

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Apoptoseinduktion in kolorektalen Zellen und Gewebe
durch die HIV-Proteaseinhibitoren Saquinavir und
Nelfinavir***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Luzie Lenzner

aus

Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Zeitz
 2. Prof. Dr. med. N. H. Brockmeyer
 3. Prof. Dr. med. T. Weinke

Datum der Promotion: 22.03.2013

für meine Eltern...

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)	9
1.2	Antivirale Medikamente.....	11
1.3	Die HIV-Proteaseinhibitoren.....	12
1.4	Zelluläre Wirkungen der Proteaseinhibitoren	13
1.5	Diarrhö bei Proteaseinhibitoren	14
1.6	Apoptose.....	15
1.7	Apoptose und Chemotherapeutika	18
1.8	HIV-Proteaseinhibitoren und Apoptose	20
2	FRAGESTELLUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Zellkultur.....	23
3.1.1	Charakterisierung der Zelllinien.....	23
3.1.2	Kultivierung der Zelllinien.....	24
3.1.3	Einfrieren von Zellen	24
3.1.4	Gewebekultur kolorektaler Mukosa und Tumoren	25
3.1.5	Kontrollführung.....	27
3.1.6	Kombination der Proteaseinhibitoren mit Camptothecin.....	28
3.1.7	Zellaussaat und Inkubation.....	28
3.2	Durchflusszytometrie	29
3.2.1	Durchflusszytometrische DNA-Analyse im Doublet-Discrimination-Mode (DDM) 30	
3.3	Histologischer Nachweis von Apoptose mittels TUNEL-Assay	33
3.3.1	TUNEL-Färbung von Zellen in Chamber-Slides	34
3.3.2	TUNEL-Färbung von Gewebeproben	34
3.3.3	TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit.....	35

3.4	Western Blot-Analyse von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) und PARP-Spaltprodukt.....	35
3.4.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.4.2	Elektrotransfer in Semi-Dry Technik.....	37
3.4.3	Immundetektion mit Anti-PARP-Antikörper und Visualisierung	37
3.4.4	Densitometrische Analyse.....	38
3.5	Statistische Auswertung.....	39
3.6	Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot.....	39
4	ERGEBNISSE	41
4.1	Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren	41
4.1.1	Spontanapoptose	41
4.1.2	Apoptoseinduktion durch Camptothecin	42
4.1.3	Apoptoseinduktion durch Saquinavir.....	42
4.1.4	Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Nelfinavir.....	45
	Zusammenfassung Nelfinavir	47
4.1.5	Zusammenfassung Saquinavir	47
4.2	Zeitverlauf der Apoptoseinduktion	47
4.2.1	Einfluss von Saquinavir auf den Zellzyklus von HT29/B6	49
4.3	Kombination Camptothecin mit Saquinavir und Nelfinavir	50
4.3.1	HT 29/B6-Zellen.....	50
4.3.2	LS174T-Zellen.....	51
4.3.3	Zusammenfassung.....	52
4.4	Qualitativer Apoptosenachweis: TUNEL-Färbung in HT29/B6-Zellen.....	52
4.5	Apoptoseinduktion in humanem Gewebe: Nachweis der PARP-Spaltung im Western Blot	53
4.5.1	Kolorektale Mukosa.....	53
4.5.2	Kolorektale Karzinome	53
4.6	Qualitativer Apoptosenachweis: TUNEL-Färbung in humanem Gewebe	54

5	DISKUSSION	56
5.1	Einführung.....	56
5.2	Spontanapoptoserate.....	56
5.3	Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir in weiteren intestinalen Zelllinien 58	
5.4	Unterschiede der Zelllinien	59
5.5	Apoptoseinduktion durch physiologische Konzentrationen	60
5.6	Zeitverlauf der Apoptoseinduktion und Einfluss auf den Zellzyklus	61
5.7	Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Nelfinavir und Saquinavir.....	62
5.8	Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren in humanem Gewebe	64
5.9	Diarrhö unter Proteaseinhibitoren durch epitheliale Apoptose	65
5.10	Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren in kolorektalen Karzinomen	66
5.11	Tumorprotektion durch HAART.....	67
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69
8	LISTE DER VERWENDETEN MATERIALIEN	82
9	LEBENS LAUF LUZIE LENZNER.....	84
10	ERKLÄRUNG	85
11	PUBLIKATIONS LISTE.....	86
12	DANKSAGUNG	87

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) wurde 1983 charakterisiert und gehört zur Familie der Retroviren^{1, 2}. Die Infektion mit HIV führt unbehandelt zum tödlich verlaufenden Immunschwäche-Syndrom (englisch: Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS). AIDS ist eine Immunschwächekrankheit, die durch das Auftreten von opportunistischen Infektionen und malignen Tumoren gekennzeichnet ist.

Nach Schätzungen der WHO waren im Jahr 2009 33,3 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert. Die Anzahl der Neuinfektionen wurde auf 2,6 Millionen geschätzt, und circa 1,8 Millionen Menschen starben an den Folgen der erworbenen Immunschwäche³. Während die HIV-Infektion durch die Anwendung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) in den industrialisierten Ländern mittlerweile den Status einer chronischen Krankheit hat, erhalten in den am stärksten betroffenen Ländern Afrikas südlich der Sahara nur schätzungsweise 36 Prozent aller therapiebedürftigen HIV-infizierten Menschen Zugang zu einer antiretroviralen Therapie³.

Zwei Typen von HIV sind derzeit bekannt: HIV-1 und HIV-2. HIV-2 findet sich überwiegend in Westafrika, während HIV-1 für die weltweite Pandemie verantwortlich ist. HIV hat sich durch Mutationen aus Immundefizienzviren anderer Primatenspezies entwickelt⁴. Das HIV- Genom besteht aus neun Genen - drei Strukturgenen (pol, env und gag) und sechs regulatorischen Genen (nef, vif, vpu, vpr, tat und rev). Das pol-Gen kodiert für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase, gag („group antigen“) kodiert für das Nukleokapsid und env für die Virushülle^{4, 5}. Die Gene sind in zwei Kopien eines Ribonukleinsäure (RNA)-Stranges codiert. Sie werden vom Nukleokapsid umgeben, welches aus dem p24-Core-Antigen besteht. Das Nukleokapsid wird von einer Phospholipid-Doppelschicht umhüllt. Auf der Phospholipid-Doppelschicht sitzt das äußere Hüllprotein Glykoprotein (gp) 120. Gp120 ist durch das Transmembranprotein gp41 in der Lipidmembran verankert (Abbildung 1). Zur Infektion einer Zelle benötigt HIV spezifische Rezeptoren: CD4 als primären Rezeptor und einen Chemokinrezeptor als Korezeptor. Die zwei wichtigsten Korezeptoren von HIV sind CCR5 und CXCR4, welche von T-Lymphozyten und Makrophagen, den häufigsten Zielzellen für HIV, exprimiert werden. Chemokinrezeptoren vermitteln die Wanderung der jeweiligen Zellen in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration⁶.

Einleitung

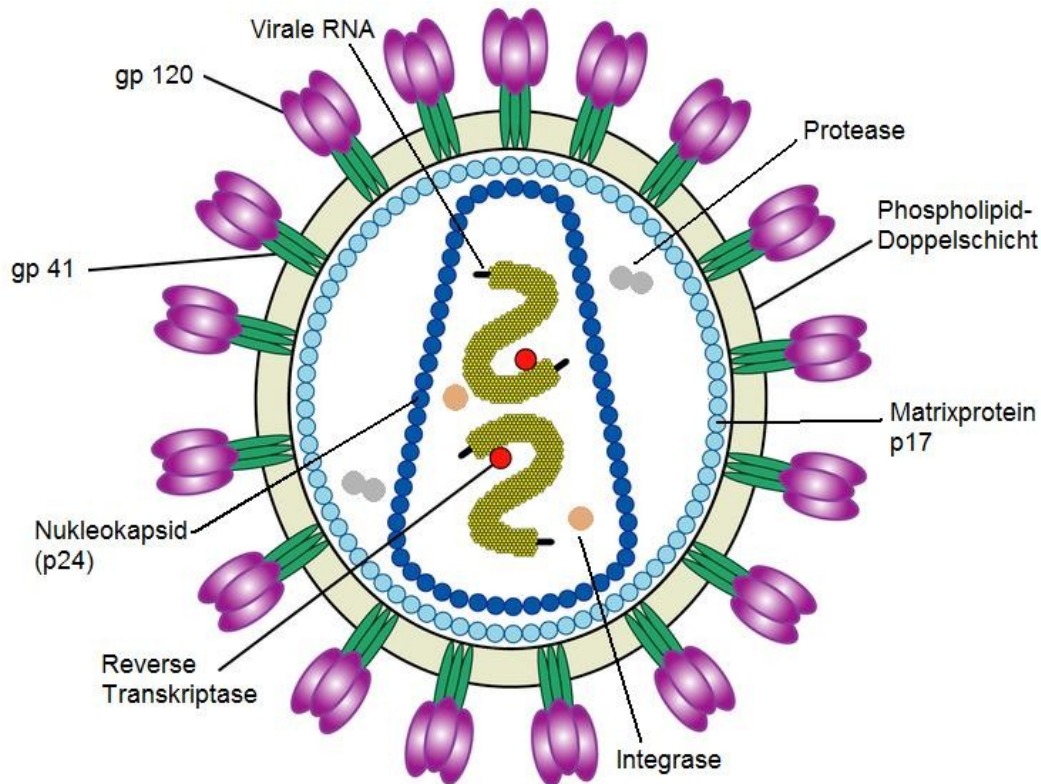


Abbildung 1: Das Humane Immundefizienz-Virus (modifiziert nach ⁷)

CD4 wurde 1984 als primärer Rezeptor von HIV-1, HIV-2 und SIV (simian immunodeficiency virus) identifiziert^{8, 9}. CD4 findet sich auf der Zelloberfläche von einem Teil der T-Lymphozyten, auf T-Vorläuferzellen in Knochenmark und Thymus, auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen im ZNS⁵. Natürliche Liganden von CD4 sind MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen: bei der Antigenerkennung assoziiert das CD4-Molekül mit dem T-Zell-Rezeptor und bindet an spezifischer Stelle des MHC-II-Moleküls der Zielzelle. Diese Bindung ist für eine effiziente Reaktion der T-Zelle notwendig¹⁰.

Bei Infektion einer Zielzelle durch HIV bindet gp120 hochaffin an das CD4-Molekül auf der Zelloberfläche. Hierdurch wird eine Konformationsänderung von gp120 induziert, welche die Interaktion mit dem jeweiligen Chemokin-Korezeptor ermöglicht. Die Virushülle fusioniert daraufhin mit der Zielzellmembran. Virale RNA und die im Virus vorhandenen Enzyme gelangen in das Zytoplasma. Dort transkribiert das virale Enzym Reverse Transkriptase die virale RNA in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Durch die Integrase wird die virale cDNA in das Genom der Wirtszelle eingefügt. Die integrierte cDNA bezeichnet man als Provirus. Das Provirus kann in ruhenden T-Zellen persistieren, ohne dass es zur Transkription kommt. Dies bezeichnet man als „latente Infektion“. Latent infizierte Zellen wie z.B. ruhende

Makrophagen oder T-Gedächtniszellen (T-Memory-Zellen) sind ein wichtiger Rückzugsort für HIV. Nur in aktivierten CD4-T-Zellen kommt es zur Transkription des Provirus. Die mRNA für die Regulator- und die Hüllproteine müssen vor der Translation gespleißt werden. Ungespleißte und gespleißte Transkripte werden translatiert und es entstehen die viralen Regulatorproteine und die strukturellen Komponenten, die zur Bildung neuer Viruspartikel benötigt werden: Kapsid, Hüllproteine und die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Einige virale Proteine entstehen über ein Vorläuferprotein, welches durch die HIV-Protease gespalten wird. Ungespleißte virale RNA-Transkripte bilden das RNA-Genom für die neu entstehenden Virionen. Sie werden mit den viralen Strukturproteinen und den viralen Enzymen zu neuen Viruspartikeln zusammengebaut (Aggregation) und „knospen“ aus der Zelle heraus (Budding). Die HIV-Protease wird erst nach dem Budding der Viruspartikel aktiv.

1.2 Antivirale Medikamente

Die Enzyme des HIV stellen Zielstrukturen für Medikamente dar: Die HIV-Proteaseinhibitoren hemmen die HIV-Protease. Es entstehen dann weiterhin Viruspartikel, die aber durch Hemmung der Protease nicht zu infektiösen Viren ausreifen können. Die Reverse Transkriptase wird durch die nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und die nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) gehemmt. NRTI sind Nukleosidanaloga, die von der Reversen Transkriptase als falscher Metabolit in die DNA eingebaut werden und zum DNA-Strangbruch führen. Azidothymidin (AZT bzw. Zidovudin) ist der älteste Vertreter dieser Substanzklasse und ist seit 1987 in den USA zugelassen zur Therapie der HIV-Infektion. Als Monotherapie kann AZT die HIV-assoziierte Mortalität und Häufigkeit opportunistischer Infektionen bei HIV-Infizierten mit AIDS senken, führt aber bei Daueranwendung zu Resistenzentwicklung^{11, 12}. Die neueste Gruppe zugelassener antiviraler Substanzen zielt auf den Eintritt des Viruspartikels in die Zielzelle. Dazu zählen die Fusionshemmer, welche die gp41-vermittelte Fusion mit den Wirtszellen verhindern, die Korezeptorantagonisten, sowie die Integraseinhibitoren¹³.

Die Hauptursache für das Versagen der genannten antiretroviralen Therapien sind resistente Virusvarianten. HIV hat einen hohen Umsatz mit bis zu 10 Milliarden neuer Viruspartikel täglich¹⁴. Da die Reverse Transkriptase mit einer hohen Fehlerrate arbeitet, entstehen ständig neue Virusvarianten. In Anwesenheit antiretroviraler Medikamente werden die resistenten Varianten zur dominanten Variante selektiert¹⁵. Ähnlich wie bei der Behandlung der Tuberkulose werden daher zur Behandlung der HIV-Infektion inzwischen ausschließlich

Kombinationen antiretroviraler Substanzen eingesetzt. In der Delta-Studie konnte 1996 gezeigt werden, dass die Kombination von AZT mit einem weiteren NRTI das Überleben verlängert und eine Progression der Krankheit verzögert¹⁶. Bei Kombination verschiedener antiretroviraler Substanzklassen spricht man von „hochaktiver antiretroviraler Therapie“ (HAART).

1.3 Die HIV-Proteaseinhibitoren

Nach Einführung von HAART sank in den Industrieländern sowohl die Inzidenz AIDS-definierender Erkrankungen als auch die AIDS-assoziierte Mortalität. Die Einführung von Proteaseinhibitoren in die Kombinationstherapien 1995 brachte zusätzlichen Nutzen, indem sie die Mortalität von 29,4 auf 8,8 Tote pro 100 Personenjahre absenkte (Abbildung 2)¹⁷.

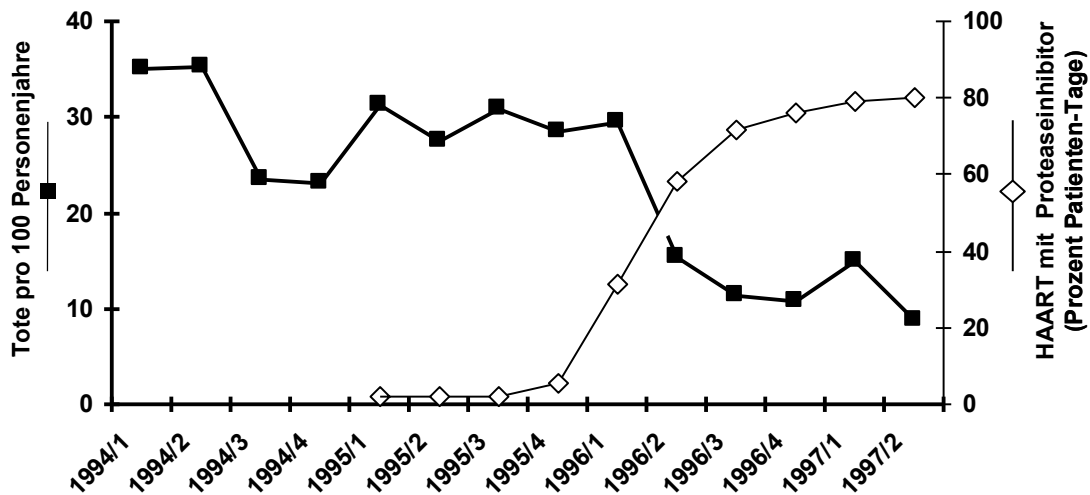


Abbildung 2: Mortalität (Tote pro 100 Personenjahre) und Häufigkeit des Einsatzes einer Kombinationstherapie, die einen Proteaseinhibitor enthält (in Prozent der Patiententage) bei HIV-Infizierten mit CD4+-Zahl >100/ μ l; vierteljährlich, Januar 1994 – Juni 1997. Ende 1996 wurden etwa 80 % der untersuchten Population mit Proteaseinhibitoren behandelt, die Mortalität sank dabei von etwa 30 auf 10 Tote pro 100 Personenjahre. Adaptiert von Palella et al., N Engl J Med 1998.

Die Proteaseinhibitoren sind Beispiele modernen Medikamentendesigns, da sie nach Aufklärung von Funktion und Struktur der HIV-Protease gezielt für deren Hemmung entwickelt wurden¹⁸,¹⁹. Zwischen 1995 und 2000 wurden fünf Proteaseinhibitoren durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen: Saquinavir (Invirase/Fortovase), Ritonavir (Norvir), Nelfinavir (Viracept), Indinavir (Crixivan) und Amprenavir (Agenerase). Sie sind inzwischen fester Bestandteil der HAART²⁰. Vier weitere Proteaseinhibitoren sind inzwischen in Deutschland zugelassen (Tipranavir, Darunavir, Atazanavir, Fosamprenavir)²¹.

1.4 Zelluläre Wirkungen der Proteaseinhibitoren

Durch die Einführung der Proteaseinhibitoren wurde in der Behandlung der HIV-Infektion ein weiterer Durchbruch erreicht. Man erklärte dies zunächst durch die noch effektivere Reduktion der Viruslast und die nachfolgende Immunrestitution. Dennoch wurde bald eine Reihe von Wirkungen beobachtet, die unabhängig von der Hemmung der Virusreplikation sind. Studien, in denen die Wirksamkeit verschiedener Therapieschemata evaluiert wurde, lieferten indirekte Hinweise auf HIV-unabhängige immunologische Effekte. Die CD4⁺-Zellzahl im peripheren Blut ist ein Marker des Schweregrads der HIV-Infektion. Unter Proteaseinhibitor-Behandlung stiegen die CD4⁺-Zellen stärker an als in Therapieschemata ohne Proteaseinhibitor²². Dies traf auch bei Individuen zu, bei denen die Viruslast nicht absank. Nach Ersatz der Proteaseinhibitor-Komponente durch einen NNRTI sank die CD4⁺-Zellzahl trotz effektiver Unterdrückung der Virusreplikation^{23, 24}. Als möglicher Mechanismus wird eine durch Proteaseinhibitoren induzierte Hemmung der HIV-getriggerten T-Zell-Apoptose über eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials diskutiert²⁵.

Auch HIV-assoziierte Tumorerkrankungen sind unter HAART seltener: Die Inzidenz von Kaposi-Sarkomen (KS) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) verringert sich, teilweise bilden diese Tumoren sich zurück²⁶. Ein verbessertes Überleben wird auch bei Virus-assoziierten, AIDS-definierenden NHL beobachtet²⁷: Das Kaposi-Sarkom (KS) ist eine angioproliferative Erkrankung, welche mit dem humanen Herpes-Virus 8 (HHV-8) assoziiert ist. Es tritt bei HIV-1/HHV8-Koinfizierten besonders häufig auf und wächst aggressiv. Die positiven Effekte der Proteaseinhibitoren in HAART auf das Kaposi-Sarkom könnten ebenfalls durch Immunrestitution²⁸ und HIV-Suppression erklärbar sein, in deren Folge die hier assoziierten Viren, HHV8 und Epstein-Barr-Virus (EBV), besser eliminiert werden konnten. Die Effekte korrelierten aber nicht deutlich mit dem Ansteigen der CD4⁺-Zellzahl oder einer effektiven Virussuppression. In einigen Fällen war bis zur Elimination des KS-assoziierten HHV8 längere Zeit notwendig als bis zum Ansprechen des KS selbst. Außerdem bestehen Unterschiede zwischen Proteaseinhibitoren-HAART und NNRTI-HAART: Unter Proteaseinhibitoren-enthaltenden Therapieschemata kam es häufiger zu einer kompletten Remission von KS. Bei einer Umstellung von Proteaseinhibitor- auf NNRTI-HAART trat ein KS häufiger wieder auf, obwohl sich beide Schemata als gleich effektiv gegen die HIV-Infektion erwiesen²⁹.

Einleitung

Aus diesen Daten lässt sich vermuten, dass die Wirkungen der Proteaseinhibitoren beim KS teilweise durch direkte antiproliferative und/oder antiangiogene Effekte der Proteaseinhibitoren verursacht sein könnten. In HIV-freien-in-vitro Systemen wurde diese Hypothese überprüft:

Die Endothelzell-Invasion und Angiogenese wird durch Indinavir und Saquinavir in KS-Zellen gehemmt²⁹. KS-Läsionen in Nacktmäusen werden in ihrem Wachstum gehemmt bzw. zeigen eine Regression, was den beobachteten Effekten unter Proteaseinhibitor-Therapie entspricht²⁹. Proteaseinhibitoren hemmen die Proliferation und vermindern die NF- κ B-Aktivität bei KS-Zellen³⁰. Die Proteaseinhibitoren haben also auch unabhängig von der HIV-Infektion Effekte im Stoffwechsel von Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören.

Weitere Hinweise auf HIV-unabhängige Wirkungen der Proteaseinhibitoren im Zellstoffwechsel ergeben sich durch die Nebenwirkungen. Unter Proteaseinhibitoren-enthaltender HAART treten metabolische Veränderungen auf: Hyperlipidämie, Lipodystrophie, Hyperglykämie, Insulinresistenz, Osteoporose³¹. NRTI stören die Mitochondrienfunktion durch ihren Einbau in die mitochondriale DNA³². Proteaseinhibitoren beeinflussen die Präadipozytendifferenzierung und den Retinoidsäure-Signaltransduktionsweg in Adipozyten. Auf diesen Wegen können beide Substanzklassen bei Langzeitanwendung zum Lipodystrophiesyndrom beitragen. Dabei kommt es zur Umverteilung des Körperfettes von den Extremitäten zum viszeralen Fett³³. Die Ursachen der Proteaseinhibitoren-Nebenwirkungen sind nur ansatzweise aufgeklärt.

1.5 Diarrhö bei Proteaseinhibitoren

Unerwünschte gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Diarrhö treten bei der Therapie mit Proteaseinhibitoren auf. Die Diarrhö ist dabei mit Abstand die häufigste Nebenwirkung der Proteaseinhibitoren der ersten Generation und tritt bei 17–20 % der mit Saquinavir³⁴ und 18–26 % der mit Nelfinavir Behandelten auf³⁵. Diarrhö betrifft aber auch bis zu 60 % der mit Ritonavir und Amprenavir behandelten Patienten unabhängig vom Immunstatus und erfolgreicher Virussuppression. Diarrhö beeinträchtigt die Lebensqualität und kann zu mangelhafter Compliance führen. Eine reduzierte Therapieadhärenz schränkt die Effektivität der antiretroviralen Therapie deutlich ein^{36,37}.

Die Pathogenese der Proteaseinhibitor-induzierten Diarrhö ist noch unklar. Neben Störungen der Darmmotilität oder Malabsorption kommen als Ursache für Diarrhö weitere Mechanismen in Frage: Die sekretorische Diarrhö wird durch aktive Ionensekretion unterhalten. Ionensekretion kann beispielsweise durch bakterielle Toxine oder durch Neurotransmitter des vegetativen

Einleitung

Nervensystems induziert werden. Passiver Leckfluss durch eine Störung der Barrierefunktion führt zum Verlust von Ionen und Wasser ins Darmlumen.

Zur Aufklärung dieser Mechanismen diente Bode et al. zunächst ein in-vitro-Zellmodell mit HT-29/B6-Monolayern. Die Monolayer wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Proteaseinhibitoren inkubiert. Der Kurzschlussstrom als Maß der Ionensekretion blieb dabei unverändert, dafür stieg die transepitheliale Leitfähigkeit und der Fluss von markiertem Natrium und Mannitol, so dass ein Leckfluss-Mechanismus vorliegen muss³⁸. Lecks in einer epithelialen Barriere können durch drei Mechanismen entstehen: Veränderungen im Netzwerk der tight-junctions^{39, 40}, nekrotischen Zelltod⁴¹, oder die Apoptose epithelialer Zellen, welche beide Mikroerosionen im Epithel verursachen^{42, 43}.

In dem HT-29/B6-Zellmodell verringerte sich nach Inkubation mit Proteaseinhibitoren die Expression der tight-junction-Proteine Occludin und Zonula-occludens-2 nicht. Weder zeigte sich eine erhöhte LDH-Freisetzung noch ergaben sich histologisch Hinweise für nekrotischen Zelltod. In der Histologie fand sich aber eine starke Apoptoseinduktion⁴⁴. Durch Ritonavir, Saquinavir und Nelfinavir kam es also zu einer Induktion von Apoptose, welche die Ursache für die Barrierestörung in HT-29/B6-Monolayern war.

1.6 Apoptose

Als Nebenwirkung der Proteaseinhibitoren ist Apoptose in der Darmmukosa ein unerwünschter Prozess. Ihr kommt im gesunden Organismus aber eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Homöostase in sich erneuernden Geweben, bei der Embryonalentwicklung, der Organogenese und der Differenzierung des Immunsystems, und auch bei pathologischen Prozessen wie der Onkogenese zu. Der Begriff Apoptose wurde 1972 durch Kerr et al. geprägt und bezeichnet im Altgriechischen das Abfallen von Blättern eines Baumes oder von Blütenblättern⁴⁵. Apoptotische Zellen zeigen Veränderungen, die sich morphologisch deutlich von denen der Nekrose unterscheiden: Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Plasmamembran, Verlust der Adhäsion, Auflösung in sogenannte apoptotische Körperchen und das Ausbleiben einer Entzündung in der Umgebung⁴⁶. Es handelt sich um einen konzentriert ablaufenden programmierten Zelltod. Die Apoptose ist ein aktiver Prozess, der als Antwort auf interne Zellsignale oder externe Stimuli auftritt.

