

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Professor Dr. med. W. Hiddemann)

**Protektive *in vitro* Wirkung mitochondrialer Entkoppler auf die
Apoptose in Leukämiezelllinien**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Alexei Pogrebniak
aus Kiew, Ukraine

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. V. Nüssler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. A. Siess

Prof. Dr. W. Machleidt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
<u>1.1 Akute Leukämien.....</u>	<u>5</u>
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Klinik.....	5
1.1.3 Diagnostik, Differentialdiagnostik.....	5
1.1.5 Prognose.....	9
1.1.6 Therapie der akuten Leukämien.....	10
1.1.8 Charakterisierung der untersuchten Zellkulturen.....	13
<u>1.2 Biologie des programmierten Zelltodes.....</u>	<u>14</u>
1.2.1 Allgemeines über Apoptose.....	14
1.2.2 Regulationsmechanismen der Apoptose (Übersicht).....	15
1.2.3 ICE-ähnliche Proteasen (Caspasen) und ihre Rolle bei der Apoptose.....	15
1.2.4 Biochemische Signalübertragungswege während der Apoptose.....	16
1.2.5 Oligonukleosomale DNA-Fragmentation als Apoptose-begleitendes Phänomen.....	17
1.2.6 Rolle von mitochondrialen Proteinen und freien Radikalen im Vollzug des apoptotischen Programms.....	18
1.2.7 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) während der Apoptose.....	20
1.2.8 Die Bcl-2 Genfamilie.....	23
1.2.9 Energiedepletion als Begleitphänomen der Apoptose.....	24
1.2.10 Zusammenhang zwischen programmiertem Zelltod und Aktivierung von PARP.....	26
2. Fragestellung und experimentelle Vorgehensweise.....	26
3. Materialien und Methoden.....	28
<u>3.1 Materialien.....</u>	<u>28</u>
<u>3.2 Methoden.....</u>	<u>29</u>
3.2.1 Zellen und Zellkultur.....	29

3.2.4 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe des kationischen potentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1	31
3.2.6 Bestimmung der Caspase-3- Aktivität	32
3.2.7 Aktivitätstest für Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP)	32
3.2.7 Bestimmung des intrazellulären NAD^+ -, NADH -, NADP^+ -, NADPH - Gehaltes	33
3.2.8 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes	34
<u>3.3 Statistik</u>	<u>34</u>
4. Ergebnisse	35
<u>4.1 Induktion des Zelltodes durch den mitochondrialen Entkoppler FCCP in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen.</u>	<u>35</u>
<u>4.2 Apoptosenachweis in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen nach Wirkungseintritt von FCCP.</u>	<u>38</u>
<u>4.3 FCCP hemmt die durch Chelerythrin (Proteinkinase C-Inhibitor) und Staurosporin (Serin/Threoninproteinkinasen-Inhibitor) ausgelöste Apoptose in CCRF-CEM- aber nicht in HL-60-Zellen</u>	<u>41</u>
<u>4.4 Aufklärung biochemischer Mechanismen der antiapoptotischen Wirkung von FCCP.</u>	<u>47</u>
5. Diskussion	54
6. Zusammenfassung	61
7. Literaturverzeichnis	65
8. Abkürzungsverzeichnis	72
9. Anhang	75
<u>9.1 Verwendete Reagenzien.</u>	<u>75</u>
<u>9.2 Verwendete Lösungen</u>	<u>77</u>
Lebenslauf	78

1. Einleitung

1.1 Akute Leukämien

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz von akuten Leukämien (AL) beträgt etwa 4 auf 100000 Einwohner/Jahr.

Der Altersmedian liegt bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) der Erwachsenen mit über 60 Jahren sehr hoch. 40 bis 50 Menschen auf 1 Million Einwohner sterben jährlich an einer Leukämie.

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist im Erwachsenenalter seltener als die AML. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Erwachsenen zwischen 30 und 40 Jahren, sie kommt aber in jedem Alter vor.

1.1.2 Klinik

Die Symptomatik wird durch die Funktionsstörung aller drei Zellreihen bestimmt: Subjektiv klagen die Patienten über Tachypnoe, Tachykardie, Fieber, Lymphknotenvergrößerungen, Müdigkeit, Leistungsinsuffizienz sowie über eine Infekt- und Blutungsneigung. Die Leukozyten sind häufig über 100.000/ μl erhöht, im Differentialblutbild überwiegen meist unreife Blasten. Andere Symptome bei akuter Leukämie werden durch Infiltration anderer Organe hervorgerufen. Dazu zählen: Meningiosis leucaemica, Hirnblutung (intrakranielle Massenblutungen), Polyneuropathie, Chlorome bei Befall des zentralen Nervensystems, Splenomegalie bei leukämischer Infiltration der Milz und Gingivahyperplasie bei Befall des oberen Respirationstrakts.

1.1.3 Diagnostik, Differentialdiagnostik

In der Diagnostik steht neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung die morphologische Differenzierung des Blutes und des Knochenmarks (KM) an erster Stelle (6).

Diese Untersuchungen sind in der Primärdiagnostik vor Einleitung einer Therapie zwingende Voraussetzung für die individuelle Prognose und für die Wahl der Therapiemaßnahmen (z.B. Intensität der Chemotherapie, Indikation zur Knochenmarktransplantation). Die Anzahl der Blasten im KM (mindestens 30% aller

kernhaltigen Zellen) wird als wichtigstes diagnostisches Kriterium von der French-American-British (FAB)-Gruppe angegeben.

Beim Nachweis vermehrter, bzw. atypischer Blasten werden zur weiteren morphologischen Differenzierung zytochemische Färbungen an Blut- und KM-Ausstrichen durchgeführt (30): die Peroxidase (POX), die Chloracetatesterase-oder die Sudanschwarz-Färbung. Diese liefern einen Hinweis auf die Zugehörigkeit der Blasten zur granulozytären Reihe; die unspezifische Esterase ist positiv bei blastären Zellen des monozytären Ursprungs; eine positive Perjodsäure/Schiff (PAS)-Reaktion deutet auf die Zugehörigkeit der Blasten zur lymphatischen und erythrozytären Reihe hin, sie kann aber auch bei Myeloblasten des promyelozytären oder monozytären Ursprungs auftreten. Die saure Phosphatase liefert einen Hinweis auf die T-Zell-Natur einer ALL.

Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik von AL besteht in der Immunphänotypisierung der leukämischen Zellen.

Die Immunphänotypisierung ist essentiell für die Diagnose der AML M0, M6 und M7 und für die Abgrenzung der AML gegenüber biphänotypischen und lymphatischen Leukämien. Mit ihrer Hilfe kann der Reifegrad und die Linienzugehörigkeit der Blasten festgestellt werden. Die Linienzugehörigkeit von Blasten zur myeloischen Zellreihe ist sicher, wenn Myeloperoxidase im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Charakteristisch für myeloische Blasten ist die Expression von CD13, CD33 (exprimiert bei 90% der AML) oder CDw65. CD13 ist bei unreifen Zellen zunächst im Zytoplasma und erst mit zunehmender Reifung auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Teilweise kann auf myeloischen Blasten bei AML auch CD15 gefunden werden; im normalen Knochenmark findet sich CD15 erst auf der Stufe der Promyelozyten.

Der intrazytoplasmatische Nachweis von Lysozym ist ein deutlicher Hinweis für die monozytäre Zellreihe. Reife monozytäre Zellen zeigen, im Gegensatz zu unreifen, eine Reaktion mit dem anti-CD14 Antikörper.

Der Nachweis von megakaryozytären Blasten gelingt über die Expression von thrombozytären Antigenen wie CD41 (Glycoprotein IIb), CD42a (Glycoprotein IX) oder CD61 (Plättchenglycoprotein IIIa), der von erythrozytären Blasten über die Expression von Glycophorin A. HLA-DR ist bei Zellen der Granulozytopoese nur in unreifen Zellen exprimiert. Myeloische Blasten bei AML zeigen häufig eine Koexpression von

lymphatischen Markern und umgekehrt werden myeloische Marker auf aberranten lymphatischen Zellen koexprimiert. Das T-Zell-Antigen CD7 ist in 10 - 15 % der AML nachweisbar, CD2 sehr viel seltener. Koexpression myeloischer Antigene (CD13, CD14, CD15, CD33 und/oder CDw65) findet sich auf ca. 20% aller Erwachsenen-ALL's.

Alle Subtypen von T-Zell-Linien-ALL exprimieren die Pan-T-Zell Antigene CD3- (überwiegend nur im Zytoplasma; cCD3)-und CD7, mehrheitlich auch CD5 und CD2 zusammen mit terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TdT) als linienunspezifischem unreifem Antigen. Allein CD3 ist streng T-linienspezifisch, während sich CD2, CD5 und CD7 auch bei einem Teil der AML's „aberrant“ finden.

Allen Subtypen der B-Vorläufer-Zellen gemeinsam ist die Expression von zytoplasmatischem CD22 (cCD22) als B-linienspezifischem Merkmal sowie der Pan-B-Antigene CD19 und CD24, die 'aberrant' auch auf AML's vorkommen können.

B-Zellen der lymphoblastischen Reihe zeigen zwar auch die Expression von CD10/CALLA, jedoch in Abweichung von der prä-B-ALL die Oberflächenexpression sowohl von Ig- μ -Schwerketten als auch die von Ig-Leichtketten sowie Negativität von TdT. Abweichend vom Phänotyp der 'Früh-B'-Zelle sind die Blasten jedoch negativ für CD24 und positiv für das 'Burkitt-Lymphom-assoziierte Antigen' (BLA) CD77.

Das „Stammzellantigen“ CD34 wird auf schwach differenzierten Blasten sowohl bei AML als auch bei ALL exprimiert.

Klonale chromosomale Veränderungen werden in 60-85% der ALL bei Erwachsenen, bei der de novo AML in ca. 50% beobachtet (40). „Klonale Marker“ der Leukämiezellen lassen sich mittels der klassischen zytogenetischen Untersuchung durch Metaphasenanalyse, mit Hilfe der reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), über Southern Blot und Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) auffinden.

Wichtige Differentialdiagnosen der AL stellen bei Erwachsenen Agranulozytose (Pseudomonas-induziert), aplastische Anämie, nicht-leukämische Panzytopenie, myelodysplastisches Syndrom (MDS), leukämoide Reaktion, infektiöse Mononukleose, Infiltrationen nicht-hämatologischer Neoplasien (z. B. kleinzelliges Bronchialkarzinom) dar.

1.1.4 Klassifikation

Akute Leukämien werden derzeit auf der Grundlage der allgemein anerkannten FAB-Klassifikation in 8 myeloische und 3 lymphatische Subtypen weiter unterteilt (72). Sie stützt sich auf die Pappenheim- und im Wesentlichen auf drei zytochemische Färbungen (POX, unspezifische Esterase und PAS) der KM-Ausstriche.

FAB-Klassifikation der AML:

-AML-M0 Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung

-AML-M1 Myeloblastenleukämie mit geringer Ausreifung

-AML-M2-Myeloblastenleukämie mit Ausreifung. Der häufige abnorme Karyotyp t(8; 21) mit der AML-1/ETO Translokation ist streng mit der AML-M2 assoziiert.

-AML-M3-Promyelozytenleukämie (APL). Es findet sich hierbei eine Translokation t(15; 17) und die dadurch bedingte Genumlagerung im Retinsäurerezeptor alpha (RAR α)-Gen, sowie häufig Gerinnungsstörungen (8, 42). Diese Translokation kann bei mehr als 90% der APL-Patienten nachgewiesen werden. Der Bruchpunkt auf Chromosom 17 im RAR α -Gen, der die Entstehung dieser Fusions-mRNS bestimmt, liegt immer im zweiten Intron des RARA-Gens, während es innerhalb des PML-Gens drei break point cluster Regionen (bcr's) gibt.

-AML-M4-myelomonozytäre Leukämie. Eine Sonderform dieser Leukämie ist mit einer Deletion und Inversion des Chromosoms 16 assoziiert und hat eine gute Prognose.

-AML-M5-Monozytenleukämie. Bei dieser Form der Leukämie werden häufig ein extramedullärer Organbefall und hohe initiale Leukozytenwerte beobachtet.

-AML-M6-Erythroleukämie.

-AML-M7-Megakaryoblastenleukämie.

FAB-Klassifikation der ALL:

-ALL-L1-kleine Zellen mit überwiegend runden Kernen sind vorherrschend.

-ALL-L2-die Zellen sind größer und sehr unterschiedlich in ihrer Gestalt. Die Kernform ist unregelmäßig mit deutlichen Einbuchtungen und Einkerbungen.

-ALL-L3-(Burkitt-Typ)-ein gleichförmig großer Zelltyp mit ovalen bis runden Kernen. Die Unterscheidung zwischen L1- und L2-Blasten hat aber nur wenig Bedeutung, da im Gegensatz zur immunzytologischen Einteilung keine klaren Beziehungen zum klinischen Verlauf bestehen. Lediglich der L3-Typ zeigt eine signifikante Korrelation mit der B-ALL. Die ALL wird daher heute vorrangig nach immunphänotypischen Kriterien

klassifiziert. Man unterscheidet Subtypen der B-Zellreihe (prä- prä-B-ALL, common-ALL, prä-B-ALL und B-ALL) und der T-Zellreihe (prä- T-ALL und T-ALL).

Eine Sonderform der ALL ist die HTLV-I positive ALL viraler Ätiologie, die mit einem Mediastinaltumor, einer Hyperkalzämie und Osteolysen einhergehen kann.

1.1.5 Prognose

Bei Patienten unter 60 Jahre beträgt ein 5-jähriges Überleben bei AML durchschnittlich 45%, bei Patienten über 60 Jahre lediglich 14%.

Es werden drei Risikogruppen bei AML definiert (3):

1) Good risk. Die Remission hält bei 70% der Patienten nach 5 Jahren an, 80% Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kompletten Remission nach Induktionstherapie.

2) Standard risk. Diese Gruppe beinhaltet mehr als 70% des gesamten Patientenkontingents mit medianem 5-jährigen Überleben um die 40%.

3) Poor risk. Dauer der Remission beträgt nur bei 10% der Patienten mehr als 5 Jahren, 55%-Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kompletten Remission nach Induktionstherapie, schnelleres Auftreten eines Rezidivs nach erster Remission. Sogenannte Frührezidive, d.h. Rückfälle die 3 - 6 Monate nach Erreichen einer Remission auftreten, sind prognostisch ungünstig und werden eher zu den refraktären myeloischen Leukämien gerechnet.

Die Prognose bei AML kann bestimmten zytogenetischen Anomalien zugeordnet werden. Eine gute Prognose haben die AML mit einer Inversion 16 bzw. einer Deletion des langen Armes von Chromosom 16 (bei FAB M4 mit Eosinophilie), die mit einer Translokation t(8; 21) (AML-1/ETO, FAB M2), die mit einer Translokation t(15;17) (FAB M3), behandelt mit All-transretinsäure (ATRA) und Chemotherapie;

Eine schlechte Prognose hingegen haben die AML-Patienten mit einer Monosomie 5 oder 7, die mit einer Deletion 7q -, 5q -, oder 3q-, die mit einer Trisomie 8, oder die mit einer Translokation t(11q23).

Die Prognose wird aber zusätzlich auch wesentlich davon bestimmt, ob eine andere hämatologische Erkrankung, z.B. Myelodysplasie, der akuten Leukämie vorangegangen ist, sowie vom Alter des Patienten. Entscheidend für die Prognose sind auch die initialen Leukozytenwerte bzw. die absolute Blastenzahl im peripheren Blut; vielzellige Leukosen

haben in der Regel eine schlechtere Prognose und bedürfen deshalb häufig eines zweiten Induktionszyklus bis zum Erreichen einer kompletten Remission.

Bei der ALL sind folgende Risikofaktoren von ungünstiger prognostischer Wertigkeit definiert:

-Keine Vollremission nach Phase I der Induktionstherapie.

-Initiale Leukozytenzahl $> 30\,000 /\mu\text{l}^3$.

-Lebensalter > 50 Jahre.

-Zytogenetische Aberrationen: eine t(9;22) (Philadelphia)-Translokation bei prä-B-ALL, eine t(4;11) Translokation bei den meisten prä-prä-B-ALL's und andere MLL (myeloid-lymphoid leukemia)-Gen betreffende Aberrationen. Die Translokation t(1;19) bedeutet keine schlechte Prognose, wenn eine intensive Chemotherapie durchgeführt wird (40).

-Immunologischer Subtyp prä-prä-B-ALL.

Die Subgruppe T-ALL ist bis auf prätymische T-ALL und reife T-ALL die prognostisch günstigste Gruppe. Ebenso eine günstige Prognose hat eine Hyperdiploidie bei B-ALL (35).

Dem Nachweis einer residuellen Leukämie bei der Verlaufskontrolle in der Remission wird in der Regel eine negative prognostische Bedeutung beigemessen. Es ist belegt worden, daß manche Aberrationen, z.B. eine nachweisbare t(15;17) Translokation bei der APL, mit einem baldigen Rezidiv verbunden sind.

1.1.6 Therapie der akuten Leukämien

Unbehandelt führt die AL oft innerhalb weniger Monate zum Tode. Heute werden durch Polychemotherapie im Kindesalter bei der überwiegenden Zahl der Erkrankten - besonders bei ALL- Langzeitremissionen mit Chance auf Heilung erreicht. Aber auch bei Erwachsenen ist dieser Anteil besonders durch Einbeziehung der Knochenmarktransplantation (KMT) in das Therapiekonzept erheblich angestiegen. Die weltweit am meisten benutzte Induktionstherapie bei AML besteht aus dem "3/7"-Programm. Hierbei wird 3 Tage lang ein Anthrazyklin, vorzugsweise Daunorubicin, und 7 Tage lang Zytosin-Arabinosid (AraC) verabfolgt (11, 14). Es ist noch umstritten, ob durch Einbeziehung von Etoposid, Mitoxantron oder Idarubicin in die Induktionstherapie Überlebensvorteile für Patienten erzielt werden können. Bei der

Therapie der refraktären Leukämie werden nichtkreuzresistente Topoisomerase II Hemmer, wie m-AMSA eingesetzt.

Wachstumsfaktoren, wie G-CSF oder GM-CSF, verkürzen die neutropenische Phase nach einem Chemotherapiezyklus, ohne jedoch einen Einfluß auf ein krankheitsfreies Überleben oder auf die Remissionsrate zu nehmen. CD33-Antikörper konjugiert mit Calicheamycin ist ein neuer, auf biologischer Grundlage basierender Ansatz in der Therapie von AML. Die Ergebnisse der Phase-I Studie sind vielversprechend: in 30% der Fälle wurde eine Komplettremission nach einem Rezidiv erreicht (64).

Der Stellenwert der KMT in der Therapie der akuten Leukämie ist bei Auftreten eines Rezidivs bzw. Erreichen einer zweiten Remission einer AML unbestritten. Trotz der gegenüber dem allogenen Verfahren deutlich geringeren Akut-Mortalität sind die Langzeitergebnisse der allogenen Transplantation gegenüber der autologen besser: insgesamt kann bei allogener KMT in erster Remission von einem leukämiefreien Überleben in 50 bis 60%, in zweiter Remission bei 30 bis 45% der Patienten, bei autologer KMT in erster Remission von einem krankheitsfreien Überleben bei 30 - 45%, in zweiter Remission bei 20 - 30% der transplantierten Patienten ausgegangen werden. (15). Die periphere Blutstammzelltransplantation (PBSC) stellt eine Alternative zur KMT dar. Der Vorteil dieser Methode besteht in einer schonenden Konsolidierungstherapie und deswegen in einer geringeren Inzidenz des Früh Todes, der Nachteil in erhöhtem Auftreten von Rezidiven und einer „graft versus host“ disease (GvHD). Zu Zeit wird versucht, diese Behandlung mit den Immunsuppressiva Mycophenolat Mofetil und Cyclosporin A zu kombinieren.

Eine prophylaktische Schädelbestrahlung gehört zur Routine bei der Behandlung von ALL, da ein Befall des ZNS bei ALL häufig vorkommt und weil ohne spezielle Prophylaxe 21-50% der Erwachsenen mit ALL ein ZNS-Rezidiv erleiden. Da bei der Behandlung der ALL im pädiatrischen Bereich gewisse Erfolge erzielt wurden, wurde dann ein komplexes pädiatrisches Protokoll für Erwachsene adaptiert. Es werden über einen langen Zeitraum abwechselnd Methotrexat+Leukovorin, VP-16, Dexamethason, VM-26, Vincristin, Vindesin, L-Asparaginase, Cyclophosphamid verabreicht. Therapieergebnisse bei der ALL des Erwachsenen lassen eine Remissionsrate von 65% bis 85% erwarten; etwa ein Drittel der Patienten können auf Dauer geheilt werden (29,

34). Eine allogene KMT in zweiter Remission bei der Erwachsenen-ALL erbringt Überlebensraten von 18%-45% nach mehr als 3 Jahren.

1.1.7 Wesentliche Resistenzmechanismen bei Leukämien

Trotz der innovativen Neuentwicklung von Zytostatika stellt die Chemotherapie-Resistenz bis heute ein Hauptproblem dar (73). Ca. 20% der AL sind primär resistent, ein noch größerer Anteil wird im Laufe der Chemotherapiebehandlung resistent (sekundäre Resistenz) (14). Die Primäre Resistenz wird durch eine Vielzahl von Resistenzmechanismen definiert (7):

- Störungen der Zytostatikaaufnahme (Beispiel: Methotrexat-Transport via Folsäure-Transportsystem, Melphalan-Transport via L-Aminosäure-Transportsystem). Verteilungsstörungen (Beispiel: Mitoxantron-Resistenz infolge der Bildung von Vesikeln).
- Unzureichende Akkumulation und Retention von Cytarabin- Triphosphat durch hohe Deaminase-Aktivitäten (Inaktivierung) und/oder zu niedrige Deoxycytidin Kinase Aktivität (mangelnde Aktivierung).
- Änderung der Zielstruktur (Topoisomerase I und II-Mutationen z.B. bei Anthrazyklinen).
- Proliferationsabhängige Resistenz (Beispiel: Hoher Anteil von G₀-Zellen, erniedrigte Thymidinkinase-Aktivität in Leukämiezellen bei smouldering Leukämie).
- Störung der Zytostatikaakkumulation in den intrazellulären Räumen (Beispiel: P-Glykoprotein (gp170), sowie die durch weitere Proteine mit sogenannter ABC-Kassette (ATP-binding cassette), wie MRP (multidrug resistance protein) und „vault protein“ vermittelte Resistenz: eine resistente Zelle schleust bestimmte Zytostatika mit Hilfe des P-Glykoproteins hinaus).

