Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. med. W. Jelkmann

Einfluss von granulozytärer Differenzierung und Stimulation der Proteinkinase C auf Wärme-induzierte Apoptose in der Leukämiezelllinie PLB-985

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck - Aus der Medizinischen Fakultät -

> vorgelegt von Martina Schad aus Münster

Lübeck 2010

1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. Dörthe M. Katschinski
2. Berichterstatter/Berichterstatterin:	PD. Dr. med. Morten Schütt
Tag der mündlichen Prüfung:	03.11.2010
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	03.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1 Apoptose – Bedeutung und Regulation	6
1.1.1 Bedeutung der Apoptose im menschlichen Organismus	6
1.1.2 Physiologische Regulation der Apoptose	6
a) Extrinsischer Weg der Apoptoseauslösung	6
b) Intrinsischer Weg der Apoptoseauslösung	
c) Gemeinsame Endstrecke der Apoptose	
1.1.3 Caspasen als Schaltstellen der Apoptose	9
1.1.4 Die Proteinkinase C innerhalb der Sigaltransduktion	11
1.2 Exogene Beeinflussung der Apoptose	13
1.2.1 Hyperthermie und Auslösung von Apoptose	
1.2.2 Zelluläre Differenzierung und ihre Bedeutung für Apoptose	15
1.3 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit	
	20
2. WIATERIAL UND MIETHODEN	
2. MATERIAL UND METHODEN	
 2. MATERIAL UND METHODEN 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung 2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay 	
 2. MATERIAL UND METHODEN	
 2. MATERIAL UND METHODEN 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung 2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay 2.3 Wärmebehandlung 2.4 Differenzierung in granulozytäre Richtung 	20 20 20 20 21 21
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 20 21 21 21 21
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 21 21 21 21 21 22
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22
 2. MATERIAL UND METHODEN 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung 2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay 2.3 Wärmebehandlung 2.4 Differenzierung in granulozytäre Richtung 2.4.1 Differenzierung mit N,N-Dimethylformamid (DMF) 2.4.2 Bestimmung der "oxidative burst"-Aktivität 2.5 Proteinkinase C – Modulation und Nachweis 2.5.1 Stimulation der Proteinkinase C 2.5.2 Nachweis von Proteinkinase C im Westernblot 	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 23
 2. MATERIAL UND METHODEN 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung. 2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay 2.3 Wärmebehandlung. 2.4 Differenzierung in granulozytäre Richtung 2.4.1 Differenzierung mit N,N-Dimethylformamid (DMF) 2.4.2 Bestimmung der "oxidative burst"-Aktivität 2.5 Proteinkinase C – Modulation und Nachweis 2.5.1 Stimulation der Proteinkinase C 2.5.2 Nachweis von Proteinkinase C im Westernblot 2.5.2.1 Zellfraktionierung 	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 23 23
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 23 23 23
 2. MATERIAL UND WETHODEN 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung. 2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay 2.3 Wärmebehandlung 2.4 Differenzierung in granulozytäre Richtung 2.4.1 Differenzierung mit N,N-Dimethylformamid (DMF) 2.4.2 Bestimmung der "oxidative burst"-Aktivität 2.5 Proteinkinase C – Modulation und Nachweis 2.5.1 Stimulation der Proteinkinase C 2.5.2 Nachweis von Proteinkinase C im Westernblot 2.5.2.1 Zellfraktionierung 2.5.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford 2.5.2.3 Westernblotanalyse 	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 23 23 23 23 23 23 24
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 23 23 23 23 24 25
 2.1 Zelllinie / Zellkultivierung	20 20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 22 23 23 23 23 24 25

2.6.2 Caspase 3-Assay	26
2.6.2.1 Proteinextraktion	26
2.6.2.1 Bestimmung der Caspase 3-Aktivität	26
2.6.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Hoechst-Färbung	27
2.7 Statistik	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1 Einfluss von Differenzierung auf Zellwachstum und Apoptose	29
3.1.1 Differenzierung mit DMF reduziert die Wachstumsgeschwindigkeit von PI	LB-
985 Zellen	29
3.1.2 Mit DMF differenzierte PLB-985 Zellen produzieren reaktive Sauerstoffsp	ezies
("oxidative burst")	30
3.1.3 Differenzierung mit DMF schützt PLB-985 Zellen vor Wärme-induzierter	
Apoptose	31
3.2 Einfluss von Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose bei	
PLB-985 Zellen	32
3.2.1 TPA induziert die Isoformen α , β , γ , δ und ι der PKC und bewirkt eine	
Translokation in die Partikelfraktion	33
3.2.2 Vitalität von PLB-985 Zellen nach Wärmebehandlung	34
3.2.3 Lineare Abhängigkeit von Caspase 3-Aktivität und Proteinmenge	35
3.2.4 Abhängigkeit der Caspase 3-Aktivität von der PKC-Stimulation durch TPA	in in
wärmebehandelten PLB-985 Zellen	36
3.2.5 Einfluss der PKC-Aktivität auf die nukleosomale DNA-Fragmentierung na	ch
Wärmebehandlung von PLB-985 Zellen	37
3.2.6 Nachweis von apoptotischer Kernfragmentierung mittels Hoechstfärbung	39
4. DISKUSSION	41
4.1 Bedeutung der Zelldifferenzierung für die Auslösung von Apoptose	41
4.1.1 Behandlung von PLB-985 Zellen mit DMF führt zu einer	
Wachstumsverlangsamung	41
4.1.2 PLB-985 Zellen erfüllen nach Behandlung mit DMF morphologische und	
funktionelle Kriterien der granulozytären Differenzierung	41
4.1.3 Differenzierung von PLB-985 Zellen mit DMF inhibiert Wärme-induzierte	
Apoptose	42

4.2 PKC und ihre Bedeutung für Wärme-induzierte Apoptose	
4.2.1 Die PKC-Isoenzyme lassen sich durch TPA differentiell induzieren	44
4.2.2 Wärme-unabhängige Apoptoseinduktion durch TPA	45
4.2.3 Lässt sich Wärme-induzierte Apoptose durch TPA verstärken?	
a) Gelelektrophoretische Daten	46
b) Vitalitätsassay	46
c) Caspase 3-Aktivität	47
d) Hoechst-Färbung	48
4.2.4 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	49
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	55
7. Abkürzungsverzeichnis	69
8. Veröffentlichungen	71
9. Danksagungen	72
10. LEBENSLAUF	73

1. EINLEITUNG

1.1 Apoptose – Bedeutung und Regulation

1.1.1 Bedeutung der Apoptose im menschlichen Organismus

Apoptose, der programmierte Selbstmord einer einzelnen Zelle, gehört zu den wichtigsten lebenserhaltenden Mechanismen eines mehrzelligen Organismus. Die Wichtigkeit der Apoptose kann an ihrer phylogenetischen Konservierung abgelesen werden – ob in Wurm oder Maus, Fruchtfliege oder Mensch, die Homöostase aller mehrzelligen Organismen ist von ihrer Funktion abhängig (Taylor *et al.*, 2008).

