

**Aus der  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der  
Charité Universitätsmedizin Berlin  
HTCC – Haut-Tumor-Centrum-Charité**

**Leiter  
Prof. Dr. Wolfram Sterry  
Arbeitsgruppe  
PD Dr. Jürgen Eberle**

# **Das eisenhaltige Cytosin-Analogon Ferropoptosid (N69) induziert Caspase-unabhängige aber ROS-abhängige Apoptose in Melanom-Zellen**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades der  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Apothekerin Jeannine C. Franke  
aus Berlin**

**Berlin, im Februar 2010**

**1. Gutachter: Privat-Dozent Dr. Jürgen Eberle**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Müller**

**Tag der Disputation: 05.07.2010**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Maligne Melanom	1
1.1.1.	Epidemiologie und Progression	1
1.1.2.	Klinische Charakteristika und Melanomtypen	2
1.1.3.	Stadieneinteilung und Prognose	4
1.1.4.	Therapie	5
1.2.	Der programmierte Zelltod (Apoptose)	7
1.3.	Signalwege der Apoptose	8
1.3.1.	Der Todesrezeptor-kontrollierte (extrinsische) Weg	9
1.3.2.	Der Mitochondrien-regulierte (intrinsische) Weg	10
1.4.	Die Funktion der Caspasen in der Apoptose	11
1.4.1.	Initiatorcaspasen	12
1.4.2.	Effektorcaspasen	12
1.4.3.	Physiologische Caspase-Inhibitoren	12
1.5.	Die Caspasen-unabhängige Apoptose	12
1.6.	Die Funktion der Cathepsine in der Apoptose	14
1.7.	Die Proteine der Bcl-2 Familie	14
1.7.1.	Anti-apoptotische Multidomänen Proteine	16
1.7.2.	Pro-apoptotische Multidomänen Proteine	16
1.7.3.	Pro-apoptotische BH3-only Proteine	16
1.7.4.	Die Rolle der Bcl-2 Proteine in der mitochondrial vermittelten Apoptose	16
1.8.	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species – ROS)	17
1.9.	Nukleosid-Analoga	20
1.10.	Fragestellung	22
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1.	Material	23
2.1.1.	Material für die Zellkultur	23
2.1.1.1.	Nährlösungen	23
2.1.1.2.	Eukaryotische Zellen	24
2.1.1.3.	Apoptose-Stimulanzen	24
2.1.1.4.	Caspase- und Cathepsin-Inhibitoren	25

2.1.1.5.	Antioxidantien	25
2.1.2.	Material für die Protein-Analytik	25
2.1.2.1.	SDS-PAGE	25
2.1.2.2.	Western Blot	27
2.1.3.	Material für Apoptose- und Nekrose-Nachweise	29
2.1.3.1.	Kits	29
2.1.3.2.	Färbungen	29
2.1.4.	Sonstige Materialien	30
2.1.4.1.	Chemikalien	30
2.1.4.2.	Materialien	31
2.1.4.3.	Geräte	31
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Zellbiologische Methoden	33
2.2.1.1.	Sterilisation von Lösungen und Nährmedien	33
2.2.1.2.	Passage eukaryotischer Zellen	33
2.2.1.3.	Lagerung eukaryotischer Zellen	33
2.2.1.4.	Inhibition von Caspasen und Cathepsinen	34
2.2.2.	Proteinanalytische Methoden	34
2.2.2.1.	Herstellung von Protein-Lysaten	34
2.2.2.2.	Herstellung von Caspase-Spaltprodukt-Lysaten	34
2.2.2.3.	Herstellung von PARP-Spaltprodukt-Lysaten	34
2.2.2.4.	Herstellung von Cathepsin-Spaltprodukt-Lysaten	35
2.2.2.5.	Herstellung von Zellfraktionierungs-Lysaten	35
2.2.2.6.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
2.2.2.7.	Diskontinuierliche SDS-PAGE	36
2.2.2.8.	Western Blot	37
2.2.2.9.	Antikörperinkubation	37
2.2.2.10.	ECL-Behandlung	38
2.2.3.	Apoptose und Nekrose Nachweise	38
2.2.3.1.	DNA-Fragmentierungs-ELISA	38
2.2.3.2.	Zytotoxizitäts-Test	40
2.2.3.3.	Wachstumskurven	41
2.2.3.4.	Caspase-3-Aktivitäts-Assay	41
2.2.3.5.	Zellzyklus-Analyse	41

2.2.3.6.	Bisbenzimid-Färbung	42
2.2.3.7.	TUNEL-Färbung	43
2.2.3.8.	Acridine Orange-Färbung	43
2.2.3.9.	JC-1-Färbung	44
2.2.4.	ROS-Nachweis	44
2.2.5.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1.	Das eisenhaltige Cytosin-Analogon N69	46
3.2.	Effekte von N69 auf die Zellmorphologie	47
3.3.	Dosisabhängige Induktion der Apoptose durch N69	48
3.4.	Zeitabhängige Induktion der Apoptose durch N69	49
3.5.	Die Real-Zeit-Zell-Analyse für N69	50
3.6.	Erhöhung der sub-G1-Zell-Population durch DNA-Fragmentierung	51
3.7.	Chromatin-Kondensation und DNA-Einzelstrangbrüche durch N69	52
3.8.	Absinken des mitochondrialen Membranpotentials durch N69	53
3.9.	Permeabilisierung der lysosomalen Membranen durch N69	54
3.10.	Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne Caspasen-Aktivierung	55
3.11.	Die N69-induzierte Apoptose verläuft mit einer sekundären, späten Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung	56
3.12.	Keine Aktivierung von Caspase-3 im ELISA	57
3.13.	Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Caspase-Inhibitoren	58
3.14.	Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne frühe Cathepsin-Beteiligung	59
3.15.	Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Cathepsin-Inhibitoren	60
3.16.	Permeabilisierung der Mitochondrien durch N69	61
3.17.	Keine Regulation der proapoptotischen Bcl-2-Proteine	62
3.18.	Zusammenhang von N69-induzierter Apoptose und ROS-Produktion	63
3.19.	Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten ROS-Produktion	64
3.20.	Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten Apoptose	65
3.21.	Funktion von Antioxidantien in der CH-11-induzierten Apoptose	66

3.22.	Die Überexpression von Bcl-2 blockiert partiell die N69-induzierte Apoptose	67
3.23.	Die Überexpression von Bcl-2 blockiert nicht die N69-induzierte ROS	68
3.24.	Die Vorbehandlung mit zVAD blockiert die N69-induzierte ROS-Produktion	69
3.25.	Der Einfluss von N69 auf normale menschliche Melanozyten	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1.	Apoptoseinduktion durch N69 in Melanomzellen	71
4.2.	Die N69-induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen	72
4.3.	Die N69-induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Cathepsinen	73
4.4.	Die Bedeutung der Bcl-2-Proteine und p53 in der N69-induzierten Apoptose	74
4.5.	Die Bedeutung von ROS in der N69-induzierten Apoptose	76
4.6.	Weiterführende Fragestellungen	80
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
5.1.	Zusammenfassung	81
5.2.	Summary	82
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
8.1.	Publikationen	96
8.1.1.	Originalarbeiten	96
8.1.2.	Kurzveröffentlichungen	96
8.2.	Lebenslauf	98
8.3.	Danksagung	100

## 1.1. Das Maligne Melanom

### 1.1.1. Epidemiologie und Progression

Die Häufigkeit von Hauttumoren ist in den letzten Jahren bei der weißen Bevölkerung weltweit dramatisch angestiegen. Besonders häufig treten sie bei hellem Hauttyp und gleichzeitig hoher Sonnenexposition auf [Balch et al., 2001]. Neben dem Malignen Melanom sind die häufigsten Tumore der Haut das Plattenepithelkarzinom und das Basalzellkarzinom. Etwas seltener treten kutane Lymphome auf. Zu den eher seltenen Hauttumoren gehören das Merkelzellkarzinom, das Kaposi-Sarkom und Morbus Paget.

Auf Grund von Inzidenz und Mortalität ist das Maligne Melanom die aggressivste Form der Hauttumore. Es entsteht durch die maligne Entartung von Melanozyten. In Mitteleuropa beträgt die Häufigkeit 10–12 / 100.000 / Jahr, in den USA 10–25 / 100.000 / Jahr und in Australien liegt sie mit 50–60 / 100.000 / Jahr am höchsten. Am geringsten ist die Häufigkeit in den mediterranen Ländern mit 5-7 / 100.000 / Jahr. Bei asiatischer und afrikanischer Bevölkerung mit einer höheren Pigmentation sind Melanome eher ungewöhnlich [Garbe et al., 2007]. Eine hohe Mortalität und eine hohe Metastasierungsrate sind die Hauptprobleme des Malignen Melanoms. Neben dem Anstieg der Melanomhäufigkeit kam es jedoch auch zu einem Anstieg der 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40 % in den 1940er Jahren bis auf etwa 90 % bis heute. Der Anstieg der Überlebensrate ist auf die frühere Erkennung eines Melanoms zurückzuführen, da dünnere Melanome eine bessere Prognose haben [Lens and Dawes, 2004].

Die Entstehung eines Melanoms wird durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt. Dazu gehört ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), eine hohe Sonnenexposition in der Kindheit, mehrere starke Sonnenbrände in der Kindheit, eine große Anzahl von Nävi, familiäre Disposition und höheres Lebensalter. Melanome entstehen durch die neoplastische Umwandlung von Melanozyten. Dazu können verschiedene Faktoren wie genetische Mutationen, Veränderungen von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod, sowie intensive UV-Strahlung beitragen. Primäre Melanome entstehen aus melanozytären Nävi oder als Neubildungen. In der radialen Wachstumsphase (radial growth phase – RGP) sind die Zellen zwar lokal invasiv, weisen jedoch noch keine metastasierenden Eigenschaften auf. In der sich anschließenden vertikalen Wachstumsphase (vertical growth phase – VGP) infiltrieren Melanomzellen als

Cluster in die Dermis und entfalten metastasierende Eigenschaften, wobei Fernmetastasen den letzten Schritt darstellen [Clark, 1991].

### 1.1.2. Klinische Charakteristika und Melanomtypen

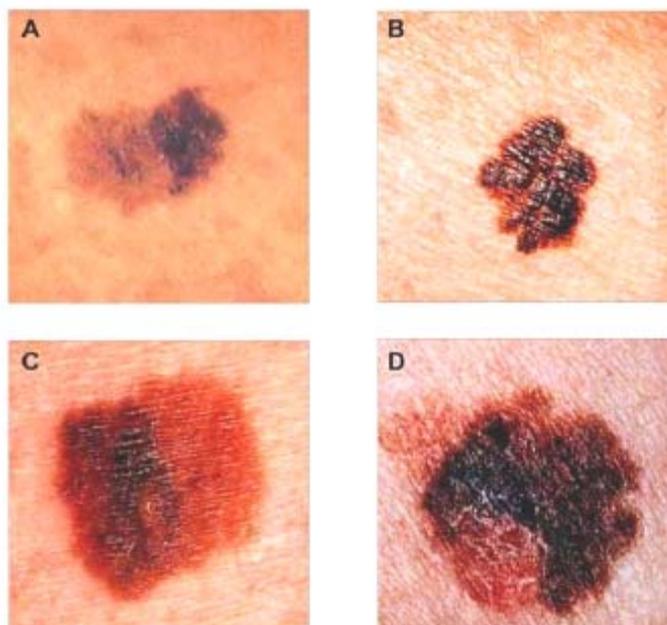
Das Maligne Melanom kann klinisch durch die ABCD-Kriterien diagnostiziert werden:

A) Asymmetry – Asymmetrie: Das Melanom lässt sich nicht durch eine Spiegelebene in zwei gleiche Hälften teilen. (Abb. 1.1.A)

B) Border irregularity - Begrenzung: Die Ränder des Melanoms sind unregelmäßig und gezackt. (Abb. 1.1.B)

C) Color variability – Color: Das Melanom ist nicht einheitlich gefärbt, sondern weist rote, braune, schwarze, bläuliche oder auch ungefärbte Bereiche auf. (Abb. 1.1.C)

D) Diameter – Durchmesser: Der Durchmesser des Melanoms beträgt mehr als 6 mm bzw. ist kleiner, aber hat sich in kurzer Zeit stark vergrößert. (Abb. 1.1.D)



**Abb. 1.1. Die ABCD-Kriterien beim Malignen Melanom**

A) Assymetrie

B) Begrenzung

C) Color

D) Durchmesser

Das Maligne Melanom wird in vier Haupttypen eingeteilt (Abb. 1.2.):

1. *Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM)*. Dieses ist die häufigste Form des Malignen Melanoms. Zu Beginn ist die Läsion flach und wächst horizontal, in späteren Phasen ist die Oberfläche inhomogen und die Begrenzung unregelmäßig.
2. *Noduläres Melanom (NM)*. Diese Form des Melanoms zeigt ein frühes vertikales Wachstum mit schneller Invasion in die Dermis. Es ist typischerweise blauschwarz und knotig oder halbkugelig mit meist scharf begrenzten Rändern.
3. *Lentigo Malignes Melanom (LMM)*. Diese Form zeichnet sich durch eine langsame Wachstumsgeschwindigkeit aus und metastasiert deshalb nur in seltenen Fällen. Charakteristisch ist eine große, bräunliche Läsion.
4. *Akrolentiginöses Melanom (ALM)*. Diese Form zeigt sich an Händen oder Füßen oder auch unter den Nägeln und zeigt oftmals Ulzerationen. Diese Form tritt gehäuft bei dunkelhäutigen Menschen auf.
5. *Andere seltene Melanomformen*. Hierunter fallen das Uvea-Melanom, das aus den Melanozyten der Aderhaut entsteht, und das Schleimhaut-Melanom, das im Mund, im Genitalbereich, dem Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt auftreten kann.



**Abb. 1.2. Die Haupttypen beim Malignen Melanom**

1. *Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM)*
2. *Noduläres Melanom (NM)*
3. *Lentigo Malignes Melanom (LMM)*
4. *Akrolentiginöses Melanom (ALM)*

### 1.1.3. Stadieneinteilung und Prognose

Beim Melanom sind die Dicke und die Invasionsstiefe des Primärtumors in die Dermis die wichtigsten prognostischen Indikatoren und deutlich ausschlaggebend für eine mögliche Metastasierung. Man zieht zur Tumorcharakterisierung bezüglich Tumordicke und Invasionslevel hauptsächlich folgende Parameter heran:

1. *Tumordicke nach Breslow.* Hier wird die Tumordicke von der Granularzellschicht der Epidermis bis zu der tiefsten Stelle des Tumors gemessen [Breslow, 1978].

2. *Invasionslevel nach Clark.* Hier wird die Eindringtiefe des Tumors in die verschiedenen Schichten der Haut bestimmt [Clark, Jr. et al., 1984].

- Level I: In situ; Tumor innerhalb der Epidermis
- Level II: Invasion ins Stratum papillare der Dermis
- Level III: Invasion ins Stratum reticulare der Dermis
- Level IV: Stratum papillare und Stratum reticulare voll erfasst
- Level V: Invasion in das subkutane Fettgewebe

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	In situ Tumoren	Keine	Keine
IA	≤ 1,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IB	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder Clark Level IV oder V	Keine	Keine
	1,01–2,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIA	1,01–2,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	2,01–4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIB	2,01–4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIC	> 4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	Keine
IIIB	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Bis zu drei Makrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	Keine aber Satelliten- und/oder in-transit Metastasen	Keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu drei Makrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	Vier oder mehr Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall oder Satelliten und/oder in-transit Metastasen mit Lymphknotenbefall	Keine
IV			Fernmetastasen

Abb. 1.3. Stadieneinteilung des Malignen Melanoms aus [Garbe et al., 2006]

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der Dicke des Primärtumors (pT), Regionären Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M). Je dicker der Tumor und je mehr Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen, desto höher wird das Stadium eingestuft (Abb. 1.3.).

Die Prognose bzw. die 5-Jahres-Überlebensrate ist in entscheidendem Maße vom Stadium abhängig. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem kleinen Primärtumor (< 1,0 mm) bei 95 % liegt, reduziert sie sich bei Fernmetastasen bis auf 18 % (Abb. 1.4.).

Stadium	5-Jahres-Überlebensrate in %
IA	95
IB	90
IIA	77
IIB	63
IIC	45
IIIA	69
IIIB	52
IIIC	29
IV	18

**Abb. 1.4. 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Malignem Melanom nach AJCC 2002 in Abhängigkeit des Stadiums**

#### 1.1.4. Therapie

Der wichtigste Schritt in der Therapie des Malignen Melanoms ist die Erkennung in einem frühen Stadium. Durch vollständige operative Entfernung des Primärtumors im Stadium I ergibt sich dadurch eine Überlebensrate von über 90%. Das fortgeschrittene Melanom metastasiert in verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Knochen oder Gehirn, was die operativen Entfernungsmöglichkeiten stark eingrenzt [Balch et al., 2001].

Die schlechte Prognose für die Überlebensrate und die geringe Ansprechrate auf herkömmliche Chemotherapeutika beim metastasierten Melanom basieren auf einer Therapie-Resistenz, die zu Defekten in der proapoptotischen Signalkaskade in Verbindung stehen. Die Chemotherapieresistenz bezüglich der Apoptose wird mit drei verschiedenen molekularen Veränderungen in Zusammenhang gebracht:

Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren, Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren und Reaktivierung von Überlebenssignalen [Eberle et al., 2007]; [Soengas and Lowe, 2003].

Verschiedene Chemotherapeutika sowie Interferon-alpha (IFN-alpha) und Interleukin-2 (IL-2) werden bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom angewendet. Jedoch ergeben sich leider insgesamt nur relativ geringe Ansprechraten [Keilholz and Gore, 2002].

Man unterscheidet bei der Therapie die Monotherapie (Abb. 1.5.) und die Polychemotherapie (Abb. 1.6.). Bei den verschiedenen Monotherapien reichen die Ansprechraten jedoch nicht über 25 % hinaus. Etwas höher liegen die Ansprechraten bei der Polychemotherapie. Dabei hat das DVP-Schema mit DTIC (Dacarbazin), Vindesin und Cisplatin mit bis zu 45 % die höchste Ansprechraten. Eine ebenfalls relativ hohe Ansprechraten hat das BOLD-Schema mit Bleomycin, Vincristin, CCNU (Lomustin) und DTIC mit bis zu 40 % [Garbe et al., 2006].

Die hohen Sterberaten beim metastasierten Melanom und die geringe Effektivität herkömmlicher Chemotherapeutika verdeutlichen die Notwendigkeit zur Entwicklung von neuen, wirksamen Substanzen und Strategien, um die hohe Therapieresistenz zu überwinden.

Medikament	Dosierung	Ansprechraten
Dacarbazin	250 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1-5 alle 3-4 Wochen oder 800-1200 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 alle 3-4 Wochen	12,1-17,6 % 5,3-23 %
Temozolomid	150-200 mg/m <sup>2</sup> oral Tag 1-5 alle 4 Wochen	13,5-21 %
Fotemustin	100 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1, 8, und 15 dann 5 Wochen Pause, Fortsetzung alle 3 Wochen	7,4-24,2 %
Vindesin	3 mg/m <sup>2</sup> i.v. alle 14 Tage	12-26 %
Interferon-alpha	9-18 Mio. I.E./m <sup>2</sup> s.c. 3*wöchentlich, kontinuierliche Gabe	13-25 %
Interleukin-2	600.000 IU/kg als 15 min Kurzinfusion i.v. alle 8 Std. Tag 1-5 (maximal 14 Einzeldosen) Wiederholungszyklus Tag 14	16-21,6 %

**Abb. 1.5. Monotherapie des fortgeschrittenen Malignen Melanoms aus [Garbe et al., 2006]**

Schema	Dosierung	Ansprechrate
DTIC (Temozolomid) + IFN- $\alpha$	DTIC 850 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 (bzw. Temozolomid 150 mg/m <sup>2</sup> oral Tag 1–5) IFN- $\alpha$ 2a/b 3 Mio. I.E./m <sup>2</sup> s.c. Tag 1–5 s.c. IFN- $\alpha$ 2a/b 5 Mio I.E./m <sup>2</sup> s.c. 3×/Woche in Woche 2–4 Wiederholung alle 4 Wochen	14–27,7 %
Vindesin + IFN- $\alpha$	Vindesin 3 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 IFN- $\alpha$ 2a/b 5 Mio I.E./m <sup>2</sup> s.c. 3× wöchentlich, Wiederholung alle 2 Wochen	24 %
BHD-Schema	BCNU 150 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1, nur jeden 2. Zyklus Hydroxyurea 1500 mg/m <sup>2</sup> oral Tag 1–5 DTIC 150 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1–5 alle 4 Wochen	12,7–30,4 %
BOLD-Schema	Bleomycin 15 mg i.v. Tag 1+4 Vincristin 1 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1+5 CCNU 80 mg/m <sup>2</sup> p.o. Tag 1 DTIC 200 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1–5 alle 4–6 Wochen	22–40 %
DVP-Schema	DTIC 250 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1–5 Vindesin 3 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 Cisplatin 100 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 alle 3–4 Wochen	31,4–45 %
DVP-Schema	DTIC 450 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1+8 Vindesin 3 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1+8 Cisplatin 50 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1+8 alle 3–4 Wochen	24 %
DBCT-Schema	DTIC 220 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1–3 BCNU 150 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1 nur jeden 2. Zyklus Cisplatin 25 mg/m <sup>2</sup> i.v. Tag 1–3 Tamoxifen 2 × 10 mg p.o. täglich alle 3–4 Wochen	18,5–31,9 %

**Abb. 1.6. Polychemotherapie des fortgeschrittenen Malignen Melanoms aus [Garbe et al., 2006]**

## 1.2. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Der Begriff Apoptose hat seinen Ursprung im Griechischen und setzt sich zusammen aus apo = ab und ptosis = fallen und steht ursprünglich für das Abfallen der Blätter der Bäume.

Der programmierte Zelltod ist ein genetisch regulierbarer, aktiver, biochemischer Prozess und kann durch das Auftreten pro-apoptotischer bzw. durch den Verlust anti-apoptotischer Signale ausgelöst werden und bringt dadurch Zellen gezielt zum Absterben [Kerr et al., 1972]. In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht aus Apoptose und Proliferation der Zellen. Wird dieses Gleichgewicht gestört, können bei verstärkter Apoptose z.B. neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson und bei abgeschwächter Apoptose z.B. maligne Erkrankungen wie Krebs auftreten [Jacobson et al., 1997]. Eine Apoptosedefizienz kann von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von

Resistenzen gegenüber Zytostatika sowie immuntherapeutischen Ansätzen sein [Soengas and Lowe, 2003]. Das ursprüngliche Verständnis von programmiertem Zelltod wurde durch genetische Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* geprägt. Bei *Caenorhabditis elegans* werden im Verlauf seiner Entwicklung 131 seiner 1090 Zellen apoptotisch eliminiert [Sulston and Horvitz, 1977].

Charakteristika der Apoptose sind Schrumpfen der Zellen, Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung, wobei die Membranintegrität erhalten bleibt. Während der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die Fragmente der Zelle enthalten und als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) bezeichnet werden. Zum Schluss werden die Zellreste durch Makrophagen bzw. Nachbarzellen aufgenommen, wobei zytosolische Bestandteile nicht in den extrazellulären Raum austreten können. Dieser Prozess wird als Phagozytose bezeichnet [Tait and Green, 2008]. Im Gegensatz zur Apoptose führt die Nekrose zu generellen Zellschäden, bei denen die Membranintegrität zerstört wird und es zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zellen kommt. Nach mechanischer Verletzung, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie), sowie Bakterieninfektionen der Zelle kann nekrotischer Zelltod auftreten [Leist and Jaattela, 2001].

### 1.3. Signalwege der Apoptose

Abhängig vom proapoptischen Reiz auf eine Zelle können unterschiedliche Signalwege aktiviert werden, die hauptsächlich in zwei verschiedene Apoptosewege münden. Bei den Signalwegen der Apoptose unterscheidet man zwischen dem extrinsischen Signalweg, der über Todesrezeptoren wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) oder CD95 (Fas/APO-1) verläuft und dem intrinsischen Signalweg, hauptsächlich induziert durch p53, bei dem Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Beide Signalwege enden mit der Aktivierung von Proteasen und der Spaltung von Todessubstraten, was schließlich zum Absterben der Zelle führt. Beide Wege können sich an verschiedenen Verbindungsstellen kreuzen oder ineinander übergehen (Abb. 1.7.).

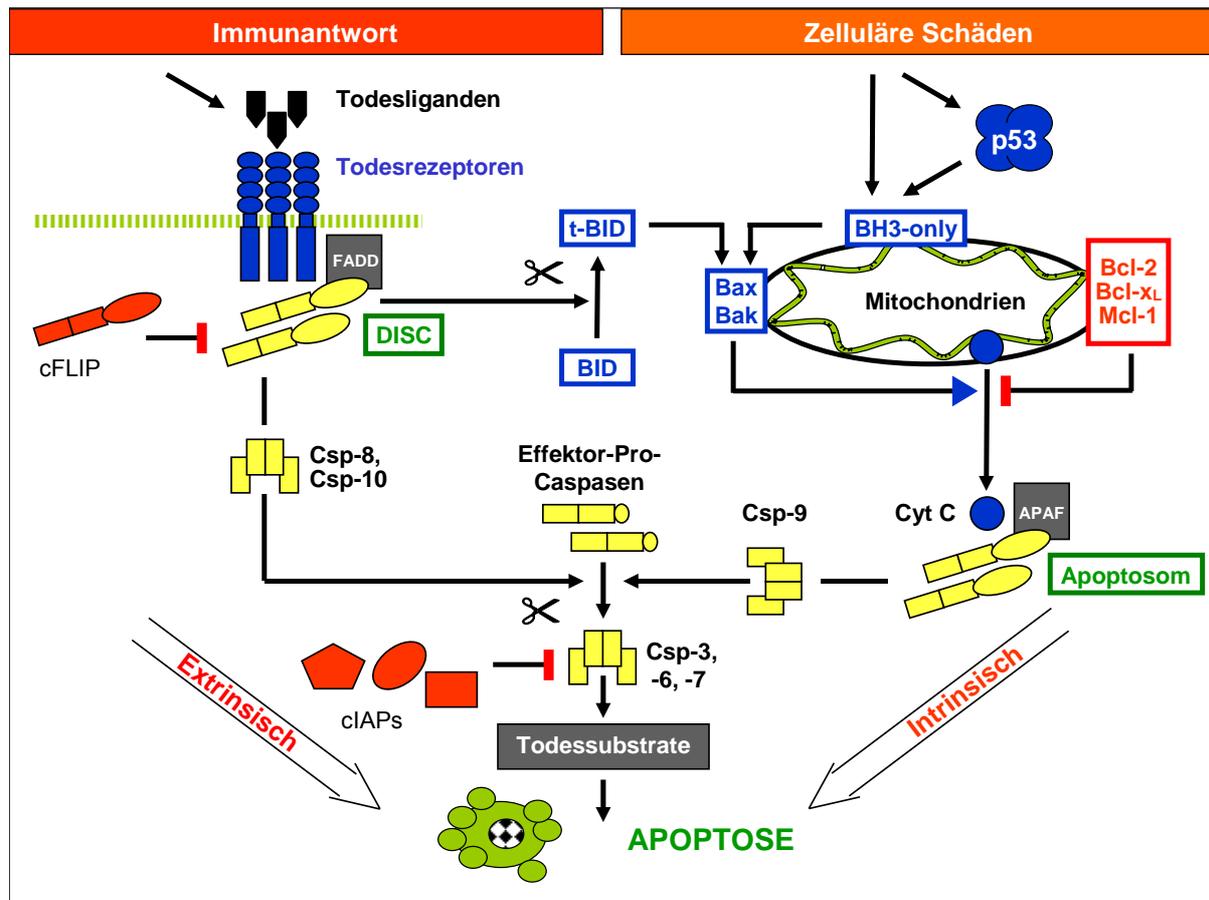


Abb. 1.7. Hauptsignalwege der Apoptose nach [Eberle et al., 2008]

### 1.3.1. Der Todesrezeptor-kontrollierte (extrinsische) Weg

Der extrinsische Signalweg beginnt mit der Bindung von Todesliganden an Todesrezeptoren an der Zelloberfläche. Jeder Todesrezeptor wird von seinem spezifischen Todesliganden gebunden. Das Signal wird intrazellulär über eine Todesdomäne auf Signalmoleküle übermittelt. CD95 wurde als erster Todesrezeptor identifiziert. Todesrezeptoren gehören zu einer Gruppe von Transmembran-Proteinen, die eine Unterfamilie innerhalb der TNF $\alpha$ -Rezeptor-Familie bilden [Daniel et al., 2001]. Durch die Bindung des CD95-Liganden (CD95L) an den CD95-Rezeptor (CD95) kommt es zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren und weiterhin zu der Ausbildung des Todesinduzierenden Signalkomplexes (death inducing signaling complex - DISC), wobei die Initiator-Caspasen 8 und 10 aktiviert werden [Krammer et al., 2007]. Dies geschieht autokatalytisch durch die intrazelluläre Assoziation von Pro-Caspase-8 über ein Adapterprotein (Fas-associated death

domain protein - FADD) mit CD95. Die aktivierte Caspase-8 kann entweder direkt zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 führen (Typ I-Zellen, z.B. Lymphozyten), oder das Signal wird durch die Spaltung von BID zu t-BID an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Typ II-Zellen, z.B. Melanozyten). An dieser Stelle kann der extrinsische in den intrinsischen Signalweg (s.u.) übergehen [Li et al., 1998; Luo et al., 1998]. Der Weg in die Apoptose kann jedoch auch noch verhindert werden. Dabei konkurriert ein Protein (FLICE-inhibitory protein - FLIP) unterhalb von CD95 mit der Initiator-Caspase-8 um Bindungsstellen am DISC und verhindert so die Aktivierung der Pro-Caspase-8 [Lamkanfi et al., 2007]. Andere Proteine (inhibitor of apoptosis proteins - IAPs) können auch die Apoptose unterdrücken, wenn bereits die Ebene der Effektor-Caspasen erreicht ist, indem diese inhibiert werden [Deveraux and Reed, 1999].