Der Erfolg einer langfristigen Krankheitstherapie der AL setzt das Absterben eines Maximums an malignen Zellen unter der applizierten Therapie voraus. Zahlreiche in der klinischen Therapie der akute Leukämien verwendete Substanzen sind in der Lage, ex vivo in leukämischen Blasten Apoptose zu induzieren. Mehrere Forschungsgruppen fanden eine signifikante Korrelation zwischen der ex-vivo-Induktion von Apoptose in malignen Zellen und dem klinischen Ansprechen auf die ex vivo getesteten Medikamente

(3). Setzt sich die Bereitschaft der Zelle, Apoptose zu untergehen, im Laufe der Behandlung herab, ist das in meisten Fällen auf die Bildung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zurückzuführen. Eine Herunterregulierung der CPP-32 (Procaspase-3), eine gesteigerte Aktivität der Nikotinamidmononukleotid-Adenylyltransferase, oder ein erhöhter intrazellulärer Gehalt an reduziertem Glutathion (12, 60) sind einige bekannte Defekte der apoptotischen Maschinerie, die für die Entstehung sekundärer Resistenzen in Tumorzellen verantwortlich sind.

Die Aufklärung zellulärer Resistenzmechanismen schafft Grundlagen für die Optimierung bestehender Therapieprotokolle und die Entwicklung neuer Therapiestrategien, die das Überleben der Patienten bei akuten Leukämien steigern können.

1.1.8 Charakterisierung der untersuchten Zellkulturen

Die humanen Leukämiezelllinien CCRF-CEM- und HL-60 sind gut etablierte Modelle für die Untersuchung der Mechanismen des apoptotischen Zelltodes, sowie des Tumorwachstums und werden heutzutage in vielen Laboratorien erfolgreich kultiviert.

CCRF-CEM ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie, die aus dem Buffycoat einer 4-jährigen weiblichen Patientin kaukasischer Abstammung mit dem Rezidiv einer T-ALL generiert wurde. Etabliert im Jahre 1964, war CCRF-CEM die erste humane immortale Zelllinie T-lymphozytären Ursprungs. Karyotypisch beinahe diploid, ist sie durch extreme chromosomale Instabilität gekennzeichnet: die Unterklone mit Trisomie 20, Monosomie X, den Deletionen del(9)(p21p22) und del(9)(q11-q13-21), sowie der Translokation t(8;9)(p11;p24) sind bereits beschrieben. Die CCRF-CEM ist nicht in der Lage, Immunglobuline zu synthetisieren. Durch Immunphänotypisierung wurde die Oberflächenexpression des T-Zellrezeptors vom alpha/beta Untertyp, CD3, CD4, sowie des Granulozyten/Monozytenmarkers CD15 gezeigt. Die Linie exprimiert nicht CD8, CD2, CD34, CD33, CD14, CD19, CD68, CDw90 und HLA-Dr auf der Zelloberfläche.

Eine intraperitoneale Implantation von CCRF-CEM-Zellen in neugeborene Hamster resultierte im Auftreten eines Lymphoms mit progressivem Wachstum, welches im Laufe der Erkrankung in eine akute Leukämie überging.

HL-60 ist eine humane Zelllinie der promyelozytären Reihe (M3 nach FAB-Klassifikation). Sie wurde aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Frau kaukasischer Abstammung mit akuter promyelozytärer Leukämie durch Leukapherese gewonnen. Diese Linie kann spontan oder durch all-trans-Retinsäure, DMSO oder Vitamin D3 in reife Granulozyten ausdifferenzieren (42). Die Größe des Zellkerns variiert zwischen den einzelnen Zellen erheblich. Das Genom der HL-60-Zellen enthält eine erhöhte Kopienzahl des Protoonkogens c-myc. Zytogenetische Untersuchungen der HL-60-Zelllinie zeigten ein komplexes Aberrationsmuster: Monosomien der Chromosomen X, 8, 16, 17, Trisomien der Chromosomen 18 und 22, verschiedene Translokationen t(5;17)(q11;q11), t(9;14)(q?22;q?22), t(16;17)(q22;q22) sowie Deletionen del(9)(p13) und Insertionen ins(1;8)(p?31;q24hsr) sowie add(18)(q21) wurden demonstriert. Die Oberflächenexpression der myelozytären Antigene CD33, CD13, CD15 wurde durchflußzytometrisch nachgewiesen. Die HL-60-Zelllinie exprimiert bis auf CD4, Fc- und Komplementrezeptoren keine für lymphatische Zellen spezifischen Marker. Sie besitzt Phagozytoseaktivität und reagiert auf verschiedene chemotaktische Stimuli. HL-60-Zellen sind in der Lage, in der athymischen Maus subkutane myeloische Tumore zu produzieren.

Beide Zelllinien besitzen eine hohe proliferative Aktivität (die Verdopplungszeit in Kultur beträgt ca. 24 Stunden) und sind in der Lage, auch bei hoher Zelldichte ($2-3 \times 10^6/\text{ml}$) zu wachsen, was sich im Hinblick auf die hohe Zytotoxizität der von uns verwendeten Substanzen als eine nützliche Eigenschaft erwies.

1.2 Biologie des programmierten Zelltodes

1.2.1 Allgemeines über Apoptose

Der programmierte Zelltod, der als Apoptose bezeichnet wird, stellt eine distinkte, physiologische Form des Zelluntergangs dar, bei der die Zelle ihr Absterben über genetisch vorgegebene Mechanismen mitsteuert. Apoptose findet physiologisch z. B. im Rahmen der Embryogenese und der Thymozytenreifung statt. Morphologisch und biochemisch läßt sich die Apoptose klar von der Nekrose abgrenzen (63).

Nekrose ist definiert als der Verlust der Plasmamembran-Permeabilitäts-Barriere. Der strukturelle Defekt in der Plasmamembran führt zur Zytolyse. Nekrose ist in der Regel mit einer entzündlichen Umgebungsreaktion verbunden.

Im Gegensatz zur Nekrose ist Apoptose ein genetisch festgelegter Prozeß des "Zellsuizids". Sie ist morphologisch charakterisiert durch Zellkernschrumpfung, Chromatinkondensation, Karyorrhexis, zytoplasmatische Blasenbildung und Bildung von Apoptosekörpern ("apoptotic bodies"). Die Membranintegrität bleibt zunächst erhalten (38).

1.2.2 Regulationsmechanismen der Apoptose (Übersicht)

Wichtige Erkenntnisse zur Regulation von programmiertem Zelltod stammen aus der Forschung an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Während der embryonalen Entwicklung des Fadenwurms sterben 131 seiner 1090 somatischen Zellen via Apoptose. Durch Analysen an *C. elegans* wurden 14 Gene, sogenannte ced-Gene ("cell death" Gene) identifiziert, die eine Rolle beim Zelltod spielen. Zwei autosomal rezessive "tödliche" Effektor-Gene, *ced-3* und *ced-4*, sind für den Tod aller 131 somatischen Zellen erforderlich: Mutationen in einem der zwei Gene haben eine Blockierung des Apoptoseprogramms zur Folge. Das Genprodukt von *ced-9*, das als negativer Regulator wirkt, kann Zellen vor Apoptose schützen (31).

Die Sequenzanalyse von *ced-9* enthüllte eine signifikante Strukturhomologie mit dem *Bcl-2* (*B-cell-lymphoma-2*) Gen. In der Tat kann menschliches *Bcl-2*, wenn es in die Nematodenzelle transferiert wird, *ced-9* ersetzen und Apoptose inhibieren (66).

Das Produkt des *ced-3*-Gens besitzt Ähnlichkeiten mit dem Interleukin-1 β -konvertierenden-Enzym (ICE, Caspase-1).

1.2.3 ICE-ähnliche Proteasen (Caspasen) und ihre Rolle bei der Apoptose

Caspasen sind Cysteinproteasen, die in der Lage sind, Aspartatreste des Zielproteins spezifisch zu erkennen und in ihrer Nähe Peptidbindung zu spalten. Ihre Hauptfunktion besteht in der Regulation des programmierten Zelltodes. Mehr als 13 menschliche Gene, die Caspase-ähnliche Moleküle kodieren, sind gegenwärtig bekannt. Während die Zelle lebt, existieren sie als inaktive Procaspasen oder sind an endogene Inhibitoren von Caspasen (IAP) gebunden. Nach der Wirkung von verschiedenen Noxen werden

aktivierende Caspasen, wie Caspase-2, Caspase-8 oder Caspase-9, in die proapoptotische Signalübertragung involviert. Aktivierende Caspasen sind in der Lage, sich selbst und Effektorcaspasen proteolytisch zu spalten und diese dadurch zu aktivieren. Zu den Substraten der Effektorcaspasen zählen Proteine wie das Retinoblastoma Protein (RB), der ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuclease), die δ - Isoform der Proteinkinase C, Lamin B, Aktin und die Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) (36). Der Zeitpunkt der Aktivierung von Effektorcaspasen wird als „point of no return“ bezeichnet. Ab diesem Moment ist die Apoptose irreversibel. Es ist gut untersucht, daß ein pharmakologischer Inhibitor der Caspasen, z-VAD-FMK (zVAD), Zellen vor Apoptose-induziert durch eine Reihe von Substanzen- schützt (41). Nicht alle Caspasen sind gleich empfindlich gegenüber z-VAD-FMK, z. B. ist die Caspase-2 schlecht durch zVAD hemmbar.

1.2.4 Biochemische Signalübertragungswege während der Apoptose

Detaillierte Studien an knock-out Mäusen ergaben, daß in Eukaryonten mindestens zwei unabhängige Wege für die Exekution des apoptotischen Programms existieren.

Der sogenannte „extrinsic pathway“ wird durch Bindung von spezifischen Liganden an sogenannte „death“ Rezeptoren getriggert. Diesen Molekülen-die zu Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)-Rezeptorfamilie gehören, ist die Präsenz einer homologen, zytoplasmatischen Sequenz, die als „death domain“ bezeichnet wird, gemeinsam. Zu den bekanntesten Mitgliedern dieser Familie zählen TNF- α -, CD95 (Fas)- und p75 Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptoren. Sowohl die Rezeptoren, als auch ihre Liganden werden häufig auf immunkompetenten Zellen exprimiert. Die physiologische Funktion dieser Moleküle besteht darin, daß fehlgeleitete Zellen innerhalb des Immunsystems durch die Bindung der Liganden an die auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren beseitigen werden können (4). Da leukämische Kulturzellen wie U937, Jurkat oder HL-60 den Fas-Rezeptor und die zytotoxischen T-Lymphozyten den Fas-Liganden exprimieren, kann diese Ligand-Rezeptor-Interaktion eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Leukämie durch das Immunsystem spielen. Durch Oligomerisation der Rezeptoren und darauffolgende Interaktion mit Adapterproteinen wie FADD, RIP oder TRADD, die ebenso eine Death-Domäne enthalten, werden

Caspase-8 und Caspase-2 aktiviert und im weiteren Verlauf der Kaskade die Caspase-3, die zu den wichtigsten Effektorcaspasen zählt.

Ein zweiter Weg ist der „intrinsic pathway“, auch „Mitochondrienweg“ genannt. Es ist noch nicht bekannt, wie hierbei die Signalübertragung erfolgt. Vermutlich fördern Funktionsstörungen in den Mitochondrien eine irreversible Freisetzung apoptosefördernder Proteine wie z. B. Zytochrom C oder des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus Mitochondrien. Diese Proteine sind in der Lage, über das Adapterprotein APAF-1 einen Komplex mit der Caspase-9 zu bilden. Die Caspase-9 aktiviert ihrerseits Caspase-3 (33).

Vor kurzem ist gezeigt worden, daß die beiden Apoptosewege miteinander verbunden sind. Einerseits wird durch Aktivierung der Caspase-8 über t-Bid, ein Protein der Bcl-2 Familie, die Homodimerisierung von Bax und Bak und die darauffolgende Freisetzung von Zytochrom C ins Zytoplasma beeinflusst (43). Andererseits wurde eine Involvierung des Fas-abhängigen Signalübertragungsweges nach Einwirkung des Zytostatikums Adriablastin beschrieben (21). Die Frage, ob Mitochondrien oder Caspasen für die Ausführung des apoptotischen Programms in der Zelle obligatorisch sind, wird zurzeit intensiv untersucht. Es wurde berichtet, daß Substanzen, die mit der Funktion des endoplasmatischen Retikulums interferieren, Caspase-12 ohne direkte Beteiligung von Mitochondrien aktivieren können (20). Es wird auch vermutet, daß AIF eine Caspase-unabhängige Apoptose triggern kann, da diese Art des Zelltodes nicht durch z-VAD-FMK gehemmt werden kann und es trotz Anwesenheit des Inhibitors zur Kondensation des Chromatins an der Peripherie des Zellkerns und zur DNA-Fragmentierung zu großen Fragmenten kommt (31).

1.2.5 Oligonukleosomale DNA-Fragmentation als Apoptose-begleitendes Phänomen

Im Verlauf der Apoptose erfolgt eine enzymatische Degradation der DNA. Sie ist gekennzeichnet durch eine sequenzunabhängige internukleosomale Spaltung mit dem Auftreten von 180-200 bp Fragmenten und Vielfachen davon, die im Agarose-Gel eindeutig nachweisbar sind. Für die oligonukleosomale DNA Fragmentation sind Ca^{2+} - Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen verantwortlich. Es ist gezeigt worden, daß diese Endonukleasen durch eine Koinkubation des intakten Zellkerns mit dem Zytosolextrakt

der apoptotischen Zellen aktiviert werden (32). In manchen Zelllinien bleibt die oligonukleosomale Degradation der DNA während der AIF-induzierten Apoptose aus und es werden lediglich grössere DNA-Fragmente (15-50 kb) beobachtet (20). Zu den Ca^{2+} - Mg^{2+} -abhängigen Endonukleasen zählt die durch Caspase aktivierte Desoxyribonuklease (CAD), die in der Lage ist, bildet Heterodimere mit anderen Proteinen, nämlich Inhibitoren der durch Caspase aktivierten Desoxyribonuklease (ICAD) zu bilden, und dadurch inaktiv zu bleiben. Während der irreversiblen Phase der Apoptose erfolgt eine Caspase-3 abhängige proteolytische Spaltung von ICAD, was den Komplex mit CAD zur Dissoziation zwingt und aktive CAD freisetzt.

1.2.6 Rolle von mitochondrialen Proteinen und freien Radikalen im Vollzug des apoptotischen Programms

Die Rolle von Mitochondrien während der Apoptose ist mittlerweile unumstritten. Die Mitochondrien sind gleichzeitig der Hauptentstehungsort für Sauerstoffradikale (ROS) und die prädominante Lokalisationsstelle für Bcl-2 (66, 67). Mitochondrien enthalten auch andere Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax, Bad, Bcl-xL, die sowohl pro-, als auch antiapoptotisch wirken. In den Mitochondrien befinden sich Proteine wie Caspase-2, Caspase-9, Zytocrom C und AIF, deren Freisetzung ins Zytoplasma zur Aktivierung von Effektorcaspasen und zum Auftreten irreversibler apoptotischer Veränderungen in der Zelle führen (Abbildung 1).

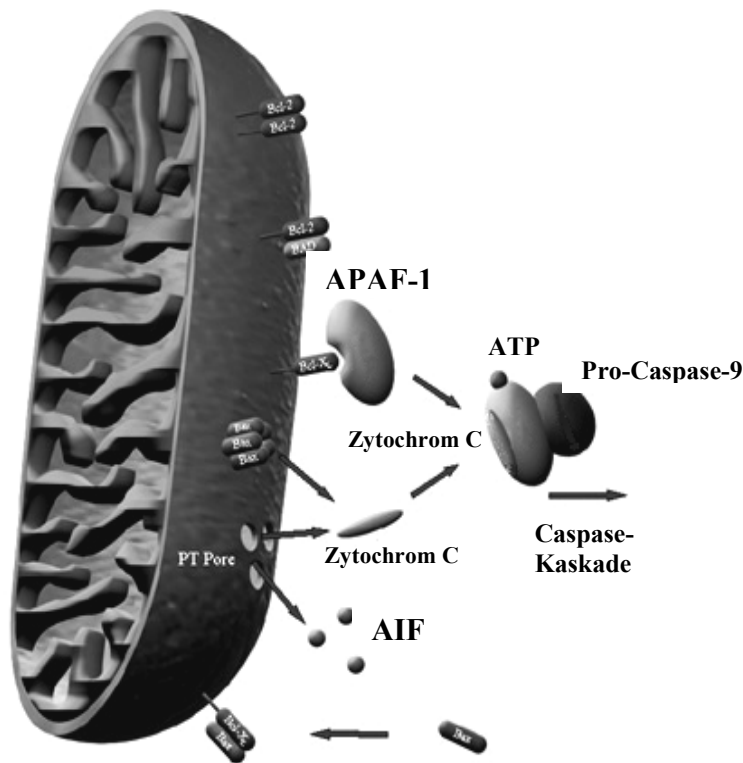


Abbildung 1. Apoptose-assoziierte Protein-Protein-Interaktionen, die in Mitochondrien stattfinden.

Die vor kurzem entdeckten Smac (DIABLO)-Proteine werden ebenfalls aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt. Sie sind in der Lage, sich an endogene Inhibitoren der Caspasen (IAP) zu binden und sie zu inaktivieren (31). Es wurde berichtet, daß p53 ein Kernprotein mit apoptogener und tumorsuppressiver Funktion und TR-3 ein Transkriptionsfaktor nach Einwirkung proapoptotischer Stimuli den Zellkern verlassen und danach in die Mitochondrien importiert werden (19).

Freie Radikale, vor allem der Superoxid-Anion, entstehen in Mitochondrien durch einen frühzeitigen Transfer der Elektronen (geschätzt auf 1-5% der Gesamtmenge), die durch die Atmungskette transportiert werden, auf den molekularen Sauerstoff (25). Viele experimentelle Befunde demonstrieren einen klaren Zusammenhang zwischen ROS und Apoptose (5). Prooxidantien, wie H_2O_2 , sind in der Lage, Apoptose in Leukämiezellen zu induzieren (17, 70). Darüber hinaus begünstigt oxidativer Stress die Öffnung der sogenannten „permeability transition“ Pore (PT-Pore). Proapoptotische Stimuli, wie $TNF-\alpha$, erhöhen den intrazellulären Gehalt an Sauerstoffradikalen in der Zelle (4).

Antioxidantien wie N-Acetylcystein oder Vitamin C inaktivieren freie Radikale und schützen dadurch Zellen vor Apoptose (13, 43).

Die Produktion von ROS wird von Enzymen mit antioxidativer Funktion reguliert, die sich in den Mitochondrien befinden (60). Zu diesen Enzymen gehören die Phospholipid Hydroperoxid-Glutathionperoxidase, die Selen-abhängige Glutathionperoxidase, und die Superoxiddismutase. Ihre Funktionen bestehen in der Inaktivierung von ROS durch Umwandlung in weniger toxische Substanzen. Reduziertes Glutathion (GSH) spielt in diesen chemischen Reaktionen eine wichtige Rolle als Koenzym. Die Überexpression der mitochondrialen, nicht aber der zytoplasmatischen Form des Enzyms Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase in der Zelle vermittelt Resistenz gegenüber Apoptose, induziert durch Etoposid, Staurosporin, UV-Irradiation, nicht aber gegenüber Fas-induziertem Zelltod (50). Depletion von mitochondrialem, nicht aber zytoplasmatischem GSH erhöhte die Zytotoxizität von tert-Butylhydroperoxid in Hepatozyten (48). Zytostatika wie BCNU sind in der Lage, die Glutathionreduktase zu inhibieren. Es wurde außerdem gezeigt, daß die Reduktion von Glutathion durch die Glutathionreduktase nur bei intakter mitochondrialer Atmungsfunktion erfolgen kann.

1.2.7 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) während der Apoptose

Es ist heute allgemein anerkannt, daß die wichtigsten biochemischen Interaktionen zwischen den Molekülen, die am Vollzug des apoptotischen Programms beteiligt sind, hauptsächlich in den Mitochondrien stattfinden. Von mehreren Forschungsgruppen wird über eine Verschlechterung der mitochondrialen Funktion und der Energieversorgung der Zelle im Verlauf der Apoptose-induziert durch verschiedene Agentien wie Dexamethason (55), TNF- α (62), Fas und Entzug des NGF (18)-berichtet. Deshalb spielen diese Organellen eine Schlüsselrolle sowohl während der Initiierungs-, als auch während der Effektorphase der Apoptose. Die Synthese der Energieäquivalente, das Aufrechterhalten der optimalen Redox-Bedingungen in der Zelle, die chemische Bindung und Entgiftung von molekularem Sauerstoff sind die wichtigsten Aufgaben der Mitochondrien. Sie können nur erfüllt werden, wenn eine intakte innere mitochondriale Membran, sowie eine persistierende Ionenasymmetrie zwischen der intramitochondrialen Matrix und dem

Zytoplasma vorhanden sind. Das sind die wichtigsten Voraussetzungen für das Aufrechterhalten vom MMP. Durch das Bestehen vom MMP wird die optimale Funktion der mitochondrialen Atmungskette ermöglicht und umgekehrt, das MMP verändert sich stark abhängig vom momentanen Energiebedarf in der Zelle: ein niedriger intrazellulärer ATP-Gehalt kurbelt den Elektronentransport durch die Atmungskette an, infolgedessen fallen das MMP und der Anteil an reduzierten Pyridin-Nukleotiden in den Mitochondrien ab. Dieser Vorgang wird als Übergang vom Zustand 4 in den Zustand 3 der mitochondrialen Atmung bezeichnet (Abbildung 2).

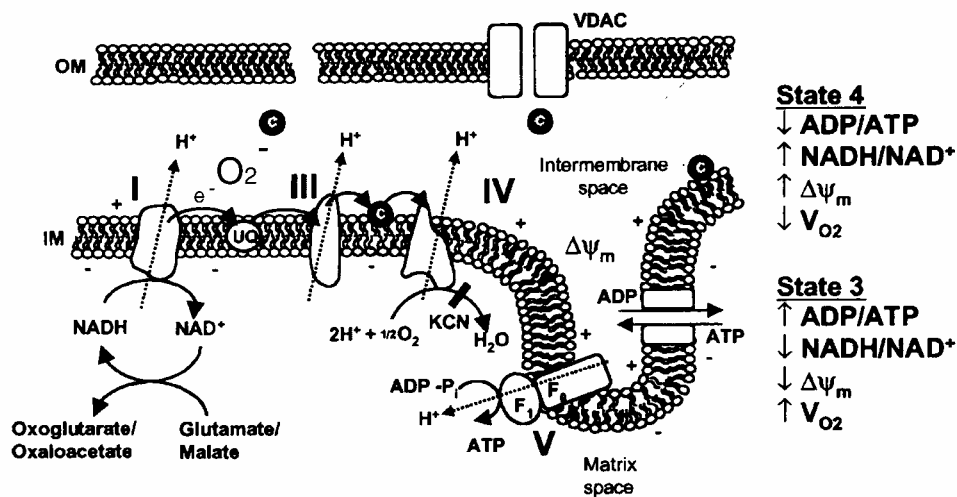


Abbildung 2. Funktion der mitochondrialen Atmungskette in einer Übersicht.

Deshalb ist das MMP ein Parameter, der für die Beurteilung der apoptoseassoziierten Veränderungen der mitochondrialen Funktion öfters herangezogen wird. In der Literatur existieren jedoch kontroverse Meinungen bezüglich des Charakters der Veränderungen vom MMP im Verlauf der Apoptose.

