

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. W. Sterry
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Dr. C. C. Geilen

EINFLUSS DER BCL-2-EXPRESSION AUF DIE WIRKUNG
DES ZYTOSTATIKUMS HEXADECYLPHOSPHOCHOLIN
IN HaCaT-KERATINOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Otto Ziehaus
aus
Neustadt an der Donau

Referent: Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen

Koreferent: Prof. Dr. med. C. C. Zouboulis

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 26.06.2007

„Aude Sapere“

Inhaltsangabe

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
1.1. Regulation der Apoptose	1
1.1.1. Definition von Apoptose und Nekrose	1
1.1.2. Molekulare Mechanismen der Apoptose	4
1.1.2.1. Caspasen: Exekution der Apoptose	7
1.1.2.2. Fas-Rezeptor und der extrinsische Apoptoseweg	9
1.1.2.3. Mitochondrialer Apoptoseweg und Bcl-2-Proteinfamilie	12
1.1.2.4. Die Rolle von Ceramid in der Regulation der Apoptose	18
1.1.3. Bedeutung der Apoptose unter klinischen Aspekten	22
1.2. Phosphatidylcholinbiosynthese	24
1.3. Das Etherlipid Hexadecylphosphocholin	30
1.3.1. Struktur der Alkylphosphocholine	30
1.3.2. Klinische Anwendungen	33
1.3.3. Biologische Effekte	36
1.3.4. Wirkmechanismen von HePC	38
1.4. Synthetische Sphingolipidanaloga	43
1.5. Fragestellung	45
2. Material und Methoden	46
2.1. Material	46
2.1.1. Geräte	46
2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	47
2.1.3. Antikörper	48
2.1.4. Zellkulturmaterialien	49
2.1.5. Zelllinien	49

Inhaltsangabe

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
2.2. Methoden	50
2.2.1. Zellkultur	50
2.2.1.1. Zellkulturmedien	50
2.2.1.2. Kultivierung der Zellen	53
2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen	54
2.2.2. Messung der Zytotoxizität	55
2.2.3. Proliferationsmessung	56
2.2.4. Apoptosebestimmung	58
2.2.4.1. Messung der DNA-Fragmentierung mittels Apoptose-ELISA	58
2.2.4.2. Detektion der Kernmorphologie mittels Bisbenzimid-Färbung	59
2.2.4.3. Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung	60
2.2.5. Proteinanalyse	62
2.2.5.1. Zellpräparation	62
2.2.5.1.1. Zellfraktionierung	62
2.2.5.1.2. Gesamtproteinextraktion	64
2.2.5.1.3. Proteinextraktion für Caspase-8-Spaltung	65
2.2.5.1.4. Proteinextraktion für Caspase-3	66
2.2.5.2. Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure	66
2.2.5.3. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	68
2.2.5.4. Western-Blot	71
2.2.5.5. Immunodetektion der Proteine	72
2.2.6. Zellzyklusanalyse	74
2.2.6.1. Methodenprinzip	74
2.2.6.2. Vorbereitung der Proben	75
2.2.6.3. Messung des DNA-Gehaltes	76
2.2.7. Caspase-3-Aktivitäts-Assay	76
2.2.8. Lichtmikroskopie	77
2.2.9. Statistik	78

Inhaltsangabe

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
3. Ergebnisse	80
3.1. Zytotoxizität von HePC	80
3.2. Bcl-2-Überexpression hemmt die Proliferation von HaCaT-Keratinocyten	82
3.3. HePC hemmt die Proliferation von HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten	83
3.4. Bcl-2-Expression alteriert die Zellzyklusprogression von HaCaT-Keratinocyten und HePC induziert Zellzyklusstop	84
3.5. HePC induziert DNA-Fragmentierung in Bcl-2-transfizierten HaCaT-Keratinocyten	85
3.6. Quantifizierung der HePC-induzierten Apoptose in HaCaT-Keratinocyten mittels Bisbenzimid-Färbung und Morphologie des Zelltodes	88
3.7. Quantifizierung der HePC-induzierten Apoptose in HaCaT-Keratinocyten mittels Annexin V-Färbung	92
3.8. HePC induziert DNA-Fragmentierung in A375/Bcl-2- und und Mel-HO/Bcl-2-Zellen	97
3.9. Überprüfung der Bcl-2- und p53-Expression in HaCaT- und Melanom-Zellen	99
3.10. Intrazelluläre Signaltransduktion von HePC in HaCaT-Zellen	100
3.10.1. Die Bcl-2-Expression der HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten wird durch HePC nicht beeinträchtigt	100
3.10.2. HePC induziert Cytochrom C-Freisetzung in HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES	101
3.10.3. HePC verursacht Caspase-3-Spaltung und Caspase-3-Aktivierung.	102
3.10.4. HePC-induzierte DNA-Fragmentierung wird durch z-VAD-fmk und Caspase-3-Inhibitor komplett verhindert	105
3.10.5. Caspase-8-Inhibitor blockierte nur in HaCaT/pIRES die HePC-induzierte DNA-Fragmentierung	107
3.10.6. HePC induziert keine Caspase-8-Spaltung sowie keine initiale Bid-Spaltung	109
3.10.7 Fumonisin-B1 reduziert teilweise die DNA-Fragmentierung	111