### **1.3.2. Der Mitochondrien-regulierte (intrinsische) Weg**

Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Signale wie Zell- oder DNA-Schäden ausgelöst. Dabei kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation - MOMP) [Green and Kroemer, 2004] und zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials [Kang et al., 2007; Zhang et al., 2006]. Die Mitochondrien haben nicht nur eine Funktion für das Leben der Zelle als Energielieferanten, sondern auch eine Rolle im programmierten Zelltod. An ihnen treffen intrinsischer und extrinsischer Signalweg (s.o.) zusammen. Bei der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran wird Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt, das an den monomeren Apoptoseaktivierenden-Faktor-1 (apoptotic protease-activating factor-1 - Apaf-1) bindet, der daraufhin oligomerisiert und über Rekrutierung von Pro-Caspase-9 zur Bildung des Apoptosoms führt [Chipuk and Green, 2008; Riedl and Shi, 2004]. Nach Aktivierung der mitochondrialen Initiator-Caspase-9 kommt es zur Prozessierung von Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, -6 und -7. Eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran macht den Zelltod unausweichlich, weil essentielle Funktionen der Mitochondrien nicht mehr stattfinden können [Chipuk and Green, 2005]. Die Bcl-2-Proteine katalysieren diesen entscheidenden Prozess und induzieren, sofern die Aktivität der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine dominiert, Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran, die daraufhin permeabel wird. Überwiegt die Aktivität der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine, stellen diese ein Schutzschild für die Mitochondrienmembran dar (s.u.) [Chipuk and Green, 2008].

#### 1.4. Die Funktion der Caspasen in der Apoptose

Die Caspasen (Cytosolic Aspartate-Specific Cysteine Proteases) spielen eine zentrale Rolle in der Apoptose-Regulation. Caspasen sind Cystein-abhängige Aspartat-spaltende Proteasen, die als inaktive Zymogene synthetisiert werden und aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, sowie einer N-terminalen Pro-Domäne bestehen. Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Zuerst wird die Pro-Domäne abgetrennt und anschließend die große von der kleinen Untereinheit gespalten. Aktive Caspasen bilden jeweils ein Heterotetramer aus zwei identisch großen Untereinheiten von ca. 20 kDa und zwei identisch kleinen Untereinheiten von ca. 10 kDa [Riedl and Shi, 2004; Los et al., 2001].

Beim Menschen sind 12 verschiedene Caspasen bekannt, die aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Hauptgruppen eingeteilt werden (Abb. 1.8.). Die erste Gruppe bilden die Effektorcaspasen, die zweite Gruppe die Initiatorcaspasen und die dritte Gruppe ist an Entzündungsprozessen beteiligt [Fuentes-Prior and Salvesen, 2004]. Caspase-14 wird mit der Differenzierung von Keratinozyten in Verbindung gebracht und hat damit eine Sonderstellung [Eckhart et al., 2000]. Für die Apoptose sind nur die Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen von Bedeutung.

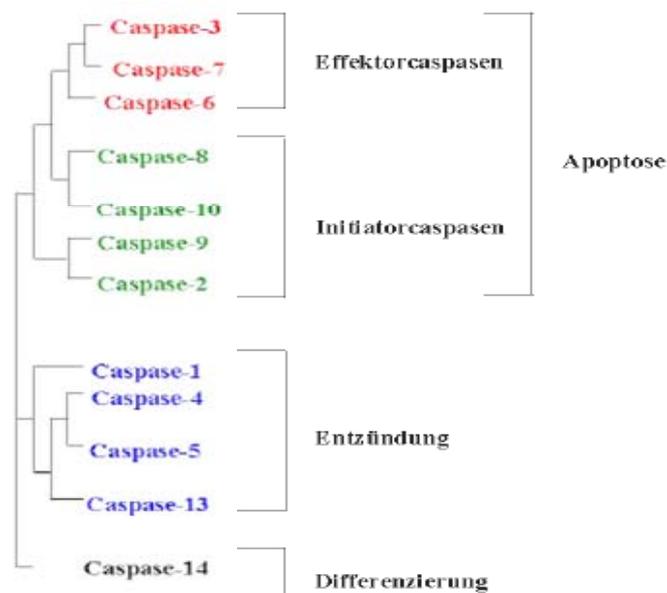


Abb. 1.8. Die Phylogenese der Caspasen

### 1.4.1. Initiatorcaspasen

Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10. Sie besitzen eine große Pro-Domäne, die Aminosäuresequenzen für die Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adaptoren beinhalten [Stennicke and Salvesen, 2000]. Pro-Caspase-9 bildet mit Apaf-1 und Cytochrom C das Apoptosom, Pro-Caspase-8 bindet mit FADD und CD95 am DISC und Pro-Caspase-2, die nach genotoxischem Stress durch p53 aktiviert werden kann, ist an die Adaptorproteine PIDD (p53-induced protein with death domain) und RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) gebunden [Tinel and Tschopp, 2004].

### 1.4.2. Effektorcaspasen

Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7. Sie besitzen eine kurze Pro-Domäne, die durch aktivierte Initiatorcaspasen abgespalten werden kann und so aktiviert wird. Nach der Spaltung kontrollieren die Effektorcaspasen eine Vielzahl von Todessubstraten, die die Apoptose einleiten [Degterev et al., 2003]. Das am besten beschriebene Todessubstrat ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Hierbei handelt es sich um ein nukleares Protein, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist und direkt über Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert werden kann [Vermeulen et al., 2005].

### 1.4.3. Physiologische Caspase-Inhibitoren

Physiologische Inhibitoren der Caspasen sind verschiedene Proteine, die deren Aktivität durch Bindung an spezifische Peptid-Sequenzen hemmen. Von diesen IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) sind zurzeit acht humane Mitglieder bekannt: XIAP, NIAP, C-IAP1, C-IAP2, hILP-2, Survivin, Livin und BRUCE. Das gemeinsame Merkmal der IAPs ist die BIR Domäne (Baculovirus IAP Repeat), mit dem sie direkt an die aktiven Stellen der Caspasen binden und so deren enzymatische Aktivität inhibieren können [Wright and Duckett, 2005].

## 1.5. Die Caspasen-unabhängige Apoptose

Wahrscheinlich stellt die Caspase-unabhängige Form des programmierten Zelltodes einen Schutzmechanismus dar, bei dem sich Organismen gegen maligne Zellen schützen können, deren Caspase-Kaskade blockiert ist [Lockshin and Zakeri, 2004]. Die Apoptose ohne Beteiligung von Caspasen wird immer wieder kritisch und

kontrovers diskutiert. Dabei ist einer der am besten untersuchten Wege die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (apoptosis inducing factor – AIF) aus den Mitochondrien. Das AIF-Vorläuferprotein wird im Zytoplasma synthetisiert und dann in die Mitochondrien transportiert. AIF ist eine Endonuklease, die unter physiologischen Bedingungen im intermembranären Raum der Mitochondrien lokalisiert ist und dort als NADH-Oxidase in der Elektronentransportkette mitwirkt. Nach der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, gelangt AIF ins Zytosol, transloziert zum Nukleus und veranlasst Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung [Krantic et al., 2007]; [Lorenzo and Susin, 2007].

Die synonyme Verwendung des Begriffes Apoptose und programmierter Zelltod wird ebenfalls kritisch und kontrovers diskutiert. Heute unterscheidet man eher zwischen programmiertem Zelltod durch Caspasen-Aktivierung, mit begleitender Caspasen-Aktivierung, sowie ohne Caspasen-Aktivierung. Je nach morphologischer Veränderung und beteiligten Proteinen werden diese alternativen Wege des programmierten Zelltodes als Autophagie, Mitotische Katastrophe oder Paraptosis beschrieben [Kroemer et al., 2009].

Bei der Autophagie werden zunächst Zellorganellen und Zytoplasma in Vesikel, die Autophagosomen, eingeschlossen. Durch die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen entstehen Autolysosomen, in denen ein Abbau durch saure, lysosomale Hydrolasen erfolgt. Die Autophagie ermöglicht den Abbau von Viren, Bakterien und Fremdeiweißen in der Zelle. Sie ist aber auch ein Schutzmechanismus bei einem Nährstoffmangelzustand der Zelle, um eine Notversorgung mit Energie durch eine Selbstverdauung zu gewährleisten. Nimmt die Selbstverdauung überhand, geht die Zelle zugrunde [Kroemer et al., 2009].

Die Mitotische Katastrophe kann bei Zellen mit fehlerhaftem Zellzyklus durch DNA-Schäden oder nach Behandlung mit Mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien erfolgen. Diese Art von Zelltod tritt in der Metaphase der Mitose auf. Die Morphologie kann der Apoptose aber auch der Nekrose gleichen [Kroemer et al., 2009].

Die Paraptosis wird durch mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) ausgelöst. Deren Aktivität zeigt sich im Anschwellen bis hin zum Platzen der Mitochondrien und in der Vakuolisierung des Cytoplasmas [Broker et al., 2005].

Ein weiterer Weg in den programmierten Zelltod ohne die Beteiligung von Caspasen kann über die Lysosomen und deren Proteasen, die Cathepsine verlaufen (s.u.). Hierbei kann man nicht von einem Signalweg sprechen, sondern eher von mehreren

---

Signalwegen, die sich mit typischen Mediatoren der Apoptose kreuzen [Broker et al., 2005].

### **1.6. Die Funktion der Cathepsine in der Apoptose**

Die Cathepsine sind hauptsächlich in den Lysosomen lokalisiert. Die meisten gehören zur Familie der Cystein-Proteasen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und Y). Einige gehören zu den Serin-Proteasen (Cathepsin A und G) und zu den Aspartat-Proteasen (Cathepsin D und E). Die Cathepsine werden als inaktive Zymogene mit einer Pro-Domäne im Zytoplasma synthetisiert. Bei der Inkorporation des Enzyms in das Lysosom wird die Pro-Domäne abgespalten und die Protease aktiviert. Die Cathepsine werden vor allem über den pH-Wert, aber auch über posttranslationale Modifikation und Proteolyse reguliert. Ihre Aufgabe besteht intralysosomal vor allem in der Protein-Degradation nach Autophagie [Chwieralski et al., 2006]; [Kroemer and Jaattela, 2005].

Apoptose unter Beteiligung von Cathepsinen setzt deren Freisetzung aus den Lysosomen in das Zytosol voraus. Dies kann durch verschiedene Stimuli, wie z.B. oxidativen Stress oder Chemotherapeutika, erfolgen. Im Zytosol können Cathepsine Substrate spalten und so Apoptose auslösen. Verschiedene Cathepsine können auch Bid zu t-Bid spalten. So kann der intrinsische Apoptoseweg aktiviert werden, was eine Verbindung zur Caspasen-Kaskade darstellt. Ebenfalls können antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1, von Cathepsinen gespalten werden, was die Mitochondrien destabilisiert und wieder in den mitochondrialen Apoptoseweg führt [Turk and Stoka, 2007].

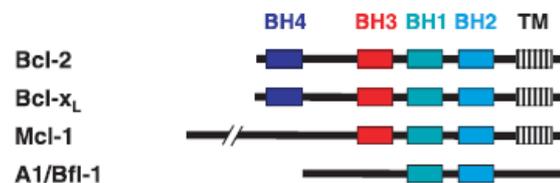
Ob oder wie Cathepsine direkt Apoptose auslösen können ist unklar. Ebenso offen ist die Frage, ob Cathepsine die Hauptakteure in diesem Signalweg sind, oder ob sie nur an einem Feedback-System beteiligt sind [Stoka et al., 2007].

### **1.7. Die Proteine der Bcl-2 Familie**

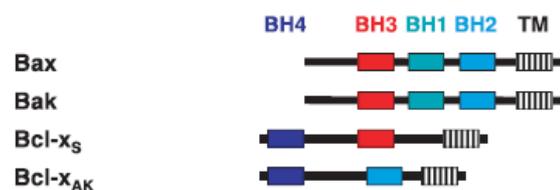
Die Apoptose-regulierende Genfamilie der Bcl-2-Proteine wurde nach ihrem ersten Mitglied Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) benannt [Tsujiimoto et al., 1984]. Weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie bzw. verwandte Proteine wurden aufgrund von Sequenzhomologie oder ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert und klassifiziert [Chao and Korsmeyer, 1998]. Je nach Aktivität können sie in zwei Hauptgruppen von antiapoptotischen und proapoptotischen Proteinen unterteilt werden (Abb. 1.9.).

Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen eine entscheidende regulative Bedeutung bei der mitochondrial vermittelten Apoptose. Außerdem haben sie die Fähigkeit zur Bildung von Homo- oder Hetero-Dimeren mit anderen Mitgliedern der Familie [Chipuk and Green, 2008]. Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-BH4) mit jeweils alpha-helikaler Struktur. Sie können miteinander über Bindung ihrer BH-Domänen interagieren. Bei einer Heterodimerisierung zwischen einem pro- und einem anti-apoptotischen Bcl-2 Protein bindet das pro-apoptotische Protein mit seiner exponierten BH3 Domäne an die BH1, BH2 und BH3 Domänen des anti-apoptotischen Proteins. Diese drei BH-Domänen bilden dabei eine Struktur, die als hydrophobe Tasche bezeichnet wird. Die BH4 Domäne des anti-apoptotischen Proteins dient zur Stabilisierung [Hossini and Eberle, 2008]. Die heterodimere Bindung zwischen anti- und pro-apoptotischen Bcl-2 Proteinen neutralisiert die Aktivität beider Proteine, wohingegen die Dimerisierung zweier pro-apoptotischer Proteinen ihre Wirkung verstärkt [Daniel et al., 2003].

#### Anti-apoptotisch / Multidomäne



#### Pro-apoptotisch / Multidomäne



#### Pro-apoptotisch / BH3-only



**Abb. 1.9. Schematische Darstellung der Struktur von anti- und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie aus [Eberle et al., 2008]**

### 1.7.1. Anti-apoptotische Multidomänen Proteine

Hierzu gehören der Namensgeber Bcl-2, sowie u.a. Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 und A1/Bfl-1. Sie besitzen bis zu vier BH-Domänen. Drei BH-Domänen bilden dabei eine Struktur, die als hydrophobe Tasche bezeichnet wird. Diese dient bei einer Heterodimerisierung als Bindungsstelle [Hossini and Eberle, 2008].

### 1.7.2. Pro-apoptotische Multidomänen Proteine

Hierzu gehören u.a. Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub> und Bcl-x<sub>AK</sub>. Ein notwendiges Charakteristikum aller pro-apoptotischer Proteine scheint die BH3-Domäne zu sein. Die Ausnahme von dieser Regel bildet Bcl-x<sub>AK</sub>, welches über keine BH3-Domäne verfügt, aber signifikant Apoptose in Melanomzellen induziert [Hossini et al., 2006].

### 1.7.3. Pro-apoptotische BH3-only Proteine

Hierzu gehören u.a. Bid, Bik/Nbk, Bad, Noxa und Puma. Bei diesen pro-apoptotischen Proteinen besteht das Charakteristikum darin, dass sie ausschließlich die BH3-Domäne aufweisen. Bid und Puma können an Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 und A1/Bfl-1 binden. Bad kann an Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> binden. Noxa kann an Mcl-1 und A1/Bfl-1 binden. Diese Bindungen führen zu einer Inaktivierung der anti-apoptotischen Wirkung [Chipuk and Green, 2008].

### 1.7.4. Die Rolle der Bcl-2 Proteine in der mitochondrial vermittelten Apoptose

Die Bcl-2-Proteine befinden sich an der äußeren Mitochondrienmembran. Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine stabilisieren das mitochondriale Membranpotential und die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine tragen zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation – MOMP) und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials bei [Kim et al., 2006].

Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak können durch Oligomerisierung und allosterische Konformationsänderung Poren in der Mitochondrienmembranen bilden. Alternativ wird vermutet, dass sie die Öffnung der PTP (permeability transition pore) regulieren. Diese bildet sich aus Komplexen von VDAC (voltage dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran mit ANT (adenine nucleotide translocator) in der inneren Mitochondrienmembran [Chipuk and Green, 2008]. Außerdem wird diskutiert, dass Bax einen Ionenkanal bilden kann, der zur

Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials beiträgt. Darüber hinaus können Bax-Oligomere mit dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC größere Kanäle zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bilden. Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax einer negativen Kontrolle durch Heterodimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> [Green and Kroemer, 2004].

Durch jegliche Art von Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kann es zu einer Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen, wie Cytochrom C, AIF (apoptosis inducing factor), Endonuklease G, Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI) und HtrA2/Omi (High temperature requirement A2), aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol kommen [Chipuk and Green, 2008].

### **1.8. Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species – ROS)**

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species - ROS) sind Formen des Sauerstoffs, die schnelle und starke Oxidationen bis hin zu oxidativem Stress hervorrufen können. Zu ihnen gehören freie Radikale wie das Superoxid-Anion (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) oder das Hydroxyl-Radikal (OH•), aber auch Peroxide wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und molekulare Oxidantien wie Ozon (O<sub>3</sub>) oder Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Sie werden von allen aeroben Zellen als Nebenprodukte von Stoffwechselreaktionen und als Antwort auf verschiedene Stimuli gebildet. Sie haben verschiedene physiologische Aufgaben z.B. als Signalmoleküle zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF-κB oder als Aktivatoren für Proteine wie Tyrosinkinasen oder MAP-Kinasen [Fleury et al., 2002].

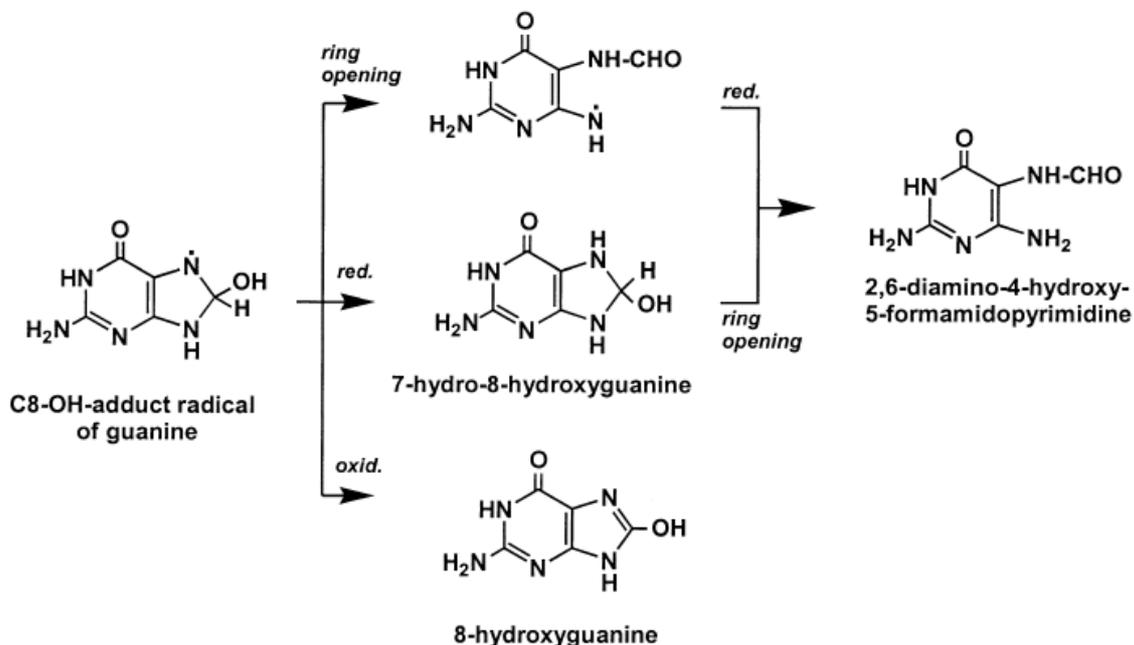
ROS können auch an der Apoptose-Regulation beteiligt sein. ROS-induzierte Schäden der Proteine und Lipide der Membranen können zu mitochondrialen und lysosomalen Fehlfunktionen führen [Salganik, 2001]. ROS-induzierte Schäden der DNA können DNA-Fragmentierung und DNA-Strangbrüche nach sich ziehen [Dizdaroglu et al., 2002]; [Pelicano et al., 2004].

Proteine können direkt durch oxidative Modifikationen von Aminosäure-Seitenketten und durch ROS-induzierte Peptid-Spaltungen geschädigt werden. Dies kann zu intramolekularen Quervernetzungen und Bildung von Protein-Aggregaten führen. Die oxidative Schädigung von Proteinen mit Redox-Funktionen, wie die metallhaltigen Enzyme Cytochrom C, Catalase und Glutathion, kann den Redox-Haushalt der Zelle stören. Die Oxidation von Catalasen und Peroxidasen vermindert die Fähigkeit der

Zelle Wasserstoffperoxid zu eliminieren und fördert dadurch einen erhöhten ROS-Spiegel und damit den oxidativen Stress [Orrenius et al., 2007].

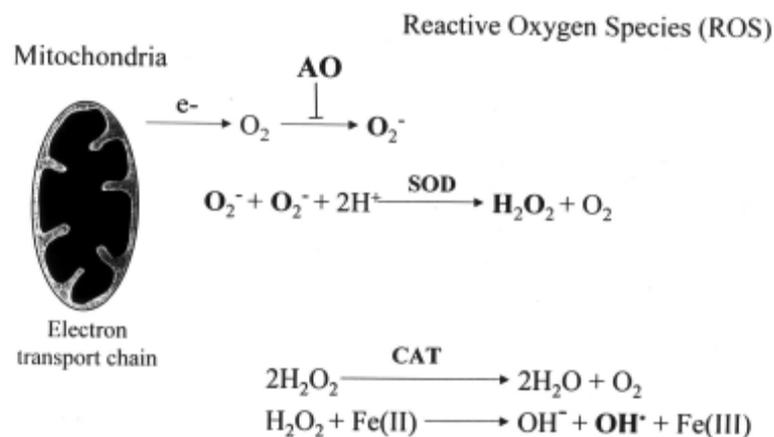
Lipide können durch Peroxidation zu Peroxyl- und Alkoxy-Radikal-Intermediaten oxidiert werden, die wiederum Peroxidationen nach sich ziehen und zu schweren Membranschäden führen können. Lipidperoxidation schädigt die Membranintegrität und fördert die Membranpermeabilität [Pelicano et al., 2004].

DNA-Modifikationen werden insbesondere durch die sehr reaktiven Hydroxyl-Radikale hervorgerufen. Dazu gehören Zucker- und Basen-Modifikationen, DNA-Strangbrüche und DNA-Protein-Quervernetzungen. Hydroxyl-Radikale können mit der C5- und C6-Position von Pyrimidin-Basen reagieren, wobei C5-OH- und C6-OH-Addukt-Radikale entstehen. Sie können ebenfalls mit der C4-, C5- und C8-Position von Purin-Basen reagieren, wobei C4-OH-, C5-OH- und C8-OH-Addukt-Radikale entstehen (Abb. 1.10.). DNA-Fragmentierung und DNA-Strangbrüche sind die Folge [Dizdaroglu et al., 2002] ; [Valko et al., 2006].



**Abb. 1.10. Der Mechanismus der Bildung von Guanin-Produkten aus dem C8-OH-Addukt-Radikal entstanden durch den Angriff von  $\cdot\text{OH}$  auf die C8-Position von Guanin aus [Dizdaroglu et al., 2002]**

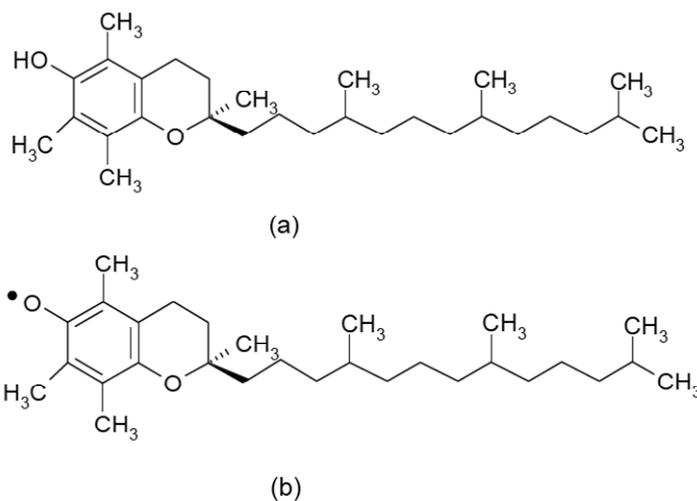
Die Mitochondrien als Kraftwerke der Zellen sind maßgeblich an der Produktion von ROS beteiligt. Sie besitzen jedoch auch ein Antioxidationsystem mit Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT) und einem kompletten Glutathion-Redoxsystem, bestehend aus Glutathion-Reduktase, reduziertem Glutathion (GSH) und Glutathion-Peroxidase. In den Mitochondrien können ROS durch die Freisetzung von Elektronen aus der Elektronentransportkette und der Reduktion von Sauerstoffmolekülen zu Superoxid-Anionen entstehen. Superoxide können durch die Superoxiddismutase (SOD) in weniger reaktives Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Wasserstoffperoxid wiederum kann durch die Catalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden. Bei der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Ionen der Übergangsmetalle, wie z.B. Eisen oder Kupfer, kann in einer Fenton-Reaktion die aggressivste Form von ROS, das Hydroxyl-Radikal, entstehen (Abb. 1.11.). Es lässt sich erkennen, dass ein ausgeglichener ROS-Haushalt für Zellen lebenswichtig ist [Salganik, 2001].