Einige Autoren beschrieben eine verminderte Inkorporation der MMP-sensitiven Farbstoffe wie Rhodamin 123 und JC-1 in Mitochondrien, was auf einen Abfall des MMP als ein frühes Zeichen der Apoptose hindeutet (5, 55, 76). Funktionelle Experimente wiesen darauf hin, daß eine präapoptotische Senkung des MMPs aufgrund der Öffnung der „permeability transition“ Pore und des darauffolgenden Permeabilitätsanstieges der inneren mitochondrialen Membran für niedermolekulare

Substanzen stattfindet (56). Die genaue Zusammensetzung dieser kanalförmigen Struktur ist noch nicht bekannt. Komponenten dieser Pore, wie die ATP/ADP-Translocase, der periphere Benzodiazepinrezeptor und der Potential-abhängige Anionenkanal (Porin), sind Bestandteile sowohl der inneren als auch der äußeren mitochondrialen Membran. Pharmakologisch ist dieser multimere Komplex durch Cyclosporin A bzw. Bongkregat hemmbar. Interaktionen der Porenkomponenten mit anderen Proteinen, wie z. B. Bax, oder Konformationsveränderungen führen zur Erhöhung der Membranpermeabilität für niedermolekulare Substanzen, was die Schwellung der Mitochondrien durch auftretende Hyperosmolarität der Matrix und die Entkopplung von mitochondrialer Atmung und Phosphorylierung hervorruft (20). Möglicherweise kann dieses Ereignis direkt eine Freisetzung von Zytochrom C oder AIF ins Zytoplasma auslösen. Der pharmakologische Wirkungsmechanismus der Protonenionophoren wie Carbonyl Cyanid p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) ähnelt dem Zustand der mitochondrialen „permeability transition“. Falls der Zustand von „permeability transition“ alleine für das Triggern des apoptotischen Programms ausreichend ist, sollte der Entkoppler von mitochondrialer Atmung und Phosphorylierung FCCP sowohl Apoptose induzieren, als auch einen synergistischen Effekt auf die mit anderen Agentien induzierte Apoptose zeigen.

Andere Autoren zeigten dagegen, daß eine initiale vorübergehende Hyperpolarisierung der mitochondrialen Membran in Anfangsstadien des apoptotischen Zelltodes zustande kam und erst im weiteren Verlauf der Apoptose ein Abfall des MMPs registriert werden konnte (59, 66). Neuere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, die an Einzellzellen durchgeführt wurden, wiesen darauf hin, daß das Auftreten apoptotischer Veränderungen nach der Inkubation von HL-60-Zellen mit Staurosporin (Sts) in der einzelnen Zelle nicht unbedingt mit einer Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran einherging und umgekehrt, daß die Senkung des MMPs nicht nur in apoptotischen Zellen, sondern auch in lebenden Zellen ohne nachweisbare apoptotische Veränderungen demonstriert werden konnte (61).

1.2.8 Die Bcl-2 Genfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind kleine regulatorische Proteine mit Molekulargewichten um 20-25 kDa. Sie definieren sich über Strukturhomologien im Bereich ihrer Bindungsdomänen BH1-BH4 (67). Die Bcl-2-Proteine sind in der Lage, miteinander durch die Bildung von Homo- und Heterodimeren komplex zu interagieren (54). Vermutlich sind alle Mitglieder dieser Familie an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt (43).

Dabei fungieren einige als Apoptose-Inhibitoren (Bcl-xL, Mcl-1, A1, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1), während andere (Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bid, Bik, und Hrk) Apoptose fördern (22, 24, 71).

Das Bcl-2-Genprodukt spielt eine herausragende Rolle bei der Regulation der Apoptose. In diversen Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Einschleusung von Bcl-2 in die Zelle eine Resistenz gegenüber zahlreichen zytotoxischen Stimuli vermitteln kann (23). Dazu zählen der Entzug von Wachstumsfaktoren, Substanzen die in die Signalübertragung eingreifen, ionisierende Strahlung, Cortikosteroide und letztendlich Chemotherapeutika.

Die genaue biochemische Funktion von Bcl-2 ist bisher nicht geklärt. Es wurde gezeigt, daß bei Sts-induzierter Apoptose der Effekt von Bcl-2 mitochondrienabhängig ist (67). Viele Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-xL oder Bax, sind aufgrund ihrer Struktur in der Lage, in Membranen Kanäle zu bilden und dadurch möglicherweise die Ionenpermeabilität in Mitochondrien zu modulieren. Es ist bekannt, daß die Freisetzung von Cytochrom C und AIF aus den Mitochondrien ins Zytosol durch die Bcl-2-Funktion verhindert wird (23). Es wird auch vermutet, daß Bcl-2 die Integrität der Mitochondrien aufrechterhält, indem einerseits eine Ruptur der mitochondrialen Außenmembran im Zustand der „permeability transition“ und andererseits die Schwellung der Mitochondrien durch Diffusion von Ca^{2+} und anderen Ionen verhindert werden kann (49). Untersuchungen mit AraC deuten darauf hin, daß Bcl-2 die Toleranz der Zelle gegenüber Sauerstoffradikalen erhöht, ohne jedoch die Anzahl der Radikale zu vermindern (28).

Bcl-2 und Bax bilden miteinander Homo- und Heterodimere. In bestimmten Zellsystemen ist das Rheostat von Bcl-2 und Bax entscheidend für das weitere Schicksal der Zelle nach einem proapoptischen Stimulus. Überwiegen die Bcl-2/Bax-

Heterodimere, überlebt die Zelle, überwiegen jedoch Bax-Homodimere, so stirbt die Zelle via Apoptose (18). Es konnte gezeigt werden, daß antineoplastische Substanzen, wie Taxol, in der Lage sind, Bcl-2 durch Phosphorylierung zu inaktivieren (26). Posttranslationelle Modifikationen der Proteine der Bcl-2-Familie können auch zytoprotektiv wirken. Ochs und al. (52) beobachteten eine Hypophosphorylierung von Bad nach Einwirkung von Alkylantien in der sensitiven, nicht aber in der resistenten CHO-Zelllinie.

Mutagenesestudien zeigten, daß die Bcl-2-Homodimere möglicherweise funktionell inaktiv sind (54).

1.2.9 Energiedepletion als Begleitphänomen der Apoptose

Über das Auftreten der ATP und NAD^+ -Depletion im Laufe der Apoptose wurde berichtet (17, 47). Während der Fas-induzierten Apoptose wurde eine Vielzahl an funktionellen Störungen der aeroben ATP-Synthese und der Ca^{2+} -Akkumulation in den Mitochondrien von Hepatozyten beobachtet (37). Diese Veränderungen konnten nur in den frühen Stadien der Apoptose durch Zugabe von exogenem Zytochrom C verhindert werden (49). Andererseits sind Zellen, die keine funktionierende Atmungskette besitzen, erheblich resistenter gegenüber dem Prooxidantium tert-Butylhydroperoxid, verglichen mit dem Wildtyp. Dieser Effekt ist durch eine Verhinderung der Oxidation von NADH bei einer Blockade des Elektronentransports über die Atmungskette zu erklären (13).

Apoptose kann durch eine pharmakologische Hemmung von Schlüsselenzymen der Atmungskette ausgelöst werden. Rotenon, Inhibitor der mitochondrialen NADH-abhängigen Dehydrogenasen, induziert Apoptose in HL-60-Zellen (47).

Für die Synthese von NAD^+ aus Nikotinamid spielen die Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (NPRT) und die Nikotinamidmononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT) eine Schlüsselrolle (45): NPRT verbraucht ATP für den Transfer einer Phosphoribosylgruppe auf Nikotinamid und für die daraus resultierende Synthese von Nikotinamidmononukleotid (NMN). Die Aktivität dieses Enzyms limitiert die Synthese von NAD^+ in ähnlicher Weise wie die Phosphofruktokinase die Glykolyse und den Trikarbonsäurenzyklus reguliert und wird durch die Bindung von Nikotinamid und ATP an allosterische Zentren beeinflusst.

NMNAT ist das einzige Enzym der NAD^+ -Biosynthese, das überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Die Aktivität dieses Enzyms ist in Tumorzellen sehr niedrig. Es wurde gezeigt, daß die NMNAT bei der ADP-Ribosylierung durch PARP inhibiert werden kann (45).

In der Leber ist darüber hinaus eine Synthese von NAD^+ aus Nikotinsäure möglich. Die Einflußnahme auf den Energiemetabolismus der malignen Zelle ist eine Grundlage für neue Ansätze in der Krebstherapie. 6-Aminonikotinamid, Tiazofurin und sein in vitro ca. 15-fach wirksameres Analogon Selenazofurin werden nach der Phosphorylierung in vivo durch die Aktivität der NMNAT in NAD^+ -Analoge verwandelt (9). Infolgedessen werden NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen, unter anderem die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym für die Synthese des DNA Bausteines Guanosinmonophosphat, kompetitiv gehemmt. Tiazofurin und Selenazofurin zeigten eine antineoplastische Aktivität bei Leukämien und soliden Tumoren in vitro und in vivo. Zellen, die keine NMNAT exprimieren, sind resistent gegenüber diesen Substanzen (12). Eine andere Strategie beruht auf der Annahme, daß eine neoplastische Zellpopulation heterogen ist und Zellen mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika enthält. Während ein Teil der malignen Zellen nach der Einwirkung von Zytostatika durch Apoptose stirbt, überleben die weniger sensitiven Zellen, weil ihr ATP-Gehalt nicht ausreichend gesenkt wird. Weitere Untersuchungen ergaben, daß eine Energiedepletion nur dann erreicht werden kann, wenn sowohl die ATP- als auch die NAD^+ -Synthese gleichzeitig gehemmt werden. Durch die dreifache Kombination aus N-(phosphonacetyl)-L-Asparaginsäure (PALA), 6-Methylmercaptapurinribosid (MMPR) und dem NAD^+ -Antagonisten 6-Aminonikotinamid (6-AN) war es möglich, einen signifikanten Abfall des Purin- und Pyrimidinnukleotidspiegels in Tumoren zu erreichen. Die alleinige Anwendung der genannten Substanzen war der dreifachen Kombination deutlich unterlegen. Es wurde gezeigt, daß die Kombination aus PALA, MMPR und 6-AN eine antineoplastische Wirkung von verschiedenen Zytostatika, wie 5-Fluorouracil und Adriablastin, in vivo verstärkt (46).

1.2.10 Zusammenhang zwischen programmiertem Zelltod und Aktivierung von PARP

PARP ist ein Chromatin-gebundenes Enzym, das NAD^+ als Substrat für die Synthese der ADP-Ribose-Homopolymere benutzt. Diese werden an verschiedene Proteine im Zellkern, Histone und DNA-Reparaturenzyme, wie PARP selbst, gekoppelt. Dadurch werden elektrostatische Bedingungen geschaffen, die den Zugang der Reparaturenzyme zu DNA Strangbrüchen erleichtern (1, 53). Genomische DNA ist eine Hauptzielscheibe für die zytotoxische Wirkung der meisten in der Klinik für die Krebsbehandlung einsetzbaren Medikamente (69). Das gilt insbesondere für alkylierende Substanzen, wie Melphalan, BCNU oder Chlorambucil, deren primäre zytotoxische und klastogene Wirkung in der Modifizierung der DNA-Bausteine (Methylierung oder Chlorethylierung) und in der Veränderung der doppelsträngigen DNA-Struktur besteht. Einige strukturell nicht verwandte PARP-Enzyme wurden vor kurzem identifiziert (2). PARP-1, das als erstes entdeckt wurde, kommt ubiquitär in der Zelle vor (es gibt ca. 1×10^6 Kopien pro Zelle) und kann direkt durch DNA-Strangbrüche aktiviert werden (69). Eine positive Korrelation zwischen der zytotoxischen Wirkung DNA-schädigender Substanzen und dem Grad der erfolgten PARP-Aktivierung wurde festgestellt (61). Die durch überschüssige Aktivität von PARP ausgelöste NAD^+ -Depletion führt zum Abfall des intrazellulären ATP-Gehaltes, weil die Zellen für die Resynthese von NAD^+ aus Nikotinamid ATP benötigen (44, 51). Die entstehende Energiekrise kann zum Zelltod führen. Ein vorübergehender Anstieg der PolyADP-Ribosylierung der nukleären Proteine und eine proteolytische Caspase-3-abhängige Spaltung von PARP, die dem programmierten Zelltod vorausgeht, wurde in verschiedenen Zelllinien demonstriert (2, 65).

2. Fragestellung und experimentelle Vorgehensweise

Folgende Fragen sollen im ersten Teil dieser Studie geklärt werden:

- Ist der mitochondriale Entkoppler FCCP in der Lage, in Leukämiezellen zytotoxische Veränderungen zu induzieren?
- Wenn ja, um welche Art des Zelltodes handelt es sich hierbei? Falls FCCP in der Lage ist, in den Leukämiezellen den verzögerten Zelltod durch Apoptose

auszulösen, welche apoptoseassoziierten biochemischen Veränderungen treten in diesen Zellen nach der Inkubation mit FCCP auf?

- Können Leukämiezellen- und wenn ja, wie-gegen mitochondriale Entkoppler sensibilisiert werden?
- Wie verändert sich das MMP nach der Behandlung der Leukämiezellen mit mitochondrialem Entkoppler?

Der zweite Teil der Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Vorbehandlung mit FCCP die durch andere Substanzen induzierte Apoptose beeinflussen kann. An die Reagenzien, deren proapoptotische Wirkung in der Kombination mit dem mitochondrialen Entkoppler in Leukämiezellen untersucht wird, werden bestimmte Anforderungen gestellt. Sie sollen in der Lage sein, Apoptose ohne de novo Proteinsynthese auszulösen. Im Gegensatz zu den meisten in der Klinik einsetzbaren Chemotherapeutika sollten diese Substanzen in ihrer apoptogenen Wirkung vor allem mit der mitochondrialen Funktion der Targetzellen interferieren und daher keine primär DNA-schädigende Eigenschaften besitzen. Sollten mitochondriale Entkoppler in unserem experimentellen System eine nicht unerhebliche Zytotoxizität aufweisen, dann wäre es sinnvoll, wenn die von uns eingesetzten Reagenzien ihre Wirkung entfalten würden, ehe die durch FCCP ausgelösten zytotoxischen Veränderungen auftreten. In Vorversuchen erwies sich eine Kombinationsbehandlung mit den Serin/Threonin-Proteinkinasehemmern Che und Sts als geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der apoptosemodulierenden Eigenschaften von FCCP. Folgende Fragen sollten in diesem zweiten Teil der Studie geklärt werden:

- Werden biochemische Zeichen von Apoptose, ausgelöst durch Che oder Sts, durch die Vorbehandlung mit FCCP aufgehoben und wenn ja, welche?
- Wie ausgeprägt ist die interferierende Wirkung von FCCP auf den programmierten Zelltod im Vergleich mit anderen aus der Literatur bekannten Substanzen, die in die apoptotische Caspase-Kaskade eingreifen, wie z. B. dem Caspase-3-Hemmer z-VAD-FMK (zVAD) und dem Inhibitor der Ca^{2+} - Mg^{2+} -Endonuklease Aurintricarboxylsäure (ATA)?
- Kann man anhand der funktionellen Untersuchungen der einzelnen Komponenten der zellulären Apoptosemaschinerie (wie zum Beispiel der Aktivität der PARP

oder der von Caspase-3), durchgeführt in FCCP-vorbehandelten Zellen, Schlußfolgerungen über die möglichen Mechanismen der apoptosemodulierenden Wirkung der mitochondrialen Entkoppler ziehen?

Kurze Skizzierung der experimentellen Vorgehensweise.

Zunächst wird die Wirkung verschiedener Konzentrationen von FCCP auf die Suspensionszelllinien CCRF-CEM- und HL-60-Zellen untersucht. Danach werden die Zelllinien zunächst mit nichttoxischen Konzentrationen der Modulatoren zVAD und ATA vorbehandelt. Eine Stunde später erfolgt die Zugabe der Apoptoseinduktoren FCCP, Serin/Threonin-Proteinkinasehemmer Che oder Sts. Danach werden die Zellen noch einige Stunden im Brutschrank inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wird ein Teil der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe des Annexin V-Tests die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der durch den mitochondrialen Entkoppler induzierten zytotoxischen Veränderungen gemessen. Zu den gleichen Zeitpunkten werden die durchflußzytometrischen Bestimmungen des MMPs, sowie eine PARP-Aktivitätsmessung in den nativen Zellen durchgeführt. Eine Zählung der Trypanblau-negativen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer Färbung nach einer Trypanblau-Färbung dient der Ermittlung derjenigen Zellmenge, die für die Aufbereitung der zwischen einzelnen Ansätzen normalisierten Zellysate notwendig ist. Die Erfassung der apoptoserelevanten Phänomene wie endonukleolytische DNA-Fragmentation, Caspase-3-abhängige proteolytische Spaltung von PARP, Aktivität von Caspase-3, sowie die Bestimmung des intrazellulären NAD^+ -, NADH-, NADPH- und ATP-Gehaltes erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt, da die hierfür nötigen Zellextrakte für eine gewisse Zeit bei -80°C gelagert werden können.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Staurosporin (Antibiotikum AM-2282), Chelerythrin (1, 2-Dimethoxy-N-methyl[1, 3]benzodioxolo[5, 6-c]phenanthridinium Chlorid, Che) und FCCP (Carbonyl Cyanid p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon) waren von Sigma; Aurintricarboxylsäure (ATA) und Propidiumjodid (PI) waren von Calbiochem; WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat) und 1-methoxy-PMS (1-

Methoxyphenazin Methosulphat) von Serva; JC-1 (5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbozyanin Iodid) von Molecular Probes; z-VAD-FMK (zVAD) von Bachem; das konjugierte Caspase-3-Substrat DEVD-AFC von Biomol; 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) von Sigma. NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH und FITC-konjugiertes Annexin V von Roche. Die Stammlösungen wurden hergestellt, indem die Reagenzien in DMSO oder DMF gelöst, portioniert und anschließend bei -20°C gelagert wurden; für Immunodetektion der Proteine Westernblotting wurden spezifische Maus monoklonale Antikörper C2-10 für PARP (Biomol), Klon 19 für CPP-32 (Transduction Laboratories) und Klon JLA20 für Aktin (Oncogene Science) eingesetzt. Als Sekundäre Antikörper wurden mit Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege anti-Maus IgG von Bio-Rad und Ziege anti-Maus IgM von Sigma verwendet. Glucose 6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) und Alkoholdehydrogenase (ADH) waren von Sigma. Eine Auflistung der verwendeten Standardchemikalien und Lösungen befindet sich im Anhang.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellen und Zellkultur

CCRF-CEM (akute T-lymphoblastische Leukämie) und HL-60 Zellen (akute promyelocytäre Leukämie), bezogen von ATCC, wurden bei 37°C in 5% CO₂ / 95% angefeuchteter Luftatmosphäre in RPMI-1640 Zellkulturmedium inkubiert, ergänzt mit 10% (v/v) foetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zelldichte während der Experimente wurde auf 1,2-1,5x10⁶/ml eingestellt, indem frisches Zellkulturmedium am Versuchstag zur Zellsuspension hinzugefügt wurde. Apoptoseinduktoren und Modulatoren wurden in verschiedenen Konzentrationen ins Zellkulturmedium aus den entsprechenden Stammlösungen pipettiert.

3.2.2 Durchflußzytometrischer Apoptosetest (Annexin V-Test)

Der Test wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit rekombinantem FITC-konjugiertem Annexin V durchgeführt. 3x10⁵ Zellen wurden in 1 ml HBSS gewaschen, 70 µl der Markierungslösung (A) zum Zellpräzipitat zugegeben, für 10 min bei 37°C inkubiert und schließlich mit 300 µl der PI-Pufferlösung (B) verdünnt. Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden am FACScan-Durchflußzytometer

(Becton Dickinson) durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und die Emissionswellenlänge 525 nm (FL1) für Annexin V-FITC und 620 nm (FL3) für PI. Es wurden fünftausend Events analysiert. Der relative Anteil an lebenden Zellen (Annexin V- und PI-negativ), apoptotischen (Annexin V-positiv, PI-negativ) und toten Zellen (beide Farbstoffe positiv) bezogen auf die ganze Zellzahl wurde durch die Abgrenzung der entsprechenden Subpopulationen im Dot-Plot ermittelt.

3.2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese und konventionelle DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurde mit Hilfe der CHEF-DRIII pulsed-field Elektrophoreseanlage (Bio-Rad) durchgeführt: Dafür wurden 5×10^6 Zellen in PBS gewaschen, in 63 μl des Resuspendierungspuffers (C) resuspendiert und für 5 min bei 50°C äquilibriert.

Anschließend, wurden 37 μl der für die Pulsfeld-Gelelektrophorese zertifizierten Agarose (Sigma) zur Zellsuspension pipettiert. Das Gemisch wurde für 7 min bei 50°C inkubiert, in die Pressform gegossen und für ca. 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Die fest gewordenen Blöcke wurden aus der Pressform herausgedrückt, über Nacht bei 55°C in Proteinase K-Reaktionspuffer (D) inkubiert und anschließend in die Schlitze des 1,4%igen Agarose-Gels hineingebracht. Die Elektrophoreselaufzeit betrug 9 Stunden bei einer Feldspannung von 9 V/cm, 4- bis 8-Sekunden Umschaltzeit bei einem Feldwinkel von 120° . Die DNA wurde mit Hilfe einer Ethidiumbromid-Färbung visualisiert (die Endkonzentration an Ethidiumbromid im Gel betrug 600 ng/ml). Um kleine DNA-Fragmente (ab 180-220 bp) zu detektieren, wurde 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (Serva) zum Überstand des Proteinase K-Reaktionspuffers hinzugefügt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 55°C inkubiert und mit 1:1 Phenol-Chloroform-Gemisch extrahiert. Nach Zentrifugation mit 12500 g bei 4°C für 10 Minuten wurde die obere Phase abgenommen, mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 5 M NaCl versetzt und durch Zentrifugation mit 12500 g bei 4°C für 30 Minuten präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μl TE Puffer (E) aufgenommen. Die DNA-Proben wurden in einem 1,2%-igen Agarose-Gel mittels der konventionellen DNA-Agarose-Gelelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 80 V aufgetrennt. Anschließend wurden die erhaltenen Banden aufgrund der Einlagerung von

Ethidiumbromid in die DNA mit Hilfe eines Transilluminators bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm visualisiert und mit einer CCD-Kamera (Pharmacia) aufgenommen.

3.2.4 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe des kationischen potentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1

$1,5 \times 10^5$ Zellen wurden einmal in HBSS gewaschen und in 250 μ l HBSS resuspendiert. Es wurden 5 μ l der JC-1 Stammlösung (1 mg/ml in DMF) zur Zellsuspension zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert, bevor mit HEPES-Lösung (F) verdünnt wurde. Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden am FACScan-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und die Emissionswellenlänge 530 nm (FL1) für die sich im Zytoplasma befindenden Farbstoffmoleküle und 595 nm (FL2) für die aggregierte JC-1-Fluoreszenzsonde, welche hauptsächlich in Mitochondrien sequestriert wird. Fünftausend Events wurden analysiert, die Zellpopulation mit hohem Vorwärtsscatter (FSC) und niedrigem Seitwärtsscatter (SSC) wurde durch Gating ausgewählt, bevor die mittlere Fluoreszenzintensität der ausgewählten Zellpopulation mit dem Mittelwert der Intensität des Kontrollansatzes im gleichen Fluoreszenzkanal verglichen wurde.