In der Histogenese ist die Apoptose der Proliferation und Differenzierung zur Formung von Zellverbänden und Organen als geregelter Zelltod gegenübergestellt. Bei der Infektabwehr ist die Apoptose sowohl zur Beendigung der körpereigenen Immunantwort wie auch zur Elimination infizierter Zellen notwendig. In vielen Arbeiten wurde u. a. die spontane Apoptose von neutrophilen Granulozyten als erste Vertreter des Immunsystems in bakteriellen Infekten charakterisiert (Luo und Loison, 2008). Schließlich gilt eine dysregulierte Apoptose als ein Meilenstein zur Entstehung von malignen Neoplasien (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.2 Physiologische Regulation der Apoptose

Es gibt zwei Wege, über die Apoptose ausgelöst werden kann, die extrinsischer und intrinsischer Weg genannt werden und in eine gemeinsame Endstrecke münden.

a) Extrinsischer Weg der Apoptoseauslösung

In der Ausbildung des Immunsystems, z. B. in der Selektion von T-Zellen, spielt eine Variante des extrinsischen Pfades, die rezeptorvermittelte Apoptose, eine zentrale Rolle. Entscheidend ist hierbei die Familie der TNF α -Rezeptoren, auch Todesrezeptoren genannt. Zu dieser Familie gehören die beiden TNF α -Rezeptoren TNFR 1 und 2 und die Rezeptoren Fas/CD95 und DR3-5 (Walczak und Krammer, 2000). Sie bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne, wobei letztere bei allen der Todesdomäne (death domain, DD) entspricht - einer Proteininteraktions-domäne, auf welcher die allen Todesrezeptoren gemeinsame Eigenschaft beruht, auf

Bindung eines adäquaten Liganden mit einer Trimerisierung zu reagieren (Walczak und Haas, 2008). Die Trimerisierung hat eine Assoziation mit intrazellulär lokalisierten Adapterproteinen zur Folge, die ebenfalls eine DD enthalten. Als Beispiel kann das in der Fas-vermittelten Apoptose wichtige FADD (Fas-associated death domain) genannt werden. Die Adapterproteine interagieren ihrerseits mit mehreren Molekülen Procaspase 8 über eine weitere Proteininteraktionsdomäne, die death effector domain (DED), welche sich dann aufgrund ihrer räumlichen Nähe trotz ihrer geringen Proteaseaktivität gegenseitig aktivieren können ("induced proximity model"). Die so entstandene Caspase 8 ist in der Lage, sog. Effektorcaspasen zu aktivieren und damit die gemeinsame Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Weg einzuleiten.

b) Intrinsischer Weg der Apoptoseauslösung

Der zweite Weg, über den Apoptose ausgelöst werden kann, wird intrinsischer oder mitochondrialer Weg genannt. Typische Auslöser für diesen Weg sind DNA-Schäden, die entweder durch Zytostatika (experimentell häufig durch den Antimetaboliten Cytarabin) oder Exposition gegenüber UV- oder energiereicherer Gamma-Strahlung verursacht werden. Die DNA-Schädigung führt zur Induktion des Transkriptionsfaktors p53 und hierüber zu vermehrter Expression proapoptotischer Faktoren. Eine wichtige Familie von Regulatoren der Apoptose stellt die Familie der Bcl-2-Proteine dar (Youle und Strasser, 2008). Die proapoptotischen Proteine wirken entweder direkt oder indirekt fördernd auf den Apoptoseprozess. Beispielsweise führt Bad über Heterodimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-xl dazu, dass diese das proapoptotische Protein Bax nicht mehr durch Bindung inaktivieren können. Nach Homodimerisierung kann Bax die Bildung eines Porenkomplexes in der Mitochondrienmembran initiieren. Eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie führt letztlich zu einer Schädigung von Mitochondrien mit Verlust des Membranpotentials über Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, so dass u. a. Cytochrom C und weitere proapoptotische Proteine wie z. B. Smac/Diablo, AIF (apoptosis inducing factor) und die Endonuclease G aus dem mitochondrialen Raum ins Zytosol strömen können (Skommer et al., 2007). Cytochrom C führt unter ATP-Spaltung zu einer aktivierenden Konformationsänderung von Apaf-1 (Apoptotischer Peptidase-aktivierender Faktor-1) und der Bildung des Apoptosoms, welches aus einem Apaf-1/ATP-Multimer, Cytochrom C sowie zwei Molekülen Procaspase 9 besteht. Innerhalb des Apoptosoms wird Caspase 9 aktiviert, über die wieder Effektorcaspasen rekrutiert werden können (Adams und Cory, 2002). Der

initiale Schritt der Mitochondrienschädigung wird von einer Vielzahl von intrazellulären Signalmolekülen beeinflusst, so z. B. der Gruppe von inhibiting apoptosis proteins (IAP), heat shock proteins (HSP) und verschiedenen Proteinkinasen (Schafer und Kornbluth, 2006). Es bestehen Verbindungen zwischen den beiden genannten Wegen, u. a. durch die Fähigkeit der Caspase 8, das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid durch Spaltung zu aktivieren (tBid – "truncated" Bid), welches u. a. durch Aktivierung von Bax die Sekretion von Cytochrom C unterstützt (Skommer *et al.*, 2007).

c) Gemeinsame Endstrecke der Apoptose

Intrinsischer und extrinsischer Weg führen zur Aktivierung von Effektorcaspasen als gemeinsamer Endstrecke, so dass das Resultat unabhängig von den o. a. Stimuli ist. Die Caspasen 3, 6 und 7 spalten direkt Strukturproteine, sorgen aber über Aktivierung weiterer Effektorenzyme außerdem auch indirekt für die Entstehung des apoptotischen Phänotyps. Eines der Substrate der Effektorcaspasen ist der Inhibitor der Caspase-aktivierten DNAse (CAD), ICAD, welcher nach Spaltung das Enzym CAD in aktivem Zustand freilässt. CAD, eine Magnesium koordinierende DNAse mit Präferenz für AT-reiche Regionen, besitzt an ihrem C-terminalen Ende ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und spaltet die DNA zunächst an den nukleären "scaffold"-Regionen in 50-200 kbp große Stücke, wodurch die Chromatinstruktur aufgeklappt wird, um sie danach in ca. 200 bp große, nukleosomale Einheiten bzw. deren Vielfache zu spalten. Letztere ergeben, in einer DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt, die typische apoptotische "Leiter" (Nagata, 2000, Yoshida *et al.*, 2006).

Weitere Substrate der Caspasen stellen die Lamine, Gelsolin, Cytokeratin 18 und Vimentin dar, wobei eine Spaltung dieser Proteine die Zerstörung des Zytoskeletts zur Folge hat und im Weiteren zur Abrundung der Zelle und zur Ausbildung von Blasen-artigen Ausstülpungen der Plasmamembran ("membrane blebbing") führt. An der Plasmamembran findet in der Frühphase der Apoptose die Externalisierung von Phosphatidylserin statt, welches durch Bindung an Annexin V nachgewiesen werden kann (Gardai *et al.*, 2006). Außerdem werden "apoptotic bodies" gebildet, welche durch die Markierung mit Phosphatidylserin leichter von benachbarten Zellen phagozytiert werden können, ohne dass eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wird, wie es beim nekrotischen Zelltod der Fall wäre (Lleo *et al.*, 2008, Munoz *et al.*, 2007, Savill und Fadok, 2000). Anhand der genannten morphologischen Kriterien kann man die beiden Arten des Zelltodes zusätzlich zum Nachweis verschiedener intrazellulärer Marker voneinander unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Nachweismethoden für den apoptotischen Zelltod die Aktivität der Caspase 3, die DNA-Fragmentierung anhand elektrophoretischer Darstellung der typischen DNA-Leitern und die Kern-Fragmentierung als morphologisches Kriterium verwendet.

1.1.3 Caspasen als Schaltstellen der Apoptose

Da die Caspasen ein zentrales Element in der Apoptose darstellen und darüber hinaus in dieser Arbeit die Caspase 3-Aktivität als quantitatives Maß für Apoptose genutzt worden ist, sollen die Caspasen im folgenden Abschnitt näher charakterisiert werden.