Inhaltsangabe

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
3.11. Sphingomyelin-Analoga induzieren DNA-Fragmentierung in HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES	112
3.11.1. Zytotoxizität von AD2646, AD 2673, AD2665 und AD2687	112
3.11.2. DNA-Fragmentierung	114
4. Diskussion	118
4.1. HePC induziert DNA-Fragmentierung in HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten	118
4.2. HePC aktiviert den mitochondrialen Apoptoseweg	123
4.3. Sphingomyelin-Analoga induzieren DNA-Fragmentierung in HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten	134
5. Zusammenfassung	136
6. Literaturverzeichnis	138
7. Veröffentlichungen	164
8. Abkürzungen	165

Curriculum vitae

Danksagung

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt des Alkylphosphocholins HePC in HaCaT-Keratiozyten, der unabhängig von der Wirkung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 ausgelöst werden konnte. Der Effekt besteht aus den drei Komponenten Zellzyklusalteration, Apoptose und Nekrose, wobei die Zellzyklusveränderungen als untergeordnet zu betrachten sind und der eingeleitete Zelltod als rapide und massiv bezeichnet werden kann. Der Phänotyp ist als Nekrapoptosis einzustufen.

Der zentrale Angriffspunkt der Substanz ist das Mitochondrium, da trotz einer Bcl-2-Überexpression die Cytochrom C-Freisetzung nachgewiesen werden konnte. Nachfolgend wird die intrinsische Apoptosekaskade aktiviert und die Effektor-Caspase-3 verursacht das typische Apoptosekriterium der DNA-Fragmentierung. Gleichzeitig treten nekrotische Kriterien auf, die nicht primär lytischer Natur, sondern dem spezifischen Wirkmechanismus von HePC zuzuschreiben sind. Nach Inhibition mit einem Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor und Caspase-3-Inhibitor wird die DNA-Fragmentierung supprimiert, der Zelltod aber nicht verhindert; er trägt nun deutliche Zeichen der Nekrose. Die Induktion der *mitochondrial permeability transition* als Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung wäre im Stande, die intermediäre Morphologie des Zelltodes zu erklären.

Anknüpfend an die Hypothese von Wieder, wonach Ceramid die apoptotische Wirkung von HePC mediiert, sind diese neu erzielten Ergebnisse, d.h. die Überwindung der antiapoptotischen Funktion von Bcl-2, nicht miteinander vereinbar. Im Gegensatz zur parentalen HaCaT-Linie, die nach Reduktion des Ceramid-Pools nicht mehr auf HePC reagierten, verminderte dies in unserem Transfektionssystem die DNA-Fragmentierungswerte nur geringfügig. Es müssen daher weitere Mechanismen in Betracht gezogen werden. Die Aktivierung des CD95/Fas-Systemes ist unter bestimmten Bedingungen ein Ansatzpunkt. Es konnte die Blockade der extrinsischen Apoptosekaskade, die DNA-Fragmentierung in HaCaT/pIRES suffizient reduzieren. Hingegen verminderten sie sich in HaCaT/Bcl-2-Zellen nur unwesentlich.

Weitere Mechanismen sind denkbar. Zum Einen der Abfall des PC-Pools, was möglicherweise allein ausreichend ist, um den Zelltod zu induzieren, da nach dessen Substitution mit Lyso-PC die Apoptose in einigen Studien verhindert werden konnte und zum Anderen spielen vielleicht physikochemische Interaktionen der Alkylphosphocholine mit Membranlipiden und/oder Membranproteinen ebenfalls eine Rolle.

