerin; 4% 2-Mercaptoethanol; 0,08% Bromphenolblau) aufgenommen. Die so gewonnenen Extrakte wurden kurz drei Mal 5 Sekunden beschallt (Branson W-250, Einstellung: output control 1, duty cycle 50%), um die DNA zu zerkleinern. Extrakte konnten dann bei -20°C aufbewahrt werden.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Zur Trennung wurden je nach Größe des zu untersuchenden Proteins 7,5%ige bis 15%ige Trenngel verwendet. Das Sammelgel war immer 5%ig. Es wurden die folgenden Lösungen verwendet: Fertiglösung aus 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid (rotiphorese Gel 30, Roth); 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 20% SDS. Diese Lösungen wurden gemäß der folgenden Tabelle für 10 ml Sammelgel und 30 ml Trenngel gemischt. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurde Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zum Start der Polymerisation zugegeben. Das Trenngel wurde nach dem Gießen in die vertikale Apparatur (Sigma) mit Isopropanol überschichtet und nach erfolgter Polymerisation das Sammelgel zugegeben.

Tab. 1: Zusammensetzung der standardmäßig verwendeten SDS-Gele.

Bestandteile im Geldichte	Sammelgel	Trenngel		
	5%	7,5%	10%	15%
rotiphorese Gel 30	1,70 ml	7,50 ml	10,00 ml	15,00 ml
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	2,50 ml	- ml	- ml	- ml
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	- ml	7,50 ml	7,50 ml	7,50 ml
20% SDS	0,05 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
Aqua dest.	5,75 ml	14,55 ml	12,05 ml	7,05 ml
10% APS	0,10 ml	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml
TEMED	0,01 ml	0,03 ml	0,03 ml	0,03 ml

3.5.4 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (Western Blotting)

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde jedes Gel kurz in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 10% Methanol) eingeweicht. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel in einer Wet-Blotting Apparatur (Sigma) auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Die Membran wurde kurz vor der Verwendung erst mit Methanol, dann mit Wasser und Blotpuffer gespült. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine dauerte der Transfer auf die Membran 2 bis 8 Stunden. Besonders bei längerer Dauer wurde der Blot im Kühlraum unter ständigem Rühren durchgeführt, um ein Erwärmen der Apparatur zu vermeiden. Nach erfolgter Übertragung der Proteine wurde die Membran mit 10%iger Trockenmilch in PBS mit 0,3% Tween-20 (PBS/T) für mindestens 30 Minuten zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Danach wurde die Membran kurz in PBS/T gewaschen und mit den entsprechenden Antikörpern (s. Tab. 2) in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 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 1:3.000 in 5%iger Trockenmilch in PBS/T für 60 Minuten. Lediglich bei Verwendung phosphospezifischer Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte wie oben beschrieben. Für die Waschschrte sowie beim Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen und zum Verdünnen der Antikörper wurde statt PBS *tris-buffered-saline* (TBS: 20 mM Tris/HCl; 120 mM NaCl; pH 7,4) mit nur 0,1% Tween-20 eingesetzt.

Nach abschließendem Waschen der Membran erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System (*enhanced chemoluminescence*, Amersham). Nach Anleitung wurden die Nachweislösungen 1:1 gemischt und die Membran damit eine Minute lang befeuchtet. Um die Membran wurde dann Frischhaltefolie geschlagen und ein spezieller Film (ECL-Hyperfilm, Amersham) aufgelegt.

Tab. 2: Bezugsquellen und Verdünnungen der in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper

Antikörper		Verdünnung		Bezugsquelle
primär	anti Bcl-2 (100)	1:2.000	(WB)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti EGF Rezeptor	1:2.000	(WB)	Dianova, Hamburg
	anti ERK1 (K-23)	1:3.000	(WB)	Santa Cruz, Heidelberg
	anti CD95	1:1.000	(FS)	Boehringer, Mannheim
	anti CD95 (SM1/23)	1:1.000	(IF)	Alexis, Deisenhofen
	anti Lamin B	1:2.000	(WB)	Calbiochem, Bad Soden
	anti Pan-ras (Ab-3)	1:2.000	(WB)	Dianova, Hamburg
	anti PARP	1:2.000	(WB)	Boehringer, Mannheim
	anti p-ERK1/2 (e10)	1:1.000	(WB)	New England Biolabs, Beverley
	anti p-p38 Kinase	1:1.000	(WB)	New England Biolabs, Beverley
	anti p-SAPK/JNK	1:1.000	(WB)	New England Biolabs, Beverley
	anti PY	1:2.000	(WB)	Dianova, Hamburg
sekundär	anti Kaninchen-HRP	1:3.000	(WB)	Amersham, Braunschweig
	anti Maus-HRP	1:3.000	(WB)	Dako, Hamburg
	anti Maus Alexis 488	1:1.000	(IF)	Alexis, Grünberg

WB: Western Blotting

FS: Funktionelle Studie

HRP: konjugiert mit Meerrettichperoxidase

IF: Immunfluoreszenz

3.6 Ras-Aktivitätstest

Dieses Testsystem ist ein Nachweis für die aktivierte Form des Ras Proteins, das in aktivem Zustand GTP gebunden hat. Das Prinzip des Tests beruht auf der Bindung von aktivem Ras-

GTP an RBD, der sog. '*ras binding domain*' des Raf-Proteins und wurde von de Rooij & Bos (1997) beschrieben. Durch Fusion der Ras-Bindedomäne des Raf an Gluthathiontransferase (GST) und anschließender Kopplung des GST-RBD an Glutathion-Agarose kann aktives Ras-GTP, das an diesen Komplex bindet, aus dem Zellysate präzipitiert werden.

3.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurden 5 ml LB-Medium (1% Bacto-Trypton, Difco, Detroit; 0,5% Bacto Hefeextrakt, Difco, Detroit; 1% NaCl) mit Bakterien einer Einzelkolonie (*E.coli DH5 α*) angeimpft und bei 37°C bis zur stationären Phase geschüttelt. 2,5 ml dieser frischen Kultur wurden in 250 ml LB-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C und 7.700 x g (Beckmann JA-10 Rotor) für 8 Minuten zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml vorgekühlter 0,1 M MgCl₂ Lösung resuspendiert, auf ein Volumen von 250 ml mit 0,1 M MgCl₂ aufgefüllt und erneut wie oben zentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in 10 ml vorgekühlter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert, mit der gleichen Lösung auf 250 ml aufgefüllt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien schließlich in 12 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen, 2 ml einer 87%igen Glycerinlösung zugegeben und 1 ml Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die kompetenten Bakterien wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zum späteren Gebrauch gelagert.

3.6.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Für jeden Transformationsansatz wurden 200 μ l kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Die entsprechende DNA (pGEX-2T/GST-RBD bzw. als Negativkontrolle pGEX-2TK nach Herrmann *et al.* 1995) wurde in Aqua dest. gelöst und auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l gebracht. 5 μ l dieser Lösung wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien für 2 Minuten auf 42°C gebracht, 2 Minuten auf Eis abgeschreckt und das vierfache Volumen an SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, Difco; 0,5% Bacto Hefeextrakt, Difco; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose) zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation im 37°C warmen Wasserbad wurden die Bakterien schließlich auf LB-Amp Platten ausplattiert. Diese Bakterienplatten wurden durch die Zugabe von 15 g Bacto-Agar (Difco) pro Liter LB-Medium hergestellt und mit 100 μ g/ml Ampicillin (Boehringer, Mannheim) versehen.

3.6.3 Expression von GST-RBD in *E.coli*

50 ml einer über Nacht-Kultur in LB-Amp (37°C, 220 rpm im Wasserbad) wurden 1:10 in LB-Amp verdünnt und bis OD₅₅₀ = 0,6 - 1 weiter inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Anschließend wurde 2 Stunden bei 37°C und 220 rpm im Wasserbad inkubiert und die Bakterien durch Zentrifugation (10 Minuten bei 7.700 × g und 4°C) geerntet. Das Pellet wurde mit 25 ml PBS mit 0,5 mM DTT, 0,1 µM Aprotinin, 1 µM Leupeptin und 1 µM Pepstatin A resuspendiert. Anschließend wurde drei Mal auf Eis für eine Minute beschallt, zum Lysat Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben und unter vorsichtigem Rühren für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten bei 12.000 × g und 4°C) wurde der Überstand gewonnen und Glycerin bis zu 10% Endkonzentration zugegeben. Das GST-RBD-Lysat wurde portioniert und bei -80°C gelagert.

3.6.4 Ras-Assay: Bindung von Ras-GTP an GST-RBD

Für diesen Versuch wurden Zellen über Nacht in serumfreiem Medium gehungert. Nach den entsprechenden Stimulationen wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% Na-Deoxycholat; 1% NP-40; 0,1% SDS; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 mM PMSF) lysiert. Nach kurzem Beschallen wurde ein Proteintest durchgeführt und je Versuchsansatz Volumina entsprechend 1 mg Gesamtprotein eingesetzt.

Um das GST-RBD an Agarose zu koppeln wurden dann pro Ansatz 50 µl Glutathion-Agarose (Pharmacia) zwei Mal mit Lysispuffer gewaschen und mit 150 µl *E. coli* GST-RBD beladen. Dieser Ansatz wurde dann 30 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundenes Protein abzutrennen wurde die Agarose anschließend drei Mal mit 300 µl Lysispuffer gewaschen (Zentrifugation 1 Minute, 5.000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge). Anschließend wurde ein Aliquot des Zellüberstands entsprechend 1 mg Gesamtprotein zugegeben. Die Bindung des Ras-GTP an RBD erfolgte dann für 2 Stunden bei 4°C im Kühlraum auf einem Überkopfmischer (Reax 2, Heidoph). Nach erneutem Waschen (siehe oben) wurde alle Flüssigkeit mit einer Spritze abgesaugt und 45 µl heißer Probenpuffer zugegeben. Nach kurzem Aufkochen (5 Minuten bei 95°C) konnten die Proben im 12,5%igen Polyacrylamid Gel aufgetrennt und gebundenes Ras-GTP mittels Ras-Immunoblot nachgewiesen werden.

3.7 Immunpräzipitation

Für den Nachweis der Aktivierung des EGF Rezeptors wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden pro Ansatz 1×10^6 MDA-MB-468 Zellen benötigt. Nach den entsprechenden Inkubationen wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und

in 500 µl kaltem Koppräzipitationspuffer (30 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 0,5% Na-Deoxycholat; 10 mM NaF; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 1 mM Natriumvanadat-Lösung) lysiert. Aus dem Lysat wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und dann direkt für die Immunpräzipitation eingesetzt. Für jeden Ansatz wurde die gleiche, maximal mögliche Proteinmenge eingesetzt und mit 40 µl Protein G+ Agarose (Calbiochem) sowie 5 µl anti-EGF Rezeptor Antikörper versehen. Zur Kopplung der EGF Rezeptor-Moleküle an die Agarose wurden die Proben drei Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurde drei Mal mit Koppräzipitationspuffer und ein Mal mit PBS gewaschen, um ungebundene Proteine abzutrennen. Alle Flüssigkeit wurde dann mit einer Spritze abgesaugt. Die gebundenen EGF Rezeptor-Moleküle wurden durch Zugabe von 45 µl Probenpuffer von der Agarose gelöst und zwei Mal für 4 Minuten bei 95°C erhitzt. Der Extrakt wurde dann auf einem 10%igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt.

3.8 Isolierung und Agarosegelelektrophorese apoptotischer DNA Fragmente

Zum Nachweis der für die Apoptose spezifischen internukleosomalem DNA Fragmentierung wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium nach der Behandlung mit PBS gewaschen und mit $200 \times g$ für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet mit 50 µl Lysispuffer (20 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1% NP-40) behandelt. Anschließend wurde das Lysat bei $1.600 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt dann die apoptotischen DNA Fragmente, während sich die intakte DNA im Pellet befand. Die Extraktion der Fragmente wurde noch ein Mal mit der gleichen Menge Lysispuffer wiederholt. Das Pellet wurde verworfen, und zu den vereinigten Überständen wurden 10 µl einer 10%igen SDS-Lösung gegeben. Anschließend folgte der Verdau der RNA mit 20 µl RNase A (Stamm: 20 mg/ml, Sigma) bei 56°C für 2 Stunden. Dann wurde bei 37°C der Proteinverdau mit 25 µl Proteinase K (Stamm: 10 mg/ml, Sigma) für mindestens 2 Stunden durchgeführt. Nach Zugabe von 50 µl 10 M Ammoniumacetat wurde die DNA mit 500 µl eiskaltem, absoluten Ethanol ausgefällt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C. Das Präzipitat wurde dann bei $1.000 \times g$ für 15 Minuten abzentrifugiert und das Pellet ein Mal mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde die DNA in 15 µl Probenpuffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Für die Agarosegelelektrophorese wurden die Proben mit 5 µl DNA Ladepuffer (40% Saccharose; 0,25% Xylencyanol; 0,25% Bromphenolblau) gemischt, für 5 Minuten auf 60°C erhitzt und sofort auf Eis abgeschreckt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte schließlich in einem 1,8%igen Agarosegel in TAE Puffer (40 mM Tris; 1,14% Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,3). Vor dem Gießen des Gels wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) zugegeben. Das Gel lief anschließend bei 2-3 V/cm und wurde nach dem Lauf mit destilliertem Wasser entfärbt bis die Hintergrundfluoreszenz verschwand. Das Gel wurde am

Transilluminator (IL-350-M, Bachofer) unter UV-Licht (320 nm) abfotografiert. Diese Fotos wurden zur Auswertung eingescannt und mit Hilfe des bildverarbeitenden Computerprogrammes Picture Publisher (Micrografx) invertiert. Durch diese Prozedur wurden besonders die niedermolekularen Banden besser sichtbar.

3.9 Untersuchungen zu Aufnahme und Metabolismus von R-N-acetyl

¹⁴C-markiertes R-N-acetyl wurde von Dr. U. Massing (Klinik für Tumorbilogie, Freiburg) hergestellt. Anhand dieser markierten Verbindung wurde exemplarisch die Aufnahme von Alkylphosphocholinen in die Zelle und ihr Abbau bzw. Umbau in der Zelle untersucht.

3.9.1 Extraktion zellulärer Lipide

Die Lipide wurden nach einer Methode modifiziert nach Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 1 ml eines Chloroform / Methanol Gemisches im Verhältnis 1 : 1 ausgeschüttelt und die untere organische Phase in ein frisches Gefäß überführt. In das Ursprungsglas wurde erneut 1 ml eines Chloroform / Methanol Gemisches im Verhältnis 2 : 1 gegeben und wieder ausgeschüttelt. Diese Prozedur wurde noch ein Mal mit einer Chloroform / Methanol Mischung im Verhältnis 4 : 1 wiederholt und die vereinigten organischen Phasen bei 40°C in einem Heizblock unter Stickstoff eingedampft. Die extrahierten Lipide konnten dann in 50 µl eines Gemisches aus Chloroform / Methanol im Verhältnis 2 : 1 aufgenommen werden und für die dünnschichtchromatographische Analyse eingesetzt werden.

3.9.2 Dünnschichtchromatographie

Die Laufkammern wurden am Tag der Auftragung der Extrakte mit den entsprechenden Laufmitteln gesättigt. Die Dünnschichtplatten (SIL G Polygram, Macherey & Nagel) wurden nach dem Vorlauf in Chloroform / Methanol / Triethylamin (2 : 1 : 1) 30 Minuten bei 130°C aktiviert.

Die in Chloroform / Methanol (2 : 1) aufgenommenen Extrakte wurden mit Hilfe eines Auftragegerätes (Automatic TLC Sampler III, CAMAG) aufgetragen.

Der Hauptlauf erfolgte in einem Gemisch aus Chloroform / Methanol / Triethylamin / Wasser im Verhältnis 30 : 35 : 34 : 8. Die Front lief vom Auftragungspunkt bis kurz unter den oberen Plattenrand.

3.9.3 Kupfersulfat-Färbung der Dünnschichtplatten

Die zellulären Lipide wurden auf der Dünnschichtplatte nach einer Methode von Touchstone *et al.* (1981) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Dünnschichtplatten 15 Sekunden in einer

CuSO₄-haltigen Färbelösung bestehend aus 90,6 ml Wasser, 9,5 ml ortho-Phosphorsäure (85%) und 10 g Kupfersulfat getaucht. Die Platte wurde kurz getrocknet und auf einer Wärmeplatte (Thermoplatte S, Desaga) 10 Minuten bei 170°C entwickelt. Die einzelnen Banden wurden dadurch dauerhaft sichtbar.

3.9.4 Autoradiographie

Auf die Dünnschichtplatten wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt. Der Film wurde in einer Fototasche 10 Tage bei -20°C exponiert und anschließend entwickelt.

3.9.5 Aufnahmekinetiken mit ¹⁴C-R-N-acetyl

Für diese Versuchsreihen wurden standardmäßig 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium ausplattiert. Nach der entsprechenden Inkubation wurde die Radioaktivität in den Zellen sowie im Medium bestimmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (HL-60) bzw. trypsinisiert (MDA-MB-468), in 1 ml PBS aufgenommen und getrennt vom Medium in Szintillationsgefäße (Zinsser) überführt. Jedes Gefäß wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick Safe A, Zinsser) gefüllt und gut geschüttelt. Die Proben wurden schließlich im Flüssigkeitsszintillationszähler (1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB) gemessen. Der Anteil der Radioaktivität in Medium bzw. Zellen wurde immer auf die Aktivität im Gesamtansatz bezogen.

3.10 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die zytosolische Calciumkonzentration wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo3/AM gemessen. Hierbei handelt es sich um ein Fluoreszeinderivat, dessen Fluoreszenz nach Bindung von Calcium um das 40-fache ansteigt. Der Farbstoff wird als Acetoxymethylester zu den Zellen gegeben und kann aufgrund seiner Lipophilie in die Zellen eindringen. Eine vorherige Permeabilisierung der Zellen ist somit nicht nötig. Einmal im Zytoplasma angelangt wird der Ester hydrolysiert, verliert so seine lipophilen Eigenschaften und bleibt in den Zellen gefangen.

Die Beladung der Zellen erfolgte in Standardkulturmedium ohne FCS, das mit 10 mM HEPES und 4 mM NaHCO₃ gepuffert und auf pH 7,3 eingestellt war. Zur Beladung wurden 2 µM Fluo3/AM, dem vorher 0,5% (v/v) Pluronsäure zugesetzt worden war, zum Medium gegeben. In diesem Medium wurden die Zellen für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden dann in eiskaltes Meßmedium (mit 10 mM HEPES; 4 mM NaHCO₃; 2 mM CaCl₂; pH 7,3) überführt, zwei Mal gewaschen und 300 µl mit je 3×10^6 Zellen in Mikrotiterplatten (Nunc) gegeben. Die Zellen wurden vor der Messung 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und

schließlich die zytosolische Calciumkonzentration im Fluoreszenzspektrometer (CytoFluor 2300, Millipore, Eschborn) bestimmt. Die Filtereinstellungen lagen für die Anregung bei 485 ± 20 nm und für die Emission bei 530 ± 25 nm. Die freie Calciumkonzentration wurde dann durch die folgende Formel berechnet:

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

k_d ist die Dissoziationskonstante des Farbstoffs (bei Raumtemperatur 450 nM) und F der gemessene Fluoreszenzwert. 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.

3.11 Immunfluoreszenz-Nachweis des Rezeptorcappings des CD95 Rezeptors

Pro Ansatz wurden 1×10^6 BJAB Zellen der Fragestellung entsprechend inkubiert, durch Zentrifugation geerntet und in $10 \mu\text{l}$ reinem FKS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf ein Deckglas ausgestrichen und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Zellen in 4%iger Formaldehydlösung, 2% Essigsäure in PBS, pH 7,2 für 10 Minuten bei 4°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen für eine Stunde mit 8% BSA in PBS behandelt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (anti-CD95, SM1/23, Alexis, $5 \mu\text{g/ml}$ in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 10 Minuten mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundär-Antikörper (Ziege anti-Maus Alexis 488, 1:1000 in PBS, 1% BSA) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut zwei Mal 10 Minuten mit PBS gewaschen, bevor die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert S100, Jena) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm untersucht werden konnten.

4 Ergebnisse

4.1 Beeinflussung des Wachstums von HL-60 Zellen durch Alkylphosphocholine

Die 8 neuen Alkylphosphocholinverbindungen wurden auf ihre Toxizität in Zellkultursystemen von humanen Tumorzellen untersucht. Da das Alkylphosphocholin Et-18-OCH₃ bereits in klinischen Studien Anwendung in der Therapie von Leukämien findet, wurde versucht, für die folgenden Experimente mit den neuen APC-Verbindungen ein anwendungsbezogenes System zu finden. Daher wurden für die Untersuchungen humane Leukämie-Zelllinien gewählt. Die promyelozytische Zelllinie HL-60 ist bereits gut charakterisiert und wird häufig für Zytotoxizitätsstudien und andere Untersuchungen mit Alkylphosphocholin eingesetzt (Civoli *et al.* 1996, Diomede *et al.* 1993, Hoffman *et al.* 1986, Mollinedo *et al.* 1993). Die meisten Versuche dieser Arbeit wurden daher mit dieser Zelllinie durchgeführt.

4.1.1 Wachstumskurven von HL-60 Zellen in Gegenwart von Alkylphosphocholin-Verbindungen

Das Wachstum von HL-60 Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an APC wurde über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in 1 ml Kulturmedium angesetzt und mit steigenden Konzentrationen der APC von 1 μ M bis 50 μ M inkubiert. Nach jeweils 24, 36, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 veranschaulicht.

Alle untersuchten Verbindungen zeigten eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung gegenüber HL-60 Zellen. Bei den Verbindungen S-OH, R-NH₂, R/S-N-acetyl und S-O-acetyl konnte eine Wachstumshemmung schon ab einer Konzentration von 1 μ M beobachtet werden. Eine starke Hemmung war bei Inkubation in Gegenwart von 5 μ M bzw. 10 μ M dieser Verbindungen zu sehen. Lediglich die Verbindungen R-OH und R-O-acetyl zeigten erst in höheren Konzentrationen eine Wirkung. So konnte ein deutlicher zytostatischer Effekt für R-OH erst ab 20 μ M beobachtet werden, und für R-O-acetyl gar erst ab 50 μ M.

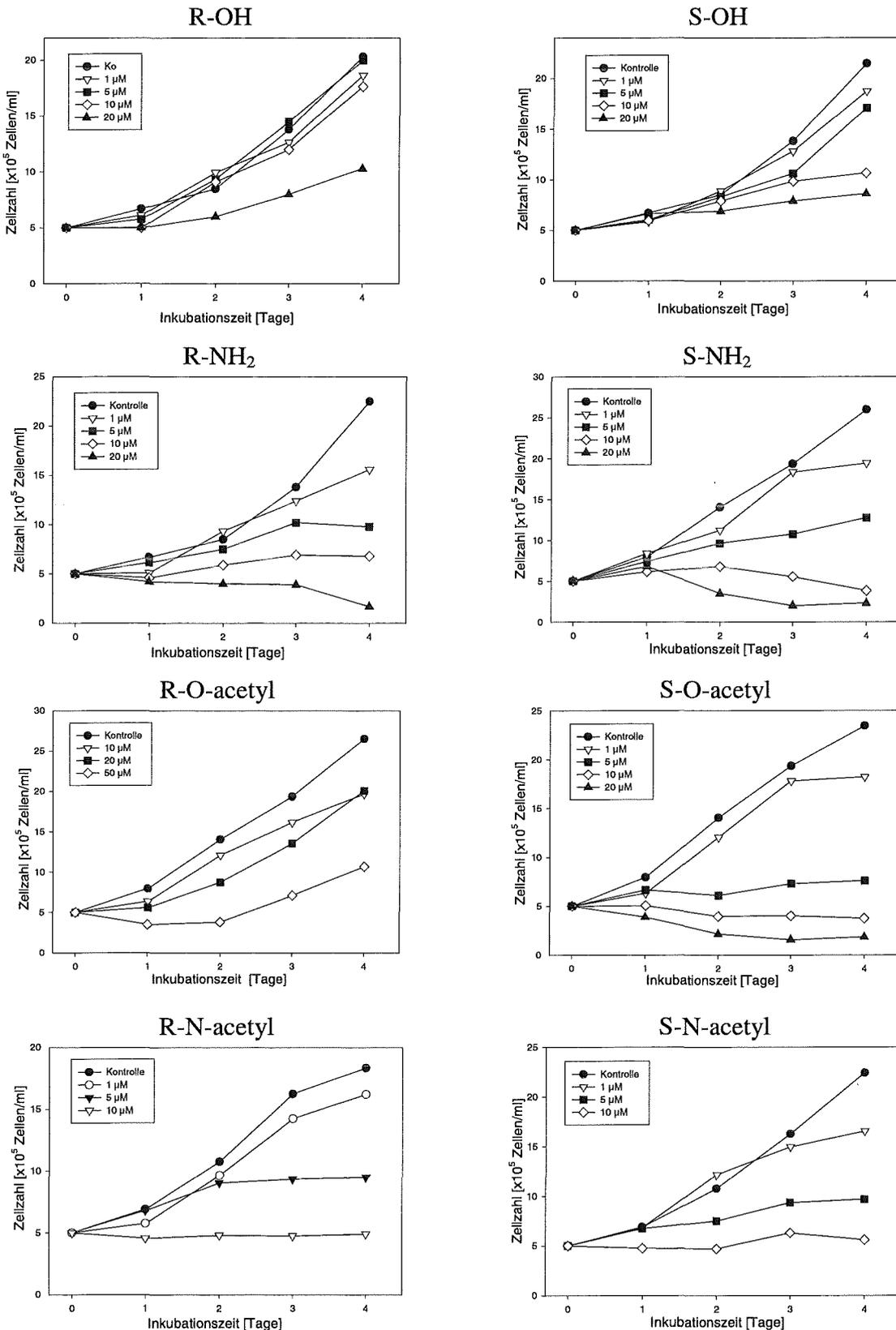


Abb. 5: Wachstumskurven von HL-60 Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Alkylphosphocholinen.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in 1 ml Kulturmedium angesetzt. Die Inkubation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen an APC über einen Zeitraum von 4 Tagen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Standardabweichungen nicht in das Diagramm mit aufgenommen. Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar, die jeweils in Doppelansätzen durchgeführt wurden.

4.1.2 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Um die Wirkung der einzelnen Substanzen besser untereinander vergleichen zu können, wurde nach 48-stündiger Inkubationszeit mit steigenden Konzentrationen an APC die Vitalität der Zellen mit dem Trypanblau-Test bestimmt und als Dosis-Wirkungsbeziehung in Abb. 6 dargestellt. Aus den jeweiligen Meßkurven wurden LD_{50} -Werte berechnet und in Tabelle 3 zusammengefaßt.

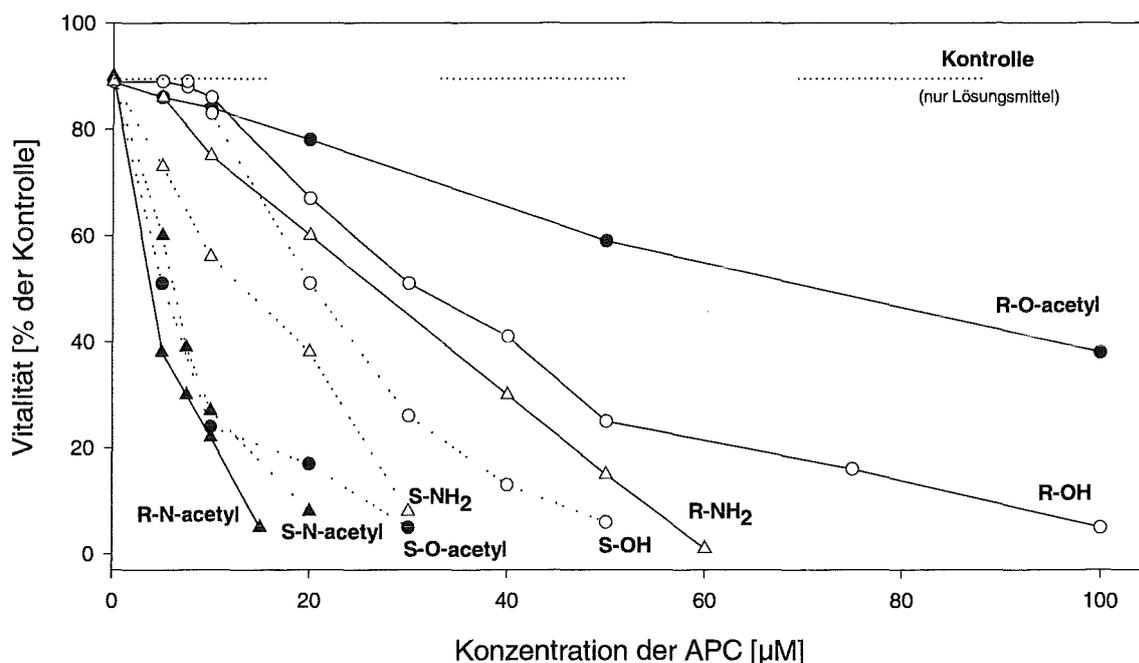


Abb. 6: Dosis-Wirkungsbeziehungen in HL-60 Zellen nach APC Behandlung.

Pro Ansatz wurden 5×10^5 HL-60 Zellen in 1 ml Kulturmedium angesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Vitalität mit Hilfe des Trypanblau-Tests bestimmt.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Standardabweichungen nicht in das Diagramm mit aufgenommen. Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar, die jeweils in Doppelansätzen durchgeführt wurden.

Von den untersuchten Verbindungen wies R-N-acetyl die größte Toxizität gegenüber HL-60 Zellen auf ($LD_{50} = 4 \mu\text{M}$). S-O-acetyl und S-N-acetyl waren ähnlich wirksam ($LD_{50} = 5 \mu\text{M}$ bzw. $LD_{50} = 7 \mu\text{M}$). Die Aminoverbindungen zeigten LD_{50} -Werte von $26 \mu\text{M}$ für das R-NH₂ und $13 \mu\text{M}$ für das S-konfigurierte Isomer S-NH₂. Für die Hydroxy-Verbindung R-OH und S-OH wurden LD_{50} -Werte von $30 \mu\text{M}$ bzw. $21 \mu\text{M}$ bestimmt. Bei den Hydroxy- und auch den Amino-Verbindungen zeigten die S-konfigurierten Substanzen eine erheblich größere Toxizität gegenüber HL-60 Zellen als ihre R-konfigurierten Isomere. Besonders auffällig war dieser konfigurationsbedingte Unterschied der LD_{50} -Werte bei dem O-acetyl-Isomerenpaar S-O-acetyl und dem R-konfigurierten Gegenstück R-O-acetyl. Während für das S-konfigurierte APC ein LD_{50} -Wert von $7 \mu\text{M}$ bestimmt wurde, lag der des R-konfigurierten Isomers um den Faktor 10 höher ($LD_{50} = 68 \mu\text{M}$). Bei diesem Isomerenpaar wurde sehr deutlich, welche Unterschiede in der Toxizität von R- (natürlich) gegenüber S- (unnatürlich) konfigurierten der APC bestehen kann.

Tab. 3: LD₅₀-Werte der neuen Alkylphosphocholine

Substanz	LD ₅₀ [µM]
R-O-acetyl	68
R-OH	30
R-NH ₂	26
S-OH	21
S-NH ₂	13
Et-18-OCH ₃	12
HePC	7,5
S-O-acetyl	7
S-N-acetyl	5
R-N-acetyl	4

5 × 10⁵ HL-60 Zellen in 1 ml Kulturmedium wurden mit steigenden Konzentrationen an APC inkubiert. LD₅₀-Werte der einzelnen APC wurden aus Dosis-Wirkungskurven nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bestimmt.

Alle APC zeigten einen dosisabhängigen zytostatischen Effekt gegenüber HL-60 Zellen.

Um die Wirksamkeit der neuen APC mit bereits bekannten APC vergleichen zu können, wurden HePC und Et-18-OCH₃ in diesem Testsystem ebenfalls untersucht. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wurde für Et-18-OCH₃ ein LD₅₀-Wert von 12 und für HePC ein LD₅₀-Wert von 7,5 bestimmt (Tab. 3).

R-N-acetyl war die aktivste der hier untersuchten Verbindungen. Für viele der folgenden Versuche wurde daher R-N-acetyl exemplarisch als potentester Vertreter der hier untersuchten Gruppe der Alkylphosphocholine eingesetzt. Jedoch wurden stichprobenartig auch andere APC verwendet (meist S-O-acetyl oder S-N-acetyl), um Ergebnisse zu bestätigen.

4.2 Aufnahme von APC in die Zelle

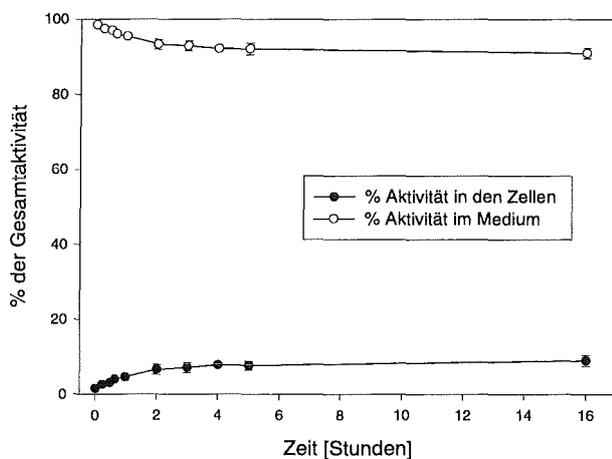
Es sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß und in welchem zeitlichen Ablauf die synthetischen Lipide von den Zellen aufgenommen wurden. Für diese Untersuchungen wurde die Verbindung R-N-acetyl ausgewählt und im Essigsäurerest radioaktiv mit ¹⁴C markiert.