Caspasen sind eine Familie von Proteasen, von denen inzwischen 14 Unterformen bekannt sind, wobei die Caspasen 1-10 und 14 humanen Ursprungs sind, 11 und 12 in der Maus und Caspase 13 im Rind isoliert wurden (Shi, 2002). Der Name leitet sich davon ab, dass im katalytischen Zentrum ein Cysteinrest vorliegt und dass diese Proteasen vorwiegend nach der Aminosäure Aspartat spalten ("Cysteinyl Aspartat-spezifische Proteinase"). Es besteht genetische Homologie zu Caspasen anderer Säugetiere und zum "Todesgen" ced-3, welches zuerst beim Nematoden Caenorhabditis elegans entdeckt wurde (Conradt und Xue, 2005, Samara und Tavernarakis, 2008).

Caspasen werden als inaktives Zymogen synthetisiert, bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen (ca. 10 kDa) Untereinheit mit einer kurzen Verbindungsregion (linker region). Zur Aktivierung ist in den meisten Fällen die Abspaltung der Prodomäne und der Verbindungsregion notwendig, wobei diese Spaltungsstellen immer hinter einem Aspartatrest liegen, so dass sich Caspasen gegenseitig aktivieren können. Das aktive Enzym ist ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Einheiten und besitzt insgesamt zwei Substratbindungsstellen (Bao und Shi, 2007).

Man unterscheidet zwischen Initiatorcaspasen, Effektorcaspasen und inflammatorischen Caspasen. Zur ersten Gruppe gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10. Sie stehen am Anfang der Caspasekaskade und aktivieren die in der Signaltransduktion stromabwärts gelegenen Effektorcaspasen. Eine strukturelle Besonderheit ist die lange Prodomäne von bis zu 100 Aminosäuren Länge, die entweder eine Todeseffektordomäne (DED) oder eine Caspase -Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne (CARD) für die Interaktion mit speziellen Adapterproteinen beinhaltet. Man geht davon aus, dass sich Initiatorcaspasen eines Typs gegenseitig aktivieren, wenn sie in räumlicher Nähe vorliegen ("induced-proximity model") bzw. wenn sie in einem gemeinsamen Komplex mit diesen Adapterproteinen vorliegen. Die Caspasen 8 und 10 spielen v. a. in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose (extrinsisch) eine Rolle, während die Caspasen 2 und 9 v. a. die mitochondriale (intrinsische) Signaltransduktionskaskade vermitteln (Kumar, 2007, Logue und Martin, 2008).

Die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7) sind nach Aktivierung durch die Initiatorcaspasen mitverantwortlich für die Entstehung des apoptotischen Phänotyps der Zelle, indem sie Strukturproteine spalten oder andere Schlüsselenzyme aktivieren. Fodrin, ein Aktinbindendes Strukturprotein, wird durch Caspase 3 gespalten und kann so nicht mehr die normale Zellform aufrechterhalten – die Zelle rundet sich ab (Slee *et al.*, 2001). Die Caspase 3 spaltet außerdem die beiden in DNA-Reparaturvorgänge involvierten Enzyme PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) (Cohen, 1997) und aktiviert durch Spaltung des entsprechenden Inhibitors (ICAD) die Caspase-abhängige DNAse CAD, die für die typische nukleosomale DNA-Fragmentation in apoptotischen Zellen verantwortlich ist. Außerdem konnte durch in vitro-Versuche gezeigt werden, dass Caspase 3 alle anderen Caspasen spalten und damit aktivieren kann, sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen. Die Caspase 3 wird als die wichtigste Effektorcaspase angesehen und bietet darüber hinaus die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung in einem Enzym-Assay, worauf wir in unseren Versuchen zurückgegriffen haben.

Die inflammatorischen Caspasen (Caspasen 1, 4, 5, 11, 13) sind v. a. in die Aktivierung von Cytokinen involviert. So spaltet z. B. die zuerst entdeckte Caspase 1 (ICE, interleukin 1 β -converting enzyme) Pro-Interleukin 1 β und aktiviert es dadurch (Kersse *et al.*, 2007).

Die Caspasen sind für irreversible Schritte der Apoptosekaskade verantwortlich, so dass sie als mögliche Angriffspunkte für therapeutische Interventionen in Frage kommen. So werden inzwischen Peptidketon-Inhibitoren in präklinischen Studien bei Tiermodellen von Meningitis oder Endotoxinschock eingesetzt, die selektiv die Caspase 3 hemmen (Nicholson, 2000). Der spezifische Caspase 1-Inhibitor Pralnacasan wurde in Phase I und II-Studien bei rheumatoider Arthritis eingesetzt. Außerdem spielt die Aktivierung von Caspasen bei Ischämie und Reperfusion eine Rolle, so wird der reversible Pan-CaspaseInhibitor IDN6556 derzeit u. a. in Phase II-Studien bei Lebertransplantationen untersucht (Howley und Fearnhead, 2008).

1.1.4 Die Proteinkinase C innerhalb der Sigaltransduktion

Der Begriff Proteinkinase C (PKC) beschreibt eine Familie von Serin-Threoninkinasen, die aus mindestens 10 Isoenzymen besteht. Sie ist in Signaltransduktionskaskaden vieler wichtiger intrazellulärer Wege eingebunden und spielt in zentralen Bereichen wie der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration eine Rolle (Barragan *et al.*, 2003, Brodie und Blumberg, 2003, Cross *et al.*, 2000, Gutcher *et al.*, 2003). Initial wurde insbesondere in Experimenten, in denen die PKC durch den Tumorpromoter TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) beeinflusst wurde, ihre Bedeutung für die Apoptose erkannt (Chow *et al.*, 2006, Mayne und Murray, 1998).

Man unterteilt die Isoenzyme der PKC in drei Unterfamilien – die klassischen, die so genannten neuen sowie die atypischen Unterformen der PKC (cPKC, nPKC und aPKC). Diese drei Unterfamilien unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihren Aktivierungswegen (Corbalan-Garcia und Gomez-Fernandez, 2006, Quest, 1996). Außerdem werden aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten teilweise PKC μ und v einer vierten Subgruppe zugeordnet. PKC μ wird auch als Proteinkinase D bezeichnet (Gutcher *et al.*, 2003, Toker, 1998). Die klassischen Isoformen der PKC – α , β I, β II und γ – benötigen Diacylglycerol (DAG) und Kalzium (Ca²⁺) zur Aktivierung. Die neuen Isoformen – δ , ε , η und θ – reagieren auf DAG, während die atypischen Isoformen, zu denen ζ , λ/ι gehören, weder durch DAG noch durch Kalzium zu beeinflussen sind. Zusätzlich ist Phosphatidylserin (PS) als Kofaktor zur Aktivierung aller drei Unterfamilien wichtig. Der Phorbolester TPA beeinflusst die Familien der klassischen und neuen Isoformen über eine Bindungsstelle an der C1-Domäne und induziert deren Expression.