3.2.5 PARP- und CPP-32-Westernblot

$1,5 \times 10^6$ Trypanblau-negative Zellen wurden in 1 ml PBS gewaschen und das Zellpräzipitat in 60 μ l Lysepuffer I (G) aufgenommen. Die Viskosität des Zellysates wurde durch dreimalige Aspiration und konsekutive Passage durch eine 25G-Nadel reduziert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 65°C. 10 μ l des Zellysates, was ungefähr 10 μ g Protein pro Spur entsprach, wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die SDS-PAGE Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer (H) bei einer konstanten Stromstärke von 0,02 A pro Gelkammer (Mini Protean II, Bio-Rad), bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreichte. Der „nasse“ Proteintransfer (Wet Blot) auf die Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Sartorius) erfolgte für eine Stunde bei der konstanten Stromstärke von 0,5 A im Transferpuffer (I). Nach Beendigung des Transfers wurden die Membranen für eine

weitere Stunde mit einem Blocking-Puffer (J) gespült und anschließend über Nacht mit den monoklonalen Mausantikörpern C2-10 für PARP (1:200), Klon 19 für CPP-32 (1:1000), Klon JLA20 für β -Aktin (1:4000), jeweils in B-Puffer, bei 4°C inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten mit TBS-T (K) erfolgte eine halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase-konjugierte Ziege-anti-Maus IgG- bzw. Ziege-anti-Maus IgM), welche in Blocking-Puffer 1:2000 verdünnt werden. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung durch viermaliges Waschen in TBS-T wurde die Visualisierung der Banden mit Hilfe des ECL-Chemilumineszenzsystems (Amersham) durchgeführt: die Membranen wurden mit der Substratlösung inkubiert, die die Lichtfreisetzung während der enzymatischen Umsetzung des Wasserstoffperoxids ermöglicht, und anschließend in einer Folie in die Röntgenkassette hineingelegt. Die entsprechenden Banden zeigten sich an der Stelle des Röntgenfilms, wo durch primäre Antikörper-Bindung eine Aktivität der Peroxidase vorhanden war.

3.2.6 Bestimmung der Caspase-3- Aktivität

Die enzymatische Aktivität der Caspase-3 in CCRF-CEM-Zellen wurde gemessen, wie von Hasegawa u. a. beschrieben (27). 2×10^6 Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, in 150 μ l des Lysepuffers II (L) aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit 12500 g für 5 Minuten zentrifugiert und die klaren Überstände eingesammelt. 70 μ l Zellysate wurden mit 430 μ l Lysepuffer verdünnt, und das fluorogene Substrat DEVD-AFC aus der 10 mM Stammlösung in DMSO zum Inkubationsansatz in einer Endkonzentration von 37,5 μ M zugefügt. Das Substratgemisch wurde für 15 Minuten inkubiert, die Fluoreszenz, deren Intensität der Menge des freigesetzten Reaktionsproduktes AFC direkt proportional war, wurde am Spektralfluorometer Hitachi F-2000 bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm zu den Zeitpunkten 0 und 15 Minuten detektiert. Die Fluoreszenzintensitäten der Proben wurden mit der Intensität des unbehandelten Kontrolllysates verglichen, wobei letztere als 100% definiert wurde.

3.2.7 Aktivitätstest für Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP)

Die Aktivität von PARP in CCRF-CEM-Zellen wurde nach der Methode von Yoshihara

et al. gemessen (75). $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit Permeabilisierungspuffer (M) gewaschen und anschließend in 100 μ l vom gleichen Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde 200 μ l Substratpuffer (N) zu den Proben hinzugefügt und erneut für 25 min bei 37°C. Die Proben wurden mit 10% TCA präzipitiert, zweimal gewaschen und in 3 ml der Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth) resuspendiert. Die TCA-unlösliche Radioaktivität wurde am Szintillationszähler Beckman LS5000 TA gemessen. Hierbei wurde die Aktivität von PARP in behandelten Zellen als relativer Wert der PARP-Aktivität des Kontrollansatzes ausgedrückt, der als 100% angenommen wurde.

3.2.7 Bestimmung des intrazellulären NAD⁺-, NADH-, NADP⁺-, NADPH-Gehaltes

$0,5 \times 10^6$ der Trypanblau-negativen Zellen wurden in PBS gewaschen. Für die Bestimmung des intrazellulären NAD⁺- or NADP⁺-Gehaltes wurden 100 μ l 0,5 M (w/v) Perchlorsäure zum Zellpräzipitat hinzugefügt und die Lysate bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden 30 μ l Neutralisationspuffer (O) zugegeben, die Proben gemischt und bei 12500 g für 3 Minuten zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden abgenommen und bei -70°C gelagert. Für die Messung der intrazellulären NADH- oder NADPH-Konzentration wurden 100 μ l des alkalischen Lysepuffers (P) zum Zellpräzipitat zugefügt. Um die Viskosität der Proben zu reduzieren, wurden die Zellysate für 10 min bei 60°C inkubiert, mit 30 μ l 0,25M Gly-Gly-Puffer (pH 7,4) neutralisiert und für 3 Minuten bei 12500 g zentrifugiert. Anschließend wurden die klaren Überstände eingesammelt und bei -70°C gelagert.

Das Prinzip des von uns verwendeten Cycling-Tests für die analytische Messung des intrazellulären Gehaltes an Pyridinnukleotiden besteht darin, daß ein NAD(P)H-abhängiger Elektronentransfer durch 1-Methoxy-PMS an das WST-1-Molekül erfolgt, was eine Reduktion von WST-1 zum wasserlöslichen Formazan zur Folge hat. Das oxidierte NAD⁺/NADP⁺ wurde nahezu gleichzeitig reduziert, und zwar durch die im Reaktionsgemisch ebenfalls vorhandenen Dehydrogenasen ADH für NAD⁺/NADH oder G6PDH für NADP⁺/NADPH). Das reduzierte WST-1 konnte spektralphotometrisch bei 450 nm gemessen werden, so daß eine Indikatorreaktion nicht nötig war. Wir haben diesen Test mit einer Standard-Methode (10) verglichen und eine ähnliche Sensitivität bei

höherer Präzision der Messungen festgestellt. Eine Reaktionszeit von 40 Minuten erwies sich als ausreichend für die vollständige Reduktion vom WST-1. Für die Bestimmung des intrazellulären NAD^+/NADH wurden 10 μl vom Zellextrakt in die 96-Well-Platte pipettiert und 150 μl des Reaktionsgemisches I (Q) wurde zu den Lysaten hinzugefügt. Für die Messung des intrazellulären $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ wurden 150 μl des Reaktionsgemisches II (R) zu 10 μl Zellextrakt zugegeben.

Die Platten wurden für 40 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinktion der Proben am ELISA-Reader (Biotek instruments) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die intrazellulären $\text{NAD}^+/\text{NADH}/\text{NADPH}$ -Konzentrationen wurden durch Interpolierung der gemessenen Werte an einer Kalibrierungskurve aufgezeichnet, die mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Standards erstellt wurde.

3.2.8 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde mit Hilfe des Luziferin-Luziferase Testkits (Labsystems) nach Vorschrift des Herstellers bestimmt. Neutralisierte saure Zellextrakte wurden auf dieselbe Weise wie für die NAD^+ - und NADP^+ -Konzentrationsbestimmung gewonnen und daraufhin 1:50 für HL-60-Zellen und 1:100 für CCRF-CEM-Zellen mit dem Luziferasepuffer (S) verdünnt. Von dem verdünnten Zellextrakt wurden 50 μl in eine 96-Well-Platte mit weißem Boden (Labsystems) pipettiert. Anschließend wurden 110 μl des Luziferasebuffers und 40 μl des ATP-Monitoring-Reagenzes separat mittels eines automatischen Dispensersystems je Vertiefung zugegeben (die endgültige Verdünnung des ATP-Monitoring-Reagenzes im Luziferasepuffer betrug 1:5). Die Lichtemission der Proben wurde am Chemiluminometer Lucy-1 (Anthos) gemessen, der mit der für 96-Well-Platten adaptierten Microwin 3.1 ELISA Software, (Biotek instruments) ausgerüstet war. Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde durch die Interpolierung der gemessenen Probenwerte auf die ATP-Standardkurve berechnet und in $\text{nmol}/10^6$ Zellen ausgedrückt.

3.3 Statistik

Für die Bestimmung der statistischen Signifikanz der festgestellten biochemischen Veränderungen nach Wirkung der Apoptoseinduktoren mit oder ohne Zugabe von

Modulatoren wurde der Student's t-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

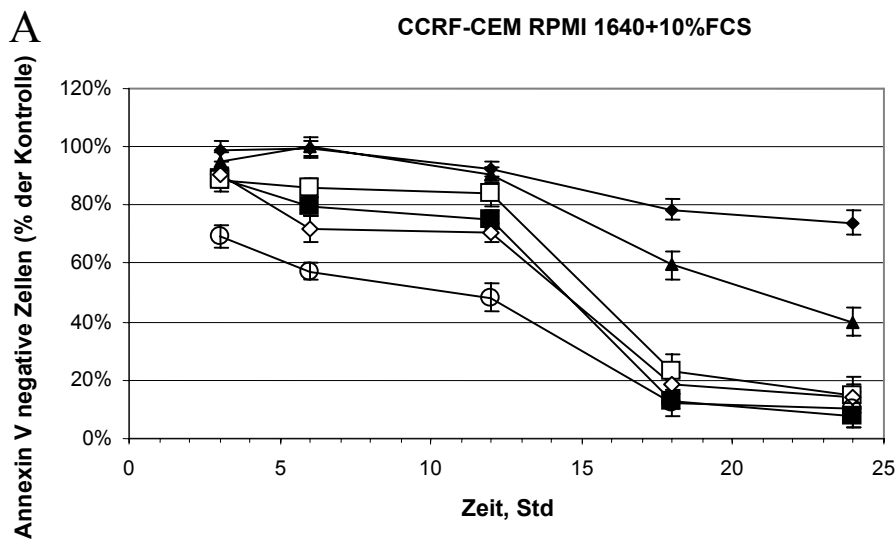
4.1 Induktion des Zelltodes durch den mitochondrialen Entkoppler FCCP in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen.

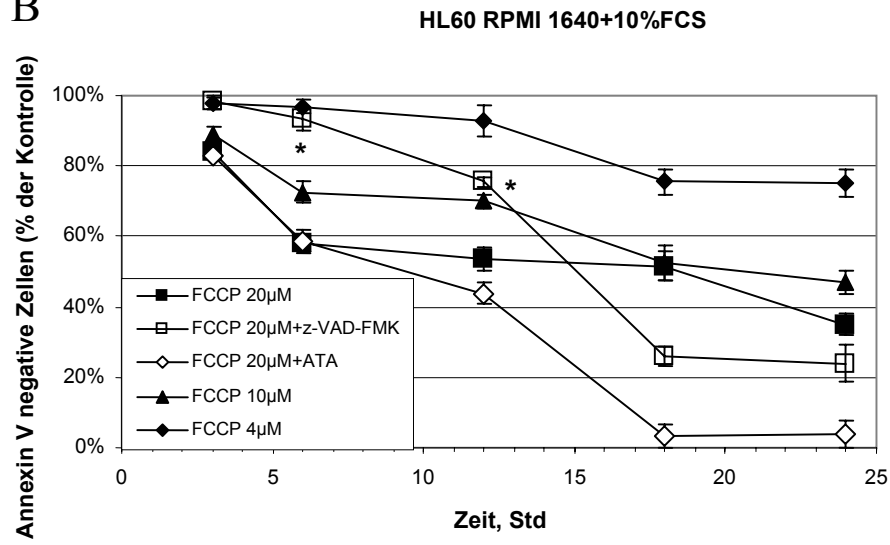
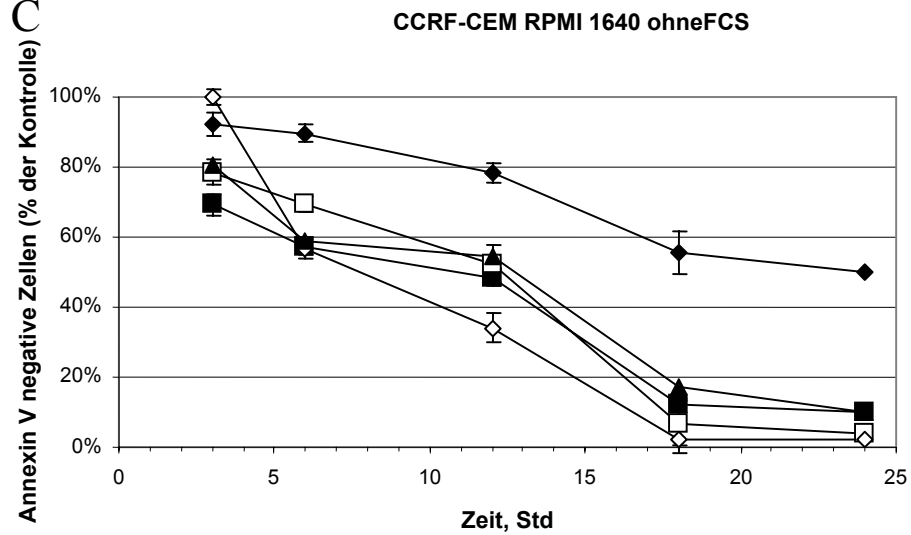
Als Entkoppler von mitochondrialer Atmung und Phosphorylierung induzierte FCCP konzentrationsabhängig Apoptose in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen. Mit Hilfe von Annexin V konnte im Zellkulturmedium RPMI 1640+10%FCS gezeigt werden, daß eine 6-stündige Behandlung mit 20 μM FCCP bei CCRF-CEM-Zellen in ca. 25% bzw. HL-60-Zellen in 50%, entsprechend eine 24-stündige Inkubation in 90% bzw. 70% apoptotischen Zellen resultierte. Ca. 70% der Zellen beider Zelllinien überlebten eine 24-stündige Behandlung mit 4 μM FCCP (Abbildung 3 A, B).

Ferner wurde untersucht, ob durch verschlechterte Inkubationsbedingungen ein besseres Ansprechen der Zellen auf FCCP erzielt werden konnte. Beide Zelllinien, aber insbesondere HL-60-Zellen reagierten gegenüber FCCP sensitiver. So führte eine Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium zu einer Sensibilisierung: schon 3 Stunden nach Inkubation mit 20 μM FCCP waren 35% der CCRF-CEM- und 80% der HL-60-Zellen apoptotisch. Nach 24-stündiger Inkubation mit der gleichen FCCP-Konzentration war in beiden Zelllinien ein 90-95%iger apoptotischer Zelltod nachweisbar; eine 4 μM FCCP-Konzentration konnte nach 18 Stunden Apoptose in mindestens 50% der CCRF-CEM- und 90% der HL-60-Zellen auslösen (Abbildung 3 C, D). Lichtmikroskopisch zeigten die Zellen nach Trypanblaufärbung die apoptosetypischen Veränderungen Kernschrumpfung, Kernfragmentierung, protoplasmatische Vakuolisierung, abnormale Lichtstreuung, sowie den für HL-60-Zellen charakteristischen Verlust der Zellform.

Durch den Einsatz der aus der Literatur bekannten Apoptosehemmer (16, 52) wurde versucht, eine FCCP-induzierte Apoptose durch Zugabe einer nicht toxischen Konzentration des Caspase-3 Inhibitors zVAD (50 μM) oder des Ca^{2+} - Mg^{2+} -Endonuklease-Inhibitors ATA (250 μM) zu hemmen. zVAD verzögerte den mit 20 μM FCCP in HL-60-Zellen induzierten apoptotischen Zelltod innerhalb der ersten 12 Stunden

der Inkubation: der Anteil an lebenden Zellen war, verglichen mit der Behandlung von 20 μM FCCP alleine, um 15-40% höher. Die Inhibition war statistisch signifikant, wenn das Inkubationsmedium sowohl mit, als auch ohne FCS verwendet wurde ($p < 0,05$). Nach 12 Stunden blieb die Wirkung des Inhibitors aus, so daß die Zellen in demselben Maße wie nach der Wirkung von 20 μM FCCP ohne Modulator starben, und zwar unabhängig davon, ob Inkubationsmedium mit oder ohne FCS eingesetzt wurde. Aurintricarboxylsäure war in keiner der eingesetzten Zelllinien in der Lage, eine FCCP-induzierte Apoptose signifikant zu hemmen (Abbildung 3).



B**C**

D

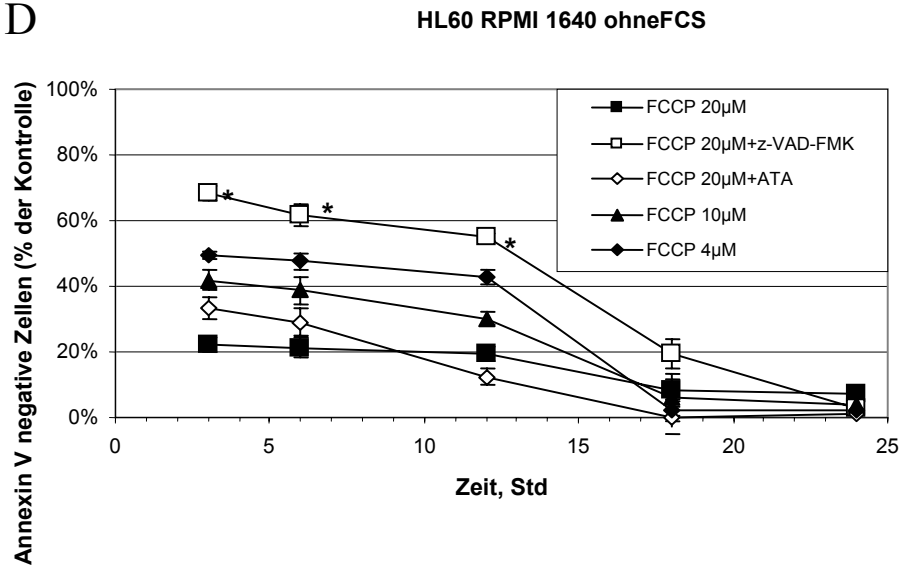


Abbildung 3. Viabilität von CCRF-CEM- (A, C) und HL-60- Zellen (B, D) anhand Annexin V Färbung zu 5 verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit FCCP in absteigenden Konzentrationen, im Inkubationsmedium RPMI-1640 mit (A, B) bzw. ohne (C, D) Zusatz von FCS, mit und ohne Zugabe der Modulatoren zVAD (50µM) und ATA (500µM). Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichungen für den relativen Anteil der lebenden Zellen in der gesamten Zellpopulation, gemessen in 3 unabhängigen Versuchen. Eine statistisch signifikante Hemmung der Apoptose durch 50 µM z-VAD-FMK ($p < 0,05$) in HL-60-Zellen wurde mit Sternen neben den Fehlerindikatoren angezeigt.

Die Inhibitoren der mRNA- und Proteinsynthese Actinomycin D (50ng/ml) und Cycloheximid (50µg/ml) hatten in beiden Zelllinien keinen signifikanten Einfluß auf die Apoptoserate.

4.2 Apoptosenachweis in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen nach Wirkungseintritt von FCCP

Mit Hilfe einer „pulsed field“ DNA-Agarose Gelelektrophorese beobachteten wir das Auftreten von 35-50 kbp großen Fragmenten (Abbildung 4 A), eine apoptosetypische

oligonukleosomale DNA-Fragmentation (180-200 bp) konnten wir in der konventionellen DNA-Agarose Gelelektrophorese nicht feststellen. Im Western Blot zeigte sich eine proteolytische Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP und eine Abnahme der Procaspase-3 CPP-32 (Abbildung 4 B, C). Diese Veränderungen traten in beiden Zelllinien zeitlich eher schneller auf, wenn Inkubationsmedium ohne FCS eingesetzt wurde, und waren in HL-60-Zellen etwas ausgeprägter (Abbildung 4 C).

Abbildung 4 A-C. Pulsed-field Gelelektrophorese (A) nach 24-stündiger Wirkung der abnehmenden Konzentrationen FCCP auf CCRF-CEM- und HL-60-Zellen. Proteolytische Spaltung von PARP und Abnahme von CPP-32 nach 24-stündiger Behandlung von CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit FCCP im Medium mit FCS (B) oder nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von FCCP im serumfreien Medium für 6 Stunden (C), detektiert mit Western Blot. β -Aktin diente als interner Standard, um festzustellen, daß in jeder Probe gleiche Mengen an Protein auf das Gel aufgetragen wurden. Der relative Anteil der Trypanblau-negativen Zellen (als lebend angenommen) wird oberhalb der jeweiligen Spur dargestellt.

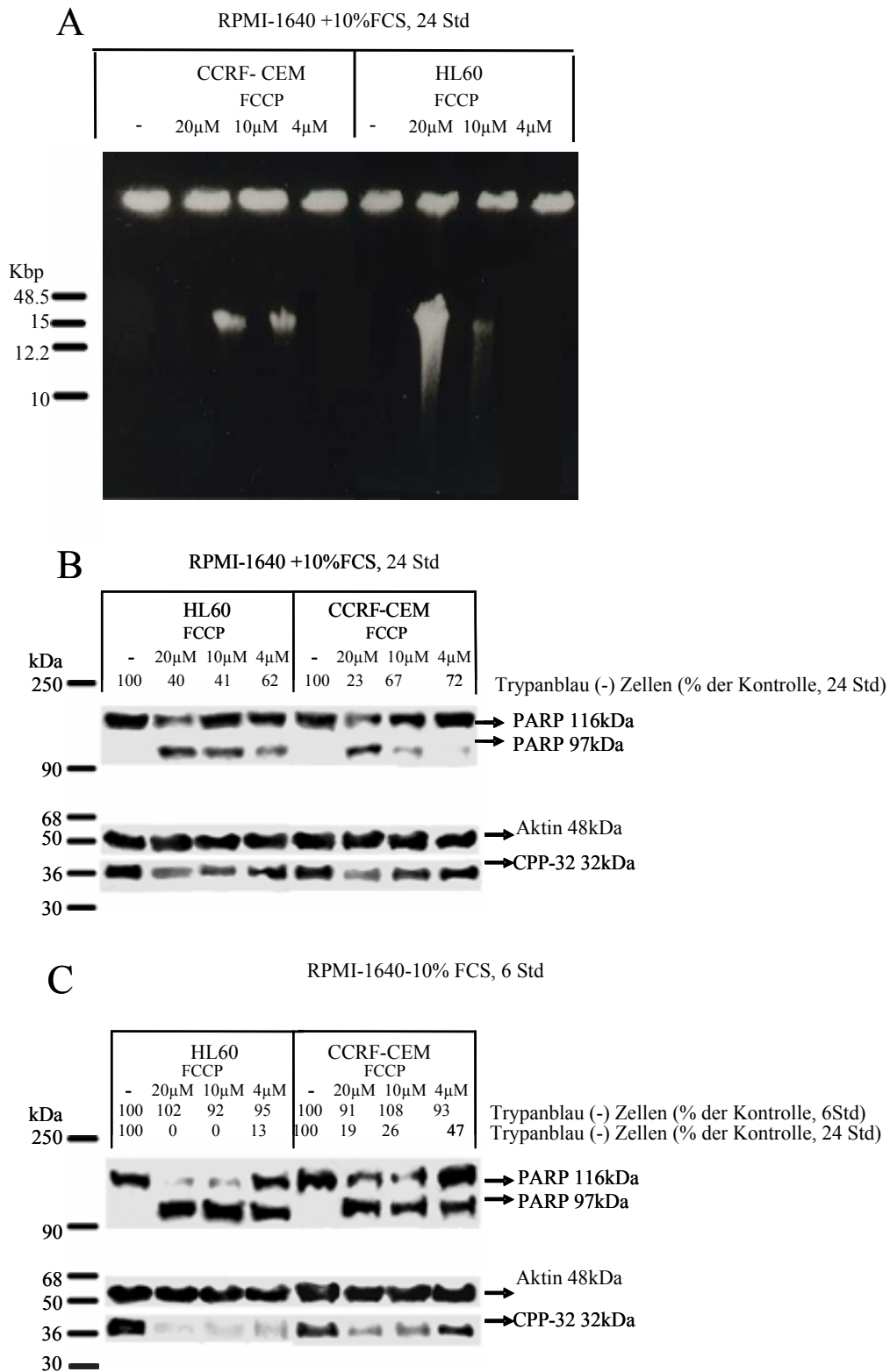


Abbildung 4 (fortgesetzt).