**Abb. 1.11. Die Entstehung von ROS durch die Mitochondrien und die Fenton-Reaktion mit Eisen und Wasserstoffperoxid aus [Salganik, 2001]**

Die Entstehung von ROS kann durch antioxidativ wirkende Substanzen abgefangen werden. Zu den physiologisch wirkenden Antioxidantien gehören die Vitamine C und E, sowie die Gruppe der Carotinoide und Flavonoide und einige Mineralstoffe wie Zink, Selen und Mangan [Collins, 1999].

Als Beispiel sei Vitamin E beschrieben (Abb. 1.12). Vitamin E reagiert mit Radikalen zu einem Vitamin E-Radikal und zu einem nicht radikalischen Produkt. Das Vitamin E-Radikal ist dabei mesomeriestabilisiert und daher für ein Radikal relativ reaktionsträge. Das Vitamin E-Radikal reagiert mit einem weiteren Radikal zu einer oxidierten Form von Vitamin E und zu einem nicht radikalischen Produkt.



**Abb. 1.12.** (a)  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), (b)  $\alpha$ -Tocopherol-Radikal (Vitamin E-Radikal) nach [Oral et al., 2006]

### 1.9. Nukleosid-Analoga

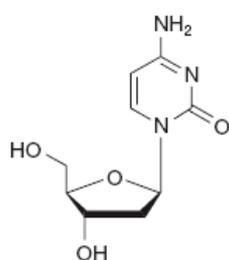
Nukleosid-Analoga stellen eine wichtige Gruppe von Chemotherapeutika bei der Behandlung von Krebs-Erkrankungen und Virus-Infektionen dar. Die meisten Substanzen entfalten ihre Wirkung durch Störung der DNA-Replikation. Es gibt aber auch Mechanismen, bei denen DNA-Strangbrüche durch direkte DNA-Schädigung entstehen [Sampath et al., 2003].

Einige Nukleosid-Analoga können Apoptose induzieren, wobei eine Schädigung der DNA nur ein Schritt von vielen ist. Es können Veränderungen im Potential und der Permeabilität der Mitochondrienmembranen hervorgerufen werden. Ebenso kann eine Schädigung der Lysosomen stattfinden. Die Translokation der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak fördert diese Ereignisse. Anti-apoptotische Bcl-

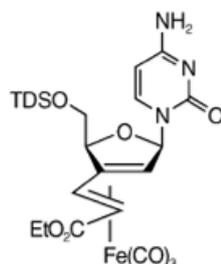
2-Proteine können durch einen Schutz der Mitochondrien die Resistenz gegenüber Nukleosid-Analoga erhöhen [Ewald et al., 2008].

Durch die Modifikation von Nukleosid-Analoga entstehen immer neue Wirkstoffe. Eine aktuelle Überlegung ist dabei eine Verbindung mit organischen Metall-Komplexen. Metalle verhelfen durch ihre Vielzahl an Oxidationsstufen zu neuen Möglichkeiten, die durch organische Verbindungen alleine nicht gegeben sind. Ferrocenium-Verbindungen waren die ersten Eisenkomplexe mit einer beschriebenen Anti-Tumor-Aktivität (Abb. 1.12.). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität nicht auf einer direkten Bindung mit der DNA basiert, sondern auf der Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, die zu oxidativen DNA-Schäden führten [Ott and Gust, 2007].

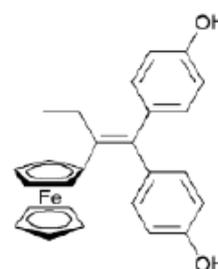
Das vor kurzem entwickelte, eisenhaltige Cytosin-Analogon Ferropoptosid (N69, 4g) (Abb. 1.13.) konnte in BJAB-Zellen Apoptose auslösen [Schlawe et al., 2004]. Im Focus dieser Arbeit stehen das proapoptische Potential von N69 und dessen Wirkungsmechanismus in Melanom-Zellen [Franke et al., 2009].



2'-Deoxycytidin



Ferropoptosid  
(N69)



Ferrocifen  
(Ferrocen-Derivat  
von Tamoxifen)

**Abb. 1.13. Deoxycytidin aus [Ewald et al., 2008], Ferropoptosid (N69) aus [Schlawe et al., 2004] und Ferrocifen aus [Ott and Gust, 2007]**

### 1.10. Fragestellung

Die Aggressivität des Malignen Melanoms basiert auf seiner hohen Chemotherapieresistenz, die mit Defekten in der Apoptose-Signalkaskade verbunden ist. Da bisherige Chemotherapeutika in der Melanom-Therapie nur wenig wirksam sind, sind zur Überwindung der Apoptose-Resistenz dringend neue Zytostatika und die Untersuchung ihrer Signalkaskaden notwendig.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das eisenhaltige Nukleosidanalogen N69 in humanen Melanomzellen Apoptose auslösen kann. Des Weiteren sollte gezeigt werden, über welchen Mechanismus eine mögliche Apoptoseinduktion erfolgt. Vier ausgewählte humane Melanomzelllinien (Mel-HO, A-375, Mel-2a und Sk-Mel-13) standen zur Verfügung. Für den Einsatz des Zytostatikums wurden verschiedene Konzentrationen und Zeiten veranschlagt.

Ein Ansprechen sollte mit unterschiedlichen, typischen Merkmalen und Nachweisen der Apoptose gezeigt werden. Dazu gehörte die DNA-Fragmentierung, die in einem DNA-Fragmentierungs-ELISA geprüft werden sollte. Ebenso sollte die Apoptose-Induktion durch die Bisbenzimid-Färbung (Chromatin-Kondensation), die TUNEL-Färbung (Detektion fragmentierter DNA-Stränge) und die Zellzyklusanalyse (Zunahme der sub-G1-Fraktion, da apoptotische Zellen durch DNA-Fragmentierung und die Auswaschung dieser Fragmente einen niedrigeren DNA-Gehalt aufweisen) belegt werden. Da die Apoptose meist über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade verläuft, sollte eine mögliche Aktivierung beziehungsweise Spaltung von verschiedenen Caspasen im Western-Blot ermittelt werden. Ebenfalls sollten Bcl-2-Proteine im Western-Blot untersucht werden, die oftmals eine entscheidende Position in der Apoptose bzw. in der Apoptoseresistenz einnehmen.

Melanomzellen reagieren oftmals nicht nach bisher bekannten Signalkaskaden. Deshalb sollten während dieser Arbeit aus sich ergebenden Resultaten weitere Mechanismen in Erwägung gezogen werden. Genaue Kenntnisse der biochemischen Vorgänge stellen eine Voraussetzung zur Überwindung von Apoptose- und Therapie-Resistenz dar.

## 2.1. Material

### 2.1.1. Material für die Zellkultur

#### 2.1.1.1. Nährlösungen

##### Zellkulturlösungen

- FCS – Fetal Calv Serum (Biochrom)
- Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml / 10.000 µg/ml (Biochrom)
- PBS – Phosphate Buffered Saline w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Biochrom)
- Trypsin / EDTA 0,05 / 0.02% (w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Biochrom)
- Geneticin (Gibco): 50 mg/ml gelöst in PBS und sterilfiltriert
- Hygromycin (Boehringer): 50 mg/ml Lösung
- CaCl<sub>2</sub> (Sigma): 15 mg/ml gelöst in Aqu. bidest. und sterilfiltriert
- Insulin (Sigma)
- BFGF (Boehringer): 100 µg/ml gelöst in PBS und sterilfiltriert
- BPE (Gibco)
- Apo-Transferrin (Sigma)
- Hydrocortison (Sigma): 100 µg/ml gelöst in Aqu. bidest. und sterilfiltriert
- Cholera toxin (Calbiochem)

##### Nährmedien

- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glucose 4,5 g/l (Gibco)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (Biochrom)
- Melanozytenmedium (MCDB) (Biochrom)

In 500 ml Medium wurden 50 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin gegeben.

In das DMEM für die Klone wurden zusätzlich 2 ml Geneticin (50mg/ml) und 0,5ml Hygromycin (50mg/ml) gegeben.

In das RPMI Medium wurden zusätzlich 1,5 ml L-Gluthamin gegeben.

In 500 ml MCDB Medium wurden 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 250 µl Insulin (in 10 ml Medium sterilfiltriert), 10 µl BFGF-Lösung, 2 ml BPE, ½ Ampulle Apo-Transferrin, 2,5 ml Hydrocortison-Lösung und 50 µl Cholera toxin gegeben.

**2.1.1.2. Eukaryotische Zellen****Humane Melanom-Zelllinien**

- Aus Primärtumoren:

A-375 [Giard et al., 1973], Mel-HO [Holzmann et al., 1988].

- Aus Metastasen:

Mel-2A [Bruggen et al., 1981], SK-Mel-13 [Carey et al., 1976].

Sub-Klone von Mel-HO and A-375 sind aus einer stabilen Transfektion von einem pIRES-Bcl-2-Konstrukt (MelHO-Bcl-2, A375-Bcl-2) oder von einem pIRES-Leer-Plasmid (MelHO-Mock, A375-Mock) hervorgegangen. Das pIRES Plasmid stammt von Clontech (Palo Alto, California, USA). Die beschriebenen Sub-Klone lagen vor Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor [Raisova et al., 2001].

**Humane Leukämie-Zelllinien**

Die humane Leukämie-Zelllinie Jurkat stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) [Schneider et al., 1977].

**Humane Melanozyten**

Es wurden mehrere Melanozyten-Kulturen (normal human melanocytes – NHM) aus menschlichen Vorhäuten isoliert. Diese standen im Labor zur Verfügung.

**2.1.1.3. Apoptose-Stimulanzen**

- N 69, 40 mM gelöst in EtOH 98% [Schlawe et al., 2004]
- Doxorubicinhydrochlorid (Alexis), 0,5 mM gelöst in Aqu. bidest.
- CH-11 (agonistischer CD95-Antikörper, Maus IgM; Beckman Coulter, Krefeld, Germany), 100 ng/ml

**2.1.1.4. Caspase- und Cathepsin-Inhibitoren**

<u>Name (Sequenz)</u>	<u>Substrate</u>	<u>Firma</u>
zVAD (Z-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspasen, Cathepsine, Calpaine	Calbiochem
zWEHD (Z-Trp-Glu-His-Asp-FMK)	Caspase-1	R&D Systems
zVDVAD (Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspase-2	R&D Systems
zDEVD (Z-Asp-Glu-Val-Asp-FMK)	Caspase-3	R&D Systems
zYVAD (Z-Tyr-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspase-4	R&D Systems
zVEID (Z-Val-Glu-Ile-Asp-FMK)	Caspase-6	R&D Systems
zIETD (Z-Ile-Asp-Thr-Asp-FMK)	Caspase-8	R&D Systems
zLEHD (Z-Leu-Glu-His-Asp-FMK)	Caspase-9	R&D Systems
zAEVD (Z-Ala-Glu-Val-Asp-FMK)	Caspase-10	R&D Systems
zLEED (Z-L-E-E-D-FMK)	Caspase-13	R&D Systems
zFA-FMK (Z-Phe-Ala-FMK)	Cathepsin B, L	Calbiochem
CA-074-Me (L-Isoleu-Pro-Me)	Cathepsin B	Calbiochem

**2.1.1.5. Antioxidantien**

- **Vitamin E**, Fluka, Germany, 50 mM gelöst in EtOH 98%
- **N-Acetylcystein**, Fluka, Germany, 50 mM gelöst in EtOH 98%

**2.1.2. Material für die Protein-Analytik****2.1.2.1. SDS-PAGE****Protein-Marker**

Prestained SDS-Page Standard (Broad Range)      BioRad

**Protein-Bestimmung**

BCA Protein Assay Kit      Pierce

Coomassie-Färbelösung      Roth

**Standardpuffer für die Protein-Extraktion: 10 ml**

100 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5), 480 µl NaCl (3M), 500µl SDS (10%), 50 µl Nonidet P-40, 36 µl Aprotinin, 100 µl Leupeptin, 100 µl Pepstatin, 100 µl PMSF (100 mM), 20 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), 8,5 ml Aqu. bidest.

**Puffer für den Nachweis von Caspase-Spaltprodukten:**

CHAPS-Puffer (Cell Signaling)

**Harnstoff-Puffer für den Nachweis von PARP-Spaltprodukten: 10 ml**

625 µl Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 6 ml Harnstoff (10 M), 1,15 ml Glycerol, 1 ml SDS (20%), 0,125 mg Bromphenolblau, 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 725 µl Aqu. bidest.

**Homogenisierungs-Puffer für den Nachweis von Cathepsin-Spaltprodukten:**

250 mM Sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA

**Puffer für die Fraktionierung von Zellen:**

Mitochondria / Cytosol Fractionation Kit (Biovision)

**Protease-Inhibitoren**

Pepstatin 0,5 mg/ml in Aqu. bidest.	Sigma
Leupeptin 10 µg/ml in Aqu. bidest.	Sigma
Aprotinin 10% in Aqu. bidest.	Sigma
PMSF 100 mM in DMSO	Sigma

**Protein-Probenpuffer (4x) 10 ml**

2,5 ml Tris-HCl (1M, pH 6,8), 0,2 g SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml β-Mercaptoethanol, 4mg Bromphenolblau, 1,5 ml Aqu. bidest.

**Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml**

19,7 g Tris-Base, 1,0 g SDS ad 500 ml Aqu. bidest.

**Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml**

38,5 g Tris-Base, 9,3 g Tris-HCl, 1,0 g SDS ad 500 ml Aqu. bidest.

<b>Sammelgel, 5 ml</b>	<b>5%</b>
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	0,84 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqu. bidest.	1,6 ml
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

<b>Trenngel, 10 ml</b>	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
Trenngelpuffer	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
Aqu. bidest.	2,5 ml	1,7 ml	1,0 ml	-
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

#### **Laufpuffer nach Laemmli (5x, 2 l)**

30,4 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS ad 2 l Aqu. bidest.

#### **2.1.2.2. Western Blot**

##### **Transferpuffer (1x, 2 l)**

11,64 Tris-Base, 4,36 g Glycin, 3,7 g SDS, 400 ml Methanol ad 2 l Aqu. bidest.

##### **PBS-Tween (0,05%)**

9,55 g PBS Dulbecco, 0,5 ml Tween ad 1 l Aqu. bidest.

##### **Milchpulver (5%)**

5 g Blotting Grade Non-Fat Dry Milk Fatfree (Biorad) ad 100 ml PBS-Tween

**Primäre Antikörper**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
AIF	Ziege	1:200	Santa Cruz
β-Aktin	Maus	1:5000	Sigma
Bad	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Bak	Kaninchen	1:500	Dako
Bax	Kaninchen	1:400	Santa Cruz
Bcl-2	Maus	1:400	Santa Cruz
Bcl-x <sub>L</sub>	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
Caspase-2	Ratte	1:200	Alexis
Caspase-3-Spalt	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-6	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Caspase-7	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Caspase-8	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-9	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Cathepsin D	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cathepsin L	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cytochrom C	Maus	1:1000	BD Pharmingen
Hsp-60	Maus	1:200	Cayman
Mcl-1	Maus	1:200	Santa Cruz
Noxa	Kaninchen	1:500	Pro Sci
Puma	Kaninchen	1:1000	Epitomics
PARP	Maus	1:5000	Biomol
p53	Maus	1:500	Santa Cruz
VDAC	Maus	1:1000	Calbiochem

**Sekundäre Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
Anti-Anti-Kaninchen konjugiert mit HRP	1:5000	Dako
Anti-Anti-Maus konjugiert mit HRP	1:5000	Dako
Anti-Anti-Ziege konjugiert mit HRP	1:5000	Dako
Anti-Anti-Ratte konjugiert mit HRP	1:5000	Dako

---

### 2.1.3. Material für Apoptose- und Nekrose-Nachweise

#### 2.1.3.1. Kits

- Cell Death Detection Kit (DNA fragmentation) Roche
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH release) Roche
- In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL) Roche
- Mitochondria / Cytosol Fractionation Kit Biovision
- Caspase-3-Activity-Assay Cell Signaling

#### 2.1.3.2. Färbungen

- **Bisbenzimid**, Sigma, Germany  
1 µg/ml in PBS  
**Bisbenzimid-Fixierungslösung**  
4 g Formaldehyd ad 100 ml PBS  
**Bisbenzimid-Permeabilisierungslösung**  
0,2% Triton X-100 ad 100 ml PBS
- **TUNEL**, Roche Diagnostics, Germany  
TUNEL-Kit  
**TUNEL-Fixierungslösung**  
4 g Paraformaldehyd ad 100 ml PBS (pH 7,4)  
**TUNEL-Permeabilisierungslösung**  
0,1% Triton X-100, 0,1% NaCl ad 100 ml PBS
- **Propidiumiodid**, Sigma, Germany  
100 µl Triton X-100 (10%), 100 µl NaCl (10%), 20 µl PI (10 mg/ml), 200 µl RNase A (10 mg/ml) ad 10 ml PBS
- **Acridin Orange**, Sigma, Germany  
15 µg/ml in PBS

- **JC-1** , Sigma, Germany  
2,5 µM in PBS
- **H<sub>2</sub>DCFDA** (2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate), Molecular Probes, USA  
15 µM in PBS

#### 2.1.4. Sonstige Materialien

##### 2.1.4.1. Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 : 1)	Biorad
APS	Biorad
Bromphenolblau	Biorad
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
Formaldehyd	J.T. Baker
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
Harnstoff	Merck
Isopropanol	J.T. Baker
β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J.T. Baker
Mounting-Medium	MoBiTec
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Non Fat Dry Milk	Biorad
PBS	Biochrom
Ponceau S	Sigma
RNase A	Sigma
SDS	Merck
Sucrose	Merck
TEMED	Biorad
Tween-20	Sigma

---

Triton-X-100	Merck
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Salzsäure	Merck

#### 2.1.4.2. Materialien

Cap Tubes (10ml und 50 ml)	Falcon
Filmkassetten	Kodak
Filterpapier 3M	Whatman
Gewebekulturflaschen	Falcon
Glas-Homogenisator (Douncer)	Biorad
Heparin-Spritzen	Beckton Dickinson
Hybridisierungs-Transfermembran	Du Pont
Hyperfilm ECL	Amersham
Kryoröhrchen	Falcon
Mikrofilter (0,2 µm)	Braun
Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83)	Schleicher & Schuell
Petrischalen	Falcon
Röntgenfilme	Fuji
Steril-Filter	Milipore
6-well Zellkultur-Platten	Falcon
24-well Zellkultur-Platten	Nunc
96-well Zellkultur-Platten	Nunc
Zellschaber	Costar

#### 2.1.4.3. Geräte

Autoklav	Webeco
Bidest-Gerät Destamat	Heraeus
Brutschrank	GFL
Durchflusszytometer FACS Calibur	Beckton Dickinson
Elektrophoreseapparaturen	Pharmacia Biotech
ELISA-Photometer	Dynatech
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

Heizblock	Tech
Mikroskop	Olympus
Mikrowelle	Bosch
pH-Meter mit Ingold-Elektrode 405	Knick
Phosphoimager	Fuji
Photometer	Beckman
Pipettierhilfe	Hirschmann
Schüttler	Köttermann
Vortex	Bender&Holbein
Wasserbad	Braun
Zentrifugen:	
Cytospin Zentrifuge	Shandon
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Vakuumzentrifuge	Heraeus

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Sterilisation von Lösungen und Nährmedien

Alle Puffer und Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Filtrieren sterilisiert (Sterilfilter 0,2 µm). Die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur bestimmt. Prozentangaben sind als Gewicht pro Volumen angegeben.

#### 2.2.1.2. Passage eukaryotischer Zellen

Melanomzellen und Melanozyten-Kulturen wurden in DMEM-1965- bzw. RPMI-1640-Medium mit 10% FCS in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verwendeten Melanomzellen sowie Melanozyten-Kulturen wachsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Die Lymphom-Zelllinie Jurkat wächst nicht adhärent. Das Zellmedium wurde etwa jeden dritten Tag erneuert, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gespült wurden, um tote Zellen und saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Um die Zellen zu passagieren, wurden diese mit PBS gewaschen und ca. 5 min mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden wurden sie mit Medium von der Kulturflasche abgespült und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das FCS im Medium inaktiviert die proteolytischen Eigenschaften des Trypsins. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

#### 2.2.1.3. Lagerung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, trypsinisiert und in 10% FCS-haltigem Medium 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 25% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO in der Lösung verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und langsam über Nacht bei -70°C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen bei -140°C aufbewahrt.

#### 2.2.1.4. Inhibition von Caspasen und Cathepsinen

200.000 Zellen pro well wurden in 6-well Platten ausgesät und nach 24 h für 1 h mit irreversiblen Caspase- bzw. Cathepsin-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit N69 (20  $\mu$ M; 24 h) behandelt. Die Inhibitoren binden selektiv an die aktiven Proteasen und verhindern damit deren Aktivität. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und mit Medium auf ihre jeweilige Endkonzentrationen verdünnt. 24 h nach Behandlung wurden die Zellysate mit dem Apoptose-ELISA untersucht. Parallel wurde der Zytotoxizitäts-Assay im Kulturmedium durchgeführt [Oppermann et al., 2005].

### 2.2.2. Proteinanalytische Methoden

#### 2.2.2.1. Herstellung von Protein-Lysaten

Die Sedimente von je ungefähr  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 100-500  $\mu$ l kaltem Lysepuffer in Eppendorfgefäßen mit 1 ml Spritzen ungefähr 10 mal geschert, 10 min bei 13.000 rpm bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Die weißlichen Rückstände bestanden hauptsächlich aus Zelltrümmern und wurden verworfen. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.2. Herstellung von Caspase-Spaltprodukt-Lysaten

Für den Nachweis von Caspase-Spaltprodukten im Western Blot wurde CHAPS-Puffer verwendet, der stabilisierend auf die Spaltprodukte wirkt. Etwa  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden pelletiert und in ca. 200  $\mu$ l CHAPS-Puffer aufgenommen. Durch dreimaliges einfrieren und auftauen der Zellen wurden die Plasmamembranen zerstört. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand von Zelltrümmern getrennt und bei -20°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden in einem Coomassie-Gel bestimmt.

#### 2.2.2.3. Herstellung von PARP-Spaltprodukt-Lysaten

Für den Nachweis von PARP Spaltprodukten im Western Blot wurden ungefähr  $5 \times 10^6$  Zellen in Harnstoff-Puffer lysiert. Der Harnstoff unterstützt die Dissoziation, um das Protein PARP von der DNA zu lösen. Das Zellysat wurde für 15 s mit Ultraschall behandelt und für 15 min auf 65 °C erhitzt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.4. Herstellung von Cathepsin-Spaltprodukt-Lysaten

Zur Herstellung Lysosomen-freier Proteinextrakte wurden  $5 \times 10^7$  Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l Homogenisierungspuffer für 10 min auf Eis äquilibriert. Anschließend wurde die Zellschlamm in einen 1 ml Glas-Homogenisator überführt und mit 20-40 Stößen auf Eis homogenisiert bis etwa 50% der Zellen aufgebrochen waren. Zunächst wurde das Homogenisat für 10 min bei 4°C mit 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 min bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut verworfen, der Überstand vorsichtig abgenommen und bei 4°C mit 100.000 g für 30 min zentrifugiert. Der nun erhaltene Lysosomen-freie Überstand wurde bei -20°C eingefroren [Schutt et al., 2002].

#### 2.2.2.5. Herstellung von Zellfraktionierungs-Lysaten

Zur Bestimmung der Cytochrom C- und AIF-Freisetzung wurden  $5 \times 10^7$  Zellen trypsinisiert, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 800g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis äquilibriert. Die Zellen wurden in einem 1 ml Glas-Homogenisator mit 40-60 Stößen auf Eis homogenisiert bis circa 75% der Zellen aufgebrochen waren Das Homogenisat wurde mit 800 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um die Zellrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde zur Sedimentation der Mitochondrien mit 10.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der neue Überstand enthält die zytosolische Fraktion und wurde bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls bei -20°C gelagert. Es enthält die mitochondriale Fraktion, in der u.a. die Proteine Bax und Bak enthalten sind.

#### 2.2.2.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

##### BCA Protein Assay (Pierce)

Prinzip:

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Biureth-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren.  $\text{Cu}^+$  reagiert dann mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelat-Komplex, dessen Absorption im ELISA-Reader gemessen werden kann.

Protokoll:

Es wurden dreimal 1 µl Lysat und als Negativkontrolle dreimal 1 µl Lysepuffer in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden gegeben, die mit Lysepuffer 1:5 verdünnt wurden. Als Eichlösungen dienten verschiedene BSA-Konzentrationen, die mit dem gleichen Puffer wie die Proben verdünnt worden waren. Je Probe wurden 200 µl Reaktionsmix zugegeben. Die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten Konzentrationen an BSA konnten die Proteinmengen der Lysate berechnet werden.

### **Coomassie-Färbung (Roth)**

Die Proteinkonzentration von CHAPS-Extrakten wurde mit Hilfe eines Coomassie-Gels festgestellt. Dazu wurden je 10 µl einer Probe mit 3,3 µl Protein-Probenpuffer versetzt, 5 Min bei 95 °C denaturiert und in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Färbung wurde das Gel in 25%-iger Methanol- Lösung 30 min gewaschen. Zur Auswertung wurden die gefärbten Banden eingescannt und quantifiziert. Als Verifizierung wurde eine Kontroll-Probe mit bekannter Konzentration eingesetzt.

#### **2.2.2.7. Diskontinuierliche SDS-PAGE**

Prinzip:

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden.

Protokoll:

Für die Herstellung der SDS-Gele wurde das Elektrophoresesystem für Minigele der Firma BioRad verwendet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Isopropanol abgegossen und mit Filterpapier nachgetrocknet. Das Sammelgel wurde darüber geschichtet und ein Gel-Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt.

Die Zellysate wurden mit 1/3 Volumen 4 x Protein-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Gel-Kämme wurden nach vollständiger Polymerisation aus den Gelen herausgezogen, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x Laufpuffer bedeckt. Die Taschen wurden gespült, um diese von Luftblasen zu befreien. Die Proben wurden in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 80-160 V durchgeführt, bis die blaue Front fast aus den Gelen herausgelaufen war.

#### **2.2.2.8. Western Blot**

Prinzip:

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Dabei werden die Proteine durch das gebundene SDS negativ geladen, so dass sie von der Kathode zur Anode wandern. Auf der Membran werden über die Bindung spezifischer, primärer Antikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugierte, sekundäre Antikörper gebunden. Die Meerrettich-Peroxidase setzt ein Chemilumineszenzreagens um, das emittiertes Lumineszenzlicht auf Röntgenfilmen sichtbar werden lässt.

Protokoll:

Der Blot wurde in einer Wet-Blot-Kammer (BioRad) aufgebaut, so dass das Gel zur Kathode hin ausgerichtet liegt und die Nitrocellulose-Membran zur Anode zeigt. An den Außenseiten wurden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt. Die Blot-Komponenten wurden im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Die Kammer wurde auf Eis gestellt, um die entstehende Hitze abzufangen. Der Western-Blot erfolgte für 90 min bei 100 mA. Zum Nachweis des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S angefärbt. Diese Färbung ist reversibel, die Membran kann anschließend mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden. Die Nitrocellulosemembran wurde in einer Schale über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Trockenmilch in PBS-Tween inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

#### **2.2.2.9. Antikörperinkubation**

Die folgenden Schritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt. Nach dem Blockieren wurde die Membran ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in 5%-iger Milch-PBS-Tween-Lösung inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen worden war, wurde der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper in 5%-iger Milch-PBS-Tween-Lösung

zugegeben und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-Tween-Lösung gewaschen und anschließend einmal für 5 min mit PBS.