Die Aufnahmeversuche wurden in HL-60 Zellen und zusätzlich in MDA-MB-468 Zellen durchgeführt. HL-60 Zellen, die in Suspensionskultur wachsen, sollten als Modell für Leukämiezellen dienen, und die adhärent wachsende Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 sollte als ein Modell für solide Tumore herangezogen werden.

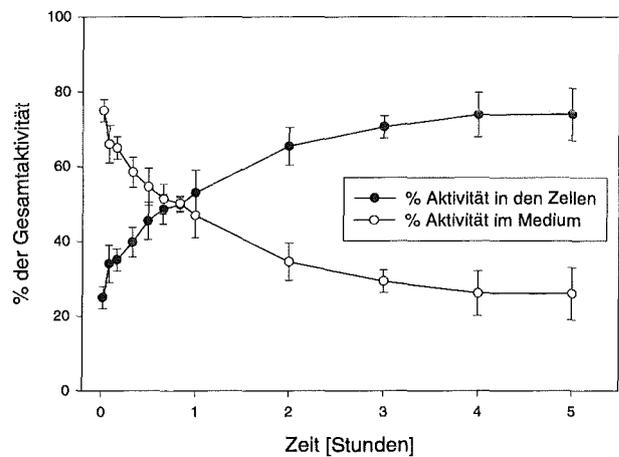
Standardmäßig wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium angesetzt und mit $0,05 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -R-N-acetyl für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Aktivität im Medium und im Zellpellet bestimmt und auf die Gesamtaktivität im jeweiligen Ansatz bezogen. Die zugegebene Menge von $0,05 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -R-N-acetyl entsprach etwa einer Endkonzentration von $7 \mu\text{M}$ im Versuchsansatz.

Um eventuelle Bindung des synthetischen Lipids an Serumbestandteile im Medium (z. B. Albumine) zu überprüfen, wurden die Aufnahmekinetiken zusätzlich zu dem normalen Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie auch in serumfreiem Medium (0% FKS) durchgeführt.

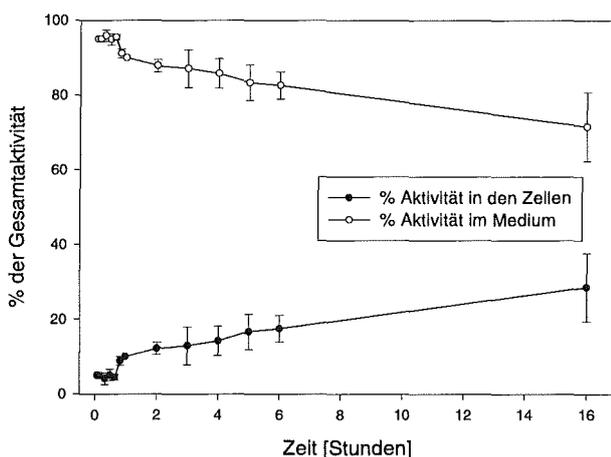
a) HL-60 Zellen in Kulturmedium



b) HL-60 Zellen, serumfrei



c) MDA-MB-468 Zellen in Kulturmedium



d) MDA-MB-468 Zellen, serumfrei

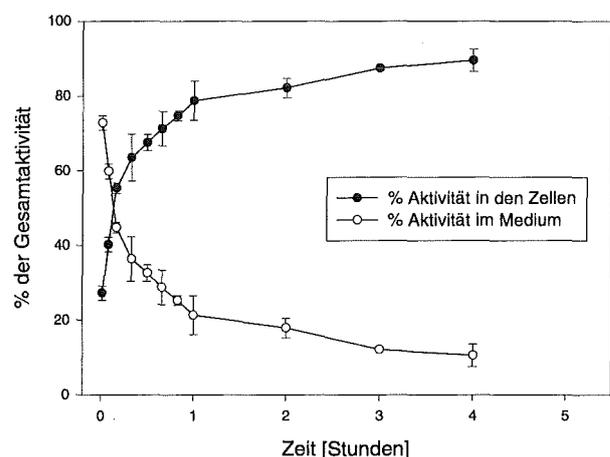


Abb. 7: Aufnahme von ^{14}C -R-N-acetyl in HL-60 und MDA-MB-468 Zellen.

Standardmäßig wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium angesetzt. Das markierte Lipid wurde mit Medium vermischt und als solches Markierungsmedium zu den Zellen gegeben. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Aktivität im Medium und in den Zellen bestimmt. Die angegebenen Meßwerte beziehen sich auf die gemessene Gesamtaktivität in den einzelnen Ansätzen. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten dar, die jeweils in Doppelsätzen durchgeführt wurden.

Die angebotenen Lipide wurden erstaunlich schlecht von den Zellen aufgenommen (Abb. 7). Nach 16-stündiger Inkubation in serumhaltigen Kulturmedium war in HL-60 Zellen nur etwa 8% des ^{14}C -R-N-acetyl zu finden, während 92% im Medium geblieben war (Abb. 7a). In MDA-MB-468 Zellen waren nach 16 Stunden immerhin 25% des markierten Lipids zu finden (Abb. 7c).

Es mußte also davon ausgegangen werden, daß Bestandteile im Medium stark mit den Zellen um die angebotenen Lipide konkurrieren, die daher nur schlecht in Zellmembranen eingelagert werden können. Daher war es besonders interessant, die Aufnahmeversuche unter serumfreien Bedingungen zu wiederholen.

Bei der Inkubation der Zellen mit $0,05 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -R-N-acetyl (entsprechend etwa $7 \mu\text{M}$) in Medium ohne Serum zeigte sich, daß diese Konzentration besonders für HL-60 Zellen akut toxisch war (Daten nicht gezeigt). Bei der folgenden Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium wurde daher nur ein Viertel der Aktivität eingesetzt, um zu gewährleisten, daß die Zellen nicht lysierten.

Unter serumfreien Bedingungen wurden die Lipide in beiden Zelllinien besser aufgenommen als in normalem, serumhaltigen Kulturmedium. HL-60 Zellen hatten nach 5 Stunden etwa 75% der Lipide inkorporiert (Abb. 7b), und MDA-MB-468 Zellen hatten bereits nach 3 Stunden 85% der Lipide aufgenommen (Abb. 7d).

Auffallend war auch, daß MDA-MB-468 Zellen im Vergleich zu HL-60 Zellen die Lipide schneller und besser aufnahmen. MDA-MB-468 Zellen hatten bereits nach 10 Minuten die Hälfte der angebotenen Aktivität aufgenommen (Abb. 7d), während HL-60 Zellen dafür fast eine Stunde gebraucht haben (Abb. 7b).

4.3 Untersuchungen zum Metabolismus von R-N-acetyl in HL-60 Zellen

Der primäre Angriffsort von Alkylphosphocholinen ist die Plasmamembran von Tumorzellen. Dort sind APC dem Angriff phospholipidmetabolisierender Enzyme ausgesetzt. Eines der Ziele bei der Synthese neuer Alkylphosphocholine war es, Verbindungen herzustellen, die eine möglichst lange Halbwertszeit innerhalb der Zellen haben. Deshalb wurde versucht funktionelle Gruppen, an denen phospholipidmetabolisierende Enzyme angreifen könnten, chemisch so zu modifizieren, daß ein Abbau der Verbindungen innerhalb der Zelle erschwert wird. Im Vergleich zu 'normalen' Phospholipiden zeigen die hier verwendeten Alkylphosphocholine schlechte Substrateigenschaften für Phospholipase C (Massing & Eibl 1994b) und ein Angriffspunkt für die PLA_2 fehlt bei den S-konfigurierten Esterverbindungen und bei allen Amidverbindungen (Massing, unveröffentlichte Daten). Daher sollte angenommen werden, daß APC nur in geringem Maße umgesetzt werden und länger in der Membran bleiben.

Mit ^{14}C -markiertem R-N-acetyl sollte untersucht werden, wie stabil diese Verbindung tatsächlich innerhalb der Plasmamembran ist, bzw. ob ein Abbau oder Umbau stattfindet.

Dazu wurden HL-60 Zellen mit ^{14}C -R-N-acetyl inkubiert und nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden alle Lipide durch Lipidextraktion aus den Zellen gewonnen. Die verschiedenen Lipidklassen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und konnten dann durch Färbung mit einer Kupfersulfat-Lösung sichtbar gemacht werden. Ein Beispiel für eine solche Dünnschichtchromatographie mit anschließender Kupfersulfat-Färbung ist in Abb. 8 gezeigt. Das Bandenmuster von Extrakten aus HL-60 Zellen ist im Vergleich zu verschiedenen Lipidstandards zu sehen. Alkylphosphocholine laufen in diesem dünn-schichtchromatographischen System langsam. Die Banden der Alkylphosphocholine erscheinen als unterste Bande etwa auf der gleichen Höhe mit zellulären Lysophospholipiden wie z.B. Lysophosphatidylcholin.

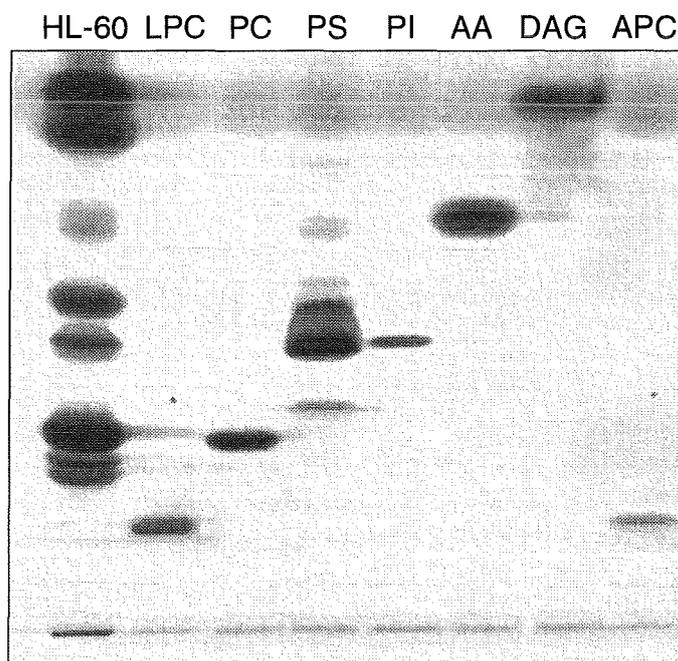


Abb. 8: Dünnschichtchromatographische Auftrennung zellulärer Lipide und Vergleich mit Lipidstandards.

HL-60: Extrakt aus 3×10^6 HL-60 Zellen; LPC: Lysophosphatidylcholin; PC: Phosphatidylcholin; PS: Phosphatidylserin; PI: Phosphatidylinositol; AA: Arachidonsäure; DAG: Diacylglycerol; APC: Alkylphosphocholin R-OH. Es wurden je $10 \mu\text{g}$ der einzelnen Standards aufgetragen.

Um das ^{14}C -R-N-acetyl zu detektieren, wurde nach der Kupfersulfat-Färbung eine Autoradiographie mit der Dünnschichtplatte durchgeführt. R-N-acetyl färbt nur schlecht mit Kupfersulfat-Lösung an und kann daher nur im Autoradiogramm gesehen werden.

Das markierte R-N-acetyl war als dicke Bande im unteren Teil der Autoradiographie zu erkennen (Abb. 9b). Die Intensität dieser Bande nahm im Laufe von 48 Stunden Behandlung nur unmerklich ab. Jedoch erschienen nach 16-stündiger Inkubation auch Banden im oberen Teil der Dünnschichtplatte. Eine besonders deutliche Bande lief in der Laufmittelfront mit, aber es konnten auch dünne Banden in der Mitte der Platte erkannt werden. Diese Banden

waren allerdings sehr schwach und konnten erst nach 10-tägiger Belichtung des Röntgenfilms detektiert werden. Offensichtlich wurde das markierte R-N-acetyl in geringem Maß ab- oder umgebaut, so daß Radioaktivität auch in anderen Lipiden zu finden war. Bei diesem Versuchsansatz kann nicht bestimmt werden, zu welchen Lipiden diese Banden gehören. Auffällig war aber das Erscheinen **mehrerer** Banden, die in ihrem Verlauf dem Muster von Zellextrakten ähneln, das durch Färbung aller zellulärer Lipide erhalten wurde (Abb. 9a). Es hatte den Anschein, als wäre die von R-N-acetyl stammende Aktivität in verschiedenen Lipiden wiederzufinden.

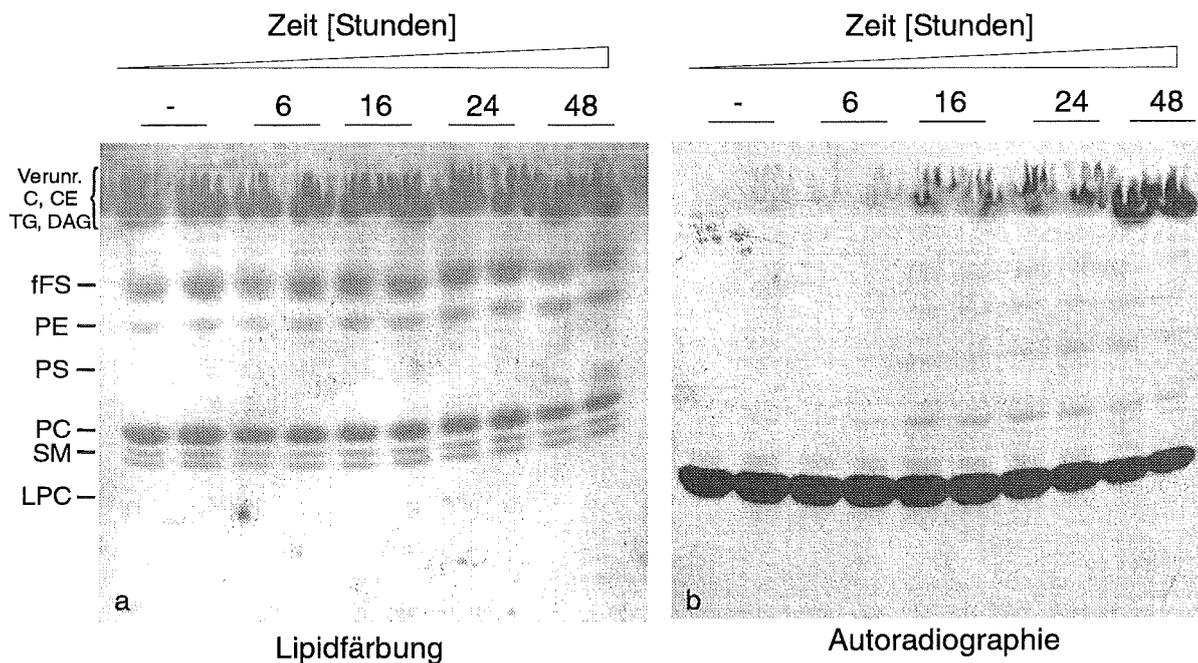


Abb. 9: Dünnschichtchromatographische Auftrennung zellulärer Lipide nach Behandlung mit ^{14}C -R-N-acetyl und anschließende Autoradiographie.

1×10^6 HL-60 Zellen wurden mit $7 \mu\text{M}$ ($0,05 \mu\text{Ci}$) ^{14}C -R-N-acetyl gemäß den angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die zellulären Lipide extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und eine Autoradiographie durchgeführt.

a) Kupfersulfat-Färbung der Dünnschichtplatte. Zu sehen sind die zellulären Lipide.

b) Autoradiographie derselben Platte. Zu sehen sind radioaktiv markierte Lipide.

Verunr.: Verunreinigungen; C: Cholesterin; CE: Cholesterinester; TG: Triglyceride; DAG: Diacylglycerol; fFS: freie Fettsäuren; PE: Phosphatidylethanolamin; PS: Phosphatidylserin; PC: Phosphatidylcholin; SM: Sphingomyelin; LPC: Lysophosphatidylcholin.

4.4 Untersuchungen zur APC-induzierten zellulären Signaltransduktion

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß Phospholipide nicht nur am Membranaufbau beteiligt sind, sondern auch signalübermittelnde Eigenschaften besitzen. Abkömmlinge bzw. durch Phospholipasen generierte Hydrolyseprodukte von Phospholipiden können im Zytosol als sekundäre Signalmoleküle oder deren Vorstufen wirken (zusammengefaßt in Exton 1994, Liscovitch & Cantley 1994). So führt beispielsweise die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zur Bildung von Inositol 1,4,5,-Trisphosphat, das intrazelluläres Calcium freisetzt, und 1,2-Diacylglycerin, das die verschiedenen Isoformen der Protein Kinase C aktivieren kann. Das durch Sphingomyelinase aus Sphingomyelin freigesetzte Ceramid kann das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflussen und auch Apoptose induzieren. Die von der Phospholipase A₂ (PLA₂) freigesetzten Fettsäuren (meistens Arachidonsäure) sind Vorläufer für Signalmoleküle wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene. Ein weiteres, wichtiges Signalmolekül aus der Familie der Lipidabkömmlinge ist die durch PLA₂ aus Phosphatidsäure freigesetzte Lysophosphatidsäure (LPA; 1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphat). LPA ist das kleinste natürlich vorkommende Lysophospholipid und daher strukturell den Alkylphosphocholinen verwandt. Es stellte sich die Frage, ob Alkylphosphocholinen ähnliche Signalfunktionen zukommen wie beispielsweise LPA. LPA ist ein Mitogen, das von aktivierten Plättchen freigesetzt wird (Eichholtz *et al.* 1993) und in Konzentrationen von 1 µM bis 5 µM im Serum vorliegt (Moolenaar 1994). LPA hat hormon- und wachstumsfaktorähnliche Funktionen und regt Zellen zur Proliferation an (Jalink *et al.* 1994, Moolenaar *et al.* 1997).

Dosis-Wirkungsuntersuchungen mit den Alkylphosphocholinen hatten aber gezeigt, daß diese Verbindungen stark toxisch sind (s. Abb. 6) und somit eine entgegengesetzte Wirkung wie die natürlich vorkommenden Verwandten LPA hatten. Es sollte daher untersucht werden, ob APC ähnliche oder andere Signalwege auslösen als LPA, und wo eine unterschiedliche Regulation der Signaltransduktion zu sehen ist.

4.4.1 APC aktivieren die MAP Kinasen ERK1/2

Die Vertreter der Mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAP Kinasen) sind bekannte Mediatoren bei mitogenen Vorgängen und Differenzierung. Die *extracellular regulated kinases* (ERK's) sind die zuerst entdeckten Vertreter der MAP Kinase Familie. Sie stehen am Ende einer Protein Kinase Kaskade und können nach der Aktivierung in den Kern transloziert werden und dort Transkriptionsfaktoren wie c-Myc und c-Fos phosphorylieren (Übersicht in Treisman 1996). Von den ERK's 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 ERK-Isoformen erfolgt durch die bispezifischen MAP Kinase Kinasen MEK-1 und MEK-2, die beide ERK-Isoformen an Tyrosin-185 und auch an Threonin-183 phosphorylieren. Diese Phosphorylierung der ERK hat im SDS-Gel eine verminderte

Laufgeschwindigkeit der Proteine zur Folge. Im Western Blot können daher die aktive, phosphorylierte und die inaktive, nicht-phosphorylierte Form der ERK gleichzeitig nachgewiesen werden. Es werden zwei Banden sichtbar, wobei es sich bei der oberen Bande um die phosphorylierte Form (p-ERK) und bei der unteren Bande um die nicht-phosphorylierte Form der ERK handelt.

LPA aktiviert diese ERK MAP Kinase Kaskade über einen rezeptorvermittelten, G-Protein abhängigen Prozeß und regt so Zellen zur Proliferation an (Cadwallar *et al.* 1997, Moolenaar *et al.* 1997). In jüngster Zeit wurde sogar für LPA ein eigener Plasmamembranrezeptor identifiziert, über den das Phospholipid die ERK MAP Kinase Kaskade auslösen kann (van der Bend *et al.* 1992). LPA kann aber ebenfalls zur Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie beispielsweise den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF Rezeptor) oder den *platelet derived growth factor* (PDGF) Rezeptor führen (Daub *et al.* 1996, Herrlich *et al.* 1998).

Es sollte nun überprüft werden, ob Alkylphospholipide ähnlich wie LPA Rezeptoren und nachgeschaltete Kinasen aktivieren können und inwiefern sich deren Aktivierungsmuster von denen des LPA unterscheiden.

Für diese Versuchsreihen wurde neben LPA auch epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) als Positivkontrolle verwendet, der über den entsprechenden Rezeptor eine Signalkaskade auslöst, die zur Aktivierung der ERK's führt und Zellen zum Wachstum anregt.

4.4.1.1 Kinetik der R-N-acetyl-induzierten ERK2 Aktivierung in HL-60 Zellen

Die Aktivierung der MAP Kinase Isoform ERK2 verlief nach Behandlung von HL-60 Zellen mit R-N-acetyl zeit- und konzentrationsabhängig. Bei Behandlung mit 50 µM R-N-acetyl wurde bereits nach einer Minute eine Zunahme der Menge phosphorylierter 42 kD ERK2 festgestellt (Abb. 10). Nach 3 bis 5 Minuten erreichte die Aktivierung ein Maximum und fiel dann wieder auf das Ausgangsniveau ab. Bereits nach 10 Minuten war keine Aktivierung von ERK2 mehr zu beobachten. Nach 5-minütiger Behandlung mit 25 µM LPA war ebenfalls eine deutliche ERK2-Aktivierung zu beobachten.

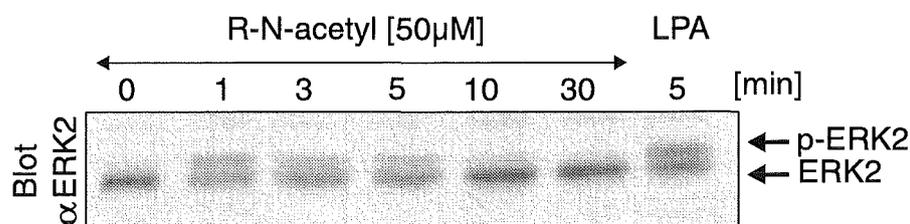


Abb. 10: Kinetik der ERK2 Aktivierung nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 50 µM R-N-acetyl.

LPA: 25 µM LPA, 5 Minuten. Der Nachweis erfolgte im Western Blot unter Verwendung von anti-ERK2 Antikörpern. Die aktive, phosphorylierte Form der ERK2 (p-ERK2) erscheint oberhalb der unphosphorylierten, inaktiven ERK2.

4.4.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der APC-induzierten ERK Aktivierung

Diese APC-induzierte Aktivierung der ERK2 war konzentrationsabhängig (Abb. 11). Steigende Konzentrationen an R-N-acetyl von 10 μM bis zu 100 μM wurden eingesetzt und die Aktivierung von ERK2 bestimmt. Es wurde eine Inkubationszeit von 3 Minuten gewählt, da zu diesem Zeitpunkt nach Inkubation mit 50 μM R-N-acetyl eine deutliche Aktivierung zu sehen war (Abb. 10). Mit steigender R-N-acetyl Konzentration nahm das Signal der phosphorylierten ERK2 gegenüber dem der unphosphorylierten Form zu.

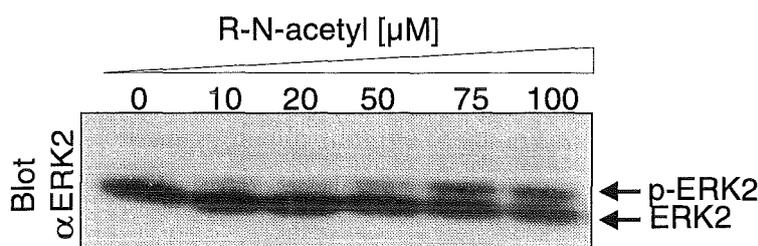


Abb. 11: Konzentrationsabhängigkeit der ERK2 Aktivierung in HL-60 Zellen.
Die Inkubation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen an R-N-acetyl für 3 Minuten.

4.4.1.3 Vergleich der APC- mit der LPA-induzierten ERK Aktivierung

Für Lysophosphatidsäure wird in der Literatur eine biphasische ERK Aktivierung beschrieben. Ein erstes, kurzfristiges, Signal wird nach einigen Minuten beobachtet, und eine zweite, länger andauernde, Aktivierungsphase nach Ablauf von 2 bis 3 Stunden. Diese zweite Aktivierungsphase ist offensichtlich für die wachstumsstimulierende Wirkung der LPA verantwortlich. Wofür die erste Aktivierungsphase dient, ist nicht klar (Cook & McCormick 1996). Es war daher wichtig zu wissen, ob eine solche biphasische ERK Aktivierung auch bei der Behandlung mit Alkylphosphocholinen beobachtet werden kann (Abb. 12). Nach 3 Minuten war wieder eine deutliche transiente Aktivierung der ERK2 zu erkennen, eine weitere Aktivierung trat jedoch innerhalb eines Zeitraumes von bis zu 5 Stunden nicht mehr auf.

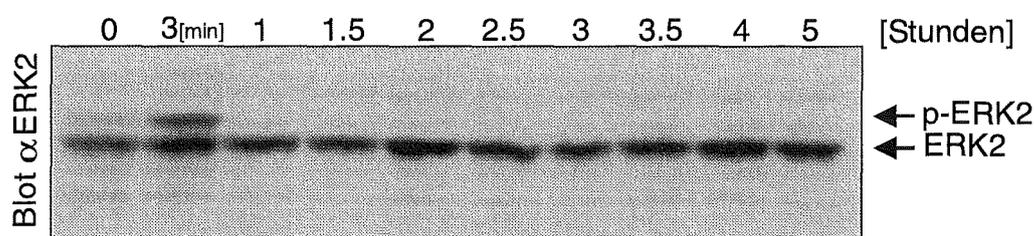


Abb. 12: Die APC-induzierte ERK2 Aktivierung ist nicht biphasisch.
Die Inkubation erfolgte gemäß den angegebenen Zeiten mit 50 μM R-N-acetyl. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit anti-ERK2 Antikörpern.

Die zweite Aktivierungsphase, die bei LPA für die wachstumsstimulierende Wirkung verantwortlich ist, blieb bei APC-Behandlung aus.

4.4.2 Effekt von Pertussis Toxin auf die APC-induzierte ERK Aktivierung

Weiterhin wurde untersucht, ob die APC-induzierte ERK Aktivierung ein G-Protein-vermittelter Prozeß ist. HL-60 Zellen wurden mit Pertussis Toxin, dem Gift des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*, vorbehandelt. Pertussis Toxin unterbricht die Signaltransduktion durch ADP-Ribosylierung bestimmter G-Proteine (Bokoch *et al.* 1984). Es ist daher ein geeignetes Instrument zur Untersuchung der Beteiligung von G-Proteinen an rezeptorvermittelten, zellulären Vorgängen. Für diesen Versuch wurden differenzierte HL-60 Zellen verwendet, die im Laufe der Differenzierung einen Rezeptor für das chemotaktische Peptid fMLP ausbilden (Klinker *et al.* 1996). fMLP kann dann über diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor eine Aktivierung der ERK MAP Kinasen bewirken (Worthen *et al.* 1994) und diente hier als Beispiel eines G-Protein abhängigen, Pertussis Toxin-sensitiven ERK Stimulus. Das Calciumionophor A23187 diente als Kontrollstimulus für eine G-Protein-unabhängige ERK Aktivierung. A23187 bewirkt eine ERK Aktivierung durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die sich nicht durch Pertussis Toxin hemmen läßt.

In diesem Testsystem wurde nun der Einfluß von Pertussis Toxin auf die R-N-acetyl induzierte ERK Aktivierung untersucht. Abb. 13 zeigt deutlich, daß sich sowohl die fMLP-, als auch die R-N-acetyl-induzierte ERK Aktivierung durch Pertussis Toxin hemmen ließen. Dagegen war die G-Protein-unabhängige ERK Aktivierung erwartungsgemäß durch Pertussis Toxin nicht hemmbar.

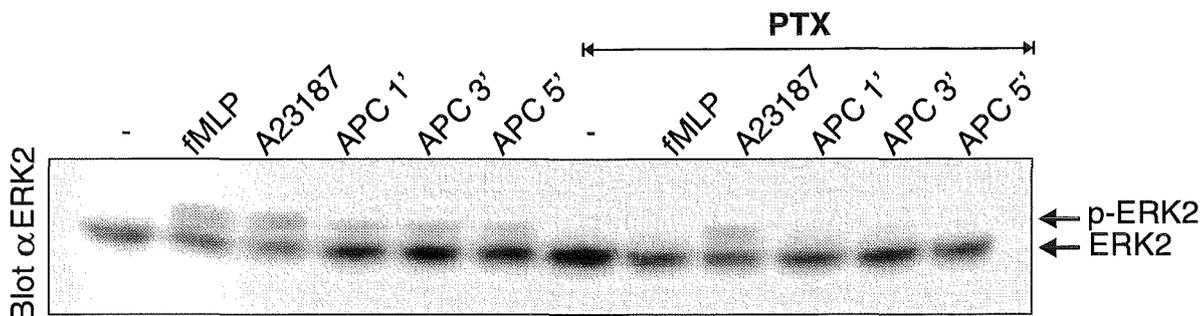


Abb. 13: Hemmung der R-N-acetyl induzierten ERK2 Aktivierung in differenzierten HL-60 Zellen durch Pertussis Toxin.

fMLP: 1 μ M, 5 Minuten; A23187: 10 μ M, 10 Minuten; APC: R-N-acetyl, 50 μ M; PTX: Vorbehandlung der Zellen mit 0,5 μ g/ml Pertussis Toxin, 3 Stunden. Die Inkubation mit R-N-acetyl wurde gemäß den angegebenen Zeiten (1, 3 und 5 Minuten) durchgeführt. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit anti-ERK2 Antikörpern.

4.4.3 Aktivierung von p21 Ras

Neben der MAP Kinase ERK2 könnten auch andere Vertreter der MAP Kinase Signalkaskade durch Alkylphosphocholine aktiviert werden. Das Protein p21 Ras ist ein Knotenpunkt an der Plasmamembran bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale von Plasmamembranrezeptoren auf Proteinkinasen der MAP Kinase Familie (Belka *et al.* 1995, Wiesmüller & Wittinghofer 1994). Ras ist eine kleine GTPase, die in einer GDP-bindenden, inaktiven und einer GTP-bindenden, aktiven Form vorliegen kann. Der Bindungspartner von Ras-GTP ist das Raf Protein, das ausschließlich aktives Ras, d.h. Ras-GTP erkennt. Auf diesem Prinzip beruht der Versuchsansatz. Ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) mit der Ras-Bindungsdomäne des Raf (RBD) wurde benutzt, um aktives Ras-GTP aus dem Zellysate zu binden. Unter Verwendung von Glutathion-Agarose konnte der Komplex aus dem GST-RBD-Fusionsprotein mit gebundenem Ras-GTP aus dem Zellysate präzipitiert und im Western Blot mit spezifischen anti-Ras Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 14).

Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit R-N-acetyl zeigte sich ein zeitliches Aktivierungsmuster, wie es schon bei der MAP Kinase ERK2 beobachtet worden war. Bereits nach einer Minute konnte eine Aktivierung des Ras nachgewiesen werden. Diese Aktivierung war nach 3 bzw. 5 Minuten noch deutlich wahrzunehmen, nahm jedoch nach 10 Minuten wieder ab und sank dann sogar unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle ab.

Als Positivkontrollen wurden LPA und EGF eingesetzt. Behandlung mit 25 μ M LPA führte zu einer starken Ras-Aktivierung nach bereits einer Minute, die nach 5 Minuten wieder leicht abnahm. Die Behandlung mit 20 ng/ml EGF führte ebenfalls zu einer Ras-Aktivierung, die auch nach 5 Minuten wieder abnahm, jedoch insgesamt nicht so stark wie die LPA-induzierte Ras Aktivierung war.

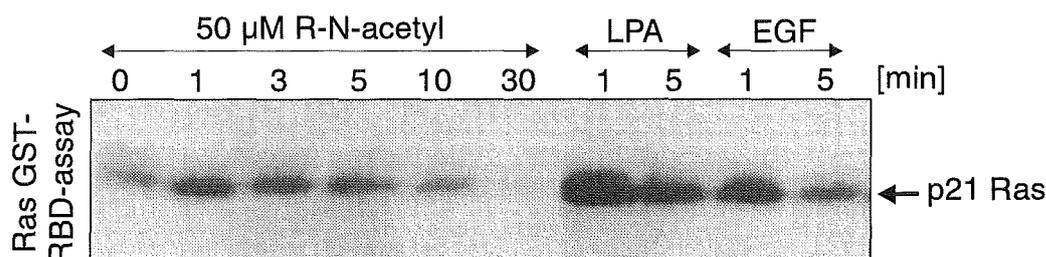


Abb. 14: Aktivierung von p21 Ras in HL-60 Zellen.

Die Inkubation erfolgte gemäß den angegebenen Zeiten. LPA: 25 μ M, EGF: 20 ng/ml. Der Nachweis von Ras-GTP erfolgte im GST-RBD-Bindungs Assay und anschließendem Western Blot unter Verwendung spezifischer anti-Ras Antikörper.