Wir konnten im Western Blot weder eine Hoch- noch eine Herunterregulation der Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 oder proapoptotischem Bax nachweisen. Die Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen von FCCP für 24 Stunden löste einen bis zu 2-fachen Anstieg des MMPs in CCRF-CEM-Zellen aus. In HL-60-Zellen kam es dagegen zu einer 50%-igen Reduktion des MMPs, durchflußzytometrisch gemessen mit Hilfe des potentialsensitiven Farbstoffs JC-1 (Tabelle 1). Der hohe, durch ATA ausgelöste Abfall des MMP in beiden Zelllinien war vermutlich ein durch Fluoreszenzquenching bedingter Artefakt.

JC-1 Fluoreszenz, % der Kontrolle

Behandlung Zelllinie	FCCP 20 μ M	FCCP 10 μ M	FCCP 4 μ M	FCCP 20 μ M +zVAD 50 μ M	FCCP 20 μ M +ATA 500 μ M
CCRF-CEM	210,4 \pm 9,5	136,2 \pm 5,7	110 \pm 6,2	118,3 \pm 6,8	18,5 \pm 4
HL-60	57,8 \pm 10,9	63,6 \pm 7,8	62,1 \pm 4,9	32,7 \pm 2,6	18,5 \pm 4,6

Tabelle 1. Relative Veränderungen des MMPs in CCRF-CEM- und HL-60-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von FCCP ohne bzw. mit Zugabe von Modulatoren.

4.3 FCCP hemmt die durch Chelerythrin (Proteinkinase C-Inhibitor) und Staurosporin (Serin/Threoninproteinkinasen-Inhibitor) ausgelöste Apoptose in CCRF-CEM- aber nicht in HL-60-Zellen

Mittels einer Annexin V-Färbung wurde ein ca. 90%iger apoptotischer Zelltod in CCRF-CEM-Zellen bereits nach 2-stündiger Behandlung mit 10 μ M Che oder nach 8-stündiger Inkubation mit 300 nM Sts nachgewiesen (Abbildung 5 A, B).

In CCRF-CEM-Zellen zeigte die konventionelle DNA-Agarose Gelelektrophorese das Auftreten von für die Apoptose typischen 180-200 bp langen oligonukleosomalen DNA-Fragmenten nach 3-stündiger Behandlung mit Che oder nach Inkubation mit Sts für 6 Stunden (Abbildung 6 A). Mit Western Blotting ließ sich eine für Apoptose

charakteristische, proteolytische Spaltung der Caspase-3 Substrate PARP und CPP-32 nachweisen (Abbildung 7 und 8 A, C). Überraschenderweise waren das Auftreten der Proteolyseprodukte von PARP und die Abnahme von Procaspase-3 bei niedrigen (10 μ M) Konzentrationen von Che ausgeprägter als bei höheren (20 μ M).

Entsprechend zum Inkubationsansatz führte der Einsatz von Actinomycin D oder Cycloheximid in den Endkonzentrationen 50ng/ml bzw. 50 μ g/ml zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden in der Kinetik der Apoptoseinduktion mit Che oder Sts in den ersten 8 Stunden der Behandlung. Sts und nicht Che führte bereits 75 Minuten nach Beginn der Inkubation zu einer ca 300%igen (densitometrisch gemessen) Hochregulation von Bcl-2, gezeigt im Western Blot. Diese war nur partiell durch die Hemmung der RNA- oder Proteinsynthese zu verhindern.

Der gleichzeitig oder eine Stunde zuvor mit Che oder Sts verabreichte mitochondriale Entkoppler FCCP verzögerte das Auftreten des programmierten Zelltodes in CCRF-CEM-Zellen. Ein Optimum der apoptosehemmenden Konzentration von FCCP lag bei 4 μ M für die Che- und bei 20 μ M für die Sts-induzierte Apoptose. Es überlebten 20-40% mehr Zellen 2 Stunden nach Beginn der Behandlung mit Che bzw. 6 Stunden nach Inkubationsstart mit Sts, verglichen mit alleiniger Behandlung mit diesen Substanzen. Der Unterschied war zu den Zeitpunkten 30, 60 und 120 Stunden für den durch Che ausgelösten Zelltod bzw. 2, 4 und 6 Stunden für die Sts-induzierte Apoptose statistisch signifikant ($p < 0,05$). Vitalitätsuntersuchungen ergaben im Vergleich zur Exposition mit Sts oder Che alleine zu den späteren Zeitpunkten keine Überlebensunterschiede. Konzentrationen von FCCP $< 2 \mu$ M zeigten keinerlei inhibitorische Wirkung auf die durch Serin/Threonin-Proteinkinase-Inhibitoren Che und Sts ausgelöste Apoptose (Abbildungen 5 A, B). Vorinkubation mit FCCP verzögerte das Auftreten der durch Behandlung mit Sts oder Che ausgelösten Veränderungen der Zellmorphologie, wie lichtmikroskopisch mit Hilfe der Trypanblaufärbung bestätigt wurde. Der protektive Effekt von FCCP wurde mit der Wirkung von anderen aus der Literatur bekannten Inhibitoren der Apoptose zVAD und ATA (53) verglichen. Eine Zugabe von 50 μ M zVAD erhöhte nicht signifikant das Überleben der Zellen nach bis zu 2-stündiger Wirkung von Che oder bis zu 8-stündiger mit Sts um 10-15%. Zu späteren Zeitpunkten unterschied sich die Vitalität der mit zVAD ko-inkubierten Zellen nicht von dem

Inkubationsansatz mit Che oder Sts alleine. Der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Endonuklease-Inhibitor ATA hob den durch Che oder Sts ausgelösten apoptotischen Zelltod in CCRF-CEM-Zellen nahezu vollständig auf (Abbildungen 5 A-C). Im Gegensatz zu FCCP oder zVAD blieben die Zellen einige Tage nach der Induktion von Apoptose und Zugabe von $250\mu\text{M}$ ATA intakt, nur die Verdopplungszeit war länger als in der Kontrollzellpopulation.

Eine 2-stündige Inkubation der HL-60-Zellen mit der gleichen Menge an Che resultierte in 50%iger Apoptose, nach 6-stündiger Behandlung mit Che wurde der Zelltod in 80% der HL-60-Zellen festgestellt. Weder FCCP noch zVAD waren in der Lage, die durch Che ausgelöste Apoptose in HL-60-Zellen zu hemmen. Ähnlich wie in CCRF-CEM-Zellen beobachteten wir eine Hemmung der durch Che induzierten Apoptose durch Zugabe von $500\mu\text{M}$ ATA zum Inkubationsansatz. Die Inhibition war in HL-60-Zellen im Gegensatz zu CCRF-CEM-Zellen nicht komplett: 6 Stunden nach der Apoptoseinduktion mit Che überlebten nur noch 50% der Zellen (Abbildung 5 C).

Abbildung 5. Kinetik der Viabilitätsveränderungen der CCRF-CEM- (A, B) und HL-60 (C)-Zellen nach Wirkungseintritt von Che (A, C) und Sts (B) gemessen zu 4 bzw. 5 verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des Annexin V-Tests. Die gesamte Zellpopulation wurde als 100% angenommen, der Anteil an lebenden, apoptotischen und toten Zellen durch das Gating der Subpopulationen ermittelt und als gestapeltes Säulendiagramm dargestellt. Eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Hemmung der Apoptose durch angewendete Inhibitoren wurde mit „*“ gekennzeichnet.

A

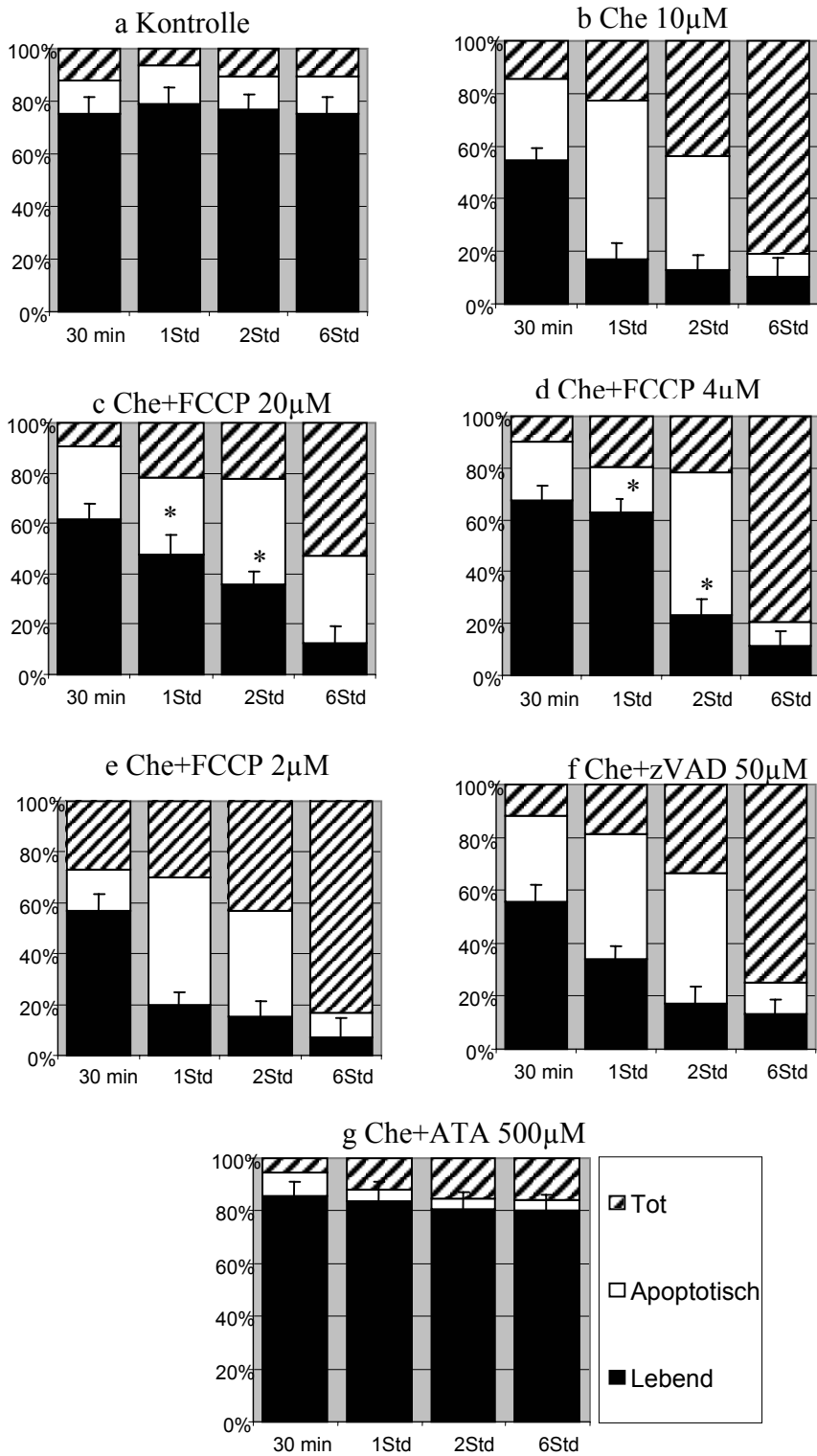


Abbildung 5 (fortgesetzt)

B

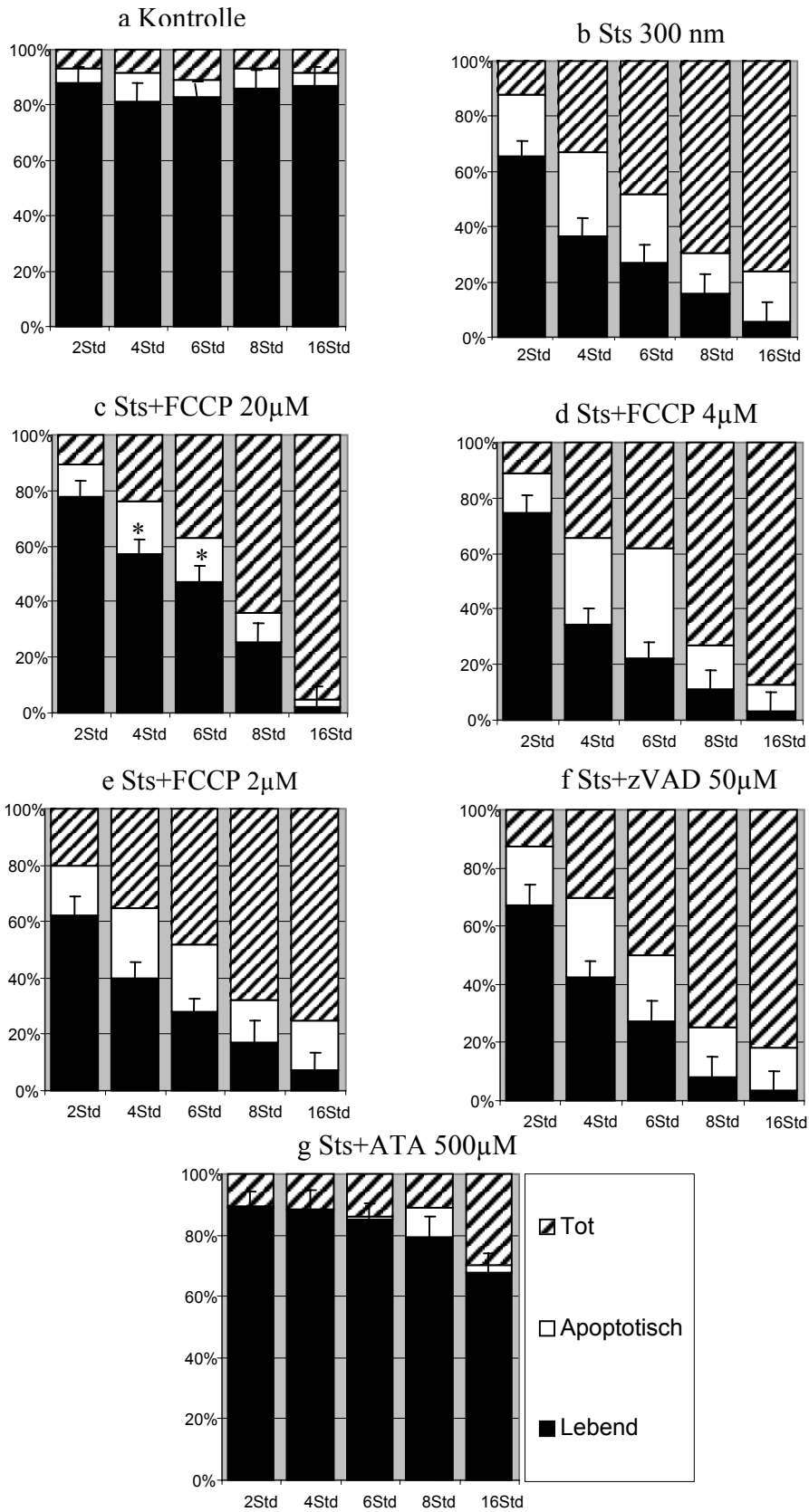


Abbildung 5 (fortgesetzt).

C

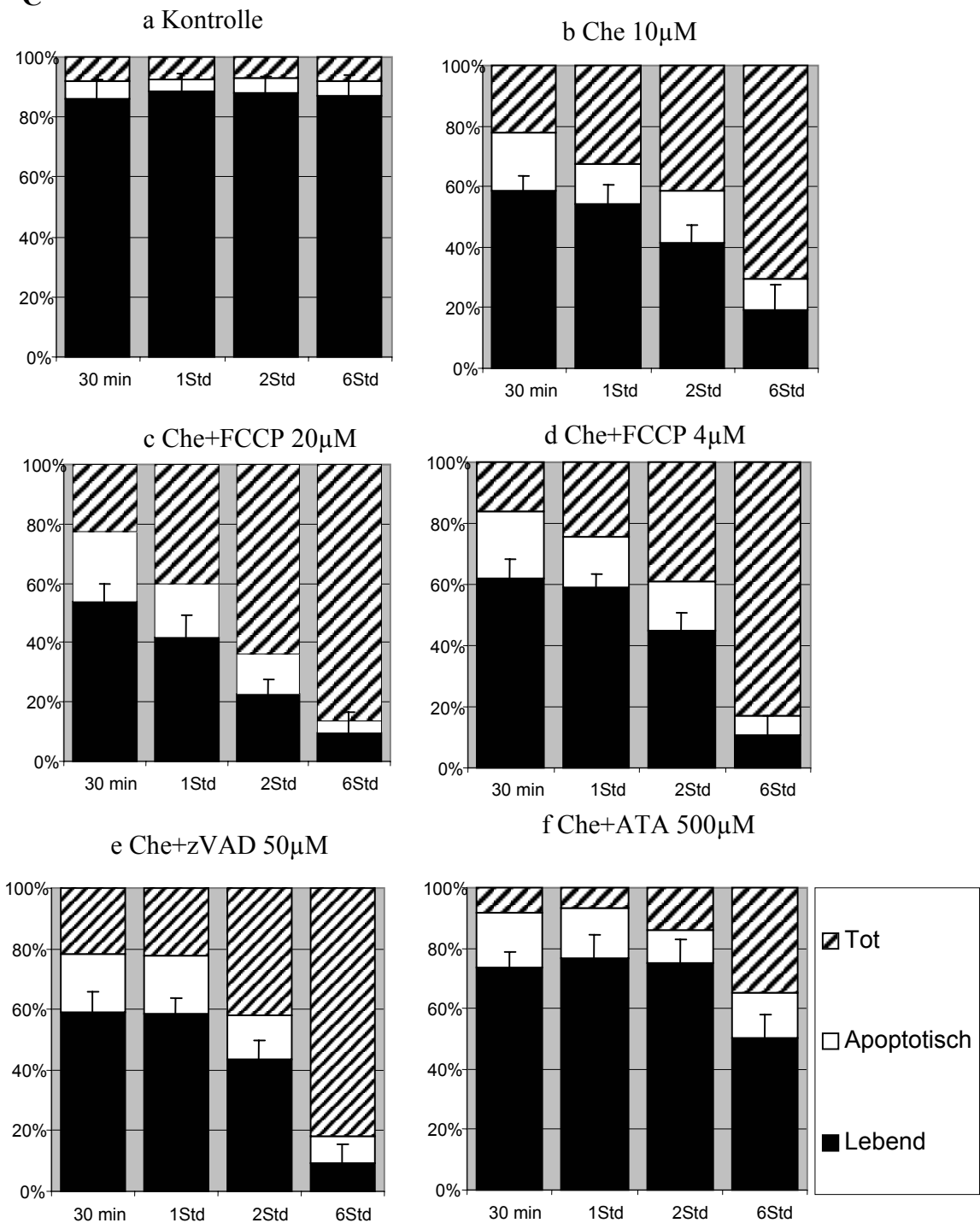


Abbildung 5 (fortgesetzt).

4.4 Aufklärung biochemischer Mechanismen der antiapoptotischen Wirkung von FCCP

Ferner haben wir uns die Frage gestellt, ob der protektive Effekt von FCCP auf den durch Che bzw. Sts induzierten Zelltod über die Interaktion des mitochondrialen Entkopplers mit den einzelnen Komponenten der zellulären Apoptosemaschinerie zu erklären ist. Hierfür haben wir den Einfluß von FCCP auf die apoptoserelevanten biochemischen und metabolischen Vorgänge wie oligonukleosomale DNA-Fragmentation, proteolytische Spaltung der Caspase-3 Substrate, Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials, Aktivierung der apoptoserelevanten Enzyme Caspase-3 und PARP, Veränderungen des zellulären Energiestoffwechsels nach der Wirkung von Serin/Threonin-Proteinkinase-Inhibitoren untersucht, um festzustellen, inwiefern die von uns verwendeten Apoptosehemmer diese modulieren können. Die durch Serin/Threonin-Proteinkinase-Inhibitoren Che und Sts ausgelöste oligonukleosomale DNA-Fragmentation wurde durch hohe Konzentrationen von FCCP (20 und 10µM für Che, 20µM für Sts) partiell verhindert. Im Gegensatz zu FCCP, blieb nach der Vorinkubation mit zVAD oder ATA das Auftreten des apoptosetypischen DNA-Ladderings nach der Behandlung mit Sts und Che vollständig aus (Abbildung 6).