#### **2.2.2.10. ECL-Behandlung**

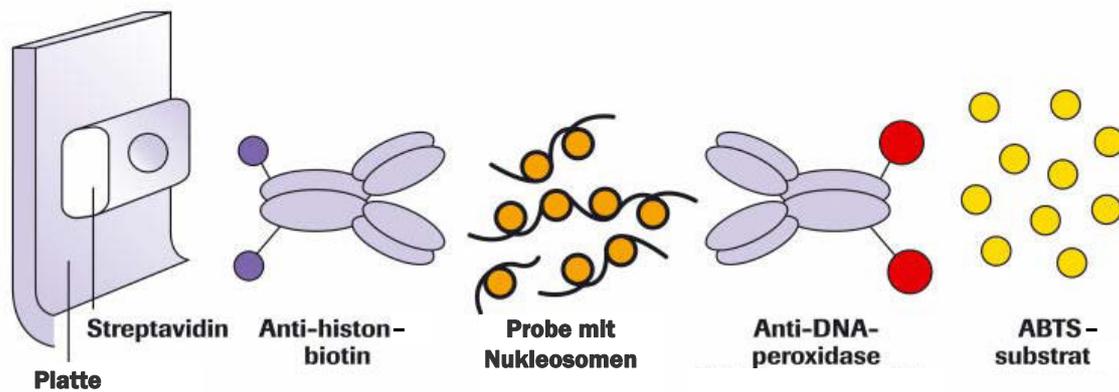
Die ECL-Reagenzien (Enhanced Chemoluminescence) (Amersham) wurden zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation unter Umschwenken wurde die Membran zwischen zwei Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme mit der Dauer von 1 Sekunde bis zu 1 Stunde aufgelegt. Zur Auswertung wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Markers identifiziert.

### **2.2.3. Apoptose und Nekrose Nachweise**

#### **2.2.3.1. DNA-Fragmentierungs-ELISA**

Prinzip:

Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche) lässt sich DNA-Fragmentierung in Zellysaten feststellen und somit Apoptose messen. Der Test basiert auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung zweier Antikörper gegen DNA und Histon-Proteine. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zellysaten. Im ersten Inkubationsschritt wird ein Anti-Histon-Antikörper adsorptiv an der Wand einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte fixiert, anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit Inkubationspuffer abgesättigt. Im zweiten Inkubationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Nukleosomen über ihren Histon-Anteil von dem an der Wand immobilisierten Antikörper gebunden. Im dritten Inkubationsschritt bindet Anti-DNA-Peroxidase (POD) an den DNA-Anteil der Nukleosomen. Nach dem Auswaschen des ungebundenen Peroxidase-Konjugates wird der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit ABTS als Substrat photometrisch bestimmt.



**Abb. 1.1. Cell Death Detection ELISA Kit.** Der Test wird in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt. Es bildet sich ein Komplex (Sandwich) aus Anti-Histon-Biotin-Antikörper und Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper mit den Nukleosomen des Zellysates. Die Detektion erfolgt über das ABTS-Substrat. Abbildung aus dem Datenblatt.

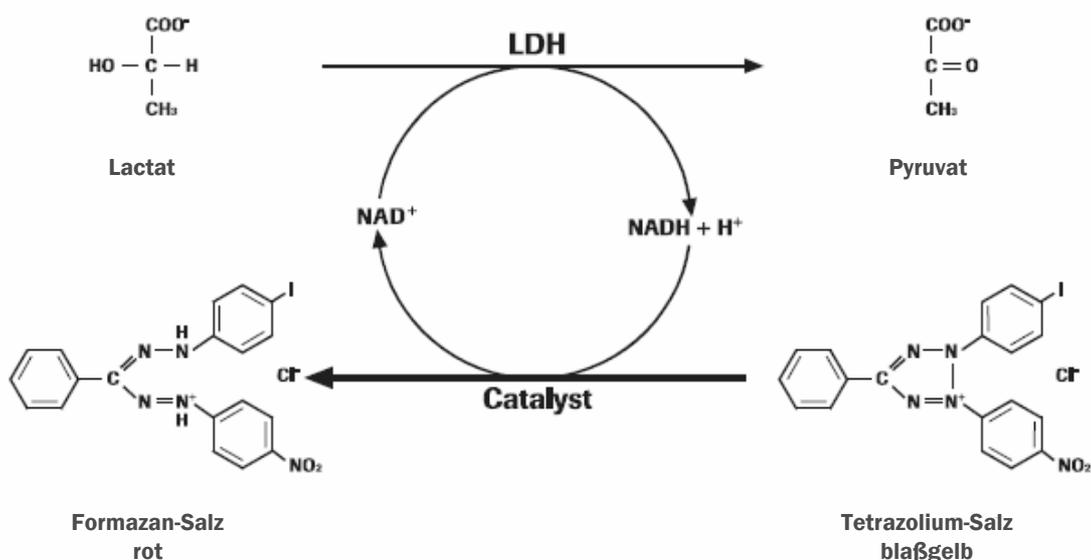
#### Protokoll:

Es wurden 200.000 Zellen pro well in 6-well-Platten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von N69 für verschiedene Zeiten behandelt. Dann wurde der Cell Death Detection ELISA durchgeführt. Die Platten wurden bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die verbleibenden Zellen mit 1 ml Lysepuffer pro well für 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden die Zellen erneut bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert. 5 µl der jeweiligen Proben und 15 µl Lysepuffer wurden auf die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 80 µl Immunreagenz Lösung wurden die Proben unter leichtem Schütteln für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen, bevor 100 µl Substrat-Lösung zugegeben wurde. Nach 5-10 min Inkubation wurde die Farbreaktion bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Kontrollwerte wurden gleich dem Wert 1 gesetzt und die gemessenen Werte auf die Kontrollen bezogen.

### 2.2.3.2. Zytotoxizitäts-Test

Prinzip:

Das Platzen der Zellen durch Schädigung der Plasmamembran (Nekrose) erfolgt meist durch äußere Einflüsse, wie z.B. toxische Reize, mechanische Schädigung oder Strahlung. Dadurch werden Enzyme, wie die Laktat-Dehydrogenase (LDH), aus dem Zytoplasma freigesetzt. Die Aktivität dieses zytosolischen Enzyms wird im isolierten Zellüberstand gemessen. Die Freisetzung der LDH wird mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche) quantifiziert. Die Aktivität dieses Enzyms wird nach zwei enzymatischen Reaktionen gemessen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, während  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt wird  $\text{H}^+$  auf ein Tetrazoliumsalz (gelb) übertragen, das dadurch zu einem Formazansalz (rot) reduziert wird. Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen.



**Abb. 1.2. Cytotoxicity Detection Kit.** Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Zellkultur-Überstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wodurch  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Nachfolgend wird  $\text{H}^+$  auf das Tetrazolium-Salz (gelb) übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz (rot) entsteht. Abbildung aus dem Datenblatt.

Protokoll:

Der Zytotoxizitäts-Test erfolgt parallel zum DNA-Fragmentierungs-ELISA mit dem Zellkulturüberstand, von dem 100  $\mu\text{l}$  jeder Probe abgenommen werden. Der Überstand wurde 1:4 verdünnt und in eine 96-well-Platte überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$

Reaktionsgemisch wurden die Proben bei Raumtemperatur 30 min im Dunkeln unter Schütteln inkubiert und bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Kontrollwerte wurden gleich dem Wert 1 gesetzt und die Werte der Proben darauf bezogen.

### **2.2.3.3. Wachstumskurven**

Prinzip:

Zur Erstellung von Wachstumskurven wird die Zelldichte kontinuierlich über eine Echt-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis, RTCA, xCELLigence, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) gemessen. Die Messtechnik basiert auf Mikroelektroden, die auf dem Boden jeden Wells einer speziellen 96-Well E-plate integriert sind. Der Widerstand der Zellen in einem Well steht in direktem Verhältnis zur Zelldichte.

Protokoll:

Pro Well wurden 10.000 Zellen ausgesät und nach 24 h mit N69 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Messung wurde über einen Zeitraum von etwa 60 h in Mess-Intervallen von 15 Minuten durchgeführt.

### **2.2.3.4. Caspase-3-Aktivitäts-Assay**

Prinzip:

Zur Messung der aktivierten Caspase-3 wird ein Sandwich-ELISA durchgeführt, der endogene Level von gespaltenen Caspase-3 detektiert.

Protokoll:

Es wurden 200.000 Zellen pro 6-well ausgesät und mit 20  $\mu$ M N69 für 6 h und 24 h oder mit 100 ng CH-11 für 24 h als Positivkontrolle inkubiert. Unbehandelte Kontrollen wurden jeweils parallel inkubiert.

### **2.2.3.5. Zellzyklus-Analyse**

Prinzip:

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS Calibur) lässt sich die Menge Propidiumjodid-gefärbter DNA einer einzelnen Zelle bestimmen. In gesunden Zellen ist die kleinste mögliche Menge an DNA vorhanden, wenn sich die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus befindet. In apoptotischen Zellen gelangen aufgrund der DNA-Fragmentierung kleine DNA-Fragmente aus dem Zellkern ins Zytosol. Permeabilisiert man die Plasmamembran, so gelangt diese extranukleäre DNA aus der Zelle und die

apoptotischen Zellen weisen einen geringeren DNA-Gehalt auf als Zellen, die sich in der G1-Phase befinden [Nicoletti et al., 1991].

Protokoll:

$5 \times 10^5$  Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h später mit N69 behandelt. Nach 3 h, 6 h, 16 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen trypsinisiert und mit 4°C kaltem PBS auf 1 Mio. Zellen / ml eingestellt. Die Zellen wurden für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 70% EtOH resuspendiert (1 Mio. Zellen / ml). Nun wurden die Zellen für 2 h bei -20°C eingefroren. Die Lösung wurde durchmischt, 1 ml abgenommen und 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2500 rpm) wurde das Pellet mit Propidiumjodid-Lösung (20 µg/ml) für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

#### **2.2.3.6. Bisbenzimid-Färbung**

Prinzip:

Für die Darstellung der Apoptose auf Einzelzellniveau verwendet man zur Zellkernanfärbung den Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst-33342). Bisbenzimid interkaliert in die DNA und zeigt angefärbt die Chromatin-Kondensation. Apoptotische Zellkerne erscheinen nach Bisbenzimid-Färbung stärker angefärbt und von geringerer Größe als gesunde Zellkerne.

Protokoll:

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 48 h nach Behandlung mit N69 trypsinisiert und mit PBS auf die Zellzahl 50.000/100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Bisbenzimid-Färbelösung (1 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und dann in Mounting-Medium eingebettet. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angegeben.

### 2.2.3.7. TUNEL-Färbung

Prinzip:

Die TUNEL-Färbung (Terminal dUTP Nick-End Labeling) färbt Zellen abhängig vom Grad ihrer DNA-Fragmentierung unterschiedlich stark. Das Enzym terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden an freie 3'-OH Enden der DNA. Bei der TUNEL-Reaktion werden DNA-Einzelstrangbrüche dargestellt, indem Fluorescein-markierte Nukleotide von der TdT in die DNA eingebaut werden.

Protokoll:

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 48 h nach Inkubation mit N69 trypsiniert und mit PBS auf die Zellzahl 50.000 / 100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur fixiert, einmal mit PBS gewaschen und für 2 min auf Eis in Permeabilisierungslösung inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit dem TUNEL-Reaktionsmix für 1 h bei 37 °C in feuchter Umgebung im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter einmaliger PBS-Wäsche wurden die Zellen mit Bisbenzimid-Lösung für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Mounting-Medium eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für die Quantifizierung wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angegeben.

### 2.2.3.8. Acridin-Orange-Färbung

Prinzip:

Acridin Orange ist ein pH-Indikator, der zum Anfärben von Lysosomen verwendet wird. In saurem Milieu ist Acridin Orange orange bis rot gefärbt (lysosomaler pH-Wert: 5,0), während es bei neutralem pH-Wert grün gefärbt ist (zytoplasmatischer pH-Wert: 7,0).

Protokoll:

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit N69 (20 µM; 48 h) und dann mit Acridine Orange (15 µg/ml; 30 min; 37°C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und mit PBS auf eine Zellzahl von 50.000 / 100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen für 10 min bei 800 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellfärbung wurde im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet [Landex and Kayser, 2004].

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h, 3 h, 6 h und 24 h) inkubiert, gewaschen, anschließend trypsinisiert, erneut gewaschen, dann mit Acridine Orange (15  $\mu$ g/ml; 15 min; 37°C) gefärbt und in PBS im FACS analysiert [Boya et al., 2003].

### **2.2.3.9. JC-1-Färbung**

Prinzip:

JC-1 ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich in gesunden Zellen im stark negativ geladenen Inneren der Mitochondrien anreichert und dort rot fluoreszierende Aggregate bildet. Bei einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran in apoptotischen Zellen kann der Farbstoff in den Mitochondrien keine Aggregate formen. Stattdessen bleibt er als grün fluoreszierendes Monomer im Zellplasma zurück.

Protokoll:

Nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h, 3 h, 6 h, 24 h) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, erneut mit PBS gewaschen und dann mit JC-1 (2,5  $\mu$ M; 15 min; 37°C) gefärbt. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in PBS im FACS analysiert [Kang et al., 2007; Zhang et al., 2006].

### **2.2.4. ROS-Nachweis**

Prinzip:

Für die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species - ROS) wird der Fluoreszenzfarbstoff H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, Molecular Probes, Oregon, USA) verwendet, der zunächst nicht fluoresziert. Durch Abspaltung der Acetat-Gruppen und Oxidation entsteht in der Zelle DCF (Dichlorofluorescein), dessen Fluoreszenz im FACS messbar ist.

Protokoll:

Nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h, 3 h, 6 h, 24 h) wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>DCFDA (15  $\mu$ M; 30 min) gefärbt, mit PBS gewaschen, trypsinisiert, erneut mit PBS gewaschen und in PBS im FACS analysiert [Kang et al., 2004].

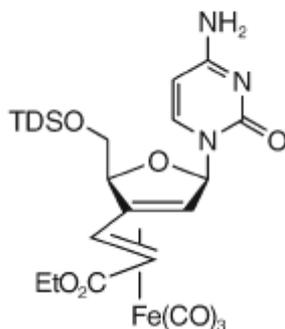
Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M; 1 h) behandelt.

### 2.2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Messwerte wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben. Mittelwerte, Standardabweichungen und Student's T-Tests wurden mit dem Programm Microsoft Excel berechnet.

### 3.1. Das eisenhaltige Cytosin-Analogon Ferropoptosid (N69)

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-G. Schmalz stellte in früheren Arbeiten fest, dass sich Butadien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexe selektiv am Acetal-Zentrum substituieren lassen. Dabei wurden  $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -stabilisierte Zwischenstufen durchlaufen. Durch die wachsende Bedeutung der biometallorganischen Chemie entstand die Idee der Kombination mit Nukleosidanaloga, die ein hohes Potential in der Virus- und Tumorthherapie haben. So zeigte auch N69 (Abb. 3.1.) proapoptotische Eigenschaften in BJAB-Zellen. Verbindungen ohne  $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplex waren erheblich weniger aktiv, was die Bedeutung des Eisencarbonyl-Fragments für die Wirksamkeit belegt [Schlawe et al., 2004]. In dieser Arbeit sollten nun die Apoptoseinduktion und der Wirkungsmechanismus von N69 in Melanom-Zellen untersucht werden [Franke et al., 2009].



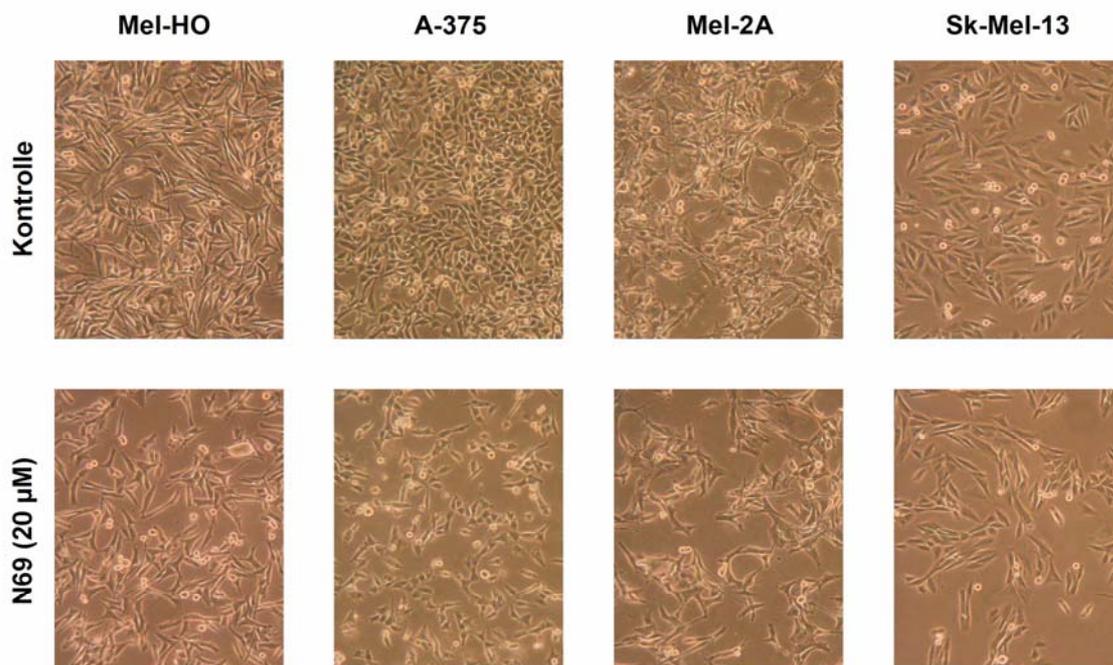
**Abb. 3.1. Die chemische Struktur des eisenhaltigen Cytosin-Analogon N69**

*TDS* = *Thexyldimethylsilyl*

*EtOH* = *Ethyl*

### 3.2. Effekte von N69 auf die Zellmorphologie

Die Effekte des eisenhaltigen Cytosin-Analogons N69 auf die Apoptose wurden in vier repräsentativen humanen Melanom-Zelllinien (Mel-HO, A-375, Mel-2a and SK-Mel-13) untersucht. Um einen Überblick über die Morphologie der verschiedenen Zelllinien zu gewinnen, wurden zunächst die Effekte im Mikroskop beobachtet (Abb. 3.2.). Hierbei war festzustellen, dass alle vier Zelllinien eine eigene charakteristische Morphologie aufweisen. Reduzierte Zellzahlen, abgerundete Zellen und abgelöste Zellen waren 24 h nach N69-Behandlung sichtbar. Es zeigte sich, dass bei Mel-HO und A-375 insbesondere abgerundete Zellen und abgelöste Zellen zu sehen waren, wohingegen bei Mel-2A und SK-Mel-13 eher reduzierte Zellzahlen festzustellen waren.



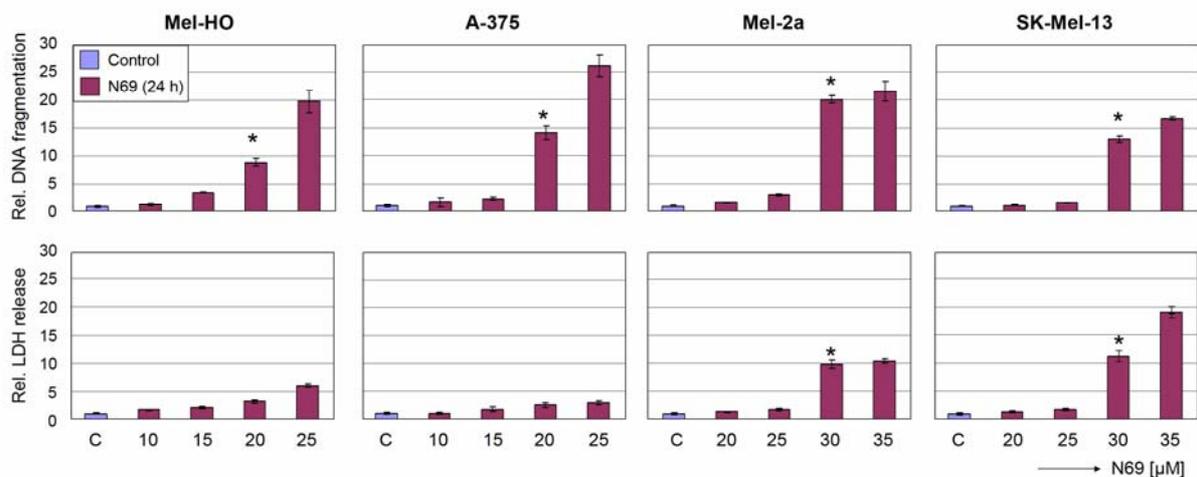
**Abb. 3.2. Effekte von N69 auf die Zellmorphologie**

Die humanen Melanom-Zelllinien Mel-HO, A-375, Mel-2A und Sk-Mel-13 wurden behandelt mit N69 (20 µM; 24 h) oder unbehandelt belassen (Kontrollen).

### 3.3. Dosisabhängige Induktion der Apoptose durch N69

Die Induktion der Apoptose wurde durch die DNA-Fragmentierung photometrisch mittels eines enzymgebundenen Immunoassays für die Detektion von cytoplasmatischen, histonassoziierten DNA-Fragmenten bestimmt. Die Apoptose wurde nach 24 h gemessen und war bei 20  $\mu\text{M}$  in Mel-HO und A-375 und bei 30  $\mu\text{M}$  in Mel-2a und SK-Mel-13 als signifikant detektierbar (Abb. 3.3., oben).

Die Zytotoxizität wurde durch die LDH-Freisetzung in das Cytoplasma parallel zu dem Apoptose-Assay photometrisch bestimmt. Bei den besonders sensitiven Zelllinien Mel-HO und A-375 war die Zytotoxizität bei niedrigen Konzentrationen gering, was darauf schließen lässt, dass die Apoptose der primäre Effekt ist. Bei den moderat sensitiven Zelllinien Mel-2A und SK-Mel-13 stieg die Zytotoxizität mit der Apoptose bei höheren Konzentrationen an (Abb. 3.3., unten).



**Abb. 3.3. Dosisabhängige Induktion der Apoptose durch N69**

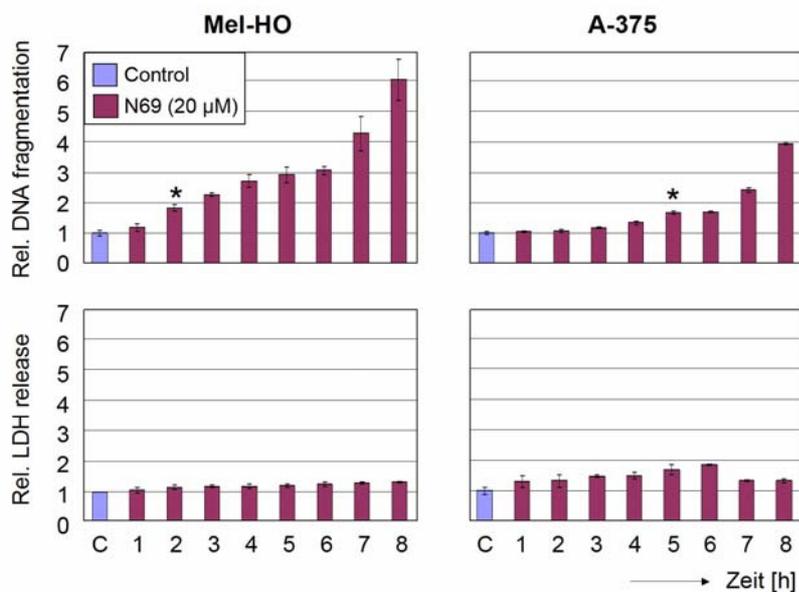
Die DNA-Fragmentierung zeigt die Apoptose (obere Reihe) und die LDH-Freisetzung die Zytotoxizität (untere Reihe) für vier Melanom-Zelllinien 24 h nach N69-Behandlung. Die Konzentrationen wurden variiert von 10  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$  für besonders sensitive Zellen (Mel-HO, A-375) und von 20  $\mu\text{M}$  bis 35  $\mu\text{M}$  für moderat sensitive Zellen (Mel-2a, SK-Mel-13). Die Relativwerte wurden auf unbehandelten Kontrollen bezogen, die gleich 1 gesetzt wurden (C). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Das Symbol [ \* ] kennzeichnet die Signifikanz.

### 3.4. Zeitabhängige Induktion der Apoptose durch N69

Die Zeitkinetik ist neben dem Dosispektrum besonders wichtig bei der Charakterisierung einer neuen Substanz. Die Apoptose setzte nach der Behandlung mit N69 (20  $\mu\text{M}$ ) in den besonders sensitiven Zellen sehr schnell ein. So war der Anstieg der Apoptose in der Zeitkinetik bereits nach 2 h bei Mel-HO und nach 5 h bei A-375 signifikant (Abb. 3.4., oben).

Die Zytotoxizität blieb über das gesamte Zeitfenster von 1 h bis 8 h mit kleineren Schwankungen unbeeinflusst (Abb. 3.4., unten). Damit ist durch die Zeitkinetik anzunehmen, dass die Apoptose den primären Effekt darstellt.



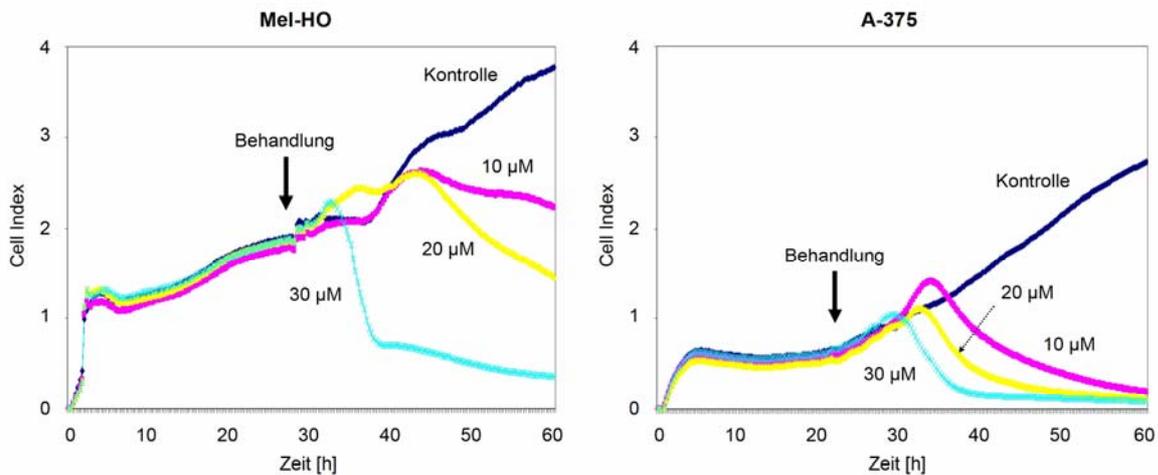
**Abb. 3.4. Zeitabhängige Induktion der Apoptose durch N69**

Die DNA-Fragmentierung zeigt die Apoptose (obere Reihe) und die LDH-Freisetzung die Zytotoxizität (untere Reihe) für zwei Melanom-Zelllinien nach Behandlung mit N69 (20  $\mu\text{M}$ ). Die Messungen erfolgten nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h und 8 h. Die Relativwerte wurden auf unbehandelte Kontrollen bezogen, die gleich 1 gesetzt wurden (C). Jeder Zeitwert hatte eine eigene Kontrolle (nicht gezeigt). Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Das Symbol [ \* ] kennzeichnet die Signifikanz.

### 3.5. Die Real-Zeit-Zell-Analyse für N69

Die Real-Zeit-Zell-Analyse (real time cell analysis - RTCA) wurde für die Untersuchung der Effekte von N69 auf die Zelldichten eingesetzt. Dabei wurden die Widerstände der Zelldichten in den Mikrotiter-Wells gemessen. Je höher die Zelldichte war, desto höher war der Widerstand.