4.4.4 ERK Aktivierung in MDA-MB-468 Zellen

Das Ras-Protein ist als wichtiger Knotenpunkt bei der Übertragung von Signalen von Plasmamembranrezeptoren auf zytosolische Effektorkinasen bekannt. Da eine Aktivierung des Ras in APC-behandelten HL-60 Zellen gefunden worden war, sollte überprüft werden, ob *upstream* von Ras auch Plasmamembranrezeptoren durch APC aktiviert werden können. Für

diese Versuche wurden MDA-MB-468 Zellen herangezogen, da diese im Vergleich zu HL-60 Zellen eine gut untersuchte Rezeptorausstattung haben (Pathak *et al.* 1979). MDA-MB-468 Zellen überexprimieren, wie viele andere Tumorzelllinien, den EGF Rezeptor (Filmus *et al.* 1985). Da von LPA bekannt ist, daß es die Ras/Raf/MAP Kinase Kaskade durch Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie etwa EGF Rezeptor oder PDGF-Rezeptor auslösen kann (Daub *et al.* 1996, Herrlich *et al.* 1998), wurde überprüft ob APC auch in der Lage sind, solche Rezeptoren zu aktivieren.

Zuerst wurde überprüft, ob APC auch in MDA-MB-468 Zellen in der Lage sind, eine ERK Aktivierung zu bewirken. Es zeigte sich, daß auch in dieser Zelllinie die Behandlung mit R-N-acetyl zu einer Aktivierung der ERK führte (Abb. 15). Nach 3 Minuten Behandlung mit 50 µM R-N-acetyl war die phosphorylierte Form der ERK2 deutlich zu erkennen. In MDA-MB-468 Zellen hielt die Aktivierung jedoch etwas länger an als in HL-60 Zellen und die Dephosphorylierung von ERK2 war erst nach etwa 30 Minuten zu beobachten. Behandlung von MDA-MB-468 Zellen mit EGF führte ebenfalls zu einer ERK2 Aktivierung, die jedoch länger anhielt und nach 30 Minuten noch nicht abgeklungen war.

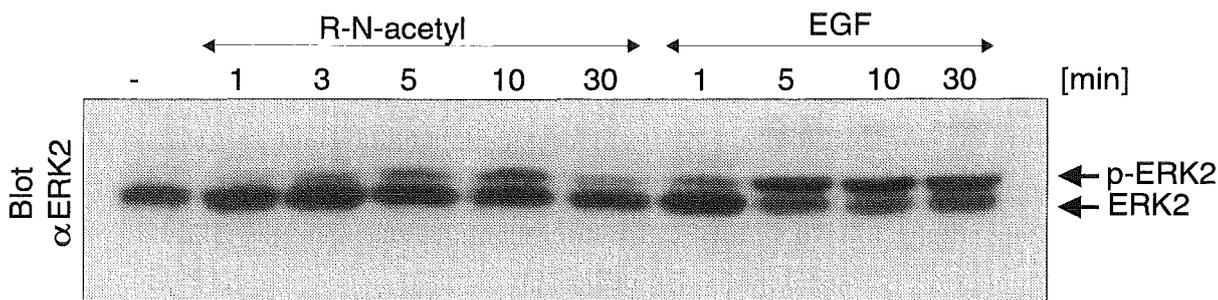


Abb. 15: ERK2-Aktivierung durch R-N-acetyl in MDA-MB-468 Zellen.

R-N-acetyl: 50 µM; EGF: 20 ng/ml. Die Inkubation erfolgte gemäß den angegebenen Zeiten, der Nachweis im Western Blot mit anti-ERK2 Antikörpern.

4.4.5 Tyrosinphosphorylierungen durch R-N-acetyl in MDA-MB-468 Zellen

Rezeptoren, wie beispielsweise der EGF Rezeptor oder PDGF-Rezeptor, werden oft durch Phosphorylierung an Tyrosinresten aktiviert (zusammengefaßt in Fantl *et al.* 1993). Daher wurde untersucht, ob sich nach Behandlung von MDA-MB-468 Zellen mit APC eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus zellulärer Proteine einstellt. Proteinextrakte aus behandelten Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und Phosphorylierungen im Western Blot mit anti-Phosphotyrosin Antikörpern nachgewiesen. Im Vergleich mit Extrakten aus unbehandelten Kontrollzellen konnten dann im Falle von Protein-Tyrosinphosphorylierungen unterschiedliche Bandenmuster in den einzelnen Ansätzen erkannt werden. Bei solch einem Versuchsansatz kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, um welche Proteine es sich handelt.

Abbildung 16 zeigt einen solchen Phosphotyrosin-Blot. In unbehandelten Kontrollzellen waren kaum Banden zu erkennen. Nach Behandlung der Zellen mit EGF wurde jedoch ein

deutliches Signal sichtbar, das von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 180 kD herrührte. Auf der gleichen Höhe erschienen auch Banden nach Behandlung mit R-N-acetyl oder LPA, wenn auch erheblich schwächer. Zudem trat nach Behandlung mit LPA eine Bande von Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 135 kD auf, die nach EGF-Behandlung nicht zu sehen war. Dieses Phänomen ist bereits von Jalink *et al.* (1994) beschrieben worden. Diese Bande wird auf die Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) zurückgeführt. Nach Behandlung mit R-N-acetyl trat eine Bande auf, die Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kD entsprach. Auch diese Bande war nach Behandlung mit EGF nicht zu sehen.

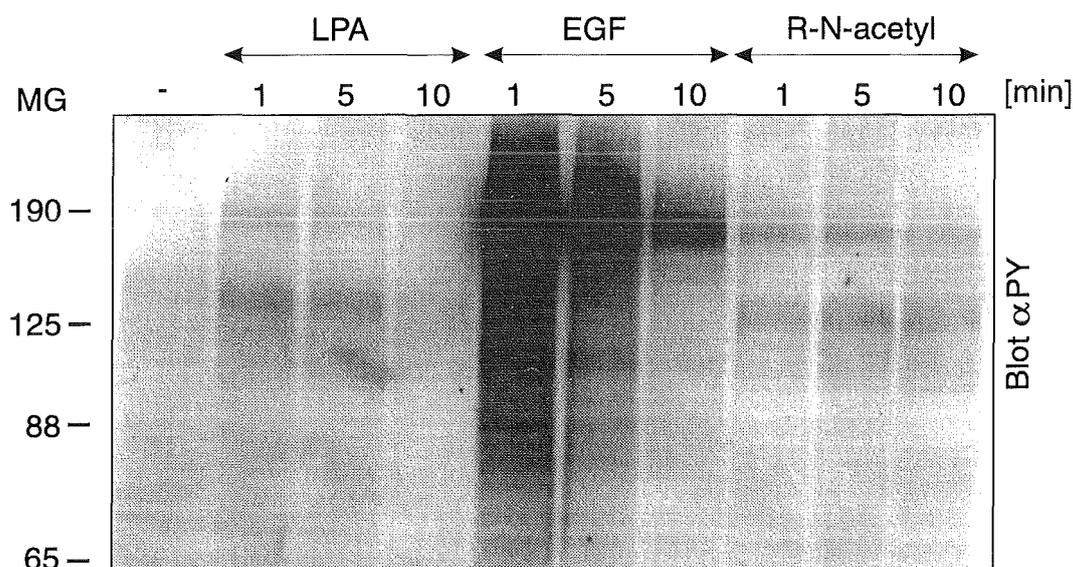


Abb. 16: Tyrosinphosphorylierungen in MDA-MB-468 Zellen nach R-N-acetyl Behandlung. LPA: 25 μ M; EGF: 20 ng/ml; R-N-acetyl: 50 μ M. Der Nachweis von Phosphorylierungen an Tyrosinresten erfolgte im Western Blot mit einem anti-Phosphotyrosin (PY) Antikörper. MG: Molekulargewicht [kD].

4.4.6 Untersuchung zur Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch APC

Nach Behandlung von MDA-MB-468 Zellen mit R-N-acetyl konnte die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen mit hohem Molekulargewicht, etwa 180 kD, nachgewiesen werden (s. Abb. 16). Die detektierten Banden lagen auf der Höhe der Banden, die nach EGF-Behandlung erschienen waren. Daher lag die Vermutung nahe, daß R-N-acetyl tatsächlich eine Aktivierung des EGF Rezeptors bewirken kann.

Es boten sich zwei Methoden an, um zu untersuchen, ob der EGF Rezeptor aktiviert wurde. Zum einen konnte der direkte Nachweis der Aktivierung über eine Immunpräzipitation des Rezeptors und Überprüfung des Phosphorylierungsstatus mit Hilfe Phosphotyrosin-spezifischer Antikörper im Western Blot erbracht werden. Zum anderen konnte die

Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden, und somit die Signalweiterleitung durch den Rezeptor gestört werden.

4.4.6.1 APC induzieren eine schwache Phosphorylierung des EGF Rezeptors

Mit Hilfe der Immunpräzipitation wurden EGF Rezeptor Moleküle aus dem Zellysat von APC-behandelten Zellen und Kontrollzellen isoliert. Nach Auftrennung auf einem SDS-Gel wurde in einem Western Blot mit Anti-Phosphotyrosin Antikörpern überprüft, ob die EGF Rezeptor Moleküle in phosphorylierter Form vorlagen.

In unbehandelten Kontrollzellen konnte keine Aktivierung des EGF Rezeptors gefunden werden (Abb. 17a). Die Stimulierung mit EGF führte zu einer Aktivierung, die in dem untersuchten Zeitraum von 2 Minuten bis zu einer halben Stunde kontinuierlich zunahm. Die Behandlung mit APC führte ebenfalls zu einer Phosphorylierung des EGF Rezeptors und war nach 5-minütiger Inkubation am deutlichsten zu erkennen. Das APC-vermittelte Signal war jedoch insgesamt wesentlich schwächer als das Signal des physiologischen Stimulus EGF.

Um sicherzustellen, daß gleiche Proteinmengen in den einzelnen Ansätzen vorlagen, wurde der Blot nachträglich mit einem anti-EGF Rezeptor Antikörper inkubiert (Abb. 17b). Die Intensitäten der einzelnen Banden bestätigen, daß gleiche Mengen an EGF Rezeptor Molekülen vorlagen.

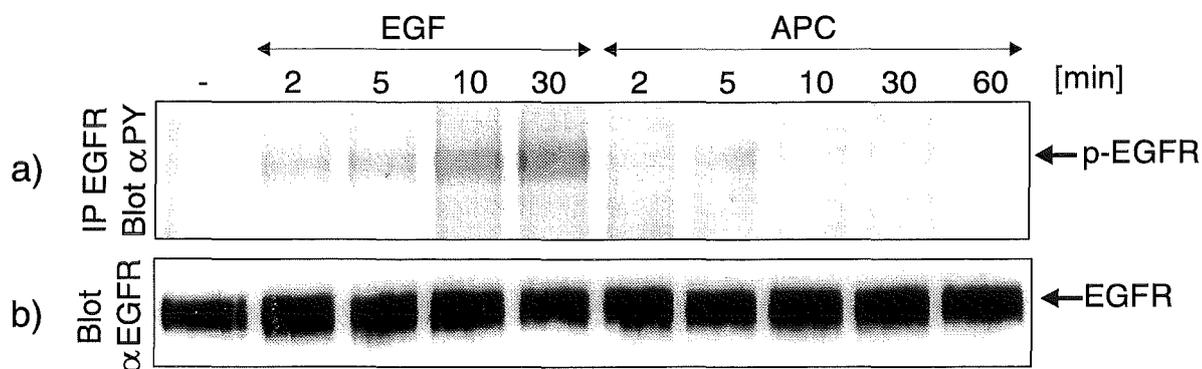


Abb.17: Aktivierung des EGF Rezeptors durch Alkylphosphocholine.

EGF: 20 ng/ml; APC: 50 µM R-N-acetyl. Die Inkubation erfolgte gemäß den entsprechenden Zeiten. a) Immunpräzipitation (IP) des EGF Rezeptors (EGFR) und anschließender Nachweis der Phosphorylierung im Western Blot mit einem anti-Phosphotyrosin (PY) Antikörper. b) Inkubation des Blots aus a) mit anti-EGF Rezeptor Antikörpern.

4.4.6.2 Effekt von Wachstumsfaktor Rezeptor-Inhibitoren auf die APC-induzierte ERK Aktivierung

Der zweite Ansatz, die Aktivierung des EGF Rezeptors zu demonstrieren, beruhte auf der Verwendung eines spezifischen Inhibitors des EGF Rezeptors. Zusätzlich sollte auch ein Inhibitor des PDGF Rezeptors eingesetzt werden. PDGF Rezeptor hat wie der EGF Rezeptor

ein Molekulargewicht von 180 kD, so daß eine Beteiligung des PDGF Rezeptors an der APC-induzierten ERK Aktivierung ausgeschlossen werden mußte.

Um dies näher zu untersuchen, wurden zwei spezifische Inhibitoren eingesetzt: AG1478, ein spezifischer Inhibitor des EGF Rezeptors (Levitzki & Gazit 1995) und AG1296, ein spezifischer Inhibitor des PDGF Rezeptors (Kovalenko *et al.* 1994, 1997). Diese Inhibitoren hemmen die Tyrosinkinase Aktivität der entsprechenden Rezeptoren und unterbrechen so die Signalweiterleitung durch diese Rezeptoren (Lipson *et al.* 1998).

MDA-MB-468 Zellen wurden mit den Inhibitoren vorinkubiert, mit R-N-acetyl behandelt und anschließend die ERK-Aktivierung im Western Blot untersucht (Abb. 18). Für diesen Blot wurde ein phosphospezifischer ERK Antikörper verwendet, der beide Isoformen, ERK1 und ERK2 erkennt. Hier wird daher ausschließlich die phosphorylierte, aktive Form der Proteine nachgewiesen. Der EGF Rezeptor Inhibitor AG1478 unterdrückte tatsächlich die R-N-acetyl induzierte ERK1/2 Aktivierung. Der PDGF Rezeptor Inhibitor AG1296 zeigte dagegen keinen Effekt in Bezug auf die R-N-acetyl vermittelte ERK1/2 Aktivierung. Die LPA-induzierte ERK1/2 Aktivierung ließ sich ebenfalls durch AG1478 hemmen, nicht aber durch AG1296.

Beide Inhibitoren wurden auf ihre Funktionsfähigkeit hin untersucht. Der EGF Rezeptor Inhibitor AG1478 hemmte die EGF-vermittelte und AG1296 die PDGF-induzierte ERK1/2 Aktivierung.

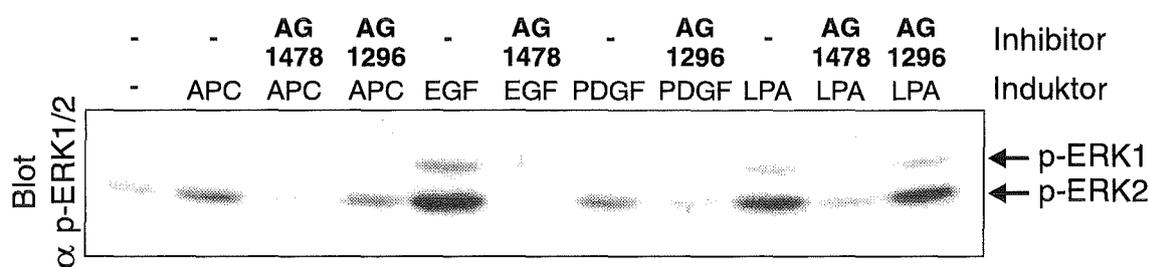


Abb. 18: Effekte der Inhibitoren AG1478 und AG1296 auf die EGF-, LPA- und APC-induzierte ERK1/2 Aktivierung.

APC: 50 μ M R-N-acetyl; EGF: 20 ng/ml; LPA: 25 μ M. Die Vorinkubation erfolgte für 30 Minuten mit 1 μ M der entsprechenden Inhibitoren. Der Nachweis von ERK1 und ERK2 erfolgte im Western Blot mit anti-ERK1/2 Antikörpern, die die phosphorylierten, aktiven Formen von ERK1 und ERK2 erkennen.

4.4.7 Untersuchungen zur Aktivierung der Streßkinasen c-Jun NH₂-terminale Kinase und p38 Kinase

Zwei weitere Vertreter der MAP Kinase Familie sind die p38 Kinase und die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK). In jüngster Literatur wird die Aktivierung dieser beiden Kinasen mit dem Zelltod in Zusammenhang gebracht. Eine Aktivierung dieser sog. Streßkinasen wird während dem UV- oder Organometall-induzierten Zelltod beobachtet (Zanke *et al.* 1996,

Zaucke 1997). Da Alkylphosphocholine ebenfalls zum Zelltod führen, war es interessant zu untersuchen, ob während APC-Behandlung ebenfalls Streßkinasen aktiviert werden.

JNK und p38 Kinase werden durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten aktiviert. Der Nachweis der Aktivierung erfolgte daher im Western Blot mit spezifischen Antikörpern, welche die aktive, phosphorylierte Form der Enzyme erkennen.

4.4.7.1 Untersuchungen zur Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK)

Die c-Jun NH₂-terminale Kinase liegt in zwei Isoformen vor: JNK1 mit einem Molekulargewicht von 54 kD und JNK2 mit einem Molekulargewicht von 46 kD. Der für den Nachweis verwendete phosphospezifische anti-JNK Antikörper erkannte beide Isoformen.

Es wurde untersucht, ob während APC-Behandlung von HL-60 Zellen eine Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 erfolgt. Behandlung mit 50 µM R-N-acetyl führte jedoch bei einer Inkubationszeit von bis zu 16 Stunden zu keinem Zeitpunkt zu einer Aktivierung der JNK (Abb. 19). Die phosphorylierten Formen von JNK1 und JNK2 ließen sich weder zu einem frühen Zeitpunkt, bei Inkubationszeiten unter einer Stunde (Abb. 19a), noch nach Ablauf mehrerer Stunden (Abb. 19b) nachweisen.

Das Einsetzen unterschiedlicher Konzentrationen an APC zeigte auch keinen Effekt. Bei Behandlung von HL-60 Zellen mit 10 µM oder 30 µM R-N-acetyl wurde ebenfalls keine JNK-Aktivierung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Das verwendete Nachweissystem funktionierte jedoch gut, wie anhand der deutlichen Signale der Positivkontrollen zu sehen ist. 10-minütige Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht sowie Behandlung mit dem Organometall Tributylzinn (TBT) führte zu einer starken Aktivierung der JNK (Abb. 19a und b, Spuren 2+3). Lediglich die Inkubation mit Alkylphosphocholinen führten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Aktivierung der JNK.

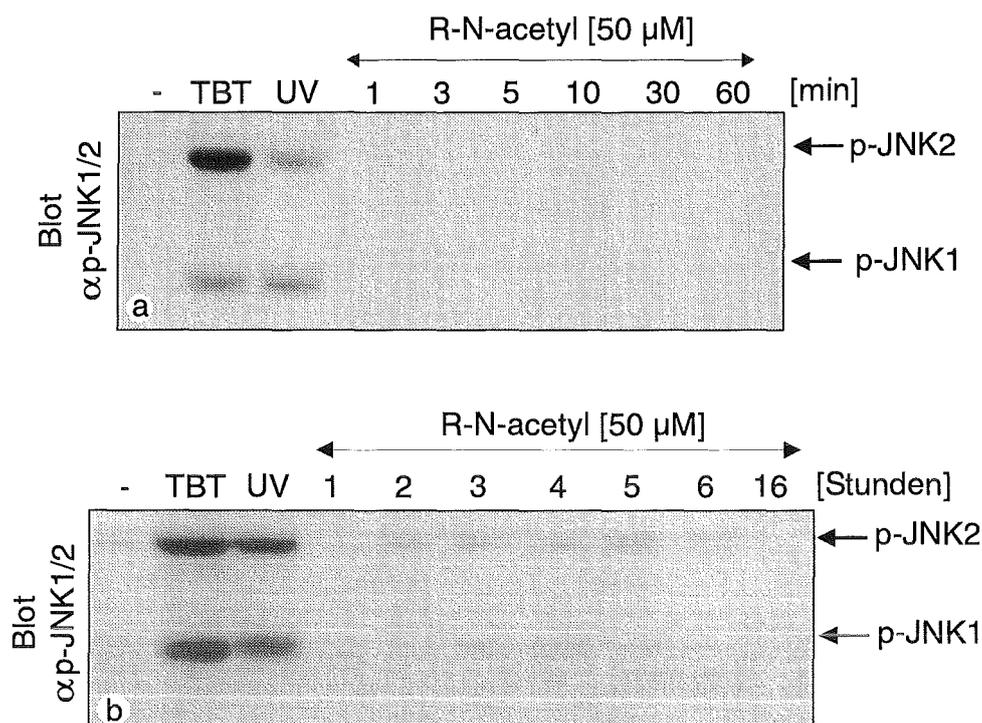


Abb. 19: JNK Aktivierung in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 50 μ M R-N-acetyl. Aktivierte JNK wurde im Western Blot mit phosphospezifischen anti-JNK Antikörpern nachgewiesen. UV: 10 Minuten UV-Bestrahlung auf dem UV-Schirm; TBT: Behandlung mit 1 μ M TBT, 20 Minuten. Die Behandlung mit R-N-acetyl erfolgte für die angegebenen Zeiten von unter einer Stunde (a) bis zu 16 Stunden (b).

4.4.7.2 Untersuchungen zur Aktivierung der p38 MAP Kinase.

Bei der p38 MAP Kinase handelt es sich wie bei der JNK um eine Streßkinase, die z.B. bei Bestrahlung von Zellen mit letalen Dosen an UV-Licht aktiviert wird. Diese Aktivierung wird mit dem Zelltod in Zusammenhang gebracht (Kimura *et al.* 1998). p38 Kinase wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert und konnte daher auch im Western Blot unter Verwendung von Antikörpern nachgewiesen werden, die ausschließlich die phosphorylierte, aktive Form des Enzyms erkennen.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, konnte über einen Zeitraum von 16 Stunden keine deutliche Aktivierung der p38 Kinase nach APC-Behandlung festgestellt werden. Lediglich die Behandlung mit dem Organometall TBT bzw. Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht führte zu einer starken Aktivierung der p38 MAP Kinase. Die APC-behandelten Proben zeigten nur ein basales Aktivierungsniveau ähnlich dem der unbehandelten Kontrolle. Es ließen sich zwar geringe Mengen an phosphorylierter p38 Kinase detektieren, jedoch waren die Signale im Vergleich zu den Positivkontrollen TBT und UV sehr schwach.

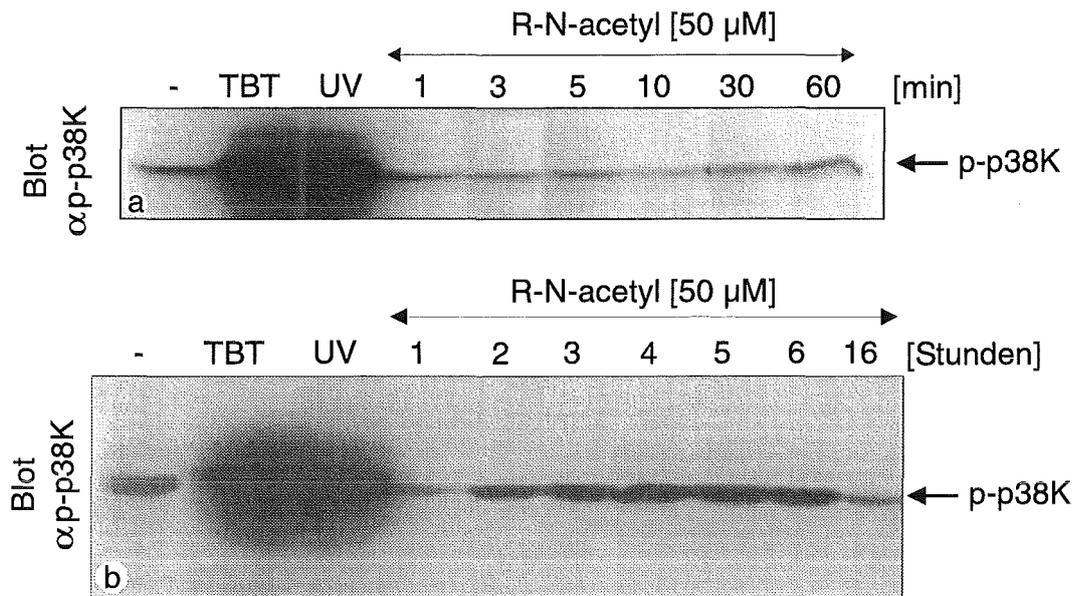


Abb. 20: Aktivierung von p38 Kinase in HL-60 Zellen nach R-N-acetyl-Behandlung.

Der Nachweis erfolgte im Western Blot unter Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern, die ausschließlich die aktive Form der p38 Kinase (p-p38K) erkennen. TBT: 1 μM TBT, 20 Minuten; UV: 10 Minuten Bestrahlung auf dem UV-Schirm. Die Behandlung mit R-N-acetyl erfolgte für die angegebenen Zeiten von unter einer Stunde (a) bis zu 16 Stunden (b).

4.4.8 Einfluß der APC auf die intrazelluläre freie Calciumkonzentration

In dem vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, daß APC auf die intrazelluläre Signaltransduktion Einfluß nehmen und Rezeptoren sowie nachgeschaltete Kinasen aktivieren können. Eine interessante Frage war daher, ob APC auch intrazelluläre Messenger wie beispielsweise Calciumionen, die an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt sind, beeinflussen.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in ruhenden Zellen ist um den Faktor 10.000 niedriger als die extrazelluläre Calciumkonzentration, und eine transiente Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wird von den Zellen als intrazelluläres Signal benutzt, um die Wirkung verschiedener Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren zu vermitteln (Berridge & Irvine 1989).

LPA und auch der plättchenaktivierende Faktor PAF, beides strukturelle Verwandte der APC, führen zu einer vorübergehenden Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob APC ähnlich wie LPA oder PAF die zytosolische freie Calciumkonzentration in HL-60 Zellen beeinflussen.

Die Änderungen der Calciumkonzentration nach Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen an APC wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten beobachtet (Abb. 21). Der Ruhewert lag in HL-60 Zellen bei etwa 100 nM freie Calciumionen. Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 10 μ M bzw. 50 μ M APC, wurde eine schnelle und transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen. Diese Änderungen des Calciumhaushaltes waren konzentrationsabhängig. Behandlung mit 10 μ M APC ließ die intrazelluläre Calciumkonzentration sprunghaft von 100 nM auf etwa 250 nM steigen, die Behandlung mit 50 μ M APC um ein 6-faches auf 600 nM. Nach 5 Minuten waren beide Signale abgeklungen und die Zellen erreichten langsam wieder ihren Ruhewert. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment fMLP verwendet, ein chemotaktisches Peptid, das in differenzierten HL-60 Zellen an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor bindet und darüber eine Calciumfreisetzung auslöst. Nach Stimulierung mit fMLP wurde eine schnelle Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration beobachtet, die ebenso rasch wieder abgeklungen war. Die Kinetik der APC-induzierten Änderung der Calciumkonzentration verlief somit fast identisch mit der des fMLP. Das legte die Vermutung nahe, daß es sich bei der APC-vermittelten Calciumkonzentrationsänderung ebenfalls um einen G-Protein abhängigen, rezeptorvermittelten Prozeß handeln könnte. Um die mögliche Beteiligung von G-Proteinen an der APC induzierten Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration zu untersuchen, wurden HL-60 Zellen daraufhin mit Pertussis Toxin vorbehandelt. Diese Vorbehandlung unterbricht die Signaltransduktion durch ADP-Ribosylierung bestimmter G-Proteine (Bokoch *et al.* 1984). Vorbehandlung der Zellen mit Pertussis Toxin führte zu einer Unterdrückung sowohl der fMLP-, als auch der APC-induzierten Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration (Abb. 22).

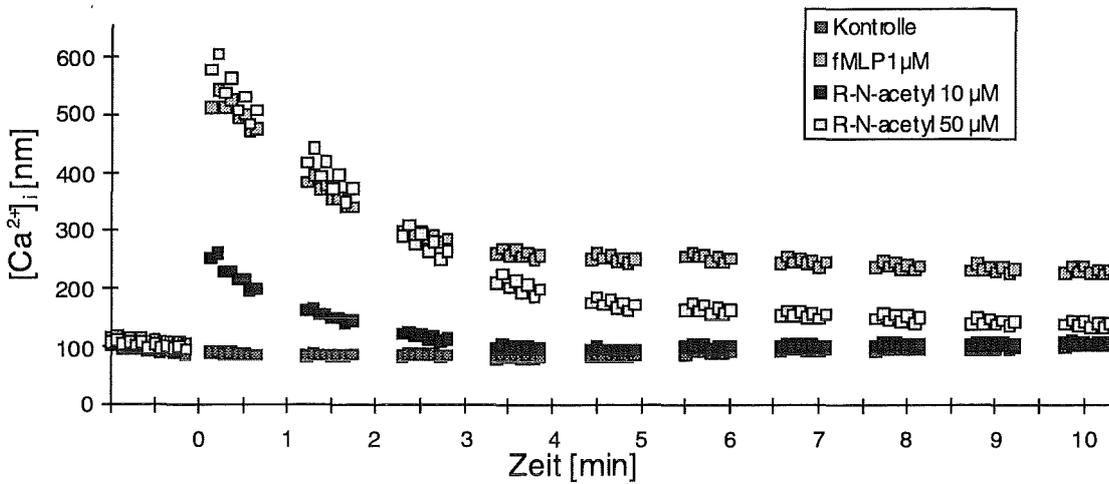


Abb. 21: Effekt von R-N-acetyl auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in HL-60 Zellen.

HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo3/AM beladen und wie angegeben mit Lösungsmittel (Kontrolle), fMLP oder R-N-acetyl behandelt. Die Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 3 Experimente.

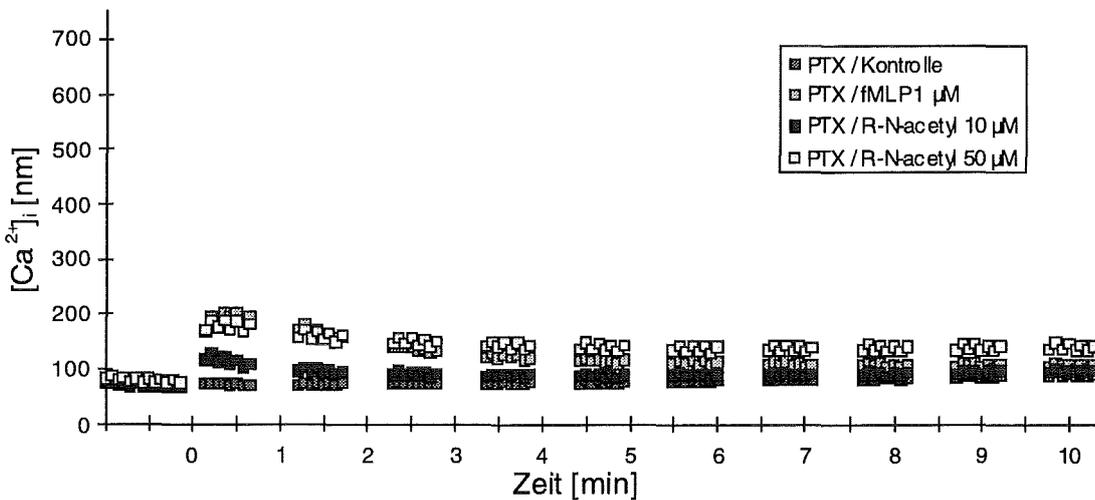


Abb. 22: Einfluß von Pertussis Toxin auf die R-N-acetyl-induzierte Änderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration.

HL-60 Zellen wurden mit 0,5 µg/ml Pertussis Toxin für 3 Stunden vorinkubiert und anschließend mit dem Calciumindikator Fluo3/AM beladen und wie angegeben mit Lösungsmittel (Kontrolle), fMLP oder R-N-acetyl behandelt. Die Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 3 Experimente.

4.5 Untersuchungen zur Alkylphosphocholin-induzierten Apoptose

Bei der Betrachtung von Alkylphosphocholin-behandelten HL-60 Zellen im Lichtmikroskop wurden drastische morphologische Veränderungen augenfällig. Die Zellen hatten den Anschein zu schrumpfen, und über einen Zeitraum von etwa sechs Stunden bildeten sich blasenartige Ausstülpungen an der Plasmamembran, die sich im weiteren Verlauf der Behandlung als Vesikel abschnürten. Diese morphologischen Veränderungen sind charakteristisch für den 'programmierten Zelltod' oder Apoptose. Daher wurden im folgenden Nachweisverfahren etabliert, um die Zellen auf den apoptotischen Zelltod hin zu untersuchen.

4.5.1 Lichtmikroskopische Beobachtungen

Morphologische Charakteristika während der Apoptose sind vor allem die Bildung von Membranausstülpungen (*blebs*) und letztendlich das Abschnüren von apoptotischen Körperchen. Die folgenden Abbildungen zeigen diese Vorgänge nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 20 μM R-N-acetyl.

Die unbehandelten Kontrollzellen waren völlig rund (Abb. 23a). Nach einigen Stunden waren erste Veränderungen zu erkennen. Ein Teil der Zellen bildete Membranausstülpungen (Abb. 23b). Nach 24 Stunden waren nur noch wenige lebende Zellen zu finden, viele Zellen bestanden bereits aus mehreren Bläschen, die sich im weiteren Verlauf abschnürten (Abb. 23c). Die Zellen waren stark geschrumpft und es schwammen zahlreiche apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) und Zellbruchstücke im Medium, die sich von den Zellen gelöst hatten.