Die Sphingolipidanaloga induzierten in transfizierten HaCaT-Keratiozyten einen Zelltod, der, ebenso wie bei HePC, Bcl-2-unabhängig ist und sich in Kinetik, Dynamik und Morphologie analog

5. Zusammenfassung

zu HePC verhält. Die DNA-Fragmentierung ist abhängig von einer Aktivierung der Caspasen. Als Zielenzym wird die saure Ceramidase angesehen, daher ist der Schluß naheliegend, dass unabhängig vom Ort der Ceramid-Generierung in diesem System die protektive Funktion der Bcl-2-Proteine überwunden wird. Jedoch sollten die strukturellen Ähnlichkeiten beider Substanzklassen bedacht werden, sodass man auch für die Wirkung der Sphingolipid-Analoga weitere zelluläre Angriffspunkte vermuten sollte. Es ergeben sich vielfältige Ansätze für neue Experimente.

Weiterhin konnte festgehalten werden, dass die stabile Transfektion von Bcl-2 mehrere unerwartet phänotypische Veränderungen auslöste, die zu einer erschwerten Interpretation der Daten beitrug. So ist die Proliferation der HaCaT/Bcl-2-Zellen im Vergleich zu den HaCaT/pIRES-Zellen deutlich reduziert, ihre Zellzyklus ist verlangsamt und die p53-Expression ist erhöht.

In zukünftigen Untersuchungen über Alkylphosphocholine könnte abgeklärt werden, ob HePC den mitochondrialen Ceramid-Pool erhöht und den PC-Pool erniedrigt oder die Substanz möglicherweise direkt auf das Mitochondrium und dessen Proteine einwirkt. Die Bestimmung der CD95/Fas-Expression ist ein weiterer Ansatz, um die Angriffspunkte von HePC besser beurteilen zu können. Ausserdem wären Daten zum Redox-Status der HaCaT-Zellen nach Behandlung mit HePC sowie der Einsatz spezifischer *adenine nucleotide translocator*-Inhibitoren hilfreich, die Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine weiter zu erhellen.

Die präzise Ermittlung der Zelltodform könnte des jeweiligen Systems könnte ebenfalls neue Hinweise für weiter Untersuchungen liefern.

8. Abkürzungen

8. Abkürzungen

A375	Melanomzelllinie von Primärtumor
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome
ALP	Alkyllysophosphocholin
ANT	Adenine nucleotide translocator
Ap-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptosis activating factor 1
APC	Alkylphosphocholin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aSMase	Saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
B13	Ceramidase-Inhibitor
BJAB-Zellen	humane B-Lymphom-Zelllinie
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BH	Bcl-2-homologe Domäne
Bro	Melanomzelllinie von Primärtumor
BSA	Bovines Serumalbumin
C3I	Caspase-3-Inhibitor, reversibel
C8I	Caspase-8-Inhibitor, reversibel
C9I	Caspase-9-Inhibitor, reversibel
CAD	Caspase activated Dnase
CAM	Cell adhesion molecules
CAPP	Ceramide-activated protein phosphatases
CARD	Caspase-recruitment domain
Caspasen	Cytosolic asparte-specific cysteine protease
CD95L/R	Cluster of differentiation 95 ligand/receptor
Cdc	Cyclin-dependent kinase
CDP	Cytidindiphosphat
Ced-3	Cell death abnormal mutations in <i>C. elegans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CEPT	Cholin/Ethanolaminphosphotransferase
CES-1	Cell death specification 1 in <i>C. elegans</i>

8. Abkürzungen

C-FLIP _{s,1}	cellular-FLICE-like inhibitory protein _{short, long}
CH11	Fas-Agonist-Antikörper
CK	Cholinkinase
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CPT	Cholinphosphotransferase
CT	Cytidyltransferase
DAG	Diacylglycerin
DAPI	Diaminophenylindol
DD	Death domain
DED	Death effector domain
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DR	Death receptor
DRM	Detergent resistant membrane
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGL-1	Egg laying defective mutations in <i>C. elegans</i>
EK	Ethanolaminkinase
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
Elk-1	Ets-like protein-1
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular regulated kinase
ErPC	Erucylphosphocholin
Et-18-OCH ₃	1-Octadecyl-2-methyl-glycero-3-phosphocholin
FACS	Durchflusszytometer
FADD	Fas-associated death domain
FAN	Factor associated with N-SMase activation
FB1	Fumonisin-B1
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor

8. Abkürzungen

FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC-H	Foreward light scatter
G-CSF	Granulocyte-colony stimulin factor
GCV	Ganciclovir, entspricht TK
GD	Gangliosid
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSH	Glutathion
HaCaT	Keratinocyten-Zelllinie, Mutationen durch hohes Ca und hoher Temperatur
HEGF	Human epidermal growth factor
HePC	Hexadecylphosphocholin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HepG2-Zellen	Humane Leberkarzinom-Zelllinie
HIV	Human immunodeficiency virus
HL-60	humane promyelozytische Leukämie-Zelllinie
HLA-DR	Human leukocyte antigen
IAP	Inhibitors of apoptosis
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % Hemmung vorliegt
ICAD	Inhibitor of caspase activated Dnase
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
IGF	Interstitial growth factor
IL-1 β	Interleukin-1 β
INF- α	Interferon- α
JNK	c-Jun N-terminal kinases
Jurkat T-Zellen	Leukämiezelllinie
K-562	Leukämiezelllinie
KBM	Keratincyte basal medium
KBr	HePC-resistente ,epidermoidale Zelllinie
kD	Kilo-Dalton
KGM	Keratinocyte growth medium
Km	Bindungsgleichgewicht
KSR	Kinase supressor of Ras
L929	Fibroblastenzelllinie
LDH	Lactatdehydrogenase
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase

8. Abkürzungen

MCF7-Zellen	Humane Brustkarzinom-Zelllinie
MDa	Mega-Dalton
MDA-MB435	Humane Mammakarzinom-Zelllinie
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney-Zelllinie
Mel-HO	Melanomzelllinie von Primärtumor
MPT	Mitochondrial permeability transition
Molt-4	Humane Leukämie-Zelllinie
mRNA	Messenger RNA
MT58	Zelllinie mit temperatursensitiver CT
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NIH-3T3-Zellen	Murine, embryonale Fibroblasten-Zelllinie
nSMase	Neutrale SMase
P53BP-2	P53 binding protein 2
PAF	Platelet activating factor
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PC3-Zellen	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie
PC12-Zellen	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie
PC	Phosphatidylcholine
PCD	Programmed cell death
PCho	Phosphocholin
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PJ	Propidiumjodid
PKA	Proteinkinase A
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PTP	Permeability transition pore
RNA	Ribonucleic acid

8. Abkürzungen

RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Grundmedium
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-activated protein kinase
SCT	SDS/Na-Cholat/Triton
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
SM1/23	Blockierender Anti-Fas-Antikörper
Smase	Sphingomyelinase
Smac/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein
Sp1	Sterol response binding protein 1
SSC-H	Side light scatter
SV40	Immortalisierte Hepatozyten-Zelllinie
tBid	Truncated Bid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyceride
TGF- β	Tumor growth factor β
TK	Thymidin-Kinase, entspricht GCV
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TPO	Thrombopoietin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRA-1A	Transkriptionsfaktor-1A
TRADD	TNF- α receptor associated death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U 937	Monozytenzelllinie
Upm	Units per minute
UV	ultraviolet
VDAC	Voltage-dependent anion channel
V-FLIP	Viral-FLICE-like inhibitory protein
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZB4	Inhibierender Fas-Antikörper

8. Abkürzungen

ZNS	Zentrales Nervensystem
Z-VAD-FMK	Irreversibel blockierender Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor

Curriculum Vitae

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Haut- und Poliklinik des Campus Benjamin Franklin der Charité, Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. C. Geilen in der Arbeitsgruppe Apoptose und Signaltransduktion.

Herrn Professor Geilen möchte ich besonders für die stets freundliche, hilfsbereite und flexible Betreuung der Arbeit danken. Ohne Ihre Anregung und Diskussionsbereitschaft wäre die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Ausserdem möchte ich mich bei Ihnen für die finanzielle Unterstützung zur Sicherung meines Lebensunterhaltes bedanken.

Allen Mitarbeitern aus der AG Apoptose, insbesondere Dr. Carola Müller und Dr. Steffen Barz, die mir die Methoden der Lipidbiochemie und Molekularbiologie beibrachten und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, gilt mein Dank, sowie allen weiteren Mitarbeitern der Haut- und Poliklinik und des Tibor-Diamantstein-Hauses, die immer hilfsbereit waren.

Meiner Frau Marina, die immer wieder unter den Launen der Zellkultur zu leiden hatte, aber immer mit Liebe und Diskussion den Prozess der Arbeitserstellung von Anfang an begleitete, möchte ich von ganzem Herzen danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihr geduldiges Vertrauen in mich herzlich danken. Ohne Euch wäre weder mein Studium noch die Promotion möglich gewesen.

Erklärung

„Ich, Otto Ziehaus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einfluß der Bcl-2-Expression auf die Wirkung des Zytostatikums Hexadecylphosphocholin in HaCaT-Keratinocyten 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.“

Berlin, den 02.11.2006

Otto Ziehaus