Nicht-physiologische Extremsituationen in der Zellumgebung, wie schwere Hypoxie oder Ischämie, verursachen den nekrotischen Zelltod. Nekrose ist charakterisiert durch

Einleitung

Zellschwellung, Zerstörung der Organellen, ungeordnete DNA-Degradierung und rasche Membranruptur, welche zur Freisetzung von Zellbestandteilen und einer exsudativen Entzündung des umliegenden Gewebes führt. Auch der nekrotischen Zelltod wird durch Proteine reguliert, die aber weniger genau beschrieben sind als bei der Apoptose⁴⁷.

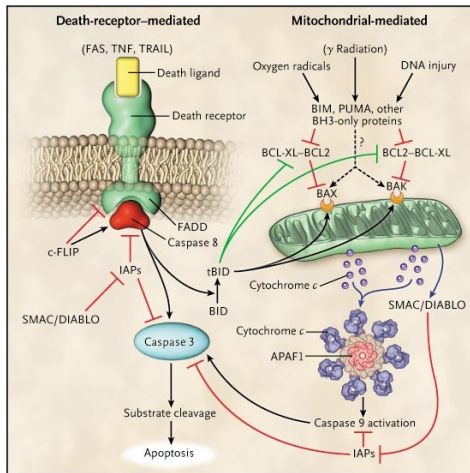


Abbildung 3: Wichtige Stoffwechselwege bei der Apoptose

Die Effektorcaspase 3 kann über die membranständigen Todesrezeptoren oder über das Mitochondrion aktiviert werden (aus: Hotchkiss et al. N Engl J Med 2009)

Im Zentrum der Apoptose steht die kaskadenartige Aktivierung einer Gruppe von Proteasen, den Caspasen (aspartat-specific cystein protease). Die Caspasen können durch zellinterne Stresssignale oder über membranständige Rezeptoren aktiviert werden. Sie haben ihrerseits eine Vielzahl von Substraten, über deren Abbau oder Aktivierung sie den apoptotischen Tod der Zelle exekutieren (zusammengefasst bei⁴⁸). Zu den membranständigen Rezeptoren, den sogenannten Todesrezeptoren, gehören z.B. die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie. Nach Bindung ihres entsprechenden Liganden bilden die Todesrezeptoren an ihrer intrazellulären Todesdomäne (DD; death domain) mit Hilfe verschiedener Adapterproteine den „death inducing signaling complex“ (DISC). Am DISC wird die Procaspase-8 in ihre aktive Form überführt, die daraufhin die weitere apoptotische Kaskade auslösen kann. Neben der Caspase-Aktivierung können am DISC weitere Signalwege eingeschlagen werden. Unter anderem kann über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa B)⁴⁹ eine veränderte Genexpression erfolgen.

Zellulärer Stress, z.B. Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlen oder Zytostatika, oder der Entzug von Wachstumsfaktoren, lösen Apoptose auf einem über das Mitochondrium führenden Weg aus. Dabei wird aus den Mitochondrien Cytochrom-C freigesetzt, das

Einleitung

normalerweise als Elektronentransporter in der Atmungskette arbeitet, nun aber weitere Proteine der Apoptosekaskade aktiviert. Cytochrom C bildet zusammen mit weiteren Adapterproteinen das Apoptosom. Am Apoptosom wird die Procaspase-9 in ihre aktive Form überführt. Reguliert werden diese Vorgänge am Mitochondrium von Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie. Die Freisetzung von Cytochrom-C wird dabei durch die proapoptotischen Proteine Bax, Bid und Bad getriggert, während die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L die mitochondriale Permeabilität herabsetzen. In der Regulation der Familie der Bcl-2-Proteine spielt auch das Protein p53 eine Rolle, das z.B. seinen apoptoseinduzierenden Effekt über die veränderte Transkription von Bax auslösen kann⁵⁰. Die Bcl-2-Proteine unterliegen außerdem der Kontrolle der Proteinkinase Akt, welche die Signale von Wachstumsfaktoren übermittelt^{51, 52}.

Die Apoptose lässt sich somit in zwei Stufen unterteilen (Abbildung 3): Zunächst erfolgt über die genannten Mechanismen die Aktivierung der Induktor-Caspasen-8, -9 & -10. Diese steuern dann ihrerseits die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 an. Die Effektor-Caspasen bewirken die Exekution der Apoptose (zusammengefasst bei⁵³).

Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung der chromosomalen DNA zuerst in größere (50 – 300 kb) und dann kleinere oligonukleosomale Fragmente mit wenigen hundert Basenpaaren⁵⁴. Der Abbau des Erbmateri als stellt einen irreversiblen Punkt der Zellvernichtung dar. Dieser Mechanismus bietet auch eine gewisse Schutzfunktion des Organismus, da auf diese Art auch schädliche Mutationen oder eingelagerte virale DNA zerstört werden⁵⁵.

Einige Caspase-abhängige Modifikationen von Proteinen des Zytoskeletts sind für Veränderungen der Zellmorphologie in den Endphasen der Apoptose verantwortlich. Lamine sind Intermediärfilamente, die das Gerüst der Kernhülle bilden. Die Lamine werden durch Caspase-6 gespalten und damit inaktiviert, was zur Fragmentierung des Zellkerns führt. Proteine, welche das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden, werden ebenfalls durch Caspasen inaktiviert, was sich in der Zellschrumpfung und der Loslösung aus dem Zellverband niederschlägt. Auch Aktin selbst kann als Substrat für die Caspasen dienen⁵³.

Neben den Proteinen des Zytoskeletts ist die Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP) ein weiteres wichtiges Substrat für die Caspase-3. PARP ist ein kernständiges Enzym, das DNA repariert. Nach der Aktivierung durch DNA-Strangbrüche überträgt PARP ADP-Ribose auf Histone und andere Kernproteine. Da dieser Prozess energieabhängig ist, würde die Aktivierung von PARP bei der DNA-Fragmentierung durch CAD einen großen Energieverlust für die Zelle darstellen, der sie in die Nekrose treiben würde. Daher wird PARP schon relativ früh während

der Apoptose in Fragmente von 89 kDa und 24 kDa gespalten. Das 24 kDa-Fragment bindet irreversibel an die DNA-Strangbrüche, so dass diese vor weiteren Reparaturversuchen geschützt werden. Auch das 89 kDa-Fragment hemmt die PARP-Aktivierung, indem es die Homodimerisation von zwei intakten PARP-Molekülen verhindert, die für die Funktion des Enzyms essentiell ist⁵⁶.

Die Fragmentierung der chromosomalen DNA und die Spaltung von PARP wurden in der vorliegenden Arbeit für den Nachweis der Apoptoseinduktion ausgewählt.

1.7 Apoptose und Chemotherapeutika

Die Schädigung der DNA und somit die Induktion von Apoptose ist das Hauptprinzip der klassischen Zytostatika zur Behandlung von Karzinomen⁵⁷.

Die Platinderivate sind alkylierende Pharmaka. Sie reagieren mit Stickstoffatomen der DNA-Basen, so dass es zu Fehlern in der DNA kommt, die nicht ausreichend repariert werden können und zur Apoptose führen. Interkalierende Zytostatika, wie z.B. Doxorubicin, schieben sich zwischen zwei Basenpaare der DNA-Helix und stören damit die Funktion der Topoisomerase II. Der Wiederverschluss der DNA wird verhindert, es entstehen Strangbrüche. Spindelgifte, also Vincaalkaloide (z.B. Vincristin) und die Taxane (Docetaxel) haben die Mikrotubuli als Hauptbestandteil der mitotischen Spindel zum Ziel. Mikrotubuli haben zahlreiche Funktionen in der Zelle, z. B. als Gerüst für Zellorganellen und bei Transportprozessen. Die Funktion der Mikrotubuli wird durch die Spindelgifte gestört und die Zellteilung verhindert. Antimetabolite, z.B. die Folatantagonisten wie Methotrexat, greifen in den Folsäuremetabolismus ein. Folsäure wird für die Synthese von Nukleotiden und Proteinen benötigt. Pyrimidin- und Purinantagonisten stören die DNA-Synthese entweder über Hemmung von Enzymen der Nukleotidsynthese oder durch Einbau in die DNA als falscher Metabolit. 5-Fluoruracil (5-FU) hemmt die Thymidilatsynthase⁵⁸.

Neben diesen Gruppen der klassischen Zytostatika, die mit dem DNA-Metabolismus interagieren, wurde in den letzten Jahren auch eine große Zahl von Pharmaka entwickelt, die spezifischer in den Tumorzellstoffwechsel eingreifen. Dies war möglich, nachdem spezifische Überlebensstrategien von Karzinomzellen identifiziert worden waren. Beispiele für solche Pharmaka sind monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, z.B. Cetuximab (EGFR - epidermal growth factor receptor), gegen Tyrosinkinase (z.B. Imatinib – BCR/Abl-Fusionsprodukt) oder gegen das Proteasom (z.B. Bortezomib). Hemmstoffe der

Einleitung

Topoisomerase I (z.B. Irinotecan), die ebenfalls an der DNA-Replikation beteiligt ist und durch deren Hemmung Doppelstrangbrüche induziert werden, werden bereits in der Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt⁵⁹.

Bei der Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms ist 5-FU seit etwa 40 Jahren das wichtigste Mittel. Zu Beginn der 90er Jahre stellte sich die Verbindung 5-FU + Folinsäure als wirksam heraus. Sie ist bis heute der Standard in der Primärtherapie des kolorektalen Karzinoms^{60, 61}.

In Deutschland sind jährlich rund 60.000 Neuerkrankungen an kolorektalem Karzinom zu verzeichnen. Bei Frauen ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Krebserkrankung nach dem Mamma-Karzinom, bei Männern die dritthäufigste nach Prostata- und Bronchialkarzinom. Bei den Sterbefällen durch Krebs stellt es in beiden Geschlechtern den zweiten Platz. Die Inzidenz steigt ab dem 45. Lebensjahr sprunghaft an, der Häufigkeitsgipfel liegt für Männer um das 67. Lebensjahr und das 72. Lebensjahr für Frauen⁶². In den USA war die Mortalität in den letzten Jahren deutlich rückläufig, insgesamt nahm die Inzidenz der Rektumkarzinome ab, zum Teil erklärbar durch verbesserte Screeningmaßnahmen und vermehrte Polypektomien, die eine Entdeckung und Behandlung in früheren Stadien ermöglichen⁶³. Über 90 % der kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome. Das sporadische kolorektale Karzinom (90 %) entwickelt sich aus adenomatösen Polypen durch Mutation von mehreren Genen (Onkogen-Aktivierung: z.B. K-Ras, oder Tumor-Suppressorgen-Inaktivierung, z.B. p53) in der Adenom-Karzinom-Sequenz zu Karzinomen. Die restlichen Kolon-Karzinome (10 %) entstehen durch autosomal-dominant vererbte genetische Alterationen im Rahmen von Syndromen wie beispielsweise der familiären adenomatösen Polyposis (FAP).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind nur etwa 40 % der kolorektalen Karzinome noch auf die Darmwand beschränkt und nicht metastasiert (Union internationale contre le cancer (UICC)-Stadium I & II). Etwa ein Drittel (32 %) der Patienten haben bereits Lymphknotenmetastasen (Stadium III) und bei 28 % liegen Fernmetastasen vor. Die Prognose ergibt sich aus Primärtumorstadium und der Operationsradikalität: Wird vollständig reseziert, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 80 %, bleiben mikro- oder makroskopische Reste, überleben nur 10 % der Patienten fünf Jahre oder länger^{64, 65}. Die vollständige Resektion ist Therapie der Wahl. Bei Durchbruch des Primärtumors durch die Darmwand (T3/4) oder Lymphknotenmetastasen muss sich wegen der wahrscheinlich vorhandenen Mikrometastasen eine adjuvante Chemotherapie anschließen. Beim Rektumkarzinom kommt außerdem eine kombinierte Radiochemotherapie zum Einsatz. Kolonkarzinome entziehen sich aufgrund der Dünndarmbelastung der Bestrahlung,

hier werden zur postoperativen adjuvanten Therapie im Stadium III Schemata mit 5-FU und Folinsäure angewendet^{66,67}.

In der palliativen Chemotherapie fortgeschrittener kolorektaler Karzinome ließ sich als Standardtherapie durch zahlreiche Studien die Kombination von Folinsäure und protrahierter 5-FU-Infusion bestätigen (zusammengefasst bei⁶⁸). Oral verabreichbare 5-FU-prodrugs wie Capecitabine zeigen gewisse Vorteile gegenüber 5-FU⁶⁹. Da aber ca. 30 % der Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom eine primäre Resistenz gegen Fluoropyrimidine zeigen und ein weiterer Teil unter der Behandlung eine sekundäre Resistenz entwickelt, besteht weiterhin die Notwendigkeit, andere Therapiekonzepte zu entwickeln. Kombinationen von 5-FU/FS mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan oder mit Oxaliplatin sind der alleinigen Anwendung von 5-FU/FS bezüglich der Überlebensdauer überlegen. Monoklonale Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab (EGF-Rezeptor-Antikörper) sowie Bevacizumab (VEGF-Antikörper) ergänzen die Therapie in der metastasierten Situation. Durch die sequentielle Kombination der genannten Medikamente kann heute beim metastasierten Kolonkarzinom eine mediane Überlebensrate von bis zu 24 Monaten erreicht werden⁷⁰.

1.8 HIV-Proteaseinhibitoren und Apoptose

Die Wirksamkeit beim Kaposi Sarkom legt nahe, dass die Proteaseinhibitoren antineoplastische Eigenschaften haben. Trotz der vermeintlichen Spezifität der Proteaseinhibitoren für die HIV-Protease gibt es eine humane Protease, die Strukturhomologien mit der HIV-Protease teilt, nämlich die 20S-Untereinheit des Proteasoms⁷¹. Das Proteasom baut Ubiquitin-markierte Proteine der intrazellulären Signalwege ab. T-Zellen präsentieren Antigene, nachdem diese durch das Proteasom bearbeitet wurden⁷². Ritonavir hemmt die 20S-Untereinheit *in vitro*^{72, 73}. Ritonavir beeinflusst in therapeutisch relevanten Konzentrationen die Proteasomfunktion und verursacht in höheren Konzentrationen einen Zellzyklusarrest⁷⁴. Ritonavir induziert an humanen Tumorzelllinien der lymphatischen Reihe und murinen Fibrosarkomzelllinien Apoptose, die angewandten Konzentrationen liegen dabei geringfügig über den *in vivo* bei der HIV-Therapie im Serum erreichten Werten⁷⁵. Die Apoptoseinduktion an epithelialen Tumorzelllinien zeigten erstmalig Pajonk et al.: Saquinavir induziert Apoptose in Prostatakarzinom-Zelllinien und die Zellen reagieren sensibler auf ionisierende Strahlung, möglicherweise auch hier vermittelt über die Hemmung des Proteasoms⁷⁶. Das Proteasom degradiert und inaktiviert sonst I κ B (Inhibitor of kappa B), den Inhibitor des antiapoptotisch wirkenden NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells).

Einleitung

Die Konzentrationen der Proteaseinhibitoren, die zur Induktion von Apoptose führten, waren in der Arbeit von Pajonk et al. höher als die Serumkonzentrationen in-vivo. Nach oraler Aufnahme kann am Darmepithel aber mit noch höheren Konzentrationen gerechnet werden. Saquinavir besitzt, je nach Aufbereitungsform und Einnahmeschema, eine orale Bioverfügbarkeit von nur etwa 4 %. Nelfinavir ist zwar zu über 70 % oral bioverfügbar, unterliegt aber ebenfalls einem ausgeprägten hepatischen first-pass-Effekt^{18, 34, 35}. Über das Darmepithel hinweg besteht also ein Konzentrationsgefälle, so dass im Bereich der Darmmukosa die Proteaseinhibitoren in höheren Konzentrationen vorliegen als im peripheren Serum. Die Darmmukosa ist also den Proteaseinhibitoren und ihrer Apoptoseinduktion exponiert. Hierin könnte wiederum die Ursache für die Nebenwirkung Diarrhö liegen. Daher soll die Apoptoseinduktion an intestinalen Zellen untersucht werden.

2 Fragestellung

HIV-Proteaseinhibitoren sind wichtige Bestandteile einer antiretroviralen Therapie, ihr Gebrauch führt jedoch häufig zu Diarrhö. In einem Zellkulturmodell mit der Kolonepithelzelllinie HT29/B6 induzierten Ritonavir, Saquinavir und Nelfinavir Apoptose und eine epitheliale Barrierestörung. Apoptoseinduktion in intestinalen Epithelzellen durch HIV-Proteaseinhibitoren könnte nicht nur Diarrhö verursachen, sondern lässt sich möglicherweise auch in der antineoplastischen Therapie nutzen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführende Untersuchungen zur Wirkung von Saquinavir und Nelfinavir auf verschiedene epitheliale Zelllinien sowie auf normales Darmgewebe und kolorektale Karzinome durchgeführt.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen geklärt werden:

Handelt es sich bei der Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir um einen zelllinienspezifischen Effekt, der auf HT29/B6-Zellen beschränkt ist? Findet Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir auch in weiteren Zelllinien intestinalen Ursprungs statt?

Führen im Körper physiologisch vorkommende Konzentrationen zu messbaren Veränderungen, oder sind diese Ergebnisse nur in unphysiologischen Konzentrationen zu erzielen? In welchem zeitlichen Rahmen findet die Apoptoseinduktion statt? Welche Auswirkungen haben die Proteaseinhibitoren auf den Zellzyklus?

Induzieren Saquinavir und Nelfinavir Apoptose auch an humaner intestinaler Mukosa? Um dies zu überprüfen, wurden Explantate humaner kolorektaler Mukosa mit den Proteaseinhibitoren behandelt. Können die beobachteten Effekte ursächlich für die Diarrhö sein, die unter Therapie mit Proteaseinhibitoren beobachtet wird? Ist Apoptoseinduktion auch in kolorektalen Karzinomen nachweisbar? Wie stark ist der Effekt im Vergleich zu dem etablierten Apoptoseinduktor Camptothecin?

In der Therapie von Karzinomen werden Kombinationen von Substanzen eingesetzt. Kann in der Zellkultur die Kombination von Saquinavir und Nelfinavir mit Camptothecin dessen apoptoseinduzierende Wirkung verstärken?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien

Die LS 174T-Zellen wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. C. Hanski zur Verfügung gestellt, die HT-29/B6-Zellen, Caco-2- und T84-Zellen erhielt ich von Prof. Dr. med. J. Schulzke (beide Medizinische Klinik I, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin).

3.1.1.1 HT-29/B6

Die humane Colonkarzinomzelllinie HT-29 (ATCC-Nummer HTB-38) bildet unter Standardkulturbedingungen unpolarisierte Multilayer. Dabei zeigt sie funktionelle Eigenschaften von Chlorid-sezernierenden Zellen⁷⁷. Im Gegensatz dazu bildet der Klon HT-29/B6 dieser Zelllinie hochdifferenzierte und polarisierte Monolayer, wenn er in Abwesenheit von Glukose kultiviert wird. So entwickeln diese Zellen unter dieser Bedingung eine apikale Bürstensaummembran und interzelluläre tight-junctions. Kreusel et al.⁷⁸ zeigten im Jahre 1991, dass diese Zelllinie HT-29/B6 auf verschiedene Sekretagoga, wie Forskolin, VIP und Prostaglandin E₁, mit einer Chloridsekretion reagiert.

3.1.1.2 Caco-2

Die Zelllinie Caco-2 (ATCC-Nummer HTB-37) wurde 1974 aus einem primären Colon-Adenokarzinom eines 72-jährigen Mannes isoliert⁷⁹. In vitro zeigen die Zellen bei Konfluenz sowohl strukturell (Microvilli-Bürstensaum, Tight-junctions) als auch funktionell (Ionen-Transport) Charakteristika enterozytischer Differenzierung, In vivo dagegen formen sie nach Inokulation in Nacktmäuse mittelgradig differenzierte Adenokarzinome. Die häufigste Chromosomenzahl (bei 16 %) beträgt 96, Polyploidie tritt bei 3,2% der Zellen auf.⁸⁰

3.1.1.3 T84

Die Zelllinie T84 (ATCC-Nummer CCL-248) wurde 1984 aus einer Lungenmetastase eines Colonkarzinomes von einem 72-jährigen Mannes isoliert und über 23 Passagen in BALB/c Nacktmäusen etabliert. Die Zellen wachsen bei Konfluenz zu einem Monolayer, bilden zwischen benachbarten Zellen Tight-junctions und Desmosomen aus und tragen auf der apikalen Membran Mikrovilli. Der Monolayer zeigt gerichteten Elektrolyttransport, der mittels verschiedener

Sekretagoga verändert werden kann. T84-Zellen sind tumorigen in Nacktmäusen. Die häufigste Chromosomenzahl (bei 28 %) beträgt 56, Polyploidie tritt bei 12,4 % der Zellen auf^{81, 82}.

3.1.1.4 LS 174T

Die Zelllinie LS 174T (ATCC-Nummer CL-188) stellt die trypsinierte Variante der Zelllinie LS 180 dar, die ursprünglich aus dem Colon-Adenokarzinom einer 58jährigen Frau isoliert wurde. Die Zellen bilden Microvilli aus und zeigen intrazelluläre Mucin-Vakuolen. Außer einem fehlenden X-Chromosom gibt es keine Chromosomenaberrationen (Karyotyp 45,X). LS 174T-Zellen sind tumorigen bei subkutaner Inokulation in Nacktmäuse^{83, 84}

3.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator (Function-Line, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in handelsüblichen Zellkulturflaschen (Nunc, Langselbold; Biochrom, Berlin) kultiviert. Als Kulturmedien erhielten die HT-29/B6-Zellen RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), Caco-2- und LS 174T-Zellen DMEM mit Glutamax-I (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und die T84-Zellen eine fertige 1:1-Mischung von DMEM und F12-Medium (Cambrex BioScienc, East Rutherford, NJ, USA). Den Kulturmedien wurden jeweils 10% (5% bei T84-Zellen) fetales Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin), welches zuvor 45 Min. bei 56°C hitzeinaktiviert wurde, sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beides Biochrom, Berlin), zugesetzt.

Das Kulturmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Die Subkultivierung erfolgte bei Konfluenz der Zellen ca. alle 7 Tage, bei den LS174T-Zellen alle vier Tage. Nach dem Entfernen des Kulturmediums und zweimaligem Waschen mit je 5 ml Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS (Phosphate buffered saline, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%, Biochrom, Berlin) inkubiert und anschließend durch Klopfen und wiederholtes Pipettieren mit 10 ml Kulturmedium vereinzelt. Durch die Calcium- und Magnesiumionen im Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert, dann 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und mit Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus dem entsprechenden Kulturmedium versetzt mit 7,5% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Taufkirchen). Die Zellsuspension wurde in 1,2 ml Rundbodenröhrchen (Nunc, Langselbold) überführt und in einer Nalgene-Einfrierbox bei einer Abkühlungsrate von 1° C pro Minute bei -

80° C eingefroren. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Einfrierröhrchen mit den Zellen frühestens nach 24 h bei -80°C in flüssigen Stickstoff (-196° C) überführt.

3.1.4 Gewebekultur kolorektaler Mukosa und Tumoren

Humanes Darmgewebes wurde gewonnen in Zusammenarbeit mit der chirurgischen Klinik I (Prof. Dr. med. H.-J. Buhr und PD Dr. med. habil A.J. Kroesen) und dem Institut für Pathologie (Prof. Dr. med. H. Stein und Dr. med. C. Loddenkemper). Beide Abteilungen sind Einrichtungen der Charité am Campus Benjamin Franklin. Die kolorektale Mukosa stammte von 7 Patienten (5 Männer, 2 Frauen) im Alter von 26 bis 74 Jahren. Die Adenokarzinome zeigten unterschiedliche Differenzierungsgrade (2 x G1, 3 x G2, 1 x G3). Patienten, die vorher eine Chemotherapie oder Bestrahlung erhalten hatten, wurden nicht eingeschlossen. Proben, bei denen die spontane Apoptoserate bereits über 50 % lag, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Zustimmung der Ethikkommission lag vor.

Die resezierten Anteile des Dickdarms von Patienten, die wegen eines kolorektalen Karzinoms operiert werden mussten, wurden direkt nach der Entnahme in das Institut für Pathologie gebracht. Dort wurden von den diensthabenden Pathologen und Pathologinnen solche Stücke von vitalem Tumorgewebe sowie unbefallener Mukosa entnommen, die für die histologische Beurteilung von Differenzierungsgrad, Infiltrationstiefe und Tumorfreiheit der Resektionsränder nicht benötigt wurden. Das Gewebe wurde in kaltem PBS transportiert. Mukosa wurde gewonnen, indem vorsichtig die Tunica muscularis inklusive Submucosa abgetrennt wurde. Es wurden Stücke mit einer Kantenlänge von 2-5 mm zugeschnitten und auf Drahtnetze in 6-Loch-Zellkulturplatten (Biochrom, Berlin) mit jeweils ca. 4 ml Kulturmedium gegeben. Die Menge des Mediums wurde dabei so angepasst, dass die Präparate durch kontinuierliches Schwenken regelmäßig von Medium überspült wurden. Die Drahtnetze (Typ V₂A von der Firma Kaldenbach, Berlin) aus rostfreiem Stahl hatten eine Drahtstärke von 0,3 mm und einen Lochdurchmesser von ca. 1 mm, die Ecken waren ca. 2 mm nach unten gebogen, so dass auch unter den Gewebestücken eine Zirkulation des Kulturmediums gewährleistet war (Abbildung 4). Es wurde RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Da bei Resektaten von Darmgewebe von einer Kontamination mit Darmkeimen ausgegangen werden muss, enthielt das Kulturmedium zusätzlich 50 µg/ml Gentamicin, 2,5 µg/ml Amphotericin B und 25 mM HEPES-Puffer (Gibco/Invitrogen, Taufkirchen). Die Methode der Kurzzeitinkubation von Darmgewebe wurde ursprünglich für die Inkubation von Darmbiopsien entwickelt. Dabei wurde die Immunglobulin-Produktion duodenaler Mukosa HIV-infizierter

Patienten untersucht⁸⁵. Die 6-Loch-Platten wurden in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus BBD 6220) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% O₂ 24 Stunden inkubiert (Abbildung 4).