Die Zelldichten von Mel-HO und A-375 Zellen wurden kontinuierlich über 60 h in einer Mikrotiter-Platte gemessen (Abb. 3.5.). N69 wurde in drei Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Unbehandelte Kontrollzellen wuchsen parallel. Die unbehandelten Zellen wuchsen mit kontinuierlich zunehmenden Zelldichten, wohingegen die mit N69 behandelten Zellen dosisabhängig nach 6-8 h einen zum Teil drastischen Einbruch bei Wachstum und Zelldichten zeigten. Bei dieser Methode könnte die Morphologie der Zellen einen Einfluss auf die Messung der Widerstände nehmen. So wäre zu erklären, warum im Vergleich die kleineren A-375 hier schneller und stärker als die großflächigeren Mel-HO reagierten.



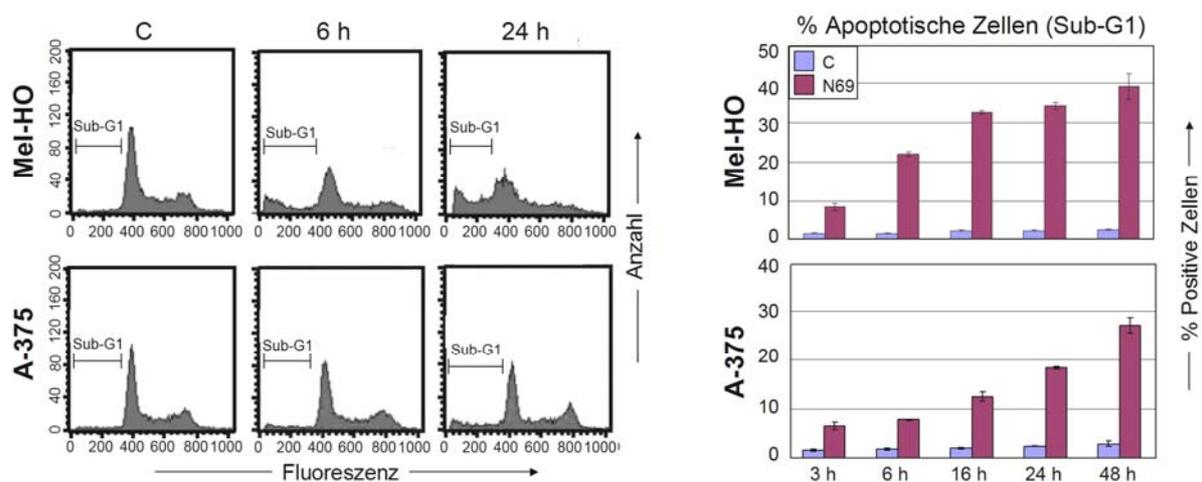
### 3.5. Die Real-Zeit-Zell-Analyse für N69

Die Real-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis - RTCA) wurde für Mel-HO und A-375 behandelt mit 10, 20 und 30  $\mu\text{M}$  N69 durchgeführt. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug 10.000 Zellen pro Mikrotiter-Well. Die Behandlung fand nach 24 h statt und der Messzeitraum betrug 60 h. Der festgestellte Zellindex gibt eine relative Messung der Zellzahl an. Das Experiment wurde dreimal mit jeweils Dreifachwerten durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

### 3.6. Anstieg der Sub-G1-Zell-Population durch DNA-Fragmentierung

Eine quantitative Bestimmung der DNA-Fragmentierung kann durch die Messung Propidiumjodid-gefärbter Zellen im Durchflusszytometer (FACS) vorgenommen werden. Mit dem so genannten Nicoletti-Assay lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmen. Die Zellkerne apoptotischer Zellen besitzen aufgrund der DNA-Fragmentierung weniger DNA in der G1-Phase des Zellzyklus als gesunde Zellen, da kleine DNA-Fragmente aus dem Zellkern ausgewaschen werden.

Nach Behandlung mit N69 (20  $\mu\text{M}$ ) wurden typische Anzeichen von DNA-Fragmentierung in Mel-HO und A-375 Zellen gesehen. Der Anstieg der Sub-G1-Zell-Population mit weniger DNA-Gehalt nahm nach 3 h, 6 h, 16 h, 24 h und 48 h kontinuierlich zu (Abb. 3.6.). Die frühe und starke DNA-Fragmentierung in diesem Assay lässt das hohe Potential dieser Substanz vermuten.



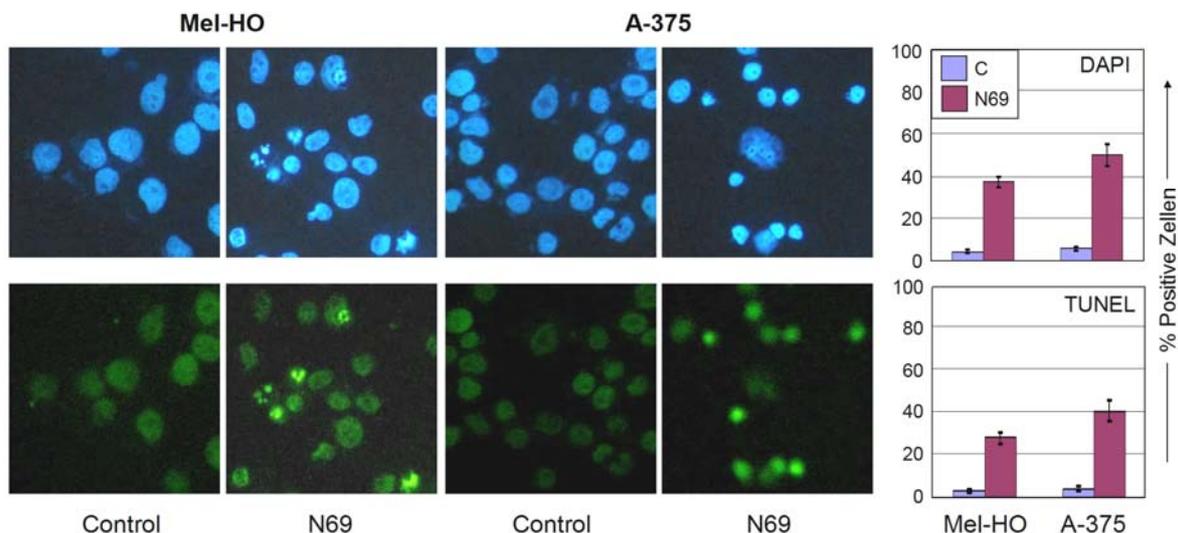
### 3.6. Anstieg der Sub-G1-Zell-Population durch DNA-Fragmentierung

Der Anstieg der Sub-G1-Zell-Population wurde nach PI-Färbung durch die FACS-Analyse für Mel-HO und A-375 behandelt mit N69 (20  $\mu\text{M}$ ; 3 h, 6 h, 16 h, 24 h und 48 h) gemessen. Die Balken stellen Prozente von positiven Zellen dar (Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachwerten). Alle Experimente wurden einmal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.7. Chromatin-Kondensation und DNA-Einzelstrangbrüche durch N69

Typische Merkmale der Apoptose sind Chromatin-Kondensation, nukleäre Fragmentierung und nukleäre Schrumpfung. Diese können durch die Färbung mit Bisbenzimid, einem Farbstoff, der in die chromosomale DNA von Zellen interkaliert und diese anfärbt, dargestellt werden. Einzelstrangbrüche in der DNA können durch die TUNEL-Färbung (Terminal dUTP Nick End Labeling) gezeigt werden. Dabei fügt die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Basen an freie 3'-OH-DNA-Enden an.

Mel-HO und A-375 wurden mit N69 (20  $\mu$ M; 48 h) behandelt. Die Bisbenzimid-Färbung ergab zwischen 40% und 50% apoptotische Zellen (Abb. 3.7., oben) und die TUNEL-Färbung zeigte zwischen 30% und 40% apoptotische Zellen (Abb. 3.7., unten).



#### 3.7. Chromatin-Kondensation und DNA-Einzelstrangbrüche durch N69

oben) Chromatin-Kondensation und nukleäre Fragmentierung bei der Bisbenzimid-Färbung nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 48 h) wurden beobachtet.

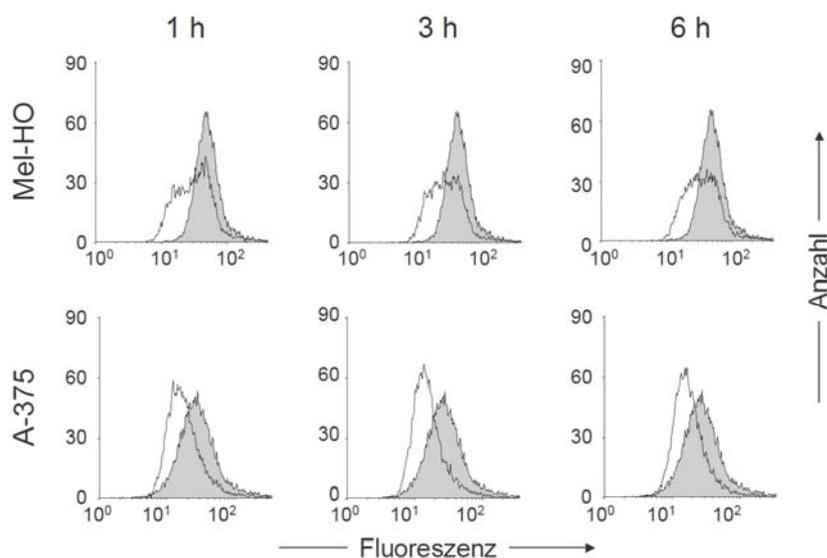
unten) DNA-Strangbrüche bei der TUNEL-Färbung nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 48 h) wurden detektiert.

Die Balken stellen Prozente von positiven Zellen dar (Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachwerten). Alle Experimente wurden einmal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.8. Absinken des mitochondrialen Membranpotentials durch N69

Apoptotische Vorgänge in der Zelle können eine Beschädigung der Mitochondrien-Membran bewirken. Wird diese permeabel, kann dies zum Absinken des Mitochondrien-Membranpotentials führen, da es zu einer Diffusion von Ionen kommen kann. Die Polarität der Mitochondrien-Membran kann durch die Färbung mit JC-1 gezeigt werden. Zellen mit polarisierten Mitochondrien bilden JC-1-Aggregate, die eine orange Färbung emittieren, wohingegen Zellen mit depolarisierten Mitochondrien Aggregate bilden, die eine grüne Färbung emittieren.

Eine deutliche Depolarisation des Mitochondrien-Membranpotentials wurde in der FACS-Analyse nach der JC-1-Färbung in Mel-HO und A-375 Zellen nach 1 h, 3 h und 6 h nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M) gesehen (Abb. 3.8.). Daraus ist zu schließen, dass die Mitochondrien-Membran durch N69 permeabilisiert wurde.



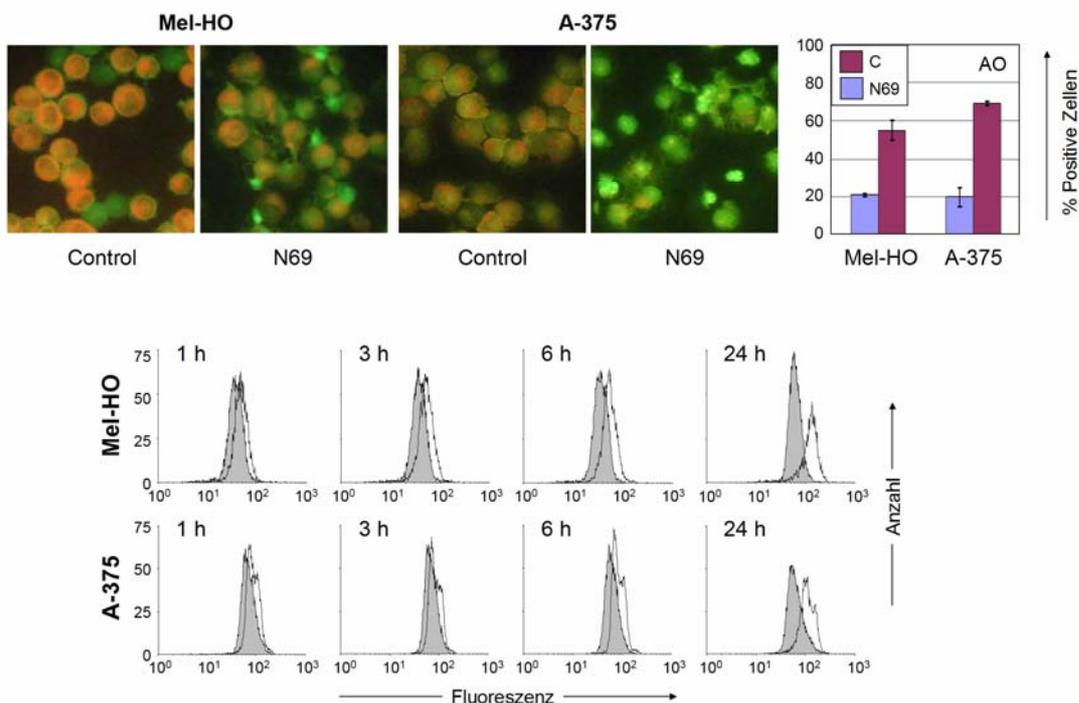
### 3.8. Absinken des mitochondrialen Membranpotentials durch N69

Das mitochondriale Membranpotential wurde nach der JC-1-Färbung im FACS gemessen. Mel-HO und A-375 wurden mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h, 3 h und 6 h) behandelt. Alle Experimente wurden einmal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.9. Permeabilisierung der lysosomalen Membranen durch N69

Apoptotische Vorgänge in der Zelle können eine Permeabilisierung der Lysosomen-Membran bewirken. Dadurch kann es zu einem Anstieg des lysosomalen pH-Wertes kommen, der zu einem Farbumschlag des pH-abhängigen Farbstoffes Acridin Orange von orange nach grün führt.

Unbehandelte Mel-HO and A-375 Zellen zeigten eine typische orange Färbung, die intakte Lysosomen anzeigt (pH 5), wohingegen nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M) eine charakteristische grüne Färbung auftrat, die permeable Lysosomen anzeigt (pH 7). Bei der Fluoreszenz-Mikroskopie zeigten etwa 60% bis 70% der Mel-HO und A-375 Zellen nach N69-Behandlung (48 h) eine grüne Fluoreszenz (Abb. 3.9., oben). Eine deutliche Zunahme der Grün-Färbung wurde ebenfalls bei der FACS-Analyse in Mel-HO und A-375 Zellen bereits nach 1 h bis hin zu 24 h nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M) festgestellt (Abb. 3.9., unten).



### 3.9. Permeabilisierung der lysosomalen Membranen durch N69

oben) Acridin Orange-Färbung für Mel-HO und A-375 nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M, 48 h). Die Balken stellen Prozente von positiven Zellen dar (Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachwerten).

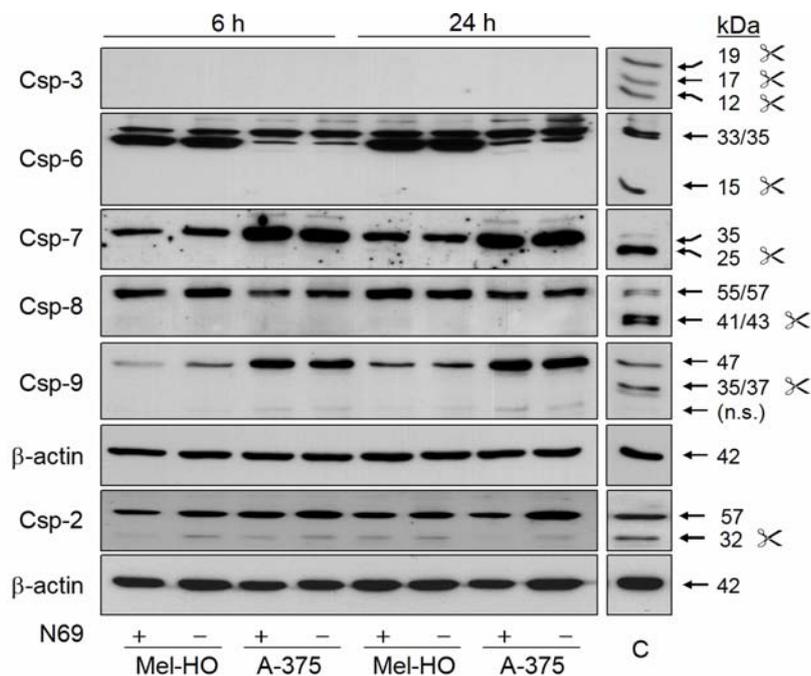
unten) FACS-Analyse nach Acridin Orange-Färbung für Mel-HO und A-375 nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 1 h, 3 h, 6 h und 24 h).

Alle Experimente wurden einmal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.10. Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne Caspasen-Aktivierung

Caspasen sind Cystein-abhängige, Aspartat-spaltende Proteasen mit entscheidender Bedeutung in der Apoptose-Kaskade verschiedener Zellsysteme. Die Aktivierung von Caspasen erfolgt über die aktivierende Proteolyse des inaktiven Zymogens (Pro-Form) in aktive Spaltprodukte [Riedl and Shi, 2004].

Um den Signalweg der N69-induzierten Apoptose in Melanom-Zellen zu charakterisieren, wurde die Beteiligung von Caspasen an der Apoptose im Western-Blot analysiert (Abb. 3.10.). Es wurde keine Prozessierung von proapoptotischen Caspasen (2, 3, 6, 7, 8 und 9) in Mel-HO und A-375 nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 6 h und 24 h) gefunden. Nur in Jurkat Zellen, die mit Doxorubicin (1  $\mu$ M; 24 h) behandelt worden waren und als Positivkontrolle fungierten, konnten Caspase-Spaltprodukte detektiert werden.



#### 3.10. Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne Caspasen-Aktivierung

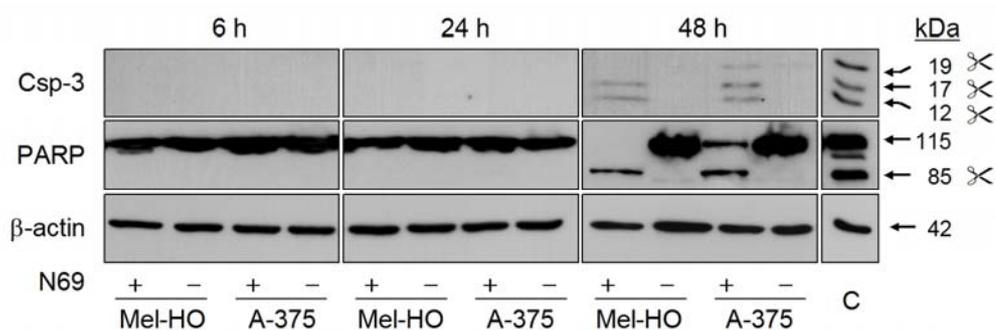
Die Proteine wurden von Mel-HO und A-375 Zellen nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 6 h und 24 h) extrahiert. Spaltprodukte der Caspasen, gekennzeichnet durch ✂, wurden nur bei der Positiv-Kontrolle (C = Jurkat-Zellen mit Doxorubicin; 1  $\mu$ M; 24 h) detektiert. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Die Analyse für  $\beta$ -actin zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (50  $\mu$ g/Bahn). Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

n.s. = nicht signifikant

### 3.11. Die N69-induzierte Apoptose verläuft mit einer sekundären, späten Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung

PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist ein DNA-Reparaturenzym und gilt als klassisches Spaltprodukt in der Apoptose. PARP ist ein typisches Substrat der aktivierten Caspase-3, der wichtigsten Effektor-Caspase.

Caspase-3 wurde ebenso wie PARP sowohl in Mel-HO als auch in A-375 erst 48 h nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M) gespalten (Abb. 3.11.). Jurkat Zellen, die mit 1  $\mu$ M Doxorubicin für 24 h behandelt worden waren, fungierten als Positivkontrolle. Da die Caspase-3- und PARP-Spaltung erst nach 48 h eine Aktivierung zeigte, deuten die Ergebnisse auf eine Caspasen-unabhängige Apoptose hin.



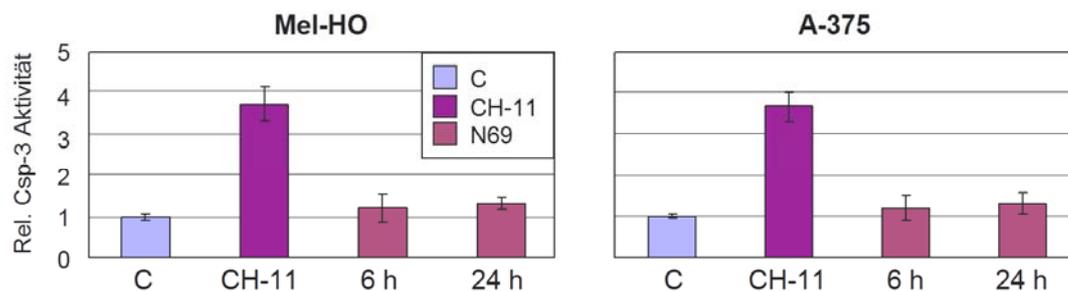
#### 3.11. Die N69-induzierte Apoptose verläuft mit einer sekundären, späten Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung

Die Proteine wurden von Mel-HO und A-375 Zellen nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 6 h, 24 h und 48 h) extrahiert. Spaltprodukte sind durch X gekennzeichnet. Als Positiv-Kontrolle fungierten Jurkat-Zellen mit Doxorubicin (1  $\mu$ M; 24 h). Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Die Analyse für  $\beta$ -actin zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (50  $\mu$ g/Bahn). Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.12. Keine Aktivierung von Caspase-3 im ELISA

Zur Validierung der Western-Blot Ergebnisse wurde ein hoch sensitiver Sandwich-ELISA zur Messung der aktivierten Caspase-3 durchgeführt, der endogene Level der gespaltenen Effektor-Caspase-3 detektiert. Der Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein enzymgekoppelter Immun-Adsorptionsassay, der auf einer enzymatischen Farbreaktion mit zwei Antikörpern basiert.

Nur die als Positivkontrolle durchgeführte CH-11-Behandlung (100 ng/ml; 24 h) von Mel-HO und A-375 zeigte eine Spaltung der Caspase-3. Bei CH-11 handelt es sich um einen agonistischen CD95-Antikörper. Nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 6 h und 24 h) war keine Aktivierung der Caspase-3 festzustellen (Abb. 3.12.). Dies bestärkt die Caspase-Unabhängigkeit der Apoptose durch N69 in Melanomzellen.



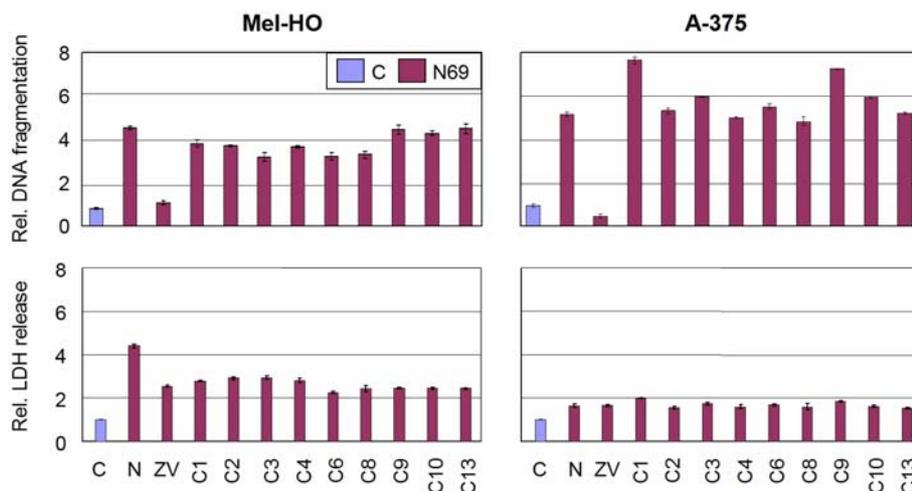
### 3.12. Keine Aktivierung von Caspase-3 im ELISA

Die Caspase-3-Aktivität nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 6 h und 24 h) zeigte im Vergleich zur CH-11-Behandlung (100 ng/ml; 24 h) keine Aktivierung gegenüber der Kontrolle. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.13. Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Caspase-Inhibitoren

Es wurden selektive Oligopeptid-Inhibitoren für die Caspasen 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 und 13 eingesetzt, um die Caspase-Unabhängigkeit nach den Western-Blot-Ergebnissen und dem Caspase-3-ELISA weiter abzusichern. Die Vorbehandlung mit den Inhibitoren für 1 h (10  $\mu$ M) blieb ohne Effekt auf die proapoptotische Aktivität von N69 (20  $\mu$ M; 24 h). Die Wirkung von N69 konnte nur von dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk inhibiert werden (Abb. 3.13.) Dieser bindet alle Caspasen, kann jedoch auch unspezifische Auswirkungen auf die Aktivität anderer Proteasen haben [Rozman-Pungercar et al., 2003].

Die inhibitorische Aktivität von Caspase-Inhibitoren in Melanom-Zellen wurde in früheren Studien gezeigt [Oppermann et al., 2005].



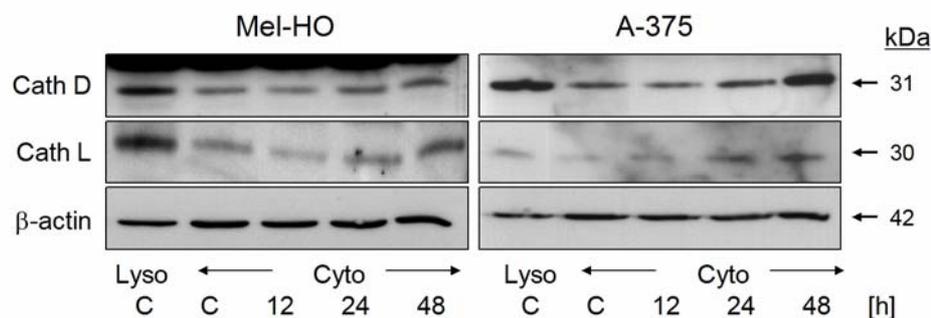
### 3.13. Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Caspase-Inhibitoren

Die DNA-Fragmentierung (Apoptose) und die LDH-Freisetzung (Zytotoxizität) wurden für Mel-HO und A-375 Zellen mit N69 (20  $\mu$ M, 24 h; N) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen (C) bestimmt. Parallel-Kulturen wurden mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk (ZV) oder mit selektiven Peptid-Inhibitoren für die Caspasen 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 und 13 (jeweils 10  $\mu$ M) für 1 h vor N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 24 h) vorinkubiert. Jeder Inhibitor hatte eine eigene Kontrolle (nicht gezeigt), worauf die Werte normalisiert wurden. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.14. Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne frühe Cathepsin-Beteiligung

Cathepsine sind lysosomal lokalisierte Cystein-Proteasen, die eine hohe Ähnlichkeit mit den Caspasen aufweisen. Cathepsine werden als inaktive Zymogene im Cytosol synthetisiert und werden erst nach dem Import in die Lysosomen aktiviert. Für eine relevante Funktion innerhalb der Apoptose müssen aktive Cathepsine zuerst aus den Lysosomen in das Cytosol freigesetzt werden.

Cathepsin D and L zeigten nur eine geringe und späte Zunahme in der cytosolischen Fraktion nach N69-Behandlung (20  $\mu$ M; 12 h, 24 h und 48 h) in Folge einer lysosomalen Freisetzung (Abb. 3.14.). Daraus lässt sich schließen, dass die Freisetzung der Cathepsine nach 48 h eher einen Sekundäreffekt in der N69-induzierten Apoptose darstellt, obwohl eine Permeabilisierung der Lysosomen durch die Acridin Orange-Färbung bereits früh gezeigt werden konnte.