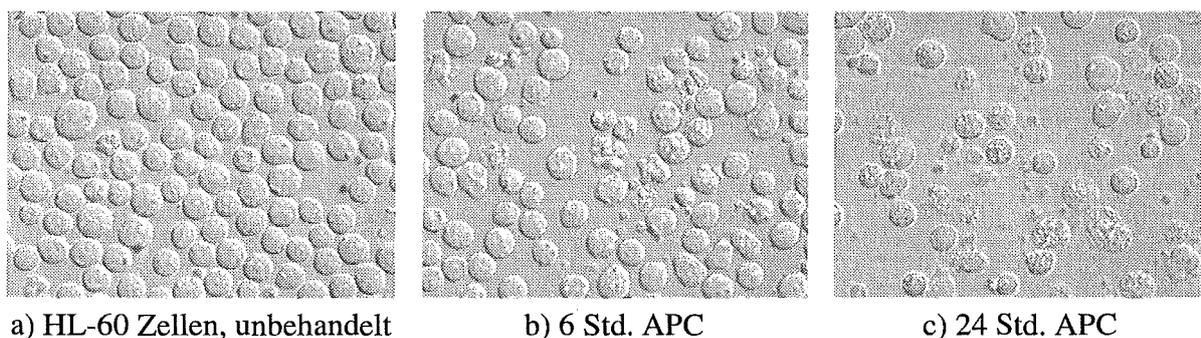


Abb. 23: Lichtmikroskopische Betrachtung von HL-60 Zellen im DIC Verfahren während der Behandlung mit APC.

1×10^6 HL-60 Zellen wurden mit 20 μM R-N-acetyl behandelt und nach den entsprechenden Zeiten unter dem Lichtmikroskop im DIC Verfahren betrachtet. Vergrößerung: 400-fach.

4.5.2 Elektronenmikroskopische Beobachtungen

4.5.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops konnten die Veränderungen an der Zelloberfläche noch genauer sichtbar gemacht werden. Abb. 24 soll das *blebbing* der Plasmamembranen von APC-behandelten Zellen veranschaulichen. Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 20 μM R-N-acetyl waren nach 16 Stunden zahlreiche Membranausstülpungen auf den Zellen sichtbar. Zudem waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelle die feinen Oberflächenstrukturen verlorengegangen. Während die Kontrollzellen eine etwas geriffelte und wellig aussehende Oberflächenstruktur aufwiesen, waren die Oberflächen der behandelten Zellen eher glatt.

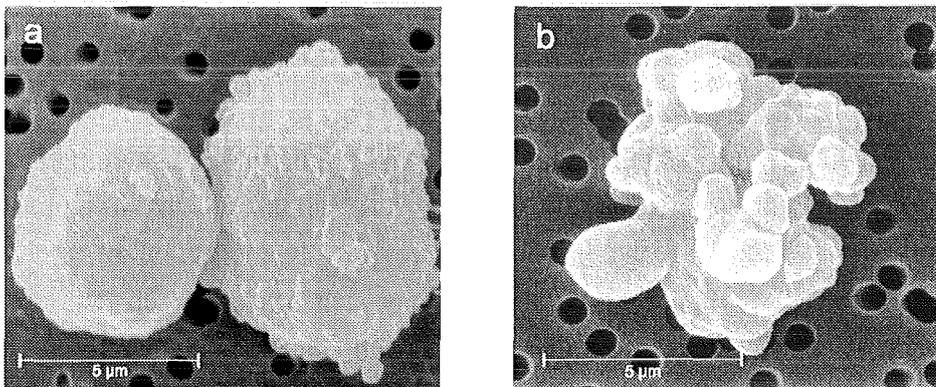


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von HL-60 Zellen. a) unbehandelte Kontrollzelle. b) 20 μM R-N-acetyl, 16 Stunden.

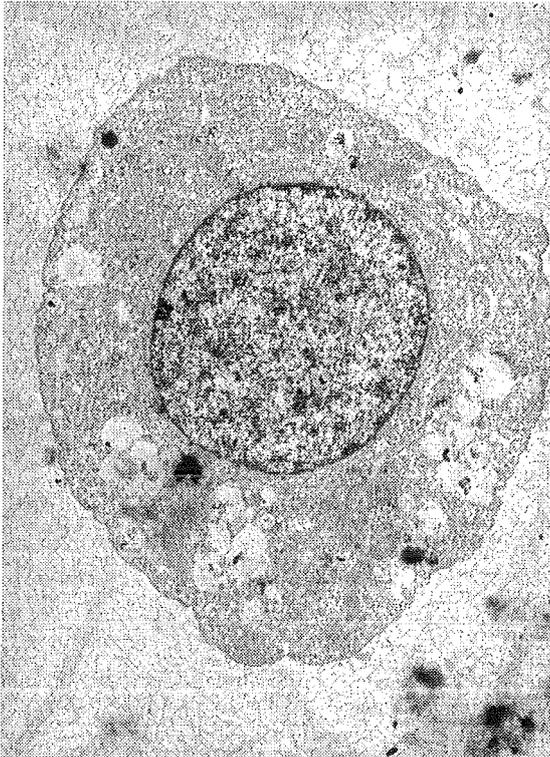
4.5.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung

Im Transmissionselektronenmikroskop ließen sich die morphologischen Veränderungen auch innerhalb der Zellen gut erkennen. HL-60 Zellen sind normalerweise völlig rund und haben einen relativ großen Kern (Abb. 25a, b). Die Behandlung von HL-60 Zellen mit Apoptose-induzierenden Substanzen resultierte in charakteristischen Veränderungen. So führte die Behandlung mit Etoposid, einem Topoisomerasehemmer und gut beschriebener Induktor der Apoptose (Kaufmann 1989), zur Bildung von zahlreichen Ausstülpungen der Plasmamembran und auch zur Abschnürung zahlreicher apoptotischer Körperchen. Während der Apoptose kondensiert das Chromatin und die Kerne werden in einzelne Fragmente getrennt. In Etoposid-behandelten HL-60 Zellen waren die Kerne der einzelnen Zellen gar nicht mehr sichtbar, bestenfalls stark kondensierte Bruchstücke, die dunkel anfärbten und meist noch von einer Membran umschlossen waren (Abb. 25c, d).

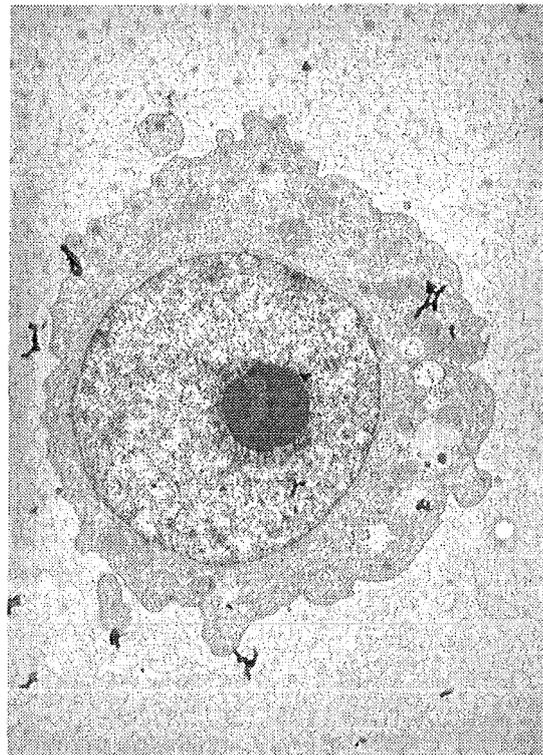
Die Behandlung von HL-60 Zellen mit R-N-acetyl führte zu vergleichbaren Veränderungen der Morphologie. 10 μM R-N-acetyl induzierte nach 16 Stunden Membranausstülpungen an

den Zellen. Die Kerne waren noch als solche zu erkennen (Abb. 25e, f). Höhere Konzentrationen (20 μ M R-N-acetyl) führten nach 16-stündiger Inkubation zur völligen Umstrukturierung in den Zellen. Die Kerne waren zerfallen und es konnte lediglich kondensiertes Chromatin gesehen werden, das noch von einer Membran umschlossen war (Abb. 25j). Zudem hatten sich zahlreiche Ausstülpungen und auch apoptotische Körperchen gebildet (Abb. 25g, h). Besonders auffällig war nach Behandlung mit 20 μ M R-N-acetyl die extreme Vakuolisierung der Zellen (Abb. 25i, j).

Bei den elektronenmikroskopischen Bildern handelt es sich um Momentaufnahmen einzelner Zellen. Es wurde jedoch versucht, möglichst repräsentative Zellen auszusuchen.



a) unbehandelte Kontrolle
8.600-fach



b) unbehandelte Kontrolle
8.600-fach



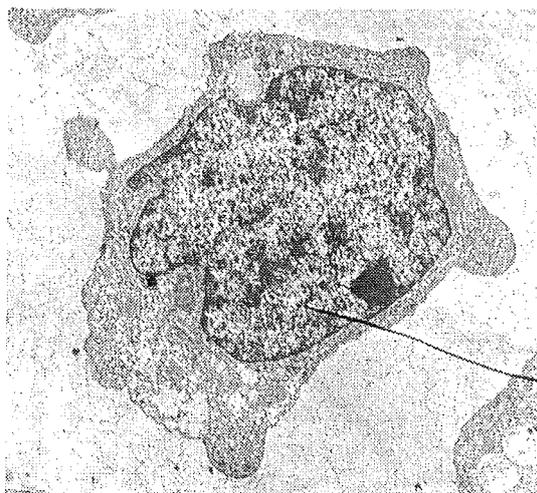
c) Behandlung mit 34 μ M Etoposid
8.600-fach



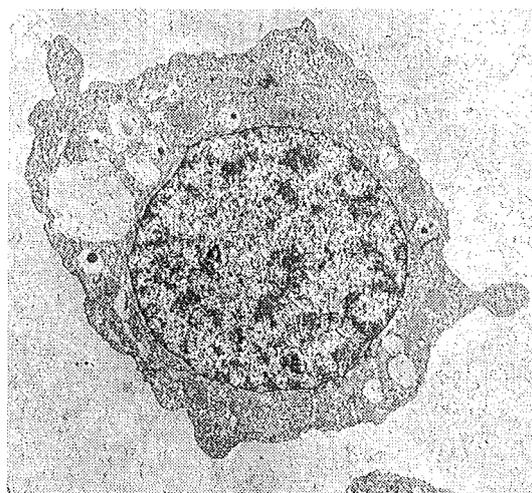
d) Behandlung mit 34 μ M Etoposid
8.600-fach

Abb. 25 a-d: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von unbehandelten (a, b) oder mit 34 μ M Etoposid (b, c) behandelten HL-60 Zellen.

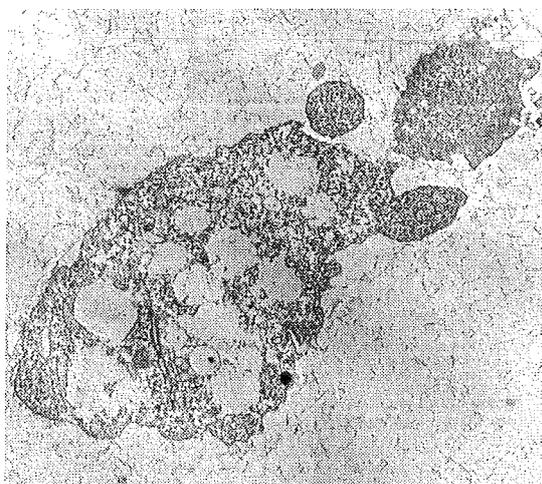
Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden. Die Vergrößerungen sind in der Abbildung angegeben.



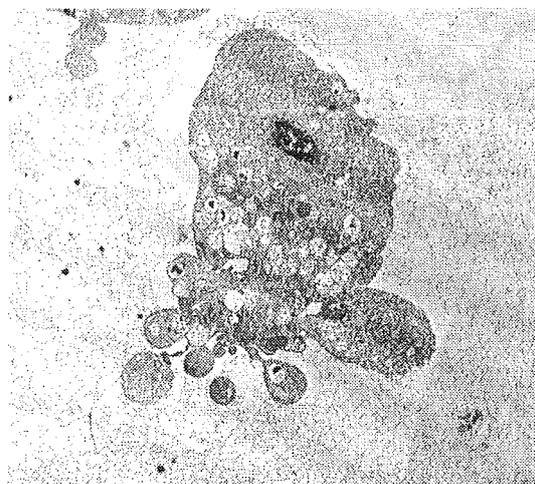
e) 10 µM R-N-acetyl
10.800-fach



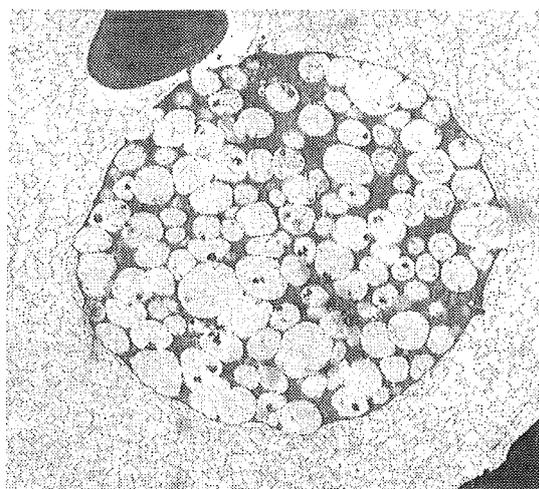
f) 10 µM R-N-acetyl
8.600-fach



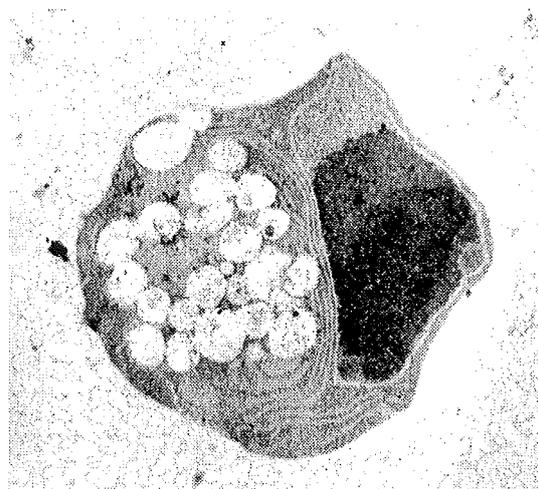
g) 20 µM R-N-acetyl
10.800-fach



h) 20 µM R-N-acetyl
6.500-fach



i) 20 µM R-N-acetyl
8.600-fach



j) 20 µM R-N-acetyl
12.600-fach

Abb. 25 e-j: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von HL-60 Zellen nach 16-stündiger Behandlung mit R-N-acetyl. Konzentrationen und Vergrößerungen sind in der Abbildung angegeben.

4.5.3 Kernfärbungen mit Bisbenzimid (Hoechst 33342)

Eine andere Methode, die Kondensierung des Chromatins und die Fragmentierung der Zellkerne während der Apoptose nachzuweisen, ist die direkte Färbung des Chromatins mit Fluoreszenzfarbstoffen. Hier wurde Bisbenzimid (Hoechst 33342) verwendet. In unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 26a) zeigte das Chromatin eine fast gleichmäßige, diffuse Färbung. Die Zellkerne hatten eine runde Form. In R-N-acetyl-behandelten Zellen (Abb. 26b) kann deutlich die Kondensation des Chromatins sowie die beginnende Fragmentierung der Kerne beobachtet werden. Die Kondensation des Chromatins führte zu einer Konzentration des Farbstoffs pro Fläche und somit zu einem intensiveren Fluoreszenzsignal. Die Kerne sahen nicht mehr rund aus, sondern hatten bereits den Anschein, sich zu zerteilen.

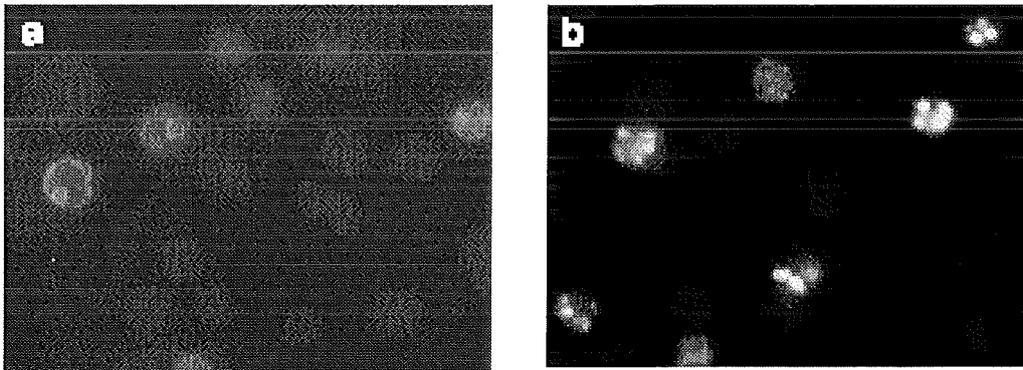


Abb. 26: Kernfärbung in HL-60 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342).

a) unbehandelte Kontrollzellen. b) 20 µM R-N-acetyl, 16 Stunden.

4.5.4 Bildung eines Prä-G₁ Peaks während der APC-induzierten Apoptose

Die Bildung von Membranausstülpungen oder *blebs* und die Fragmentierung der Kerne nach APC-Behandlung konnte bereits in den vorherigen Abschnitten mit mikroskopischen Techniken nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit, das Abschnüren der apoptotischen Körperchen zu beobachten, bietet die Zellzyklusanalyse im Durchflußzytometer. Grundsätzlich wird bei dieser Methode die DNA Menge von einzelnen Kernen gemessen. Je nachdem in welcher Zellzyklusphase sich eine Zelle gerade befindet hat ihr Kern einen unterschiedlichen Chromatingehalt. In der G₁-Phase liegt der Chromosomensatz in diploider Form vor und in der G₂-Phase kurz vor der Mitose (G₂/M-Phase) ist ein tetraploider Chromosomensatz vorhanden. Befindet sich eine Zelle in der DNA-Synthesephase (S-Phase), können alle möglichen Zwischenstadien auftreten. Daraus ergibt sich dann eine klassische Zellzyklusverteilung. Etwa 58% der Zellen befinden sich in der G₁-Phase, 15% in der S-Phase und 22% in der G₂/M-Phase. Zusätzlich finden sich 5% der Zellen unterhalb des G₁-Peak wieder (Abb. 27, Kontrolle). Apoptotische

Zellen besitzen nach Abschnürung von apoptotischen Körperchen weniger DNA als Zellen in der G₁-Phase. Im Histogramm tritt dann dieser Peak unterhalb des G₁-Peaks auf. Durch Bestimmung des sog. Prä-G₁-Peaks läßt sich die Menge der apoptotischen Zellen bestimmen. Abbildung 27 zeigt Histogramme von APC-behandelten Zellen. HL-60 Zellen wurden mit 20 µM der einzelnen APC für 24 Stunden inkubiert und die Zellzyklusverteilung nach DAPI-Färbung im Durchflußzytometer gemessen.

Der Anteil der apoptotischen Zellen des Prä-G₁-Peaks an der Gesamtzellpopulation ist in Kreisdiagrammen veranschaulicht.

Nach Behandlung mit 20 µM R-OH oder R-O-acetyl ergab sich ein Histogramm ähnlich dem der Kontrolle. Diese beiden Verbindungen, die auch bereits die höchsten LD₅₀-Werte aufwiesen, zeigten demnach wenig Effekt.

Behandlung mit 20 µM S-O-acetyl oder S-N-acetyl führte dagegen zu einer fast vollständigen Zerstörung der Zellzyklusverteilung. 65% der Zellen fanden sich im Prä-G₁-Peak und nur ein kleiner Rest des G₁-Peaks war noch zu sehen.

Nach Inkubation mit 20 µM R-N-acetyl oder S-OH waren nach 24 Stunden 50% der Zellen in der Prä-G₁-Fraktion wiederzufinden, es befanden sich jedoch noch Zellen in der G₂/M oder der G₁-Phase.

Die Aminoverbindungen R-NH₂ und S-NH₂ zeigten eine ähnliche Wirkung wie R-N-acetyl. Hier waren noch verschiedene Zellzyklusphasen voneinander unterscheidbar, jedoch befanden sich etwa 30% der Zellen in der Prä-G₁-Fraktion.

Bei diesem Versuch wurde wieder das unterschiedliche Verhalten von S- und R-konfigurierten Isomeren deutlich. Während S-OH und S-O-acetyl den Zellzyklus maßgeblich beeinflussten und zur Bildung apoptotischer Körperchen führten, zeigten die R-konfigurierten Isomere keinen Effekt.

Bezüglich der Prä-G₁-Peak Bildung können die APC nach ihrer Wirksamkeit in folgender Reihenfolge geordnet werden:



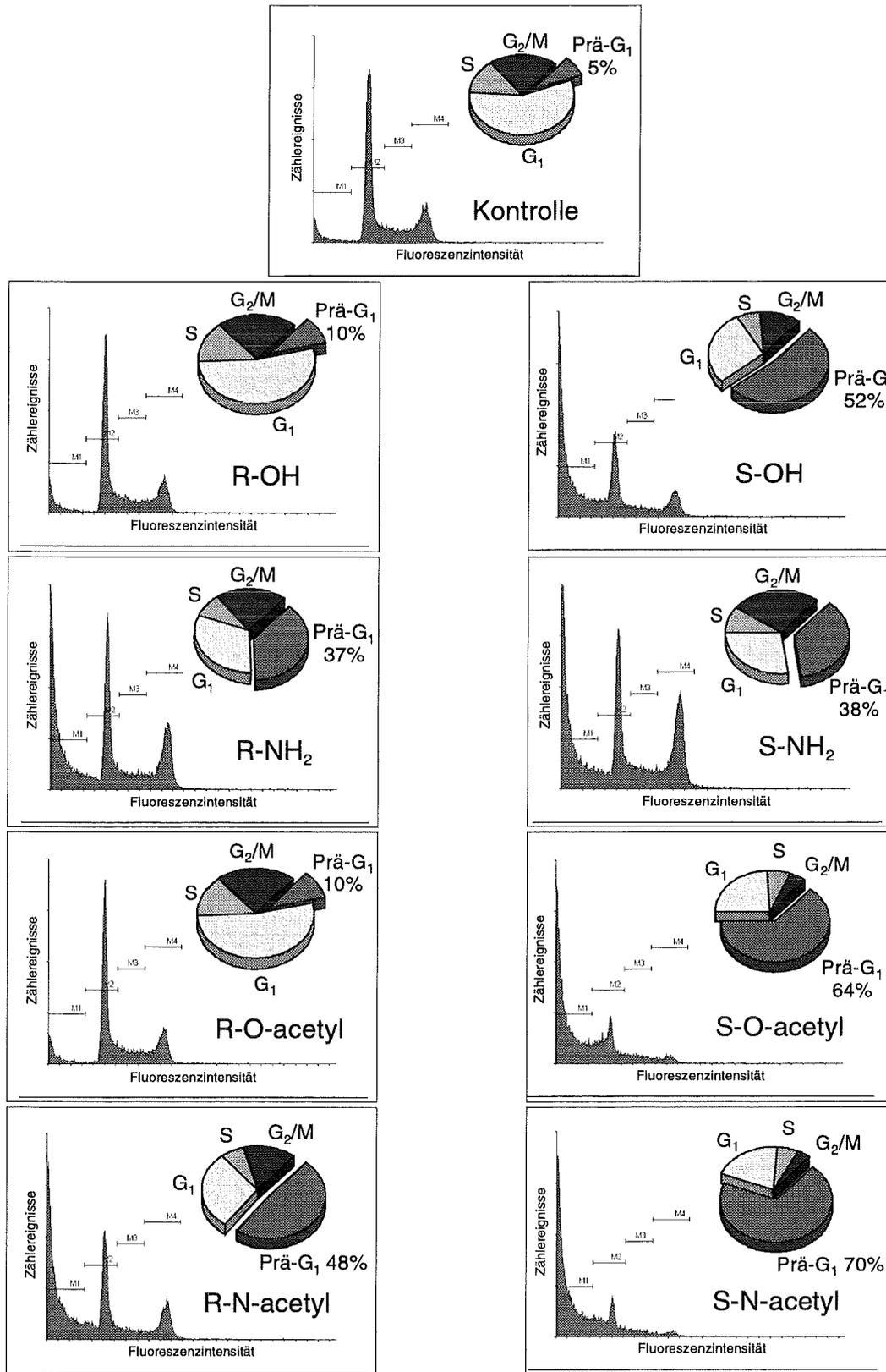


Abb. 27: Effekt von Alkylphosphocholinen auf die Zellzyklusverteilung und die Ausbildung eines Prä-G₁-Peaks in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden mit 20 µM der angegebenen APC für 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach DAPI-Färbung im Durchflußzytometer (Pasill, Partec). Die hier dargestellten Histogramme sind Originalabbildungen aus dem Durchflußzytometer. Aufgetragen sind Zählereignisse gegen die Fluoreszenzintensität. Die Kreisdiagramme veranschaulichen den Anteil der Zellen des Prä-G₁-Peaks an der Gesamtzellpopulation.

4.5.5 Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie während der APC-Behandlung

Ein frühes Ereignis während der Apoptose ist die Umverteilung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS). PS ist normalerweise nur auf der Innenseite von Plasmamembranen zu finden. Im Verlauf der Apoptose geht diese Asymmetrie verloren und PS wird auf die Außenseite der Membran verlagert (Martin *et al.* 1995). Dort dient es als Erkennungsmerkmal für Makrophagen, die eine derart als apoptotisch gekennzeichnete Zelle vernichten können.

In diesem Versuch wurde das PS-bindende Protein Annexin-V benutzt, um die Umverteilung des PS während der APC-induzierten Apoptose beobachten zu können (Abb. 28). Das Annexin-V war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluos, einem FITC-Derivat, gekoppelt. Annexin-V-positive Zellen konnten daher an ihrer grünen Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. Um apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid gegengefärbt. Propidiumiodid kann nur in Zellen eindringen, deren Membran geschädigt ist und dort an DNA binden.

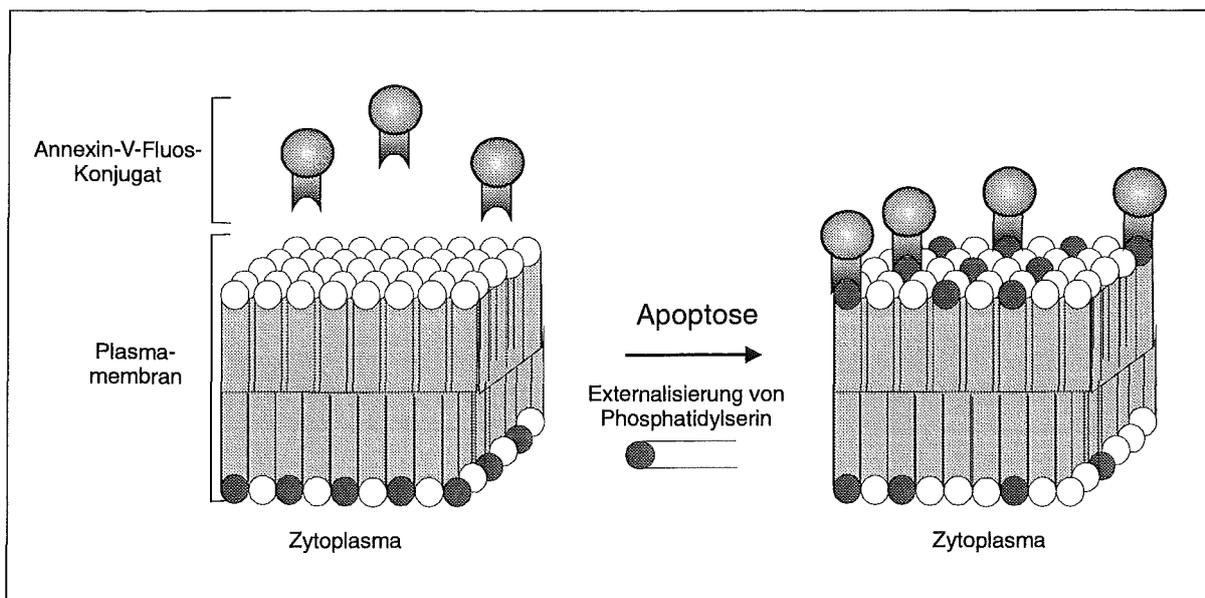


Abb. 28: Schema der Externalisierung des Phosphatidylserin während der Apoptose.

Bereits eine Stunde nach Behandlung mit R-N-acetyl konnten Annexin-V-positive Zellen detektiert werden (Abb. 29). Charakteristische grüne 'Ringe' um die Zellen herum zeigten, daß PS auf die Außenseite der Plasmamembran verlagert wurde. Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigten die Zellen bei lichtmikroskopischer Betrachtung noch keine auffälligen morphologischen Veränderungen wie z.B. *blebbing* (s. Abb. 23). Die Integrität der Plasmamembran war auch noch erhalten, denn die Zellen waren nicht Propidiumiodid-positiv. Nach 16-stündiger Behandlung war schon bei lichtmikroskopischer Betrachtung ein deutliches *blebbing* der Plasmamembranen zu sehen. Bei fluoreszenzmikroskopischer

Analyse fiel auf, daß zwar viele Zellen die für Annexin-V-Fluos spezifische grüne Fluoreszenz zeigten, jedoch waren die charakteristischen 'Ringe' um die Zellen nicht mehr zu sehen. Außerdem waren fast alle Zellen Propidiumiodid-positiv, d.h. die Zellmembranen waren geschädigt. Da im Zellkultursystem keine Makrophagen oder andere unbehandelte Zellen vorhanden sind, die apoptotische Körperchen rechtzeitig phagozytieren können, kommt es in diesem späten Stadium der Apoptose zum Verlust der Membranintegrität. Die Zellen bzw. deren Bruchstücke werden nekrotisch. Dieses Phänomen wird auch als 'sekundäre Nekrose' oder 'späte Apoptose' bezeichnet.

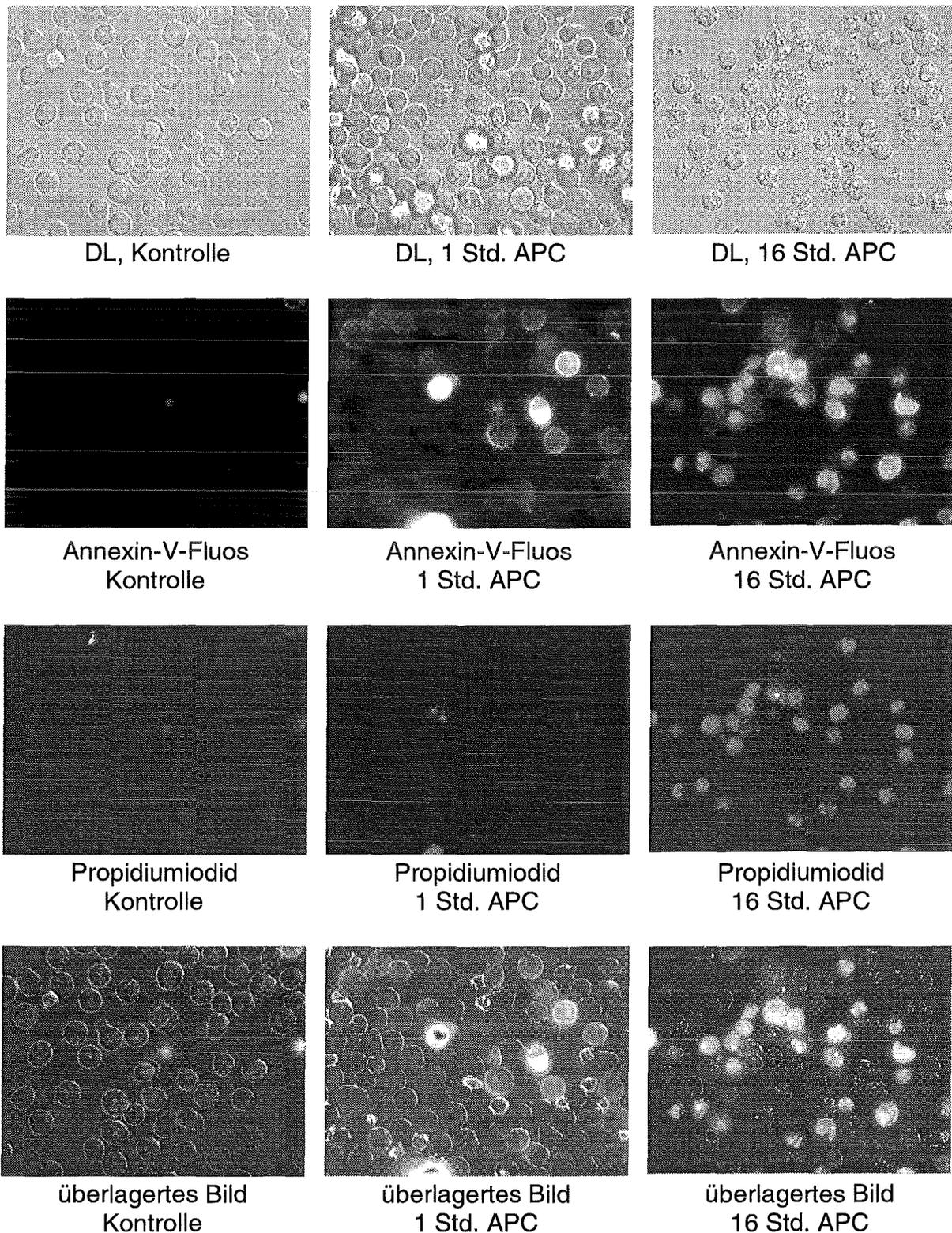


Abb. 29: Annexin-V-Fluos Färbung von HL-60 Zellen.