Die grundsätzliche Struktur der PKC besteht aus vier konservierten Domänen C1-4 sowie fünf variablen Domänen V1-5. Dabei bilden die Domänen C1 und 2 gemeinsam mit der so genannten Pseudosubstratregion die N-terminale regulatorische Domäne. Die Pseudosubstratregion hat große Ähnlichkeit mit dem optimalen Substrat-Motiv, wobei die zu phosphorylierende Aminosäure Serin/Threonin durch Alanin ersetzt ist. Durch Bindung an die Substrat-Bindungstasche kommt es zur Autoinhibition der katalytischen Domäne am C-terminalen Ende (Toker, 1998). Die C1-Domäne besteht bei cPKC und nPKC aus zwei Untereinheiten a und b mit jeweils einer Zinkfingerregion, welche gemeinsam die Bindungsstelle sowohl für DAG als auch für TPA bilden. Die durch Bindung von DAG oder TPA entstehende Energie führt zur Dislokation der Pseudosubstratregion, zur Beendigung der Autoinhibition und ermöglicht die Aktivierung der PKC. Die nur aus einer Untereinheit bestehende C1-Domäne bei aPKC ist weder DAG- noch TPA-sensibel (Gutcher *et al.*, 2003).

Eine C2-Region liegt bei cPKC und nPKC vor, wobei die C2-Region in cPKC der C1-Region folgt und Kalzium-sensibel ist, während sie bei nPKC der C1-Region vorangestellt ist, unabhängig von Kalzium ist und u. a. die Bindung von PS sowie Protein-Proteininteraktionen vermittelt. Die Bindungsstellen von Kalzium und Phosphatidylserin liegen in der C2-Region und beeinflussen sich gegenseitig (Corbalan-Garcia und Gomez-Fernandez, 2006). Das Fehlen einer C2-Domäne erklärt die fehlende Beeinflussbarkeit von aPKCs durch Kalzium.

Zusätzlich können verschiedene Unterformen der PKC durch Produkte der Phosphoinositol-3-Kinase sowie ungesättigte Fettsäuren, z. B. Arachidonsäure, und weitere Lipide aktiviert werden.

Die regulatorische und die C-terminale katalytische Domäne sind durch die hinge-Region, V3 entsprechend, verbunden. Spaltung des Enzyms an der hinge-Region führt zu einer konstitutiv aktiven katalytischen Region.

Die katalytische Domäne enthält die Bindungsstellen für ATP und Substrat. Der Aktivierung durch Kofaktoren ist ein SO genanntes Priming durch drei Phosphorylierungsschritte an der katalytischen Domäne vorangestellt. Deshalb ist die PKC von anderen Kinasen abhängig und regulierbar. Der Geschwindigkeits-limitierende Schritt ist die Phosphorylierung an der so genannten "activation loop" am Eingang zur Substrat-Bindungstasche. Das hierfür verantwortliche Enzym ist die Phosphoinositol-3-abhängige Kinase-1 (PDK-1) (Dempsey et al., 2000, Le Good et al., 1998). Als zweiter Schritt erfolgt eine Autophosphorylierung an einer hydrophoben Region, was zur Enzymaktivierung führt. Der dritte Phosphorylierungsschritt ermöglicht die Freisetzung der PKC ins Zytosol. Anschließend erfolgt die Translokation an die Plasmamembran mit Bindung und Aktivierung durch PS, ggf. DAG und Kalzium auf die o. a. Weise. Nach Aktivierung werden die verschiedenen Isoformen der PKC u. a. an Rezeptoren aktivierter C-Kinasen (RACK), Isoenzym-spezifische Ankerproteine, gebunden. Diese bestimmen die weitere Translokation, z. B. an das Zytoskelett, die Mitochondrien oder den Zellkern und dadurch die Verfügbarkeit bestimmter Substrate für die PKC (Gutcher *et al.*, 2003).

Aufgrund der vielfältigen Verknüpfungspunkte mit den intrazellulären Signaltransduktionswegen, die Proliferation und Apoptose steuern, entschieden wir uns, die Bedeutung der PKC in dem durch unsere Arbeitsgruppe bereits etablierten Modell der Wärme-induzierten Apoptose in der Leukämie-Zelllinie PLB-985 näher zu untersuchen. Als Stimulator wählten wir aufgrund der ausführlichen Datenlage den Phorbolester TPA, der spezifisch die cPKC und nPKC induziert und aktiviert.

1.2 Exogene Beeinflussung der Apoptose

1.2.1 Hyperthermie und Auslösung von Apoptose

Temperaturregulation stellt für den Menschen eine wichtige Voraussetzung für physiologische und pathophysiologische Vorgänge dar. Einer Beeinflussung durch die Temperatur unterliegen sowohl physikalische Eigenschaften von Zellbestandteilen und Enzymaktivitäten auf Zellebene, als auch z. B. das Herz-Kreislauf-System auf Ebene des Gesamtorganismus. Die Körpertemperatur wird zentral aus dem thermoregulatorischen Zentrum im Hypothalamus gesteuert. Dieses Zentrum integriert Signale sowohl von peripheren wie auch von zentralen Thermorezeptoren im Gefäßbett des Hypothalamus. Als Resultat werden Wärmeabgabe, z. B. über Vasokonstriktion, und Wärmebildung, z. B. über die Veränderung der metabolischen Aktivität, angepasst. Richtgröße ist der so genannte hypothalamische Stellwert.

Hyperthermie ist definiert als Erhöhung der Körpertemperatur über den beim Menschen normalen Bereich von 37,2 – 37,7° C (bei oraler Messung) hinaus bei gleich bleibendem hypothalamischem Stellwert. Ursache ist ein Missverhältnis zwischen Wärmeproduktion bzw. Wärmeentstehung und inadäguater Wärmeabgabe. Auslöser hierfür können sowohl erhöhte Wärmeexposition bei gleichzeitiger Dehydrierung sein, z. B. beim Hitzschlag, als auch erhöhte Wärmeproduktion durch Muskelarbeit, z. B. durch körperliche Belastung in heißer Umgebung. Einen Sonderfall stellt das Syndrom der malignen Hyperthermie dar, bei dem durch einen genetischen Defekt des Ryanodin-Rezeptors im sarkoplasmatischen Retikulum nach Gabe depolarisierenden Muskelrelaxantien oder von Inhalationsanästhetika eine exzessive Steigerung des intrazellulären Kalziums innerhalb von wenigen Minuten zu Muskelzittern, Temperaturanstieg um mehrere Grad Celsius und letztlich zu Azidose, Muskelzelluntergang und tubulotoxischem Nierenversagen führen kann (Ali *et al.*, 2003). Dem gegenüber gestellt ist das Fieber, bei dem der hypothalamische Stellwert durch Einwirkung von exogenen (Exotoxin, LPS) oder endogenen (Zytokine IL-1, 2, 6, TNF α) Pyrogenen angehoben wird und über Muskelzittern und periphere Vasokonstriktion eine Erhöhung der Körperkerntemperatur hervorgerufen wird.

Bereits in den 70er Jahren wurde entdeckt, dass Exposition von menschlichen Zellen gegenüber Temperaturen von über 43°C abhängig von der Expositionsdauer einen Zelluntergang zur Folge hat. Dabei kann es – je nach Temperaturhöhe – sowohl zu nekrotischem als auch zu apoptotischem Zelltod kommen (Harmon *et al.*, 1990). Insbesondere in Zellkulturexperimenten konnte auch eine Thermosensitivität von Tumorzellen sowie eine durch Hyperthermie induzierte Verbesserung der Sensitivität gegenüber Zytostatika und Radiotherapie beobachtet werden.