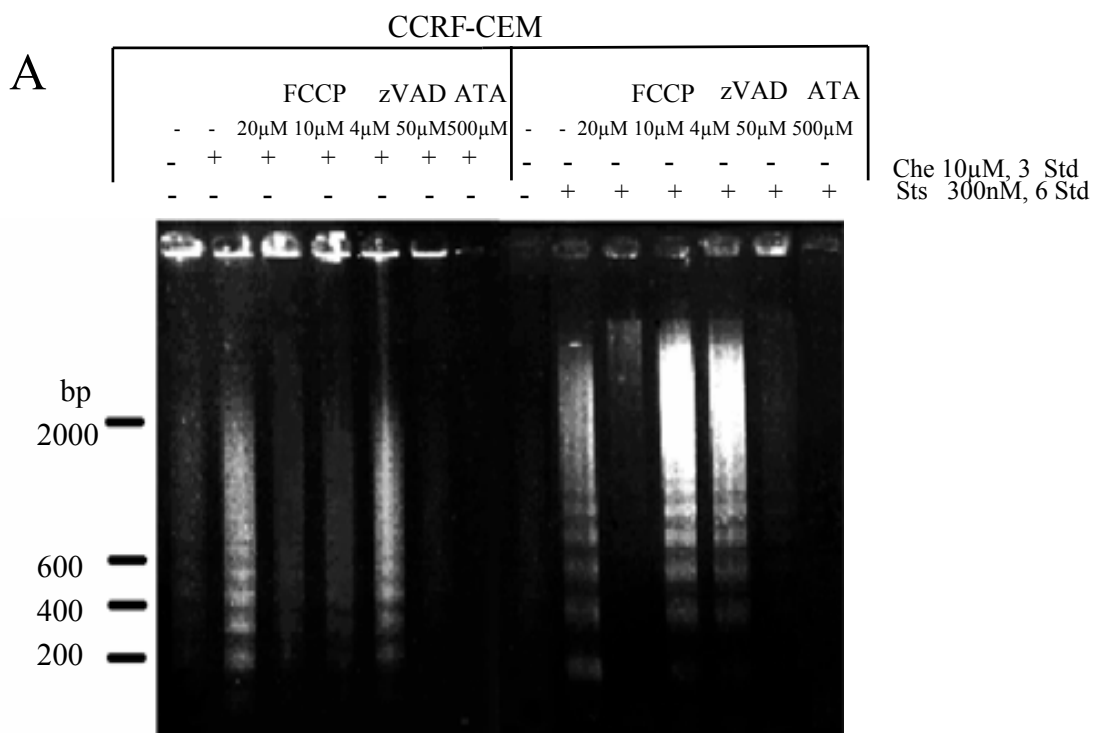


Abbildung 6. Oligonukleosomale (180-200 bp) DNA-Fragmentation in CCRF-CEM-Zellen nach 3-stündiger Behandlung mit Che (Spuren 1-7) oder 6-stündiger Inkubation mit Sts (Spuren 8-14) mit und ohne Zugabe der Modulatoren FCCP, zVAD und ATA. Im Western Blot wurde gezeigt, daß in CCRF-CEM-Zellen die Vorbehandlung mit FCCP die durch Che, nicht aber die durch Sts ausgelöste Caspase-3-abhängige Proteolyse von PARP nahezu vollständig aufhob (Abbildung 7 B, C). In der HL-60-Zelllinie führte die Zugabe von FCCP nach Inkubation mit 10µM Che zum verzögerten Auftreten des Spaltproduktes von PARP (Abbildung 7 A). Die proteolytische Spaltung von PARP blieb in beiden Zelllinien aus, wenn die Zellen vor der Induktion der Apoptose durch Che oder Sts mit zVAD sowie hohen (500µM) Konzentrationen von ATA vorinkubiert wurden (Abbildung 7 A-C).

Abbildung 7. Proteolytische Spaltung von PARP und Abnahme von CPP-32 nach der 3-stündigen Behandlung von CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit Che. β-Aktin diente als interner Standard, um festzustellen, ob das Gel mit jeweils gleichen Proteinemengen beladen wurde. Der relative Anteil der Trypanblau-negativen (vitalen) Zellen wurde oberhalb der jeweiligen Spur dargestellt.

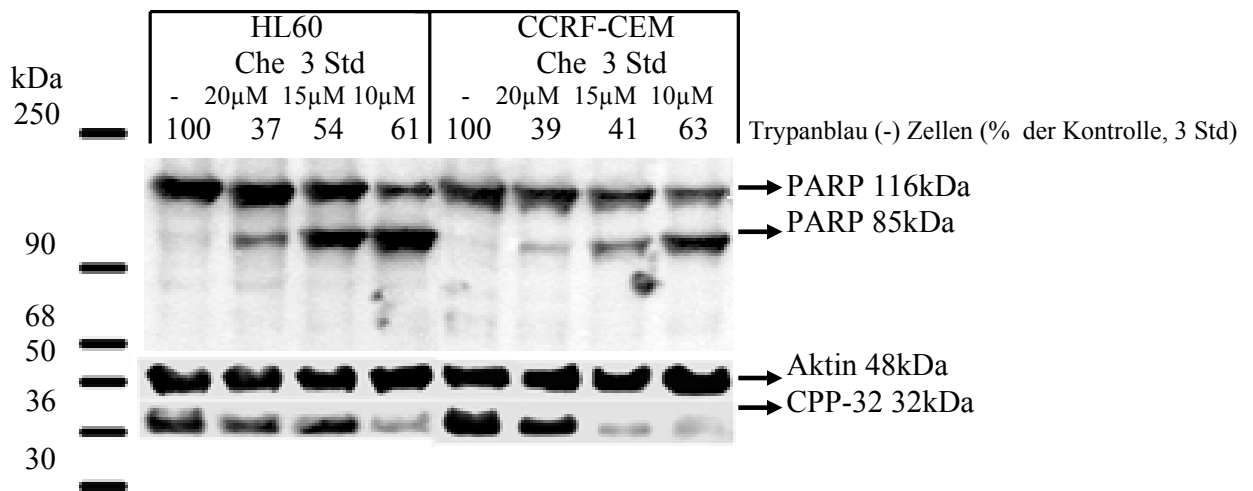


Abbildung 7 (fortgesetzt).

Wir zeichnen einen bis zu 4-fachen Anstieg des MMPs in CCRF-CEM-Zellen nach der Behandlung mit 10µM Che für 3 Stunden auf. Einsatz des mitochondrialen Entkopplers

FCCP sowie von zVAD hoben die Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials partiell auf. Wie oben beschrieben, verursachte ATA ein Fluoreszenzquenching (Tabelle 2).

JC-1 Fluoreszenz, in % der Kontrolle

Modulatoren	Keine	+FCCP 20µM	+FCCP 4µM	+zVAD 50µM	+ATA 500µM
Induktoren					
Che 10µM	394,9±12,3	251,3±9*	256,3±2,8*	272,6±7,9*	58,4±7,2
Sts 300nM	133,4±9,4	141,6±7,8	133,2±6,2	130,7±5,3	43,6±4,2

Tabelle 2. Relative Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in CCRF-CEM-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Che oder Behandlung mit Sts für 6 Stunden mit und ohne Einsatz von Modulatoren. Statistisch signifikante ($p < 0,05$) Senkung der durch Che induzierten Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials durch angewendete Inhibitoren wird mit „*“ bezeichnet.

Abbildung 8. Proteolytische Spaltung von PARP nach 3-stündiger Behandlung von HL-60 und CCRF-CEM-Zellen mit Che (A und B entsprechend) oder Inkubation der CCRF-CEM-Zellen mit Sts für 6 Stunden (C) mit und ohne Zugabe der Modulatoren FCCP, zVAD oder ATA. Aktin diente als interner Standard, um festzustellen, daß in jeder Probe gleiche Mengen an Protein aufs Gel aufgetragen wurden. Der relative Anteil der Trypanblau-negativen (vitalen) Zellen wurde oberhalb der jeweiligen Spur dargestellt.

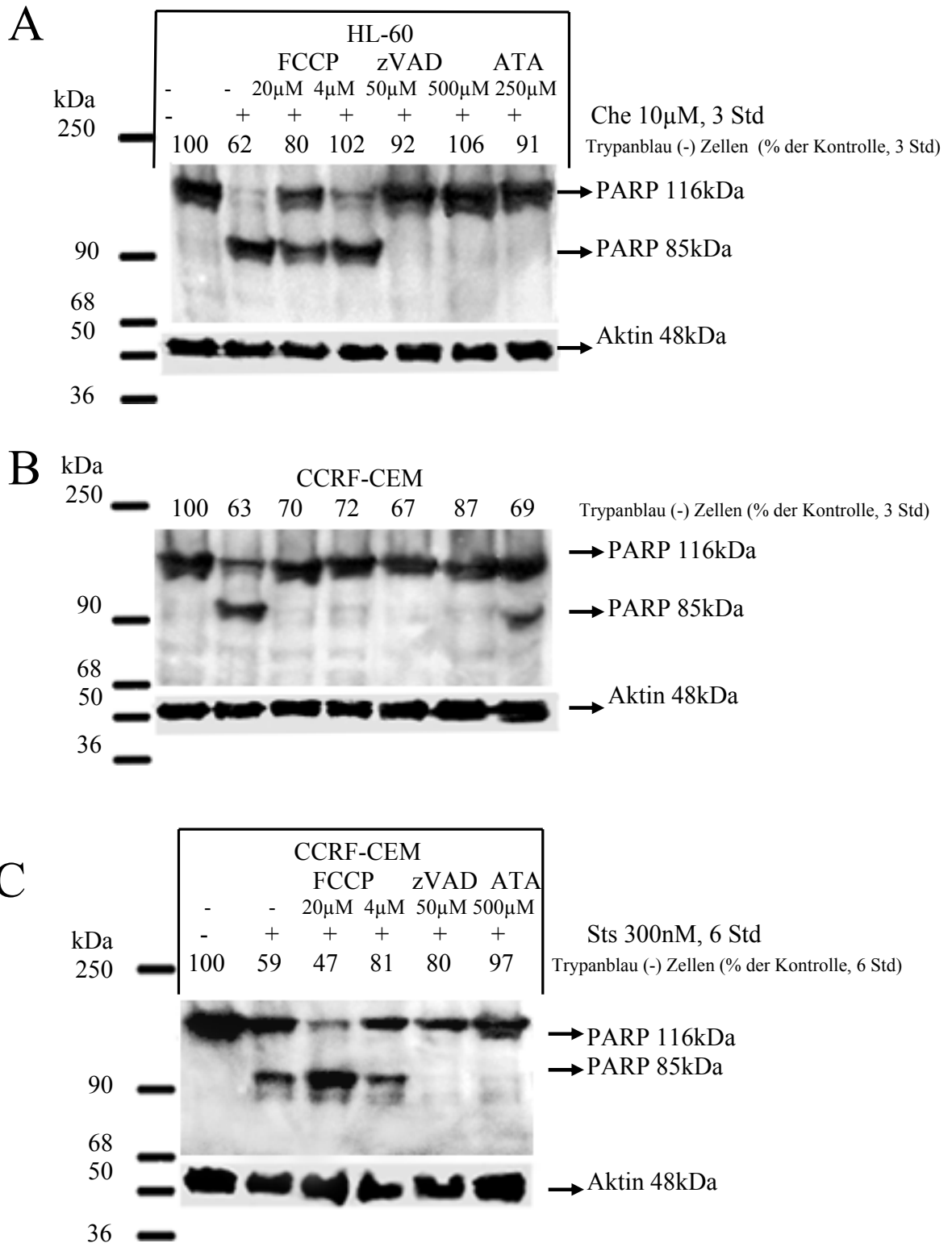
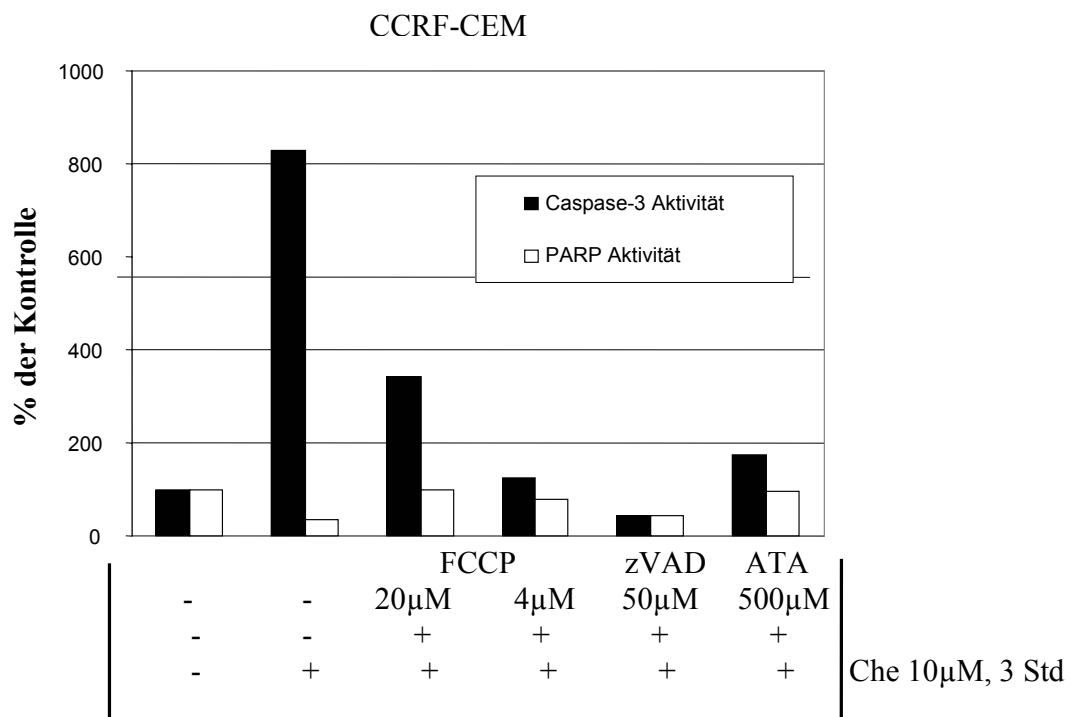


Abbildung 8 (fortgesetzt).

Abbildung 9. Relative Veränderungen der Aktivität von Caspase-3 und PARP in CCRF-CEM-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Che mit oder ohne Einsatz von Apoptosehemmer FCCP, zVAD und ATA. Das vorgestellte Diagramm stellt einen repräsentativen Versuch von insgesamt drei Experimenten dar.



Eine 3-stündige Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Che resultierte in einem ca. 8-fachen Aktivitätsanstieg der Caspase-3, gemessen im Zellysatz. Die eingesetzten Modulatoren waren in der Lage, der Erhöhung der Caspase-Aktivität durch Che entgegenzuwirken. Dennoch waren die Aktivitätswerte nach Vorinkubation mit FCCP bzw. ATA um das 1,5-3-fache erhöht, verglichen mit der Aktivität in den Kontrollzellen. Im Gegensatz zur Caspase-3, führte die Exposition der CCRF-CEM-Zellen mit Che zu

einem mehr als 2-fachen Abfall der PARP-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Eine Vorbehandlung der Zellen mit FCCP, ATA, nicht aber mit zVAD führte zur partiellen Wiederherstellung der Aktivität von PARP.

Die Inkubation von HL-60- und CCRF-CEM-Zellen mit 10 μ M Che für 3 Stunden führte zum Abfall des intrazellulären NAD⁺-, NADH- und ATP-Gehaltes um mehr als 70% des jeweiligen Kontrollwertes in beiden Zelllinien. Während die Absenkung des ATP-Gehaltes in HL-60-Zellen besonders ausgeprägt war, stand bei CCRF-CEM-Zellen der Abfall der Pyridin-Nukleotide NAD⁺, NADH und NADPH im Vordergrund. NADP⁺ ließ sich in den Kontrollzellen beider Zelllinien nicht detektieren. Eine gleichzeitige Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen von FCCP (20 und 4 μ M) bzw. 50 μ M zVAD verhinderte teilweise die in HL-60 und CCRF-CEM-Zellen durch Chelerythrin ausgelöste Reduktion des intrazellulären ATP-, NAD⁺-, NADPH-Gehaltes, nicht jedoch die von NADH.

Nur die Zugabe von 500 μ M ATA war in beiden untersuchten Zelllinien in der Lage, sowohl den intrazellulären NAD⁺-, NADH-, NADPH- als auch den ATP-Spiegel aufrechtzuerhalten (Abbildung 10).

Abbildung 10. Veränderungen des intrazellulären NAD⁺-, NADH-, NADPH- und ATP-Gehaltes nach der Exposition der HL-60 (A) und CCRF-CEM-Zellen (B) zu Che mit oder ohne Einsatz von Modulatoren für 3 Stunden. Die im Diagramm vorgestellten Daten ergaben sich aus dem Mittelwert von drei verschiedenen Experimenten, jeweils zweifach gemessen.

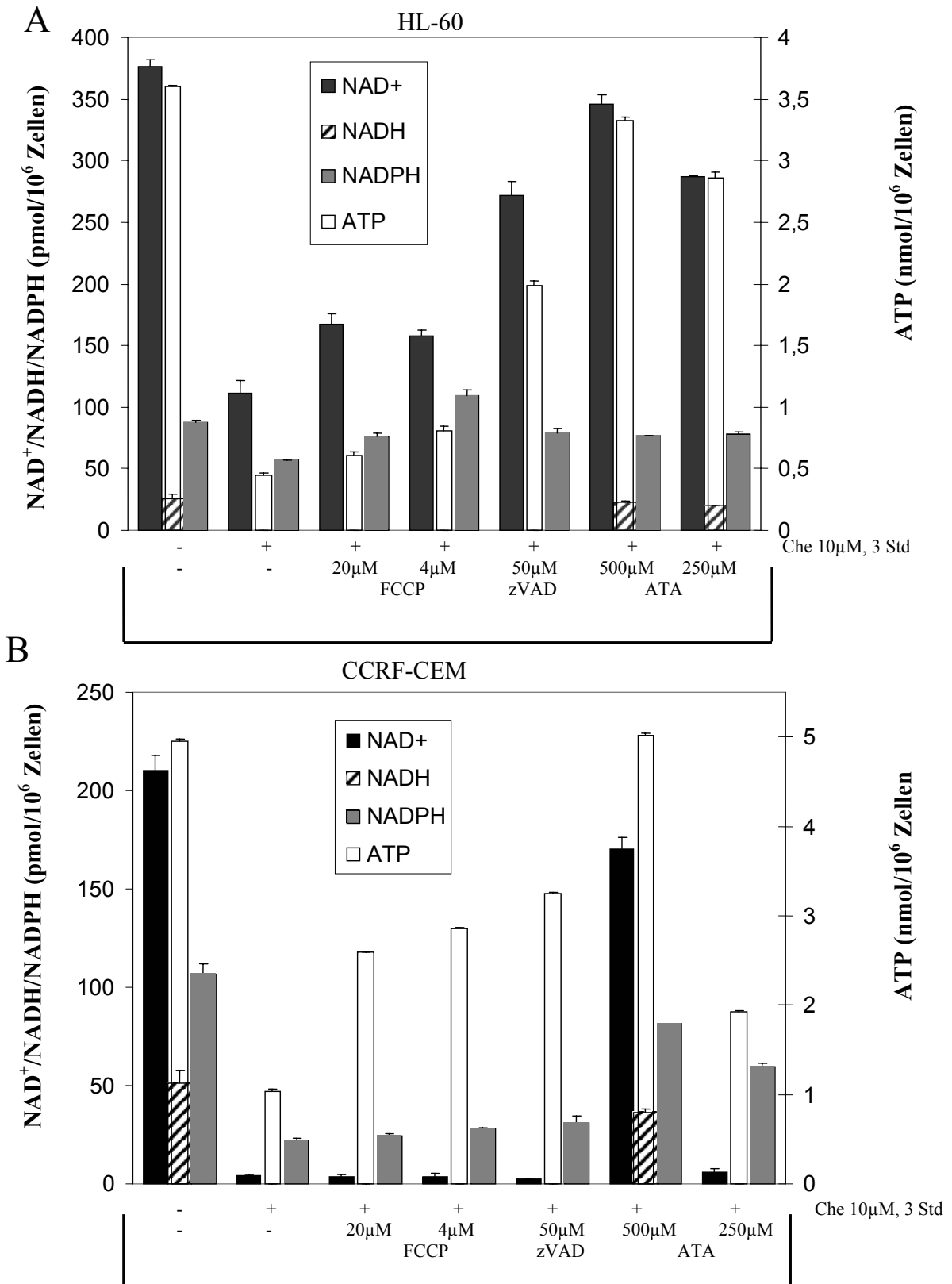


Abbildung 10 (fortgesetzt).

5. Diskussion

In dieser Studie konnte demonstriert werden, daß der mitochondriale Entkoppler FCCP in der Lage war, den verzögerten Zelltod in Leukämiezelllinien sowohl myeloischer (HL-60) als auch lymphatischer Herkunft (CCRF-CEM) konzentrationsabhängig zu induzieren. Die Zeitkinetik der FCCP-induzierten zytotoxischen Veränderungen über 24 Stunden wurde mit Hilfe des Annexin V/PI-Tests erfaßt. Weitere molekularbiochemische Untersuchungen charakterisierten den durch mitochondrialen Entkoppler ausgelösten Zelltod als apoptotisch: das verspätete Auftreten Annexin V-positiver Zellen (zwölf Stunden nach Behandlungsbeginn) wurde bei erhaltener Integrität der Zellmembran festgestellt. Desweiteren konnte die für den apoptotischen Zelltod typische proteolytische Spaltung der Caspase-3-Substrate, nämlich PARP und CPP-32 (Procaspase-3), nach 24-stündiger Wirkung von FCCP im Westernblot demonstriert werden. Nach heutigem Kenntnisstand ist es erstmalig gelungen, FCCP-induzierte Apoptose in hämatopoetischen Zellen nachzuweisen, während diese bei einer neuronalen Phäochromozytom-Zelllinie PC12 bereits durch eine andere Forschungsgruppe gezeigt werden konnte.

In den beschriebenen Experimenten war die durch mitochondriale Entkoppler induzierte Apoptose durch große DNA-Fragmente (15-40 kbp) gekennzeichnet; die apoptosetypische oligonukleosomale DNA-Fragmentierung (180-200 bp) konnte nicht nachgewiesen werden. Ein ähnliches Phänomen wurde für verschiedene Zelllinien nach Exposition mit Etoposid beschrieben (77). Die Gründe für diese „inkomplette“ DNA-Spaltung sind unklar. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der apoptotischen Antwort und der Größe der gebildeten DNA-Fragmente konnte nicht gefunden werden (74).

Die durch den Entzug von FCS ausgelöste Verschlechterung der Inkubationsbedingungen führte zum erhöhten Ansprechen beider Leukämiezelllinien auf FCCP im Sinne einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Zum einen konnten im FCS-freien Milieu eine erhöhte Anzahl apoptotischer bzw. toter Zellen nach Einwirkung der bereits unter herkömmlichen Inkubationsbedingungen (RPMI-1640+10% FCS) apoptoseauslösenden Konzentrationen von FCCP (10 und 20 µM) im FACS mit Annexin V detektiert werden. Zum anderen reichte eine niedrigere, im Inkubationsmedium mit 10% FCS normalerweise nicht toxische Konzentration von FCCP (4 µM) aus, um den

programmierten Zelltod zu induzieren. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, daß die für den Zellschutz gegen proapoptotische Noxen notwendigen Serumfaktoren, wie Zytokine (Interleukine, Interferone), Wachstumsfaktoren, o. ä., unter FCS-freien Bedingungen fehlen. Alternativ käme ein Anstieg der effektiven Konzentration des mitochondrialen Entkopplers in Betracht, da FCCP unter serumfreien Bedingungen nicht an die im FCS vorhandenen Albumine binden kann. Diese Bindung könnte auf dieselbe Weise erfolgen, wie manche Medikamente und Hormone (Thyroxin, nichtsteroidale Antiphlogistika, Herzglykoside, Beta-Blocker usw.) mit humanem Serumalbumin in vivo interagieren.