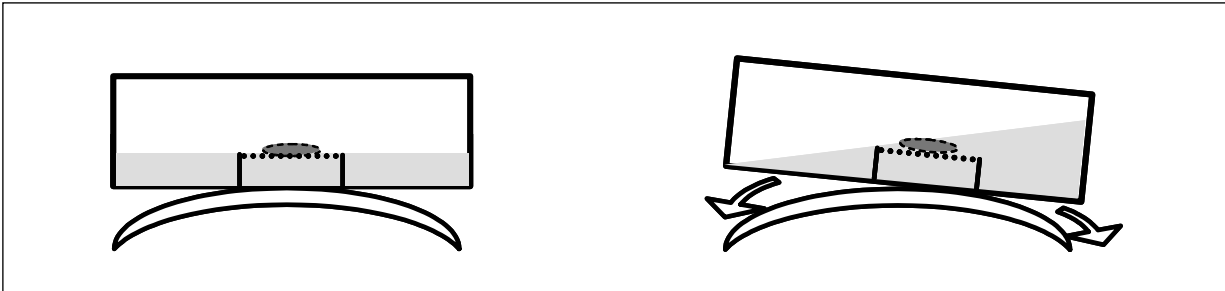


Abbildung 4: Gewebekultur. In den 6-Loch-Zellkulturplatten wurden die Gewebestücke (dunkelgrau) auf dem Schüttler im Begasungsbrutschrank über 24 Stunden kontinuierlich durch Kulturmedium (hellgrau) benetzt.

Nach 24 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Substanzen wurden die Gewebestücke entnommen, und je eine Probe in Econo 20 ml Glas-Gefäßen (PerkinElmer, USA) in ca. 3 ml 10% Formalin (neutral gepuffert, Sigma, Taufkirchen) fixiert und für HE- und TUNEL-Färbung (siehe S. 33) in Paraffin eingebettet. Das übrige inkubierte Gewebe wurde gewogen und in einer Konzentration von 30 mg / 200 µl in 3fach-konzentriertem SDS-Lämmli-Puffer (siehe S. 39) in 1,8 ml Eppendorf-Probenröhrchen auf Eis gegeben. Daraufhin wurden die Proben zweimal je 10 Sekunden durch Ultraschallbehandlung zerkleinert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

3.1.4.1 Ansatz der Proteaseinhibitoren Saquinavir und Nelfinavir und Inkubationsschema

Die Saquinavir-Reinsubstanz (Saquinavir-Mesylat) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, die Nelfinavir-Reinsubstanz (Nelfinavir-Mesylat) von Agouron Pharmaceuticals (San Diego, USA).

3.1.4.2 Auswahl der Proteaseinhibitor-Konzentrationen

Über die in vivo-Gewebekonzentrationen von PIs ist wenig bekannt, aber es ist wahrscheinlich, dass sie in der intestinalen Mukosa deutlich höher sind als im Blutplasma, da sich nach oraler Aufnahme über das Epithel ein Konzentrationsgradient zum Blutkompartiment bilden muss. Die in den Experimenten benutzten Konzentrationen waren niedriger als die in vivo-Konzentrationen im Darmlumen, die bei Annahme eines Darminhalts von einem Liter bei der Einnahme der einfachen Dosis zu einer auf das Epithel wirkenden Konzentration von 600 µg / ml Saquinavir (782 µM) und 750 µg / ml Nelfinavir (1129 µM) führen würden.

3.1.4.3 Saquinavir

Die maximale Plasmakonzentration von Saquinavir liegt je nach Einnahmeschema zwischen 197 ng/ml (3 x 600 mg / Tag) und 2623 ng/ml (2 x 1000 mg / Tag bei Kombination mit 2 x 100 mg /

Tag Ritonavir)³⁴. Bei einem Molekulargewicht von 766,955 g/l liegt die Plasmakonzentration demnach im Bereich zwischen 0,25 μM und 3,4 μM , Als einfache Plasmakonzentration wurde 3 μM festgesetzt, im Bereich des Darmepithels ist die Saquinavir-Konzentration aber, wie oben dargestellt, bis zu 260fach höher. Zum Einsatz in der Zellkultur kamen daher die Konzentrationen 3, 15, 30, 60, 90, 120 und 300 μM , in der Gewebekultur 60 μM . Für den Ansatz der 1500 μM Stammlösung wurden 57,52 mg Saquinavir abgewogen, in 500 μl unvergälltem 70%igem Ethanol vorgelöst und zu 49,5 ml des jeweiligen Kulturmediums gegeben.

3.1.4.4 Nelfinavir

Die maximale Plasmakonzentration von Nelfinavir liegt je nach Einnahmeschema (2 x 1250 mg/Tag bzw. 3 x 750 mg/Tag) zwischen 3,2 $\mu\text{g/ml}$ und 4,8 $\mu\text{g/ml}$ ³⁵. Bei einem Molekulargewicht von 663,90 g/l bewegt sie sich demnach im Bereich zwischen 4,8 μM und 7,2 μM . Als einfache Plasmakonzentration wurde 7 μM festgesetzt, im Bereich des Darmepithels ist sie aber, wie oben dargestellt, bis zu 160fach höher. Zum Einsatz in der Zellkultur kamen daher die Konzentrationen 7, 35, 70, 140, 280, 560 und 700 μM , in der Gewebekultur 70 μM . Für den Ansatz der 700 μM Stammlösung wurden 23,24 mg Nelfinavir abgewogen, in 250 μl sterilem DMSO vorgelöst und auf 49,75 ml des jeweiligen Kulturmediums gegeben.

3.1.5 Kontrollführung

Bei allen Experimenten wurde eine Kontrolle mit Kulturmedium und dem entsprechenden Proteaseinhibitor-Lösungsmittel (Ethanol oder DMSO bzw. beide, wenn es durch die Kombination zweier Substanzen erforderlich war) in seiner höchsten im Experiment vorkommenden Konzentration mitgeführt. Dies waren 0,14 % Ethanol bzw. 0,5 % DMSO. Bei allen Experimenten zur Apoptoseinduktion in HT-29/B6-Zellen durch die Einzelsubstanzen wurde außerdem eine Kontrolle mit normalem Kulturmedium ohne Lösungsmittel inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Apoptoseinduktor Camptothecin verwendet.

Camptothecin ist ein etablierter Apoptoseinduktor⁸⁶. Es bindet an die Topoisomerase-1, die den DNA-Doppelstrang für die Replikation entwindet, wofür sie ihn durchtrennt⁸⁷. Dieser Strangbruch ist zunächst reversibel, sobald aber die Replikationsgabel auf den durch Camptothecin stabilisierten Topoisomerase-1-DNA-Komplex trifft, kommt es zu irreversiblen Doppelstrangbrüchen und über die Aktivierung von Caspasen zum apoptotischen Zelltod. Verschiedene Derivate des Camptothecins werden zur antineoplastischen Therapie eingesetzt⁸⁸. Das Derivat Irinotecan erhielt 1998 die volle Zulassung der U.S. Food and Drug Administration

zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms, da in Phase-3-Studien eine Überlegenheit gegenüber anderen Therapieschemata gezeigt werden konnte⁸⁹.

Für HT-29/B6-Zellen ergab sich bei Einsatz von 20 µg/ml Camptothecin für 48 h eine Erhöhung der Apoptoserate von 3,5 +/- 0,3 % bei Kontrollen auf 14,3 +/- 1,5 %⁴³. Aufgrund dieser Daten wurden alle Zelllinien zur Positivkontrolle über 48 h mit 20 µg/ml Camptothecin inkubiert.

16 mg Camptothecin wurden in 1 ml DMSO gelöst und davon 50 µl auf 40 ml Kulturmedium gegeben. Die eingesetzte Konzentration betrug 20 µg/ml (57,41 µM), bzw. 6µg/ml (20µM) in den Kombinationsversuchen.

3.1.6 Kombination der Proteaseinhibitoren mit Camptothecin

Für die Versuche zur Kombination von Camptothecin mit den Proteaseinhibitoren wurden HT-29/B6- und LS174T-Zellen verwendet. Es wurden solche Konzentrationen von Camptothecin gewählt, die nach 24 h nur zu einer geringen Apoptoseinduktion führten. Bei den LS174T-Zellen wurde 0,57 µM (bzw. 0,2 µg/ml) eingesetzt, bei den HT-29/B6-Zellen 20 µM Camptothecin, welche jeweils mit 30 µM Saquinavir und 35 µM Nelfinavir kombiniert wurden. Dies entspricht einem Hundertstel (LS174T) bzw. einem Drittel (HT-29/B6) der Konzentration von Camptothecin, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde.

3.1.7 Zellaussaat und Inkubation

Die Zellen wurden trypsiniert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml (LS174T und Caco2), 150.000 Zellen/ml (HT29/B6) und 200.000 Zellen/ml (T84) in je 1 ml Kulturmedium pro Loch in 12-Loch-Platten eingesetzt. Durch diese geringen Zellzahlen sollte sichergestellt werden, dass sich die Zellen größtenteils in Proliferation befinden. Bei Konfluenz proliferieren die Zellen nicht mehr.

3.1.7.1 Inkubationsschema der Versuche zur Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion

Alle Zelllinien wurden zunächst 24 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt und durch 1 ml des jeweiligen Kulturmediums mit der entsprechenden Konzentration an Proteaseinhibitor bzw. dessen Lösungsmittel für die Kontrolle ersetzt.

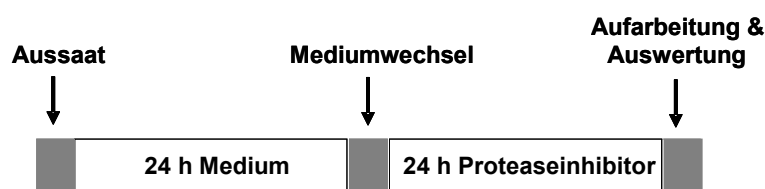


Abbildung 5: Inkubationsschema der Versuche zur Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion

3.1.7.2 Inkubationsschema der Versuche zur Zeitkinetik der Apoptoseinduktion

Für die Zeitkinetik-Versuche wurde das Inkubationsschema geringfügig geändert.

Beim Mediumwechsel wurden 2 ml Kulturmedium mit Proteaseinhibitor zugegeben, um die Versorgung der über 48 Stunden inkubierten Zellen zu gewährleisten. Als Kontrolle wurde nur die entsprechende Lösungsmittel-haltige Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten wie in Abbildung 6 beschrieben aufgearbeitet und in Ethanol bei -20°C aufbewahrt, bis sie am Ende des Experimentes durchflusszytometrisch analysiert wurden.

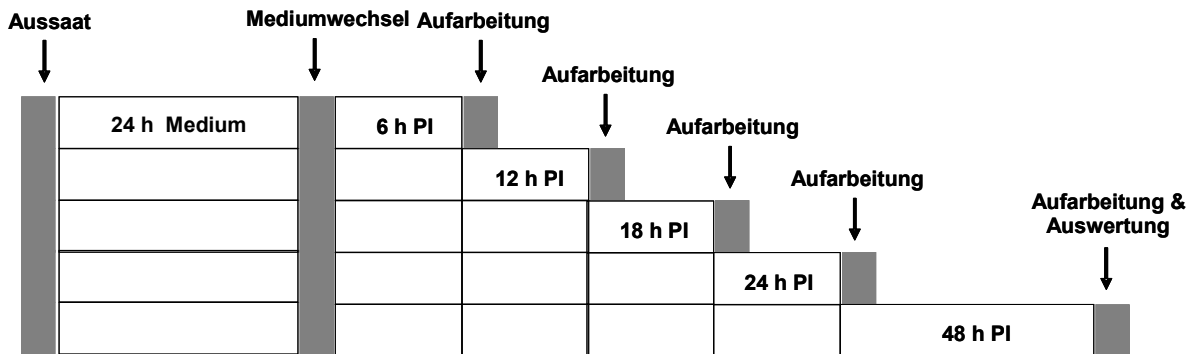


Abbildung 6: Inkubationsschema zur Zeitkinetik der Apoptoseinduktion (PI=Proteaseinhibitor)

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die häufig gebrauchte Abkürzung „FACS“ steht dabei für „Fluorescence activated cell sorting“ und ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson.

Ein Durchflußzytometer erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie verschiedener Fluoreszenzfarben für mehrere tausend Einzelzellen. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Meßkammer werden die Zellen durch die

isotone Pufferlösung, welche die Zellen umgibt, stark beschleunigt. Es kommt zur Auftrennung von kleineren Zellaggregaten und zur Hintereinanderreihung der Zellen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt trifft der fokussierte Lichtstrahl (Laser) auf die durchströmende Zelle, und die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mittels Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Fotoverstärker geleitet und quantifiziert.

Tritt ein Partikel in einen Lichtstrahl ein, streut er das einfallende Licht, wobei nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des Lichtstrahls verändert wird. Die Lichtstreuung wird durch die Zelleigenschaften wie Zellgröße, Zellmembranstruktur und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Der größte Anteil des Lichts wird in Richtung des einfallenden Lichtstrahls gestreut. Es wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter – FSC) bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Rechtwinklig von der Zelle gestreutes Licht wird im „Side Scatter“ (SSC) bestimmt, die Werte sind ein Maß für die Zellkomplexität, welche von der Zellstruktur (u.a. Zellmembranfältelung, Vakuolen, Granula) bestimmt wird⁹⁰.

Darüber hinaus ist es möglich, intrazelluläre oder auf der Membran gelegene Zellbestandteile mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und zu detektieren. Geeignete Fluoreszenzfarbstoffe müssen eine Absorption im Wellenlängenbereich des im Gerät vorhandenen Laser (488 nm) aufweisen, wie das in dieser Arbeit verwendete Propidiumjodid mit einem Emissionsmaximum bei ca. 620 nm (Rot-/Orangefluoreszenz). Propidiumjodid interkaliert irreversibel in doppelsträngige DNA und korreliert daher bei permeabilisierten Zellen mit dem DNA-Gehalt jeder einzelnen untersuchten Zelle.

3.2.1 Durchflusszytometrische DNA-Analyse im Doublet-Discrimination-Mode (DDM)

3.2.1.1 Zellzyklus

Eine Zelle in der Ruhephase (G_0) und in der präsynthetischen Phase (G_1) besitzt einen diploiden Chromosomensatz ($2c$). In der Synthesephase (S) wird die DNA-Menge durch Replikation vermehrt. Die S-Phase endet mit dem Erreichen der prämitotischen Phase (G_2), in dem die Zelle einen reduplizierten Chromosomenbestand ($4c$), also verdoppelten DNA-Gehalt aufweist. In der nachfolgenden, kurzdauernden Mitosephase (M) kommt es zur gleichmäßigen Aufteilung der reduplizierten Chromosomen auf zwei Tochterzellen, die somit einen diploiden Chromosomensatz erhalten und sich in der G_0/G_1 -Phase befinden, so dass der Zellzyklus von vorne beginnen kann.

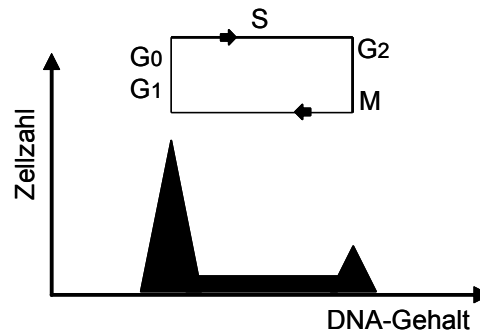


Abbildung 7: Verteilung einer Zellpopulation gemäß ihres DNA-Gehaltes in Bezug auf den Zellzyklus

Durch die Analyse des DNA-Gehaltes einer Vielzahl von Zellen kann eine prozentuale Zuordnung getroffen werden, wie viele Zellen der Population sich in einem bestimmten Zellzyklusabschnitt (G₀/G₁-, S-, G₂/M-Phase) befinden. Ebenso wird eine DNA-Menge erkannt, die kleiner ist als die in der G₀/G₁-Phase vorliegende. Da drei der vier getesteten Zelllinien aneuploid sind, sind die Grenzen zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen weniger deutlich. Einige ruhende Zellen werden wahrscheinlich nur aufgrund des erhöhten DNA-Gehaltes fälschlicherweise der S-G₂/M-Phase zugeordnet. Da es sich jedoch um eine systematische Fehlerquelle handelt, ist die Messung von Veränderungen innerhalb einer Zelllinie nicht betroffen.

3.2.1.2 Apoptose

Bei der Apoptose kommt es zu einer Fragmentierung der DNA in oligonucleosomale, 180-200 Basenpaare oder ein Vielfaches davon enthaltende Fragmente. Durch die Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol und Triton-X100 verlässt ein Teil der niedrigmolekularen DNA-Fragmente die apoptotische Zelle, so dass sich der DNA-Gehalt verringert und sich als hypodiploider „sub-G₁“-Peak im DNA-Histogramm darstellt. Dieses Verfahren wurde ursprünglich von Nicoletti et al. bei Dexamethason-induzierter Apoptose in Thymozyten angewandt⁹¹.

3.2.1.3 Doublet-Discrimination-Mode

Bei der normalen Detektion von Lichtsignalen zeigt eine Zelle mit dem doppelten DNA-Gehalt dieselbe maximale Fluoreszenzintensität wie zwei zusammenhängende Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Deshalb muss sichergestellt werden, dass nur einzeln separierte Zellen in die Auswertung einbezogen werden. Dazu kann der sogenannte „Doublet-Discrimination-Mode“ eingesetzt werden (Abbildung 8). In diesem Detektionsmodus wird nicht nur die maximale Fluoreszenzintensität (FL-Height, FL-H) ermittelt, sondern die über die gesamte Zeit, die der Partikel zur Durchquerung des Lasers benötigt, emittierte Fluoreszenz als Fluoreszenz-Fläche

(Area, FL-A). Als weiterer Messwert wird die Partikelgröße (Fluoreszenz-Width, FL-W) bestimmt, die sich wiederum aus der Zeit ergibt, die ein Partikel zur Durchquerung des Laserstrahls braucht⁹².

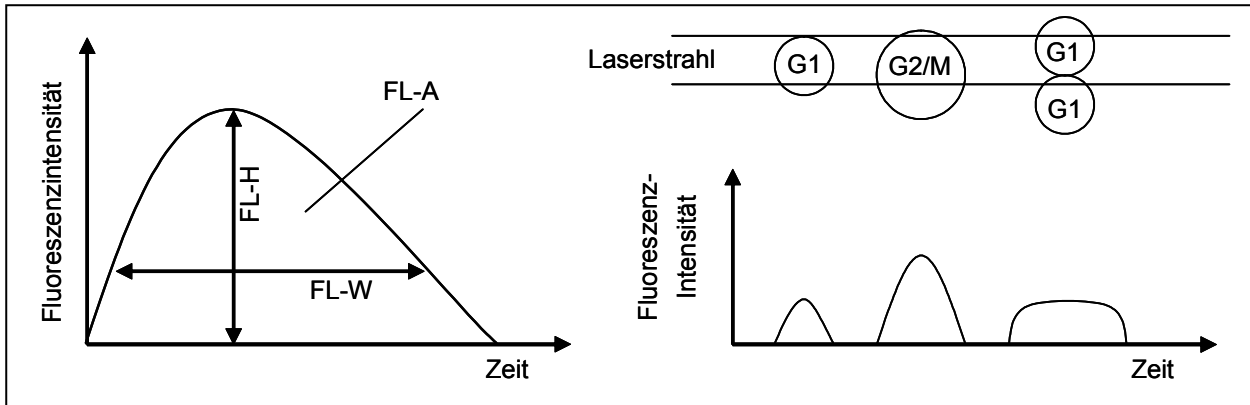


Abbildung 8: Schematische Darstellung der DNA-Analyse im DDM:

Zwei zusammenhängende Zellen in der G1-Phase haben dieselbe maximale Fluoreszenzintensität (FL-Height = FL-H) wie eine einzelne Zelle in der G1-Phase. Sie benötigen aber mehr Zeit zur Durchquerung des Laserstrahls, so dass die Fluoreszenz-Weite (FL-Width, FL-W), größer ist. Folglich vergrößert sich auch die Fläche unter der Kurve, die Fluoreszenz-Area (FL-A). Eine Zelle in G2/M-Phase hat dagegen eine höhere maximale Fluoreszenzintensität.

Trägt man die FL-A-Werte einer Zelle gegen die FL-W-Werte in ein Koordinatensystem (Dot Plot) ein, so lassen sich die einzelnen, separierten Zellen leicht erkennen und von zusammenhängenden Zellen unterscheiden.

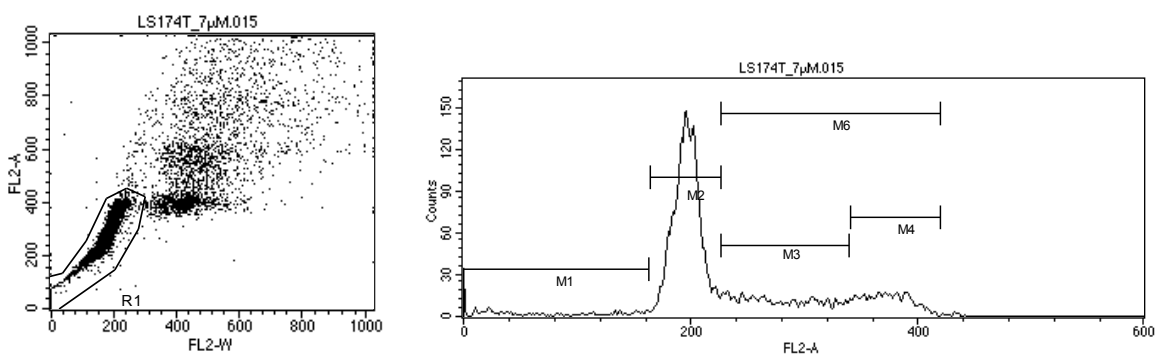


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse von LS174T-Zellen im DDM.:

Trägt man FL-A gegen FL-W im Koordinatensystem (links) auf, sieht man die Population von Einzelzellen (eingekreist), und die Zellaggregate. Im Histogramm (rechts) ist die Zellzahl gegen FL-A aufgetragen und die verschiedenen Gipfel lassen sich den einzelnen Zellzyklusphasen zuordnen (M1: sub-G1-Bereich = Apoptose, M2: G0/G1-Phase, M2: S-Phase, M4: G2/M-Phase, M6: S- + G2/M-Phase).

3.2.1.4 Propidiumjodid-Färbung zur DNA-Analyse fixierter Zellen

Nach der Inkubation mit den Proteaseinhibitoren (siehe S. 28) wurde das Kulturmedium abgenommen, zweimal mit je 1ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gespült und mit 200 μl Trypsin/EDTA-Lösung fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Trypsin wurde inaktiviert durch Zugabe von 1 ml Kulturmedium, in dem Calcium- und Magnesiumionen enthalten sind. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen noch weiter vereinzelt. Um auch abgelöste Zellen in die anschließende Messung mit einzubeziehen, wurden alle Überstände und Spülflüssigkeiten in 15-ml-Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

Die Röhrchen wurden bei 380 g 5 Minuten zentrifugiert (Minifuge T, Heraeus, Hanau), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 500 μl PBS resuspendiert und in 1,5 ml Safe Lock Eppendorf Röhrchen (Eppendorf, Hamburg) überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (2200 rpm in Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg) wurden die Zellen zur Permeabilisierung in 500 μl Ethanol (70 % in PBS) resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Nach 45 Min. bei -20°C wurde das 70%ige Ethanol durch Zentrifugation entfernt. Zunächst wurde das Zellpellet in 200 μl PBS resuspendiert und dann 200 μl der Propidiumjodid-Lösung zugegeben. Die Propidiumjodid-Lösung bestand aus 0,1%igem Triton-X 100 (Sigma, Taufkirchen) gelöst in PBS mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumjodid. Die RNase A wurde zur DNase-Inaktivierung vorher 5 Min. bei 95°C gekocht. Die Zugabe von RNase A (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein) dient dem enzymatischen Abbau von in der Zelle vorliegender Doppelstrang-RNA, welche ebenfalls durch Propidiumjodid gefärbt wird und demnach die Messergebnisse beeinflusst hätte.

Nach 30 Min. Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur erfolgte die durchflusszytometrische Messung von jeweils mindestens 10.000 Zellen und deren Analyse mittels Cellquest Software.

3.3 Histologischer Nachweis von Apoptose mittels TUNEL-Assay

Zum Nachweis von Apoptose in fixierten Zellen und an Paraffinschnitten von Gewebeproben wurde das TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit der Firma Oncogene/Calbiochem (Merck, Darmstadt) verwendet.

Dieses Nachweisverfahren ist unter dem Namen „TUNEL“ bekannt, was für „terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP (deoxyuridine triphosphate) nick end labeling“ steht. Dabei bindet das TdT-Enzym an die freien 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente,

die bei der Apoptose entstehen, und hängt hier Nucleotide an, welche teilweise mit Biotin verbunden sind. Die biotinylierten Nucleotide werden danach mit einem Konjugat aus Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen. Streptavidin ist ein Protein, das mit hoher Affinität an Biotin bindet. Die Meerrettich-Peroxidase oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid den Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), der unter Oxidation einen bräunlichen Farbniederschlag bildet.

3.3.1 TUNEL-Färbung von Zellen in Chamber-Slides

Die Zellen wurden trypsiniert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Dichte von 20.000 Zellen/ml (LS174T und Caco2), 50.000 Zellen/ml (HT29/B6) und 100.000 Zellen/ml (T84) in je 400 µl Kulturmedium pro Loch in 8-Loch-Glas-Chamber-Slides eingesetzt. Es handelt sich dabei um Glas-Objektträger, die einen Aufsatz aus ablösbaren Kunststoff-Kammerchen mit Deckel haben (Lab-Tek® II Chamber Slide™, Nunc, Langselbold). Nach 24 Stunden Inkubation wurde das normale Kulturmedium entfernt und durch je 400 µl des jeweiligen Kulturmedium mit der entsprechenden Konzentration an Proteaseinhibitor bzw. dessen Lösungsmittel für die Kontrolle ersetzt.

Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen durch 10minütige Inkubation mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Zellen 15 Minuten in TBS rehydriert und wie für das TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit beschrieben weiterverarbeitet.

3.3.2 TUNEL-Färbung von Gewebeproben

Stücke kolorektaler Mukosa und Tumoren wurden wie beschrieben 24 Stunden mit Proteaseinhibitoren inkubiert, mit 10% Formalin (neutral gepuffert) fixiert und für HE- und TUNEL-Färbungen in Paraffin eingebettet. Es wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf handelsübliche Glasobjektträger aufgebracht. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 5 Min. Xylen, 2 x 5 Min. 100 % Ethanol, 3 Min. 90 % Ethanol, 3 Min. 80 % Ethanol, 3 Min. 70 % Ethanol, alle Merck, Darmstadt) deparaffinisiert und durch kurzes Eintauchen in TBS (Tris Buffered Saline: 20 mM Tris pH 7,6, 140 mM NaCl, beides Sigma, Taufkirchen) rehydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift umrandet und wie für das TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit beschrieben weiterverarbeitet.

3.3.3 TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit

Die angegebenen Substanzen stammten, sofern nicht anders angegeben, aus dem oben beschriebenen Kit der Fa. Roche und wurden entsprechend der Anweisung des Herstellers verwendet. Die Permeabilisierung der Proben (Gewebe und Zellen) erfolgte durch Inkubation mit Proteinase K (2 mg/ml in 10mM Tris pH8), gefolgt von dreimaligem Waschen in TBS. Durch 5minütige Inkubation mit 3% H₂O₂ in Methanol (beides Merck, Darmstadt) wurden die endogenen Peroxidasen inaktiviert. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Equilibrierung durch 20minütige Inkubation mit „TdT-Equilibration-Buffer“, welcher anschließend durch das TdT-Enzym in Kombination mit biotinylierten und nicht-markierten Nucleotiden („TdT-Labeling-Reaction-Mixture“) ersetzt wurde. Die Inkubation mit der TdT-Labeling-Reaction-Mixture wurde bei 37°C in einer feuchten Kammer durchgeführt und dauerte 1,5 Stunden. Die Markierungs-Reaktion wurde mit „Stop Buffer“ (0,5 M EDTA in PBS) beendet und die Proben wieder mit TBS gewaschen. Das Konjugat aus Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase wurde in „Blocking Buffer“ (4% bovines Serum Albumin in PBS) verdünnt und 30 Minuten mit den Proben inkubiert. 3,3'Diaminobenzidin (0,7 mg) und H₂O₂/Harnstoff (0,6 mg) wurden in 1 ml Leitungswasser gelöst und nach einem erneuten Waschgang mit TBS auf die Proben gegeben und 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und für 3 Minuten mit Methylgrün gegengefärbt. Bei der Zellkultur wurden jetzt die Kammern der Chamber-Slides entfernt. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90%, 100 % Ethanol, Xylol, s.o.) wurden die Proben dehydriert und anschließend mit Corbit-Balsam (I. Hecht, Kiel-Hassee) eingebettet und am Nikon Eclipse E800 lichtmikroskopisch untersucht. Bilder wurden mit der Kamera Donpisha 3CCD erstellt.

3.4 Western Blot-Analyse von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) und PARP-Spaltprodukt

In der Zellkultur sollten Dosisabhängigkeit und Zeitverlauf der Apoptoseinduktion überprüft werden. Ergebnisse aus der Zellkultur sind nicht immer auf die Vorgänge im menschlichen Organismus übertragbar. Um sich der Situation beim Menschen anzunähern, sollte die Apoptoseinduktion zunächst ex-vivo an humanem Gewebe getestet werden. Dazu wurde Gewebe aus operativ entfernten Adenokarzinomen des Kolorektums (n=6) sowie kolorektale Mukosa (n=7) verwendet. Das Gewebe wurde 24 Stunden mit 60 µM Saquinavir, 70 µM Nelfinavir und mit Camptothecin 20µg/ml als Positivkontrolle inkubiert. Zur Kontrolle wurde Gewebe in Kulturmedium mit Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate

durch Nachweis von PARP-Spaltung im Western Blot quantifiziert. Der Anteil von PARP-Spaltprodukt an der Gesamt-PARP-Menge spiegelt den Anteil apoptotischer Zellen in den Gewebestückchen wider.

Da die Ischämiedauer des Gewebes vor Inkubation mit den Proteaseinhibitoren variierte, handelt sich also in Bezug auf die Apoptosedetektion um ein grobes System. Daher wurde die Anforderung gestellt, dass die Positivkontrollen (Inkubation mit Camptothecin) einen messbaren Effekt zeigten und in den Kontrollen keine hohe Spontanapoptoserate auftrat. Es wurden daher nur solche Gewebeproben in die Auswertung einbezogen, bei denen die Spontanapoptoserate unter 50 % lag und bei denen nach Inkubation mit Camptothecin als Positivkontrolle die PARP-Spaltung zugenommen hatte.

Die Spaltung von intaktem PARP (116 kDa) in das 85kDa-Spaltprodukt gilt als spezifischer Apoptosemarker⁹³. Über den Anteil gespaltener PARP an der Gesamt-PARP-Menge kann man auf die im Gewebe abgelaufene Apoptose schließen. Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen, die in einer Gelmatrix vorliegen, auf eine Membranoberfläche. Auf der Membran können die Proteine anschließend durch Markierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Proteine unterscheiden sich in ihren Wanderungseigenschaften innerhalb eines elektrischen Feldes je nach ihrer Form, Größe und elektrischer Gesamtladung. Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen wird bei dieser Methode eine Negativladung aller Proteine erreicht. Innerhalb eines elektrischen Feldes wandern sie dementsprechend alle zum positiven Pol. Die Proteine werden denaturiert und verlieren ihre ursprüngliche Form, so dass sie im elektrischen Feld mit einer dem Logarithmus ihres Molekulargewichts proportionalen Geschwindigkeit. Verwendet wird ein Gel, das durch Quervernetzung eines Acrylamidpolymers mit Bisacrylamid entsteht. Der Grad der Quervernetzung lässt sich durch Variation des Verhältnisses der Komponenten verändern. Je höher das Molekulargewicht des gesuchten Proteins, desto niedriger muss die Polyacrylamidkonzentration im Gel gewählt werden. Die SDS-PAGE wurde mit dem Mini Trans-Blot®Cell-System von Bio-Rad (München) durchgeführt.

Zur Herstellung der Gele wurden die aus je zwei Glasplatten vorgefertigten Gelkammern zu drei Viertel mit dem flüssigen Trenngelgemisch gefüllt. Um zu gewährleisten, dass bei der Polymerisation eine glatte Oberfläche entsteht, wurde das Gemisch vorsichtig mit Aqua bidest.

überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Gels (ca. 30 Minuten) wurde das Wasser entfernt, das Trenngel mit der frisch angesetzten Sammelgellösung überschichtet und ein Kamm eingesetzt. Nach Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, so dass 10 Probestaschen zur Beladung mit Antigen zur Verfügung standen.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die Gelkammern in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Laufkammer eingehängt, und 20 - 50 µl der mit Probenpuffer versetzten und durch 5minütiges Erhitzen auf 95°C denaturierten Proben in die Probestaschen gefüllt. Zusätzlich wurde in mindestens eine Tasche 10-15 µl eines farbig markierten standardisierten Proteingrößenmarkers (Bio-Rad, München) geladen. Bei einer Spannung von 150 V erreichte beim 9 %igen Gel die Lauffront den unteren Rand des Gels nach etwa 70 Minuten.

3.4.2 Elektrotransfer in Semi-Dry Technik

Im Polyacrylamidgel liegt das elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemisch vor. Das Gel wird einem senkrecht zur Gel-Ebene wirkenden Spannungsfeld ausgesetzt und die Proteine dadurch von dem Gel auf eine Trägermembran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF-Membran) transferiert. Auf Grund hydrophober Bindungen adsorbieren die Proteine an der Matrix der Membran.

Als PVDF-Membran wurde die Immobilon-P-Membran (Millipore, Eschborn) verwendet. Jede Immobilon-P-Membran wurde vor dem Transfer 30 Sekunden in Methanol (Baker, Deventer, Holland), und dann, ebenso wie die benötigten Filterpapiere, für wenige Minuten im methanolhaltigen Transferpuffer eingeweicht. Auf die Anode der Biometra Fast-Blot-Kammer wurden drei Filterpapiere und die Immobilon-P-Membran aufeinandergelegt und dann das Polyacrylamidgel blasenfrei auf die Membran aufgebracht. Über drei darauf gelegte Filterpapiere wurde der Kontakt mit der Kathode im Deckel hergestellt. Der Transfer erfolgte dann bei 200 mA über 45 Minuten.

3.4.3 Immundetektion mit Anti-PARP-Antikörper und Visualisierung

Der Proteintransfer wurde zunächst mit reversibler Ponceaurotfärbung überprüft. Das Ponceaurot wurde mit PBS / 0,01 % Tween® 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaureate, Merck, Darmstadt, im folgenden PBS-T) ausgewaschen. Um freie Bindungsstellen zu besetzen, wurde die Immobilon-P-Membran für eine Stunde in Blockierungspuffer, bestehend aus PBS-T + 0,5 % Trockenmagermilchpulver (Sucofin®, TSI GmbH & Co. KG, Zeven) abgesättigt. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS-T entfernt. Die abgesättigte Membran wurde dann mit dem Maus-Anti-PARP-Antikörper C2-10, (PharMingen, Becton Dickinson,

Heidelberg), der 1:3000 in PBS-T verdünnt worden war, über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit PBS-T wurde zur Detektion des ersten Antikörpers ein Anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg) hinzugegeben (1:3000 in PBS-T verdünnt) und die Membran damit eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP) konjugiert, welche die nachfolgende Chemolumineszenz-Reaktion katalysierte. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit PBS-T entfernt, daraufhin wurde die Membran 3 Minuten mit 1,5 ml Chemolumineszenz-Lösung gespült. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz, also optische Strahlung, entsteht. Verwendet wurde hier das „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Pierce, Rockford, USA). Der Nachweis erfolgte durch einen photographischen Film (Kodak® T-MAT PLUS DG, Kodak, Rochester, USA), welcher durchschnittlich 30 Sekunden exponiert werden musste. Danach ist es möglich, die gebundenen Antikörper durch Inkubation mit Strip-Puffer zu entfernen und eine neue Immundetektion vorzunehmen.

3.4.4 Densitometrische Analyse

Mit einem Farbscanner (Jade 2, Linotype-Hell, Eschborn) wurde der entwickelte Film mit einer Auflösung von 600dpi eingescannt und im Tagged Image File Format (TIFF) abgespeichert. In dem Programm Scion Image 1.62a wurden mithilfe eines Macros (Gel Plotting Macro) die Dichtewerte der einzelnen Proteinbanden in Graphen umgerechnet und über ihr Integral miteinander in Beziehung gesetzt. Berechnet wurde dann der prozentuale Anteil von PARP-Spaltprodukt (85 kD) an der Gesamtmenge nachgewiesenen PARP-Moleküls (116 kD + 85 kD).

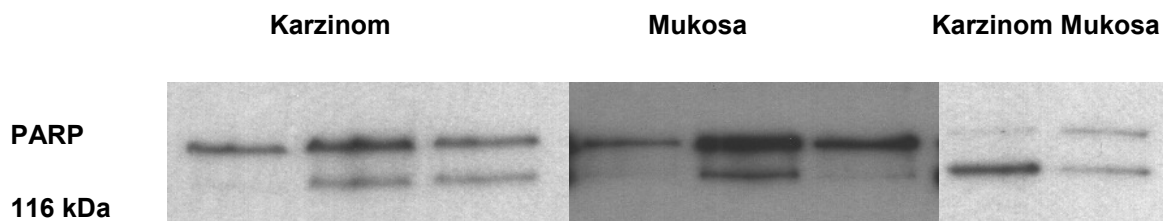


Abbildung 10: Repräsentative Western Blots

Erkennbar ist die Zunahme der apoptotischen PARP-Spaltung in Gewebe aus kolorektalen Karzinomen und kolorektaler Mukosa bei 24stündiger Inkubation mit 60 µM Saquinavir (SQV) und 70 µM Nelfinavir (NFV) sowie 57 µM Camptothecin (CPT).

3.5 Statistische Auswertung

Die Signifikanzprüfung erfolgte für die Zellkultur mit dem Studentschen-t-Test gegen die Werte der nur mit Kulturmedium bzw. Lösungsmittel inkubierten Zellen bzw. Gewebe. Ab $p < 0,05$ wurde ein Ergebnis als signifikant verschieden zur Kontrolle gewertet. Die Daten der Gewebekultur wurde mit dem Wilcoxon Rangsummentest geprüft. Die Signifikanzniveaus sind folgendermaßen bezeichnet: n.s. (nicht signifikant) = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

3.6 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

<u>Trenngelpuffer</u>	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Bio-Rad
<u>Sammelgelpuffer</u>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Bio-Rad
<u>Acrylamid-Lösung</u>	30% Acrylamid/Bis-Lösung, 37,5:1	Bio-Rad

<u>Trenngel 9%</u>	<u>Sammelgel 4%</u>		
8,8 ml	6,1 ml	Aqua bidest	
5ml	2,5 ml	Puffer s.o.	
2ml	100 µl	10 % SDS	Sigma
6 ml	1,3 ml	Acrylamid-Lösung s.o.	
200 µl	50 µl	10% APS	Sigma
20 µl	10 µl	TEMED	Bio-Rad
<u>10 x Laufpuffer</u>	0,25 M Tris-Base	30,3 g	Sigma
	1,92 M Glycin	144 g	Sigma
	1 % SDS	10 g	Sigma
		<hr/> Ad 1 l Aqua bidest.	
<u>10 x PBS</u>	27 mM KCl	2 g	
(10 x Waschpuffer)	18 mM KH ₂ PO ₄	2,4 g	
	1370 mM NaCl	80 g	
		<hr/> Ad 1 l Aqua bidest.	

Material und Methoden

<u>PBS-T</u>	0,1 % Tween-20	1 ml	
		Ad 1 l 1 x PBS	
<u>6 x Lämmli-Puffer</u>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	7 ml	Sigma
	Glycerol	3 ml	Sigma
	SDS	1 g	Sigma
	Mercaptoethanol	349 µl	Sigma
	Bromphenolblau	1,2 mg	Sigma
<u>10 x Blotpuffer</u>	0,25 M Tris-Base	30,3 g	Sigma
(Semi-dry-Blot)	1,5 M Glycin	113 g	Sigma
		pH 8,3 Ad 1 l Aqua bidest.	
	Methanol	10 %	
	(beim Verdünnen frisch dazu)		
<u>10 x Ponceau-S-Lösung</u>	Ponceau-S	2 g	Serva
	Trichloressigsäure	30 g	Sigma
	Sulfosalicylsäure	30 g	Sigma
		Ad 100ml Aqua bidest.	
<u>Strippuffer</u>	100 mM Mercaptoethanol	3,55 ml (von 14,1 M)	Sigma
	2 % SDS	100 ml (von 10% SDS)	Sigma
	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8	62,5 ml	Sigma
		Ad 500ml Aqua bidest.	

4 Ergebnisse

4.1 Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren

Apoptoseinduktion durch die Proteaseinhibitoren Saquinavir und Nelfinavir kann eine Barrierestörung in Monolayern aus HT-29/B6-Zellen induzieren. Ein vergleichbarer Effekt ist möglicherweise die Ursache der Diarrhö, welche unter Therapie mit Proteaseinhibitoren häufig auftritt.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf HT-29/B6-Zellen beschränkt ist, wurden weitere Zelllinien intestinalen Ursprungs mit Proteaseinhibitoren behandelt. Zunächst wurde untersucht, ob der Effekt dosisabhängig auftritt. Dazu wurden die unterschiedlichen Zelllinien über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Proteaseinhibitoren inkubiert und dann mittels Durchflusszytometrie der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Die Signifikanz wurde durch den T-Test ermittelt. Werte über 0,05 wurden als nicht signifikant bewertet. Die Spontanapoptoserate unterschied sich zum Teil deutlich bei den unterschiedlichen Zelllinien. Als Postivkontrolle wurde Camptothecin eingesetzt.

4.1.1 Spontanapoptose

Saquinavir wurde in 70%igem Ethanol vorgelöst und dann in normalem Zellkulturmedium in den benötigten Konzentrationen angesetzt. Um einen Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Spontanapoptoserate auszuschließen, wurden in jedem Experiment die intestinalen Zelllinien HT29/B6, Caco-2, LS 174T und T84 in üblichem Kulturmedium sowie in Medium mit 0,14 % Ethanol über 24 h inkubiert. Diese Ethanolkonzentration entsprach derjenigen, die bei Inkubation mit 300 µM Saquinavir im Medium vorhanden war.

Nelfinavir wurde in 100%igem DMSO vorgelöst und dann in normalem Zellkulturmedium in den benötigten Konzentrationen angesetzt. Um einen Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Spontanapoptoserate auszuschließen, wurden die HT29/B6-Zellen in üblichem Kulturmedium sowie in Medium mit 0,5 % DMSO über 24 h inkubiert. Diese DMSO-Konzentration entsprach derjenigen, die bei Inkubation mit 700 µM Nelfinavir im Medium vorhanden war.

Die Spontanapoptoserate nach 24stündiger Inkubation unterschied sich bei den einzelnen Zelllinien (Tabelle 1). Die Zugabe von 0,14 % Ethanol zum Kulturmedium beeinflusste aber bei keiner der Zelllinien die Spontanapoptoserate ($p > 0,05$). Die Zugabe von 0,5 % DMSO minderte

nur bei den T84-Zellen die Apoptoserate, hier wurde bei der niedrigen Probenzahl (n=2) auf eine statistische Prüfung verzichtet.

Tabelle 1: Spontanapoptoserate der Zelllinien HT-29/B6, Caco-2, LS 174T und T84 nach 24 h in normalem Kulturmedium (Medium), in Kulturmedium mit 0,14 % Ethanol (Ethanol) und in Kulturmedium mit 0,5 % DMSO (DMSO)

	HT-29/B6	Caco-2	T84	LS 174T
Medium	1,8 ± 0,1	10,8 ± 0,7	19,1 ± 2,1	3,7 ± 1,0
Ethanol	2,0 ± 0,2	10,6 ± 1,3	21,2 ± 1,4	2,5 ± 0,1
DMSO	2,7 ± 0,4	†15,8 ± 2,4	†9,7 ± 0,5	†4,2 ± 0,1

Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung in Prozent der Gesamtpopulation, n=4, †: n=2.

4.1.2 Apoptoseinduktion durch Camptothecin

Der Topoisomerase-1-Hemmstoff Camptothecin wurde in den Versuchen zur Apoptoseinduktion durch Saquinavir als Positivkontrolle eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit Camptothecin in der Konzentration 20 µg/ml inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Camptothecin wurde in DMSO vorgelöst. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0,25 %.

Der Camptothecin-induzierte Anstieg der Apoptoserate war bei den HT-29/B6- und den Caco-2-Zellen jeweils etwa 2,4fach auf $7,9 \pm 2,3$ % bzw. $25,8 \pm 1,1$ %, während die T84-Zellen etwas stärker mit einem etwa 3,5fachen Anstieg der Apoptoserate auf $63,6 \pm 0,3$ % reagierten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Apoptoserate der Zelllinien HT29/B6, Caco-2 und T84 nach 48 h in Kulturmedium mit 0,25 % DMSO (DMSO) bzw. nach 48 h Inkubation mit dem Apoptoseinduktor Camptothecin in der Konzentration 20 µg/ml (CPT 20 µg/l)

	HT29/B6	Caco-2	T84
DMSO	3,3 ± 0,4	10,7 ± 1,8	18,2 ± 1,8
CPT 20 µg/ml	7,9 ± 2,3	25,8 ± 1,1	63,6 ± 0,3

Arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung in Prozent der Gesamtpopulation, n=4.

4.1.3 Apoptoseinduktion durch Saquinavir

Zur Ermittlung der Apoptoseinduktion durch Saquinavir wurden alle Zelllinien mit Konzentrationen zwischen 3 und 300 µM für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen entsprechen der einfachen bis hundertfachen Serumkonzentration, welche bei der Therapie mit Saquinavir erreicht werden. Anschließend wurden die in Apoptose befindlichen Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Es wurden jeweils vier Proben ausgewertet.

4.1.3.1 HT-29/B6

Die Apoptoserate stieg im Vergleich signifikant an bei Inkubation mit 30 μM Saquinavir, der Anteil apoptotischer Zellen stieg auf $21,2 \pm 3,1$ %. Bei Einsatz der doppelten Menge Saquinavir (60 μM) stieg die Apoptoserate noch weiter auf $37,2 \pm 2,3$ %. Bei höheren Saquinavir-Konzentrationen fiel die Apoptoserate zunächst ab (90 μM : $27,7 \pm 4,2$ %), wobei sie sich signifikant von den bei 60 μM Saquinavir erreichten Werten unterschied ($p < 0,01$), nahm bei Einsatz größerer Mengen (300 μM Saquinavir) aber erneut zu ($40,2 \pm 1,5$ %). Dieser biphasische Verlauf mit einem Rückgang der Apoptoserate im Bereich von 90-120 μM zeigte sich bei zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils $n=4$ (

Abbildung 11).

4.1.3.2 LSI74-T

Bei Inkubation mit 30 μM Saquinavir ergab sich ein leichter Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf $5,7 \pm 0,3$ % ($p < 0,05$), bei 60 μM Saquinavir stieg die Apoptoserate deutlich auf $21,9 \pm 3,3$ %, $p < 0,001$. Bei Inkubation mit 90 μM Saquinavir wurde mit $68,6 \pm 1,6$ % apoptotischer Zellen der stärkste Effekt erreicht. Bei der Konzentration 300 μM Saquinavir nahm die Apoptoserate wieder ab auf $59,9 \pm 2,4$ %. Die Apoptoserate bei niedrigeren Konzentrationen als 30 μM Saquinavir zeigte eine starke Streuung und war nicht signifikant verschieden von der spontanen Apoptoserate (

Abbildung 11).

4.1.3.3 Caco-2

Ein signifikanter, etwa siebenfacher Anstieg der Apoptoserate auf $76,0 \pm 0,9$ % ($p < 0,001$) erfolgte bei Inkubation mit 60 μM Saquinavir. Bei Inkubation mit 90 μM Saquinavir betrug der Anteil apoptotischer Zellen $82,2 \pm 0,8$ % und erhöhte sich nicht weiter mit steigender Saquinavir-Konzentration (

Abbildung 11).

4.1.3.4 T84

Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate um über 10 % auf $32,2 \pm 5,2$ % zeigte sich bei Inkubation mit 15 μM Saquinavir, bei 30 μM Saquinavir sank die Apoptoserate aber wieder ab und unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen oder dem bei 15 μM erreichten Wert ($p=0,28$). Ein deutliches Ansteigen des Anteils apoptotischer Zellen war bei Inkubation mit 60

Diskussion

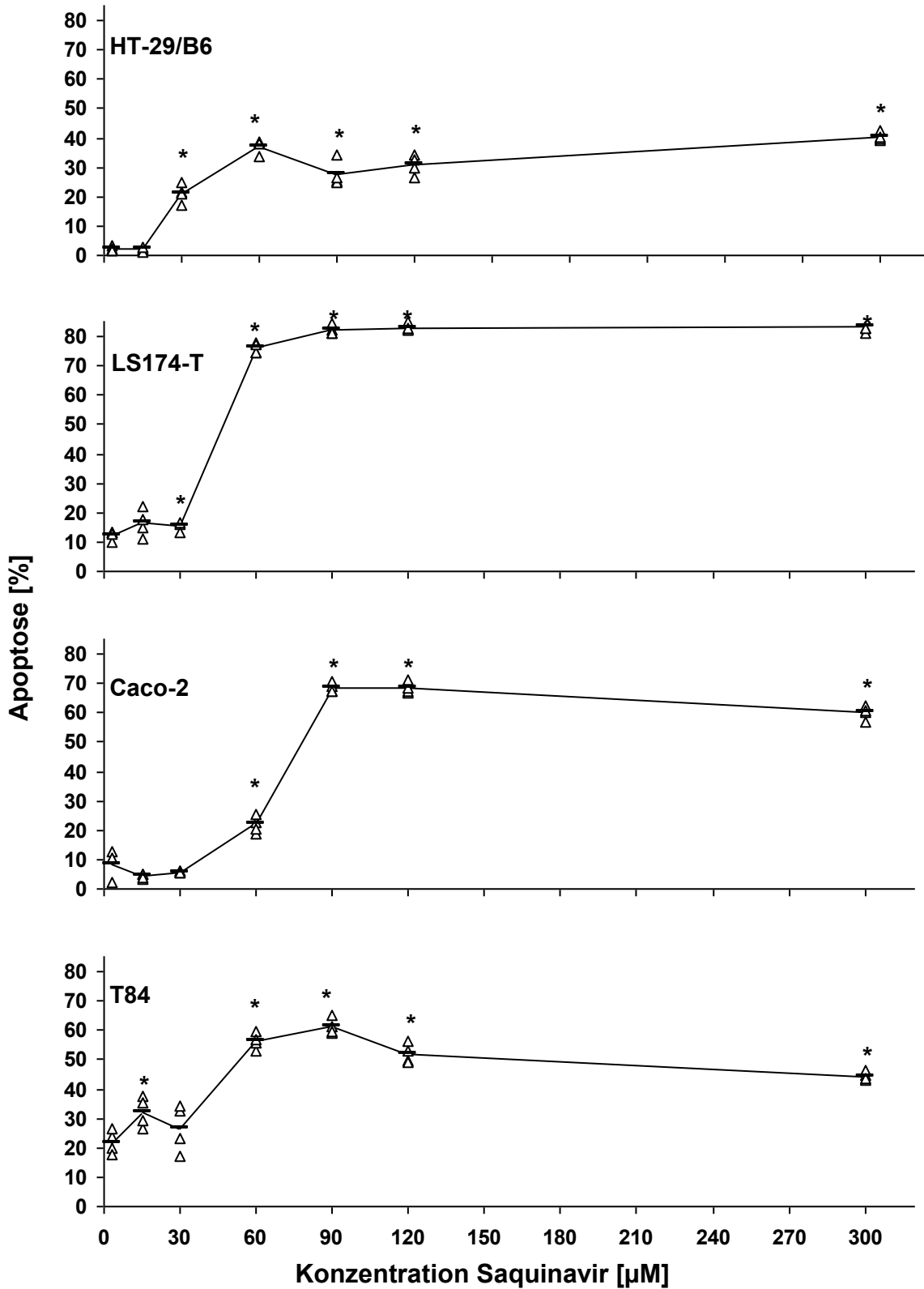


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion bei HT-29/B6-, LS174-T-, Caco-2- und T84-Zellen durch Saquinavir in einem Konzentrationsbereich von 3-300 µM

Der Anteil der Zellen im sub-G1-Bereich bei durchflusszytometrischer Analyse PJ-gefärbter Zellen ist angegeben in Prozent der Gesamtpopulation. Der Graph gibt den Mittelwert (—) an für eine Versuchsgruppe mit n=4 je Konzentration (Δ). Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (p<0,05) sind mit * gekennzeichnet.