Diese präklinischen Beobachtungen waren die Grundlage für die Anwendung von Hyperthermie in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie bei Tumorpatienten. Man unterscheidet die lokale oder regionale Hyperthermie von der Ganzköperhyperthermie (whole body hyperthermia, WBH). So ist z. B. die Phase III-Studie EORTC 62961 mittlerweile abgeschlossen, in der regionale Hyperthermie als Ergänzung zu Chemo- und Strahlentherapie bei Hochrisikopatienten mit Weichteilsarkomen kontrolliert verglichen wurde. Die endgültigen Ergebnisse werden derzeit noch ausgewertet, die bereits veröffentlichten Daten zeigten einen Vorteil im Krankheits-freien Überleben für die mit regionaler Hyperthermie behandelten Patienten (Issels et al., 2007). Die WBH ist als invasives Verfahren anzusehen, u. a. weil zum Erreichen einer Körperkerntemperatur von 41,8° - 42° C für eine Stunde zusätzlich zur Hyperthermieapplikation eine Allgemeinnarkose oder Analgosedierung notwendig ist (Hildebrandt et al., 2005). Gleichzeitig erhoffte man sich von der WBH als einem systemischen Verfahren auch eine systemische Bekämpfung des Tumors. Daher wurde insbesondere der Einfluss auf metastasierte Tumorerkrankungen untersucht (Westermann et al., 2003). Im Vergleich zur WBH ist die regionale Hyperthermie besser verträglich; lokal können höhere Temperaturen toleriert werden, wobei hier eine homogene Verteilung der erhöhten Körperteiltemperaturen und die Messung in den einzelnen Zonen besonders problematisch sind. In Phase III-Studien

konnte die Wirksamkeit von zusätzlicher Hyperthermie zu Radiotherapie z. B. bei metastasiertem Melanom bzgl. lokaler Tumorkontrolle und Überleben gezeigt werden (Overgaard *et al.*, 1995, Overgaard *et al.*, 1996). In vivo ist der Effekt der Hyperthermiebehandlung lediglich in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie gezeigt worden. Hyperthermie wird deshalb z. Zt. nicht als Monotherapie, sondern nur im Rahmen von multimodalen Therapiekonzepten angewandt.

Auf zellulärer Ebene ist die Reaktion auf Hyperthermie in vielerlei Hinsicht untersucht worden. Insbesondere die Familie der heat shock proteins (HSP) spielt hierbei eine Rolle. Dabei handelt es sich um Chaperone, die durch Einwirkung von Hyperthermie und anderen Arten von zellulärem Stress heraufreguliert werden. Diese wirken meistens antiapoptotisch und könnten damit einer Hyperthermiebehandlung entgegen wirken (Calderwood und Ciocca, 2008). In unserer Arbeitsgruppe wurden parallel zu den hier vorgestellten Ergebnissen Untersuchungen über die Rolle von HSP bei Wärme-induzierter Apoptose durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in HL-60 Zellen nach Exposition gegenüber 43° C die Expression von HSP 27 und 70 steigt. In HL-60 Zellen mit erhöhter endogener Katalase-Aktivität trat Apoptose mit Zeitverzögerung und in geringerem Ausmaß auf, gleichzeitig war die HSP 27-Produktion erniedrigt (Katschinski *et al.*, 2000). Da Hyperthermie in ersten klinischen Studien viel versprechende Ergebnisse in der

Therapie maligner Tumoren gezeigt hatte, als apoptotischer Stimulus bereits etabliert war und außerdem ein einfach anzuwendendes Therapieprinzip ist, verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit Hyperthermie als Apoptose auslösendes Agens.

1.2.2 Zelluläre Differenzierung und ihre Bedeutung für Apoptose

Unter Differenzierung versteht man die Ausbildung von Zelltyp-spezifischen Merkmalen sowohl funktioneller als auch struktureller Art in der Entwicklung einzelner Zellen oder gesamter Gewebe. Dabei kann es sich beispielsweise bei Epithelzellen um die Entstehung einer Polarität mit jeweils speziellen Resorptionskanälen und Sekretionswegen an apikaler und basaler Fläche handeln. Die Differenzierung von Epithelzellen ist beim erwachsenen Menschen in der Epidermis oder im Darm zu beobachten bei der Entstehung einer Zelle durch Teilung einer Basalzelle und anschließender Wanderung durch die verschiedenen Schichten der Epidermis. Hierfür wird ein Zytoskelett ausgebildet, welches sich von einer Schicht zur nächsten wandelt und mit Desmosomen und gap junctions in den verschiedenen Schichten für den Schutz der Epidermis gegen Dehydratation, mechanische, chemische und thermische Noxen sorgt (Fuchs, 2007).

Ausgangspunkt für jegliche Differenzierung sind pluripotente Stammzellen, aus denen sich im Embryo Zellen aller drei Keimblätter entwickeln. Aus ihnen gehen multipotente adulte Stammzellen hervor, die bereits einem Organsystem zuzuordnen sind.

Detailliert wurden Differenzierungsmechanismen anhand der Hämatopoese untersucht. Hier bilden hämatologische Stammzellen (HSC) den Pool, aus dem sich Zellen sowohl lymphoider wie auch myeloider und erythroider Richtung entwickeln können. HSC werden anhand von Oberflächenmarkern und der Potenz der Selbsterneuerung in lang- und kurzlebige HSC unterschieden. Aus ihnen gehen multipotente Vorläuferzellen hervor, die noch in alle drei Zelllinien ausdifferenzieren können, sich aber nicht mehr selbst ersetzen können (Rosenbauer und Tenen, 2007). HSC besitzen die Fähigkeit, bei einer Teilung eine Zelle mit denselben Fähigkeiten wie die Ursprungszelle sowie eine weiter ausdifferenzierte Tochterzelle hervorzubringen. Dieser Vorgang wird auch asymmetrische Teilung genannt (Giebel et al., 2006). Mit zunehmender Differenzierung verringert sich die Proliferationskompetenz einer Vorläuferzelle. Die beiden gegenläufigen Prozesse Differenzierung und Proliferation sind bei HSC durch Wachstumsfaktoren wie SCF (stem cell factor), Thrombopoietin, Erythropoietin und **GM-CSF** (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) sowie durch Transkriptionsfaktoren wie RUNX-1, PU-1 und C/EBPalpha reguliert (Kaushansky, 2006, Rosenbauer und Tenen, 2007).

Eine fehlerhafte Differenzierung bzw. ein Differenzierungsblock können zu ungehemmter Proliferation und damit zur Ausbildung hämatologischer Malignome führen (Tenen, 2003) und gelten wie die Apoptoseinhibition als ein Meilenstein in der Entwicklung maligner Neoplasien (Hanahan und Weinberg, 2000). Das Ausmaß der Entdifferenzierung ist ein wichtiger Prognosefaktor (Grading), weil u. a. Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasierungsneigung des Tumors von ihr abhängen.

Aufgrund dieser Beobachtungen haben differenzierende Medikamente in die onkologische Forschung und mittlerweile auch in die Therapie Einzug gehalten. So konnte man beispielsweise zeigen, dass in Kultur gehaltene myeloische Leukämiezelllinien, z.B. HL-60 oder PLB-985, durch Agenzien wie Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder das Vitamin A-Derivat all-trans-Retinoinsäure (ATRA) in granulozytäre Richtung differenziert werden können. Auch eine Differenzierung in monozytäre Richtung mittels TPA, Vitamin D3 oder Cytarabin ist für diese Zelllinien ebenso wie für die CML- Linie K-562 beschrieben. Eine Differenzierung in erythrozytäre Richtung konnte in den Zelllinien MEL und K-562 gezeigt werden (Tsiftsoglou *et al.*, 2003).