HL-60-Zellen zeigten insgesamt eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der durch FCCP induzierten Apoptose als CCRF-CEM-Zellen: die Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, messbar mit dem Annexin V-Test, fand in dieser Zelllinie zeitlich etwas früher statt als in CCRF-CEM-Zellen. Außerdem war der Grad der Sensitivierung der HL-60-Zellen gegenüber mitochondrialem Entkoppler nach dem Entzug von FCS aus dem Inkubationsmedium höher als bei der CCRF-CEM-Zelllinie (Abbildung 3 C, D). Ferner waren die biochemischen Anzeichen von Apoptose in der untersuchten myeloischen Zelllinie stärker ausgeprägt als in der lymphatischen: ein größerer Anteil der genomischen DNA wurde fragmentiert, die Abnahme der ungespaltenen Caspase-3-Substrate PARP und CPP-32 (Procaspase-3) waren im Westernblot ebenfalls deutlicher zu sehen (Abbildung 4). Eine Erklärung für die festgestellten zelllinienabhängigen Unterschiede wäre, daß Zelllinien des lymphozytären Ursprungs, wie zum Beispiel die CCRF-CEM, einen erheblichen Energieanteil durch anaerobe Glykolyse gewinnen könnten, und nicht in dem Maße auf oxidative Phosphorylierung angewiesen sind wie die malignen Promyelozyten (HL-60). Es ist auch bekannt, daß HL-60-Zellen in der Lage sind, eine schnelle und ausgeprägte apoptotische Antwort auf verschiedene Stimuli zu produzieren, sogar auf Substanzen, die in anderen Zelllinien keine Apoptose, sondern eine Nekrose auslösen, wie zum Beispiel MNNG (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidinium) (58).

Bemerkenswert sind die gegensätzlichen Veränderungen des MMPs in den von uns untersuchten Leukämiezelllinien: in CCRF-CEM-Zellen kam es nach der Behandlung mit dem mitochondrialen Entkoppler zur erhöhten Aufnahme des Farbstoffs JC-1 in die

Mitochondrien. Einem Anstieg des MMPs entsprach die Verschiebung der JC-1-Fluoreszenz vom grünen (FL1) in den orangen (FL2) Fluoreszenzkanal. In HL-60-Zellen dagegen wurde eine konzentrationsabhängige Senkung des MMPs nach der Exposition mit FCCP verzeichnet. Auch in der Leukämiezelllinie K562 (Blastenkrise der chronisch myeloischen Leukämie) konnte in Vorversuchen ebenfalls ein Anstieg des MMPs in Konzentrationen von FCCP bis zu 50 μ M bereits nach zweistündiger Behandlung der Zellen beobachtet werden. Möglicherweise spielt hierbei eine Mobilisation zelleigener Gegenregulationsmechanismen in CCRF-CEM-Zellen (Ionenpumpen?) eine Rolle, die eine Steigerung des MMPs trotz der Aufhebung des Protonengradienten durch FCCP hervorrufen könnten. Darüberhinaus unterschied sich die von uns entwickelte Methode der MMP-Meßdatenauswertung etwas von der Methode anderer Autoren. So kommt es im Verlauf des programmierten Zelltodes zu Veränderungen der Zellmorphologie und des Zellvolumens. Dabei fällt die Forwärtlichtstreuung der Zellpartikel (FSC) ab und die Seitwärtlichtstreuung (SSC) steigt an, was bei der entsprechenden Dot Plot-Darstellung (FSC auf der x-Achse, SSC auf der y-Achse) als eine Verschiebung der Zellpopulationswolke nach links oben beobachtet werden kann. Deswegen wurde bei der Messung des MMPs die lebende Zellpopulation mit hohem FSC und niedrigem SSC in der unbehandelten Kontrollprobe durch Gating ausgegrenzt, das Gate in den mit Apoptoseinduktoren und Modulatoren behandelten Proben blieb unverändert und das MMP in dieser Subpopulation wurde mittels eines Histogramms quantifiziert. Die Veränderungen des MMPs in den behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen konnten mit Hilfe der verwendeten Auswertemethode im direkten Vergleich mit der konventionellen Vorgehensweise besser erfasst werden (53).

Als nächstes wurde untersucht, ob FCCP den Verlauf des durch andere proapoptische Substanzen induzierten, verzögerten Zelltodes modulieren könnte. Für die Kombinationsbehandlung der CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit mitochondrialem Entkoppler haben wir zwei verschiedene Serin/Threoninproteinkinasehemmer Che und Sts ausgewählt. Diese Substanzen zeigten eine rapide Kinetik der apoptotischen Veränderungen (mehr als 70% der Zellen waren innerhalb von 6 Stunden nach dem Behandlungsbeginn mit Che oder Sts apoptotisch). Im Gegensatz zu der durch FCCP induzierten Apoptose wiesen die lymphatischen CCRF-CEM-Zellen eine deutlich höhere

Sensitivität gegenüber dem Proteinkinase C-Inhibitor Che auf. Die Serin/Threonin-Proteinkinase-Inhibitoren induzierten außerdem eine apoptosetypische, oligonukleosomale DNA-Fragmentation, eine Caspase-3-abhängige Spaltung von PARP, sowie einen 4- bis 10-fachen Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Die ausgebliebene Aktivierung von PARP nach der Inkubation der CCRF-CEM-Zellen mit Che zeigte, daß diese Substanz nicht in der Lage war, DNA-Strangbrüche zu produzieren (Abbildung 7). Während Che die α - und β -Isoformen der Proteinkinase C spezifisch inhibierte, ist Sts, ursprünglich auch als ein Hemmer der Proteinkinase C beschrieben, als ein starker aber unspezifischer Inhibitor mehrerer Serin/Threonin-Proteinkinasen bekannt. Trotz dieser geringeren Selektivität wird der Sts-induzierte programmierte Zelltod in verschiedenen Modellsystemen als klassisch angesehen (21).

Überraschenderweise konnten wir feststellen, daß eine Vorbehandlung mit FCCP die durch Che und Sts ausgelöste Apoptose in CCRF-CEM-Zellen verzögerte. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein: eine protektive Wirkung von FCCP auf TNF- α -induzierte Apoptose wurde bereits beschrieben (62). Der protektive Effekt von FCCP auf den durch Exposition mit den Serin/Threonin-Proteinkinasehemmern Che und Sts ausgelösten Zelltod war zelllinienabhängig: in HL-60-Zellen wurde keine Aufhebung des verzögerten Zelltodes bei der Koinkubation von FCCP mit Che festgestellt. Dennoch konnte mittels Westernblot eine Verzögerung der proteolytischen Spaltung von PARP nach Einwirkung von Che auf HL-60-Zellen nach Vorbehandlung mit dem mitochondrialen Entkoppler festgestellt werden. Es wurde auch gezeigt, daß die, durch eine Pre-Inkubation mit FCCP bedingte protektive Wirkung auf die Che-induzierte Apoptose stärker ausgeprägt war als auf den Zelltod, ausgelöst durch Sts. Höhere Konzentrationen von FCCP (20 μ M gegenüber 4 μ M bei Che) waren erforderlich, um den apoptosehemmenden Effekt in CCRF-CEM-Zellen auf den durch Sts ausgelösten programmierten Zelltod zu erreichen. In Gegensatz zur Apoptose, induziert mit Che, wurde während der Kombinationsbehandlung mit FCCP und Sts keine Verzögerung der Caspase-3-abhängigen Spaltung von PARP beobachtet. Die Bildung der für den apoptotischen Zelltod charakteristischen DNA-Leiter wurde jedoch durch 20 μ M FCCP verhindert (Abbildung 6).

Der Inhibitor der Caspasen zVAD zeigte im Vergleich zu FCCP eine schwächere Hemmung der durch Sts und Che induzierten Apoptose. Eine statistisch signifikante Steigerung des zellulären Überlebens nach der Vorbehandlung mit zVAD konnte lediglich nach der Induktion der Apoptose durch FCCP in HL-60-, nicht aber in der CCRF-CEM-Zelllinie demonstriert werden. Eine komplette Hemmung der Caspase-3, sowie eine Verhinderung der oligonukleosomalen DNA-Degradation und der Caspase-3-abhängigen Proteolyse wurde dennoch in beiden untersuchten Zelllinien nach Einwirkung von allen eingesetzten Apoptoseinduktoren in den mit zVAD vorbehandelten Zellen festgestellt. Ein spezifischer Inhibitor der Caspase-3, z-DEVD-FMK, besaß eine ähnlich moderate protektive Wirkung nach Exposition der CCRF-CEM-Zellen mit Che oder Sts, wie der unspezifische Caspasen-Hemmer zVAD. Die Fas-induzierte Apoptose in Leukämiezellen (Anti-Fas IgM (CH11), 10 µg/ml) wurde durch den Einsatz von zVAD komplett inhibiert, was für eine antiapoptotische Aktivität des eingesetzten Peptids in den Caspase-abhängigen apoptotischen Signaltransduktionswegen spricht. Einige Autoren (32) beschrieben einen apoptosehemmenden Effekt von zVAD auf den durch Sts-induzierten verzögerten Zelltod in SV40-transformierten menschlichen Fibroblasten (GM701-Zelllinie), SKW 6.4- und CHO-Zellen. Weil et al. (72) dagegen berichteten, daß zVAD das Auftreten des programmierten Zelltodes nach der Behandlung mit Sts in der embryonalen Mauszelllinie E13, nicht aber in vierzelligen Mäusemryonen verhindern konnte.

Die antiapoptotischen Eigenschaften von ATA sind in verschiedenen Modellsystemen von mehreren Forschungsgruppen untersucht worden (53). Im Gegensatz zum mitochondrialen Entkoppler und Caspasen-Hemmern, die den durch die Serin/Threonin-Proteinkinasehemmer Che und Sts induzierten Zelltod nicht verhinderten, sondern lediglich verzögerten, wurde sowohl Apoptose als auch die Depletion der Redox-Äquivalente in den mit hohen ATA-Konzentrationen (500 µM) vorbehandelten Leukämiezellen nach der Inkubation mit Che und Sts gar nicht ausgelöst. Eine Vorbehandlung der CCRF-CEM-Zellen mit niedrigen Konzentrationen von ATA (250 µM) eine Stunde vor dem Behandlungsbeginn mit Che induzierte dagegen eine deutliche Verzögerung des Zelltodes (um mehr als 24 Stunden) sowie eine partielle Wiederherstellung des intrazellulären NAD⁺-Pools, analog dem kürzlich beschriebenen

protektiven Effekt des PARP-Hemmers 3-Aminobenzamid auf die mit Ricin induzierte Apoptose (39). ATA ist eine Substanz mit breitem Wirkungsspektrum: neben der Hemmung von Enzymen, die am Vollzug des apoptotischen Programms teilnehmen, wie der Ca^{2+} - Mg^{2+} -Endonuklease und der Topoisomerase II, stimuliert diese Substanz auch die Phosphorylierung von Tyrosin durch Tyrosinkinasen. Diese Kinasen interferieren anscheinend nach Stimulation durch ATA mit den durch Che und Sts aktivierbaren Signalübertragungswegen stromaufwärts von Caspasen. Diese sind bei der intakten apoptotischen Maschinerie für die Auslösung der apoptotischen Kaskade verantwortlich. Das ist eine mögliche Erklärung, weshalb ATA nur die durch Kinaseinhibitoren ausgelöste Apoptose und nicht den durch mitochondriale Entkoppler induzierten Zelltod verhindern kann. Die durch ATA stimulierten Kinasen spielen anscheinend eine eher untergeordnete Rolle bei denjenigen intermolekularen Interaktionen, welche durch mitochondriale Entkoppler aktiviert werden und in den betroffenen Zellen Apoptose auslösen.

In beiden von uns untersuchten haematopoetischen Zelllinien haben wir drei charakteristische Merkmale der durch Che induzierten Apoptose festgestellt. Erstens, der mit Che induzierte verzögerte Zelltod ging mit einer starken Verminderung des intrazellulären NAD^+ -, NADH -, NADPH - sowie ATP-Gehaltes einher. Dieses Phänomen war in der CCRF-CEM-Zelllinie besonders ausgeprägt. Die beschriebenen Veränderungen waren bereits drei Stunden nach dem Behandlungsbeginn mit Che feststellbar. Zweitens, die eingesetzten Che-Konzentrationen korrelierten direkt mit dem mittels Trypanblaufärbung quantifizierten Zelltod, wiesen dagegen eine umgekehrte Korrelation mit der mittels Westernblot dargestellten Menge des gespaltenen PARP-Moleküls auf (Abbildung 7). Drittens, die nach der Exposition mit Che gestorbenen Zellen zeigten keine für den apoptotischen Zelltod typische Fragmentierung der Zellkerne. Dieser Befund wurde fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe der Hoechst 33342 Färbung demonstriert, insbesondere wenn höhere Konzentrationen von Che ($>10 \mu\text{M}$) eingesetzt wurden. Zusammengefaßt führte die Behandlung der Leukämiezellen mit Che zur Aktivierung der Caspase-3 und zum konsekutiven Vollzug des apoptotischen Programms. Desweiteren war Che in der Lage, parallel zur Induktion von Apoptose die Energieäquivalente in beiden Zelllinien zu depletieren, was zum Zelltod durch Nekrose

föhrte. Dies könnte erklären, weshalb die antiapoptotischen Effekte von zVAD and FCCP nicht ausreichend waren, um das berleben der von uns untersuchten Zellen zu verlängern. Der Mechanismus, wie Che die NAD⁺-Depletion in haematopoetischen Zellen auslöst, bleibt ungeklärt. Es ist aber bekannt, daß einige alkylierende Substanzen wie 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin (MNNG) (58), Temozolomid (68), sowie Wasserstoffperoxid (70), Purinanaloga (57) und Ricin (39) den verzögerten Zelltod durch eine Aktivierung von PARP und den darauffolgenden überschüssigen Verbrauch von NAD⁺ induzieren. Die NAD⁺-Depletion, die nach der Behandlung mit Che festgestellt wurde, konnte jedoch nicht durch eine erhöhte PARP-Aktivität ausgelöst werden. Erstens, konnten wir keine Aktivierung von PARP nach der Inkubation der CCRF-CEM-Zellen mit Che feststellen (Abbildung 7), und zweitens resultierte die Vorbehandlung der HL-60- und CCRF-CEM-Zellen mit dem PARP-Hemmer 3-Aminobenzamid weder im langfristigen Schutz der Zellen vor dem Che-induzierten apoptotischen Zelltod, noch in einem signifikanten Einfluß auf die Kinetik der apoptotischen Veränderungen. Diese Daten deuten darauf hin, daß Che in der Lage war, einen weiteren, PARP-unabhängigen Signaltransduktionsweg zu aktivieren, der zu einem erhöhten NAD⁺- und ATP-Verbrauch führt. Es ist eher unwahrscheinlich, daß die NAD(PH)-Depletion in Leukämiezellen nach Einwirkung von Che aufgrund einer Störung der - unter normalen Bedingungen eher langsam ablaufenden - NAD⁺-Synthese aus Nikotinamid und ATP entsteht, da der Abfall des intrazellulären Gehaltes an Pyridin-Nukleotiden rasch, d. h. innerhalb von Minuten, auftritt und regelmäßig von einer ATP-Depletion begleitet wird. Der Wirkungsmechanismus von FCCP ist unklar, obwohl offensichtlich ist, daß alle biochemischen Merkmale der durch Che ausgelösten Apoptose in CCRF-CEM-Zellen nach der Vorbehandlung mit mitochondrialem Entkoppler verhindert oder zumindest attenuiert wurden.

Es kann nicht davon ausgegangen werden, daß die zytoprotektive Wirkung von FCCP auf die bisher noch nicht beschriebenen nicht-mitochondrialen Effekte von FCCP zurückzuführen ist. Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP), ein mitochondrialer Entkoppler mit einer ähnlichen chemischen Struktur wie FCCP, sowie Atraktulosid, ein Inhibitor des mitochondrialen Enzyms ADP-ATP-Translokase, zeigten in Vorversuchen ähnliche apoptosehemmende Eigenschaften wie FCCP nach der

Inkubation der CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit Che bzw. dem Ara-C-Analogon Gemzytabin. Durch weitere Experimente wurde demonstriert, daß FCCP keinen Einfluß auf die Caspase-3-, PARP-Aktivität und die intrazelluläre Bcl-2-Expression hat. Ein weiterer möglicher Mechanismus der protektiven Wirkung von mitochondrialem Entkoppler wäre eine Verhinderung der NAD⁺-, NADPH- und ATP-Depletion in Leukämiezellen, da die intrazelluläre NAD⁺-, NADPH-, ATP-, nicht aber die NADH-Depletion nach der Inkubation mit Che in FCCP-vorbehandelten Zelllinien unabhängig partiell verhindert wurde. Außerdem war die beste protektive Wirkung von FCCP in CCRF-CEM-Zellen zu beobachten, wo die NAD(PH)-Depletion, verglichen mit HL-60-Zellen, ausgeprägter war.

Einige Forscher berichteten, daß die verschlechterte mitochondriale Funktion und FCCP selbst einige antiapoptotische Signaltransduktionsfaktoren, wie NF-κB und verschiedene Kinasen aktivieren können (34).

Die MMP-Veränderungen in den von uns untersuchten Leukämiezelllinien nach der Behandlung mit Che verhielten sich ähnlich, wie nach Inkubation mit FCCP bereits oben beschrieben wurde: in CCRF-CEM-Zellen kam es zum Anstieg des MMPs, während in HL-60-Zellen eine Senkung des MMPs nach Einwirkung von Che verzeichnet wurde. Die gegensätzlichen Veränderungen des MMPs in zwei von uns untersuchten Leukämiezelllinien scheinen ein Zelllinien-, nicht jedoch ein induktorabhängiges Ereignis zu sein. Zudem war der Inhibitor der „permeability transition“-Pore, Cyclosporin A (10 µM), nicht in der Lage, die mit dem Topoisomerase II-Hemmer Etoposid induzierte Apoptose zu blockieren. Diese Resultate weisen darauf hin, daß dem „permeability transition“-Phänomen eine eher untergeordnete Bedeutung während des Vollzugs des apoptotischen Programms beigemessen werden kann. Es wird sogar spekuliert, daß durch einen Einfluß auf die Funktion der mitochondrialen Atmungskette gewisse, bis jetzt nicht genau identifizierte Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika aktiviert werden können.

6. Zusammenfassung

Es ist mittlerweile unbestritten, dass Mitochondrien eine zentrale Rolle beim Vollzug des apoptotischen Programms zumindest bei diversen „death-receptor“-unabhängigen Arten

des verzögerten Zelltodes spielen. Die Freisetzung bestimmter mitochondrialer membrangebundener Proteine wie Zytocrom C, Smac (DIABLO) oder AIF löst die Bildung eines oligomeren Komplexes im Zytoplasma aus, infolgedessen zelluläre apoptosespezifische Proteasen (Caspasen) aktiviert werden. Dieses Phänomen wird generell als „point of no return“ im Verlauf der Apoptose betrachtet. Mitochondrien sind gleichzeitig der Hauptentstehungsort für freie Radikale und die prädominante Lokalisationsstelle für Enzyme mit antioxidativer Funktion wie Glutathionreduktase, Thioredoxinreduktase, Phospholipid Hydroperoxid Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase. Es wurde gezeigt, dass ein wichtiges Antionkogen p53 nach Einwirkung proapoptotischer Stimuli den Zellkern verlässt und in die Mitochondrien importiert wird. Den überwiegend in den Mitochondrien lokalisierten Membranproteinen der Bcl-2-Familie wird eine besonders kritische Bedeutung beim Schutz der Zelle gegen den apoptotischen Zelltod beigemessen. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Proteine ist *bis dato* unbekannt. Sie sind aber in der Lage, in der mitochondrialen Membran Kanäle zu bilden und dadurch den funktionellen Veränderungen in den Mitochondrien im Verlauf der Apoptose entgegenzuwirken. Eine Störung des mitochondrialen Elektronentransports und die Öffnung der sogenannten „permeability transition“-Pore sind als frühe Ereignisse im Verlauf des apoptotischen Zelltodes bekannt. Der Entkoppler mitochondrialer Atmung und Phosphorylierung, FCCP, verursacht durch eine Erhöhung der Permeabilität der inneren mitochondrialen Membran für Protonen ähnliche Störungen der mitochondrialen Funktion.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt des mitochondrialen Entkopplers FCCP alleine oder in Kombination mit bekannten Apoptoseinduktoren, wie dem Proteinkinase C-Inhibitor Che und dem Serin/Threonin-Proteinkinasehemmer Sts zu untersuchen. Desweiteren sollten biochemische Mechanismen aufgeklärt werden, die der Modulation der Apoptose durch FCCP in Leukämiezelllinien des lymphatischen (CCRF-CEM) und myeloischen (HL-60) Ursprungs zugrunde liegen. Der Effekt mitochondrialer Entkoppler auf die durch Che und Sts induzierte Apoptose sollte ausserdem mit der Wirkung bekannter Modulatoren des programmierten Zelltodes wie Caspasehemmer zVAD und $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -Endonuklease-Inhibitor ATA in gleichem Modellsystem verglichen werden, um weitere Hinweise über die Stärke und Dauer der apoptosemodulierenden Wirkung von FCCP zu

erhalten. Die durchgeführten *in vitro* Zellkulturuntersuchungen zeigten, dass eine Inkubation der CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit FCCP dosisabhängig den verzögerten Zelltod in beiden Leukämiezelllinien induzierte. Im FCS-haltigen Zellkulturmedium wurde in beiden Zelllinien eine Apoptose nach 18-stündiger Behandlung mit 4 μM FCCP in 25% der Population beobachtet. 50% der HL-60-Zellen und 85% der CCRF-CEM-Zellen waren apoptotisch oder tot, wenn 20 μM FCCP über einen Zeitraum von 18 Stunden eingesetzt wurden. Ein FCS-Entzug resultierte in der Sensibilisierung der CCRF-CEM- und HL-60-Zelllinien gegenüber FCCP: mehr als die Hälfte der Population in beiden Leukämiezelllinien waren bereits 12 Stunden nach Behandlungsbeginn mit FCCP apoptotisch bzw. tot. Die im Westernblot demonstrierte Caspase-3-abhängige proteolytische Spaltung von PARP, sowie die Reduktion des intrazellulären CPP-32-Spiegels (Procaspase-3) zeigte sich bereits 6 Stunden nach Behandlungsbeginn mit FCCP, statt, verglichen mit 24 Stunden unter normalen Inkubationsbedingungen.

Im Verlauf der durch FCCP induzierten Apoptose konnten wir mittels konventioneller DNA-Agarose-Gelelektrophorese keine oligonukleosomale DNA-Fragmentierung (180-200 bp) nachweisen, mit Hilfe der pulsed field-Gelelektrophorese wurden lediglich große DNA-Fragmente (15-40 kbp) aufgezeigt.

Nach zweistündiger Inkubation mit 10 μM Che bzw. achtstündiger Behandlung mit 300 nM Sts starben 90% CCRF-CEM-Zellen, während 60% der HL-60-Zellen nach zweistündiger Einwirkung von Che apoptotisch waren. Überraschenderweise war die proteolytische Spaltung von PARP nach Behandlung beider Zelllinien mit einer niedrigeren Konzentration von Che (10 μM) ausgeprägter als mit der höheren Konzentration des Proteinkinase C-Hemmers (20 μM), obwohl die Anzahl der toten Zellen direkt proportional zur eingesetzten Che-Konzentration war.