μM Saquinavir zu sehen ($56,4 \pm 1,4 \%$, $p < 0,001$). Eine geringe Steigerung um ca. 5 % wurde durch Inkubation mit $90 \mu\text{M}$ Saquinavir erreicht, während bei den höheren eingesetzten Konzentrationen die Konzentrationen die Apoptoserate wieder abnahm auf $44,4 \pm 0,7 \%$ bei $300 \mu\text{M}$ Saquinavir. Die Apoptoserate bei niedrigeren Konzentrationen als $60 \mu\text{M}$ zeigte eine stärkere Streuung und unterschied sich nicht signifikant von der Spontanapoptoserate (

Abbildung 11).

4.1.4 Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch Nelfinavir

Zur Ermittlung der Apoptoseinduktion durch Nelfinavir wurden die untersuchten Zelllinien mit Konzentrationen zwischen 7 und $700 \mu\text{M}$ für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen entsprechen der einfachen bis hundertfachen Serumkonzentration, die bei der Therapie mit Nelfinavir erreicht wird. Anschließend wurden die in Apoptose befindlichen Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Von den HT29/B6-Zellen wurden jeweils vier Proben und von den übrigen Zelllinien jeweils 2 Proben ausgewertet.

4.1.4.1 HT29/B6

Bei Inkubation mit $35 \mu\text{M}$ Nelfinavir stieg der Anteil apoptotischer Zellen deutlich etwa 15fach auf $38 \pm 0,9 \%$ an (Abbildung 12). Bei höheren Nelfinavir-Konzentrationen stieg die Apoptoserate nur gering. Die Apoptoserate fiel bei höheren Konzentrationen wieder leicht ab auf $35,4 \pm 2,4 \%$ bei Inkubation mit $700 \mu\text{M}$ Nelfinavir (Abbildung 12).

4.1.4.2 LS174-T, Caco-2 und T84

LS174T- und Caco-2-Zellen reagierten bei Inkubation mit $7 \mu\text{M}$ Nelfinavir nicht mit einer Steigerung der Apoptoserate (Abbildung 13). Nur bei T84-Zellen stieg bei $7 \mu\text{M}$ Nelfinavir die Apoptoserate von $9,7 \pm 0,5 \%$ bei Inkubation mit Kulturmedium inklusive $0,5 \%$ DMSO auf $16,1 \pm 2,1 \%$. Bei Inkubation mit $35 \mu\text{M}$ Nelfinavir dagegen reagierten alle getesteten Zelllinien deutlich: Bei den Caco-2-Zellen stieg die Apoptoserate ca. 4fache auf $69 \pm 0,3 \%$, bei den LS174T-Zellen ca. 7fach auf $29,2 \pm 2,8 \%$, und bei den T84-Zellen erhöhte sich die Apoptoserate ca. 5fach auf $51 \pm 2,1 \%$. Die T84-Zellen zeigten bei Einsatz höherer Konzentrationen keine deutliche Steigerung, während bei den Caco-2 sowie bei den LS174T-Zellen sich die Apoptoserate auf $82,7 \pm 0,4 \%$ bzw. $47,9 \pm 5,1 \%$ bei Inkubation mit $700 \mu\text{M}$ Nelfinavir erhöhte. Bei allen Zelllinien führten Nelfinavir-Konzentrationen $\geq 35 \mu\text{M}$ jeweils zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate (Abbildung 13).

Diskussion

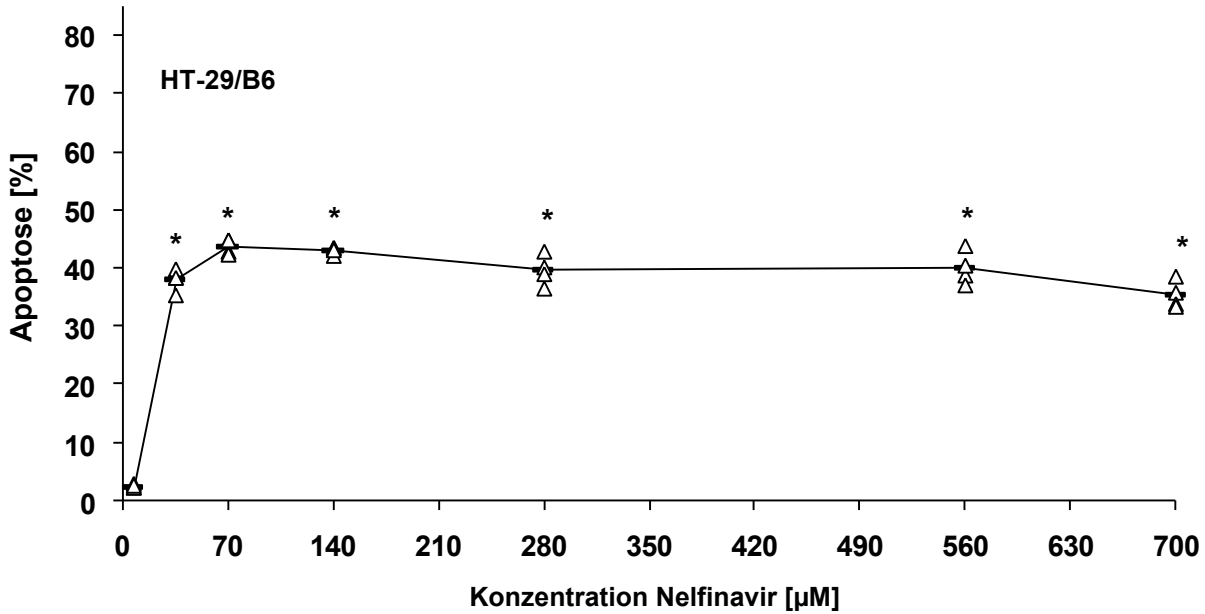


Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion bei HT-29/B6-Zellen durch Nelfinavir in einem Konzentrationsbereich von 7-700 µM

Der Anteil der Zellen im sub-G1-Bereich bei durchflusszytometrischer Analyse PJ-gefärbter Zellen ist angegeben in Prozent der Gesamtpopulation. Der Graph gibt den Mittelwert (—) an für eine Versuchsgruppe mit n=4 je Konzentration (Δ). Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

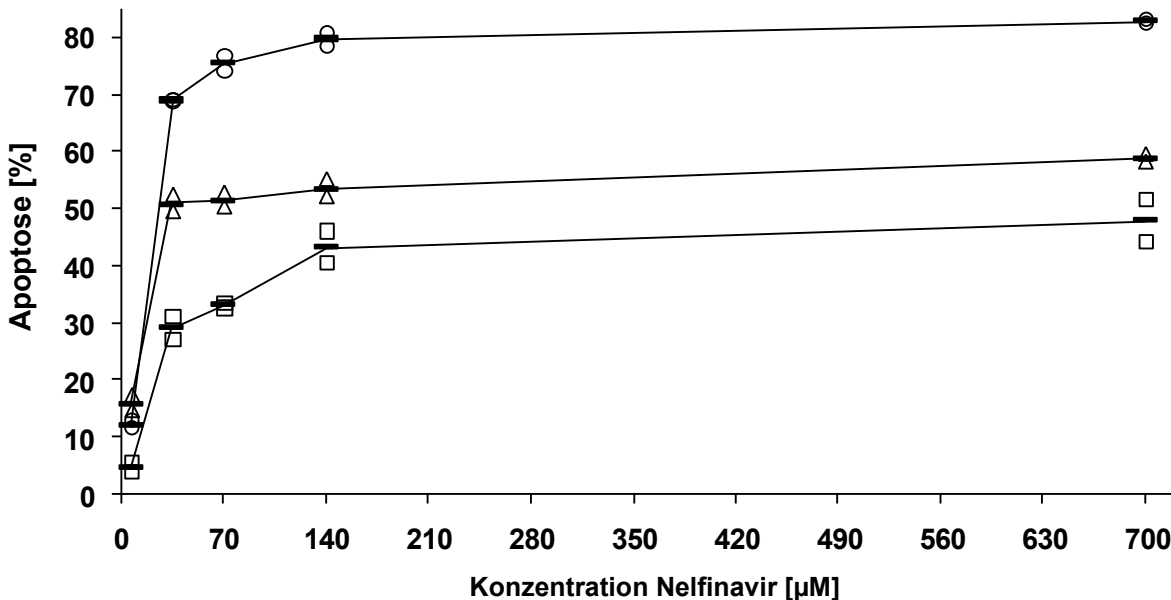


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion bei LS174-T- (□), Caco-2- (Δ) und T84-Zellen (○) durch Nelfinavir in einem Konzentrationsbereich von 7-700 µM

Der Anteil der Zellen im sub-G1-Bereich bei durchflusszytometrischer Analyse PJ-gefärbter Zellen ist angegeben in Prozent der Gesamtpopulation. Der Graph gibt den Mittelwert (—) an für eine Versuchsgruppe mit n=2 je Konzentration.

Zusammenfassung Nelfinavir

In einem Konzentrationsbereich von 35-140 μM induziert Nelfinavir Apoptose in HT29/B6-, LS174-T- und Caco-2-Zellen. Höhere Konzentrationen führten bei HT29/B6-Zellen wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate.

4.1.5 Zusammenfassung Saquinavir

In einem Konzentrationsbereich von 30-90 μM induziert Saquinavir Apoptose in HT29/B6-, LS174-T- und Caco-2-Zellen. Höhere Konzentrationen führten bei LS174-T-Zellen wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate. Bei T84-Zellen induzierte Saquinavir Apoptose im Konzentrationsbereich von 60-90 μM Höhere Konzentrationen führten wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate.

4.2 Zeitverlauf der Apoptoseinduktion

Saquinavir konnte bei allen getesteten Zelllinien im Dosisbereich von 30 – 90 μM Apoptose induzieren. Deshalb wurde die Konzentration von 60 μM benutzt, um den Zeitverlauf der Apoptoseinduktion an HT29/B6-Zellen zu überprüfen. Nelfinavir konnte bei allen getesteten Zelllinien im Dosisbereich von 35 – 140 μM Apoptose induzieren. Deshalb wurde die Konzentration von 70 μM benutzt, um den Zeitverlauf der Apoptoseinduktion an HT29/B6-Zellen zu überprüfen. Apoptose wurde nach 6, 12, 18 und 24 h sowie nach 48 h mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit Kulturmedium und Lösungsmittel inkubiert wurden.

Bei Einsatz von 60 μM Saquinavir trat im Verlauf von 12 Stunden nur eine schwache Erhöhung ($P < 0,05$) der Apoptoserate auf (Abbildung 14). Nach 18 Stunden Inkubation mit 60 μM Saquinavir unterschied sich der Anteil apoptotischer Zellen deutlich von dem der Kontrollzellen ($6,3 \pm 0,2$ % gegenüber $3,1 \pm 0,2$ %, $p < 0,001$). Der größte Anstieg der Apoptoserate erfolgte zwischen 18 und 24 Stunden Inkubation auf $26,1 \pm 1,3$ % ($p < 0,001$) nach 24 Stunden. Im Vergleich dazu sank nach 48stündiger Inkubation mit 60 μM Saquinavir die Apoptoserate leicht auf $18,6 \pm 0,7$ %.

Bei Einsatz von 70 μM Nelfinavir fand sich schon bei Beginn der Messung nach 6 h Inkubation eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$, Abbildung 15). Ein deutlicher Anstieg der Rate fand zwischen 12 und 24 h Inkubation statt (von $11,4$ % \pm $0,9$ % auf $43,7 \pm 1,7$ %), eine längere Inkubation führte dagegen nur noch zu einem geringen Anstieg auf 51 % \pm $2,2$ %.

Diskussion

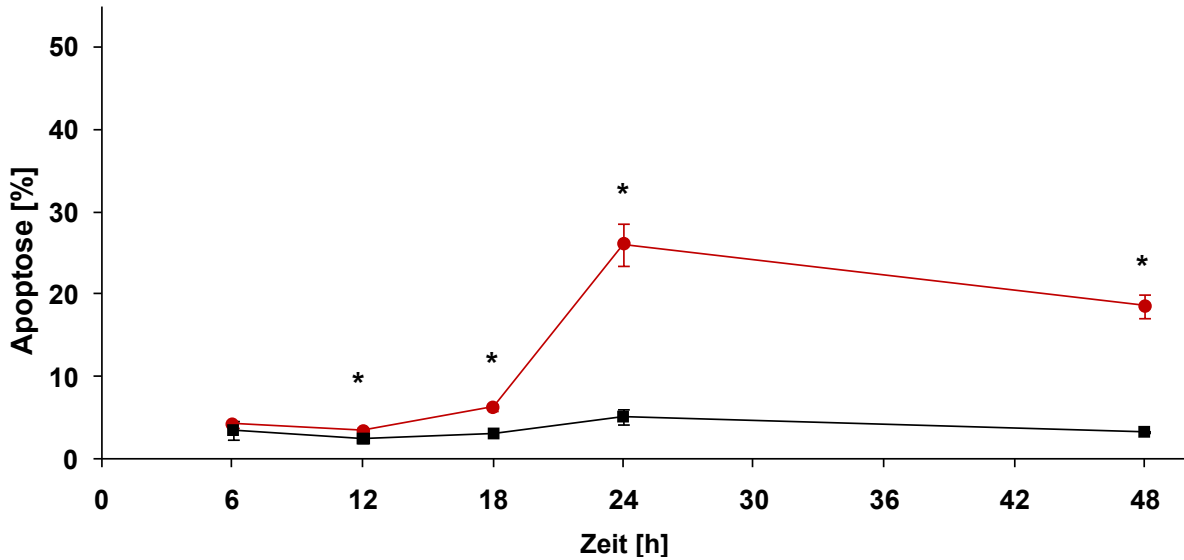


Abbildung 14: Zeitverlauf der Apoptoseinduktion durch Saquinavir bei HT-29/B6-Zellen

HT-29/B6-Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit $60 \mu\text{M}$ Saquinavir (●) oder mit Kulturmedium mit $0,14 \%$ Ethanol (■) inkubiert. Nach 6, 12, 18, 24 und 48 Stunden wurde der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt. Der Anteil der Zellen im sub-G1-Bereich bei durchflusszytometrischer Analyse PJ-gefärbter Zellen ist angegeben in Prozent der Gesamtpopulation. Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet (Arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle $n=4$).

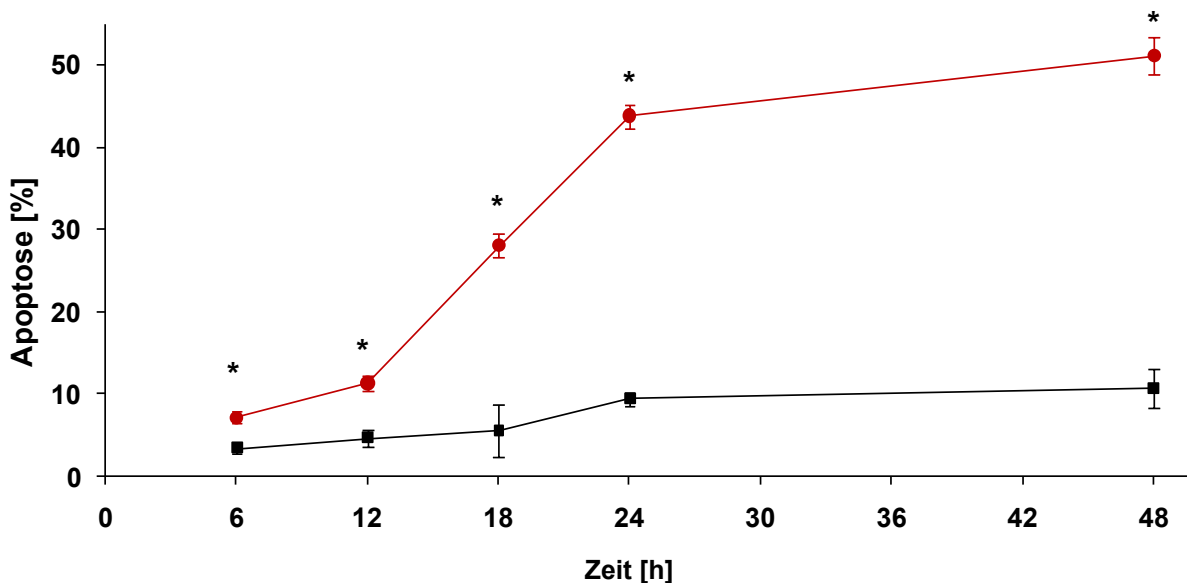


Abbildung 15: Zeitverlauf der Apoptoseinduktion durch Nelfinavir bei HT-29/B6-Zellen

HT-29/B6-Zellen wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit $70 \mu\text{M}$ Nelfinavir(●) oder mit Kulturmedium mit $0,5 \%$ DMSO (■) inkubiert. Nach 6, 12, 18, 24 und 48 Stunden wurde der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt. Der Anteil der Zellen im sub-G1-Bereich bei durchflusszytometrischer Analyse Propidiumjodid-gefärbter Zellen ist angegeben in Prozent der Gesamtpopulation. Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet (Arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle $n=4$).

4.2.1 Einfluss von Saquinavir auf den Zellzyklus von HT29/B6

Nach 12stündiger Inkubation mit 60 μ M Saquinavir stieg die Apoptoserate bei HT29/B6-Zellen an und erreichte ihr Maximum nach 24 Stunden (s.o.). Durch die durchflusszytometrische Analyse Propidiumjodid-gefärbter Zellen sind auch Aussagen über die Zellzyklusverteilung möglich. Die Zellzyklusverteilung ist in Abbildung 16 dargestellt. Zellen in der Synthesephase und in der G2-/Mitosephase wurden als proliferierende Zellen zusammengefasst.

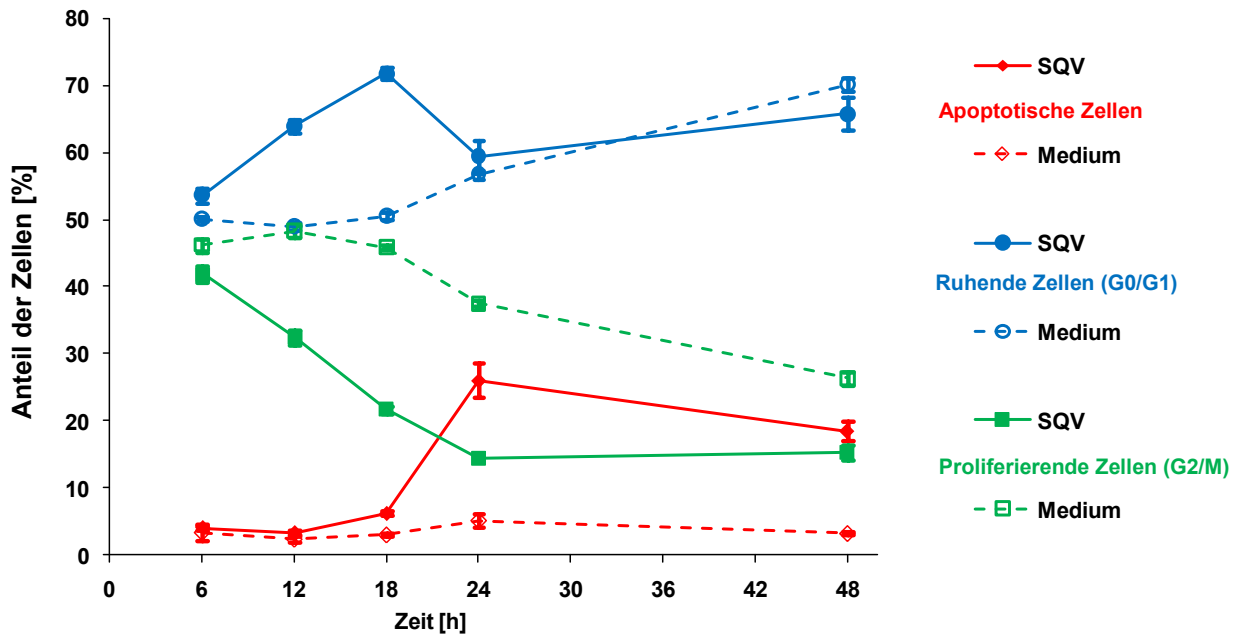


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen bei HT-29/B6-Zellen

HT-29/B6-Zellen wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit 60 μ M Saquinavir (—, SQV) oder mit Kulturmedium mit 0,14 % Ethanol (Medium - - -) inkubiert. Nach 6, 12, 18, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und nach Zellzyklusphasen getrennt in Prozent der Gesamtpopulation dargestellt. Zellen in der S- und G2/M-Phase wurden als proliferierende Zellen (■) zusammengefasst. Apoptotische Zellen (◇) und Zellen in der G0/G1-Phase(●) sind ebenfalls dargestellt. (Arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, alle $n=4$, Kontrolle bei 48 h: $n=3$).

Nach 6 h Inkubation unterschied sich die Zellzyklusverteilung von saquinavirbehandelten und Kontrollzellen kaum. Nach 12 h nimmt unter Saquinavir der Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase zu, die proliferierenden Zellen nehmen ab. Erst nach 18 h kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen. Dagegen ist in der Kontrollgruppe bis zum Zeitpunkt 18h keine Änderung Zellzyklusverteilung zu sehen.

Zum Zeitpunkt $t=24$ h, der maximalen Apoptoseinduktion, finden sich weniger Zellen in der G0/G1-Phase. In der Kontrollgruppe kommt es über die gesamte Zeit zu keiner wesentlichen

Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen. Nach 18 h steigt der Anteil ruhender Zellen (G0/G1) auf Kosten der proliferierenden Zellen.

Die Zellzyklusverteilung wurde auch in den Versuchen zur Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion aufgeschlüsselt (keine Abbildung). Bei HT-29/B6- und LS174T-Zellen erhöhte sich der Anteil von ruhenden Zellen (G0/G1-Phase) deutlich, noch bevor eine signifikante Apoptoseinduktion auftrat.

4.3 Kombination Camptothecin mit Saquinavir und Nelfinavir

Die Wirksamkeit einer Kombination von Proteaseinhibitoren mit Camptothecin sollte überprüft werden. Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die nur gering Apoptose induzierten.

4.3.1 HT 29/B6-Zellen

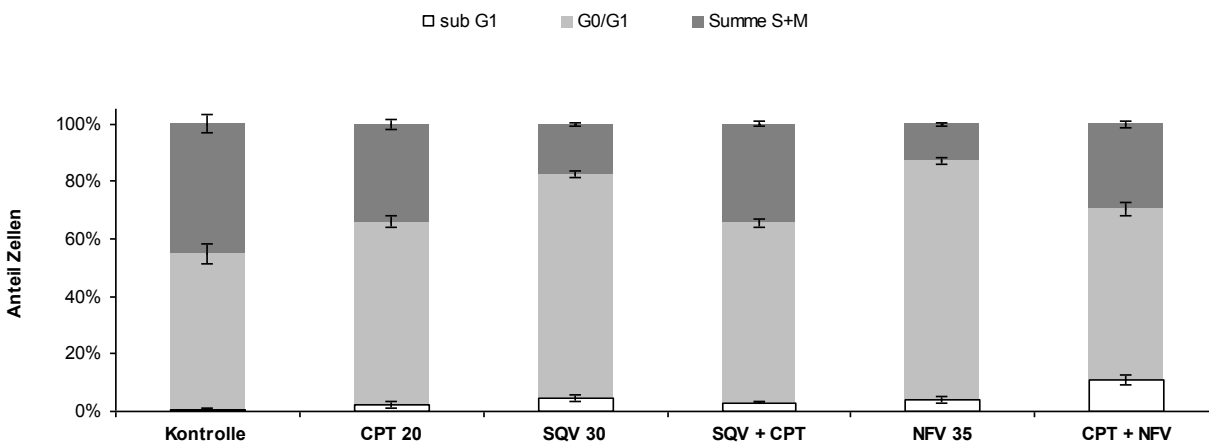


Abbildung 17: Apoptoseinduktion und Anteil der Zellen in G0/G1- und S + G2/M-Phase bei Inkubation mit Saquinavir, Nelfinavir und Kombination mit Camptothecin bei HT-29/B6-Zellen.

Dargestellt ist der Anteil der HT-29/B6-Zellen in Apoptose (weiße Balken), in der G0/G1-Phase (hellgraue Balken) und in der S+G2/M-Phase (dunkelgraue Balken) in Prozent der Gesamtpopulation nach 24 Stunden Inkubation in Kulturmedium mit Lösungsmittel (Kontrolle), Camptothecin 20 μ M (CPT 20), Saquinavir 30 μ M (SQV 30), Nelfinavir 35 μ M (NFV 35) sowie der jeweiligen Kombinationen.

Die spontane Apoptoserate der HT29/B6-Zellen nach 24 h Inkubation mit Kulturmedium inkl. 0,25 % DMSO und 0,14 % Ethanol betrug $0,9 \pm 0,3$ %. Nach Inkubation mit 30 μ M Saquinavir stieg die Apoptoserate signifikant auf $4,7 \pm 0,9$ % an, bei Inkubation mit 20 μ M Camptothecin auf $2,5 \pm 1,2$ % an. Die Kombination aus Saquinavir 30 μ M und Camptothecin 20 μ M brachte im Vergleich zu Camptothecin alleine keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Zellzyklusphasen.