Mittlerweile wurden molekulare Korrelate von Differenzierungsblocks in verschiedenen hämatologischen Malignomen gefunden. So liegt z.B. bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (FAB-Klassifikation AML M3) eine Translokation t(15;17) vor, durch die es zu einer Fusion der Gene für das Promyelozytenprotein PML und den Rezeptor für ATRA (RAR a) kommt (Rosenbauer und Tenen, 2007). Die Gabe von ATRA führt zur Aufhebung dieses Differenzierungsblocks und zu konsekutiver Differenzierung der Promyelozyten in granulozytäre Richtung, u. a. durch Degradierung des Fusionsproteins. Diese Differenzierung geht gleichzeitig mit einer Proliferationshemmung einher. Die Wirksamkeit dieser Therapie mit Retinoiden insbesondere in der Induktionstherapie ist inzwischen gut durch Studien belegt, so dass ATRA bei der Promyelozyenleukämie Teil der Erstlinientherapie in Kombination mit Anthrazyklinen und Cytarabin geworden ist (Degos und Wang, 2001, Lengfelder et al., 2005). Interessanterweise ist ATRA auch bei einzelnen Patienten mit AML ohne die typischen morphologischen Marker von AML M3 wirksam, wobei in diesen Fällen ebenfalls die PML-RAR α-Mutation vorlag (Allford et al., 1999, Lehmann et al., 2001). Retinoide sind mittlerweile auch in der Therapie solider Tumore etabliert und z. B. ein fester Bestandteil der Therapie des Neuroblastoms im Kindesalter (Berthold et al., 2004).

Ein weiteres Beispiel für gestörte Differenzierung ist die chronische myeloische Leukämie, CML. Charakteristisch ist das Philadelphia-Chromosom mit der Translokation t(9;22), welche zur Fusion der beiden Gene ber und abl führt. Das Produkt Ber-Abl stellt eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase dar, die über Aktivierung der Ras-Kaskade sowie des PI3-Kinase/Akt-Weges eine antiapoptotische sowie proliferationsfördernde Wirkung ausübt, u. a. mittels Aktivierung von NFkB und Inhibierung von p53 (Alvarez *et al.*, 2007). Die Applikation des "small molecule inhibitors" Imatinib inhibiert diese Tyrosinkinase und ermöglicht die weitere Differenzierung dieser Tumorzellen sowie die Induktion von Apoptose (Sell, 2005). Auch akute lymphatische Leukämien, bei denen ein Philadelphia-Chromosom nachgewiesen wird, werden inzwischen standardmäßig mit Imatinib behandelt – ebenso auch gastrointestinale Stromatumoren, in denen die rearrangierte Proteinkinase c-kit inhibiert wird (Demetri *et al.*, 2002, Druker *et al.*, 2001).

Die zunehmende Differenzierung im Rahmen der Hämatopoese ermöglicht auch eine Regulation durch Apoptose, z. B. in der Lymphopoese. Hier entstehen aus den "common lymphoid progenitors" die reifen B- und T-Zellen. Nach Rearrangement und Diversifikation der Antigenrezeptoren rezirkulieren die Lymphozyten in der Peripherie sowie in sekundären lymphatischen Organen. In dieser Selektionsphase führt eine sehr starke Stimulation, z. B. bei autoreaktiven T-Zellen, zu Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bim sowie Bax und Bak hierfür essentiell sind (Strasser und Bouillet, 2003). Auch B-Zellen mit zu geringer Bindungskapazität an Antigene fallen der Apoptose zum Opfer, ebenfalls vermittelt durch Bim. In diesem Fall scheint die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Formen der Apoptose erst mit zunehmender Differenzierung zu entstehen.

Die klassischen Chemotherapeutika induzieren bei empfindlichen Tumorzellen zwar Apoptose (und Nekrose), sind aber außerdem allgemein zytotoxisch und gefährden daher auch gesunde Zellen. Daraus ergibt sich die Frage der unterschiedlichen Sensitivität von Tumorzellen und gesunden Zellen gegenüber Apoptose, die den Anstoß zur vorliegenden Arbeit gab. Mittels Differenzierung myeloider Leukämiezellen durch exogene Agentien lassen sich im selben Zellkulturmodell Merkmale einer Tumorzelllinie vermindern. Damit entsteht die Möglichkeit, Zellen, die gesunden, reifen Leukozyten ähnlich sind, mit den ursprünglichen Tumorzellen direkt zu vergleichen. Aus diesem Grunde haben wir für den ersten Teil der Arbeit die Zelllinie PLB-985 mit konsekutiver Differenzierung in granuloytäre Richtung gewählt. Als differenzierendes Agens wählten wir das polarisierende Lösungsmittel DMF, für das eine differenzierende Wirkung auf verschiedene Tumorzelllinien, so auch für die myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie PLB-985, beschrieben war (Langdon und Hickman, 1987).

1.3 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Apoptose stellt einen zentralen Regulationsmechanismus in der Entstehung eines Organismus sowie in der Infektabwehr und der Hämatopoese dar. Eine dysregulierte Apoptose spielt in der Entstehung von neurologischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Neoplasien eine Rolle. Die genauere Beschreibung der zugrunde liegende Signaltransduktion kann Wege zur Beeinflussung von Apoptose und möglicherweise neue therapeutische Ansätze eröffnen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses (a) von Differenzierung und (b) der Stimulation der PKC auf die Wärme-induzierte Apoptose in der Leukämiezelllinie PLB-985.

(a) In der vorliegenden Arbeit wählten wir als Apoptosemodell das in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Modell der Wärme-induzierten Apoptose in der myelomonozytären Leukämiezelllinie PLB-985. Der Zusammenhang zwischen fehlender Differenzierung, Apoptosehemmung und konsekutiver Proliferation ist in der Hämatopoese und Entstehung hämatologischer Neoplasien besonders offensichtlich. Im ersten Teil der Arbeit sollte daher der Einfluss der Differenzierung myelomonozytärer Zellen auf Wärme-induzierte Apoptose untersucht werden. Das gewählte Zellmodell PLB-985 gab uns die Möglichkeit, die ursprüngliche, undifferenzierte Tumorzelllinie vor und nach ihrer Differenzierung in granulozytäre Richtung miteinander zu vergleichen. Als differenzierendes Agens wählten wir das Lösungsmittel DMF. Um die granulozytäre Differenzierung nachzuweisen, sollte die Wachstumsgeschwindigkeit sowie die Produktion von ROS als funktionelles Kriterium untersucht werden.

(b) In der aktuellen Literatur erscheint die PKC als eine zentrale Schaltstelle in der Regulation von Proliferation und Apoptose. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher am o. g. Zellmodell der Einfluss von Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose untersucht werden. Aufgrund der ausführlichen Datenlage wählten wir den Phorbolester TPA, der spezifisch die cPKC und nPKC induziert und aktiviert. Aktivierung der PKC führt zu einer Membranbindung und damit zu einer Translokation in die Partikelfraktion, so dass wir in dieser Arbeit zum Nachweis der PKC-Aktivierung Westernblot-Analysen der PKC-Isoenzyme nach Zellfraktionierung durchführten.

Um das Ausmaß an Apoptose zu bestimmen, wählten wir die Caspase 3-Aktivität, den Nachweis der typischen DNA-Leiter mittels DNA-Gelelektrophorese sowie die morphologische Differenzierung von apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen mittels Hoechstfärbung.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Sigma Biochemicals, Deisenhofen, Deutschland erworben.