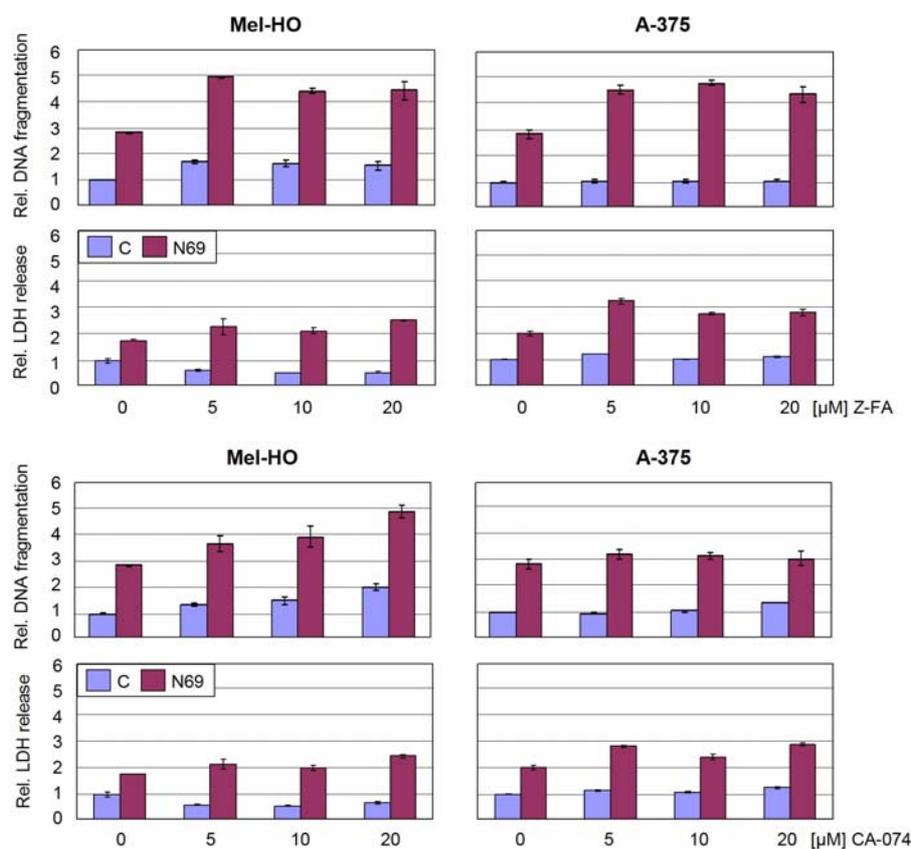


#### 3.14. Die N69-induzierte Apoptose in Melanom-Zellen verläuft ohne Cathepsin-Beteiligung

Die cytosolischen Extrakte von Mel-HO und A-375 behandelt mit N69 (20  $\mu$ M; 12 h, 24 h und 48 h) wurden auf die Freisetzung von Cathepsin D und L untersucht. Unbehandelte Zellen wurden parallel für 48 h kultiviert (C). Lysosomale Extrakte wurden als Positiv-Kontrollen geladen. Die Analyse für  $\beta$ -actin zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (50  $\mu$ g/Bahn). Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

### 3.15. Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Cathepsin-Inhibitoren

Es wurden selektive Oligopeptid-Inhibitoren für die Cathepsine B and L eingesetzt, um die Cathepsin-Unabhängigkeit nach den Western-Blot-Ergebnissen abzusichern (Abb. 3.15.). Die Vorbehandlung mit den Inhibitoren (5-20  $\mu\text{M}$ ) für 1 h war ohne Effekt auf die proapoptotische Aktivität von N69 (20  $\mu\text{M}$ ; 24 h). Die inhibitorische Aktivität dieser Cathepsin-Inhibitoren in Melanom-Zellen wurde in früheren Arbeiten gezeigt [Oppermann et al., 2005]; (Dissertation Malte Oppermann, FU Berlin, 2006).



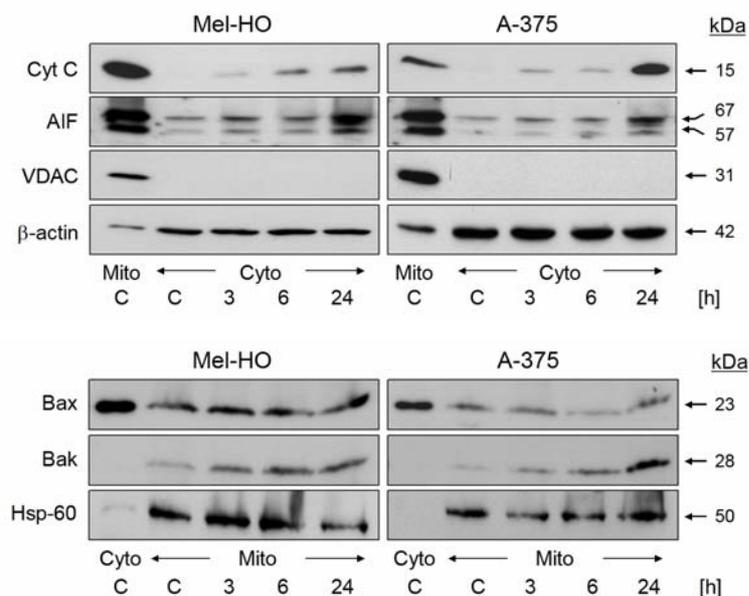
#### 3.15. Keine Hemmung der N69-induzierten Apoptose durch selektive Cathepsin-Inhibitoren

Die DNA-Fragmentierung (Apoptose) und die LDH-Freisetzung (Zytotoxizität) wurden für Mel-HO und A-375 Zellen mit N69 (20  $\mu\text{M}$ ; 24 h) verglichen mit unbehandelten Kontroll-Zellen (C). Parallele Kulturen wurden für 1 h vor der N69-Behandlung mit selektiven Peptid-Inhibitoren (jeweils 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$ ) für die Cathepsine B und L (z-FA; oben) und für Cathepsin B (CA-074; unten) vorbehandelt. Für jeden Inhibitor wurde eine eigene Kontrolle ohne N69 angesetzt, und jeder Messwert wurde auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.16. Permeabilisierung der Mitochondrien durch N69

Die Freisetzung von mitochondrialen Faktoren in das Cytosol und die Translokation von Bax und Bak sind typische Zeichen des mitochondrialen, proapoptotischen Signalweges nach einer Permeabilisierung der Mitochondrien.

Um eine Beteiligung der Mitochondrien an der Apoptose nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 3 h, 6 h und 24 h) zu prüfen, wurden mitochondriale und cytosolische Fraktionen isoliert. Im Western-Blot zeigte sich eine Freisetzung von Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor) bereits nach 3 h, die mit der Zeit kontinuierlich zunahm. Parallel dazu wurde eine verstärkte Lokalisation von Bak, aber nicht von Bax, in den Mitochondrien festgestellt (Abb. 3.16.). Das lässt darauf schließen, dass N69 die Mitochondrien beeinflusst.



#### 3.16. Permeabilisierung der Mitochondrien durch N69

Die mitochondrialen Fraktionen (Mito) und die cytosolischen Fraktionen (Cyto) wurden von Mel-HO und A-375 Zellen behandelt mit N69 (20  $\mu$ M; 3 h, 6 h und 24 h) isoliert. Behandelte Zellen wurden mit unbehandelten Kontrollen verglichen, die für 24 h parallel gewachsen waren (C).

oben) Die cytosolischen Extrakte wurden auf die Freisetzung von Cytochrom C und AIF untersucht. Das mitochondriale Protein VDAC fungierte als cytosolische Reinheitskontrolle. Die Analyse für  $\beta$ -actin zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (20  $\mu$ g/Bahn).

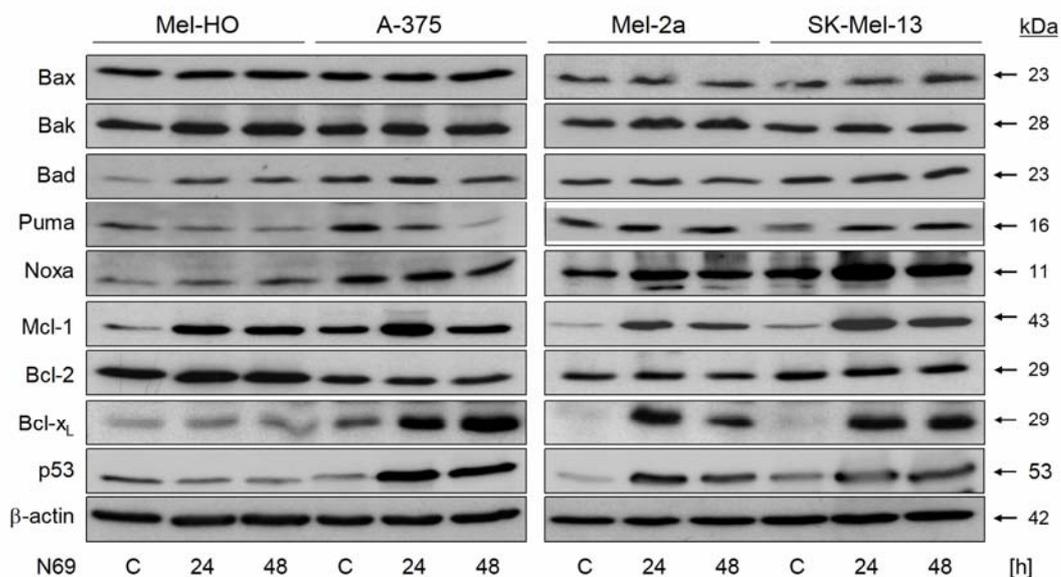
unten) Die mitochondrialen Extrakte wurden auf die Translokation von Bax und Bak untersucht. Die Analyse für heat shock protein 60 (Hsp-60) zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (20  $\mu$ g/Bahn).

Die Experimente wurden einmal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.17. Keine Regulation der proapoptotischen Bcl-2-Proteine

Im Weiteren sollte im Western-Blot gezeigt werden, ob anti-apoptotische Bcl-2-Proteine (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>), pro-apoptotische Multidomäne-Bcl-2-Proteine (Bax, Bak) und pro-apoptotische BH3-only-Proteine (Bad, Noxa, Puma) nach N69-Behandlung (20 µM; 24 h und 48 h) reguliert wurden. Allerdings konnte nur eine Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 (Mel-HO, Mel-2a, SK-Mel-13) und Bcl-x<sub>L</sub> (A-375, Mel-2a, SK-Mel-13) festgestellt werden (Abb. 3.17.), was eine Schutzreaktion der Zellen darstellen könnte.

Zusätzlich wurde die Expression des Transkriptionsfaktors und Apoptoseinduktors p53 untersucht, der für die Expression verschiedener proapoptotischer Bcl-2-Proteine wie Bax, Puma und Noxa mitverantwortlich sein soll. Die Expression von p53 war durch die N69-Behandlung hochreguliert in A-375, Mel-2a und SK-Mel-13, aber nicht in Mel-HO (Abb. 3.17.). Es konnte keine Korrelation zwischen der Regulation von p53 und der Expression der Bcl-2-Proteine festgestellt werden, was für einen eher sekundären Effekt stehen könnte.



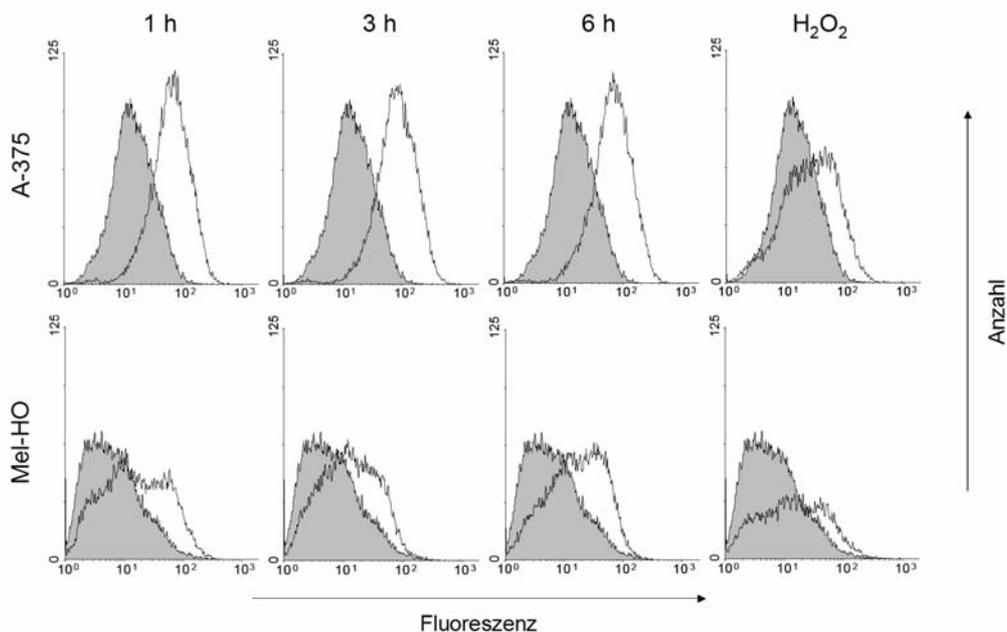
### 3.17. Keine Regulation der proapoptotischen Bcl-2-Proteine

Verschiedene Bcl-2-Proteine und p53 wurden im Western-Blot analysiert. Vier Melanom-Zelllinien wurden mit N69 (20 µM; 24 h und 48 h) behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (C) verglichen. Die Analyse für β-actin zeigte gleichmäßige Protein-Ladungen (50 µg/Bahn). Das Experiment wurde einmal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

### 3.18. Zusammenhang von N69-induzierter Apoptose und ROS-Produktion

Das Cytosin-Analogon N69 enthält nullwertiges Eisen in einem Komplex. Intrazellulär kann Eisen zu der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species – ROS) führen. ROS können durch den Fluoreszenzfarbstoff H<sub>2</sub>DCFDA nachgewiesen werden. Dieser wird durch ROS zu DCF oxidiert und zeigt in oxidierte Form eine stärkere Fluoreszenz als in reduzierter Form.

Es wurden signifikant erhöhte ROS-Spiegel nach der H<sub>2</sub>DCFDA-Färbung (15 µM; 30 min) im FACS in Mel-HO and A-375 Zellen nach N69-Behandlung (20 µM; 1 h, 3 h und 6 h) nachgewiesen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM; 1 h) fungierte als Positivkontrolle (Abb. 3.18.). Dies könnte darauf schließen lassen, dass durch eine erhöhte ROS-Produktion mittels N69 eine Schädigung der Mitochondrien auftritt.

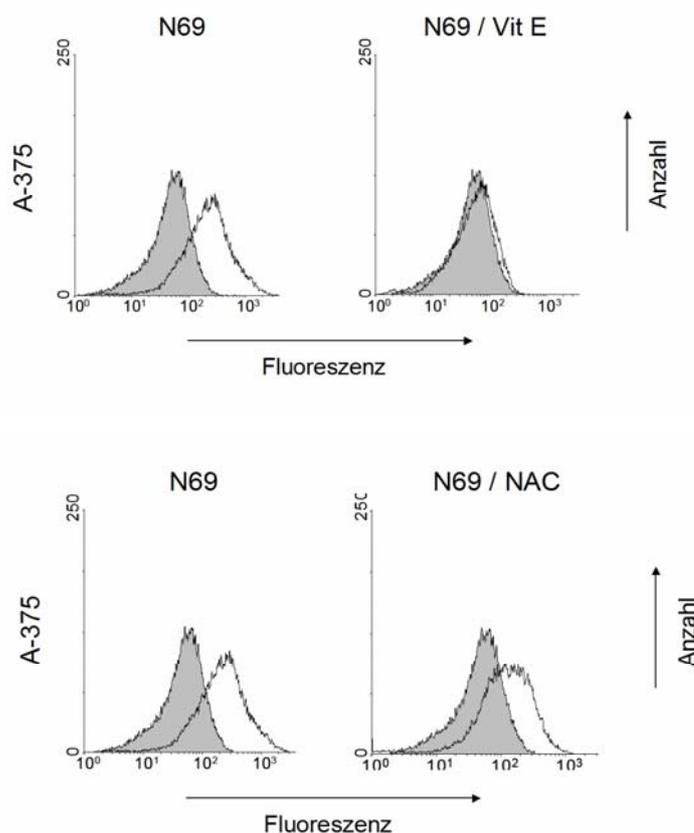


### 3.18. Zusammenhang von N69-induzierter Apoptose und ROS-Produktion

ROS-Spiegel wurden mit der H<sub>2</sub>DCFDA-Färbung mittels FACS-Analyse von Mel-HO und A-375 Zellen nach N69-Behandlung (20 µM; 1 h, 3 h und 6 h; offene Graphen) untersucht und mit unbehandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte Zellen (200 µM; 1 h) fungierten als Positivkontrolle. Eine Verschiebung zu einer stärkeren Fluoreszenz zeigt eine Erhöhung des ROS-Spiegels. Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.19. Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten ROS-Produktion

Antioxidantien können ROS abfangen und Radikale zu unschädlichen Verbindungen abbauen. Die Rolle von ROS nach N69-Behandlung wurde durch den Einsatz des lipophilen Antioxidans Vitamin E (Vit E; oben) und des hydrophilen Antioxidans N-Acetylcystein (NAC; unten) untersucht. Durch die Vorbehandlung mit Vit E (200  $\mu$ M; 1 h) konnte die ROS-Produktion durch N69 (20  $\mu$ M; 24 h) nahezu vollständig blockiert werden, wohingegen NAC (200  $\mu$ M; 1 h) keinen Einfluss zeigte (Abb. 3.19.). Da in vorherigen Ergebnissen eine Schädigung der Mitochondrien festzustellen war, ist zu vermuten, dass sich das lipophile Vitamin E besser schützend an den Mitochondrien lokalisieren könnte.

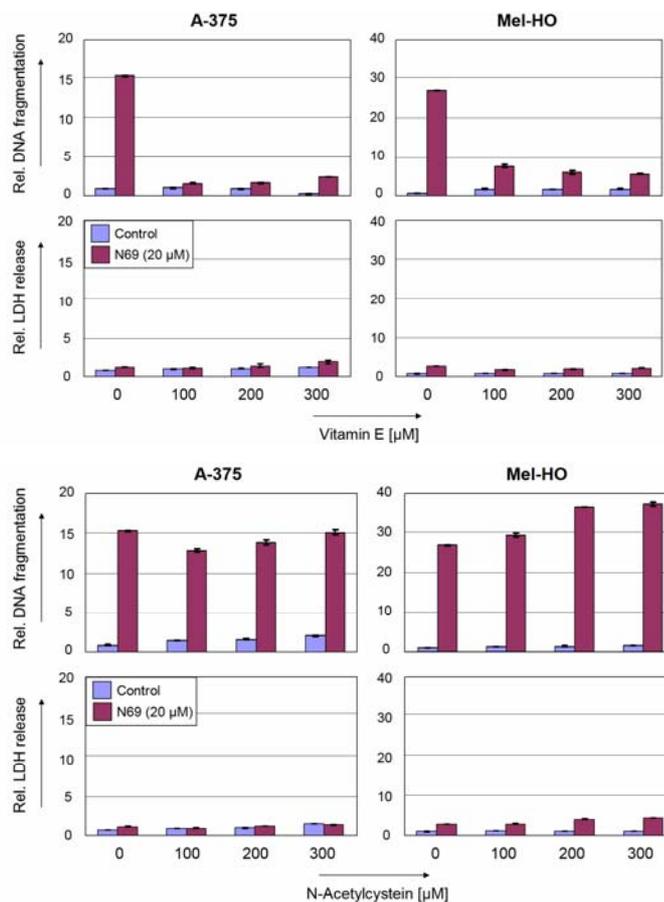


### 3.19. Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten ROS-Produktion

A-375 Zellen wurden für 1 h mit 200  $\mu$ M Vitamin E (Vit E, oben) oder mit 200  $\mu$ M N-Acetylcystein (NAC, unten) behandelt, bevor N69 (20  $\mu$ M; 24 h) zugegeben wurde. N69-behandelte Zellen (offene Graphen) wurden mit unbehandelten Zellen (graue Graphen) verglichen. Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.20. Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten Apoptose

Durch ROS können verschiedene DNA-Schäden, wie Purin- und Pyrimidin-Modifikationen, DNA-Protein-Vernetzungen und DNA-Strangbrüche, verursacht werden [Pelicano et al., 2004]. Durch die Vorbehandlung mit Vit E und NAC sollte eine mögliche Inhibierung der DNA-Fragmentierung (Apoptose) durch N69 (20  $\mu$ M; 24 h) untersucht werden. Mit Vit E konnte die Apoptose fast vollständig blockiert werden, wohingegen NAC keinen Einfluss zeigte (Abb. 3.20.).

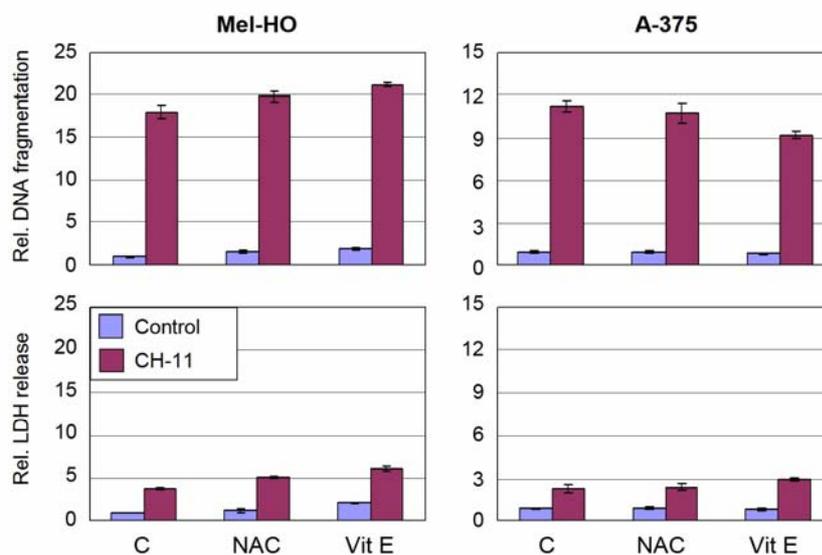


### 3.20. Funktion von Antioxidantien in der N69-induzierten Apoptose

Die DNA-Fragmentierung (Apoptose) und die LDH-Freisetzung (Zytotoxizität) wurden für A-375 und Mel-HO Zellen mit N69 (20  $\mu$ M; 24 h) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (C). Parallele Kulturen wurden 1 h vor der N69-Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen (100-300  $\mu$ M) Vitamin E (Vit E, oben) oder N-Acetylcystein (NAC, unten) vorbehandelt. Für jede Konzentration wurde eine eigene Kontrolle ohne N69 angesetzt und jeder Messwert auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.21. Funktion von Antioxidantien in der CH-11-induzierten Apoptose

Um die spezifische, ROS-abhängige Wirkung von N69 zu zeigen, wurden im Vergleich Mel-HO und A-375 Zellen mit CH-11 (100 ng/ml; 24 h), einem agonistischen CD95-Antikörper, nach einer Vorinkubation mit Vit E oder NAC (200  $\mu$ M; 1 h) behandelt. Beide Antioxidantien zeigten keinen Einfluss auf die CH-11-induzierte Apoptose (Abb. 3.21.). Somit ist die Apoptose durch CH-11, im Gegensatz zu der Apoptose durch N69, ROS-unabhängig.

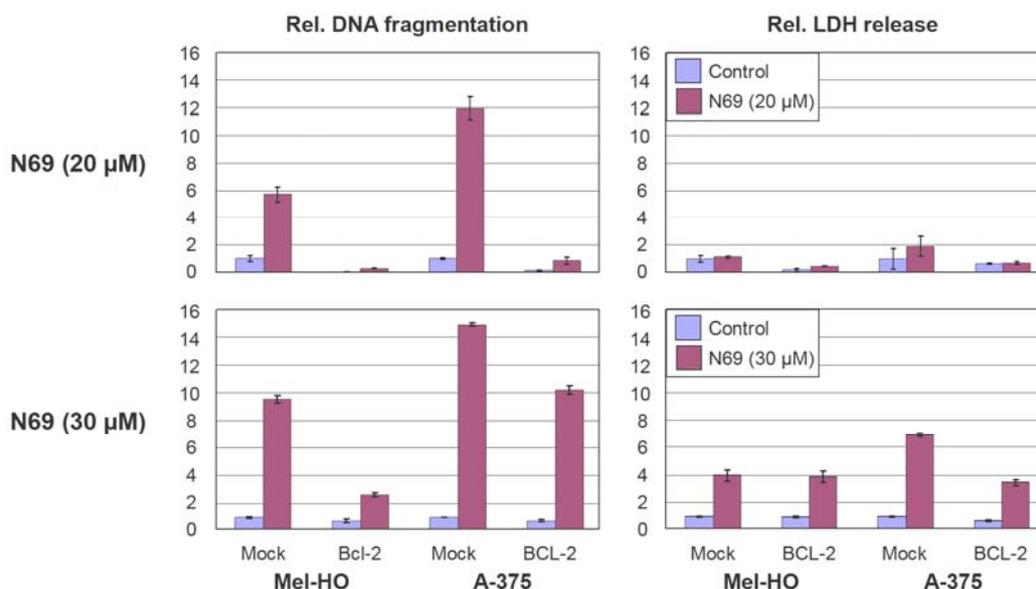


### 3.21. Funktion von Antioxidantien in der CH-11-induzierten Apoptose

Die DNA-Fragmentierung (Apoptose) und die LDH-Freisetzung (Zytotoxizität) wurden für Mel-HO und A-375 behandelt mit CH-11 (100 ng/ml; 24 h) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (C). Parallele Kulturen wurden für 1 h vor der CH-11-Behandlung mit 200  $\mu$ M Vitamin E (Vit E) oder N-Acetylcystein (NAC) vorbehandelt. Für jede Konzentration wurde eine eigene Kontrolle ohne CH-11 angesetzt, und jeder Messwert auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.22. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert partiell die N69-induzierte Apoptose

Für das Verständnis der N69-induzierten Apoptose in Melanom-Zellen wurden die Effekte der Überexpression von Bcl-2 untersucht. Mit einem Bcl-2-Expressions-Plasmid stabil transfizierte Klone von Mel-HO und A-375 Zellen und mock-transfizierte Zellen wurden mit N69 (20  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ ; 24 h) behandelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Bei der niedrigeren Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) waren die Zellen durch Bcl-2 nahezu komplett von dem proapoptotischen Effekt von N69 geschützt. Bei der höheren Konzentration (30  $\mu\text{M}$ ) konnte die Apoptose nicht komplett unterdrückt werden, wobei jedoch eine deutlich erhöhte Zytotoxizität festzustellen war (Abb. 3.22.). In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion bei Melanomzellen durch Verstärkung der Bcl-2-Expression drastisch gesenkt werden konnte [Raisova et al., 2001].