HL-60 Kontrollzellen sowie behandelte Zellen wurden mit dem Phosphatidylserin bindenden Protein Annexin-V-Fluos angefärbt (grün). DNA wurde mit Propidiumiodid (rot) gefärbt. Die Behandlung erfolgte mit 20 μ M R-N-acetyl (APC) entsprechend den angegebenen Zeiten. Oberste Reihe: Durchlichtbilder (DL); 2. Reihe: Annexin-V-Fluos-Färbung; 3. Reihe: Propidiumiodid-Färbung; 4. Reihe: überlagertes Bild aus den 3 vorherigen Bildern. Vergrößerung: 400-fach.

4.5.6 Induktion der DNA-Fragmentierung durch Alkylphosphocholine

Ein weiteres Charakteristikum der Apoptose ist der Abbau der DNA in Fragmente genau definierter Größe. Im Verlauf der Apoptose wird nicht nur das Chromatin kondensiert und die Kerne fragmentiert, sondern es findet auch ein Abbau der DNA statt. Die DNA-Stränge werden durch Endonukleasen zuerst in größere Stücke von 50-300 Kilobasenpaaren und anschließend in kleinere Fragmente von etwa 180-200 Basenpaare (bp) und Vielfache davon zerlegt. Diese Fragmentgröße ergibt sich, da Endonukleasen die DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen zerschneiden. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von internukleosomalem Abbau der DNA. Nach der Isolierung dieser DNA-Fragmente und Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese ergibt sich ein für die Apoptose charakteristisches Leitermuster, was im folgenden als 'DNA-Leiter' bezeichnet wird.

Es wurde untersucht, ob die Behandlung mit Alkylphosphocholinen neben der Chromatinkondensation auch den Abbau der DNA stimulieren kann. Abb. 30 zeigt ein solches Agarosegel zum Nachweis von apoptosespezifischen DNA-Fragmenten. Für diesen Versuch wurden alle acht Alkylphosphocholine in einer Konzentration von 20 μM eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden die DNA-Fragmente apoptotischer Zellen isoliert. In Kontrollzellen war keine DNA-Leiter zu sehen, ebensowenig nach Behandlung mit den Verbindungen R-OH und R-O-acetyl. Alle anderen Alkylphosphocholin-Verbindungen waren in der Lage, diesen DNA-Abbau zu induzieren (Abb. 30). R-OH und R-O-acetyl zeigten bereits geringe Toxizität gegenüber HL-60 Zellen und sind die Verbindungen mit den höchsten LD_{50} -Werten.

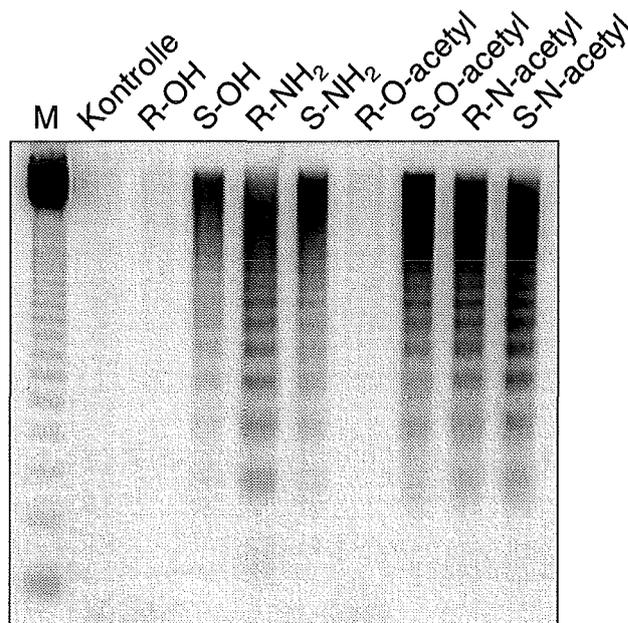


Abb. 30: Induktion der DNA-Fragmentierung in HL-60 Zellen durch Alkylphosphocholine. Die Zellen wurden mit 20 μM der entsprechenden APC für 16 Stunden inkubiert. M: DNA-Molekulargewichtsmarker.

Dieser Nachweis der DNA-Fragmentierung wurde auch in weiteren Versuchen dieser Arbeit immer wieder herangezogen, um das Auftreten von Apoptose zu zeigen.

4.5.6.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der APC-induzierten DNA-Fragmentierung

In einem nächsten Schritt wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der APC-induzierten DNA-Fragmentierung überprüft. Diese Versuche wurden mit R-N-acetyl durchgeführt, da dies die aktivste Verbindung mit dem kleinsten LD₅₀-Wert gegenüber HL-60 Zellen war (Tab. 3). HL-60 Zellen wurden mit 20 µM R-N-acetyl behandelt und nach verschiedenen Zeiten auf die Bildung einer DNA-Leiter hin untersucht. DNA-Fragmentierung begann erst nach 5-stündiger Inkubation mit R-N-acetyl. Eine deutliche Leiterbildung war erst nach 7,5 Stunden zu sehen (Abb. 31).

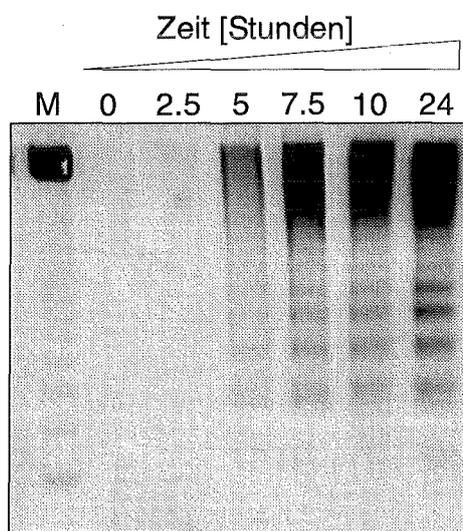


Abb. 31: Zeitabhängigkeit der R-N-acetyl-induzierten DNA-Fragmentierung.

HL-60 Zellen wurden mit 20 µM R-N-acetyl für die angegebenen Zeiten inkubiert. M: DNA-Molekulargewichtsmarker.

Um eine Konzentrationsabhängigkeit der Induktion der DNA-Fragmentierung zu demonstrieren, wurden HL-60 Zellen mit steigenden Konzentrationen an R-N-acetyl für 16 Stunden inkubiert. Bereits ab einer Konzentration von 2,5 µM R-N-acetyl konnte das Auftreten der DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Abb. 32).

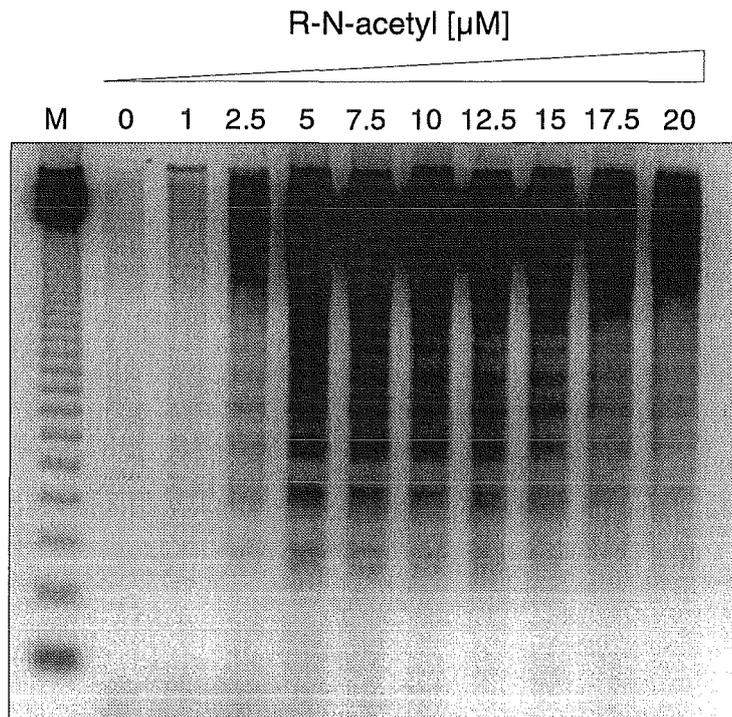


Abb. 32: Konzentrationsabhängigkeit der R-N-acetyl-induzierten DNA-Fragmentierung.

HL-60 Zellen wurden für 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an R-N-acetyl inkubiert. M: DNA-Molekulargewichtsmarker.

4.5.7 Proteolytische Prozesse während der APC-induzierten Apoptose

4.5.7.1 PARP-Spaltung

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Proteinen identifiziert worden, die im Verlauf des kontrollierten Zellabbaus während der Apoptose sehr spezifisch degradiert werden und als Marker für das Auftreten von Apoptose verwendet werden können. Daher wurde als zweiter Nachweis für Apoptose die Spaltung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) herangezogen. PARP, das im Kern lokalisiert ist und dessen Funktion die DNA-Reparatur ist (Schwartz & Milligan 1996), ist ein Substrat für Caspase-Proteasen und wird im Verlauf der Apoptose abgebaut (Kaufmann *et al.* 1993). Dieser Abbau kann im Western Blot verfolgt werden und mit Hilfe spezifischer Antikörper ist das Verschwinden des 116 kD nativen Proteins und entsprechend das Auftreten eines 86 kD großen Bruchstücks nachweisbar. Alle acht Alkylphosphocholine wurden daher auf ihre Fähigkeit hin, PARP-Spaltung zu induzieren, untersucht. HL-60 Zellen wurden mit 20 μM der entsprechenden APC für 16 Stunden inkubiert und anschließend die Spaltung des PARP im Western Blot nachgewiesen. Außer R-OH und R-O-acetyl waren alle Alkylphosphocholine in der Lage den Abbau des PARP zu stimulieren (Abb. 33). Somit bestätigte sich die Beobachtung des Versuchs zur DNA-Fragmentierung und der Zellzyklusanalyse, da R-OH und R-O-acetyl

auch hier keinen Effekt zeigten. Die Verbindungen R-OH und R-O-acetyl waren nicht in der Lage, den Abbau des PARP zu induzieren. Die S-konfigurierten Isomere S-OH und S-O-acetyl, sowie die stickstoffhaltigen Verbindungen dagegen induzierten die proteolytische Spaltung des PARP.

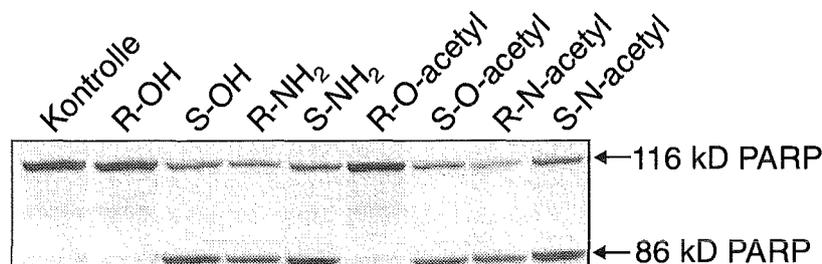


Abb. 33: Spaltung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase durch Alkylphosphocholine.
HL-60 Zellen wurden mit 20 μ M der entsprechenden APC für 16 Stunden inkubiert. Der Nachweis der nativen 116 kD großen Form des PARP und des 86 kD Abbauprodukts erfolgte im Western Blot mit spezifischen anti-PARP Antikörpern.

Dieser zweite Apoptose-Nachweis wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ebenfalls immer wieder herangezogen, um die Induktion von Apoptose in behandelten Zellen zu demonstrieren.

4.5.8 Induktion von Apoptose durch Alkylphosphocholine ist ein Zelltyp-unabhängiges Wirkungsprinzip

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß sechs der acht Alkylphosphocholin-Verbindungen in der Lage waren, Apoptose in HL-60 Zellen zu induzieren. Es sollte nun überprüft werden, ob APC auch in anderen Zelltypen den apoptotischen Zelltod auslösen können, oder ob dieses Phänomen nur auf HL-60 Zellen beschränkt ist. Für diesen Versuch wurden weitere humane leukämische Zelllinien getestet: Jurkat T-Zellen, B-lymphoblastoide BJAB und SKW6 Zellen, aber auch Mammakarzinomzelllinien wie T47D und MDA-MB-468, HeLa Adenokarzinomazellen sowie humane SV-40 transformierte Nabelschnurendothelzellen Huvec.

Zudem sollte überprüft werden, ob der Differenzierungsstatus der Zellen eine Rolle im Hinblick auf die Sensitivität der Zellen gegenüber APC spielt. Daher wurden neben normalen, undifferenzierten HL-60 Zellen (uHL-60) auch ausdifferenzierte HL-60 Zellen (dHL-60) verwendet.

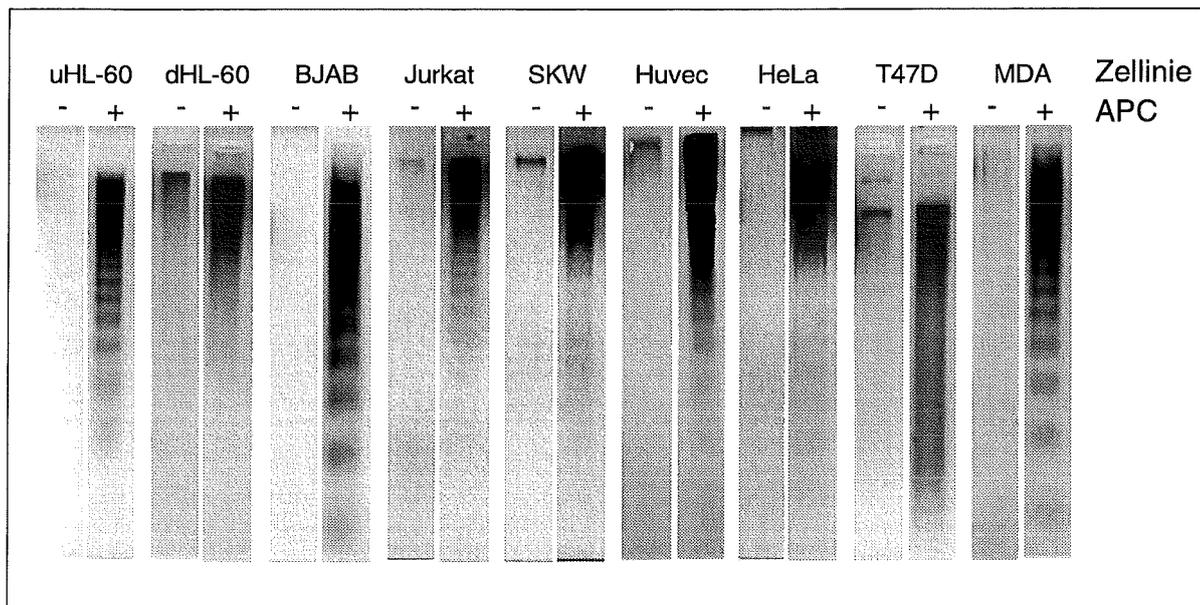


Abb. 34: Induktion der Apoptose durch APC in verschiedenen humanen Zelllinien.

Die angegebenen Zellen wurden mit 30 μ M R-N-acetyl (APC) für 16 Stunden inkubiert. Apoptoseinduktion wurde durch Bildung einer DNA-Leiter nachgewiesen.

In allen untersuchten Zelllinien konnte nach 16-stündiger Behandlung mit 30 μ M R-N-acetyl die Bildung einer DNA-Leiter nachgewiesen werden (Abb. 34).

R-N-acetyl konnte also in allen untersuchten Zelllinien Apoptose induzieren, was ein Zelltyp-unabhängiges Wirkungsprinzip nahelegt. In manchen Zelllinien war die Bildung des Leitemusters nicht sehr deutlich. In differenzierten HL-60 Zellen, SKW6 und T47D Zellen war nur eine sehr 'verschmierte' Leiter zu sehen. Die Zellen zeigten jedoch bei Betrachtung im Lichtmikroskop das charakteristische *blebbing* (Daten nicht gezeigt).

Der Differenzierungsgrad der HL-60 Zellen spielte keine Rolle. In undifferenzierten, wie auch in differenzierten HL-60 Zellen konnte die Bildung einer DNA-Leiter nach APC-Behandlung beobachtet werden.

4.6 Die Rolle der Caspasen bei der APC-induzierten Apoptose

Caspasen sind spezifische Proteasen, die während der Apoptose aktiviert werden und für viele der proteolytischen Prozesse verantwortlich sind. Mindestens 10 dieser Cystein Asparat-spezifischen Proteasen sind in Zusammenhang mit der Apoptose bekannt. Caspasen zeichnen sich durch ihre fast absolute Spezifität für Aspartat-Reste in der P1-Position ihres aktiven Zentrums aus. Sie haben ein konserviertes Pentapeptid-Motiv im aktiven Zentrum: QACXG, wobei X ein Arginin- Glutamin- oder Glycinrest sein kann (zusammengefaßt in Cohen 1997). Die Aktivierung von Caspasen erfolgt durch proteolytische Spaltung durch andere Caspasen, so daß man von einer Caspase-Kaskade spricht (Thornberry & Lazebnik 1998). Die Aktivierung dieser Caspase-Kaskade führt während der Apoptose zum Abbau wichtiger

zellulärer 'Todessubstrate' wie beispielsweise das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) oder Lamine.

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die Caspasen bei der APC-induzierten Apoptose spielen.

4.6.1 Aktivierung von Caspasen während der APC-induzierten Apoptose

Der Abbau von drei verschiedenen Caspase-Substraten während der APC-induzierten Apoptose wurde untersucht. Der Abbau des PARP war nach Behandlung von HL-60 Zellen mit 20 μ M R-N-acetyl zeitabhängig (Abb. 35a). Nach 5 Stunden Inkubationszeit war das 86 kD Abbauprodukt des PARP erstmals im Western Blot nachzuweisen. Nach 24 Stunden war ein deutlicher Abbau zu beobachten, jedoch verschwand die obere Bande des nativen PARP nicht ganz.

Als zweites Caspase-Substrat wurde Lamin B ausgewählt und dessen Abbau ebenfalls im Western Blot verfolgt (Abb. 35b). Der Antikörper gegen Lamin B erkennt jedoch nur die native, intakte Form des Proteins. Ein Abbauprodukt wird nicht erkannt. Daher kann nur das Verschwinden der Bande des nativen Lamin B beobachtet werden. Bereits nach 5 Stunden Inkubation mit 20 μ M R-N-acetyl wurde die Lamin B-Bande deutlich schwächer. Nach 24 Stunden war kein Lamin B mehr nachweisbar.

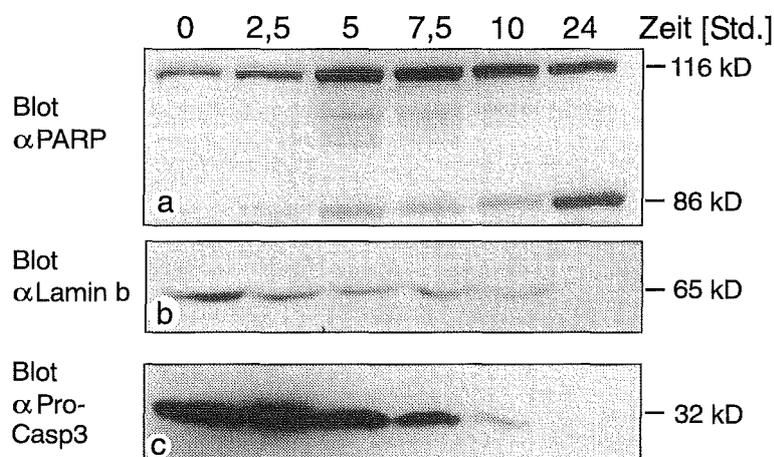


Abb. 35: Aktivierung von Caspasen während der APC-induzierten Apoptose

Der Abbau der Todessubstrate PARP (a) und Lamin B (b), sowie die Prozessierung der Pro-Caspase-3 (c) wurden im Verlauf der R-N-acetyl-induzierten Apoptose untersucht. HL-60 Zellen wurden mit 30 μ M R-N-acetyl gemäß den angegebenen Zeiten inkubiert. Der Nachweis der einzelnen Proteine erfolgte im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper.

Als drittes Caspase-Substrat wurde Pro-Caspase-3 (CPP32) untersucht. Caspase-3 ist für viele proteolytische Prozesse während der Apoptose verantwortlich und wird selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert (Erhard & Cooper 1996, Liu *et al.* 1996). In einem Western Blot kann die proteolytische Prozessierung der Pro-Caspase 3 verfolgt werden. Mit Hilfe

eines anti-Pro-Caspase-3 Antikörpers konnte anhand des Verschwindens der 32 kD Bande der Pro-Caspase-3 auf die Aktivierung des Enzyms geschlossen werden (Abb. 35c). Das Verschwinden des Pro-Enzyms begann nach 5 Stunden und war nach 7,5 Stunden bereits sehr deutlich. Nach 10-stündiger Inkubation lagen kaum noch Pro-Caspase-3 Moleküle vor.

4.6.2 Effekt der Caspase-Inhibitoren zVADfmk und zD-DCB auf die APC-induzierte Apoptose

Um zu demonstrieren, daß die Aktivierung der Caspasen essentiell für die APC-induzierte Apoptose ist, wurden hochspezifische Inhibitoren eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Inhibitoren verwendet: z-Val-Ala-Asp-fluormethylketon (zVADfmk), und z-Asp-2,6-dichlorbenzoyloxymethylketon (zD-DCB). zVADfmk ist ein kompetitiver und irreversibler Inhibitor der Caspase-1 bis Caspase-10 (Garcia-Calvo *et al.* 1998). Bei zD-DCB handelt es sich um einen Caspaseinhibitor mit breitem Wirkungsspektrum, der aufgrund einer hydrophoben Gruppe gut in die Zellen eindringen kann (Henkart 1996).

HL-60 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an zVADfmk und zD-DCB vorinkubiert und anschließend mit 30 µM R-N-acetyl behandelt. Nach 16-stündiger Inkubation wurde anhand der Bildung einer DNA-Leiter und des PARP-Abbau überprüft, ob Apoptose stattgefunden hatte.

Es zeigte sich, daß die APC-induzierte DNA-Fragmentierung (Abb. 36a), wie auch die Spaltung von PARP (Abb. 36b) konzentrationsabhängig von diesen Inhibitoren gehemmt wurden.

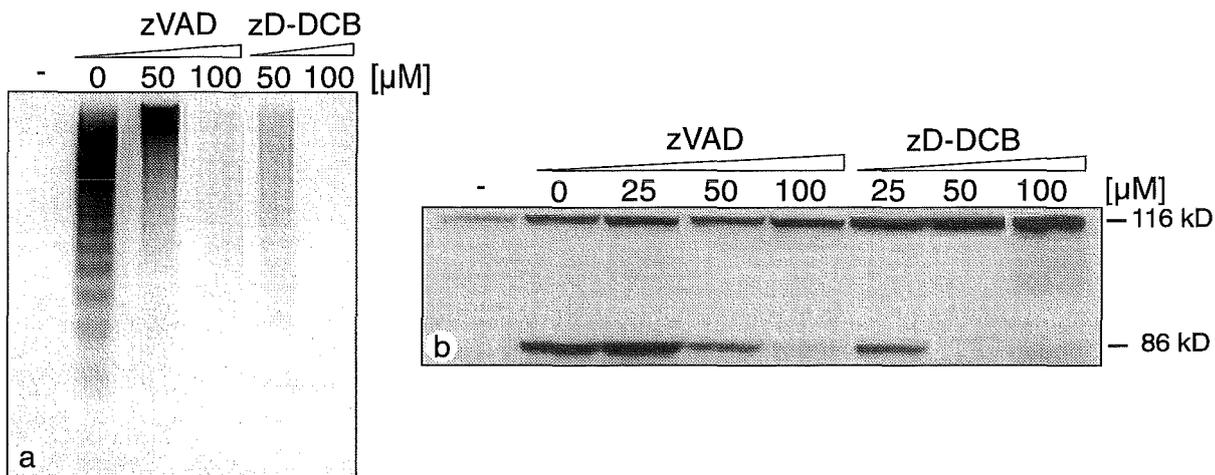


Abb. 36: Hemmung der APC-induzierten Apoptose durch die Caspase-Inhibitoren zVADfmk und zD-DCB.

HL-60 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 30 µM R-N-acetyl für 16 Stunden behandelt. (-) unbehandelte Kontrollzellen. Apoptose wurde anhand der Bildung einer DNA-Leiter im Agarosegel (a) und der Spaltung des PARP im Western Blot (b) überprüft.

Der Inhibitor zD-DCB konnte bereits ab einer Konzentration von 50 μM die APC induzierte Bildung einer DNA-Leiter und die Spaltung des PARP verhindern. Vorbehandlung mit 50 μM zVADfmk hatte nur einen schwachen Effekt. Dieser Inhibitor war erst bei einer Konzentration von 100 μM wirksam, konnte dann aber ebenfalls die Bildung eine DNA-Leiter sowie die Spaltung des PARP vollständig unterdrücken.

4.6.3 Die Expression des Virotoxins CrmA inhibiert R-N-acetyl induzierte Apoptose

CrmA ist das Gift des Kuhpockenvirus, mit dem das Virus die Immunantwort seines Wirtes unterdrückt. CrmA ist ein Protein, das effektiv und spezifisch Caspasen der Gruppe I und Gruppe II inhibiert. Durch die Hemmung von Caspasen in der befallenen Wirtszelle verhindert das Virus das apoptotische Sterben der Wirtszelle und deren Eliminierung durch das Immunsystem des Wirts (Cohen 1997, Garcia-Calvo *et al.* 1998, Ray *et al.* 1992).

Dieses Virusgift CrmA wurde in SKW6 Zellen überexprimiert und diese Zellen dazu benutzt, einen weiteren Beweis zu erbringen, daß Caspasen eine essentielle Rolle bei der APC-induzierten Apoptose spielen. Es ist bereits bekannt, daß Überexpression von CrmA Zellen vor Apoptoseinduktion durch verschiedene Stimuli schützt, wie beispielsweise UV-Bestrahlung (Rehemtulla *et al.* 1997) oder CD95 Ligand (Strasser *et al.* 1995).

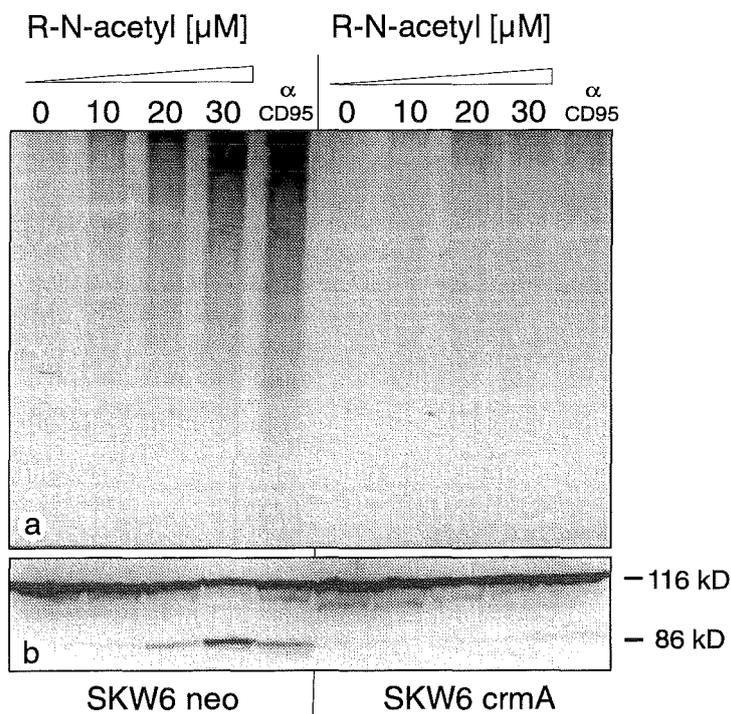


Abb. 37: Hemmung der APC-induzierten Apoptose durch CrmA.

SKW6 neo Zellen und SKW6 crmA Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an R-N-acetyl für 16 Stunden inkubiert. Das Auftreten von Apoptose wurde durch Nachweis der DNA-Fragmentierung (a) bzw. der PARP-Spaltung (b) nachgewiesen. α CD95: Behandlung mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ apoptoseinduzierenden anti-CD95 Antikörpern für 16 Stunden.

SKW6 Kontrollzellen, die nur mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren (SKW6 neo), sowie SKW6 Zellen, die einen Expressionsvektor für CrmA enthielten (SKW6 crmA), wurden mit steigenden Konzentrationen an R-N-acetyl behandelt. Nach 16-stündiger Inkubation wurde anhand von DNA-Leiterbildung (Abb. 37a) und PARP-Spaltung (Abb. 37b) überprüft, ob Apoptose stattgefunden hatte.

Als Kontrollsubstanzen wurden bei diesem Versuch anti-CD95 Antikörper eingesetzt, die in SKW6 Zellen Apoptose über den CD95 Rezeptor auslösen können. Diese Antikörper mimikrieren die Wirkung des CD95 Liganden indem sie durch Quervernetzung der Rezeptormoleküle zu deren Aggregation und Aktivierung führen (Oehm *et al.* 1992).

In SKW6 Kontrollzellen war ab einer Konzentration von 20 μ M R-N-acetyl die Bildung einer DNA-Leiter (Abb. 37a) und das Auftreten des 86 kD Spaltprodukts des PARP zu beobachten (Abb. 37b). Anti-CD95 Antikörper waren ebenfalls in der Lage, DNA-Fragmentierung und PARP-Abbau zu induzieren.

In CrmA exprimierenden Zellen fand jedoch keine Apoptoseinduktion statt. Selbst bei Inkubation der Zellen mit 50 μ M R-N-acetyl konnte kein DNA- oder PARP-Abbau beobachtet werden. Inkubation mit anti-CD95 Antikörpern zeigte ebenfalls keinen Effekt.

Das Kuhpockenvirusgift CrmA war demnach in der Lage, Induktion der Apoptose durch APC wie auch durch anti-CD95 Antikörper zu verhindern.

4.7 Die Rolle des Bcl-2 Proteins bei der APC-induzierten Apoptose

Das Bcl-2 Protein gehört zu einer ständig wachsenden Familie von Proteinen, die wichtige Regulatoren der Apoptose sind. Es sind sowohl pro-apoptotische, als auch anti-apoptotische Vertreter dieser Familie bekannt. Bcl-2 selbst ist der erste Regulator des Zelltodes in Säugern, der entdeckt wurde (Vaux *et al.* 1988). Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein, das ein Überleben der Zelle fördern und vor Apoptose schützen kann. Derzeit wird diskutiert, daß Bcl-2 seine protektive Wirkung ausübt, indem es Proteine inhibiert, die als Adaptoren für die Aktivierung von Caspasen notwendig sind. Eine Übersicht ist in Adams & Cory (1998) gegeben.

Es wurde untersucht, ob Bcl-2 auch ein Schutz gegen die apoptotische Wirkung der Alkylphosphocholine ist. Zwei verschiedene humane Zelllinien wurden als Modellsysteme herangezogen: Jurkat T Zellen und die B lymphoblastoid Zelllinie SKW6. Beide Zelllinien waren stabil mit einem Bcl-2 Expressionsvektor transfiziert (SKW6 bcl-2, Jurkat bcl-2). Kontrollzellen waren mit einem leeren Vektor transfiziert (SKW6 neo, Jurkat neo) (Armstrong *et al.* 1996, Strasser *et al.* 1995).

Bcl-2 überexprimierende Zellen und Kontrollzellen beider Linien wurden mit steigenden Konzentrationen an APC behandelt. Als Kontrollen für die Induktion der Apoptose wurden Taxol und Etoposid, zwei bekannte Induktoren der Apoptose verwendet (Kaufmann 1989,

Solary *et al.* 1994). Etoposid ist ein DNA-Topoisomerasehemmer, und Taxol wirkt stabilisierend auf Mikrotubuli. Um zu überprüfen, ob in den einzelnen Ansätzen Apoptose induziert wurde, wurde der Abbau des PARP und die Fragmentierung der DNA gemessen (Abb. 38).

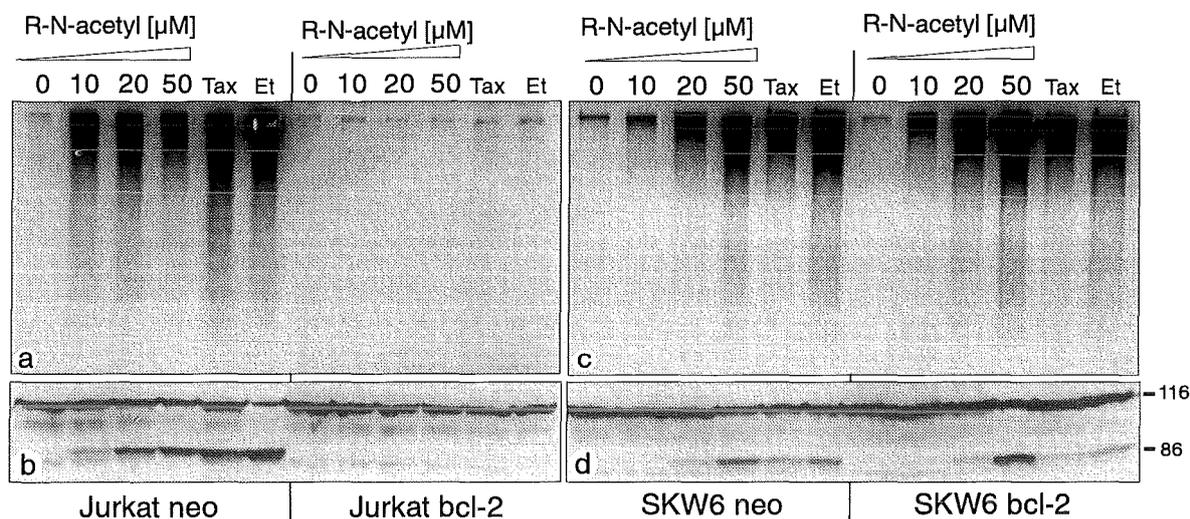


Abb. 38: Bcl-2 Überexpression schützt vor APC-induzierter Apoptose nur in Jurkat T Zellen.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an R-N-acetyl für 16 Stunden inkubiert. Et: 34 μM Etoposid, 16 Stunden. Tax: 10 μM Taxol, 16 Stunden. a) DNA-Fragmentierung in Jurkat T-Zellen; b) PARP-Spaltung in Jurkat T-Zellen; c) DNA-Fragmentierung in SKW6 Zellen; d) PARP-Spaltung in SKW6 Zellen.