Diskussion

Auch bei Inkubation mit 35 μM Nelfinavir stieg die Apoptoserate leicht an auf $4 \pm 1,2 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle). Bei Kombination von 35 μM Nelfinavir mit 20 μM Camptothecin stieg die Apoptoserate auf $11,2 \pm 1,7 \%$ und unterschied sich dabei signifikant von der Inkubation mit 30 μM Nelfinavir bzw. 20 μM Camptothecin alleine ($p < 0,001$). Die Apoptoserate war hierbei höher als bei reiner Addition der Apoptoseren.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich ein größerer Anteil von Zellen in der G1-Phase sowohl bei Inkubation mit Saquinavir als auch Nelfinavir. (Kontrollen $53,7 \pm 3,5 \%$ vs. $77,7 \pm 1,1 \%$ Saquinavir 30 μM und $82,7 \pm 1,2 \%$).

4.3.2 LS174T-Zellen

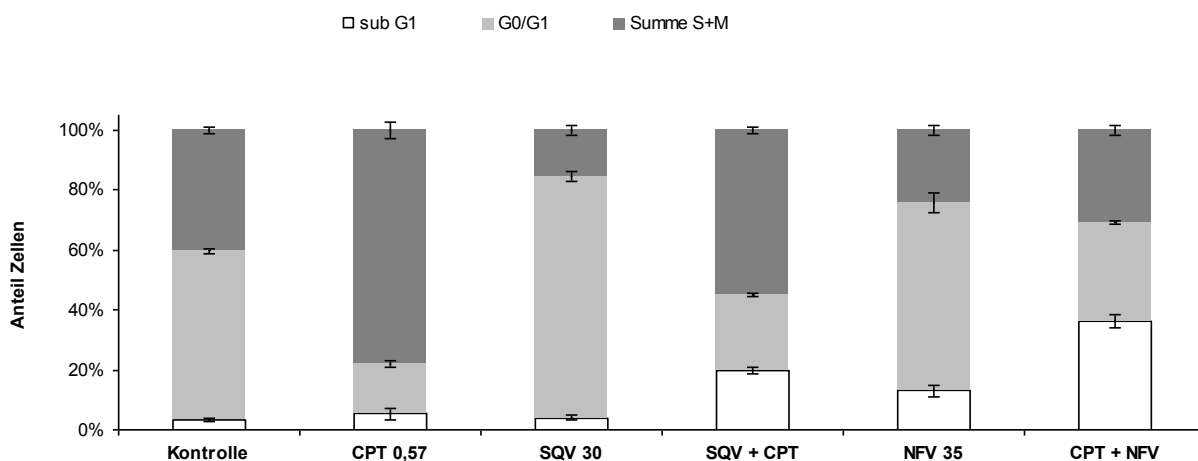


Abbildung 18: Apoptoseinduktion und Anteil der Zellen in G0/G1- und S + G2/M-Phase bei Inkubation mit Saquinavir, Nelfinavir und Kombination mit Camptothecin bei LS174-T-Zellen.

Dargestellt ist der Anteil der LS174-T-Zellen in Apoptose (leere Balken), in der G0/G1-Phase (hellgraue Balken) und in der S+G2/M-Phase (dunkelgraue Balken) in Prozent der Gesamtpopulation nach 24 Stunden Inkubation in Kulturmedium mit Lösungsmittel (Kontrolle), Camptothecin 0,57 μM (CPT 0,57 bzw. CPT), Saquinavir 30 μM (SQV 30), Nelfinavir 35 μM (NFV 35) sowie der jeweiligen Kombinationen.

Die spontane Apoptoserate der LS174T-Zellen nach 24 h Inkubation in Kulturmedium mit 0,25 % DMSO und 0,14 % Ethanol betrug $3,3 \pm 0,7 \%$ wie bei den vorhergehenden Experimenten. Inkubation mit 0,57 μM Camptothecin (0,2 $\mu\text{g/ml}$) bzw. 30 μM Saquinavir allein erhöhte die Apoptoserate nicht signifikant, während durch Kombination beider Substanzen ein Anstieg auf $19,6 \pm 1,1 \%$ zustande kam. Inkubation mit 35 μM Nelfinavir führte zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate ($13 \pm 1,8 \%$), die sich durch gleichzeitige Inkubation mit 0,57 μM Camptothecin auf $36,4 \pm 2,2 \%$ etwa dreifach steigern ließ.

Wie in den Versuchen zur Dosis-Wirkungsbeziehung kam es zu einer Vermehrung des Anteils von Zellen in der G1-Phase sowohl bei Inkubation mit 30 μM Saquinavir ($80,5 \pm 1,5\%$ vs. $56 \pm 0,6\%$, $p < 0,001$), als auch bei Inkubation mit Nelfinavir 35 μM ($62,6 \pm 3,6\%$, $p < 0,01$).

4.3.3 Zusammenfassung

Nelfinavir bzw. Saquinavir wurden jeweils mit Camptothecin kombiniert. Es wurden Konzentrationen eingesetzt, welche nur geringfügig oder gar nicht Apoptose induzierten.

Bei HT-29/B6-Zellen wurde die Apoptoserate durch Kombination von Nelfinavir und Camptothecin gesteigert im Vergleich zur Inkubation mit den Einzelsubstanzen. Bei LS174-T-Zellen steigerte die Kombination sowohl von Nelfinavir als auch Saquinavir mit Camptothecin sowohl bei Nelfinavir die Apoptoserate deutlich.

4.4 Qualitativer Apoptosenachweis: TUNEL-Färbung in HT29/B6-Zellen

Zur Bestätigung der in der durchflusszytometrischen Analyse Propidiumjodid-gefärbter Zellen gewonnenen Ergebnisse, wurde ein hochspezifischer Apoptosenachweis mittels TUNEL-Färbung durchgeführt. HT29/B6-Zellen wurden in 8-Loch Lab-Tek II Glas-Chamber-Slides mit Kulturmedium bzw. Proteaseinhibitoren inkubiert. Hier zeigte sich eine deutliche Apoptoseinduktion bei Inkubation mit den Proteaseinhibitoren. Bei höheren Konzentrationen der Proteaseinhibitoren mit stärkerer Apoptoseinduktion lösten sich die Zellen aber aus ihrem Verband und gingen bei den Wasch- und Färbeschritten verloren, somit war mit dieser Methode keine verlässliche Quantifizierung der Apoptoseinduktion möglich.

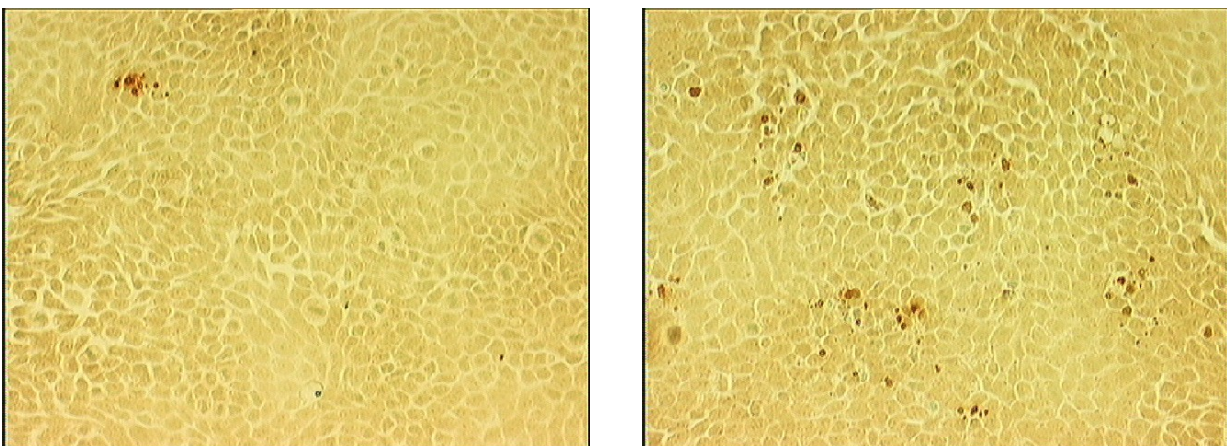


Abbildung 19: TUNEL-Färbung von HT29/B6-Zellen:

HT29/B6-Zellen wurden in für 72 Stunden 8-Loch Lab-Tek II Glas-Chamber-Slides mit Kulturmedium mit Lösungsmittel (Kontrolle, links) bzw. 48 Stunden mit 30 μM SQV inkubiert (rechts). Es kommt zu einer deutlichen Zunahme apoptotischer Zellen und apoptotischer Körperchen, die sich dunkelbraun darstellen (Farbstoff DAB). Die Gegenfärbung wurde mit Methylgrün, einem DNA-Farbstoff, durchgeführt. Bei den Kontrollzellen sind vereinzelt Mitosefiguren zu erkennen. Vergrößerung: 100fach.

4.5 Apoptoseinduktion in humanem Gewebe: Nachweis der PARP-Spaltung im Western Blot

In der Zellkultur sollten Dosisabhängigkeit und Zeitverlauf der Apoptoseinduktion überprüft werden. Ergebnisse aus der Zellkultur sind nicht immer auf die Vorgänge im menschlichen Organismus übertragbar. Um sich der Situation beim Menschen anzunähern, wurde die Apoptoseinduktion zunächst ex-vivo an humanem Gewebe getestet werden. Dazu wurde Gewebe aus operativ entfernten Adenokarzinomen des Kolorektums (n=6) sowie kolorektale Mukosa (n=7) verwendet. Das Gewebe wurde 24 Stunden mit 60 µM Saquinavir, 70 µM Nelfinavir und mit Camptothecin 20µg/ml als Positivkontrolle inkubiert. Zur Kontrolle wurde Gewebe in Kulturmedium mit Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate durch Nachweis von PARP-Spaltung im Western Blot quantifiziert. Der Anteil von PARP-Spaltprodukt an der Gesamt-PARP-Menge spiegelt den Anteil apoptotischer Zellen in den Gewebestückchen wider.

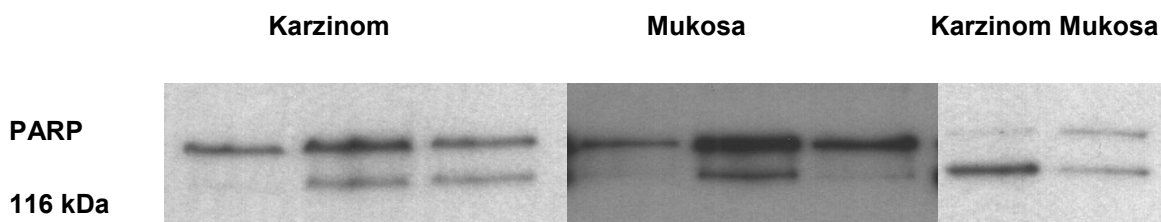


Abbildung 20: Repräsentative Western Blots der PARP-Spaltung in humanem Gewebe

Erkennbar ist die Zunahme der apoptotischen PARP-Spaltung in Gewebe aus kolorektalen Karzinomen und kolorektaler Mukosa nach 24stündiger Inkubation mit 60 µM Saquinavir (SQV) und 70 µM Nelfinavir (NFV) sowie 57 µM Camptothecin (CPT).

In den nur mit Medium inkubierten Kontrollen lag der Median der PARP-Spaltung bei 28% (Abbildung 21), die Inkubation mit Saquinavir steigerte die PARP-Spaltung auf 37% ($p<0,02$). Die Inkubation mit 70 µM Nelfinavir ergab einen Zuwachs auf 38%, der statistisch nicht signifikant war ($p=0,12$). Die Positivkontrolle Camptothecin zeigte auch hier einen deutlichen Effekt auf die PARP-Spaltung (63%, $p<0,05$).

4.5.2 Kolorektale Karzinome

In den Kontrollen lag der Median der PARP-Spaltung bei 18%, die Inkubation mit Saquinavir steigerte die PARP-Spaltung auf 37% (Abbildung 21). Dieser Effekt war nicht signifikant. Inkubation mit Nelfinavir steigerte die PARP-Spaltung dagegen signifikant auf 48% ($p<0,05$),

dennoch fiel bei einer Probe hier die Apoptoserate ab. Die Inkubation mit Camptothecin steigerte bei allen Proben die Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle (83% PARP-Spaltung, $p < 0,05$).

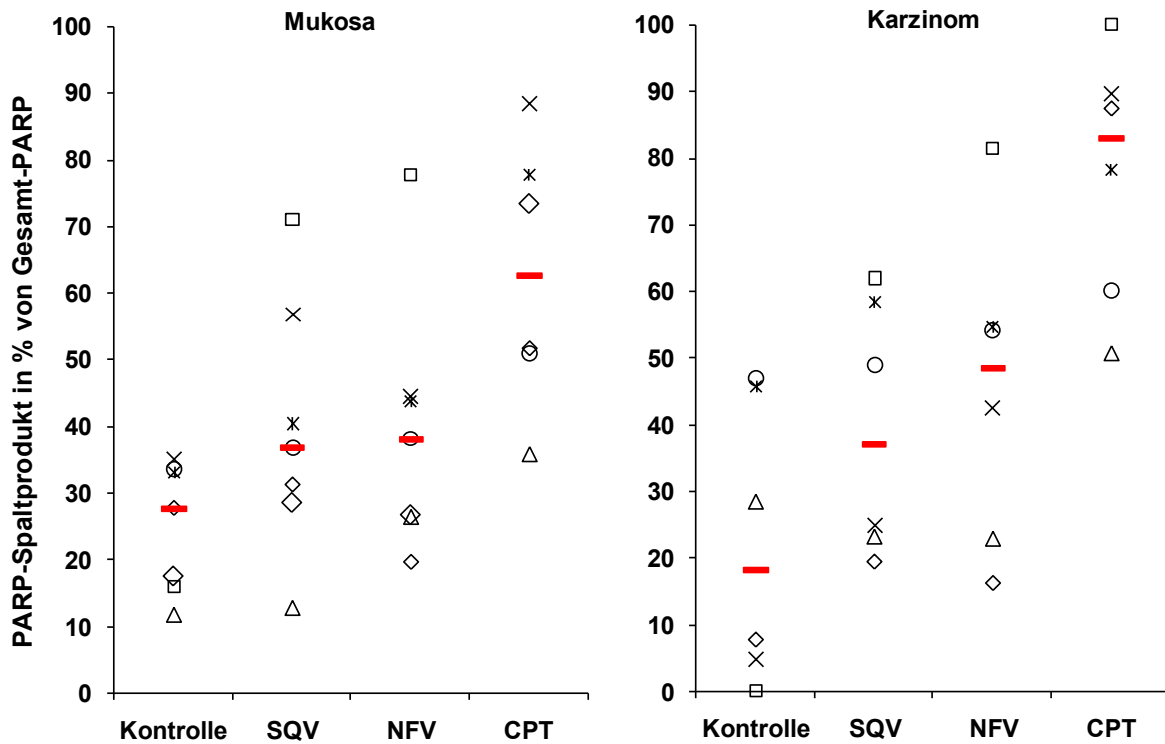


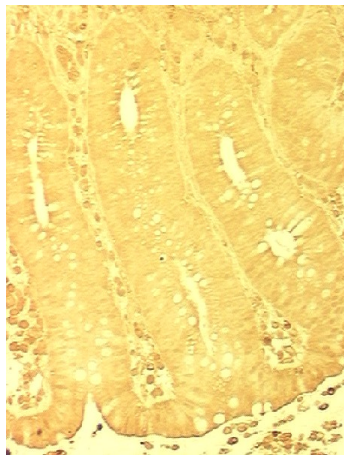
Abbildung 21: Apoptoseinduktion in humanen Gewebe-Explantaten

PARP-Spaltprodukt in Prozent von Gesamt-PARP detektiert im Western Blot nach 24 Stunden Inkubation mit Kulturmedium (Kontrolle), 60 μ M Saquinavir (SQV), 70 μ M Nelfinavir (NFV) und 20 mg/ml Camptothecin (CPT). Der Median ist rot dargestellt (—). Signifikanter Anstieg der PARP-Spaltung in Proben der Mukosa durch Camptothecin, in Proben von Kolon-Karzinomen bei Nelfinavir und Camptothecin ($P > 0,05$).

4.6 Qualitativer Apoptosenachweis: TUNEL-Färbung in humanem Gewebe

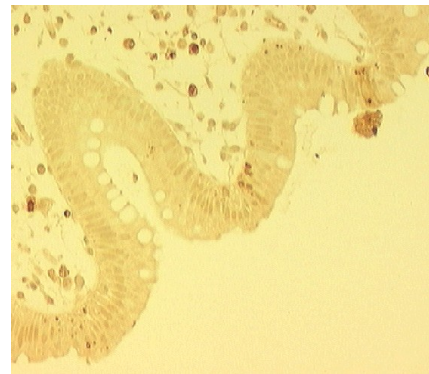
Die Apoptoseinduktion durch die Proteaseinhibitoren wurde auch qualitativ überprüft. Hierzu wurde die oben beschriebene TUNEL-Färbung an Schnitten paraffinierter kolorektaler Mukosa und kolorektaler Karzinome durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Induktion von Apoptose durch Inkubation mit 60 μ M Saquinavir bzw. 70 μ M Nelfinavir (Abbildung 22 Abbildung 23).

Diskussion



Medium

Mukosa



SQV

Abbildung 22: TUNEL-Färbung von kolorektaler Mukosa

Isolierte kolorektale Mukosa wurde 24 h mit Kulturmedium mit Lösungsmittel (Medium) bzw. 60 μM Saquinavir (SQV) inkubiert. Niedrigmolekulare DNA-Fragmente werden in der TUNEL-Färbung spezifisch angefärbt, hier mit einem braunen Farbstoff (DAB). Deutlich zu sehen ist die Zunahme von apoptotischen Zellkernen und Apoptosekörperchen in der Mukosa. Gegenfärbung: Methylgrün. Vergrößerung: 100fach.

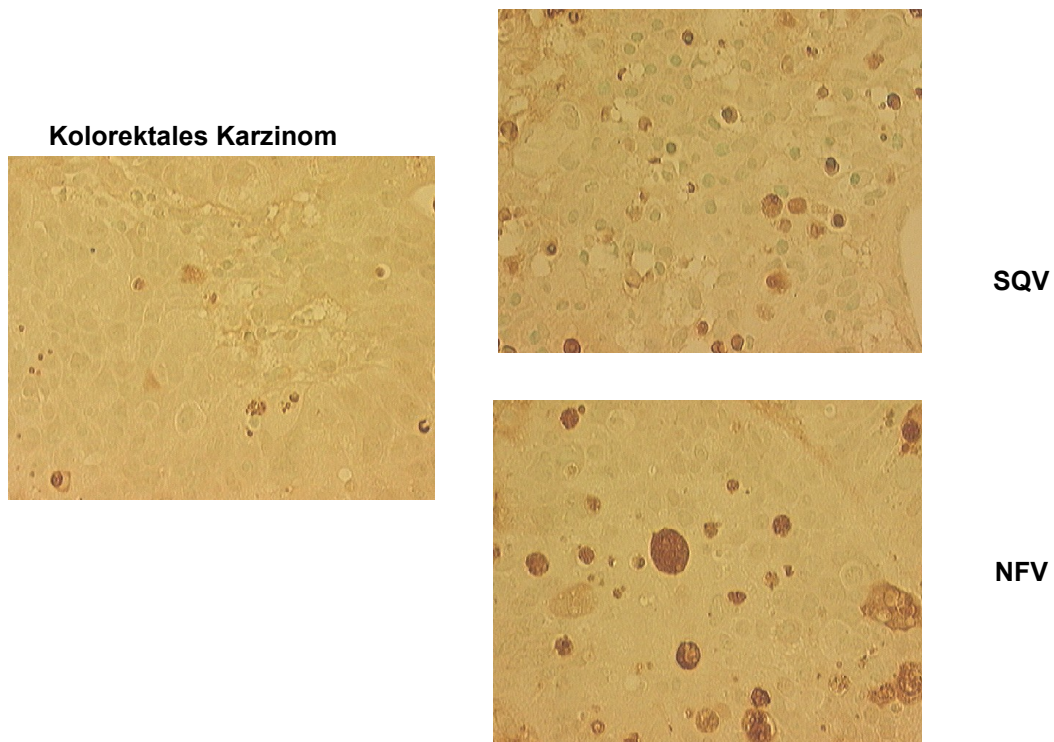


Abbildung 23 TUNEL-Färbung von kolorektalen Karzinomen

Proben aus kolorektalen Karzinomen wurden 24 h mit Kulturmedium und Lösungsmittel (Medium) bzw. 60 μM Saquinavir (SQV) und 70 μM Nelfinavir (NFV) inkubiert. Niedrigmolekulare DNA-Fragmente werden in der TUNEL-Färbung spezifisch angefärbt, hier mit einem braunen Farbstoff (DAB). Deutlich zu sehen ist die Zunahme von apoptotischen Zellkernen und Apoptosekörperchen in der Mukosa. Gegenfärbung: Methylgrün. Vergrößerung: 200fach.

5 Diskussion

5.1 Einführung

Diarrhö ist eine der häufigsten Nebenwirkungen der Therapie mit HIV-Proteaseinhibitoren, die bei 16 – 62 % der Behandelten auftritt^{34, 35}. Die Ursache der Diarrhö ist noch unklar. Infrage kommen neben Störungen der intestinalen Motilität oder Resorptionsstörungen eine erhöhte Ionen-Sekretion oder eine verstärkte Durchlässigkeit des Darmepithels durch eine lückenhafte Barriere.

In Vorarbeiten unserer Gruppe wurde zunächst an HT-29/B6-Zellen gezeigt, dass durch Saquinavir, Nelfinavir und Ritonavir keine Ionensekretion ausgelöst wird, sondern dass es zu einer Störung der Barrierefunktion mit Verminderung des transepithelialen Widerstandes und nachfolgender Permeabilitätssteigerung für höhermolekulare Substanzen wie Mannitol sowie für Ionen kommt⁹⁴. Weiterhin wurden die möglichen Ursachen einer Barriestörung untersucht, nämlich Veränderungen in den Schlußleisten (tight-junctions), Mikroerosionen durch Nekrose, sowie Apoptosen in der Epithelzellschicht^{42, 43}. Bei HT-29/B6-Zellen hatten die Proteaseinhibitoren keinen Einfluß auf die Schlußleistenproteine Occludin und Zonula-Occludens-1. In einem Assay zur LDH-Bestimmung (Markermolekül für Nekrose) fand sich kein Hinweis für nekrotischen Zelluntergang. Dagegen fand eine massive Induktion von Apoptose statt, was sich sowohl im Nucleosomen-ELISA zeigte als auch histologisch bestätigt wurde⁴⁴. Als Konzentrationen der Proteaseinhibitoren waren dabei orientierend die zehnfach bis hundertfache maximale Serumkonzentration eingesetzt worden und die Effekte über bis zu 72 h gemessen worden.

5.2 Spontanapoptoserate

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptoserate nach DNA-Färbung mit Propidiumjodid durchflußzytometrisch bestimmt. Da diese Methode auf der Extraktion niedermolekularer DNA, wie sie bei der Apoptose entsteht⁵⁴, aus permeabilisierten Zellen beruht, ergeben sich zwei wichtige Fehlerquellen⁹⁵: Einerseits kann das Auswaschen der niedermolekularen DNA aus den permeabilisierten Zellen während der verschiedenen Waschschriffe variieren und ist so möglicherweise nicht immer reproduzierbar. Die Abweichungen der Spontanapoptoserate war bei den verschiedenen Experimenten mit HT-29/B6 und LS 174T-Zellen allerdings unerheblich. Andererseits ist die Methode kein spezifischer Apoptosenachweis: In der sub-G1-Zellpopulation werden sich auch mechanisch geschädigte Zellen darstellen, sowie Zellen, die innerhalb einer

Diskussion

Zelllinie mit heterogenem DNA-Gehalt einfach weniger DNA besitzen, und tote Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben. Weiterhin können Zellen, die aus der G2-Phase des Zellzyklus in Apoptose übergehen, möglicherweise nicht detektiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit lag die spontane Apoptoserate der mit Medium oder Lösungsmitteln inkubierten HT-29/B6-Zellen nach 24 Stunden bei 2 - 3 %. Die Spontanapoptoserate war somit niedriger als die von Bojarski et al. nach 48 Stunden mittels DAPI-Färbung in geschlossenen Monolayern gemessene spontane Apoptoserate von $3,5 \pm 0,3$ %⁴³. Durch DAPI-Färbung kann nicht immer adäquat zwischen mitotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden, weil es sich um einen DNA-bindenden Fluoreszenzstoff handelt. Kondensierte DNA, wie sie bei der Mitose vorkommt, kann mit apoptotischen Zellen verwechselt werden. In einer anderen Untersuchung wurde die Apoptoserate in horizontalen Semidünnschnitten von HT-29/B6-Monolayern rein morphologisch quantifiziert. Mit 0,5 % (0 - 3 %) wurde eine geringere Spontanapoptoserate vorgefunden⁴⁴. Die Spontanapoptoserate der LS 174T-Zellen lag in einem ähnlichen Bereich ($4,2 \pm 0,1$ % in den Experimenten mit Nelfinavir und $3,7 \pm 1$ % in den Experimenten mit Saquinavir).

Größere Unterschiede in der Spontanapoptoserate zeigten sich bei T 84- und Caco-2-Zellen. Bei T 84-Zellen waren die Ergebnisse andere Autoren reproduzierbar: Die Spontanapoptose von T 84-Zellen lag in der Nelfinavir-Versuchsreihe bei $9,7 \pm 0,5$ % wie auch bei Brito et al. mit Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung beschrieben⁹⁶. Andererseits lagen sie in der Saquinavir-Versuchsreihe mit $19,5 \pm 2$ % deutlich höher. Die Spontanapoptoserate der Caco-2-Zellen betrug $10,8 \pm 0,7$ %, was sich mit den Beobachtungen anderer Autoren im Annexin-V-/Propidiumjodid-Assay deckt⁹⁷. Sie war nur geringfügig höher bei den Versuchen mit Nelfinavir ($15,8 \pm 2,4$ %). Die unterschiedlichen Werte bei Caco-2- und T 84-Zellen in der vorliegenden Arbeit lassen sich durch folgende Beobachtung erklären: Bei beiden, insbesondere aber bei den T 84-Zellen, fiel auf, dass sie sich mit Trypsin/EDTA-Lösung schlechter vereinzeln ließen als HT-29/B6- und LS174T-Zellen. Bei T84- und Caco-2-Zellen blieben trotz sorgfältiger Beachtung des Protokolls häufiger Aggregate mit über fünf zusammenhängenden Zellen übrig, was zu Problemen während der Durchflußzytometrie führte. Im Extremfall kam es zur Verstopfung der Meßküvette, was durch Spülmanöver beseitigt werden mußte, bevor die Messung fortgesetzt werden konnte.