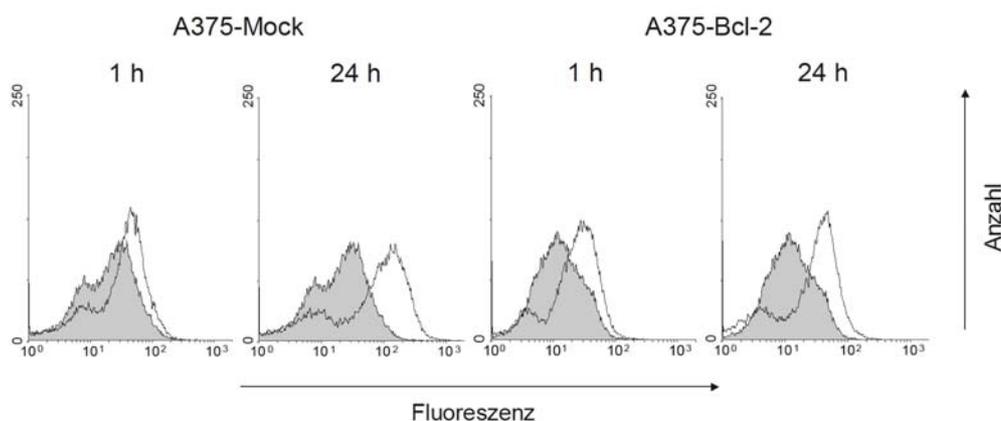


#### 3.22. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert partiell die N69-induzierte Apoptose

Klone von Mel-HO und A-375, stabil transfiziert mit einem Bcl-2-pIRES-Expressions-Konstrukt (Bcl-2) oder einem pIRES-transfiziertem Kontroll-Klon (Mock), wurden mit N69 (20  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ ; 24 h) behandelt. Die relative Apoptose und Zytotoxizität wurde auf unbehandelte Mock-Zellen bezogen und gleich 1 gesetzt. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.23. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert nicht die N69-induzierte ROS-Produktion

Um die Effekte einer Bcl-2-Überexpression auf die ROS-Produktion zu untersuchen, wurden A-375-Mock und A-375-Bcl-2 Zellen mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h und 24 h; offene Graphen) behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Die Bcl-2-Überexpression zeigte keine inhibierende Wirkung auf die ROS-Produktion (Abb. 3.23.), obwohl sie die Apoptose deutlich vermindern konnte. Daher ist zu schließen, dass in einer Signalkaskade die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2 unterhalb der ROS-Produktion liegt. Die Bcl-2-Überexpression macht die Zellen jedoch wahrscheinlich resistenter gegenüber einem erhöhten ROS-Spiegel [Tripathi and Hildeman, 2004], was die verminderte Apoptose zeigte.

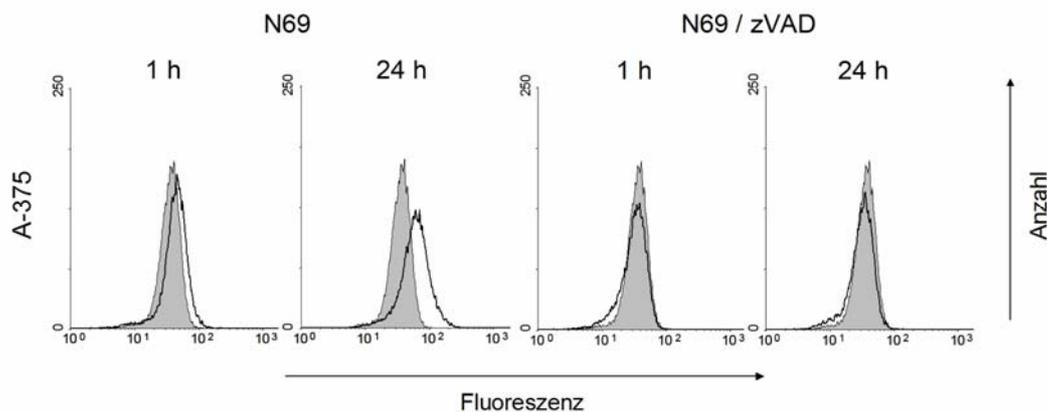


### 3.23. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert nicht die N69-induzierte ROS-Produktion

Klone von A-375, stabil transfiziert mit einem Bcl-2-pIRES-Expressions-Konstrukt (Bcl-2) oder pIRES-transfizierte Kontroll-Klone (Mock), wurden mit N69 behandelt (20  $\mu$ M; 1 h und 24 h; offene Graphen) und mit unbehandelten Kontrollen verglichen (graue Graphen). Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.24. Die Vorbehandlung mit zVAD blockiert die N69-induzierte ROS-Produktion

Da zVAD als einziger Inhibitor die Apoptose unterdrücken konnte (siehe 3.13.), sollte ein möglicher Einfluss auf die ROS-Produktion untersucht werden. A-375 Zellen wurden mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h und 24 h; offene Graphen) behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (graue Graphen) verglichen. Durch die Vorbehandlung mit zVAD (10  $\mu$ M; 1 h) konnte die ROS-Produktion nach Behandlung mit N69 (20  $\mu$ M; 1 h und 24 h) sowohl nach 1 h als auch nach 24 h vollständig unterdrücken werden (Abb. 3.24.). Es ist daher anzunehmen, dass in einer Signalkaskade die antiapoptotische Aktivität von zVAD oberhalb der ROS-Produktion liegt. Es wäre vorstellbar, dass zVAD auf Proteasen wirken könnte, die an Redox-Prozessen beteiligt sind, was jedoch bis jetzt ungeklärt ist [Ganguly et al., 2007].

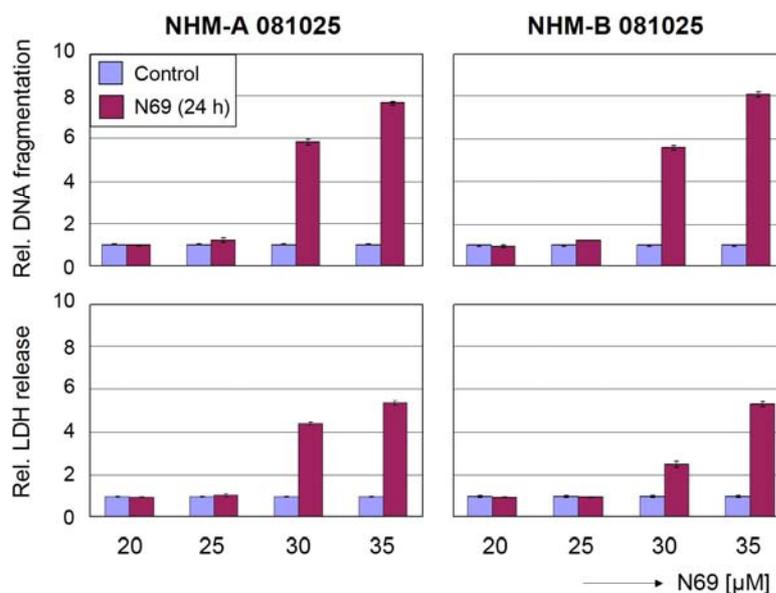


### 3.24. Die Vorbehandlung mit zVAD blockiert die N69-induzierte ROS-Produktion

A375 Zellen wurden mit N69 behandelt (20  $\mu$ M; 1 und 24 h; offene Graphen) und mit unbehandelten Kontrollen verglichen (graue Graphen). Zusätzlich wurde ein Versuchsansatz von Zellen mit zVAD vorbehandelt (10  $\mu$ M; 1 h). Zellen ohne zVAD sind auf der linken Seite gezeigt, Zellen mit zVAD auf der rechten Seite. Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.25. Der Einfluss von N69 auf normale menschliche Melanozyten

Der Einfluss von N69 auf normale menschliche Melanozyten als Beispiel für normale menschliche Zellen wurde untersucht, um Risiken für eine spätere mögliche Anwendung in vivo abschätzen zu können. Dafür wurden zwei verschiedene Melanozytenkulturen mit steigenden Konzentrationen von N69 (20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 30  $\mu$ M und 35  $\mu$ M; 24 h) behandelt. Auf normale menschliche Melanozyten hatte N69 in niedrigen Konzentrationen keine zytotoxische oder apoptotische Wirkung. Erst bei höheren Konzentrationen wirkte es zytotoxisch (Abb. 3.25.). Der starke Anstieg der Zytotoxizität bei der N69-Behandlung von 25  $\mu$ M zu 30  $\mu$ M könnte ein Hinweis auf ein enges therapeutisches Fenster sein.



### 3.25. Der Einfluss von N69 auf normale menschliche Melanozyten

Die DNA-Fragmentierung zeigt die Apoptose (obere Reihe) und die LDH-Freisetzung die Zytotoxizität (untere Reihe) für zwei humane Melanozyten-Zelllinien 24 h nach N69-Behandlung. Die Konzentrationen wurden von 20  $\mu$ M bis 35  $\mu$ M variiert. Die Relativwerte wurden auf unbehandelte Kontrollen bezogen, die gleich 1 gesetzt wurden. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar von einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes Experiment aus Dreifachwerten bestand. Die unabhängigen Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

#### 4.1. Apoptoseinduktion durch N69 in Melanomzellen

In dieser Arbeit wurde das neue eisenhaltige Cytosin-Analogon Ferropoptosid (N69) bezüglich der Apoptose-Induktion und dem dazugehörigen Wirkungsmechanismus in humanen Melanomzellen untersucht [Franke et al., 2009]. Für N69 wurde bereits eine proapoptotische Aktivität in BJAB-Zellen beschrieben [Schlawe et al., 2004]. Organometallische Verbindungen stellen durch ein breites Spektrum an Oxidationsstufen neue Möglichkeiten in der Therapie von Viruserkrankungen und Krebs dar [Ott and Gust, 2007].

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein physiologischer Prozess in multizellulären Organismen zur Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Proliferation und Eliminierung von Zellen. Vor allem handelt es sich um einen Schutzmechanismus des Organismus vor fehlregulierten, geschädigten und genetisch veränderten Zellen. Eine Fehlregulation der Apoptose-Mechanismen führt in Krebszellen oft zu einer Apoptose-Defizienz und erklärt somit eine häufige Chemotherapie-Resistenz. In der Krebstherapie scheint die Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Signalweg ein wichtiger Bestandteil zu sein, da die Mitochondrien neben der DNA einen wichtigen Angriffspunkt für Chemotherapeutika darstellen [Soengas and Lowe, 2003].

Für das Maligne Melanom ist die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika besonders charakteristisch. Die Aufklärung der Fehlfunktion in der Apoptose-Kaskade erscheint dementsprechend dringlich [Eberle et al., 2007a]; [Eberle et al., 2007b]. Es gibt bis jetzt keine effektive Chemotherapie, die die Lebenserwartung von Patienten mit metastasiertem Melanom verlängert [Garbe et al., 2007]. Neue Wirkstoffe könnten durch alternative Signalwege die Chemotherapie-Resistenz überwinden. Neue Möglichkeiten könnten die Kombination von Nukleosidanaloga und Eisenkomplexen bieten, die ihre Wirkungen jeweils ergänzen sollen [Schlawe et al., 2004].

Es konnte eine starke und frühe Apoptose-Induktion durch N69 in Melanomzellen ohne Effekte von Zytotoxizität gezeigt werden. Sie wurde durch verschiedene, unabhängige Apoptose-Assays belegt, zu denen die DNA-Fragmentierung, die LDH-Freisetzung, die Chromatin-Kondensation und die Zunahme von Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt durch DNA-Fragmentierung gehören. Diese Nachweise der Apoptose standen weitestgehend in Übereinstimmung mit der letzten Klassifizierung des programmierten Zelltodes [Kroemer et al., 2009].

#### 4.2. Die N69-induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen

Die N69-induzierte Apoptose in Melanomzellen wich allerdings von bisher beschriebenen Signalwegen ab. An der Initialphase waren keine Caspasen beteiligt, da keine Caspase-Spaltprodukte detektiert werden konnten. Auch selektive Caspase-Inhibitoren und ein Caspase-3-ELISA lieferten keine Hinweise auf eine Caspasen-Aktivierung. Erst zu späten Zeitpunkten erfolgte über eine zelluläre Gesamtaktivierung eine Spaltung von Caspase-3 und deren Todessubstrat PARP. Lediglich der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD zeigte eine inhibitorische Wirkung auf die Apoptose nach N69-Behandlung. Es wurde allerdings gezeigt, dass zVAD auch andere Faktoren hemmen kann, wie Cystein-Proteasen einschließlich der Cathepsine, Papain und Legumain. Die Hemmung weiterer Faktoren wird für möglich gehalten [Rozman-Pungercar et al., 2003].

Über lange Zeit galt die Caspasen-Aktivierung als notwendiges Charakteristikum des programmierten Zelltodes. In den letzten Jahren häufen sich jedoch die Hinweise auf alternative, Caspasen-unabhängige Wege der Apoptose [Leist and Jaattela, 2001]; [Kroemer and Martin, 2005]; [Broker et al., 2005].

Beim Caspasen-unabhängigen Zelltod kommt den Mitochondrien eine wichtige Funktion zu. Erfolgt eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran (mitochondrial outer membrane permeabilisation – MOMP), kann der Apoptose-induzierende Faktor (apoptosis inducing faktor – AIF) freigesetzt werden, der direkt und Caspasen-unabhängig zu DNA-Fragmentierung führt. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak können durch Translokation oder durch Änderung der Konformation zu einer Permeabilisierung der Mitochondrien-Membran beitragen, indem Poren gebildet oder Ionenkanäle geöffnet werden [Susin et al., 1999]; [Lorenzo and Susin, 2007].

In Melanomzellen wurde eine Bak-Translokation nach N69-Behandlung festgestellt, die zu einer Membranpermeabilisierung beitragen könnte. Bestätigt wurde dies durch eine deutliche und frühe Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Folglich wurde auch eine Freisetzung von Cytochrom C detektiert, die aber in einer Sackgasse verlief, da es zu keiner Caspasen-Aktivierung kam. Hierfür könnten Inhibitoren der Apoptose Proteine (inhibitors of apoptosis proteins – IAP's) verantwortlich sein. Es wurde auch AIF freigesetzt, der allerdings einen relativ hohen Basal-Spiegel vor der N69-Behandlung aufwies. Die Freisetzung von AIF könnte jedoch einen zusätzlichen Beitrag zur N69-induzierten Apoptose geleistet haben.

### 4.3. Die N69-induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Cathepsinen

Die Caspase-unabhängige Induktion der Apoptose durch N69 gab Anlass zu der Annahme, dass andere Proteasen als die Caspasen aktiviert sein könnten. Lysosomen und die lysosomale Freisetzung von Proteasen, insbesondere von Cathepsinen, kommen sowohl Caspase-unabhängig als auch Caspase-abhängig für die Induktion der Apoptose in Betracht [Chwieralski et al., 2006].

Die meisten Cathepsine, und alle Caspasen, gehören zu der Klasse der Cysteinproteasen. Cathepsine sind lysosomal lokalisierte Proteasen, die bei der Proteindegradation mitwirken. Ähnlich den Caspasen werden Cathepsine zunächst als inaktive Zymogene synthetisiert, die durch Spaltung aktiviert und durch Phosphorylierung reguliert werden können [Stoka et al., 2007]. Cathepsine entfalten ihre höchste enzymatische Aktivität bei saurem pH-Wert in den Lysosomen, können aber auch unter neutralen Bedingungen wie im Zytosol Proteine degradieren [Stoka et al., 2007]; [Turk and Stoka, 2007].

Es wurde bereits gezeigt, dass nach bestimmten Stimuli, wie nach p53-Aktivierung, Behandlung mit Mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien und dem Auftreten von oxidativem Stress, aktive Cathepsine in das Zytosol freigesetzt werden konnten [Tu et al., 2009]; [Broker et al., 2004]; [Zhao et al., 2003].

Seit längerem ist bekannt, dass Bid ein Verbindungsglied zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptose-Signalweg darstellt [Li et al., 1998]; [Luo et al., 1998]. Für eine mögliche Verbindung zwischen Lysosomen und Mitochondrien wurde in einer Zell-freien Studie gezeigt, dass Bid durch Cathepsine gespalten wurde [Stoka et al., 2001]; [Droga-Mazovec et al., 2008].

Für Melanomzellen konnte bereits Caspase-unabhängige Apoptose durch die Hochregulation von Nbk und die Freisetzung von Cathepsinen gezeigt werden [Oppermann et al., 2005]; (Dissertation Malte Oppermann, FU Berlin, 2006).

Für die Wirkung von N69 in Melanomzellen zeigten sich signifikante lysosomale Veränderungen zu sehr frühen Zeitpunkten (1 h). Durch die Färbung mit Acridin-Orange wurde nach kurzer Zeit mit einem Farbumschlag von orange nach grün, bedingt durch die Zunahme des pH-Wertes in den Lysosomen, eine Permeabilisierung der Lysosomen nachweisbar. Allerdings wurden Cathepsine erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt freigesetzt (48 h). Es ist daher nicht anzunehmen, dass die Cathepsine für die frühe Caspase-unabhängige Apoptose durch N69 in Melanomzellen verantwortlich sind.

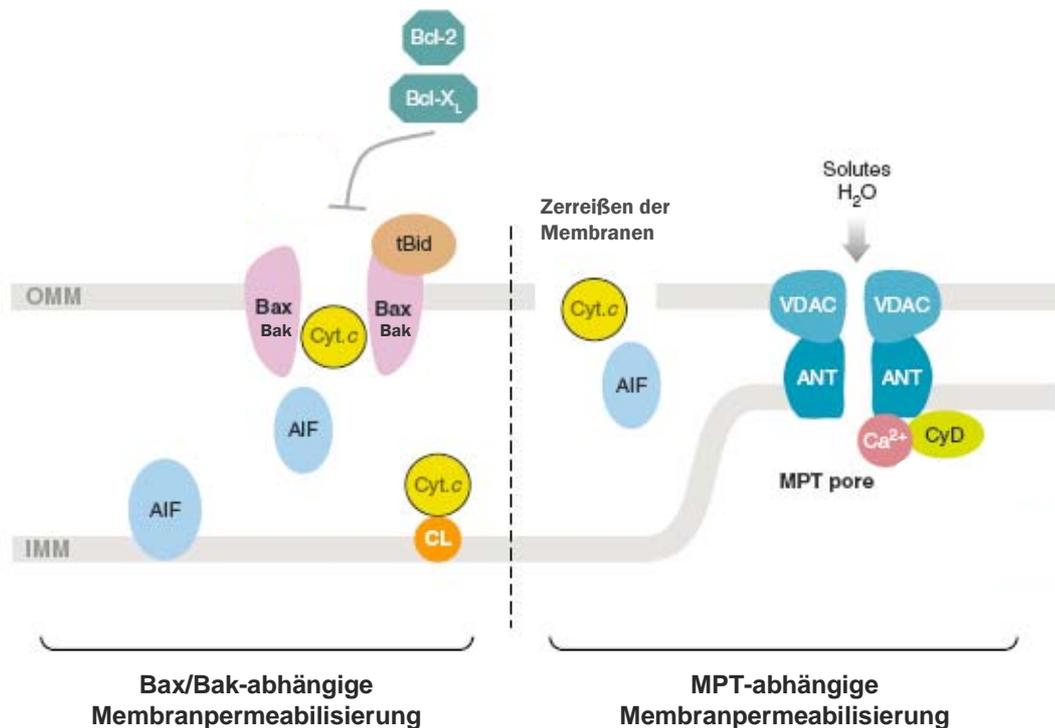
#### 4.4. Die Bedeutung der Bcl-2-Proteine und p53 in der N69-induzierten Apoptose

Die Bcl-2-Proteine gelten als Wächter und Regulatoren der Mitochondrien. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak können durch Oligomerisierung und allosterische Konformationsänderung Poren in der Mitochondrienmembranen bilden. Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax und Bak einer negativen Kontrolle durch Heterodimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> (Abb. 4.1.) [Green and Kroemer, 2004]. Alternativ wird vermutet, dass sie die Öffnung der PTP (permeability transition pore) regulieren. Diese bildet sich aus Komplexen von VDAC (voltage dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran mit ANT (adenine nucleotide translocator) in der inneren Mitochondrienmembran [Chipuk and Green, 2008]. Durch den Einstrom von Flüssigkeit können erst die innere und dann die äußere Membran reißen. Durch die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran kann es zu einer Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor) kommen (Abb. 4.1.) [Orrenius et al., 2007].

Die Mitochondrien wurden früh durch N69 angegriffen, was durch eine Abnahme des Membranpotentials, Freisetzung von Cytochrom C und AIF ins Zytosol und erhöhten Bak-Spiegeln in den Mitochondrien zum Ausdruck kam. Da die Freisetzung von Cytochrom C nicht zu einer Caspasen-Aktivierung führte, könnte dieser Weg jedoch hier durch Inhibitoren der Apoptose Proteine (inhibitors of apoptosis proteins – IAP's) blockiert sein. Bak ist ein proapoptotisches, mitochondriales Protein, was bei Apoptoseinduktion tiefer in die Mitochondrien-Membran integriert wird und an einer Porenbildung beteiligt sein kann [Chipuk and Green, 2008]. Erhöhte Bak-Spiegel in Mitochondrien wurden auch in Glioblastom-Zellen mit SNAP [Jin et al., 2006] und in Hepatom-Zellen mit Luteolin [Lee et al., 2005] beobachtet.

Auch antiapoptotische Regulationen wurden nach N69-Behandlung auf der Ebene der Bcl-2-Proteine festgestellt, wie die Hochregulation von Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub>, insbesondere in den weniger sensitiven Mel-2a und SK-Mel-13 Zellen. Es handelte sich hierbei vermutlich um eine Gegenregulation als Schutz vor der Apoptose. Solche Gegenregulation von Mcl-1 wurde ebenfalls in Melanomzellen mit dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib berichtet [Fernandez et al., 2005].

Die Überexpression von Bcl-2 schützte in Melanomzellen weitgehend vor N69-induzierter Apoptose. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in Melanomzellen mit Ceramid und Todesliganden [Raisova et al., 2002] und in Brustkrebszellen mit TRAIL [Fulda et al., 2002] festgestellt.



**Abb. 4.1. Mechanismus der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation – MOMP) nach [Orrenius et al., 2007]**

AIF: apoptosis inducing factor; ANT: adenine nucleotide translocator; CL: Cardiolipin; Cyt c: Cytochrome c; Cy D: Cyclophilin D; IMM: inner mitochondrial membrane; MPT: mitochondrial permeability transition; OMM: outer mitochondrial membrane; VDAC: voltage-dependent anion channel

Die Apoptoseregulation im Melanom erscheint oft anders reguliert als in anderen Tumoren. Daher ist die Rolle von p53 im Melanom nicht klar, und es wird vermutet, dass der p53-Signalweg trotz des Fehlens inaktivierender Mutationen blockiert sein kann [Eberle et al., 2007b]. Es wurde ein erhöhter p53-Spiegel durch N69 in drei der vier Melanom-Zelllinien gefunden. Einige Proteine der Bcl-2-Familie wie Bax, Noxa oder Puma sind bekannte p53-Targets [Yu and Zhang, 2005], jedoch konnte keine Korrelation zwischen der p53-Hochregulation durch N69 und der Expression dieser Proteine detektiert werden. Die Rolle von p53 in N69-induzierter Apoptose könnte aber auch im Zusammenhang mit der Regulation von ROS (reactive oxygen species) stehen, da auch verschiedene REDOX-Gene als p53-Targets beschrieben wurden [Yu and Zhang, 2005].

#### 4.5. Die Bedeutung von ROS in der N69-induzierten Apoptose

Reactive oxygen species (ROS) sind an der Regulation vieler verschiedener Signalwege beteiligt, wie MAP-Kinasen, Tyrosinkinase, Transkriptionsfaktoren und an der Genexpression [Fleury et al., 2002]. Mehrere Arbeiten weisen darauf hin, dass ROS auch in Verbindung zur Regulation der Apoptose stehen können [Hervouet et al., 2007]; [Kießling et al., 2009]. Die mitochondriale Atmungskette ist der wichtigste Entstehungsort von ROS. Durch Redox-Prozesse und Elektronenverschiebungen kann es zur Bildung von Superoxid-Anionen und zur Produktion von  $H_2O_2$  kommen [Orrenius et al., 2007]. Intrazelluläres Eisen kann mit  $H_2O_2$  in einer Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führen, die die aggressivste Form von ROS darstellen [Galaris et al., 2008]; [Valko et al., 2006].

Es werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, wie ROS zu Apoptose und DNA-Fragmentierung führen können, wobei auch hier sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Wege beschrieben wurden [Orrenius et al., 2007]. ROS verursachen verschiedene DNA-Schäden wie Purin- und Pyrimidin-Modifikationen, DNA-Protein-Vernetzungen, Backbone-Schäden und DNA-Strangbrüche [Pelicano et al., 2004]; [Dizdaroglu et al., 2002]. DNA-Schäden können in p53-Aktivierung resultieren und schließlich in die Aktivierung des extrinsischen Signalweges münden [Riedl and Shi, 2004]. Cytochrom C Freisetzung ins Zytosol kann auch durch ROS-bedingte oxidative Modifikation von Cardiolipin erfolgen. Cytochrom C ist durch Cardiolipin mit der inneren Mitochondrienmembran verbunden. Mitochondriale Membran-Proteine und Membran-Lipide sind direkte Angriffspunkte von ROS [Fleury et al., 2002]; [Orrenius et al., 2007].

ROS-abhängige aber Caspase-unabhängige Apoptose ist bereits in verschiedenen Zellmodellen beschrieben worden, so in Fibroblasten nach Behandlung mit Cadmium oder Curcumin [Shih et al., 2004]; [Thayyullathil et al., 2008], in Zervixkarzinomzellen mit Arsenitoxid [Kang et al., 2004] und in Plattenepithelkarzinomzellen mit Cisplatin [Kim et al., 2008]. Die genauen Signalwege sind unbekannt und wurden teilweise mit der mitochondrialen Freisetzung von AIF und Endonuklease G diskutiert.

In der N69-induzierten Apoptose wurde schon nach kurzer Zeit ein starker Anstieg von ROS festgestellt. Diese Aktivität von N69 könnte durch das komplexierte Eisen zustande kommen, wobei die Nukleosidstruktur als Carrier-Funktion dienen könnte, um eine gute Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten [Molina-Arcas et al., 2009]; [King et al., 2006].

Die Entstehung von ROS kann durch antioxidativ wirkende Substanzen oder Enzyme aufgehoben bzw. abgefangen werden. Zu den physiologischen Antioxidantien gehören Glutathion, Albumin, Vitamin C und Vitamin E. Ein nicht physiologisches Antioxidans ist N-Acetylcystein. Zu den antioxidativen Enzymen gehören Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase. Die Zellen eines Organismus benötigen ein bestimmtes Maß an ROS für physiologische Prozesse, daher sind ROS immer vorhanden. In der Apoptose können mehr ROS entstehen als physiologisch benötigt werden und können so zum programmierten Zelltod beitragen [Salganik, 2001].

In der Zellkultur werden hauptsächlich N-Acetylcystein (NAC), Vitamin E (Vit E) und Vitamin C eingesetzt. Welches Antioxidans unter welchem Stimulus wirksam ist, ist wahrscheinlich von der Art der Zelle und deren Aufnahmefähigkeit bezüglich der jeweiligen Substanz abhängig.

In Leukämiezellen, die mit der aus der traditionellen chinesischen Medizin stammenden Droge Baizhu behandelt worden waren, konnte die Apoptose durch NAC von 65% auf 5% gesenkt werden [Huang et al., 2005]. In Leukämiezellen, die mit Withaferin A, einem sekundären Pflanzenstoff der Schlafbeere, behandelt worden waren, konnte durch NAC die Apoptose von 45% auf 10% reduziert werden [Malik et al., 2007]. Caspase-unabhängige Apoptose wurde durch Arsenitoxid in Cervixkarzinomzellen induziert und konnte durch NAC auf Kontrollniveau gesenkt werden [Kang et al., 2004]. Das hydrophile NAC zeigte jedoch keine Wirkung auf die Apoptoseinduktion und ROS-Produktion durch N69 in Melanomzellen, sondern erzielte eher eine Verstärkung der Apoptose und ROS-Produktion.

In anderen Zellsystemen wurde auch Vitamin E als Antioxidans eingesetzt. Bei Leberzellkarzinomzellen, die mit Cinnamaldehyd behandelt worden waren, senkte Vitamin E die Apoptose auf Kontrollniveau [Wu et al., 2004]. In Ewing Sarkomzellen behandelt mit Betulinsäure konnte nur Vitamin E die Apoptose verhindern, nicht jedoch Vitamin C oder NAC [Gopal et al., 2004]. Bei Melanomzellen nach Behandlung mit dem selektiven I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitor BMS-345541 wurde das Vitamin E Derivat Tiron eingesetzt, welches im Gegensatz zu NAC die Apoptose verhinderte [Yang et al., 2007]. Die durch N69 induzierte Apoptose und die ROS-Produktion in Melanomzellen konnten durch das lipophile Vitamin E vollständig unterdrückt werden. Möglicherweise lagert sich Vitamin E durch seine Lipophilie gezielt an zu schützenden Membranen in der Zelle an [Tsuruga et al., 2003].