Es zeigte sich, daß Überexpression von Bcl-2 nur in der Jurkat T-Zelllinie einen Schutz vor Apoptose bot (Abb. 38a, b). In den Bcl-2 überexprimierenden Jurkat T-Zellen konnte weder der Abbau von PARP, noch eine Fragmentierung der DNA beobachtet werden. Die Jurkat Kontrollzellen (Jurkat neo) hingegen zeigten diese apoptotischen Merkmale.

Überexpression von Bcl-2 in SKW6 Zellen konnte dagegen die Wirkung der APC nicht unterdrücken. DNA-Fragmentierung und auch der Abbau des PARP waren sowohl in den Bcl-2 überexprimierenden SKW6 Zellen zu beobachten als auch in den SKW6 Kontrollzellen (Abb. 38c, d).

Taxol und Etoposid zeigten die gleichen Effekte wie R-N-acetyl. Beide Substanzen induzierten Apoptose in Jurkat neo und SKW6 neo, aber nur in den Jurkat Zellen war durch Bcl-2 ein Schutz gegeben.

Es war eher erstaunlich, daß Bcl-2 in den beiden verwendeten Zelllinien ein unterschiedliches Verhalten zeigte. Obwohl Bcl-2 in Jurkat T Zellen ein Schutz vor Apoptose war, zeigte es in SKW6 Zellen keine Wirkung. Daher wurde überprüft, ob in den SKW6 Zellen Bcl-2 auch tatsächlich überexprimiert wird. Im Western Blot wurden die relativen Mengen an Bcl-2 Protein in SKW6 neo Zellen und den Bcl-2 überexprimierenden SKW6 bcl-2 Zellen verglichen (Abb. 39). Vor der Gelelektrophorese wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um sicherzustellen, daß gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden.

Es konnte gezeigt werden, daß in den SKW6 Zellen deutlich mehr Bcl-2 Protein vorhanden war als in den SKW6 neo Zellen.

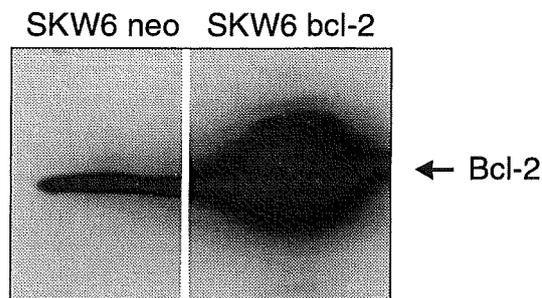


Abb. 39: Bcl-2 Expression in SKW6 neo und SKW6 bcl-2 Zellen.

Ganzellextrakte von SKW6 neo und SKW6 bcl-2 Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die relative Menge an Bcl-2 Protein im Western Blot unter Verwendung eines spezifischen anti-Bcl-2 Antikörpers bestimmt.

Um die Unterschiede zwischen der Jurkat T und der SKW6 Zelllinie näher zu untersuchen, wurde die Wirkungsweise der Alkylphosphocholine mit der eines weiteren Apoptoseinduktors verglichen.

Der klassische Apoptoseweg über den Todesrezeptor CD95 wurde durch Behandlung mit anti-CD95 Antikörpern ausgelöst. Diese Antikörper können Apoptose über den CD95 Signalweg auslösen, indem sie Rezeptormoleküle quervernetzen (Oehm *et al.* 1992).

Zellen, die mit anti-CD95 Antikörpern (α CD95) behandelt wurden zeigten ein ähnliches Verhalten wie APC-behandelte Zellen. Apoptotische Phänomene, wie die Fragmentierung der DNA, waren in Jurkat neo, nicht aber in Jurkat bcl-2 Zellen zu beobachten (Abb. 40). Überexpression von Bcl-2 bot demnach in Jurkat T Zellen einen Schutz vor anti-CD95 induzierter Apoptose. In SKW6 Zellen zeigten sich apoptotischen Phänomene in beiden Zelltypen unabhängig von der Überexpression des Bcl-2. DNA-Fragmentierung und PARP-Spaltung wurden sowohl in SKW6 neo, als auch in SKW6 bcl-2 Zellen induziert. Überexpression von Bcl-2 bot also in SKW6 Zellen keinen Schutz vor anti-CD95-induzierter Apoptose.

Diese Experimente ließen auf eine Zelltyp-abhängige Apoptose-inhibierende Wirkung des Bcl-2 schließen. APC verhielten sich in diesem Testsystem ähnlich wie anti-CD95 Antikörper.

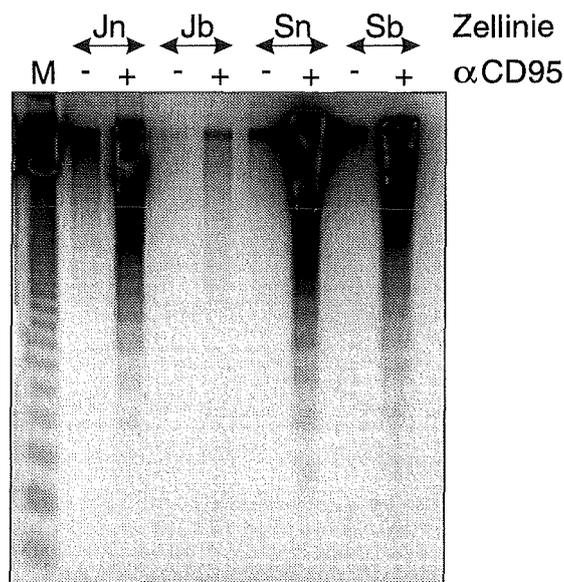


Abb. 40: Bcl-2 Überexpression schützt nur in Jurkat T-Zellen vor anti-CD95-induzierter Apoptose.

Jurkat T bzw. SKW6 Zellen wurden mit 1 µg/ml des apoptoseinduzierenden anti-CD95 Antikörpers (α CD95) für 5 Stunden inkubiert. M: DNA-Molekulargewichtsmarker; Jn: Jurkat neo; Jb: Jurkat bcl-2; Sn: SKW6 neo; Sb: SKW6 bcl-2.

4.8 Beteiligung von CD95 an der APC-induzierten Apoptose

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß bei der APC-induzierten Apoptose charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge abliefen. Erst wurde der Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie beobachtet, dann die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen, die Chromatinkondensierung und Fragmentierung der Zellkerne, sowie das *blebbing* der Plasmamembran und letztendlich das Abschnüren apoptotischer Körperchen. Es war jedoch nicht klar, wie APC-Verbindungen letztendlich die Apoptose-Maschinerie in Gang setzen können.

Ein klassischer Weg der Auslösung von Apoptose geht über den CD95 (Fas/APO-1) Rezeptor. Der CD95 Rezeptor kommt in vielen verschiedenen Zellen vor und löst nach Aktivierung durch den entsprechenden Liganden eine Signalkaskade aus, die zu besagten morphologischen und biochemischen Veränderungen in der Zellen führen, die auch nach APC-Behandlung beobachtet worden waren. In jüngster Literatur wird berichtet, daß CD95 auch unabhängig von CD95 Ligand aktiviert werden kann, beispielsweise durch Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht (Aragane *et al.* 1998, Rehemtulla *et al.* 1997). CD95 schien daher ein interessanter Kandidat für ein mögliches molekulares Ziel der APC zu sein.

4.8.1 Hemmung der APC-induzierten Apoptose in FADD dominant negativen BJAB Zellen

Um zu untersuchen, ob CD95 an der APC-induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden B-lymphoblastoide BJAB Zellen verwendet, die eine dominant negative Version des FADD (hier als FADD dn bezeichnet) exprimierten (Chinnaiyan *et al.* 1996). Diese FADD dn Mutante war noch in der Lage an CD95 zu binden, konnte aber aufgrund einer N-terminalen Verkürzung das apoptotische Signal nicht mehr weiterleiten (Chinnaiyan *et al.* 1995). Parallel dazu wurden Wildtyp-Zellen als Kontrollen benutzt (BJAB wt).

In diesen beiden Zelltypen wurde die Wirkung der APC untersucht. In einem ersten Versuch wurden BJAB FADD dn und BJAB wt Zellen mit steigenden Konzentrationen an R-N-acetyl inkubiert und nach 16 Stunden anhand der Bildung einer DNA-Leiter überprüft, ob Apoptose in den einzelnen Zellen stattgefunden hatte (Abb. 41a). APC induzierten unter diesen Bedingungen ab einer Konzentration von 30 μM die Bildung einer DNA-Leiter in den BJAB Kontrollzellen. Bei Behandlung mit 50 μM R-N-acetyl für 16 Stunden war eine sehr deutliche Leiter zu sehen. In den FADD dn Zellen zeigte sich jedoch keine DNA-Leiter. Nur bei einer Konzentration von 50 μM war ein sehr schwaches Leitermuster zu sehen. Bei der Betrachtung der Zellen im Lichtmikroskop wurde auch deutlich, daß FADD dn Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen nicht das für Apoptose charakteristische *blebbing* zeigten (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Test bezog sich auf den Abbau von PARP. Da ab 30 μM R-N-acetyl in BJAB Wildtypzellen eine DNA-Leiter zu sehen war, wurden Zellen mit R-N-acetyl dieser Konzentration behandelt und nach verschiedenen Inkubationszeiten der Abbau des PARP untersucht (Abb. 41b). Zusätzlich wurde hier als Kontrolle der CD95 Ligand als physiologischer Aktivator des CD95 Rezeptors eingesetzt.

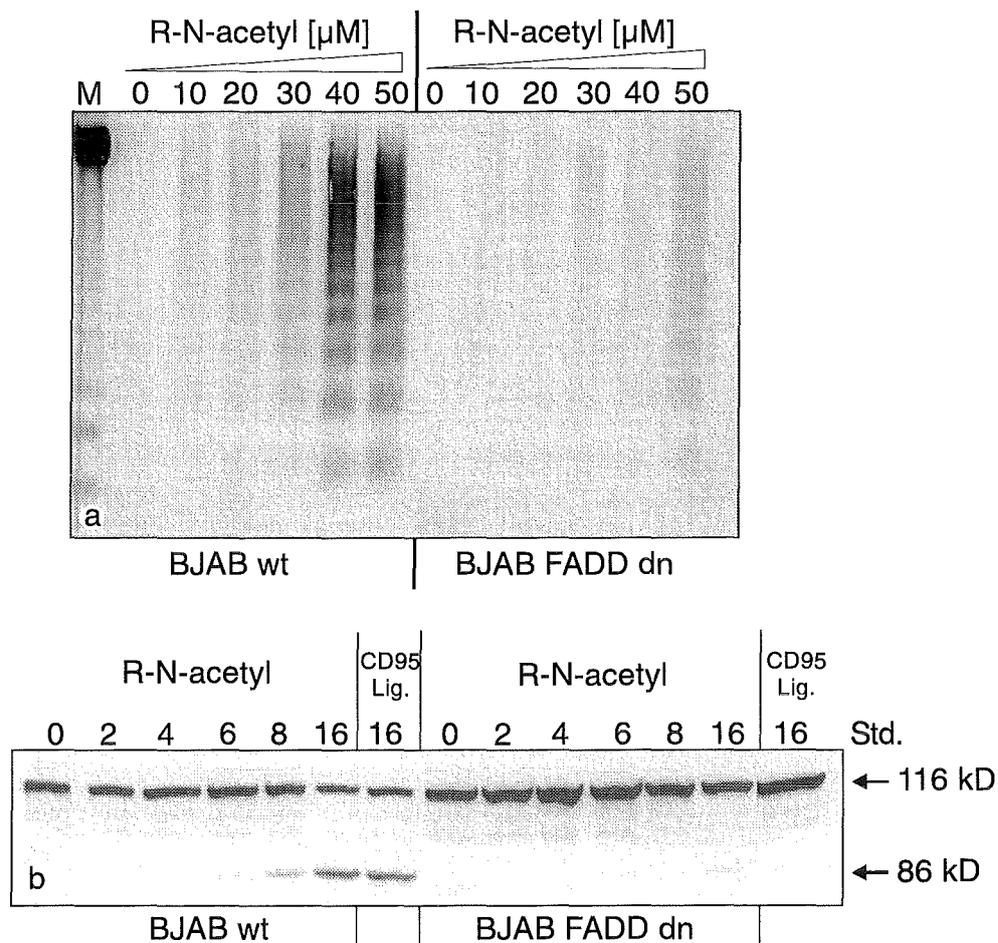


Abb. 41: Hemmung der APC-induzierten Apoptose in BJAB FADD dn Zellen.

BJAB wt und BJAB dn Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen R-N-acetyl für 16 Stunden inkubiert und anschließend auf DNA-Fragmentierung hin im Agarosegel untersucht (a). Zusätzlich wurden Zellen mit 30 μM R-N-acetyl für unterschiedliche Zeiten inkubiert und die Spaltung des PARP im Western Blot nachgewiesen (b). Als Kontrolle wurde CD95 Ligand (CD95 Lig.) in einer Konzentration von 300 ng/ml eingesetzt.

In den Wildtypzellen begann der Abbau des PARP nach 8 Stunden. CD95 Ligand konnte in diesen Wildtyp-Zellen ebenfalls den Abbau des PARP induzieren. In den FADD dn Zellen hingegen war über den gesamten Zeitraum der Behandlung kein Abbau des PARP zu beobachten. Selbst nach 16-stündiger Inkubation mit 30 μM R-N-acetyl lag das PARP noch in der nativen Form vor. CD95 Ligand konnte in diesen Zellen ebenfalls keinen PARP-Abbau induzieren.

Diese Ergebnisse ließen auf eine Beteiligung des CD95 Rezeptors an der APC-induzierten Apoptose schließen.

4.8.2 APC induzieren ein *capping* des CD95 Rezeptors

Mit Hilfe der BJAB FADD dn Zellen konnte nur ein indirekter Beweis für die Beteiligung des CD95 an der APC-induzierten Apoptose erbracht werden. Daher wurde die Aktivierung des CD95 Rezeptors mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie demonstriert.

Wie bereits erwähnt führt eine Aktivierung des CD95 zu einer Aggregation von CD95 Molekülen (Dixit 1998). Anschließend kann, wie bei der Aktivierung mancher anderer Rezeptoren auch, ein *capping* beobachtet werden, d.h. die Rezeptormoleküle sammeln sich an einem Pol der Zelle und bilden dort ein sog. *cap*.

Dieses *capping* kann im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung spezifischer anti-CD95 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern nachgewiesen werden.

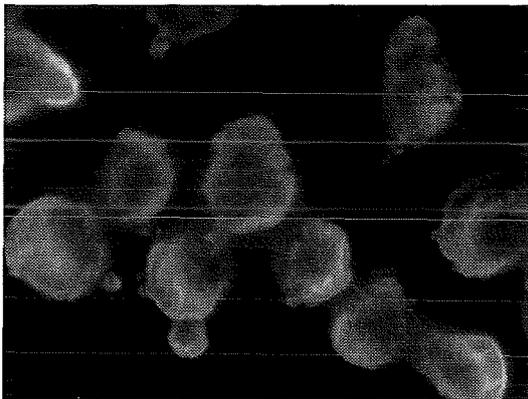
Unbehandelte BJAB Wildtyp Kontrollzellen zeigten eine schwache und diffuse Fluoreszenz (Abb. 42a). Als Positivkontrolle wurden BJAB Zellen mit CD95 Ligand behandelt. Die Aggregation der CD95 Moleküle nach Bindung der Liganden führte zu einer Konzentration des Farbstoffs pro Fläche und somit zu einem intensiveren Fluoreszenzsignal (Abb. 42b, c).

Nach 30 Minuten zeigten sich in CD95 Ligand-behandelten Zellen sehr deutliche *caps*.

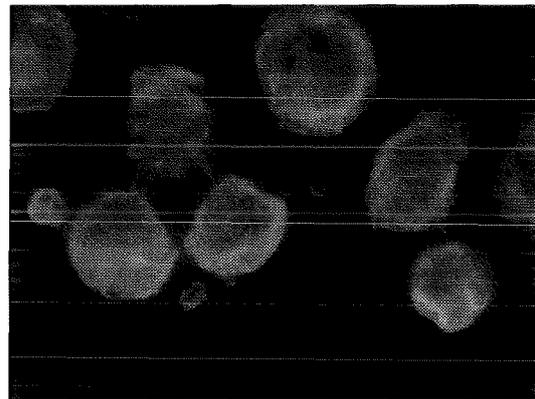
Die Behandlung von BJAB Zellen mit 30 μ M R-N-acetyl für 2 und 3 Stunden führte ebenfalls zu einer *cap*-Bildung (Abb. 42d, e). CD95 Moleküle hatten sich halbmondförmig an einer Seite der Zellen angesammelt. Die *caps* waren nicht so ausgeprägt wie nach Behandlung mit CD95 Liganden, jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich zu erkennen.



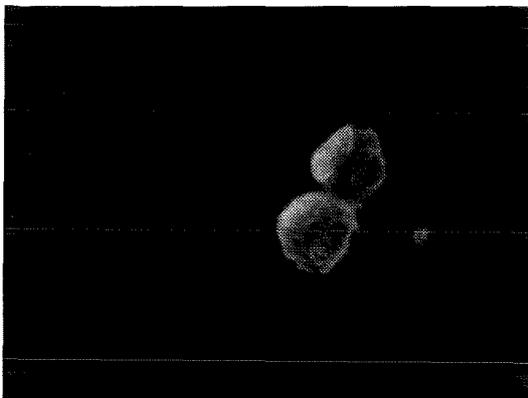
a) Kontrolle



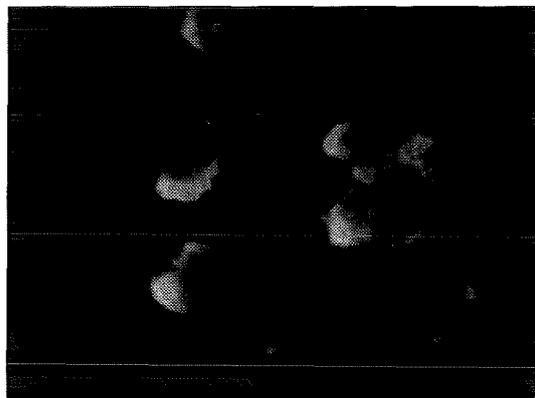
b) APC, 30 μM, 2 Stunden



c) APC, 30 μM, 3 Stunden



d) CD95 Ligand, 300ng/ml, 30 min



e) CD95 Ligand, 300 ng/ml, 30 min

Abb. 42: Immunfluoreszenz-Nachweis des CD95-Rezeptorcappings in BJAB Wildtyp Zellen.
 1×10^6 BJAB Zellen wurden gemäß den angegebenen Bedingungen inkubiert. Der Nachweis des Rezeptorcappings erfolgte im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe von spezifischen anti-CD95 Antikörpern. Vergrößerung: 1.000-fach. APC: R-N-acetyl.

5 Diskussion

Seit Anfang der 80er Jahre ist die antitumorale Wirkung von Alkylphosphocholinen bekannt. HePC schien ein vielversprechender Kandidat für die Tumorthherapie zu sein, jedoch zeigten sich bei der systemischen Applikation erhebliche Nebenwirkungen wie Übelkeit und Brechreiz. HePC wird daher nur in der topischen Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebspatientinnen eingesetzt (Unger *et al.* 1988, 1989). Mit Et-18-OCH₃ wurden *in vitro* ebenfalls gute Ergebnisse erzielt, es ließen sich jedoch keine genügend hohen Serumspiegel im Patienten erreichen, da Et-18-OCH₃ im Serum bevorzugt an Lipoproteine bindet und daher rasch in der Leber abgebaut werden kann (Kötting 1992a). Et-18-OCH₃ wird in klinischen Studien zum *ex vivo* Knochenmarkspurgung vor der autologen Transplantation eingesetzt (Dietzfelbinger *et al.* 1993, Koenigsmann *et al.* 1996, Vogler *et al.* 1987, Vogler & Berdel 1993).

Da ein 'optimales' APC noch nicht gefunden wurde, sind bereits viele Strukturveränderungen an APC vorgenommen worden. Die Vertreter dieser Substanzklasse basieren auf dem Grundgerüst des 2-Lysophosphatidylcholins und variieren in der Länge der apolaren Kohlenwasserstoffkette und der Anzahl der Doppelbindungen, in der funktionellen Gruppe an der 2-Position sowie in der polaren Kopfgruppe. Eine ausführliche Übersicht über fast 100 für die Tumorthherapie hergestellter APC ist in Houlihan *et al.* (1995) gegeben. Diese Bemühungen, durch Strukturvariationen wirksamere APC herzustellen, verdeutlicht die Notwendigkeit von neuen, 'maßgeschneiderten' Substanzen.

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten APC zielte dahin, sich im Vergleich zum HePC wieder an die Struktur der natürlich vorkommenden Lysophospholipide anzunähern, in der Hoffnung, so die Nebenwirkungen des HePC zu verringern. Die neuen APC sind daher Derivate des HePC mit einer Funktionalisierung an der 2-Position und einer im Vergleich zum HePC um 2 Kohlenstoffatome verlängerten Kohlenwasserstoffkette, um eine apolare Kettenlänge von 16 C-Atomen beizubehalten.

Am Anfang der Arbeit standen 8 neue Verbindungen zur Verfügung (Abb. 2), über deren Wirkung auf Tumorzellen noch nicht viel bekannt war. Die Zielsetzung war es daher, diese neuen Verbindungen in Zellkultursystemen humaner Tumorzelllinien auf ihre Wirkung hin zu testen und den Wirkmechanismus aufzuklären.

5.1 Toxizität der neuen APC

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die neuen APC in der Leukämie Zelllinie HL-60 auf ihre Toxizität hin getestet.

Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit APC zeigte sich bei allen Verbindungen konzentrationsabhängig eine Wachstumshemmung (Abb. 5, 6). Der Konzentrationsbereich, in

dem die einzelnen APC wirksam waren, variierte jedoch stark. Die wirksamste Verbindung war R-N-acetyl mit einem LD₅₀-Wert von 4 µM.

Im Vergleich mit den 'klassischen' APC, HePC und Et-18-OCH₃ zeigten R-N-acetyl, S-N-acetyl und S-O-acetyl einen niedrigeren und S-NH₂ einen vergleichbaren LD₅₀-Wert (Tab. 3). In diesem Testsystem waren demnach drei der neuen APC-Verbindungen wirksamer als HePC und Et-18-OCH₃.

Die Vitalität der Zellen nach APC-Behandlung wurde mit Hilfe des Trypanblau-Tests bestimmt und daraus die LD₅₀-Werte berechnet. Das Prinzip dieses Nachweises beruht darauf, daß der Farbstoff Trypanblau in nekrotische Zellen eindringen kann, deren Membranen geschädigt sind. Da im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt wurde, daß APC durch Induktion von Apoptose ihre zytotoxische Wirkung ausüben können, wurde deutlich, daß bei den Vitalitätsbestimmungen nur (sekundär-) Nekrosen gezählt wurden. Zellen, die sich in einem früheren Stadium der Apoptose befanden, konnten nicht mit erfaßt werden. Ein anderer Test, der apoptotische Zellen berücksichtigt hätte, hätte vermutlich zu noch niedrigeren LD₅₀-Werten der neuen APC geführt.

Bei den Hydroxy- und Esterverbindungen war die Toxizität abhängig von der Konfiguration der APC. Die S- (unnatürlich) konfigurierten Isomere waren weit toxischer als die R- (natürlich) konfigurierten Gegenstücke. Es zeigte sich, daß nur die S-konfigurierten Isomere im unteren mikromolaren Bereich toxisch waren. Die LD₅₀-Werte der R-konfigurierten Isomere lagen dagegen erheblich höher bei 68 µM für R-O-acetyl und 30 µM für R-OH. Für das Isomerenpaar R/S-O-acetyl wurde sogar ein Unterschied der Toxizität um den Faktor 10 bestimmt. Der Grund dafür läßt sich in der unterschiedliche Metabolisierbarkeit der beiden Stereoisomere sehen. R-O-acetyl kann von der Phospholipase A₂ mit einer Umsatzrate von 269 U/min zu R-OH metabolisiert werden. Für S-O-acetyl wurde lediglich eine Umsatzrate von < 0,1 U/min bestimmt. Die Amidverbindungen sind ebenfalls keine Substrate für PLA₂ (Massing, unveröffentlichte Daten). Hildenbrand (1998) hat gezeigt, daß R-OH zu einer R-O-acyl-ähnlichen Verbindung reacyliert werden kann. Diese neue Verbindung, die Phosphatidylcholin sehr ähnlich ist, kann in der Zellmembran toleriert werden und ist offensichtlich weit weniger toxisch als ihr Vorgänger. Die Verbindungen R-OH und R-O-acetyl können demnach effektiv durch zelluläre Enzyme 'entgiftet' werden.

Die Beobachtung, daß die R-konfigurierten Hydroxy- und Esterverbindungen weniger toxisch sind als die S-konfigurierten Isomere, zog sich weiter durch die ganze Arbeit. R-OH und R-O-acetyl konnten in HL-60 Zellen keine Apoptose induzieren. Effekte wie die Spaltung von PARP oder DNA-Fragmentierung und auch die Bildung apoptotischer Körperchen konnten nach Behandlung mit R-OH und R-O-acetyl ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 27, 30, 33).

5.2 Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-R-N-acetyl

Nachdem gezeigt wurde, daß APC eine toxische Wirkung in HL-60 Zellen hatten, stellte sich die Frage, wie schnell und in welchem Ausmaß die Verbindungen in die Zellen aufgenommen werden.

Für weitere Untersuchungen wurde R-N-acetyl ausgewählt, da dies die Verbindung mit dem kleinsten LD₅₀-Wert war. R-N-acetyl wurde im Essigsäure-Rest mit ¹⁴C markiert und für Versuche zur Aufnahme in die Zellen eingesetzt. Die Aufnahmeversuche wurden mit HL-60 und MDA-MB-468 Zellen durchgeführt, um ein Beispiel für Tumorzellen in Suspensionskultur und adhärent wachsende Tumorzellen zu haben.

Es zeigte sich, daß die Aufnahme in HL-60 Zellen sowie in MDA-MB-468 Zellen in Kulturmedium langsam und schlecht vor sich ging. Nach 16-stündiger Inkubation mit radioaktiven Lipiden hatten HL-60 Zellen nur etwa 8% davon aufgenommen, während 92% im Medium geblieben waren (Abb. 7). In MDA-MB-468 Zellen waren nach dieser Zeit immerhin 25% der markierten Lipide zu finden.

Um zu überprüfen, ob APC an Bestandteile des Serums im Kulturmedium binden, wurden die Aufnahmeversuche in serumfreiem Medium (0% FKS) wiederholt. Hier zeigte das R-N-acetyl schon nach einigen Minuten eine derartig hohe Toxizität gegenüber HL-60 Zellen, daß die Konzentration des ¹⁴C-R-N-acetyl um den Faktor 4 gegenüber den Versuchen in serumhaltigem Medium gesenkt werden mußte, um zu verhindern, daß die Zellen lysierten. Dann zeigte sich, daß beide Zelllinien innerhalb von drei Stunden die angebotenen Lipide schnell und fast vollständig aufnahmen.

Es lag auf der Hand, daß APC stark an Bestandteile im Serum binden, vermutlich an Albumin. Albumin hat vier Bindungsstellen für Fettsäuren (Spector *et al.* 1975) und es wäre denkbar, daß APC mit der apolaren Kohlenwasserstoffkette an Albumin binden können.

Andreesen *et al.* (1982) beschreiben den Einfluß der Serumkonzentration im Kulturmedium auf die Toxizität des Et-18-OCH₃. Die Zerstörung frisch isolierter Leukämiezellen durch Et-18-OCH₃ war serumabhängig. Je mehr Serum im Medium vorlag, desto ungiftiger war Et-18-OCH₃. In Gegenwart von 40% FKS im Medium war Et-18-OCH₃ völlig ungiftig für die Zellen. Heesbeen *et al.* (1995) haben gezeigt, daß Et-18-OCH₃ an Albumin im Serum des Zellkulturmediums bindet und dadurch die Toxizität von Et-18-OCH₃ erheblich vermindert wird. Zudem kann Et-18-OCH₃ mit Albumin wieder aus Zellen extrahiert werden (Heesbeen *et al.* 1993). Offensichtlich können die hier untersuchten APC ebenfalls an Serumbestandteile wie beispielsweise Albumin binden. Dadurch wird die Toxizität der APC erheblich verringert. In serumfreiem Medium führte eine Konzentration von 20 µM R-N-acetyl zur schnellen Lyse von HL-60 Zellen (Daten nicht gezeigt). Für HePC wird eine lytische Wirkung bei 10% FKS im Medium erst ab 100 µM beschrieben und bis 80 µM wurden die Zellen nicht beschädigt (Kaufmann-Kolle & Fleer 1992). Alle weiteren Versuche mit APC wurden in normalem, serumhaltigen Medium durchgeführt um zu gewährleisten, daß keine Lyse der Zellen vorlag.

Die Versuche zur Aufnahme des ^{14}C -R-N-acetyl in HL-60 und MDA-MB-468 Zellen wurden in normalem Kulturmedium durchgeführt. Das Kulturmedium enthielt für MDA-MB-468 Zellen 10% FKS, für HL-60 Zellen 15% FKS. Die Aufnahmeversuche haben gezeigt, daß R-N-acetyl von MDA-MB-468 Zellen scheinbar besser aufgenommen wird als von HL-60 Zellen (Abb. 7a, c). In normalem Kulturmedium war allerdings bei HL-60 Zellen 5% mehr Serum im Medium vorhanden, so daß hier wahrscheinlich nicht von einer schlechteren Aufnahme die Rede sein kann, sondern eher von einer verstärkten Bindung des ^{14}C -R-N-acetyl an Albumin. Jedoch haben MDA-MB-468 Zellen die APC auch unter serumfreien Bedingungen besser aufgenommen. Bereits nach 5 Minuten hatten MDA-MB-468 Zellen 50% der markierten APC aufgenommen, während HL-60 Zellen dazu fast eine Stunde brauchten (Abb. 7b, d). Vermutlich läßt sich daher doch ein besserer Aufnahmemechanismus der adhärent wachsenden MDA-MB-468 Zellen im Vergleich zu den in Suspensionskultur wachsenden HL-60 Zellen diskutieren.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob ^{14}C -R-N-acetyl in den Zellen metabolisch stabil ist, oder ob ein Ab- oder Umbau stattfindet.

Nach entsprechenden Inkubationszeiten mit ^{14}C -R-N-acetyl wurden alle Lipide aus den Zellen extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Radioaktivität in den einzelnen Banden mit Hilfe der Autoradiographie detektiert.

Ein Abbau von R-N-acetyl fand nur in sehr geringem Maße statt (Abb. 9b). Während der gesamten Behandlungszeit von 16 Stunden nahm das Signal der Bande des ^{14}C -R-N-acetyl kaum ab. Nach 16-stündiger Inkubationszeit erschienen einige schwache Banden, die sich allerdings erst nach 10-tägigem Auflegen des Röntgenfilms zeigten. Bei längeren Inkubationszeiten von 24 oder 36 Stunden waren diese dünnen Banden ebenfalls zu erkennen. Es sei jedoch angemerkt, daß zu diesem Zeitpunkt die Zellen bereits apoptotisch waren und im Lichtmikroskop das charakteristische *blebbing* beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Auffällig war, daß die Banden der Autoradiographie in ihrem Verlauf dem Muster von zellulären Lipiden entsprachen. Da das ^{14}C -R-N-acetyl im Essigsäurerest markiert war, ist anzunehmen, daß der Essigsäurerest in geringem Maße abgespalten wurde und in Form von Acetyl-CoA als Bausteine für Fettsäuren zum Aufbau von Lipiden verwendet wurde.

Ein andere Möglichkeit eines Abbaus von APC besteht durch ein Phospholipase C-ähnliches Enzym, das an der Phosphatgruppe angreifen könnte. Für Et-18-OCH₃ wird ein langsamer Abbau durch ein solches Enzym zu 1-O-Octadecyl-2-O-methylglycerol beschrieben, der jedoch die toxische Wirkung nicht beeinträchtigt (Fleer *et al.* 1987). Ebenso kann HePC innerhalb von Zellen zu Hexadecanol abgebaut werden (Eibl & Unger 1986). Es wäre denkbar, daß eine derartige Reaktion auch bei R-N-acetyl stattfinden kann. Wie sich aber gezeigt hat, ist nach 36-stündiger Behandlung von Zellen, die zu diesem Zeitpunkt schon apoptotisch sind, noch der Großteil des R-N-acetyl als solches zu detektieren (Abb. 9b).