Insgesamt scheint die quantitative durchflußzytometrische Analyse bei diesen Zelllinien weniger gut geeignet. Weiterhin muß erwähnt werden, dass die Versuche zur Dosisabhängigkeit der

Apoptoseinduktion mit Nelfinavir außer bei den HT 29/B6-Zellen nur mit n=2 durchgeführt wurden, so dass hier die Aussagekraft etwas niedriger ist.

Die Unterschiede der Spontanapoptoseraten könnten aber auch in der Zellkultur selbst begründet sein. Für die Caco-2-Zelllinie, die seit Jahrzehnten in Laboren weltweit als Modell für intestinale Epithelien verwendet wird, konnte von Sambuy et al. gezeigt werden, dass sich durch unterschiedliche Bedingungen teils sehr heterogene Untergruppen bezüglich Differenzierung und Proteinexpression ergeben können⁹⁸. Zwar sind die Experimente in der vorliegenden Arbeit an eng aneinanderfolgenden Passagen durchgeführt worden, Einflüsse sind aber nicht sicher auszuschließen.

Bei starker Zunahme der apoptotischen Zellen demarkieren sich die Grenzen zwischen den Zellzyklusphasen nicht mehr so deutlich, die Messung wird weniger genau. Je stärker die Apoptoseinduktion desto größer war bei den durchgeführten Versuchen auch die Standardabweichung. Bei T84 und Caco-2-Zellen fiel die Proteaseinhibitor-induzierte Apoptoserate bei den hohen eingesetzten Konzentrationen wieder ab. Diese Ergebnisse zeigen am ehesten die Limitierungen der eingesetzten Methode.

Zur qualitativen Überprüfung der Befunde wurde eine TUNEL-Färbung der Zelllinie HT-29-B6 angeschlossen. Hier zeigte sich ebenfalls eine deutliche Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen. Zur quantitativen Auswertung eignete sich dieser Ansatz aber nicht, da die Zellen im Verlauf der Apoptose zunehmend von der Glasoberfläche der Chamber-Slides und aus dem Zellverband ablösten, wie auch bei Desjardins et al. beschrieben⁹⁹. Bei hohen Apoptoseraten hafteten dann nicht ausreichend viele Zellen zur Auswertung am Boden der Chamber-Slides.

Zusammenfassend lag die Spontanapoptoserate der verschiedenen Zelllinien in der vorliegenden Arbeit in dem Bereich, der in der Literatur mit verschiedenen Methoden vorbeschrieben war. Dies zeigt, dass die DNA-Färbung mit Propidiumjodid zur Quantifizierung der Apoptoserate gut geeignet ist, obwohl sie nicht als spezifisch für Apoptose gelten kann.

5.3 Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir in weiteren intestinalen Zelllinien

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob es sich bei der Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt, der auf HT29/B6-Zellen beschränkt ist, oder ob Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir auch in weiteren Zelllinien intestinalen Ursprungs stattfindet.

In einem Konzentrationsbereich von 30-90 μM induzierte Saquinavir Apoptose in HT29/B6-, LS174-T- und Caco-2-Zellen deutlich. Höhere Konzentrationen führten bei LS174-T-Zellen wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate. Bei T84-Zellen induzierte Saquinavir Apoptose im Konzentrationsbereich von 60-90 μM Höhere Konzentrationen führten wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate. Nelfinavir induzierte Apoptose in einem Konzentrationsbereich von 35-140 μM in HT29/ B6-, LS174-T- und Caco-2-Zellen. Höhere Konzentrationen führten bei HT29/B6-Zellen wieder zu einer erniedrigten Apoptoserate.

Apoptoseinduktion zeigte sich auch bei LS 174T, Caco-2 und T84-Zellen. Es handelt sich um einen dosisabhängig auftretenden Prozeß. Der Effekt war dabei bei Caco-2 und HT-29/B6-Zellen ähnlich stark bzw. stärker als bei Inkubation mit Camptothecin, einem etablierten Apoptoseinduktor, der bei HT-29/B6-Zellen Apoptose und einen Verlust der Barrierefunktion auslöst⁴³. In der vorliegenden Arbeit konnte geklärt werden, dass die Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir nicht auf die Zelllinie HT-29/B6 begrenzt ist.

5.4 Unterschiede der Zelllinien

HT-29-Zellen überexprimieren eine mutierte Form des Proteins p53. p53 greift als Transkriptionsfaktor vielfältig in die Regulation von Zellzyklus und Zelltod ein. Es hemmt unter anderem das Fortschreiten im Zellzyklus an Kontrollpunkten, die den Übergang von einer Zellzyklusphase zur nächsten regulieren. Ist p53 nicht mutiert und funktioniert normal, wird es nach DNA-Schädigung in der Zelle angehäuft und stoppt den Zellzyklus, indem es das Protein p21 stimuliert. p21 wirkt als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase (cyclin-dependent kinase, CDK) und reguliert damit den Übergang von G1- zur G2-Phase, und wirkt überwiegend proapoptotisch u.a. durch Induktion von Bax⁵⁰. Mutationen von p53 gehören zu den häufigsten Genmutationen überhaupt, die in Karzinomen zu finden sind, außerdem führt seine Mutation zu unterschiedlichem Ansprechen auf zytostatische Chemotherapeutika und kann unter anderem für eine Resistenz gegen 5-FU mitverantwortlich sein^{100, 101}. Caco-2-Zellen haben eine p53-nonsense Mutation, dagegen exprimieren T84-Zellen ebenso wie LS174T-Zellen Wildtyp-p53, während LS174T-Zellen kein pro-apoptotisches Bax besitzen¹⁰¹. Die Apoptoserate nach Inkubation mit Saquinavir war bei Caco-2 am stärksten, gefolgt von LS174T und T84. Sie war bei HT-29/B6 insgesamt am niedrigsten ausgeprägt (wobei diese jedoch den höchsten Anstieg bezogen auf ihre spontane Apoptoserate zeigten). In den hier vorliegenden Versuchen zeigten sich also kein Zusammenhang zwischen p53-Status und Saquinavir-induzierter Apoptoserate.

Die vier Zelllinien zeigten bei Inkubation mit Nelfinavir ein abweichendes Reaktionsmuster: Caco-2-Zellen erreichten die höchste Apoptoserate, gefolgt von T84-Zellen. LS 174T- und HT-29/B6-Zellen reagierten ungefähr gleich, trotz des unterschiedlichen p53-Status (Mutation bei HT-29/B6-Zellen versus Wildtyp bei LS174T-Zellen), so dass hier ebenfalls ein p53-unabhängiger Mechanismus angenommen werden muss.

Trotzdem Nelfinavir und Saquinavir speziell für die Hemmung der HIV-1-Aspartyl-Protease entworfen wurden, und diese beiden Substanzen sich ultrastrukturell innerhalb der Proteaseinhibitoren am wenigsten unterscheiden¹⁸, kann die Wirkung auf den humanen Zellstoffwechsel durchaus unterschiedlich sind. Es ist bekannt, dass sie die verschiedenen Mitglieder der Cytochrom-P450-3A-Familie in unterschiedlichem Maße inhibieren¹⁰² und dadurch andersartige Wechselwirkungen mit einer Vielzahl weiterer Medikamente haben. Es ist deshalb auch nicht auszuschließen, dass die verschiedenen Mitglieder dieser Substanzklasse auch auf verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle wirken.

Denkbar ist auch, dass intrazelluläre Mechanismen eine Rolle spielen. Die hier untersuchten Proteaseinhibitoren sind Substrate für den Multidrug-transporter MDR1/p-glycoprotein¹⁰³ und können aktiv von Zellen sezerniert werden, was sich in vivo unter anderem in der schlechten Bioverfügbarkeit und schlechten Penetration in bestimmte Gewebe zumindest bei den Proteaseinhibitoren der ersten Generation bemerkbar macht^{104, 105}.

Sie stammen alle von kolorektalen Tumoren ab und weisen Charakteristika intestinaler Mukosazellen auf, wie zum Beispiel gerichteten Ionentransport und Zellverbindungen über Schlußleisten. Der p-53-Status als Onkogen erklärt die hier vorliegenden Ergebnisse nicht. Die apoptoseregulierenden Gene und ihre Mutationen in den untersuchten Zelllinien sind allerdings nicht vollständig charakterisiert. Zusammenfassend bestehen zwischen den einzelnen Zelllinien nur geringfügige Unterschiede.

5.5 Apoptoseinduktion durch physiologische Konzentrationen

Die HIV-Proteaseinhibitoren Nelfinavir und Saquinavir induzieren in HT-29/B6-, LS174-T-, Caco-2- und T84-Zellen Apoptose. In diesen vier epithelialen Zelllinien kolorektalen Ursprungs findet die Apoptoseinduktion zeit- und dosisabhängig statt. Die Apoptoseinduktion begann beim fünf- bis zehnfachen der Konzentrationen im Serum, die bei Einsatz der Proteaseinhibitoren bei der HIV-Infektion erreicht werden. Halbmaximale Effekte zeigten sich bei Saquinavir je nach Zelllinie im Bereich zwischen 30 und 60 μM , bei Nelfinavir im Bereich zwischen 7 und 35 μM .

Nelfinavir war hier also die effektivere Substanz. Der maximal erreichbare Effekt lag für Saquinavir bei 90 μM , für Nelfinavir bei 70 μM .

Mit der gewählten Methode war im Zellkulturmodell Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren also nur bei Konzentrationen nachweisbar, die im Serum HIV-Krankter nicht erreicht werden. Über die in vivo-Gewebekonzentrationen von PIs ist wenig bekannt. Die Gewebeverteilung von Nelfinavir wurde bislang nur in einer Arbeit untersucht¹⁰⁶. ^{14}C -markiertes Nelfinavir wurde hier Ratten in einer Dosis von 50mg/kg verabreicht. Nach 4h wurden die Organe entnommen und samt Inhalt auf das Vorhandensein von Nelfinavir untersucht. Die grösste Menge des verabreichten ^{14}C fand sich im Dickdarm (57,5 %), gefolgt von Dünndarm (16,9 %), Magen (6,8 %) und Leber (5,4 %).

Es ist wahrscheinlich, dass die in vivo-Gewebekonzentrationen von PIs in der intestinalen Mucosa deutlich höher sind als im Blutplasma, da sich nach oraler Aufnahme über das Epithel ein Konzentrationsgradient zum Blutkompartiment bildet. Die in den Experimenten benutzten Konzentrationen waren niedriger als die in vivo-Konzentrationen im Darmlumen, die zu einer auf das Epithel wirkenden Konzentration von 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Saquinavir (782 μM) und 750 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Nelfinavir (1129 μM) führen würden. In der vorliegenden Arbeit waren sehr viel geringere Konzentrationen der Proteaseinhibitoren effektiv. Dies spricht dafür, dass Apoptoseinduktion auch in vivo an der Darmmukosa der Behandelten auftritt.

5.6 Zeitverlauf der Apoptoseinduktion und Einfluss auf den Zellzyklus

Die Apoptoseinduktion in HT29-B6-Zellen war bei Inkubation mit 60 μM Saquinavir nach 18 Stunden nachweisbar ($26,1 \pm 1,3$ %). Bei Inkubation mit 70 μM Nelfinavir trat Apoptose schon nach 6 Stunden auf, zwischen 12 und 24 Stunden erfolgte der größte Anstieg der Apoptoserate ($43,7 \pm 1,7$ %). Nach 24 steigerte sich die Apoptoseinduktion bei beiden Substanzen nicht mehr deutlich.

Neuere Publikationen beschreiben für die Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren auch in Zelllinien aus anderen Ursprungsgeweben ähnliche Ergebnisse. In einem Modell von PC-3-Prostatakarzinomzellen führte 48stündige Inkubation mit 60 μM Saquinavir zu einem etwa 5fachen Anstieg der Apoptoserate (von 10,4 % bei 0 μM auf 55,7 % bei 60 μM Saquinavir), ebenfalls gemessen als sub-G1-Fraktion Propidiumjodid-gefärbter und durchflußzytometrisch analysierter Zellen⁷⁶. Die Autoren berichten außerdem über einen Beginn der Apoptoseinduktion bei 60 μM Saquinavir nach 24 Stunden, während eine kürzere Inkubationsdauer nur bei höheren

Konzentrationen ausreichend war. Bei Zelllinien mit Ursprung aus chronisch-myeloischen-Leukämie-Zellen konnte nach 72stündiger Exposition mit 20 μM Saquinavir ein 2 bis 5facher Anstieg der Apoptoserate beobachtet werden. CD34 \pm -Zellen aus Nabelschnurblut, welche hämatopoetischen Stammzellen entsprechen, reagierten dagegen deutlich weniger.¹⁰⁷

Intestinale Zellen scheinen also empfindlicher auf die Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir zu reagieren. Sie zeigten Apoptoseinduktion schon nach kürzerer Zeit und bei geringeren Konzentrationen. Sie reagieren außerdem stärker als undifferenzierte Blutstammzellen.

Für Nelfinavir bestimmten Yang et al. bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien bei 24stündiger Inkubation mit 20 μM im TUNEL-FACS Apoptoseraten von 20 – 25 %, bei 40 μM 25 – 37 %. Hier zeigte sich ebenfalls eine anteilige Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus bei 48stündiger Inkubation mit 30 μM Nelfinavir¹⁰⁸. In LNCaP-Prostatakarzinomzellen wurde ein Anteil von 20 ± 5 % bzw. 37 ± 6 % (20 μM bzw. 50 μM Nelfinavir über 24 Stunden) apoptotisch¹⁰⁹.

Nelfinavir und Saquinavir verursachen in HT-29/B6- und LS174T-Zellen eine Arretierung in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Für die weitere Aufklärung des Mechanismus muß also nach Proteinen gesucht werden, die an der Regulation der Zellzyklus „check-points“ bzw. „restriction-points“ beteiligt sind und im weiteren Verlauf zur Apoptose führen können.

5.7 Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Nelfinavir und Saquinavir

Für Prostata-Karzinomzellen und NSCLC-Bronchialkarzinomzellen konnte ebenfalls ein G0/G1-Arrest sowie die Induktion von Apoptose gezeigt werden¹⁰⁹. Es zeigte sich auch eine Sensibilisierung für die zytotoxischen Effekte von Docetaxel. Die Effekte waren für Nelfinavir, Saquinavir und RTV nachweisbar, Nelfinavir zeigte aber die niedrigste ED50 (10 μM), so dass die Versuche zur Beeinflussung der Signaltransduktionswege mit Nelfinavir durchgeführt wurden. Als Mechanismus zeigte sich hier eine Verminderung des Akt-gesteuerten Signalweges. Proteaseinhibitor-Behandlung führte zu einer Reduktion der aktiven, phosphorylierten Form von Akt, während die Gesamtmenge von Akt unbeeinflusst blieb. Kontrollproteine, welche den Übergang G1-S kontrollieren, wurden verstärkt exprimiert. Auch in Maus-Xenograft-Modellen kam es zu einer Wachstumshemmung der Tumoren und verstärkter Apoptose in den Tumorgewebe^{108, 109}.

Diskussion

Gupta et al. zeigten für Saquinavir und Nelfinavir in Zelllinien mit verschiedenen Onkogen-Mutationen ebenfalls eine Blockade des Akt-Signalweges in-vitro sowie in Maus-Xenograft Modellen. Außerdem wurden die Zellen und das Xenograft-Gewebe für ionisierende Strahlung sensibilisiert¹¹⁰. Eine Strahlensensibilisierung durch Saquinavir in Prostatakarzinomzellen wurde schon früher gezeigt⁷⁶. Bei Glioblastomzellen liegt eine Reduktion der pAkt-Level vor. Die Angiogenese war hier in einem Matrigel-Assay-Xenograft vermindert¹¹¹. Angiogenese nach VEGF-Expression wird wiederum über den PI3-K(Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt-Signaltransduktionsweg reguliert.

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren (IGF, EGF, Integrine; BCR/ABL, HER-2/neu) stimulieren Zellproliferation und -überleben über Akt. Akt wirkt antiapoptotisch. Über die Hemmung von Bad wird zum Beispiel antiapoptotisches Bcl-Xl aktiv. Auch NFκB-Aktivierung (über die IκB-Kinase) findet bei bestimmten Stimuli statt. Apoptoseinduktion über Akt kann auch bei gehemmter Proteinbiosynthese stattfinden, so dass nicht zwangsläufig Transkriptionsfaktoren involviert sein müssen. Kolorektale Karzinome haben im Vergleich zu normaler Mukosa erhöhte PI3-K-Level und eine Mutation im PI3-K-Gen. EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab werden bereits klinisch beim EGFR+-kolorektalen Karzinom eingesetzt¹¹². Akt-Mutationen sind an Magen-Adenokarzinomen gezeigt worden. PTEN hemmt die Akt-Aktivierung über PI3-K. Mutationen in PTEN sind beim Cowden-Syndrom beschrieben. MTOR-Inhibitoren als antineoplastische Wirkstoffe werden zur Therapie von Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Eine weitere kleine Studie von Timeus et al. konnte zeigen¹⁰⁷, dass durch Saquinavir bei Imatinib-(Gleevec)-resistente CML-Zelllinien wieder sensibilisiert werden konnten. Die IC50 wurde deutlich vermindert durch Zugabe von 5 μM Saquinavir, eine Konzentration, die in vivo erreichbar ist. Die NFκB-Aktivität wurde durch Saquinavir ebenfalls vermindert werden. Das Ziel von Imatinib sind Tyrosinkinase am Wachstumsfaktor-Rezeptor PDGF, welche in Folge der bcr-abl-Fusionsproteinbildung überaktiviert werden. Proteasominhibitoren (Bortezomib), welche wahrscheinlich unter anderem über die NFκB-Inhibition wirken, werden bei der bcr/abl-CML bereits erfolgreich eingesetzt. Bei Melanomzelllinien¹¹³ kam es durch Nelfinavir ebenfalls zu einer verminderten Proliferation, Arrest in G0/G1 und Induktion von Apoptose, im Widerspruch zu den vorher genannten Untersuchungen war hier aber ein Ansteigen des Levels von pAkt zu verzeichnen. Zuletzt konnte für Nelfinavir gezeigt werden, dass es beim Pankreaskarzinom strahlensensibilisierend wirkt und ebenfalls die PI3-K/Akt-Signalkaskade inhibiert^{114, 115}

Mit der verminderten Aktivierung von Akt ließen sich die Apoptoseinduktion und der G1-Arrest gut erklären. Die Akt-Signalkaskade kann auch in kolorektalen Karzinomen überaktiviert sein.

Der Einfluß von Saquinavir und Nelfinavir auf die Akt-Signalkaskade bei kolorektalen Karzinomen sollte weiter untersucht werden.

5.8 Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren in humanem Gewebe

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten kolorektalen Zelllinien besitzen Eigenschaften von Darmmukosa. Es ist aber unklar, ob Ergebnisse, die in Zellkultur-Experimenten gewonnen wurden, auch auf humane Darmepithelien übertragbar sind. Primäre Darmepithelzellen sind kultivierbar, weisen aber eine sehr hohe Spontanapoptose auf, sobald sie aus dem Zellverband entfernt werden. Deshalb wurde auf die Gewebekultur ausgewichen und Explantate humaner kolorektaler Mukosa mit den Proteaseinhibitoren behandelt.

In der Gewebekultur zeigte sich eine Zunahme der PARP-Spaltung in explantierter und mit den Proteaseinhibitoren über 24 Stunden inkubierter kolorektaler Mukosa. Statistisch signifikant war der Effekt allerdings nur bei Saquinavir. Die Spontanapoptoserate der Mukosa war hoch. Dies liegt am ehesten an der ischämischen Schädigung, die schon intraoperativ vor Entfernung des entsprechenden Darmabschnittes eintritt. Möglich ist auch, dass die Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Kontrollen unterschätzt wurde, da sich die apoptotischen Zellen stark aus dem Zellverband lösten. In den zur Kontrolle angefertigten TUNEL-Färbungen der Mukosa war die Ablösung deutlich sichtbar. Das Medium, in dem die Gewebestückchen inkubiert wurden, war für die Proteinanalyse entfernt worden und wurde nicht analysiert.

Obwohl die Spaltung von PARP als ein bedeutender Apoptosemarker angesehen wird, konnte PARP-Spaltung auch in nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Auch hier wird PARP gespalten, es treten aber neben dem 89 kDa-Fragment weitere Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa und in geringerem Maß auch noch Fragmente von ca. 40 und 35 kDa auf¹⁶. Schwache Banden im Western Blot wurden auch hier teilweise beobachtet. Bei der Aufarbeitung der Mukosa war es nicht immer möglich, eine möglichst kurze Zeit zwischen Entnahme des Gewebes und erneuter Inkubation zu gewährleisten. Auch die Lokalisation und durch die Operationstechnik unterschiedliche Ischämiedauer führten sicherlich zu unterschiedlich stark ausgeprägtem, zusätzlichem Hypoxie-bedingtem nekrotischem Zelltod in diesem ex-vivo-Modell. Da die Stücke von beiden Seiten mit Medium umspült waren, kann auch den Anteil apoptotischer Lamina Propria-Zellen nicht sicher abgegrenzt werden.

Inkubation mit Camptothecin induzierte Apoptose im Vergleich zu Saquinavir und Nelfinavir stärker. Auch das Camptothecin-Derivat Irinotecan, was inzwischen als Standardtherapie des

kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird⁵⁹, löst als Nebenwirkung Diarrhö aus, möglicherweise liegt die Ursache auch hier in einer Zunahme der Apoptosen in den Darmepithelien.

Auch in Explantaten kolorektaler Mucosa und kolorektaler Karzinome war Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir nachweisbar. In der Mukosa war die Spontanapoptose höher und die Apoptoseinduktion stärker als in dem Gewebe aus kolorektalen Karzinomen. Camptothecin wirkte allerdings stärker auf die Mukosa als auf die kolorektalen Karzinome. Nelfinavir induzierte am stärksten Apoptose in kolorektalen Karzinomen. Methodenbedingt bestand aber aufgrund der unvermeidbaren Vorschädigung von explantiertem Gewebe eine hohe Spontanapoptoserate.

5.9 Diarrhö unter Proteaseinhibitoren durch epitheliale Apoptose

Rufo et al. fanden in Kulturen von T84-Zellen eine Verstärkung der Cl⁻-Sekretion bei 90minütiger Vorbehandlung mit 30 µM Nelfinavir nach Stimulation durch Carbachol. Dieser Effekt wird durch vermehrte Aufnahme von Calciumionen in die Zellen vermittelt¹¹⁷. Die Autoren weisen dabei darauf hin, dass eine Inkubation mit Nelfinavir allein keinen Einfluß auf die Ionensekretion hatte. Als Mechanismus der Diarrhö unter Proteaseinhibitoren postulieren die Autoren eine sekretorische Diarrhö und bekräftigen dies durch die klinische Beobachtung, dass bei 7 von 8 getesteten Patienten unter Nelfinavirbehandlung eine verminderte osmotische Lücke und eine erhöhte Ionenkonzentration im Stuhl auftraten. In unseren eigenen Vorarbeiten fanden wir keinen Hinweis auf eine gesteigerte Ionensekretion in HT-29/B6-Monolayern³⁸.

In der Zellkultur wurde ein Verlust der Barrierefunktion durch verstärkte Apoptose schon mehrfach beschrieben^{42, 43}. Durch Apoptose kann es zu Leckfluß-Diarrhö durch Verlust von Ionen und Wasser in das intestinale Lumen kommen. (zusammengefasst bei¹¹⁸). Beim M. Crohn konnte gezeigt werden, dass im Colon eine erhöhte mukosale Apoptoserate sowie eine gestörte epitheliale Barrierefunktion besteht, welche durch Therapie mit TNF- α -Antikörpern vermindert wird¹¹⁹. Auch in einem Maus-Modell von akuter Pankreatitis kam es zu einer Zunahme der Apoptoserate in Ileummucosa mit erhöhter Permeabilität des Epithels¹²⁰. Veränderungen der tight-junctions waren dabei nicht nachweisbar. Auch für die Infektion mit dem Parasiten *Blastocystis ratti*, welche mit wäßriger Diarrhö einhergeht, ist in-vitro an IEC-6-Zellen eine Apoptoseinduktion und Verminderung des transepithelialen Widerstandes gezeigt worden¹²¹.

Epitheliale Apoptosen können Diarrhö auslösen. Dies könnte der Mechanismus der bei Behandlung mit Nelfinavir und Saquinavir auftretenden Diarrhö sein.

5.10 Apoptoseinduktion durch Proteaseinhibitoren in kolorektalen Karzinomen

Saquinavir und Nelfinavir induzieren Apoptose in Explantaten humaner kolorektaler Karzinome. In den mit Medium inkubierten Kontrollen lag der Median der PARP-Spaltung bei 18%, also war die Spontanapoptoserate niedriger als in der Mukosa. Bei Saquinavir kam es zu einer nicht-signifikanten Zunahme der PARP-Spaltung auf 37% ($p=0,07$), Inkubation mit Nelfinavir steigerte die PARP-Spaltung dagegen signifikant auf 48%. Das als Positivkontrolle eingesetzte Camptothecin induzierte Apoptose in den Experimenten mit Gewebeexplantaten deutlich stärker als die Proteaseinhibitoren, obwohl Camptothecin in der Zellkultur weniger effektiv als die Proteaseinhibitoren war. In der Zellkultur war die Apoptoserate durch Camptothecin nur 2,4 – 3,4-fach gesteigert worden. In den Experimenten mit kolorektalen Gewebeexplantaten wurde dieselbe Konzentration von Camptothecin wie in der Zellkultur eingesetzt.