2.1 Zelllinie / Zellkultivierung

In unseren Experimenten haben wir die 1987 erstbeschriebene myelomonozytäre Leukämiezelllinie PLB-985 benutzt (Tucker *et al.*, 1987). Sie wurde uns freundlicherweise von M. Dinauer (Herman B. Wells Center for Pediatric Research, Indiana University Medical Center, Indianapolis, IN, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden – soweit nicht gesondert beschrieben – in allen Experimenten in RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Karlsruhe), mit 10% v/v hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum + 20 µg Streptomycin/ml + 20 IU Penicillin/ml) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft in einem Brutschrank (Fa. Heraeus, Düsseldorf) bei 37° C kultiviert. Sie wurden in einer Dichte von 10⁵ Zellen/ml in einer 100 ml Kulturflasche (Fa. Nunc, Wiesbaden) ausgesät und alle drei Tage passagiert. Vor jedem Experiment wurde mittels Trypanblaufärbung sichergestellt, dass mehr als 90% der Zellen vital waren.

Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde bestimmt, indem PLB-985 Zellen in einer Dichte von $0.2 \times 10^6/10$ ml ausgesät wurden. Über 7 d hinweg wurde 24-stündlich die Gesamtzellzahl durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2 Toxizitätstestung mittels MTT-Assay

Die Toxizitätsprüfungen der in den Zellkulturversuchen verwendeten Substanzen TPA, DMSO und DMF erfolgte mittels eines Formazan-basierten Assays. MTT (3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein wasserlösliches, gelbes Salz und kann durch Spaltung eines seiner Tetrazolium-Ringe in einen dunkelblau-violetten wasserunlöslichen Formazankomplex überführt werden. Diese Reaktion wird u. a. durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert, so dass man anhand der Menge des entstandenen Formazans die Vitalität der Zellen bestimmen kann (Hansen *et al.*, 1989). Die Auswertung erfolgt luminometrisch aufgrund der o. a. Farbverschiebung.

Für diese Versuche wurden PLB-985 Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/100 µl RPMI-Medium (mit 10% FKS und 0,2% Penicillin/Streptomycin) in einer 96-LochMikrotiterplatte (Fa. Nunc, Wiesbaden) kultiviert und mit absteigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden je 50 μ l einer MTT-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg MTT /ml PBS (pH 7,5) hinzugegeben und der Ansatz wurde für weitere 2 h bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden je 200 μ l eines Lysepuffers hinzugegeben (0,69 M SDS, 0,34 M N,N-Dimethylformamid, 2% Essigsäure und 25 mM HCl, pH 4,7). Nach weiteren 18 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Platten photometrisch ausgewertet und die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem Absorptionsspektrometer (Rainbow, SLT) bestimmt. Dabei wurde als Leerwert ein Ansatz mit angereichertem RPMI-Medium eingesetzt. Als Referenzwert (Vitalität = 100%) diente ein Ansatz mit PLB-985 Zellen ohne Zusatz der zu testenden Substanz. Die Zytotoxizität wurde als Dosis-Wirkungs-Beziehung dargestellt und eine optimale Dosis ermittelt.

2.3 Wärmebehandlung

Für die Hyperthermiebehandlung wurden PLB 985-Zellen in einer Dichte von 10⁶ Zellen/10 ml Medium in einer 25 ml Kulturflasche ausgesät und für 24 h bei 37° C inkubiert. Daraufhin wurden sie in Polyethylen-Folie wasserdicht eingeschweißt und für eine Stunde in einem Wasserbad bei Temperaturen zwischen 37° C und 43° C inkubiert. Die Äquilibrierungszeit zwischen Wasserbad und Medium lag bei 5 min. Die Temperatur des Wasserbades wurde mit Hilfe einer Temperatursonde auf 0,1° C genau eingestellt. Nach der Wärmebehandlung folgten je nach Versuchsansatz eine weitere Inkubation im Brutschrank (bis 48 h) und anschließend die Fixierung auf Objektträgern bzw. die DNA-und Proteinextraktion. Der Zeitpunkt 0 h war definiert als der Zeitpunkt, an dem die Zellen aus dem Wasserbad genommen wurden.

2.4 Differenzierung in granulozytäre Richtung

2.4.1 Differenzierung mit N,N-Dimethylformamid (DMF)

Bei der myelomonozytären Leukämiezellinie PLB-985 kann eine Differenzierung in granulozytäre Richtung mittels verschiedener Agenzien induziert werden (Tucker *et al.*, 1987). Wir haben hierfür die Substanz DMF verwendet (Pedruzzi *et al.*, 2002). Zur

Differenzierung wurden $0.2 \ge 10^6$ Zellen/10 ml Medium mit 0.5% v/v DMF für sechs Tage inkubiert, wobei jeweils nach drei Tagen Medium und DMF ausgetauscht wurden.

2.4.2 Bestimmung der "oxidative burst"-Aktivität

Ein Merkmal reifer neutrophiler Granulozyten ist die Fähigkeit, nach Stimulation – z. B. durch Bakterienbestandteile – mittels der NADPH-Oxidase reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu generieren und zu sezernieren. Diese können im Lucigenin-Assay nachgewiesen werden.

PLB-985 Zellen wurden über sechs Tage mit 0,5% DMF differenziert, zentrifugiert und in 50 μ l PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 5 μ l einer Lucigenin-Stammlösung (Endkonzentration 100 μ M) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Zur Stimulation wurden das Tripeptid fMLP (formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) in einer Konzentration von 1 mM und 1 μ M TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetat) verwendet. Als Substrat der Oxidase wurde 10 mM NADPH zugesetzt. Die Lichtemission wurde mit einem Luminometer (MicroLumat LB96P, EG & G Berthold) gemessen und als Funktion der Zeit ausgewertet. In einem weiteren Versuchsansatz wurden den mit DMF differenzierten PLB-985 Zellen 1 mM fMLP und NADPH in Konzentrationen von 1,5 μ M bis 1 mM hinzugesetzt und die Emissionen nach 45 min bestimmt, jeweils mit und ohne Zugabe von 1 μ M TPA.

2.5 Proteinkinase C – Modulation und Nachweis

2.5.1 Stimulation der Proteinkinase C

Der Phorbolester TPA ist als Aktivator der PKC etabliert, insbesondere als Stimulator der klassischen und neuen Isoformen.

TPA wurde in unseren Versuchen in Dimethylsulfoxid gelöst und in einer Konzentration von 5 nM und 50 nM eingesetzt. Die Lösungsmittelkonzentration erreichte maximal 0,05% v/v DMSO, was weder die Vitalität von PLB-985 Zellen noch ihr Verhalten gegenüber Wärme beeinflusste, wie in entsprechenden Versuchen geprüft. Das TPA wurde je nach Versuchsansatz dem Medium eine Stunde vor Beginn der Wärmebehandlung bzw. eine oder 24 Stunden vor Proteinextraktion zum PKC-Nachweis zugegeben.

2.5.2 Nachweis von Proteinkinase C im Westernblot

2.5.2.1 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung ist eine Methode der Proteinextraktion, bei der man nach Zelllyse mit Hilfe von Ultrazentrifugation zwei Proteinfraktionen gewinnt, von denen die eine das zytosolisch gelöste und die andere das membrangebundene bzw. das in den membranumhüllten Kompartimenten enthaltene Protein beinhaltet.