5.3 Einfluß von R-N-acetyl auf die intrazelluläre Signaltransduktion

5.3.1 Untersuchungen zur Aktivierung der ERK MAP Kinase Kaskade

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob APC die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen und als Signalmoleküle fungieren können. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß manche Phospholipide bzw. deren Abkömmlinge signalübermittelnde Eigenschaften besitzen. Hier wurde versucht, den Einfluß der APC auf die intrazelluläre Signaltransduktion mit der Wirkung von Lysophosphatidsäure (LPA) zu vergleichen. LPA, das kleinste natürlich vorkommende Lysophospholipid, wird durch Phospholipase A₂ aus Phosphatidsäure freigesetzt und hat strukturell eine Ähnlichkeit zu den hier untersuchten APC.

LPA ist ein Mitogen, das in Konzentrationen von 1 µM bis 5 µM an Albumin gebunden im Serum vorliegt. LPA werden viele biologische Effekte zugeschrieben, wie beispielsweise Stimulierung der Proliferation von Fibroblasten, der Plättchenaggregation, der Bewegungsfähigkeit von Zellen, der Tumorzellinvasion, sowie der Dedifferenzierung und Retraktion von Neuriten. Zudem wird es für die hitzestabile und nicht-dialysierbare Aktivität des Serums verantwortlich gemacht (Jalink *et al.* 1994, Moolenaar 1994).

Obwohl APC im Gegensatz zu LPA toxisch sind, wurde untersucht, ob durch APC ähnliche intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden können und wo eventuell eine unterschiedliche Regulation zu sehen ist.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Aktivierung der MAP Kinasen ERK gelegt.

LPA aktiviert die ERK MAP Kinase Kaskade über einen rezeptorvermittelten, G-Protein abhängigen Mechanismus (Cadwallar *et al.* 1997, Moolenaar *et al.* 1997). LPA kann zelltypabhängig zu einer Autophosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGF Rezeptor (Daub *et al.* 1996) oder PDGF-Rezeptor (Herrlich *et al.* 1998) führen. Zudem wurde für LPA ein eigener Plasmamembranrezeptor identifiziert und kloniert (van der Bend *et al.* 1992). Es war denkbar, daß APC aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu LPA mit solchen Targets an der Plasmamembran wechselwirken können.

Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit R-N-acetyl fand eine kurze, transiente Aktivierung der MAP Kinase ERK statt (Abb. 10). Schon nach einer Minute war die phosphorylierte, aktive Form der ERK nachzuweisen, nach 3 Minuten wurde ein Maximum erreicht und nach 5 Minuten klang das Signal wieder ab. Diese APC-induzierte ERK-Aktivierung war konzentrationsabhängig (Abb. 11). Ab einer Konzentration von 10 µM R-N-acetyl konnte eine Aktivierung der ERK beobachtet werden. Deutliche Aktivierung war nach Inkubation mit 50 µM R-N-acetyl zu messen.

Eine Aktivierung der ERK MAP Kinase konnte auch in MDA-MB-468 Zellen gefunden werden, was einen zelltypunabhängigen Effekt nahelegt (Abb. 15). Die APC-induzierte ERK-Aktivierung in MDA-MB-468 dauerte jedoch etwas länger an und das Signal klang erst nach 30 Minuten wieder ab.

Die ERK Aktivierung durch LPA ist biphasisch (Cook & McCormick 1996). Ein erstes, kurzes und transientes Signal wird nach einigen Minuten beobachtet, ähnlich wie bei den APC. Eine zweite, länger andauernde Aktivierungsphase tritt nach Ablauf von 2 bis 3 Stunden auf. Diese zweite Aktivierungsphase wird für die mitogene Wirkung der LPA verantwortlich gemacht. Wofür die erste Aktivierungsphase dient, ist nicht klar.

Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit R-N-acetyl ließ sich nur eine kurzfristige Aktivierung der ERK beobachten. Eine zweite Aktivierungsphase trat innerhalb eines Zeitraumes von bis zu fünf Stunden nicht mehr auf (Abb. 12). Die Aktivierung der ERK durch APC war demnach nicht biphasisch.

Es ist bekannt, daß unterschiedliche ERK Aktivierungskinetiken zu verschiedenen Effekten innerhalb von Zellen führen können. Marshall (1995) beschreibt den Unterschied zwischen einer transienten im Vergleich zu einer anhaltenden ERK Aktivierung in PC12 Zellen. Eine transiente ERK Aktivierung in PC12 Zellen, wie sie nach EGF-Stimulierung erreicht wird, führt zur Proliferation. Eine bis zu drei Stunden andauernde ERK Aktivierung, die durch NGF ausgelöst werden kann, hat die Differenzierung der PC12 Zellen zu Neuronen zur Folge. Diese Experimente verdeutlichen, daß die Dauer der ERK Aktivierung entscheidend für die zellulären Antworten ist. Hier könnte daher eine unterschiedliche Regulation des LPA- und des APC-vermittelten Signals zu sehen sein.

Nachdem eine Aktivierung der ERK durch APC gezeigt werden konnte war es interessant, dieses Signal näher zu charakterisieren.

Neben ERK wurde daher in HL-60 Zellen die Aktivierung von p21 Ras, einer weiteren Komponente des MAP Kinase Signalwegs, untersucht. Nach Behandlung von HL-60 Zellen mit APC ließ sich eine Aktivierung des Ras messen, die in ihrem zeitlichen Verlauf dem Aktivierungsmuster der MAP Kinase ERK entsprach. Bereits nach einer Minute konnte eine Zunahme des aktiven Ras-GTP nachgewiesen werden. Diese Aktivierung war nach drei und fünf Minuten noch deutlich wahrzunehmen und sank dann unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle ab (Abb. 14).

Das Ras-Protein ist als Knotenpunkt bei der Weiterleitung von Signalen von verschiedenen Plasmamembranrezeptoren auf Proteinkinasen der MAP Kinase Familie bekannt (Belka *et al.* 1995, Wiesmüller & Wittinghofer 1994). Die Beteiligung von Ras an der APC-induzierten ERK Aktivierung legte die Möglichkeit nahe, daß es sich um einen rezeptorvermittelten Prozeß handeln könnte. Daher wurde untersucht, ob *upstream* von Ras Rezeptoren aktiviert werden.

Um zu klären, ob die APC-induzierte ERK Aktivierung ein G-Protein abhängiger Prozeß ist, wurde Pertussis Toxin eingesetzt, das die Signaltransduktion durch ADP-Ribosylierung bestimmter G-Proteine unterbricht (Bokoch *et al.* 1984). Die ERK Aktivierung ließ sich in HL-60 Zellen durch Pertussis Toxin unterdrücken (Abb. 13). Diese Beobachtung verdeutlicht zweierlei. Zum einen legt die Hemmbarkeit der APC-induzierten ERK Aktivierung durch

Pertussis Toxin die Beteiligung von G-Proteinen an diesem Prozeß nahe. Zum anderen konnte ausgeschlossen werden, daß die ERK-Aktivierung auf einer unspezifischen, detergenzartigen Wirkung der APC beruht, was zu einem Calciumeinstrom in die Zelle und zu einer Calcium-induzierten ERK Aktivierung geführt hätte.

Die Transduktion des mitogenen Signals der LPA verläuft über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der die Aktivierung der Ras/MAP Kinase Kaskade vermittelt (Jalink *et al.* 1994, Malarkey *et al.* 1995). LPA kann jedoch auch zur Autophosphorylierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen führen, wie beispielsweise EGF Rezeptor oder PDGF Rezeptor. Diese Rezeptor-Tyrosinkinasen werden als *downstream* Mediatoren im Signalweg der ERK Aktivierung durch G-Protein gekoppelten Rezeptoren diskutiert (Daub *et al.* 1996). LPA kann unabhängig von Liganden zelltypabhängig über eine Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors zur Autophosphorylierung des EGF Rezeptors oder des PDGF Rezeptors führen (Herrlich *et al.* 1998).

Es schien daher interessant zu untersuchen, ob Rezeptor-Tyrosinkinasen an der APC-induzierten ERK-Aktivierung beteiligt sind. Für diese Versuche wurden MDA-MB-468 Zellen verwendet, da sie eine im Vergleich zu HL-60 Zellen gut untersuchte Rezeptorausstattung haben (Pathak *et al.* 1979). MDA-MB-468 Zellen exprimieren, wie viele andere Tumorzellen auch, eine hohe Zahl von EGF Rezeptor Molekülen (Filmus *et al.* 1985). Daher war diese Zelllinie besonders geeignet, um einen möglichen Effekt der APC auf den EGF Rezeptor zu untersuchen.

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren war durch Untersuchungen zum Tyrosinphosphorylierungsstatus der gesamten zellulären Proteine gegeben. Nach Behandlung mit APC konnten Phosphorylierungen an Tyrosinresten von Proteinen eines Molekulargewichts von etwa 180 kD im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 16). Eine Immunpräzipitation des EGF Rezeptors und anschließender Western Blot zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der EGF Rezeptormoleküle zeigte nach APC-Inkubation eine sehr schwache Phosphorylierung des EGF Rezeptors im Vergleich zu EGF-behandelten Zellen (Abb. 17).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde AG1478, ein spezifischer Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors, verwendet, um eine Beteiligung des EGF Rezeptors an der APC-induzierten ERK Aktivierung zu bestätigen (Levitzki & Gazit 1995). Um zu überprüfen, ob der PDGF Rezeptor auch an der APC-induzierten ERK Aktivierung beteiligt ist, wurde mit AG1296 zusätzlich ein spezifischer Inhibitor des PDGF-Rezeptors eingesetzt (Kovalenko *et al.* 1994, 1997). Nur AG1478 konnte die APC-induzierte ERK Aktivierung unterdrücken (Abb. 18). Das legt eine Beteiligung des EGF Rezeptors an der APC-induzierten ERK Aktivierung in EGF Rezeptor überexprimierenden MDA-MB-468 Zellen nahe.

Was die Aktivierung der Ras/MAP Kinase Kaskade, die nach APC-Behandlung beobachtet wurde, zu bedeuten hat, ist unklar. Jedoch sind mitogene Effekte auch für andere APC beschrieben worden. Et-18-OCH₃ beispielsweise regt in subtoxischen Dosen Zellen zum Wachstum an (Sobottka *et al.* 1993). Dieses eher paradox anmutende Phänomen tritt nicht nur bei Alkylphosphocholinen auf, sondern auch bei anderen zytotoxischen Substanzen wie beispielsweise Adriamycin, das in subtoxischen Dosen ebenfalls die Zellproliferation stimuliert (Vichi & Tritton 1989). Das Organometall TBT, ein starkes Zellgift und Induktor der Apoptose, führt ebenfalls zu einer Aktivierung der ERK MAP Kinase Kaskade (Zaucke 1997).

5.3.2 Einfluß der APC auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Calciumionen sind an vielen Signaltransduktionswegen als intrazelluläre *messenger* beteiligt. Da gezeigt werden konnte, daß APC die Signaltransduktion beeinflussen und zu einer Aktivierung der ERK MAP Kinase Kaskade führen, wurde bestimmt, welchen Einfluß APC auf die intrazelluläre freie Calciumkonzentration haben.

Nach Behandlung von differenzierten HL-60 Zellen mit R-N-acetyl wurde eine kurze und transiente Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels gemessen. Der Verlauf dieser Konzentrationsänderung war vergleichbar mit dem des fMLP, einem chemotaktischen Peptid, das in differenzierten HL-60 Zellen einen rezeptorvermittelten Calciumeinstrom auslöst kann (Abb. 21). Beide Signale, das fMLP- und das APC-vermittelte Signal, ließen sich durch Pertussis Toxin unterdrücken (Abb. 22). Dieser Versuch verdeutlicht, daß die APC in den eingesetzten Konzentrationen von bis zu 50 µM nicht zur Lyse der Zellen führten. Die Änderung der intrazellulären freien Calciumkonzentration beruhte nicht auf einer Zerstörung der Membranintegrität durch detergenzartige Effekte der APC, sondern war ein G-Protein abhängiger, vermutlich rezeptorgekoppelter Vorgang.

Die Bedeutung dieses Calcium-Signals ist nicht bekannt, wird aber auch bei anderen APC beschrieben. Et-18-OCH₃ (Lohmeyer & Workman 1993) und SRI 62-834, ein heterozyklisches APC (Lazenby *et al.* 1990), lösen ebenfalls eine kurze, transiente, monophasische Erhöhung der Calciumkonzentration aus. In HL-60 Zellen wird eine Beteiligung des PAF-Rezeptor an dem Et-18-OCH₃-induzierten Anstieg der Calciumkonzentration beschrieben (Alonso *et al.* 1997). Eine Beteiligung der veränderten Calciumkonzentration an der mitogenen Wirkung der APC kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch unklar, ob diese Ergebnisse für den klinischen Einsatz der APC von Bedeutung sind. Es wird vermutet, daß diese Effekte in Zusammenhang mit der immunomodulatorischen Wirkung der APC stehen, die bei niedrigen Konzentrationen beobachtet wird (Houlihan *et al.* 1995).

5.4 Apoptose

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur APC-induzierten Apoptose durchgeführt.

Der Befund, daß Alkylphosphocholine ihre antitumorale Wirkung durch Induktion von Apoptose ausüben können, ist neu. Erst in jüngster Literatur wird die Induktion von Apoptose durch HePC (Konstantinov *et al.* 1998, Mollinedo *et al.* 1997), Et-18-OCH₃ (Verdonck & van Heutgen 1996) und Erucylphosphocholin (Jendrossek *et al.* 1999) in Tumorzellen beschrieben.

In dieser Arbeit wurde die APC-induzierte Apoptose zunächst auf rein morphologischer Ebene untersucht. Anschließend wurden mögliche Mechanismen, die bei der Induktion von Apoptose beteiligt sein könnten, eingehender beleuchtet. Von besonderem Interesse waren hierbei vor allem die zahlreichen Degradationsprozesse und die daran beteiligten Enzyme, sowie die Identifizierung eines möglichen Angriffspunktes der APC an der Plasmamembran.

Für die Experimente zur Induktion der Apoptose und für die Etablierung verschiedener Nachweissysteme wurden hauptsächlich HL-60 Zellen verwendet, da diese Zelllinie sich gut für Untersuchungen zur Apoptose eignet. Je nach Fragestellung und zur Aufklärung von Mechanismen wurden auch andere Zelllinien herangezogen, es handelte sich jedoch immer um Leukämiezelllinien humanen Ursprungs.

Die Versuche zur Apoptoseinduktion wurden, wenn nicht anders erwähnt, hauptsächlich mit R-N-acetyl durchgeführt.

5.4.1 Morphologische Veränderungen

Das sogenannte *blebbing* der Zellen dient neben der Umverteilung des Zellinhalts auch zur Neuordnung der Zytoplasmamembran. Dies ist notwendig, da während der Apoptose die Asymmetrie der Plasmamembran verloren geht und Phosphatidylserin, das normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran zu finden ist, auf der Außenseite der Membran präsentiert wird. Durch dieses Signal machen apoptotische Zellen in einem frühen Stadium unter physiologischen Bedingungen Makrophagen auf sich aufmerksam, die so zur Phagozytose angeregt werden und die Zellen bzw. deren Bruchstücke beseitigen (Fadok *et al.* 1992). Die Externalisierung des Phosphatidylserins war das erste meßbare Ereignis der APC-induzierten Apoptose. Bereits nach einer Stunde konnte PS auf der Außenseite der Plasmamembran von HL-60 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29).

Deutliches *blebbing* von APC-behandelten Zellen war im Lichtmikroskop erst nach einigen Stunden Inkubation zu beobachten (Abb. 23). Die Zellen fingen nie gleichzeitig an, *blebs* zu bilden (Daten nicht gezeigt). Nach drei bis vier Stunden der Behandlung zeigten einige Zellen, nach sechs Stunden etwa ein Drittel der Zellpopulation deutliche *blebs*. Erst nach mindestens 10-stündiger Inkubation mit 30 µM R-N-acetyl ging die Mehrzahl der Zellen in das *blebbing* über.

Für die Bildung von *blebs* werden Veränderungen im Calcium- und/oder Thiolhaushalt verantwortlich gemacht, die sich auf die Bestandteile des Zytoskeletts auswirken (Jewell *et al.* 1982). Das *blebbing* der Zellen wird immer mehr als Marker für Apoptose herangezogen, da es häufig mit der Kern- und DNA-Fragmentierung korreliert (Kerr & Harmon 1991).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen und veranschaulichen die lichtmikroskopischen Befunde. Besonders deutlich waren die Membranausstülpungen im Rasterelektronenmikroskop zu erkennen (Abb. 24b). Die Bildung zahlreicher Membranausstülpungen und der Verlust der Oberflächenstrukturen der HL-60 Zellen konnte in Rasterelektronenmikroskop beobachtet werden. Im Transmissionselektronenmikroskop waren auch die Veränderungen im Zellinneren sichtbar (Abb. 25). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelle konnten nach Behandlung mit APC deutliche apoptotische Merkmale erkannt werden. Besonders nach Behandlung mit 20 μ M R-N-acetyl für 16 Stunden war die starke Vakuolisierung der Zellen auffällig (Abb. 25i, j). Dieses Phänomen wurde von Bøe *et al.* (1991) als zytoplasmatisches 'Kochen' bezeichnet und ist charakteristisch für die Aktivität der Zelle während der ablaufenden Degradationsreaktionen (Wyllie *et al.* 1980).

5.4.2 Vorgänge im Zellkern

Bereits in der transmissionselektronenmikroskopischen Darstellung war die Fragmentierung und Kondensierung der Kerne in APC-behandelten Zellen deutlich zu erkennen (Abb. 25h, j). Die Kernfragmentierung sowie das Abschnüren apoptotischer Körperchen war jedoch insgesamt nicht so deutlich wie bei Etoposid-behandelten Zellen (Abb. 25c, d). Dini *et al.* (1996) beschreiben in U937 Zellen abhängig vom Induktor der Apoptose mehrere Arten der Kernfragmentierung und begründen dies mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der einzelnen Substanzen und unterschiedlicher Interaktion der Induktoren mit Bestandteilen des Zytoskeletts.

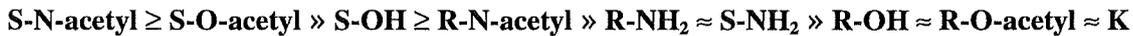
Die Vorgänge im Kern wurden weiter durch Anfärbung des Chromatins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 verdeutlicht. In APC-behandelten Zellen war nach 16-stündiger Inkubationszeit die Kondensation des Chromatins und die beginnende Kernfragmentierung zu beobachten (Abb. 26). Die Kerne sahen nicht mehr rund aus, sondern fingen bereits an, sich zu zerteilen.

5.4.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen im FACS

Eine gute Möglichkeit, apoptotische Zellen in der Gesamtzellpopulation zu quantifizieren, bietet die Durchflußzytometrie. Bei dieser Methode wird die DNA der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Das Fluoreszenzsignal apoptotischer Zellen, die bereits apoptotische Körperchen abgeschnürt haben, ist niedriger als das von Kontrollzellen, da sie eine geringere DNA-Menge als Kontrollzellen besitzen. Ein DNA-Verlust kann auch

aufgrund der Aktivität von Endonukleasen und anschließender Diffusion der niedermolekularen DNA-Fragmente aus der Zelle entstehen (Darzynkiewicz *et al.* 1992). Dieser Effekt führt dann zum Auftreten eines sog. Prä-G₁-Peaks im Histogramm.

In dieser Arbeit wurden Zellzyklusverteilungen in HL-60 Zellen nach Behandlung mit 20 µM der einzelnen APC bestimmt. Bezüglich der Prä-G₁-Peak-Bildung konnten die APC nach ihrer Wirksamkeit in folgender Reihenfolge geordnet werden (Abb. 27):



Interessanterweise stand hier nicht das R-N-acetyl, d.h. die Verbindung mit dem kleinsten LD₅₀-Wert an erster Stelle, sondern das S-konfigurierte Isomer S-N-acetyl.

Bei diesem Versuch wurden wieder die Unterschiede zwischen den R- oder S-konfigurierten Hydroxy- und Esterverbindungen deutlich. R-O-acetyl und R-OH hatten kaum Einfluß auf die Zellzyklusverteilung, während nach Behandlung mit den S-konfigurierten Isomeren S-N-acetyl und S-OH 70% bzw. 52% der Zellen im Prä-G₁-Peak wiederzufinden waren.

5.4.4 Fragmentierung der DNA während der APC-induzierten Apoptose

Bereits 1980 beschrieben Wyllie *et al.* die Fragmentierung der DNA durch spezifische Endonukleasen während der Apoptose und das Erscheinen des charakteristischen Leitemusters im Agarosegel. Mittlerweile gilt der Nachweis der DNA-Fragmentierung als sicherer Apoptose-Marker.

In HL-60 Zellen konnte durch die Behandlung mit APC mit Ausnahme von R-OH und R-O-acetyl die Bildung einer DNA-Leiter induziert werden (Abb. 30). Nach R-N-acetyl-Behandlung war die Induktion der DNA-Fragmentierung zeit- und konzentrationsabhängig (Abb. 31, 32). Bereits ab einer Konzentration von 2,5 µM R-N-acetyl konnte die Bildung einer DNA-Leiter nach 16-stündiger Inkubationszeit beobachtet werden.

Die DNA-Fragmentierung war interessanterweise schon nachweisbar, bevor im Lichtmikroskop deutliches *blebbing* sichtbar wurde. Nach 5-stündiger Inkubationszeit konnte bereits eine deutliche DNA-Leiter im Agarosegel nachgewiesen werden (Abb. 31), obwohl zu diesem Zeitpunkt nur ein geringer Teil der Zellpopulation *blebs* gebildet hatte (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der DNA-Fragmentierung wurde daher als ein früher Marker für das Auftreten von Apoptose in APC-behandelten Zellen herangezogen.

Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien ergaben, daß die APC-induzierte Induktion der DNA-Fragmentierung ein Zelltyp-unabhängiges Wirkungsprinzip ist. So konnte nach R-N-acetyl-Behandlung das Leitemuster im Agarosegel in verschiedenen leukämischen Zelllinien, sowie in HeLa Adenokarzinoma Zellen, T47D und MDA-MB-468 Mammakarzinoma Zellen und in Huvec Nabelschnurendothelzellen nachgewiesen werden. Besonders interessant ist, daß R-N-acetyl auch in differenzierten HL-60 Zellen Apoptose induzieren kann. Verschiedene Arbeiten beschreiben einen Unterschied zwischen undifferenzierten und differenzierten HL-60 Zellen im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber der toxischen

Wirkung des Et-18-OCH₃ (Heesbeen *et al.* 1993, Mollinedo *et al.* 1997, Vallari *et al.* 1988). Durch DMSO zu neutrophilen Granulozyten differenzierte HL-60 Zellen sind weitgehend resistent gegen Et-18-OCH₃. Mollinedo *et al.* (1997) führen diese Resistenz auf eine verminderte Aufnahme der synthetischen Lipide in differenzierten HL-60 Zellen zurück. Dieser Unterschied konnte nach R-N-acetyl-Behandlung nicht beobachtet werden. Gegenüber R-N-acetyl zeigten sich undifferenzierte und differenzierte HL-60 Zellen gleichermaßen sensitiv (Abb. 34).

5.4.5 Proteolytische Prozesse während der APC-induzierten Apoptose

Während der Apoptose findet neben der DNA-Fragmentierung auch eine charakteristische Degradation bestimmter Proteine statt. Für den Abbau dieser Proteine werden die sogenannten Caspasen verantwortlich gemacht. Eine Übersicht über die bis heute bekannten Caspasen ist in Tabelle 4 gegeben.

Tab. 4: Caspasen und ihre Substrate:

Name:	andere (alte) Namen:	Substrate:
Caspase-1	ICE	Pro-IL-1 β , PKC- δ , Aktin, Pro-Caspase-1, -3
Caspase-2	Nedd2, ICH-1	?
Caspase-3	CPP32, Yama, apopain	PARP, Pro-Caspase-6, -9, SREBP-1, -2, DNA-PK
Caspase-4	ICE _{rel} II, TX, ICH-2	Pro-IL-1 β
Caspase-5	ICE _{rel} III, TY	?
Caspase-6	Mch2	PARP (schwach), Lamin A, B1/B2, C
Caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP
Caspase-8	MACH, FLICE, Mch5	PARP
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	PARP
Caspase-10	Mch4	Pro-Caspase-3, -7

DNA-PK: DNA-Protein Kinase, ICE: *Interleukin-1 β converting enzyme*, PKC- δ : Protein Kinase C- δ , IL-1 β : Interleukin-1 β , SREBP: *sterol regulatory element-binding protein*.

Verändert nach Cohen (1997) und Whyte (1996).

Bisher konnte die Beteiligung von Caspasen an jeder Form der induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Caspasen ist neben der Externalisierung des Phosphatidylserins eines der frühen Ereignisse während der Apoptose. Die spezifische Spaltung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) durch die Caspasen-3, -7, -8 und -9 wurde von Kaufmann *et al.* (1993) als früher Marker der Apoptose beschrieben.

Auch APC waren in der Lage, die proteolytische Spaltung des PARP zu induzieren (Abb. 33). Lediglich die Verbindungen R-OH und R-O-acetyl zeigten keine Wirkung. Die Spaltung des PARP wurde als zweites Standard-Nachweissystem für das Auftreten von Apoptose in APC-behandelten Zellen verwendet.

Zwei weitere Caspase-Substrate wurden während der APC-induzierten Apoptose untersucht. Lamin b, ein Substrat der Caspase-6 und Pro-Caspase-3, die inaktive Form der Caspase-3, die durch proteolytische Spaltung aktiviert wird (Erhard & Cooper 1996, Liu *et al.* 1996). Von diesen beiden Substraten wurde jedoch kein Spaltprodukt nachgewiesen, sondern die Menge der Substrate, die während der APC-Inkubation abnahm.

Der Abbau der drei untersuchten Caspase-Substrate war nach Behandlung von HL-60 Zellen zeitabhängig. Nach 5 Stunden waren erstmals das Abbauprodukt des PARP und das Verschwinden des Lamin b und der Pro-Caspase-3 zu beobachten. Nach 24 Stunden waren kein Lamin b und Pro-Caspase-3 mehr nachzuweisen. Die Spaltung des PARP erfolgte jedoch nicht vollständig (Abb. 35).

Um die Rolle der Caspasen bei der APC-induzierten Apoptose zu verdeutlichen, wurden spezifische Caspase-Inhibitoren eingesetzt. Caspasen können durch Peptide, die an das konservierte Pentapeptid-Motiv im aktiven Zentrum binden, aber nicht gespalten werden können, irreversibel gehemmt werden. Zwei solcher Peptidinhibitoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind zVADfmk und zD-DCB. zVADfmk hemmt alle 10 Caspasen (Garcia-Calvo *et al.* 1998) und zD-DCB ist gleichfalls ein Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum (Henkart 1996), der aufgrund einer hydrophoben Gruppe gut in die Zellen eindringen kann.

Vorinkubation von HL-60 Zellen mit 50 μ M zD-DCB oder 100 μ M zVADfmk konnte die APC-induzierte DNA-Fragmentierung und den Abbau des PARP vollständig unterdrücken (Abb. 36).

Zusätzlich wurde mit DEVD ein spezifischer Inhibitor der Caspase-3 eingesetzt, welcher jedoch die APC-induzierte Apoptose nicht verhindern konnte (Daten nicht gezeigt). Arbeiten von Drexler (1997) haben gezeigt, daß DEVD schlecht in Zellen eindringen kann. Dadurch kann erklärt werden, warum dieser Inhibitor in Bezug auf die APC-induzierte Apoptose ohne Wirkung blieb.

Mit CrmA wurde ein weiterer Caspaseinhibitor auf seine Fähigkeit hin, die APC-induzierte Apoptose zu hemmen, untersucht. CrmA ist das Toxin des Kuhpockenvirus, mit dem das Virus die Immunantwort seines Wirtes unterdrückt. CrmA hemmt Caspasen-1, -4, -5, -8, -9, -10 (Garcia-Calvo *et al.* 1998). Nach Behandlung von CrmA exprimierenden Zellen konnte beobachtet werden, daß dieser Inhibitor die Zellen vor APC-induzierter DNA-Fragmentierung und Spaltung des PARP schützte (Abb. 37). Diese Experimente weisen den Caspasen eine essentielle Funktion in der APC-induzierten Apoptose zu.

5.5 Mechanismen der Apoptoseinduktion

5.5.1 Bcl-2

Bcl-2 und verwandte zytoplasmatische Proteine sind wichtige Regulatoren der Apoptose. Bcl-2 selbst ist ein anti-apoptotisches Protein, das ein Überleben von Zellen fördert. Bcl-2 ist in der Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindert dort den Austritt von Cytochrom c, das für die Aktivierung von Caspase-3 nötig ist, aus den Mitochondrien. Zudem fungiert Bcl-2 als Antioxidans und kontrolliert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (zusammengefaßt in Korsmeyer 1995). In jüngster Zeit wird außerdem diskutiert, daß Bcl-2 Adaptorproteine hemmt, die für die Aktivierung von Caspasen benötigt werden (zusammengefaßt in Adams & Cory 1998).

Es war interessant zu wissen, ob Bcl-2 ein Schutz vor APC-induzierter Apoptose ist. Für diese Versuche standen zwei Bcl-2 überexprimierende Zelllinien zur Verfügung: Jurkat T Zellen und SKW6 B-lymphoblastoide Zellen. Interessanterweise zeigte sich, daß die Überexpression von Bcl-2 nur in Jurkat T Zellen, nicht aber in SKW6 Zellen einen Schutz vor APC-induzierter Apoptose bot (Abb. 38).

Eine Erklärung für diese Beobachtung läßt sich durch Untersuchungen von Scaffidi *et al.* (1998) geben. Abhängig von der Zelllinie werden zwei unterschiedliche Wege der Apoptoseinduktion über den CD95 Rezeptor diskutiert: ein Mitochondrien-unabhängiger und ein Mitochondrien-abhängiger Weg. Dementsprechend lassen sich Zellen in zwei Gruppen einteilen: Typ I und Typ II Zellen. In Typ I Zellen (SKW6 Zellen) wird nach Aktivierung von CD95 eine deutliche Bildung eines *death inducing signaling complex* (DISC), bestehend aus den intrazellulären Todesdomänen des CD95, dem Adaptorprotein FADD und Caspase-8 (siehe auch Abb. 43) beobachtet. Caspase-8 wird an diesem DISC durch proteolytische Spaltung aktiviert und startet dann die Caspase-Kaskade durch direkte, von den Mitochondrien unabhängige, Aktivierung der Caspase-3. Die meisten der von Scaffidi *et al.* (1998) getesteten Zellen waren Typ I Zellen.

In Typ II Zellen (Jurkat T Zellen) werden nach Aktivierung von CD95 nur wenige Caspase-8 Moleküle am DISC aktiviert. Das führt nicht zu einer direkten Aktivierung der Caspase-3, sondern über einen Mitochondrien-abhängigen Weg zur Freisetzung von Cytochrom c und damit zur weiteren Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3.

Da die CD95-induzierte Apoptose nur in Typ II Zellen (Jurkat T) von den Mitochondrien abhängig ist, konnte auch nur in diesen Zellen nach Behandlung mit APC oder induzierenden anti-CD95 Antikörpern die Apoptose durch Bcl-2 verhindert werden (Abb. 38, 40).

Bcl-2 ist in Lymphozyten nur selten ein Schutz vor CD95-vermittelter Apoptose (Newton *et al.* 1998, Smith *et al.* 1996, Strasser *et al.* 1995). Daher ist, zumindest auf das lymphoide System bezogen, der CD95-Weg von Typ I Zellen, der die Mitochondrien und Bcl-2 nicht miteinbezieht und Caspase-8 direkt aktiviert, der meist gebräuchliche Weg zur Apoptose. Das ist von besonderem Interesse im Hinblick auf den möglichen Einsatz der in dieser Arbeit

untersuchten APC in der Tumortherapie. Grob geschätzt besitzen 50 % aller im Patient diagnostizierten Tumore abnormal hohe Konzentrationen an Bcl-2 (Reed 1997). Daher ist es in der Tumortherapie von Bedeutung, Antitumormittel wie die hier untersuchten APC einzusetzen, die unabhängig vom Bcl-2-Gehalt der Tumorzellen Apoptose induzieren können.

5.5.2 Die Rolle des CD95 in der APC-induzierten Apoptose

Auf der Suche nach einem molekularen Target der APC *upstream* von Caspasen, Bcl-2 und Mitochondrien wurde untersucht, ob der Weg der Auslösung der Apoptose über den Todesrezeptor CD95 verläuft. Um zu zeigen, daß CD95 an der APC-induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden Zellen verwendet, die eine dominant negative Version des FADD exprimierten. Diese FADD dn Mutante war noch in der Lage, an die Todesdomäne des CD95 zu binden, konnte aber aufgrund einer N-terminalen Verkürzung nicht mehr zur Weiterleitung des apoptotischen Signals beitragen (Chinnaiyan *et al.* 1996). In diesen FADD dn Zellen konnte nach APC-Behandlung weder die Fragmentierung der DNA, noch die Spaltung von PARP gemessen werden (Abb. 41). Dadurch konnte gezeigt werden, daß FADD an der APC-induzierten Apoptose beteiligt ist.

Der CD95 Rezeptor gehört zur Familie des *tumor necrosis factor* (TNF) Rezeptor. Die Todesdomäne ist beiden Rezeptoren homolog, so daß eine Bindung von FADD nicht ausschließlich an CD95 erfolgt, sondern auch zu einem geringen Teil an den TNF-Rezeptor-1 (Chinnaiyan *et al.* 1995, 1996). Daher wurde die Aktivierung des CD95 nach APC-Behandlung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt.