Die Zugabe von FCCP bzw. des Caspase-Inhibitors zVAD verzögerten den durch Che und Sts induzierten apoptotischen Zelltod: 20-40% mehr Zellen überlebten innerhalb der ersten sechs Stunden der Inkubation, wenn 4-20 μM FCCP zum Inkubationsmedium zugegeben wurden, während nur 15-20% mehr Zellen bei Zugabe von 50 μM zVAD am Leben blieben. Der protektive Effekt von zVAD und ATA war jedoch nur vorübergehend: sechs Stunden nach Behandlungsbeginn mit Che oder Sts gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied im Überleben der Zellen. Die Vorbehandlung mit

ATA verhinderte komplett eine Apoptose in beiden Zelllinien, so daß diese mindestens einige Tage nach Behandlungsbeginn mit Serin/Threonin-Proteinkinase-Hemmern intakt blieben. Alle eingesetzten Modulatoren hemmten das Auftreten der durch Che bzw. Sts ausgelösten biochemischen Zeichen der Apoptose, wie oligonukleosomale DNA-Degradation, Abfall der PARP-Aktivität und Aktivierung der Caspase-3.

Eine 3-stündige Inkubation der CCRF-CEM- und HL-60-Zellen mit 10 µM Che führte in beiden Zelllinien zu einem deutlichen Abfall der intrazellulären NAD⁺-, NADH-, NADPH- und ATP-Konzentrationen. Insbesondere in der CCRF-CEM-Zelllinie stand die Senkung des intrazellulären Gehaltes an Pyridinnukleotiden im Vordergrund, in den myeloischen HL-60-Zellen war die ATP-Depletion ausgeprägter. Während FCCP oder zVAD den Abfall der Energie- und Redoxäquivalente lediglich partiell verhinderten, war ATA in der Lage, die Depletion von NAD⁺, NADH, NADPH und ATP komplett zu inhibieren. Da FCCP und zVAD lediglich die mit der Apoptose assoziierten biochemischen Phänomene, wie die Aktivierung der Caspase-3 oder der Ca²⁺-Mg²⁺-Endonuklease und nicht die Depletion der Energie- und Redoxäquivalente in Leukämiezellen aufhoben, waren die durch die Einwirkung von Che aufgetretenen Störungen des Energiestoffwechsels ein möglicher Grund, weshalb die protektive Wirkung von FCCP und zVAD nur vorübergehend war.

Diese Daten deuten darauf hin, daß die Behandlung mit dem mitochondrialen Entkoppler FCCP zum apoptotischen Zelltod in CCRF-CEM- und HL-60-Leukämiezelllinien führt. In der Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen wie den Serin/Threonin-Proteinkinasehemmern Che und Sts besitzt FCCP jedoch antiapoptotische Eigenschaften.

7. Literaturverzeichnis

1. Althaus FR, Richter C. ADP-ribosylation of proteins: enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys* 37; 1-125, 1987
2. d'Amours D, Desnoyers S, d'Silva I, Poirier G Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342; 249-268, 1999
3. Appelbaum FR. Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. *Semin Hematol* 36; 401, 1999
4. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281; 1305-1308, 1998
5. Backway KL, McCulloch EA, Chow S, Hedley DW. Relationships between the mitochondrial permeability transition and oxidative stress during Ara-C cytotoxicity. *Cancer Res* 57; 2446-2451, 1997
6. Bain, BJ: *Leukaemia Diagnosis, a Guide to the FAB Classification*. Lippincott, Philadelphia 1990
7. Beck, WT: Mechanisms of multidrug resistance in human tumor cells: The roles of P- glycoprotein, DNA topoisomerase II, and other factors. *Cancer Treatment Reviews* 17; 11, 1990
8. Bennett JM: Classification of the acute leukemias: cytochemical and morphologic considerations. In: P. H. Wiernik, G. P. Canellos, R. A. Kyle, C. A. Schiffer (Hrsg.): *Neoplastic Diseases of the Blood*. Churchill Livingstone, New York, 1991, 169-181
9. Berger NA, Berger SJ, Catino DM, Petzold SJ, Robins RK. Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide and poly(adenosinediphosphoribose) metabolism by the synthetic "C" nucleoside analogs, tiazofurin and selenazofurin. A new strategy for cancer chemotherapy. *J Clin Invest* 75; 702-709, 1985
10. Bernofsky C, Swan M. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* 259; 452-473, 1973
11. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 87; 1710-1717, 1996
12. Boulton S, Kyle S, Durkacz BW Low nicotinamide mononucleotide adenyltransferase activity in a tiazofurin-resistant cell line: effects on NAD metabolism and DNA repair *Br J Cancer* 76; 845-851, 1997

13. Brambilla L, Sestili P, Guidarelli A, Palomba L, Cantoni O. Electron transport-mediated wasteful consumption of NADH promotes the lethal response of U937 cells to tert-Butylhydroperoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 284; 1112-1121, 1998
14. Büchner T, Hiddemann W. Treatment strategies in acute myeloid leukemia (AML). A. First-line chemotherapy. *Blut* 60; 61-70, 1990
15. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens R. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation in intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet* 351; 700-708, 1998
16. Catovsky D. *The Leukemic Cell*, Second edition, Churchill Livingstone, Edinburgh 1991
17. Coppola S, Nosseri C, Maresca V, Ghibelli L. Different basal NAD levels determine opposite effects on H₂O₂-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 221; 462-469, 1995
18. Deckwerth TL, Easton RM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Johnson EM. Placement of the Bcl-2 family member Bax in the death pathway of sympathetic neurons activated by trophic factor deprivation. *Exp Neurol* 152; 150-162, 1998
19. Donato NJ, Perez MJ. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *J Biol. Chem* 273; 5067-72, 1998
20. Finkel E. The mitochondrion. Is it central to apoptosis? *Science* 292; 624-626, 2001
21. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin K-M. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med* 2; 574-577, 1996
22. Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a Bad influence. *Cell* 87; 589-592, 1996
23. Green DR, Reed JC Mitochondria and apoptosis. *Science* 281; 1309-1312, 1998
24. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for Cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274; 1156-63, 1999

25. Guarnieri C, Muscari C, Caldagera CM Free radicals and aging (Emerit E, Chance B, Ed.) Birkhauser Verlag, Basel, pp. 73-77, 1998
26. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 26; 1253-55, 1996
27. Hasegawa J, Kamada S, Kamiike W, Shimizu S, Imazu T, Matsuda H, Tsujimoto Y. Involvement of CPP-32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* 56; 1713-1718, 1996
28. Hedley DW, McCulloch EA. Generation of reactive oxygen intermediates after treatment of blasts of acute myeloblastic leukemia with Cytosine arabinoside: role of bcl-2. *Leukemia* 10; 1143-9, 1996
29. Hoelzer, D, Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. In: Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ (Hrsg.): *Hematology, Basic Principles and Practice*, Churchill Livingstone Inc., New York, 1991, 793-804
30. Huber H, Löffler H, Pastner D. *Diagnostische Hämatologie*, Springer, Stuttgart, 1992
31. Hunot S, Elavell RA. Apoptosis: death of a monopoly? *Science* 292; 865-866, 2001
32. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Role of Ced-3/ICE family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* 133; 1041-1051, 1996
33. Juin P, Tremblais K, LeCabellec MT, Gregoire M, K.Meflah, Valette FM. Potentiation of apoptosis by mitochondria in a Cell-Free System. *Biochem Biophys Res Commun* 253; 185-191, 1998
34. Josse C, Legrand-Poels S, Piret B, Sluse F, Piette J. Impairment of mitochondrial electron chain transport prevents NF-kappa B activation by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 25; 104-112, 1998
35. Kantarjian, H.M. Adult acute lymphocytic leukemia: critical review of current knowledge. *Am J Med* 97; 176-184, 1994
36. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of Poly(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53; 3976-3985, 1993
37. Kehrer JP, Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17; 65-75, 1994

38. Kimura C, Zhao QL, Kondo T, Amatsu M, Fujiwara Y. Mechanism of UV-induced apoptosis in human leukemia cells: roles of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease, caspase-3, and stress-activated protein kinases. *Exp Cell Res* 239; 411-422, 1998
39. Komatsu N, Nakagawa M, Oda T, Muramatsu T Depletion of Intracellular NAD^+ and ATP Levels during ricin-induced apoptosis through the Specific Ribosomal Inactivation Results in the Cytolysis of U937 Cells *J Biochem* 128; 463-470, 2000
40. Lampert F, Harbott J, Ritterbach J. Karyotypes in acute childhood leukemias may lose prognosis significance with more intensive and specific chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 54: 277, 1991
41. Lazebnik LA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE *Nature* 371; 346-347, 1994
42. Lo Coco, F., Diverio, D., D'Adamo, F. PML/RAR- α rearrangement in acute promyelocytic leukemias apparently lacking the t(15;17) translocation. *Eur J Hematol* 48; 173-176, 1992
43. Luo D, Cheng SC, Xie Y. Expression of Bcl-2 family proteins during chemotherapeutic agents-induced apoptosis in the hepatoblastoma HepG2 cell line. *Br J Biomed Sci* 56; 114-22, 1999
44. Maellaro E, Del Bello B, Comporti M. Protection by ascorbate against apoptosis of thymocytes: implications of ascorbate-induced nonlethal oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation *Exp Cell Res* 226; 105-113, 1996
45. Magni G, Amici A, Emanuelli M, Raffaelli N. Enzymology of NAD^+ synthesis. In: (DL Purich, Ed.) *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, Vol. 73: Mechanism of enzyme action, pp. 135-182, 1999
46. Martin DS, Bertino JR, Koutcher JA. ATP depletion+pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Res* 60; 6776-6783, 2000
47. Matsunaga T, Kudo J, Takahashi K, Dohmen K, Hayashida K, Okamura S, Ishibashi H, Niho Y. Rotenone, a mitochondrial NADH dehydrogenase inhibitor, induces cell surface expression of CD13 and CD38 and apoptosis in HL-60 cells. *Leuk Lymphoma* 20; 487-494, 1996
48. Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 257; 3747-3753, 1982

49. Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsacopoulou V, Manneble CA, Korsmeyer SJ. A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous Cytochrome C. *EMBO J* 20; 661-671, 2001
50. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* 274; 29294-302, 1999
51. Nossari C, Coppola S, Ghibelli L. Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 212; 367-373, 1994
52. Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and Caspase-9/3 regulated and Fas/Caspase-8 independent. *Cancer Res* 60; 5815-5824, 2000
53. Okada N., Koizumi S. A neuroprotective compound, aurin tricarboxylic acid, stimulates the tyrosine phosphorylation cascade in PC12 cells. *J Biochem* 70; 16464-69, 1995
54. Oltvai ZN, Milliman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74; 609-619, 1993
55. Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon M-L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130; 157-167, 1995
56. Petit PX, Susin S-A, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 396; 7-13, 1996
57. Pettitt AR, Sherrington PD, Cawley JC. Role of Poly(ADP-ribosylation) in the killing of chronic lymphocytic leukemia cells by purine analogues. *Cancer Res* 60; 4187-4193, 2000
58. Pogrebniak A, Schemainda I, Pelka-Fleischer R, Nuessler V, Hasmann M. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors transiently protect leukemic cells from apoptosis by three different mechanisms. *Biochimica Biophysica Acta*, Manuscript in revision.
59. Pogrebniak A, Stoetzer OJ, Wilmanns W, Nuessler V. Alterations in mitochondrial membrane potential under influence of apoptosis-inducing substances. In: *Research festival* (Eds. Klein HG and Seidel D) 39-40, 1996

60. Pu Q, Bianchi P, Bezwoda WR. Alkylator resistance in human B lymphoid cell lines: (1). Melphalan accumulation, Cytotoxicity, interstrand-DNA-crosslinks, cell cycle analysis, and glutathione content in the melphalan-sensitive B-lymphocytic cell line (WIL2) and in the melphalan-resistant B-CLL cell line (WSU-CLL). *Anticancer Res* 20; 2561-8, 2000
61. Salvioli S, Dobrucki J, Moretti L, Troiano L, Fernandez MG, Pinti M, Pedrazzi J, Franceschi C, Cossarizza A. Mitochondrial heterogeneity during staurosporine-induced apoptosis in HL60 cells: analysis at single cell and single organelle level. *Cytometry* 40; 189-197, 2000
62. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME, Apoptosis signalling by death receptor. *Eur J Biochem* 254; 439-459, 1998.
63. Sims JL, Berger SJ, Berger NA Effects of nicotinamide on NAD and poly(ADP-ribose) metabolism in DNA-damaged human lymphocytes. *J Supramol Struct Cell Biochem* 16; 281-188, 1981
64. Sievers EL, Appelbaum FR, Speilberger RT, Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamycin immunoconjugate. *Blood* 1999; 93; 3678-3684
65. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares AH, Smulson ME Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose)polymerase in early stages of apoptosis *J Biol Chem* 273; 13703-12, 1998
66. Stötzer OJ, Pogrebniak A, Pelka-Fleischer R, Hasmann M, Hiddemann W, Nüssler V. Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity. *Biochemical pharmacology* 63; 471-83, 2002
67. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease *J Exp Med* 184; 1331-1341, 1996.
68. Tentori L, Orlando L, Lacal PM, Benincasa E, Faraoni I, Bonmassar E, D'Atri S, Graziani G. Inhibition of O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase or poly(ADP-ribose)polymerase increases susceptibility of leukemic cells to apoptosis induced by temozolomide. *Molecular Pharmacol* 52; 249-258, 1997
69. Thraves PJ. Selective isolation of domains of chromatin proximal to both carcinogen-induced DNA damage and poly-adenosine diphosphate-ribosylation. *Cancer Res* 45; 386-391, 1985

70. Watson AJM, Askew JN, Benson RSP. Poly(Adenosine diphosphate ribose)polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology* 109; 472-482, 1995
71. Wei MC, Zong W-Z, Cheng EH-Y, Lindsten T, Panoutsacopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292; 727-730, 2001
72. Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Are caspases involved in the death of cells with transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci* 111; 2707-15, 1998
73. Wilmanns, W.: Akute Leukämien, In: G. Riecker, Hrsg.: Therapie innerer Krankheiten, 7. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (1991), 389
74. Walker PR, Leblanc J, Carson C, Ribocco M, Sikorska M. Neither caspase-3 nor DNA fragmentation factor is required for high molecular weight DNA degradation in apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 887; 48-591, 1999
75. Yoshihara K, Itaya A, Hironaka T, Sakuramoto S, Tanaka Y, Tsuyuki M, Inada Y, Kamiya T, Ohnishi K, Honma M, Kataoka E, Mizusawa H, Uchida M, Uchida K, Miwa M. Poly (ADP-ribose) polymerase defective mutant cell clone of mouse L1210 cells. *Exp Cell Res* 200; 126-134, 1992
76. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 182; 367-377, 1995
77. Zhang J, Lee H, Low DW, Bovin XP, Xu M. Lack of obvious 50 kilobase pair DNA fragments in DNA fragmentation factor 45-deficient thymocytes upon activation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 274; 225-9, 2000

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Kassette ATP-binding cassette
ADH Alkoholdehydrogenase
AFC 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AIF Apoptose-induzierender Faktor
6-AN 6-Aminonikotinamid
APL Promyelozytenleukämie
AraC Cytosin-Arabinosid
ATA Aurintricarboxylsäure
ATP Adenosintri-phosphorsäure
bp Basenpaar
CAD durch Caspase aktivierte Desoxyribonuklease
CCCP Carbonyl Cyanid m- Chlorophenylhydrazon
CD cluster of differentiation
Che Chelerythrin
DMF Dimethylformamid
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonucleinsäure
ECL enhanced chemiluminescence
EDTA Ethylendiamintetraacetat
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
FAB French-American-British-Gruppe
FACS fluorescence activated cell sorter
FCCP Carbonyl Cyanid p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS foetales Kälberserum
FISH Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC Fluoreszein Isothiocyanat
FSC Forwärtslichtstreuung
g Einheit für die relative Zentrifugalbeschleunigung
G6PDH Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
GSH Reduziertes Glutathion

GvHD „graft versus host“ disease
HBSS Hanks-buffered salt saline
IAP endogene Inhibitoren von Caspasen
ICAD Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuclease
ICE Interleukin-1 β -konvertierendes-Enzym
IL Interleukin
kDa Kilodalton
KM Knochenmark
KMT Knochenmarktransplantation
MDS myelodysplastisches Syndrom
Mg Milligramm
ml Milliliter
mM Millimol
MMP mitochondriales Membranpotential
MMPR 6-Methylmerkaptopurinribosid
MRP multidrug resistance protein
MNNG 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidinium
NAD(P) Nikotinamadenindinukleotid (phosphate)
NGF Nervenwachstumsfaktor
nm Nanometer
NMN Nikotinamidmononukleotid
NMNAT Nikotinamidmononukleotid-Adenylyltransferase
NPRT Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase
PAGE Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PALA N-(phosphonacetyl)-L-Asparaginsäure
PARP Poly(ADP-Ribose)polymerase
PAS Perjodsäure/Schiff-Reaktion
PBS phosphate buffered saline
PBSC periphere Blutstammzelltransplantation
PFGE Pulsfeld-Gelelektrophorese
PI Propidiumjodid

POX Peroxidase
PT-Pore „permeability transition“ Pore
RAR α Retinsäurerezeptor alpha
RB Retinoblastoma Protein
RNase Ribonuklease
ROS reactive oxygen species
RT- PCR reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS Sodium dodecylsulfate
SSC Seitwärtslichtstreuung
Std Stunde
Sts Staurosporin
TBS Tris-buffered saline
TdT terminale Desoxynukleotidyltransferase
TNF- α Tumornekrosefaktor-alpha
WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat
zVAD z-VAD-FMK

9. Anhang

9.1 Verwendete Reagenzien

Die folgende Aufstellung gibt Aufschluß über Art und Herkunft der verwendeten Chemikalien.

Agarose	(Bio-Rad)
Pulsfeld zertifizierte Agarose	(Sigma)
Bromphenolblau	(Sigma)
BSA (Rinderserumalbumin)	(Biomol)
CaCl ₂	(Merck)
L-Cystein	(Sigma)
Digitonin	(Merck)
DTT	(Sigma)
EDTA	(Roth)
EGTA	(Sigma)
Essigsäure	(Merck)
Ethanol	(Merck)
Ethidiumbromid	(Sigma)
foetales Kälberserum	(Biochrom)
Glycerol	(Merck)
Glycin	(Roth)
Gly-Gly (Glycyl-Glycin)	(Sigma)
Harnstoff	(Bio-Rad)
HBSS	(Sigma)
HEPES	(Serva)

K ₂ HPO ₄	(Merck)
KH ₂ PO ₄	(Merck)
KOH	(Merck)
β-Mercaptoethanol	(Sigma)
Methanol	(Merck)
NaCl	(Sigma)
³ H-NAD ⁺	(Dupont-NEN)
Na Desoxycholat	(Sigma)
Na Lauroylsarcosin	(Sigma)
NaOH	(Merck)
Nikotinamid	(Sigma)
PBS	(Gibco)
Penicillin	(Biochrom)
Proteinase K	(Sigma)
RNAse A	(Serva)
RPMI-1640	(Biochrom)
Saccharose	(Sigma)
SDS	(Serva)
Streptomycin	(Biochrom)
Tris	(Roth)
Trypanblau (0,05% Lösung in PBS)	(Biochrom)
Tween-20	(Serva)

9.2 Verwendete Lösungen

- A. Markierungslösung (10 mM HEPES; pH 7,4; 5 mM CaCl₂; 2.66% FITC-konjugiertes Annexin V)
- B. PI-Pufferlösung (10 mM HEPES; pH 7,4; 5 mM CaCl₂; 0,01 mg/ml PI)
- C. Resuspendierungspuffer (10 mM Tris, pH 7.2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA)
- D. Proteinase K-Reaktionspuffer (100 mM EDTA; pH 8,0; 0,2% Na Desoxycholat; 1% Na Lauroylsarcosin; 0,5 mg/ml Proteinase K)
- E. TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA)
- F. HEPES-Lösung (10mM HEPES; pH 7,4)
- G. Lysepuffer I (62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 6 M Harnstoff; 2% SDS; 10% Glycerol; 0,00125% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol)
- H. Laufpuffer (25 mM Tris; pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% SDS)
- I. Transferpuffer (25 mM Tris; pH 8,3; 192 mM Glycin; 20% Methanol)
- J. B-Puffer (3% Rinderserumalbuminlösung (BSA) in TBS-T)
- K. TBS-T (20 mM Tris-HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% Tween-20)
- L. Lysepuffer II (10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA; 10 mM EGTA; 30 µg/ml Digitonin)
- M. Permeabilisierungspuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,8; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 0,25 M Saccharose)
- N. Substratpuffer (50 mM Tris; pH 8,5; 37,5 mM MgCl₂; 0,5 mg/ml BSA; 50 µM ³H-NAD⁺ (0,1 MBq/ml))
- O. Neutralisationspuffer (2 N KOH; 0,2 M K₂HPO₄/KH₂PO₄; pH 7,5)
- P. Alkalischer Lysepuffer (0,02 N NaOH; 0,5 mM L-Cystein)
- Q. Reaktionsgemisch I (60 mM Gly-Gly-Puffer; pH 7,4; 1,63 mM WST-1; 65,3 µM 1-Methoxy-PMS; 60 mM Nikotinamid; 300 mM Ethanol; 20 U ADH)
- R. Reaktionsgemisch II (50 mM Tris; pH 8,1; 1,63 mM WST-1; 65,3 µM 1-methoxy-PMS; 5 mM Glukose 6-phosphat und 0,45 U G6PDH)
- S. Luziferasepuffer (0,1 M Tris-Acetat; pH 7,75; 2 mM EDTA)

Lebenslauf

1. Allgemeine Daten:

1.1 Name Pogrebniak
1.2 Vorname Alexei
1.3 Geburtsdatum 30.07.72
1.4 Geburtsort Kiew
1.5 Familienstand verlobt
1.6 Staatsangehörigkeit Deutsch
1.7 Private Anschrift Hogenbergstraße 13,
80686 München
Deutsches Herzzentrum München
Abteilung Experimentelle
Kinderkardiologie
Lazarettstraße 60
80636 München. Tel. 089/12182600
0178/7855066, e-mail:
pogrebniak@dhm.mhn.de

1.8 Dienstliche Anschrift:

2. Berufsausbildung:

2.1 Schulbildung:
1978-1988 Mittelschule in Kiew

2.2 Studium:
09.1988-02.1991 Studium an der Saratower
medizinischen Hochschule
02.1991-06.1994 Studium an der Ukrainischen
staatlichen medizinischen Universität.
Diplomabschluß als Arzt
10.1995-04.1997 Studium an der LMU München.
Abschluß mit Staatsexamen

2.3 Tätigkeiten außerhalb der Erwerbstätigkeit
10.1994-06.1995 Deutschkurs bei BBZ, Augsburg
08.1995-10.1995 Laborpraktikum Dr. Dirr, Augsburg

2.4 Beruflicher Werdegang:
03-1996-03.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am
Institut für klinische Hämatologie der
GSF (Direktor **Prof. W. Wilmanns**,
Laborleiter **Dr. V. Nüssler**).
04.1998-07.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im
Infektiologielabor der Med.
Poliklinik. (Laborleiter **Dr. O.
Schatz**)
07.2000-12.2001 Arzt im Praktikum im
Forschungslabor A, Klinikum
Großhadern (Laborleiter **PD Dr. V.
Nüssler**)

Ab 12.2001

Arzt im Praktikum und ab 09.2002
Post-Doc in der Abteilung für
experimentelle Kinderkardiologie am
Deutschen Herzzentrum München
(Direktor **Prof. J. Hess**, Laborleiter
PD Dr. A. Görlach)