Der durch N69 aktivierte Apoptose-Signalweg in Melanomzellen wurde durch den Einsatz von antiapoptotischen Substanzen wie dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD und durch die Überexpression von Bcl-2 blockiert.

In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass zVAD auch unspezifische Aktivitäten aufweisen kann, wie die generelle Inhibition von Cystein-Proteasen wie der Caspasen, Cathepsine, Papain und Legumain. Auswirkungen auf weitere Proteasen oder Enzyme scheinen daher nicht ausgeschlossen [Rozman-Pungercar et al., 2003]. Auch eine Verbindung zwischen zVAD und ROS wurde bereits für Prostatakarzinomzellen mit Betulinsäure dargestellt, wobei zVAD hier die ROS-Produktion und auch die DNA-Fragmentierung reduzierte und so die Zellen schützte [Ganguly et al., 2007].

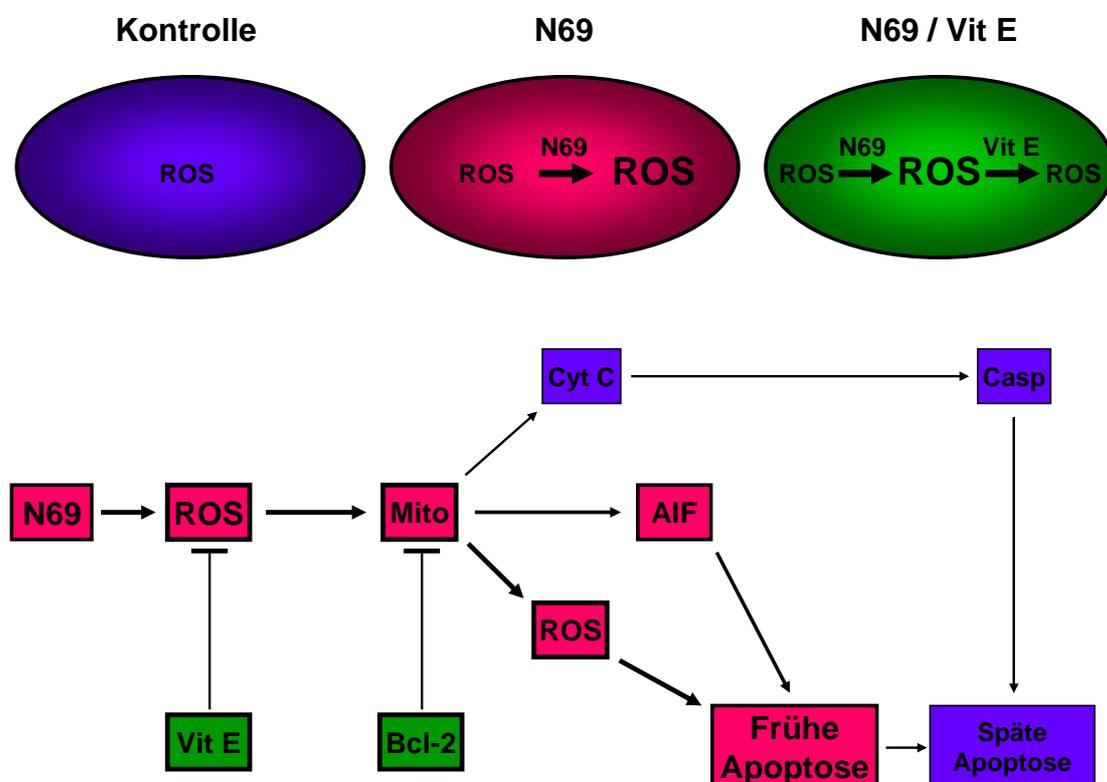
In Melanomzellen mit N69 wurden ähnliche Ergebnisse deutlich, indem die ROS-Produktion und die Induktion der Apoptose durch zVAD vollständig blockiert wurden. Die Wirkungsweise von zVAD auf die ROS-Produktion bleibt jedoch sowohl für Prostatakarzinomzellen als auch für Melanomzellen ungeklärt.

Antiapoptotische Bcl-2-Proteine inhibieren die Aktivität von Bax, Bak und BH3-only-Proteinen und verhindern so die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und die Freisetzung von Cytochrom C [Chipuk and Green, 2008]. Es wurde vielfach diskutiert, dass sie ebenfalls in die Entstehung der mitochondrialen ROS-Produktion involviert sind [Fleury et al., 2002]; [Kang et al., 2004]. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Überexpression von Bcl-2 vor ROS-Produktion schützte, was in Verbindung zu der vermehrten Bildung von intrazellulären Antioxidantien wie Superoxiddismutase und Glutathion stand [Voehringer and Meyn, 2000]; [Tripathi and Hildeman, 2004]. Des Weiteren sollen antiapoptotische Bcl-2-Proteine die Zellen unempfindlicher gegenüber höheren ROS-Spiegeln werden lassen, da sie wahrscheinlich die Mitochondrienmembran schützen [Tripathi and Hildeman, 2004].

In Melanomzellen blockierte die Bcl-2-Überexpression zwar die Apoptose, war jedoch ohne Effekt auf die Entstehung von ROS. Dies legt nahe, dass die Bcl-2-Überexpression ihre antiapoptotischen Eigenschaften eher unterhalb der ROS-Bildung entfaltet. Die Bcl-2-Überexpression hat hier also keinen Effekt auf Redox-Potentiale, sondern stellt eher einen Schutzschild für die Mitochondrien dar.

Für N69 scheint ein Wirkungsmechanismus unter Einbeziehung des nullwertigen Eisens wahrscheinlich. N69 bewirkt eine erhöhte ROS-Produktion, die Membranpermeabilisierungen und Apoptose nach sich zieht. Die entstandenen ROS können Lipide und Proteine der Membranen angreifen. Dadurch können proapoptotische mitochondriale Faktoren freigesetzt werden. Durch ein Zusammenbrechen der Mitochondrien und weitere ROS-Produktion kann es zur frühen Caspase-unabhängigen Apoptose kommen. Über eine spätere Gesamtaktivierung weiterer Faktoren erfolgt letztlich auch eine Caspasen-Aktivierung. Erhöhte ROS-Bildung und sich anschließende Apoptose durch N69 kann durch Vitamin E in Melanomzellen fast vollständig verhindert werden. Eine Bcl-2-Überexpression unterdrückt zwar nicht die ROS-Bildung, aber kann wahrscheinlich die Mitochondrien vor einer Schädigung durch ROS schützen und so die Apoptose verhindern (Abb. 4.2.).

Mit diesem neuen Signalweg könnten neue Möglichkeiten für Angriffspunkte bei dem sehr therapieresistenten Malignen Melanom entstehen.



**Abb. 4.2. Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von N69**

oben) Darstellung der ROS-Produktion durch N69 und des Schutzes durch Vitamin E

unten) Durch N69 entstehen ROS, die zu Membranschäden führen und so Apoptose auslösen können

#### 4.6. Weiterführende Fragestellungen

In dieser vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Apoptoseinduktion von Ferroptosid (N69) in Melanomzellen beschrieben. Insbesondere wurde der Wirkungsmechanismus beleuchtet, so dass sich diese Substanz als ein viel versprechendes Zytostatikum für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beim Melanom oder möglicherweise auch bei anderen Karzinomen darstellt.

Dieses Nukleosidanalogen scheint hier nicht über einen Einbau in die DNA zu wirken, sondern eher über die sehr schnelle und sehr starke Produktion von ROS. Diesbezüglich wäre weiterführend von Interesse, ob durch Radikale hier nur Lipide und Proteine der Membranen oxidiert werden, oder ob auch durch eine direkte Oxidation der DNA Strangbrüche entstehen.

Bei den Proteinen Cytochrom C und AIF konnte eine Freisetzung aus den Mitochondrien ins Cytosol gezeigt werden, wobei AIF zu Caspase-unabhängiger Apoptose führen kann. Es gibt drei weitere proapoptotische Proteine, die bei mitochondrialen apoptotischen Vorgängen aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt werden können, HtrA2/Omi als Inhibitor von IAPs mit Serinprotease-Aktivität [Broker et al., 2005], Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase / Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) als Inhibitor von IAPs [Kim et al., 2006] und Endonuklease G, die direkt an der Fragmentierung der DNA mitwirken kann [Kim et al., 2008]. Die mögliche Beteiligung von Endonuklease G an der N69-induzierten Apoptose in Melanomzellen wäre von besonderem Interesse, da sie auch Caspase-unabhängig wirken soll.

Besonders zu beleuchten wäre weiterhin die Anwendung von N69 in vivo. In einem Mausversuch zeigte N69 in mittleren Konzentrationen keine auffällige Toxizität (Prokop A. et al., unveröffentlicht). Auf humane Melanozyten wirkte N69 nur in hohen Konzentrationen toxisch. Inwieweit die Anwendung von N69 in vivo Nebenwirkungen mit sich bringen könnte, ist daher momentan noch nicht genau zu sagen.

Die interessante Substanz N69 liefert durch ihre veränderten Signalwege neue Möglichkeiten für Angriffspunkte beim Melanom und möglicherweise auch bei anderen Karzinomen.

### 5.1. Zusammenfassung

Das Maligne Melanom zeichnet sich durch hohe Aggressivität auf Grund starker Resistenz gegenüber gängigen Chemotherapeutika aus. Die schwachen Ansprechraten lassen sich auf die massive Apoptose-Defizienz von Melanomzellen zurückführen. Der genetisch festgelegte Prozess der Apoptose (programmierter Zelltod) beschreibt einen Schutzmechanismus multizellulärer Organismen zur Eliminierung überflüssiger oder entarteter Zellen. Die Entwicklung und Charakterisierung neuer Chemotherapeutika zur Überwindung der Resistenzen ist dringend notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Strategie zur Induktion der Apoptose in Melanomzellen überprüft. Das eisenhaltige Cytosin-Analogon Ferroptosid (N69) löste signifikant in niedrigen Konzentrationen und nach kurzer Zeit Apoptose in Melanomzellen aus. Dabei konnten typische Charakteristika wie DNA-Fragmentierung, Chromatin-Kondensation und Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials festgestellt werden. Dennoch war die durch N69 induzierte Apoptose in Melanomzellen primär völlig unabhängig von einer Caspasen-Aktivierung. Es konnten weder gespaltene Caspasen detektiert werden, noch konnten selektive Caspase-Inhibitoren den pro-apoptotischen Effekt von N69 verhindern. Cathepsine wurden zu späten Zeitpunkten aus den permeabilisierten Lysosomen freigesetzt. Daher sind sie wohl eher nicht ursächlich für die frühe Apoptose, was durch die Wirkungslosigkeit von selektiven Cathepsin-Inhibitoren belegt wurde. Cytochrom C und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF), der seine proapoptotische Wirkung Caspasen-unabhängig entfaltet, wurden aus den Mitochondrien freigesetzt, was zusätzlich durch die Abnahme des Mitochondrien-Membranpotentials bestätigt wurde. Zusätzlich wurde eine Hochregulation von Bak festgestellt, was zu Porenbildungen in den Mitochondrien-Membranen beitragen kann.

Ein wichtiges Charakteristikum von organischen Eisenverbindungen ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Als ein Hinweis auf neue proapoptotische Signalwege in Melanomzellen durch N69 wurde ein erhöhter ROS-Spiegel festgestellt. Durch Vitamin E konnte der ROS-Spiegel auf Kontroll-Niveau gesenkt und dadurch die Apoptose inhibiert werden. ROS können Lipide, Proteine und DNA schädigen und so zur Apoptose führen. Die hier identifizierte besondere Rolle von ROS in der Apoptoseregulation von Melanomzellen könnte in der Behandlung des Malignen Melanoms genutzt werden, um die Apoptoseresistenz zu überwinden und die Wirksamkeit bestehender Therapieformen zu optimieren.

## 5.2. Summary

Malignant melanoma is characterized by a high malignancy due to its strong resistance against common chemotherapeutics. The weak response is related to massive apoptosis deficiency in melanoma cells. The genetically regulated process of apoptosis (programmed cell death) describes a protection mechanism of multicellular organisms in order to eliminate useless or degenerated cells. Development and characterization of new chemotherapeutics are urgently required.

In the present study a new strategy for induction of apoptosis in melanoma cells was investigated. The iron-containing cytosine analogue ferropoptoside (N69) significantly induced apoptosis in melanoma cells in low concentrations and after early times. Typical characteristics of apoptosis as DNA fragmentation, chromatin condensation and decrease of mitochondrial membrane potential were seen. However apoptosis induced by N69 in melanoma cells was primary completely independent of caspase activation. Neither cleaved caspases were detected, nor could selective caspase inhibitors prevent the proapoptotic effect of N69. Cathepsins were released from permeabilized lysosomes at late times. Thus they are probably not causal for early apoptosis, which was proven by the inefficiency of selective cathepsin inhibitors. Cytochrome C and apoptosis inducing factor (AIF), which develops the proapoptotic activity caspase-independent, were released from mitochondria, which was additionally proven by a decrease of the mitochondrial membrane potential. Additionally an upregulation of Bak was seen, which can lead to pore buildings in the mitochondrial membranes.

An important hallmark of organic iron compounds is the formation of reactive oxygen species (ROS). As an indicator for new proapoptotic pathways in melanoma cells by N69 an increased ROS level was found. By the use of Vitamine E ROS level could be reduced nearly to control level and apoptosis was thereby blocked. ROS are able to oxidize lipids, proteins and DNA and thus lead to apoptosis. This identified specific role of ROS in apoptosis regulation of melanoma cells could be used for treatment of malignant melanoma to overcome the apoptosis resistance and to optimize the efficiency of current therapies.

## 6. Literaturverzeichnis

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* **19**: 3635-3648

Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G (2003) Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* **22**: 3927-3936

Breslow A (1978) Tumor thickness in evaluating prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* **187**: 440

Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FAE, Giaccone G (2004) Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research* **64**: 27-30

Broker LE, Kruyt FAE, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* **11**: 3155-3162

Bruggen J, Fogh J, Sorg C (1981) Tumor production in the nude mouse, fibrinolytic activity and cross-reactivity with antimelanoma sera of various human tumor cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* **102**: 141-152

Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ (1976) Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3278-3282

Chao DT, Korsmeyer SJ (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**: 395-419

- 
- Chipuk JE, Green DR (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **18**: 157-164
- Chipuk JE, Green DR (2005) Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 268-275
- Chwieralski CE, Welte T, Buhling F (2006) Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* **11**: 143-149
- Clark WH (1991) Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* **64**: 631-644
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van HM (1984) A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* **15**: 1147-1165
- Collins AR (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**: 238-246
- Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* **39**: 73-88
- Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* **15**: 1022-1032
- Degtarev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239-252
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* **32**: 1102-1115
- Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, Salvesen GS, Stoka V, Turk V, Turk B (2008) Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell

death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem* **283**: 19140-19150

Eberle J, Fecker LF, Forschner T, Ulrich C, Rowert-Huber J, Stockfleth E (2007a) Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *British Journal of Dermatology* **156**: 18-24

Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H (2008) Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. *Experimental Dermatology* **17**: 1-11

Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefter U, Fecker LF (2007b) Overcoming apoptosis deficiency of melanoma - Hope for new therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates* **10**: 218-234

Eckhart L, Ban J, Fischer H, Tschachler E (2000) Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **277**: 655-659

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2008) Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**: 6522-6537

Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opipari AW, Jr., Lowe SW, Soengas MS (2005) Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* **65**: 6294-6304

Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**: 131-141

Franke JC, Plotz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J (2009) New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* **79**: 575-586

Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**: 201-232

Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **21**: 2283-2294

Galaris D, Skiada V, Barbouti A (2008) Redox signaling and cancer: the role of "labile" iron. *Cancer Lett* **266**: 21-29

Ganguly A, Das B, Roy A, Sen N, Dasgupta SB, Mukhopadhyay S, Majumder HK (2007) Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res* **67**: 11848-11858

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R (2006) [Brief guidelines: malignant melanoma of the skin]. *J Dtsch Dermatol Ges* **4**: 344-349

Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R (2007) Evidence and interdisciplinary consensus-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* **17**: 393-399

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-1423

Gopal DVR, Narkar AA, Badrinath Y, Mishra KP, Joshi DS (2004) Protection of Ewing's sarcoma family tumor (ESFT) cell line SK-N-MC from betulinic acid induced apoptosis by alpha-DL-tocopherol. *Toxicology Letters* **153**: 201-212

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629

Hervouet E, Simonnet H, Godinot C (2007) Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie* **89**: 1080-1088

Holzmann B, Lehmann JM, Ziegler-Heitbrock HW, Funke I, Riethmuller G, Johnson JP (1988) Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant melanoma, is a novel leukocyte activation antigen. *Int J Cancer* **41**: 542-547

Hossini AM, Eberle J (2008) Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol* **76**: 1612-1619

Hossini AM, Geilen CC, Fecker LF, Daniel PT, Eberle J (2006) A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain. *Oncogene* **25**: 2160-2169

Huang HL, Chen CC, Yeh CY, Huang RL (2005) Reactive oxygen species mediation of Baizhu-induced apoptosis in human leukemia cells. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 21-29

Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354

Jin HO, Park IC, An S, Lee HC, Woo SH, Hong YJ, Lee SJ, Park MJ, Yoo DH, Rhee CH, Hong SI (2006) Up-regulation of Bak and Bim via JNK downstream pathway in the response to nitric oxide in human glioblastoma cells. *Journal of Cellular Physiology* **206**: 477-486

Kang MH, Kang YH, Szymanska B, Wilczynska-Kalak U, Sheard MA, Harned TM, Lock RB, Reynolds CP (2007) Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood* **110**: 2057-2066

Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, et al. (2004) Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Research* **64**: 8960-8967

Keilholz U, Gore ME (2002) Biochemotherapy for advanced melanoma. *Semin Oncol* **29**: 456-461

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257

Kiessling MK, Klemke CD, Kaminski MM, Galani IE, Krammer PH, Gulow K (2009) Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* **69**: 2365-2374

Kim JS, Lee JH, Jeong WW, Choi DH, Cha HJ, Kim DH, et al. (2008) Reactive oxygen species-dependent EndoG release mediates cisplatin-induced caspase-independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells. *International Journal of Cancer* **122**: 672-680

Kim R, Emi M, Tanabe K (2006) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 545-553

King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD, Baldwin SA (2006) Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 416-425

Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**: 532-542

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Progress in Neurobiology* **81**: 179-196

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3-11

Kroemer G, Jaattela M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer* **5**: 886-897

Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**: 725-730

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden BT, Vandenabeele P (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* **14**: 44-55

Landex NL, Kayser L (2004) Optimization of an Acridine Orange-bisbenzimidazole procedure for the detection of apoptosis-associated fluorescence colour changes in etoposide-treated cell cultures. *J Mol Histol* **35**: 133-139

Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH (2005) Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**: 124-131

Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 589-598

Lens MB, Dawes M (2004) Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* **150**: 179-185

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501

Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**: 2405-2419

Lorenzo HK, Susin SA (2007) Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat* **10**: 235-255

Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* **22**: 31-34

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490

Malik F, Kumar A, Bhushan S, Khan S, Bhatia A, Suri KA, Qazi GN, Singh J (2007) Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic cell death of human myeloid leukemia HL-60 cells by a dietary compound withaferin A with concomitant protection by N-acetyl cysteine. *Apoptosis* **12**: 2115-2133

- Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2009) Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* **7**: 426-434
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**: 271-279
- Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J (2005) Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* **24**: 7369-7380
- Oral E, Rowell SL, Muratoglu OK (2006) The effect of alpha-tocopherol on the oxidation and free radical decay in irradiated UHMWPE. *Biomaterials* **27**: 5580-5587
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 143-183
- Ott I, Gust R (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm (Weinheim)* **340**: 117-126
- Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**: 97-110
- Raisova M, Goltz G, Bektas M, Bielawska A, Riebeling C, Hossini AM, Eberle J, Hannun YA, Orfanos CE, Geilen CC (2002) Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett* **516**: 47-52
- Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* **117**: 333-340
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 897-907
- Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogoyo M, Turk D, Vasiljeva O, Stefe I, Vandenabeele P, Bromme D, Puizdar V, Fonovic M, Trstenjak-Prebanda M, Dolenc I, Turk V, Turk B (2003) Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by

caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ* **10**: 881-888

Salganik RI (2001) The benefits and hazards of antioxidants: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition* **20**: 464S-472S

Sampath D, Rao VA, Plunkett W (2003) Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* **22**: 9063-9074

Schlawe D, Majdalani A, Velcicky J, Hessler E, Wieder T, Prokop A, Schmalz HG (2004) Iron-containing nucleoside analogues with pronounced apoptosis-inducing activity. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**: 1731-1734

Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977) Characterization of Ebv-Genome Negative Null and T-Cell Lines Derived from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukemic Transformed Non-Hodgkin Lymphoma. *International Journal of Cancer* **19**: 621-626

Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J (2002) Isolation of intact lysosomes from human RPE cells and effects of A2-E on the integrity of the lysosomal and other cellular membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **240**: 983-988

Shih CM, Ko WC, Wu JS, Wei YH, Wang LF, Chang EE, Lo TY, Cheng HH, Chen CT (2004) Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* **91**: 384-397

Soengas MS, Lowe SW (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**: 3138-3151

Stennicke HR, Salvesen GS (2000) Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 299-306

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V,

Salvesen GS (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**: 3149-3157

Stoka V, Turk V, Turk B (2007) Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem* **388**: 555-560

Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**: 110-156

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446

Tait SW, Green DR (2008) Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* **27**: 6452-6461

Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S (2008) Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med* **45**: 1403-1412

Tinel A, Tschopp J (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**: 843-846

Tripathi P, Hildeman D (2004) Sensitization of T cells to apoptosis - A role for ROS? *Apoptosis* **9**: 515-523

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**: 1097-1099

Tsuruga M, Dang Y, Shiono Y, Oka S, Yamazaki Y (2003) Differential effects of vitamin E and three hydrophilic antioxidants on the actinomycin D-induced and colcemid-accelerated apoptosis in human leukemia CMK-7 cell. *Molecular and Cellular Biochemistry* **250**: 131-137

Tu HC, Ren D, Wang GX, Chen DY, Westergard TD, Kim H, Sasagawa S, Hsieh JJ, Cheng EH (2009) The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate

programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1093-1098

Turk B, Stoka V (2007) Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett* **581**: 2761-2767

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**: 1-40

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **84**: 627-639

Voehringer DW, Meyn RE (2000) Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal* **2**: 537-550

Wright CW, Duckett CS (2005) Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* **115**: 2673-2678

Wu SJ, Ng LT, Lin CC (2004) Effects of vitamin E on the cinnamaldehyde-induced apoptotic mechanism in human PLC/PRF/5 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **31**: 770-776

Yang JM, Su YJ, Richmond A (2007) Antioxidants tiron and N-acetyl-L-cysteine differentially mediate apoptosis in melanoma cells via a reactive oxygen species-independent NF-kappa B pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **42**: 1369-1380

Yu J, Zhang L (2005) The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**: 851-858

Zhang XD, Wu JJ, Gillespie S, Borrow J, Hersey P (2006) Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin. *Clin Cancer Res* **12**: 1355-1364

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* **270**: 3778-3786

---

**7. Abkürzungen**

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
APS	Ammonium Persulfat
ALM	Akrolentiginöses Melanom
Bad	Bcl-2 Antagonist of Cell Death
Bak	Bcl-2 Antagonist / Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma / Leukemia-2
Bcl-x <sub>L</sub>	Bcl-x (long form)
Bcl-x <sub>S</sub>	Bcl-x (short form)
BSA	Bovine Serum Albumin
Caspase	Cysteiny-Aspartat-Spezifische Proteinase
Cathepsine	griech. Verdauen
CD95	APO-1, Fas
CHAPS	3-[ (3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-Propansulfonat
DISC	Death Inducing Signaling Complex (Todes Signal Komplex)
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pl
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis
FCS	Fötales Kälberserum
Hrk	Harakiri
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
LDH	Laktat-Dehydrogenase-Enzym
LMM	Lentigo Malignes Melanom
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
NHM	Normale Humane Melanozyten
NMM	Noduläres Malignes Melanom
Noxa	lat. Schaden
OD	Optische Dichte

---

PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
ROS	Reactive Oxygen Species
RTCA	Real-Time Cell Analysis
SDS	Natriumdodecylsulfat
smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SSM	Superficiell Spreitendes Melanom
TAE	Tris-Acetat
TEMED	N,N, N',N'-tetramethylethylenediamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
XIAP	X-linked inhibitory apoptosis protein
z-VAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

## 8.1. Publikationen

### 8.1.1. Originalarbeiten

New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. **Franke JC**, Plötz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J. *Biochemical Pharmacology* 79 (2010) 575–586.

### 8.1.2. Kurzveröffentlichungen

The new iron-containing nucleoside analogue N69 triggers apoptosis in human melanoma cells by a caspase-independent way. **Franke JC**, Prokop A, Schlawe D, Schmalz HG, Fecker LF, Eberle J.

(Poster auf der 34. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung - ADF - 2007 in Freiburg)

The iron-containing nucleoside analogue N69 efficiently induces apoptosis in human melanoma cells by activating new pathways enclosing lysosomal activation. **Franke JC**, Prokop A, Schlawe D, Schmalz HG, Eberle J.

(Poster auf der 35. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung - ADF - 2008 in Erlangen)

The iron-containing nucleoside analogue N69 induces apoptosis in melanoma cells by new pathways also enclosing reactive oxygen species (ROS). **Franke JC**, Prokop A, Schlawe D, Schmalz HG, Fecker LF, Eberle J.

(Poster beim 18. Hautkrebskongress der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie - ADO - 2008 in Berlin)

The iron-containing nucleoside analogue N69 induces apoptosis in human melanoma cells by a caspase-independent way and cytochrome c release. **Franke JC**, Prokop A, Schlawe D, Schmalz HG, Eberle J.

(Poster auf der Apoptosis World 2008 in Luxemburg)

---

The iron-containing nucleoside analogue N69 induces apoptosis in human melanoma cells by a caspase-independent but ROS-dependent pathway. **Franke JC**, Plötz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J.

(Poster auf dem 17. Kongress der European Cell Death Organisation - ECDO - 2009 in Paris)

New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. **Franke JC**, Prokop A, Schlawe D, Schmalz HG, Fecker LF, Eberle J.

(Vortrag auf dem 5. Kongress der European Association of Dermato-Oncology - EADO - 2009 in Wien)

8.2. Lebenslauf

## Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

## **Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

### 8.3. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank all jenen, die durch ihre Unterstützung in jeglicher Form zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. Jürgen Eberle und Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen danke ich für die interessante Themenstellung. Ihre fachliche Kritik, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Geduld trugen wesentlich zur Vervollkommnung dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Rainer Müller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens anstelle von Herrn Prof. Dr. Ronald Gust, dem ich für seine neuen Aufgaben in Innsbruck alles Gute wünsche.

Herrn PD Dr. Dr. Aram Prokop und Herrn Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz danke ich für die interessante Substanz Ferropoptosid (N69).

Herrn Dr. Lothar F. Fecker danke ich für sein technisches Wissen und seine praktische Hilfestellung im Laboralltag.

Weiterhin danke ich Dr. Amir M. Hossini, Dr. Bahtier M. Kurbanov, Dr. Malte Oppermann, Dr. Giorgios Kokolakis, Frank Braun, Michael Plötz, Amma Yeboah, Magdalena Schmude, Stefanie Rückert, Conny Schwarz und allen, die nicht persönlich genannt sind, für die nette Atmosphäre und Hilfe im Labor.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre finanzielle und insbesondere emotionale Unterstützung aufs Wesentlichste zum Gelingen meines Studiums und meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Aus diesem Grund widme ich diese Arbeit meinen Eltern.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Freund Maximilian für Geduld und Langmut, da er so manches Mal auf Zeit mit mir zugunsten meiner Arbeit verzichten musste.