Es ist nicht bekannt, warum das Gewebe bei Inkubation mit Camptothecin mit einer stärkeren Apoptoseinduktion reagierte. Möglicherweise liegt dies an der ischämischen Vorschädigung. Unter hypoxischen Bedingungen können Prozesse, die viel Energie benötigen, nicht mehr ablaufen. Dies könnte auch zu einer Störung der DNA-Reparaturvorgänge kommen. Die Reparatur der Doppelstrangbrüche, die durch Camptothecin induziert werden, könnte hier vermindert ablaufen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Zellkulturexperimenten Nelfinavir bzw. Saquinavir auch mit Camptothecin kombiniert. Es wurden Konzentrationen eingesetzt, welche nur geringfügig oder gar nicht Apoptose induzierten. Die Apoptoseinduktion konnte dadurch im Vergleich zu der Inkubation mit den Einzelsubstanzen deutlich gesteigert werden.

Die Proteaseinhibitoren induzieren Apoptose auch in Gewebe aus kolorektalen Karzinomen. Der Effekt war geringer als bei dem Apoptoseinduktor Camptothecin. Da es sich um etablierte, sichere Medikamente handelt, liegt es nahe, diese Substanzen auch zur Therapie kolorektaler Karzinome einzusetzen. In der Zellkultur konnte durch die Kombination der Proteaseinhibitoren in nicht-wirksamen Konzentrationen mit geringen Camptothecinkonzentrationen eine stärkere Apoptoseinduktion erreicht werden. Es wäre sinnvoll, die Proteaseinhibitoren hinsichtlich ihres Einsatzes als zytostatische Chemotherapeutika in Kombination mit etablierten Substanzen zu überprüfen.

5.11 Tumorprotektion durch HAART

In einer Analyse der „International Collaboration on HIV and Cancer“ wurde untersucht, ob sich mit Einführung der HAART auch die Inzidenz von Krebserkrankungen verringert hat²⁶. In dieser Studie flossen Daten von 23 Studien mit insgesamt 47936 HIV-infizierten Patienten ein. Die Daten wurden getrennt für die Jahre vor HAART (1992 - 1996) und nach weit verbreiteter Anwendung von HAART (1997 - 1999) analysiert. 90 % der Karzinome waren dabei Kaposi-Sarkome oder Non-Hodgkin-Lymphome, deren Inzidenzraten in den angegebenen Zeiträumen deutlich sanken. Bei allen anderen Krebsarten (sowohl AIDS-definierende- wie nicht-AIDS-definierende Karzinome [NADC] und gastrointestinale Karzinome waren in die Suche eingeschlossen worden), zeigte sich kein Einfluss auf die Inzidenzrate. Eine andere Studie analysierte die Inzidenz nicht-AIDS-definierender Karzinome im Vergleich zur französischen Allgemeinbevölkerung und ebenfalls aufgeteilt in Zeit vor HAART (hier 1992 – 1995) und mit HAART (hier 1996 – 1999). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den angegebenen Zeiträumen in der Gesamtinzidenz von NADC, insgesamt traten aber bei HIV-infizierten Männern häufiger nicht-AIDS-definierende Karzinome auf als in der französischen Normalbevölkerung¹²².

Der Beobachtungszeitraum ist noch zu kurz, um Rückschlüsse auf eine veränderte Inzidenz kolorektaler Karzinome unter Therapie mit Proteaseinhibitoren zu ziehen. Kolorektale Karzinome entwickeln sich in der Adenom-Karzinom-Sequenz über deutlich längere Zeiträume. Auch sind die tatsächlich verwendeten antiretroviralen Substanzen in den Studien nicht genau aufgeschlüsselt. Gleichzeitig war auch die Anzahl detektierter „anderer“ Karzinome insgesamt sehr gering. Hier müssen Studien mit Langzeitbeobachtungen weitere Ergebnisse bringen.

6 Zusammenfassung

Einführung: Diarrhö ist eine häufige Nebenwirkung bei der Therapie der HIV-Infektion mit Proteaseinhibitoren. Bei Monolayern der Zelllinie HT-29/B6 wird durch Saquinavir und Nelfinavir die epitheliale Barrierefunktion gestört durch Induktion von Apoptose. Diese Arbeit untersucht, ob dieser Effekt zelllinienspezifisch ist, ob er bei physiologischen Konzentrationen und auch in intestinaler Mukosa und Tumorgewebe auftritt.

Methoden: Die intestinalen epithelialen Zelllinien HT-29/B6, T84, LS 174T und Caco-2 wurden mit Saquinavir und Nelfinavir inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen der Proteaseinhibitoren entsprachen der ein- bis hundertfachen Plasmakonzentration nach oraler Aufnahme. An der Mukosa herrschen aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit höhere Konzentrationen. In der Zellkultur wurde Apoptose mittels Durchflusszytometrie nach Propidiumjodidfärbung quantifiziert. Proben von resezierter Kolonmukosa und kolorektalen Karzinomen wurden 24 Stunden mit Nelfinavir und Saquinavir inkubiert und die Apoptoseinduktion über die Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) im Western Blot quantifiziert. Eine TUNEL-Färbung wurde zur qualitativen Bestätigung eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der Topoisomeraseinhibitor Camptothecin, der auch in Kombination mit Proteaseinhibitoren eingesetzt wurde.

Ergebnisse: Alle untersuchten Zelllinien zeigten nach 24stündiger Inkubation mit 30 – 90 μM Saquinavir bzw. 35 – 140 μM Nelfinavir eine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Der Effekt war mit der Apoptoseinduktion durch Camptothecin vergleichbar. Kombination der Proteaseinhibitoren mit Camptothecin verstärkte die Apoptoseinduktion. Apoptose durch Nelfinavir war nach 6-12 Stunden nachweisbar, durch Saquinavir nach 12-18 Stunden. In der Zellzyklusanalyse zeigte sich bei beiden Substanzen eine Zunahme der Zellfraktion in der G0/G1-Phase noch vor Beginn der Apoptoseinduktion. PARP-Spaltung wurde durch Saquinavir und Nelfinavir sowohl in normaler Mukosa als auch in Gewebe aus kolorektalen Karzinomen induziert. Nur Nelfinavir erreichte eine signifikante Steigerung der Apoptoserate in kolorektalem Karzinomgewebe. Histologisch war in Zellkultur und intestinalem Gewebe eine Zunahme apoptotischer Zellen nach Inkubation mit den Proteaseinhibitoren nachweisbar.

Schlußfolgerung: Saquinavir und Nelfinavir induzieren in vitro Apoptose in unterschiedlichen intestinalen Zelllinien, sowie in Gewebeexplantaten aus kolorektaler Mukosa und Karzinomgewebe. Epitheliale Apoptose kann in vivo zu einer gestörten Barrierefunktion mit Leckfluss-Diarrhö führen. Die Apoptoseinduktion durch Saquinavir und Nelfinavir könnte von Nutzen sein für die antineoplastische Therapie kolorektaler Karzinome.

7 Literaturverzeichnis

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-71.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:865-7.
3. UNAIDS/WHO. *Joint United Nations programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO)*. Geneva; 2010.
4. Das erworbene Immunschwächesyndrom. In: Janeway CA, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., ed. *Immunologie*. 5. ed. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002:484-499.
5. Rubbert A. Pathophysiologie der HIV-Infektion. In: Hoffmann C, Rockstroh JS, Kamps BS, eds. *HIV.NET2005*. Wuppertal: Steinhäuser Verlag; 2005:58-79.
6. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52:145-76.
7. Henderson C. HIV Virion. In: Virion-en-2.png H, ed: US National Institute of Health; 2005.
8. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-7.
9. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 1984;225:59-63.

Literatur

10. Janeway CA, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. Die angeborene Immunität. In: Janeway CA, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., ed. *Immunologie*. 5. Auflage ed. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002:75-78.
11. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987;317:185-91.
12. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*. 1989;243:1731-4.
13. Hoffmann C. ART - Substanzklassen, Medikamentenübersicht. In: Christian Hoffmann JKR, ed. *HIV 2010*. Hamburg: Medizin Fokus Verlag; 2010:96-109.
14. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271:1582-6.
15. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4171-5.
16. Darbyshire J. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *The Lancet*. 1996;348:283-291.
17. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:853-60.
18. Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*. 1998;338:1281-92.
19. Eron JJ, Jr. HIV-1 protease inhibitors. *Clin Infect Dis*. 2000;30 Suppl 2:S160-70.

20. Yeni PG, Hammer SM, Carpenter CC et al. Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama*. 2002;288:222-35.
21. Klein R, Langendorf M, Vorderwülbecke U, eds. *ROTE LISTE - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland*; 2011.
22. Owen C, Kazim F, Badley AD. Effect on CD4 T-cell count of replacing protease inhibitors in patients with successful HIV suppression: a meta-analysis. *Aids*. 2004;18:693-5.
23. Phenix BN, Cooper C, Owen C, Badley AD. Modulation of apoptosis by HIV protease inhibitors. *Apoptosis*. 2002;7:295-312.
24. Phenix BN, Angel JB, Mandy F et al. Decreased HIV-associated T cell apoptosis by HIV protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:559-67.
25. Phenix BN, Lum JJ, Nie Z, Sanchez-Dardon J, Badley AD. Antiapoptotic mechanism of HIV protease inhibitors: preventing mitochondrial transmembrane potential loss. *Blood*. 2001;98:1078-85.
26. Appleby P, Beral V, Newton R, Reeves G, Carpenter L. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1823-30.
27. Antinori A, Cingolani A, Alba L et al. Better response to chemotherapy and prolonged survival in AIDS-related lymphomas responding to highly active antiretroviral therapy. *Aids*. 2001;15:1483-91.
28. Hoffmann C, Tabrizian S, Wolf E et al. Survival of AIDS patients with primary central nervous system lymphoma is dramatically improved by HAART-induced immune recovery. *Aids*. 2001;15:2119-27.
29. Sgadari C, Barillari G, Toschi E et al. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. *Nat Med*. 2002;8:225-32.

Literatur

30. Pati S, Pelsler CB, Dufraine J, Bryant JL, Reitz MS, Jr., Weichold FF. Antitumorigenic effects of HIV protease inhibitor ritonavir: inhibition of Kaposi sarcoma. *Blood*. 2002;99:3771-9.
31. Jain RG, Furfine ES, Pedneault L, White AJ, Lenhard JM. Metabolic complications associated with antiretroviral therapy. *Antiviral Res*. 2001;51:151-77.
32. Brinkman K, Kakuda TN. Mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: a looming obstacle for long-term antiretroviral therapy? *Curr Opin Infect Dis*. 2000;13:5-11.
33. Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo M et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet*. 2001;357:592-8.
34. Roche. Produktinformation INVIRASE 200mg Hartkapseln. *FachInfo-Service*: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V.; 2002.
35. Roche. Produktinformation VIRACEPT 50 mg/g Pulver zum Einnehmen. *FachInfo-Service*: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e. V.; 2002.
36. Deeks S. Determinants of virological response to antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2000;30:S177-S184.
37. Bangsberg DR, Hecht FM, Charlebois ED. Adherence to protease inhibitors, HIV-viral load, and development of drug resistance in an indigent population. *AIDS*. 2000;14:357-366.
38. Bode H, Schmidt W, Schulzke JD, Fromm M, Riecken EO, Ullrich R. Effects of HIV protease inhibitors on barrier function in the human intestinal cell line HT-29/B6. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:117-22.
39. Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol*. 1999;276:G1279-88.

40. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 1):137-46.
41. Hudspeth AJ. The recovery of local transepithelial resistance following single-cell lesions. *Exp Cell Res.* 1982;138:331-42.
42. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J.* 2000;14:1749-53.
43. Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K et al. Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol.* 2001;535:541-52.
44. Bode H, Lenzner L, Kraemer OH et al. The HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir, and nelfinavir induce apoptosis and decrease barrier function in human intestinal epithelial cells. *Antivir Ther.* 2005;10:645-55.
45. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-57.
46. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
47. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death
10.1056/NEJMra0901217. *N Engl J Med.* 2009;361:1570-1583.
48. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001;92:57-70.
49. Jones RA, Johnson VL, Hinton RH, Poirier GG, Chow SC, Kass GE. Liver poly(ADP-ribose)polymerase is resistant to cleavage by caspases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:436-41.
50. Vousden KH. p53: death star. *Cell.* 2000;103:691-4.

Literatur

51. Thompson JE, Thompson CB. Putting the Rap on Akt. *J Clin Oncol*. 2004;22:4217-4226.
52. Badley AD, Roumier T, Lum JJ, Kroemer G. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2003;24:298-299.
53. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:821-46.
54. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast rev*. 1992;11:105-119.
55. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96-9.
56. Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7:321-8.
57. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Thieme Pharmakologie und Toxikologie*. 16 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
58. Chu E, Mota AC, Fogarasi MC. Antimetabolites. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
59. Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:905-14.
60. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. *J Clin Oncol*. 1992;10:896-903.
61. Wolmark N, Rockette H, Fisher B et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol*. 1993;11:1879-87.

62. Deutschland ABKi, ed. *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe ed. Saarbrücken; 2002.
63. American Cancer Society I, ed. *Cancer Facts & Figures 2003*; 2003.
64. Ruf G. Tumorzentrum Freiburg - Leitlinie zum kolorektalen Karzinom. Freiburg: Tumorzentrum Freiburg am Universitätsklinikum; 2000.
65. Flieger D, Keller R, Fischbach W. Therapeutische Strategien beim kolorektalen Karzinom. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;128:1902-1907.
66. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial. QUASAR Collaborative Group. *Lancet*. 2000;355:1588-96.
67. Porschen R, Bermann A, Loffler T et al. Fluorouracil plus leucovorin as effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: results of the trial adjCCA-01. *J Clin Oncol*. 2001;19:1787-94.
68. Chau I, Cunningham D. Chemotherapy in colorectal cancer: new options and new challenges. *Br Med Bull*. 2002;64:159-80.
69. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19:4097-106.
70. Pohl A, Zhang W, Ning Y, Manegold PC, Lurje G, Lenz HJ. Targeting metastatic colorectal cancer in 2008: a long way from 5-FU. *Oncology (Williston Park)*. 2008;22:456-62; discussion 462-3, 467-8, 474 passim.
71. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 20 S proteasome shares cleavage sites with HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:801-847.
72. Bogoy M, Gaczynska M, Ploegh HL. Proteasome inhibitors and antigen presentation. *Peptide Science*. 1997;43:269-280.

Literatur

73. Kelleher AD, Booth BL, Jr., Sewell AK et al. Effects of retroviral protease inhibitors on proteasome function and processing of HIV-derived MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:1063-6.
74. Schmidtke G, Holzhutter HG, Bogyo M et al. How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity. *J Biol Chem*. 1999;274:35734-40.
75. Gaedicke S, Firat-Geier E, Constantiniu O et al. Antitumor Effect of the Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitor Ritonavir: Induction of Tumor-Cell Apoptosis Associated with Perturbation of Proteasomal Proteolysis. *Cancer Res*. 2002;62:6901-6908.
76. Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Protease Inhibitor Saquinavir Inhibits Proteasome Function and Causes Apoptosis and Radiosensitization in Non-HIV-associated Human Cancer Cells. *Cancer Res*. 2002;62:5230-5235.
77. Hayslett JP, Gogelein H, Kunzelmann K, Greger R. Characteristics of apical chloride channels in human colon cells (HT29). *Pflugers Arch*. 1987;410:487-94.
78. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol*. 1991;261:C574-82.
79. Fogh J, Trempe, G. *New human tumor cell lines*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1975:115-141.
80. ATCC. Caco-2 Product Information. 2003.
81. ATCC. T84 Product Information. 2003.
82. Dharmsathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol*. 1984;246:G204-8.
83. Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*. 1976;12:180-91.

84. ATCC. LS174T Product Information. 2003.
85. Schneider T, Zippel T, Schmidt W et al. Increased immunoglobulin G production by short term cultured duodenal biopsy samples from HIV infected patients. *Gut*. 1998;42:357-361.
86. Shimizu T, Pommier Y. Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia*. 1997;11:1238-44.
87. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1985;260:14873-8.
88. Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet*. 2003;361:2235-42.
89. Cunningham D, Pyrhonen S, James RD et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 1998;352:1413-8.
90. Carter NP, Ormerod, M.G. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod MG, ed. *Flow Cytometry*. third edition ed. Oxford: Oxford University Press; 2000:1-22.
91. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139:271-9.
92. Ormerod MG. Analysis of DNA - general methods. In: Ormerod MG, ed. *Flow Cytometry*. third edition ed. Oxford: Oxford University Press; 2000:83-96.
93. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1993;53:3976-85.

Literatur

94. Bode H, Schmidt W, Schulzke JD et al. The HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir, and nelfinavir but not indinavir impair the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *Aids*. 1999;13:2595-7.
95. Darzynkiewicz Z. Methods in analysis of apoptosis and cell necrosis. In: Laboratories PUC, ed. *Purdue Cytometry CD-ROM Series, Volume 3*.
96. Brito GAC, Fujji J, Carneiro-Filho BA, Lima AAM, Obrig T, Guerrant RL. Mechanisms of Clostridium difficile Toxin A-Induced Apoptosis in T84 Cells. *JID*. 2002;186:1438-47.
97. Giovaninni C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. Induction of apoptosis in Caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicol*. 2000;145:63-71.
98. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. 2004;21:1-26.
99. Desjardins LM, MacManus JP. An adherent cell model to study different stages of apoptosis. *Exp Cell Res*. 1995;216:380-7.
100. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y. Disruption of p53 in human cancer cells alters responses to chemotherapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999;104:263-269.
101. Violette S, Poulain L, Dussaix E et al. Resistance of colon cancer cells to long-term-5-fluoruracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53. *Int J Cancer*. 2002;98:498-504.
102. Granfors MT, Wang J, Kajosaari LI, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT. Differential Inhibition of Cytochrome P450 3A4, 3A5 and 3A7 by Five Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease Inhibitors *in vitro*. *Pharmacology & Toxicology*. 2005;98:79-85.

103. Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO et al. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*. 1998;37:3594-601.
104. Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G, Lacarelle B. Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:238-43.
105. Kim RB, Fromm MF, Wandel C et al. The Drug Transporter P-glycoprotein Limits Oral Absorption and Brain Entry of HIV-1 protease Inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;101:289-294.
106. Shetty BV, Kosa MB, Khalil DA, Webber S. Preclinical pharmacokinetics and distribution to tissue of AG1343, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:110-4.
107. Timeus F, Crescenzo N, Ricotti E et al. The effects of saquinavir on imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cell lines. *the hematology journal*. 2006;91:711-712.
108. Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C et al. NFV, an HIV-1 protease inhibitor, induces growth arrest, reduced Akt signalling, apoptosis and docetaxel sensitisation in NSCLC cell lines. *Br J Cancer*. 2006;95:1653-1662.
109. Yang Y, Ikezoe T, Takeuchi T et al. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human prostate cancer LNCaP cells in vitro and in vivo in conjunction with blockade of androgen receptor STAT3 and AKT signaling. *Cancer Science*. 2005;96:425-433.
110. Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, McKenna WG, Muschel RJ. HIV Protease Inhibitors Block Akt Signaling and Radiosensitize Tumor Cells Both In vitro and In vivo. *Cancer Res*. 2005;65:8256-8265.
111. Pore N, Gupta AK, Cerniglia GJ, Maity A. HIV Protease Inhibitors Decrease VEGF/HIF-1 α Expression and Angiogenesis in Glioblastoma Cells. *Neoplasia*. 2006;8:889-895.

Literatur

112. Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5:1621-33.
113. Jiang W, Mikochik PJ, Ra JH et al. HIV Protease Inhibitor Nelfinavir Inhibits Growth of Human Melanoma Cells by Induction of Cell Cycle Arrest. *Cancer Res*. 2007;67:1221-1227.
114. Bruning A, Gingelmaier A, Friese K, Mylonas I. New prospects for nelfinavir in non-HIV-related diseases. *Curr Mol Pharmacol*;3:91-7.
115. Brunner TB, Geiger M, Grabenbauer GG et al. Phase I trial of the human immunodeficiency virus protease inhibitor nelfinavir and chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:2699-706.
116. Shah GM, Shah RG, Poirier GG. Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229:838-44.
117. Rufo PA, Lin PW, Andrade A et al. Diarrhea-associated HIV-1 APIs potentiate muscarinic activation of Cl⁻ secretion by T84 cells via prolongation of cytosolic Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C998-C1008.
118. Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:288-99.
119. Zeissig S, Bojarski C, Buergel N. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumor necrosis factor α antibody treatment. *Gut*. 2004;53:1295-1302.
120. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T et al. Breakdown of Intestinal Mucosa Via Accelerated Apoptosis Increases Intestinal Permeability in Experimental Severe Acute Pancreatitis. *Journal of Surgical Research*. 2006;135:18-26.

Literatur

121. Puthia MK, Sio SWS, Lu J, Tan KSW. Blastocystis ratti Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infect. Immun.* 2006;74:4114-4123.

122. Herida M, Mary-Krause M, Kaphan R et al. Incidence of non-AIDS-defining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Oncol.* 2003;21:3447-53.

8 Liste der verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Einsatzbereich
RPMI1640-Medium	Gibco	Kulturmedium HT-29/B6
DMEM with Glutamax-I	Gibco	Kulturmedium Caco-2, LS 174T
DMEM:F12 1:1	Cambrex BioScienc, East Rutherford, USA	Kulturmedium T84
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin	Zellkultur
Fetal Calf Serum	Biochrom, Berlin	Zellkultur
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% in PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin	Zellkultur
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	Zellkultur
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen	Einfriermedium, Lösemittel für Nelfinavir & Camptothecin
Function Line-Inkubator	Heraeus, Hanau	Zellkultur
Nuaire Class II-Sterilbank	Nuaire, Plymouth, USA	Zellkultur
Zellkultur-Flaschen 50ml	Nunc, Langselbold	Zellkultur
Zellkultur-Testplatten (12-Loch-Format, 3,66 cm ² Wachstumsfläche)	Biochrom, Berlin (TRP)	Zellkultur
Zellkultur-Testplatten (6-Loch-Format, 9,03 cm ² Wachstumsfläche)	Biochrom, Berlin (TRP)	Zellkultur
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen	Durchflußzytometrie
RNase A (10µg/ml)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Mannheim	Durchflußzytometrie
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen	Durchflußzytometrie
FACS-Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflußzytometrie
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflußzytometrie
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflußzytometrie
Macintosh Quadra 650	Macintosh	Durchflußzytometrie
Cellquest	Becton Dickinson, Heidelberg	Durchflußzytometrie
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml Safe Lock	Eppendorf, Hamburg	Durchflußzytometrie

Liste der verwendeten Materialien

Adapter für 1,5 ml Safe Lock Mikrozentrifugenröhrchen	Deutsches Rheuma Forschungszentrum	AG Prof. Dr. med Dr. rer. nat. Schneider
Zentrifugenröhrchen 15ml	Nunc, Langselbold	Zellkultur
Camptothecin	Sigma, Taufkirchen	Apoptoseinduktion
Econo Glass Vials 20 ml	PerkinElmer, USA	Fixierung von Präparaten für Histochemie
Formalin 10% neutral gepuffert	Sigma, Taufkirchen	Fixierung von Präparaten für Histochemie
FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit	Oncogene-Calbiochem- Novabiochem, Soden/Schwalbach (Merck)	Bad TUNEL
Tris Buffered Saline pH 7	Sigma, Taufkirchen	TUNEL (Waschpuffer)
10mM Tris pH8	Sigma, Taufkirchen	TUNEL (Verdünnung Proteinase K)
H ₂ O ₂ in Methanol	Merck, Darmstadt	TUNEL
Xylol	Merck, Darmstadt	TUNEL
Corbit-Balsam	Merck, Darmstadt	TUNEL
HT29/B6, Caco2, T84	Prof. Dr. med. J.-D. Schulzke	
LS174T	Prof. Dr. rer. nat. Christoph Hanski	
Amphotericin B	Merck, Darmstadt	Resektate
HEPES	Sigma, Taufkirchen	Resektate
Gentamycin	Merck, Taufkirchen	Resektate
Cytoperm-Inkubator	Heraeus, Hanau	Resektate
Drahtnetz V ₂ A 0,3 mm	Kaldenbach, Berlin	Resektate
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	Bio-Rad, Berkeley	Western Blot
20% SDS (Sodiumdodecylphosphat)	Serva, Heidelberg	Western Blot
10% APS	Roth, Karlsruhe	Western Blot
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe	Western Blot
Tween 20	Roth, Karlsruhe; Sigma, Taufkirchen	Western Blot

9 Lebenslauf Luzie Lenzner

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

10 Erklärung

„Ich, Luzie Lenzner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Apoptoseinduktion in kolorektalen Zellen und Gewebe durch die HIV-Proteaseinhibitoren Saquinavir und Nelfinavir“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

11 Publikationsliste

Publikationen:

Bode H, Lenzner L et al: The HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir, and nelfinavir induce apoptosis and decrease barrier function in human intestinal epithelial cells; *Antivir Ther.* 2005;10(5):645-55.

Posterpräsentationen:

DGVS Jahresversammlung 09/2004, Leipzig, Deutschland

HIV 2005, 05/2005, Wien, Österreich

ICMI 2007, 06/2007, Tokyo, Japan

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Martin Zeitz für die Überlassung des Themas und die professionelle Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Professor Christoph Hanski und Professor Jörg-Dieter Schulzke und den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppen, die mir die Zelllinien gaben und technische Unterstützung boten. Bei Prof. H.-J. Buhr, PD. Dr. A.-J. Kroesen und anderen Mitarbeitern der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie (CBF) sowie PD Dr. C. Loddenkemper und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (CBF) möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung von Gewebeprobe danken.

Meinem Betreuer Dr. Reiner Ullrich danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz und die vielfältigen Impulse, mit denen er die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat. Bei PD Dr. Severin Daum möchte ich mich für die geduldige Diskussion, mit der er mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet hat, bedanken.

Bei der technischen Durchführung waren mir in der AG Ullrich Dr. Hagen Bode und wechselnde technische Mitarbeiter behilflich. Mein besonderer Dank gilt hier Ulrike Dethlefs, Sylvia Münchow und Uschi Schreiber.

Ich danke allen meinen Freunden, insbesondere Pinar Akman, David Hernández García und Daniela Tominski, und meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.