Die Aktivierung des CD95 Rezeptors erfolgt durch die entsprechenden Liganden oder durch agonistische Antikörper, woraufhin die Todesdomänen aggregieren (Huang *et al.* 1996). Die Aggregation der CD95 Rezeptormoleküle kann im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe spezifischer, fluoreszenzgekoppelter Antikörper beobachtet werden. Dieses *capping* des CD95, das zu einem verstärkten Fluoreszenzsignal führt, ist ein Nachweis für die ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors, der immer mehr an Bedeutung gewinnt. Rehemtulla *et al.* (1997) und Aragane *et al.* (1998) beschreiben *capping* des CD95 nach UV-Behandlung von lymphatischen Zellen.

Nach APC-Behandlung konnte die Bildung von solchen CD95 *caps* beobachtet werden (Abb. 42). Das *capping* war nicht so ausgeprägt wie nach Behandlung mit CD95 Ligand, es konnte jedoch ein deutliches, halbmondförmiges Fluoreszenzsignal an einem Pol der Zellen beobachtet werden. Das *capping* war nach 2 und 3 Stunden Inkubation mit 30 µM R-N-acetyl besonders intensiv. Anhand dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, daß CD95 an der APC-induzierten Apoptose beteiligt ist.

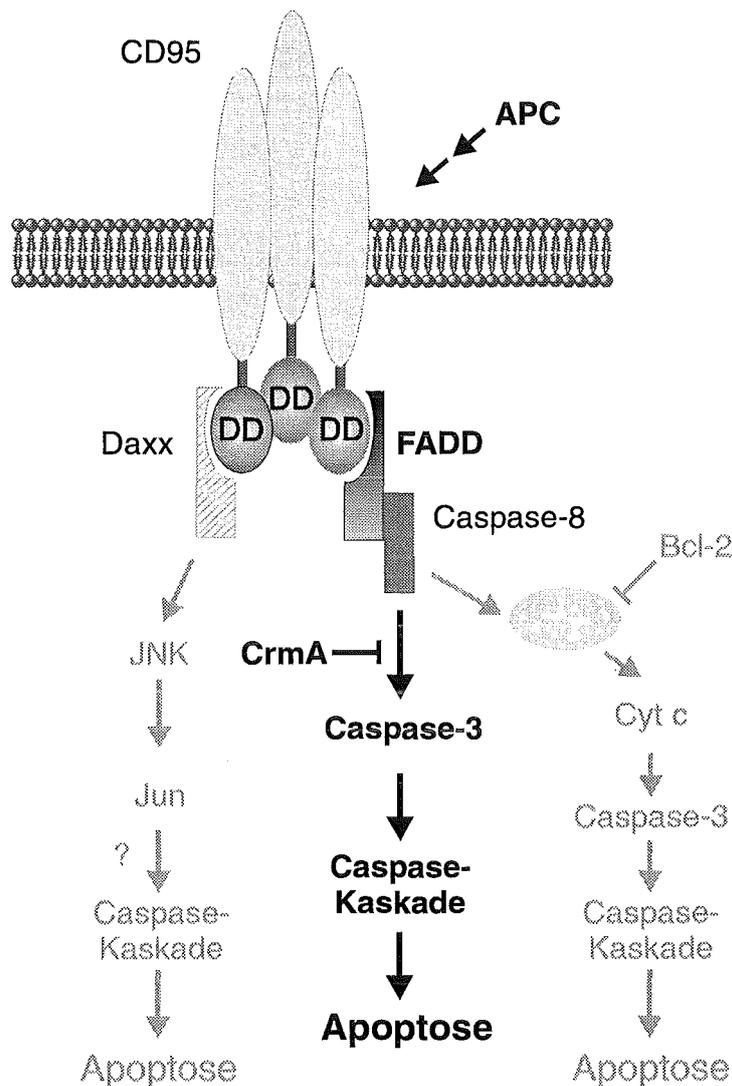


Abb. 43: Schematische Darstellung des CD95 Signalwegs.

Verändert nach Scaffidi *et al.* (1998) und Yang *et al.* (1997). JNK: c-Jun NH₂-terminale Kinase; FADD: fas associated death domain; DD: death domain.

5.5.3 Die Rolle der Streßkinasen bei der APC-induzierten Apoptose

Im Gegensatz zu ERK's, die bei mitogenen Vorgängen eine Rolle spielen, werden die Streßkinasen c-Jun NH₂-terminalen Kinase und p38 Kinase mit der Apoptose in Verbindung gebracht. Cahill *et al.* (1996) beschreiben eine Aktivierung von JNK *downstream* von CD95. Es konnte jedoch nach APC-Behandlung von HL-60 Zellen weder nach kurzen Inkubationszeiten, noch nach Ablauf von bis zu 16 Stunden eine Aktivierung der JNK oder der p38 Kinase gemessen werden (Abb. 19, 20). Für die p38 Kinase konnte lediglich ein basales Aktivierungsniveau ähnlich dem der unbehandelten Kontrolle gefunden werden.

Gajate *et al.* (1998) beschreiben eine JNK-Aktivierung nach Et-18-OCH₃-Behandlung in HL-60, Jurkat T und U937 Zellen, die mit der Induktion der Apoptose in Zusammenhang

gebracht wird. Die hier untersuchten APC führten jedoch nicht zu einer Aktivierung der JNK, was einen unterschiedlichen Reaktionsablauf im Vergleich zu Et-18-OCH₃ nahelegt.

Nachdem im letzten Teil der Arbeit eine Beteiligung von CD95 an der APC-induzierten Apoptose diskutiert wurde, mußte eine Erklärung dafür gefunden werden, wieso keine JNK Aktivierung zu messen war. In neuen Arbeiten von Yang *et al.* (1997) und Chang *et al.* (1999) werden zwei verschiedene Wege *downstream* von CD95 diskutiert. Einmal verläuft der Signalweg über FADD und Caspase-8 zur weiteren Aktivierung von Caspasen und somit zur Apoptose. Der andere Weg führt zu einer Rekrutierung des Adaptorproteins Daxx an die Todesdomäne des CD95 und daraufhin über die Aktivierung der JNK zur Apoptose (Abb. 43). Yang und Chang haben gezeigt, daß eine dominant negative Version des FADD keinen Einfluß auf die Aktivierung der JNK hat und haben somit demonstriert, daß JNK nicht an der über CD95 und FADD vermittelten Apoptose beteiligt ist. Da APC über den CD95/FADD Signalweg zur Induktion von Apoptose führen, läßt sich erklären, weshalb keine Aktivierung der JNK gefunden wurde.

5.6 Effekte der verschiedenen APC im Vergleich

Zusammenfassend sind in der folgenden Tabelle die Effekte der acht unterschiedlichen APC sowie Hexadecylphosphocholin und Et-18-OCH₃ in Bezug auf Toxizität und Apoptoseinduktion dargestellt.

Hier wird noch einmal deutlich, daß die R-konfigurierten Hydroxy- und Esterverbindungen nicht in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Obwohl R-N-acetyl die Verbindung mit dem kleinsten LD₅₀-Wert ist, sind nach Behandlung mit dem S-konfigurierten Isomer S-N-acetyl nach 24 Stunden mehr Zellen apoptotisch.

Tab. 5: Effekte der verschiedenen APC im Vergleich

Verbindung	LD ₅₀ -Wert [µM]	DNA-Leiterbildung	PARP-Spaltung	apoptotische Zellen nach 24 Std.
R-OH	30	-	-	10 %
S-OH	21	+	+	52 %
R-O-acetyl	68	-	-	10 %
S-O-acetyl	7	+	+	64 %
R-NH ₂	20	+	+	37 %
S-NH ₂	13	+	+	38 %
R-N-acetyl	4	+	+	48 %
S-N-acetyl	5	+	+	70 %
HePC	7,5	+	+	nicht gemessen
Et-18-OCH ₃	12	+	+	nicht gemessen

5.7 Zeitliche Reihenfolge der apoptotischen Ereignisse nach APC-Behandlung

Das erste apoptotische Phänomen, das nach Behandlung mit 30 μM R-N-acetyl zu messen war, ist die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS). Bereits nach einer Stunde konnte mit Hilfe des Annexin-V-Fluos-Tests PS auf der Außenseite der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 29). Das Signal hielt bis zu zehn Stunden an, bevor die Zellen begannen, nekrotisch zu werden (Daten nicht gezeigt).

Nach 2-stündiger Inkubationszeit konnte das *capping* des CD95 im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Das Signal war auch nach 3 Stunden noch deutlich zu sehen (Abb. 42).

Die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen war etwa gleichzeitig nach fünf Stunden zu messen. Die Spaltung von PARP und Lamin b konnte ab diesem Zeitpunkt im Western Blot verfolgt werden (Abb. 35). Die DNA-Fragmentierung war im Agarosegel ebenfalls nach fünf Stunden erstmals nachzuweisen (Abb. 31).

Kurz darauf wurden morphologische Veränderungen wie beispielsweise *blebbing* sichtbar. Nach etwa 6 Stunden konnten im Lichtmikroskop erste Zellen beobachtet werden, die Membranausstülpungen bildeten (Abb. 23). Der Anteil der *blebbenden* Zellen nahm im weiteren Verlauf der Inkubation langsam zu. Nach 16 Stunden waren die *blebs* im Rasterelektronenmikroskop deutlich zu erkennen (Abb. 24).

Nach 10-stündiger Inkubationszeit konnte die Kondensierung des Chromatins durch Färbung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff gezeigt werden (Abb. 26).

Erst nach 16 Stunden war die Abschnürung von apoptotischen Körperchen zu beobachten. Messungen im Durchflußzytometer zeigten nach 24 Stunden einen deutlichen Prä-G₁-Peak im Histogramm (Abb. 27). Das apoptotische Programm war erst nach etwa 2 Tagen abgeschlossen, als keine lebenden Zellen mehr vorlagen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die APC-induzierte Apoptose langsam voranschreitet. Andere Apoptoseinduktoren, wie beispielsweise das Organometall TBT, können dagegen schon innerhalb von wenigen Stunden zum apoptotischen Zelltod führen (Zaucke 1997).

Das durch APC ausgelöste apoptotische Programm konnte auch nicht durch Erhöhung der Konzentration an APC in seiner Geschwindigkeit beeinflusst werden. Die eingesetzten Konzentrationen der APC lagen immer bei 20 μM oder 30 μM , um zu gewährleisten, daß keine unspezifischen, detergentenartigen Wirkungen der APC auftreten.

5.8 Anmerkung zum Vergleich der neuen APC mit HePC und Et-18-OCH₃

Die Wirkung der neuen APC wurde in dieser Arbeit oft mit HePC und Et-18-OCH₃ verglichen bzw. mit Daten zu diesen Verbindungen, die aus der Literatur bekannt waren. Nicht immer ist solch ein Vergleich gerechtfertigt. Es handelt sich um unterschiedliche Verbindungen, die aber die Gemeinsamkeit haben, daß sie zur Gruppe von Lysophospholipid-Derivaten gehören, die für die Tumorthapie synthetisiert worden sind. Daß kleine strukturelle Unterschiede zu großen Auswirkungen im Hinblick auf die Toxizität führen können, verdeutlicht das Isomerenpaar R-O-acetyl und S-O-acetyl der hier untersuchten APC. HePC und Et-18-OCH₃ sind die in der Literatur am besten beschriebenen Verbindungen der Klasse der Alkylphosphocholine. Sie sind, wie die neuen APC auch, in der Lage, Apoptose zu induzieren. Es kann jedoch ein anderer Reaktionsmechanismus zugrunde liegen. Einen Hinweis gibt der Befund, daß Et-18-OCH₃ über eine Aktivierung der JNK zur Apoptose führt (Gajate *et al.* 1998), während für die neuen APC eine Apoptoseinduktion unabhängig von JNK gefunden wurde. Die neuen APC könnten sich demnach in ihrem Wirkungsmechanismus von Et-18-OCH₃ und HePC unterscheiden. Ein Vergleich im Hinblick auf die Toxizität und Wirksamkeit der Verbindungen scheint jedoch gerechtfertigt.

5.9 Bedeutung der Versuche im Hinblick auf weitere APC-Synthesen

Während vor einiger Zeit davon ausgegangen wurde, daß die toxische Wirkung der APC hauptsächlich durch unspezifische Effekte auf Ebene der Plasmamembran ausgelöst wird oder auf einen rein biophysikalischen Effekt der Veränderung der Membranzusammensetzung oder -fluidität beruht, so wird immer mehr die Wechselwirkung der APC mit spezifischen Targets wie Enzymen des Phospholipidstoffwechsels und auch Rezeptoren diskutiert.

Auch die vorliegende Arbeit zeigt, daß APC spezifische Wirkungen haben und Rezeptoren, sowie nachgeschaltete Signalwege aktivieren können.

In der Zukunft sollten Bemühungen auf jeden Fall dahin gerichtet werden, ein molekulares Target der APC näher zu charakterisieren. Diese Arbeit hat gezeigt, daß Plasmamembranrezeptoren vielversprechende Kandidaten als molekulare Targets sein können. Die exakte, molekulare Identifizierung eines Angriffspunktes der APC z.B. am CD95 Rezeptor, wie die Resultate dieser Arbeit sie annehmen lassen, hat direkten Einfluß auf die genauere Synthese von 'maßgeschneiderten' APC, deren Wirkung so optimiert werden kann.

6 Literatur

- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326, 1998.
- Alonso MT, Gajate T, Mollinedo F, Modolell M, Alvarez J, García-Sancho J. Dissociation of the effects of the antitumor ether lipid Et-18-OCH₃ on cytosolic calcium and on apoptosis. *Brit. J. Pharmacol.* 121: 1364-1368, 1997.
- Andreesen R, Modolell M, Oepke GHF, Common H, Löhr GW, Munder PG. Studies on various parameters influencing leukemic cell destruction by alkyl-lysophospholipids. *Anticancer Res.* 2: 95-100, 1982.
- Andreesen R. Ether lipids in the therapy of cancer. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 22: 118-131, 1988.
- Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas-APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* 140: 171-182, 1998.
- Arends MJ, McGregor AH, Wyllie AH. Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras and HPV oncogenes. *J. Pathol.* 144: 1045-1057, 1994.
- Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271: 16850-16855, 1996.
- Arnold D, Weltzien HU, Westphal O. Synthesis of choline phosphatides. 3. Synthesis of lysolecithins and their ether analogs. *Ann. Chem.* 709: 234, 1967.
- Ashagbley A, Samadder P, Bittman R, Erukulla RK, Byun H-S, Arthur G. Synthesis of ether-linked analogues of lysophosphatidate and their effect on the cell proliferation of human epithelial cancer cells *in vitro*. *Anticancer Res.* 16: 1813-1818, 1996.
- Belka C, Brach MA, Herrmann F. The role of tyrosine kinases and their substrates in signal transmission of hematopoietic growth factors: a short review. *Leukemia* 9: 754-761, 1995.
- Berdel WE, Andreesen R, Munder PG in Kuo JF (Ed). *Phospholipids and cellular regulation 2*. CRC Press, Boca Raton, FL. 41-73, 1985.
- Berdel WE, Bausert WRE, Fink U, Rastetter J, Munder PG. Anti-tumor action of alkyl-lysophospholipids. *Anticancer Res.* 1: 345-352, 1981.
- Berger MR, Munder PG, Schmähl D, Westphal O. Influence of the alkyllysophospholipid ET-18-OCH₃ on methylnitrosourea-induced rat mammary carcinomas. *Oncology* 41: 109-113, 1984.
- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205, 1989.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- Bøe R, Gjertsen BT, Vintermyr OK, Houge G, Lanotte M, Døskeland SO. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 195: 237-246, 1991.
- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Ui M, Gilman AG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3560-3567, 1984.
- Brachwitz H, Vollgraf C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol. Ther.* 66: 39-82, 1995.
- Breiser A, Kim D-J, Fleer EAM, Damenz W, Drube A, Berger M, Nagel GA, Eibl H. Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. *Lipids* 22: 925-926, 1987.
- Cadwaller K, Beltman J, McCormick F, Cook S. Differential regulation of extracellular signal-regulated kinase 1 and Jun N-terminal kinase 1 by Ca²⁺ and protein kinase C in endothelin-stimulated Rat-1 cells. *Biochem. J.* 321: 795-804, 1997.
- Cahill MA, Peter ME, Kischkel FC, Chinnaiyan AM, Dixit VM, Krammer PH, Nordheim A. CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* 13: 2087-2096, 1996.
- Chang HY, Yang X, Baltimore D. Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun-N-terminal kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1252-1256, 1999.

- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512, 1995.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 4961-4965, 1996.
- Civoli F, Pauig SB, Daniel LW. Differentiation of HL-60 cells distinguishes between cytostatic and cytotoxic effects of the alkylphospholipid Et-18-OCH₃. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38: 269-272, 1996.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 362: 1-16, 1997.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349, 1977.
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75: 2458-2462, 1978.
- Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244, 1987.
- Cook SJ, McCormick F. Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem. J.* 320: 237-245, 1996.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR. An intact microfibular network is necessary for the formation of apoptotic bodies in cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 52: 997-1005, 1992.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hoth MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808, 1992.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-560, 1996.
- de Rooij J, Bos JL. Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14: 623-625, 1997.
- Dietzfelbinger HF, Kühn DG, Zafferani M, Hanauske AR, Rastetter JW, Berdel, WE. Removal of breast cancer cells from bone marrow by in vitro purging with ether lipids and cryopreservation. *Cancer Res.* 53: 3747-3751, 1993.
- Dini L, Coppola S, Ruzittu MT, Ghibelli L. Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp. Cell Res.* 223: 340-347, 1996.
- Diomedede L, Colotta F, Piovani B, Re F, Modest EJ, Salmona M. Induction of apoptosis in human leukemic cells by the ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. A possible basis for its selective action. *Int. J. Cancer* 53: 124-130, 1993.
- Dixit VM. Death Receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998.
- Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 855-860, 1997.
- Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15: 2685-2694, 1996.
- Eibl H, Hilgard P, Unger C. Alkylphosphocholines: New drugs in cancer therapy. *Prog. Exp. Tumor Res. Basel, Karger* 24: 25-32, 1992.
- Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine, a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat. Rev.* 17: 233-242, 1990.
- Eibl H, Unger C. Phospholipide als Antitumormittel: Möglichkeiten einer selektiven Therapie. In: *Die Zellmembran als Angriffspunkt der Tumorthherapie.* Hrsg: Unger C, Eibl H, Nagel G. Zuckerschwerdt Verlag, München, 1-18, 1986.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem. J.* 291: 677-680, 1993.

- Erhard P, Cooper GM. Activation of the CPP32 apoptotic protease by distinct signaling pathways with differential sensitivity to Bcl-x_L. *J. Biol. Chem.* 271: 17601-17604, 1996.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128, 1992.
- Exton JH. Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr. Biol.* 6: 226-229, 1994.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207-2216, 1992.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 453-481, 1993.
- Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified receptor gene and is growth-inhibited by EGF. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 128: 898-905, 1985.
- Fleer EA, Bercovic D, Unger C, Eibl H. Cellular uptake and metabolic fate of hexadecylphosphocholine. *Prog. Exp. Tumor Res.* Basel, Karger 34: 33-46, 1992.
- Fleer EA, Unger C, Kim PJ, Eibl H. Metabolism of ether phospholipids and analogs in neoplastic cells. *Lipids* 22: 856-861, 1987.
- Frearson JA, Alexander DR. Protein tyrosine phosphatases in T-cell development, apoptosis and signalling. *Immunol. Today* 8: 385-391, 1996.
- Gajate C, Santos-Beneit A, Modolell M, Mollinedo F. Involvement of c-Jun NH₂-terminal kinase activation and c-Jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-*O*-Octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine. *Mol. Pharmacol.* 53: 602-612, 1998.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273, 32608-32613, 1998.
- Green DR, Reed CJ. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.
- Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leukocyte Biol.* 37: 407-422, 1985.
- Heesbeen EC, Rijksen G, van Heutgen HG, Verdonck LF. Influence of serum levels on leukemic cell destruction by the ether lipid Et-18-OCH₃. *Leukemia Res.* 19: 417-425, 1995.
- Heesbeen EC, Verdonck LF, Haagmans M, van Heutgen HG, Staal GEJ, Rijksen G. Adsorption and uptake of the alkyllyosphospholipid Et-18-OCH₃ by HL-60 cells during induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *Leukemia Res.* 17: 143-148, 1993.
- Henkart P. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death. *Immunity* 4: 195-201, 1996.
- Henke J, Willker W, Engelmann J, Leibfritz D. Combined extraction techniques of tumor cells and lipid/phospholipid assignment by two dimensional NMR spectroscopy. *Anticancer Res.* 16: 1417-1428, 1996.
- Herrlich A, Daub H, Knebel A, Herrlich P, Ullrich A, Schultz G. Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8985-8990, 1998.
- Herrmann C, Martin GA, Wittinghofer A. Quantitative analysis of the complex between p21ras and the ras-binding domain of the human raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 2901-2905, 1995.
- Herrmann DB, Neumann HA. Cytotoxic activity of the thioether phospholipid analogue BM 41.440 in primary human tumor cultures. *Lipids* 22: 955-957, 1987.
- Hildenbrand B. Antitumorale Aktivität einer neuen Klasse von Alkylphosphocholinen in Relation zu deren Wirkung auf den Phospholipidstoffwechsel. Dissertation, Universität Freiburg, 1998.
- Hilgard P, Klemmer T, Stekar J, Nossner G, Kutscher B, Engel J. D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumor activity. *Eur. J. Cancer* 33: 442-446, 1997.
- Hilgard P, Stekar J, Voegli R, Engel J, Schumacher W, Eibl H, Unger C, Berger MR. Characterisation of antitumor activity of hexadecylphosphocholine. *Cancer Clin. Oncol.* 24: 1457-1461, 1988.

- Hoffman DR, Hoffman LH, Snyder F. Cytotoxicity and metabolism of alkyl phospholipid analogues in neoplastic cells. *Cancer Res.* 46: 5803-5809, 1986.
- Houlihan WJ, Lohmeyer M, Workman P, Cheon SH. Phospholipid antitumor agents. *Med. Res. Rev.* 15: 157-223, 1995.
- Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384: 638-641, 1996.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268: 10932-10937, 1993.
- Jalink K, Hordijk PL, Moolenaar WH. Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 185-196, 1994.
- Jendrossek V, Erdlenbruch B, Hunold A, Kugler W, Eibl H, Lakomek M. Erucylphosphocholine, a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines *in vitro*. *Int. J. Oncol.* 14: 15-22, 1999.
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S, Smith MT. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science* 217: 1257-1269, 1982.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53: 3976-3985, 1993.
- Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49: 5870-5878, 1989.
- Kaufmann-Kolle P, Fleer EAM. Morphological changes of adherent and nonadherent cells by treatment with hexadecylphosphocholine and 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine observed by scanning electron microscopy. In: Eibl H, Hilgard P, Unger C (eds.). *Alkylphosphocholines: new drugs in cancer therapy.* Prog. Exp. Tumor Res. Basel, Karger 34: 47-58, 1992.
- Kerr JF, Harmon BV. 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, 1991.
- Kerr JFR. Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.* 5: 55-57, 1995.
- Kimura C, Zhao QL, Kondo T, Amatsu M, Fujiwara Y. Mechanism of UV-induced apoptosis in human leukemia cells: roles of Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease, caspase-3, and stress-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.* 239: 411-422, 1998.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588, 1995.
- Klinker JF, Wenzel-Seifert K, Seifert R. G-protein-coupled receptors in HL-60 human leukemia cells. *Gen. Pharmac.* 27: 33-54, 1996.
- Koenigsmann MP, Nötter M, Papadimitrou CA, Oberberg D, Reufi B, Mücke C, Thiel E, Berdel WE. Chemopurging of peripheral blood-derived progenitor cells by alkyl-lysophospholipid and its effects on haematopoietic rescue after high-dose therapy. *Bone Marrow Transplantation* 18: 549-557, 1996.
- Konstantinov SM, Eibl H, Berger MR. Alkylphosphocholines induce apoptosis in HL-60 and U-937 leukemic cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 41: 210-216, 1998.
- Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11: 101-105, 1995.
- Kötting J, Fleer EAM, Unger C, Eibl H. Synthetische Alkylphospholipide als Antitumormittel - Strukturverwandte des "Platelet Activating Factor". *Fat Sci. Technol.* 90: 345-351, 1988.
- Kötting J, Marschner NW, Neumüller W, Unger C, Eibl H. Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: A comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. *Prog. Exp. Tumor Res.* Basel, Karger 34: 131-142, 1992a.
- Kötting J, Marschner NW, Unger C, Eibl H. Determination of alkylphosphocholines and of alkyl-glycero-phosphocholines in biological fluids and tissues. *Prog. Exp. Tumor Res.* Basel, Karger 34: 6-11, 1992b.

- Kötting J, Unger C, Eibl H. A continuous assay for O-alkylglycerol monooxygenase (E. C. 1.14.16.5). *Lipids* 22: 824-830, 1987.
- Kovalenko M, Gazit A, Bohmer A, Rorsman C, Ronnstrand L, Heldin CH, Waltenberger J, Bohmer FD, Levitzki A. Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res.* 54: 6106-6114, 1994.
- Kovalenko M, Ronnstrand L, Heldin CH, Loubtchenkov M, Gazit A, Bohmer FD. Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296. *Biochemistry* 36: 6260-6269, 1997.
- Kuhlencord A, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1630-1634, 1992.
- Kypta RM, Hemming A, Courtneidge SA. Identification and characterization of p^{59^{fyn}} (a src-like protein kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7: 3837-3844, 1988.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 277: 680-685, 1970.
- Lane D. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
- Lazenby CM, Thompson MG, Hickman JA. Elevation of leukemic cell intracellular calcium by the ether lipid SRI 62-834. *Cancer Res.* 50: 3327-3330, 1990.
- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell. Prolif.* 24: 203-214, 1991.
- Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267: 1782-1788, 1995.
- Lipson KE, Pang L, Huber LJ, Chen H, Tsai JM, Hirth P, Gazit A, Levitzki A, McMahon G. Inhibition of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptor signaling events after treatment of cells with specific synthetic inhibitors of tyrosine kinase phosphorylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 844-852, 1998.
- Liskovitch M, Cantley LC. Lipid second messengers. *Cell* 77: 329-334, 1994.
- Liu X, Kim CN, Pohl J, Wang, X. Purification and characterization of an interleukin-1 β -converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J. Biol. Chem.* 271: 13371-13376, 1996.
- Lohmeyer M, Workman P. The role of intracellular free calcium mobilization in the mechanism of action of antitumor ether lipids SRI 62-834 and Et-18-OMe. *Biochem. Pharmac.* 45: 77-86, 1993.
- Lowry OH, Rosebrough IN, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- Malakrey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH, Plevin R. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 309: 361-375, 1995.
- Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185, 1995.
- Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182: 1545-1556, 1995.
- Massing U, Eibl H, Haberstroh F, Hildenbrand B, Unger C. Antitumoral effects of octadecylphosphocholine analogues. *Eur. J. Cancer* 33: 175, 1997.
- Massing U, Eibl H. Substrates for phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. Relation between chemical structure and enzyme hydrolysis. In: Wooley P, Petersen SB (Eds). *Lipases. Their structure, biochemistry and application.* Cambridge University Press, 225-242, 1994b.
- Massing U, Eibl H. Synthesis of enantiomerically pure 1-O-phosphocholine-2-N-acyl-octadecane and 1-O-phosphocholine-2-N-acyl-octadecane. *Chem. Phys. Lipids* 69: 105-120, 1994a.
- McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukocyte Biol.* 59: 775-783, 1996.
- McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG. Bcr-Abl maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83: 1179-1187, 1994.

- Mollinedo F, Fernández-Luna JL, Gajate C, Martín-Martín B, Benito A, Martínez-Dalmau R, Modolell M. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): Molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X_L. *Cancer Res.* 57: 1320-1328, 1997.
- Mollinedo F, Martínez-Dalmau R, Modolell M. Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid Et-18-OCH₃. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 192: 603-609, 1993.
- Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 168-173, 1997.
- Moolenaar WH. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological action. *Trends Cell Biol.* 4: 213-219, 1994.
- Muschiol C, Berger MR, Schuler B, Scherf HR, Garzon FT, Zeller WJ, Unger C, Eibl HJ, Schmähl D. Alkyl phosphocholines: toxicity and anticancer properties. *Lipids* 22: 930-934, 1987.
- Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
- Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KGC, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 17: 706-718, 1998.
- Nosedá A, Godwin PL, Modest EJ. Effects of antineoplastic ether lipids on model and biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 945: 92-100, 1988.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstingl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 267: 10709-10715, 1992.
- Pathak S, Siciliano MJ, Cailleau R, Wiseman CL, Hsu TC. A human breast adenocarcinoma with chromosome and isoenzyme markers similar to those of the HeLa line. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 263-271, 1979.
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet GS, Pickup DJ. Viral Inhibition of Inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69: 597-604, 1992.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins: role in dysregulation of apoptosis and chemoresistance in cancer. In: Martin SJ (ed.). *Apoptosis and cancer*. Karger Landes Systems, Basel, 64-97, 1997.
- Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit AM. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J. Biol. Chem.* 272: 25783-25786, 1997.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K-M, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17: 1675-1687, 1998.
- Scherf HR, Schuler B, Berger MR, Schmähl D. Therapeutic Activity of Et-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. *Lipids* 22: 927-929, 1987.
- Schwartz LM, Milligan CE. Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *Trends Neurosci.* 19: 555-562, 1996.
- Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 263: 1143-1145, 1994.
- Smith KG, Strasser A, Vaux DL. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J.* 15: 5167-5176, 1996.
- Sobottka SB, Berger MR, Eibl H. Structure-activity relationships of four anti-cancer alkylphosphocholine derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer* 53: 418-425, 1993.
- Solary E, Bertrand R, Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leukemia and Lymphoma* 15: 21-32, 1994.
- Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *J. Lipid Res.* 16: 165-179, 1975.
- Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 14: 6136-6147, 1995.
- Tewari M, Telford WG, Miller RA, Dixit VM. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270: 22705-22708, 1995.

- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316, 1998.
- Touchstone JC, Levin SS, Dobbins MF, Carter PJ. Differentiation of saturated phospholipids on thin layer chromatograms. *J. HRC & CC* 4: 423-424, 1981.
- Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 205-215, 1996.
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985.
- Unger C, Damenz W, Fleer EAM, Kim DJ, Breiser A, Hilgard P, Engel J, Nagel G, Eibl H. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. *Acta Oncologica* 28: 213-217, 1989.
- Unger C, Eibl H, Breiser A, von Heyden HW, Engel J, Hilgard P, Sindermann H, Peukert M, Nagel GA. Hexadecylphosphocholine (D18506) in the topical treatment of skin metastases: a phase-I trial. *Onkologie* 11, 295-296, 1988.
- Unger C, Eibl H. Phospholipide als Antitumormittel. Zytotoxische Prinzipien als Ergebnis von Strukturvariationen. In Nagel GA (Hrsg.): *Mammakarzinome - Neue Perspektiven experimenteller und klinischer Therapieforchung*. Springer Verlag, Berlin, 115-123, 1986.
- Unger C, Maniera P, Kaufmann-Kolle P, Eibl H. *In vivo* antileishmanial activity of hexadecylphosphocholine and other alkylphosphocholines. *Drugs Today* 34: Suppl. 1998.
- Vallari DS, Smith ZL, Snyder F. HL-60 cells become resistant towards antitumor ether-linked phospholipids following differentiation into a granulocytic form. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156: 1-8, 1988.
- van der Bend RL, Brunner J, Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J.* 11: 2495-2501, 1992.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes hemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442, 1988.
- Verdonck LF, van Heutgen HG. Ether lipids are effective cytotoxic drugs and can act by the induction of apoptosis. *Leukemia Res.* 21: 37-43, 1996.
- Verweij J, Krzemieniecki K, Kok T, van Pottelsberghe C, van Glabbeke M, Mouridsen H. Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of adult and EORTC soft tissue and bone sarcoma group study. *Eur. J. Cancer* 29: 208-209, 1993.
- Verweij J, van den Burg M, Stoter G. A dose finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118: 606-608, 1992.
- Vichi P, Tritton TR. Stimulation of growth in human and murine cells by adriamycin. *Cancer Res.* 49: 2679-2682, 1989.
- Vogler WR, Berdel WE. Autologous bone marrow transplantation with alkyl-lysophospholipid-purged marrow. *J. Hematotherapy* 2: 93-102, 1993.
- Vogler WR, Olson AC, Okamoto S, Somberg LB, Glasser L. Experimental studies on the role of alkyl lysophospholipids in autologous bone-marrow transplantation. *Lipids* 22: 919-924, 1987.
- Whyte M. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 6: 245-248, 1996.
- Wiesmüller L, Wittinghofer F. Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal.* 6: 247-267, 1994.
- Wijermans PW, Ossenkoppele GJ, Huijgens PC, Imandt LM, de Waal FC, Langenhuijsen MM. Quantitative enzyme determination: a parameter for leukemic cell differentiation. *Leukemia Res.* 11: 641-648, 1987.
- Worthen GS, Avdi N, Buhl AM, Suzuki N, Johnson GL. FMLP activates ras and raf in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 94: 815-823, 1994.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306, 1980.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89: 1067-1076, 1997.

Literatur

- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibitable by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347, 1991.
- Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, Kyriakis J, Liu FF, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* 6: 606-613, 1996.
- Zaucke F. Biochemische Wirkungen von organischen Metallverbindungen auf *in vitro* Zellsysteme: Untersuchungen zur zellulären Signaltransduktion und Apoptose. Dissertation, Universität Karlsruhe, 1997.