Hierzu wurden 10×10^6 PLB-985 Zellen zunächst für 10 min bei 2000 U/min (Minifuge GL, Heraeus Christ) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit PBS resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 100 µl vorgekühltem Homogenisierungspuffer (20 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM Dithiothreitol, 7,5 mM Benzamidin, 55 µM Leupeptin, 1 mM PMSF) aufgenommen. Die Zellen wurden zur Vervollständigung der Lyse für 3 x 10 s mit Ultraschall mechanisch zerkleinert (Sonifier B-12, Bronson). Anschließend wurde das Lysat für 1 h bei 4° C mit 35.000 U/min (= 100.000 g) zentrifugiert (Ultrazentrifuge mit TLS-55-Rotor, Beckmann). Der so gewonnene Überstand entsprach der Zytosolfraktion und wurde bei –20° C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 100 µl Homogenisierungspuffer mit 1% Triton X-100 aufgenommen und erneut mit Ultraschallwellen behandelt. Daraufhin wurde dieses Lysat ebenfalls für 1 h bei 4° C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand entsprach der Partikelfraktion und wurde bei –20° C eingefroren.

2.5.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte wurde nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Bei dieser Methode macht man sich die Reaktion von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Blau zunutze, während derer sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda = 465$ nm auf 595 nm verschiebt, so dass man die Menge des Reaktionsproduktes photometrisch bestimmen kann.

Hierfür wurden je Probe 5 µl Proteinlösung zu 95 µl einer 0,15 M NaCl-Lösung gegeben. Für den Leerwert wurden an Stelle des Proteinextraktes 5 µl Proteinlysepuffer verwendet. In der Standardreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) aus einer Stammlösung von 0,5 mg BSA/ml 0,15 M NaCl-Lösung in Mengen von 0,5-10 µg eingesetzt und für die Messung mit 0,15 M NaCl auf 100 µl Volumen aufgefüllt. Jeder dieser Ansätze wurde daraufhin mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,01% Coomassie G250, 5% Ethanol und 8,5% Ortho-Phosphorsäure) versetzt.

Nach Vortex und fünfminütiger Inkubationszeit wurden 200 µl je Probe in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem ELISA-Reader (Rainbow, Fa. SLT) bestimmt. Die Konzentrationen der einzelnen Proteinlösungen wurden aus den Extinktionen nach der Lambert-Beer-Gleichung berechnet.

2.5.2.3 Westernblotanalyse

In der Westernblotanalyse wurden die beiden Proteinfraktionen in einem 7,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt (Trenngel: 7,5% Acrylamid, 337,5 mM Tris HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% APS, 0,005% TEMED; Sammelgel: 3,9% Acrylamid, 125 mM Tris HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,01% TEMED), wobei jeweils 20 µg Protein eingesetzt wurden. Die über 2 h angelegte Spannung betrug 100 V. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad) erfolgte bei 12 V für 1 h. Durch Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S wurde eine gleichmäßige Ladung mit Protein und deren Übertragung auf die Membran überprüft. Zur Blockierung von unspezifischen Proteinbindungsstellen erfolgte eine Inkubation mit 5% Trockenmilch in PBS. Die Inkubationszeit mit dem primären Maus-Antikörper (s. u.) betrug 60 min. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran anschließend für 45 min mit einem an Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelten sekundären Anti-Maus-Antikörper inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen wurde die Membran mit ECL (Enhanced Chemiluminescence Substrat, Amersham) beschichtet. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgte in einer 5- bis 15-minütigen Exposition.

primäre Antikörper (Maus), Transduction Labaratories, Lexington, KY:

anti-PKCα-IgG, 1 : 1000 anti-PKCβ-IgG, 1 : 250 anti-PKCγ-IgG, 1 : 5000 anti-PKCδ-IgG, 1 : 500 anti-PKCε-IgG, 1 : 1000 anti-PKCε-IgG, 1 : 250 sekundärer Antikörper (Kaninchen), Transduction Labaratories, Lexington, KY: anti-Maus-IgG:HRPO, 1:2000

2.6 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Apoptose

2.6.1 Nachweis von apoptotischer DNA-Fragmentation mittels DNA-Gelelektrophorese

Für die DNA-Extraktion wurden PLB-985 Zellen für 10 min bei RT mit 3000 U/min (Minifuge GL, Heraeus Christ) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Apoptose-Lyse-Puffer (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,2% Triton X-100) aufgenommen und für 10 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 60 µg Proteinase K hinzugegeben und die Probe für 1 h im Wasserbad bei 50° C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 100 µl 5 M NaCl überschichtet, für weitere 5 min auf Eis gekühlt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt.

Anschließend wurden die Proben bei 4° C für 20 min bei 14.000 U/min (Centrifuge 5417R, Fa. Eppendorf) zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in 200 µl Ethanol 75% aufgenommen und die beiden vorhergegangenen Schritte wiederholt. Die Pellets wurden bei RT getrocknet, in 30 µl 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA aufgenommen und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurden 1,8 µl RNAse (2 mg/ml) hinzugegeben und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei RT über 20 min mit 13.000 U/min. Der Überstand mit der extrahierten DNA wurde vorsichtig abpipettiert. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden 5 µl Probe zu 95 µl destilliertem Wasser gegeben und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Photometer GeneQuant 2, Pharmacia Biotech). Die DNA-Konzentration der Proben wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet (50 µg doppelsträngiger DNA entsprechen bei dieser Wellenlänge einer OD von 1).

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde ein 1,5% Agarosegel verwendet. Es wurde eine DNA-Menge von 20 µg eingesetzt, die in 10 mM Tris HCl pH 7,4, 1 mM EDTA in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgenommen wurde. Als Marker wurde ein 100 bp-Marker benutzt. Nach Laden der Proben wurden diese im Agarosegel über einen Zeitraum von ca. 45 min bei 85 V aufgetrennt. Die Agarosegele wurden hinterher unter UV-Licht fotografiert (E.A.S.Y. RH, Herolab).

2.6.2 Caspase 3-Assay

2.6.2.1 Proteinextraktion

Zur Gewinnung des Gesamtproteins, d. h. sowohl des zytosolischen als auch des im Zellkern lokalisierten bzw. membrangebundenen Proteins, wurden PLB-985 Zellen für 10 min bei 3000 U/min (Minifuge GL, Heraeus Christ) bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ und 2,7 mM KCl, pH 7,4) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl gekühltem Lysepuffer aufgenommen, welcher aus 990 µl CHAPS-Caspase-Puffer (100 mM HEPES, 10% Saccharose, 0,1% CHAPS und 1 mM EDTA pH 7,5) und 10 µl des Proteinaseinhibitors PMSF (Stammlösung 5,7 mM PMSF in Isopropanol) frisch angesetzt worden war. Die so gewonnenen Extrakte wurden zur vollständigen Lyse für 1 h auf Eis inkubiert. Um das Lysat von störenden Membranresten u. ä. zu reinigen, wurde es bei 4° C für 10 min mit 14.000 U/min (Centrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde in den folgenden Versuchen als Proteinextrakt eingesetzt.

2.6.2.1 Bestimmung der Caspase 3-Aktivität

Die Aminosäuresequenzen der Substratschnittstellen der meisten Caspasen sind bekannt, und es stehen Substrate zu Verfügung, deren fluoreszierende Spaltprodukte fluorometrisch erfasst werden können. Das Aminosäuremotiv der bevorzugten Substratschnittstelle im Falle der Caspase 3 ist DEVD-X, so dass als Substrat ein Peptid mit der Folge Ac-DEVD-AMC zur Bestimmung ihrer Aktivität herangezogen wurde. Aus dieser Verbindung kann nach Hydrolyse durch die aktive Caspase 3 das fluoreszierende Spaltprodukt AMC freigesetzt werden.

In einem Vorversuch wurde die Beziehung zwischen eingesetzter Proteinmenge und Enzymaktivität untersucht. Sie war unter den Versuchsbedingungen in einem Bereich von $15 - 75 \ \mu$ g eingesetztem Protein linear. Zur Bestimmung der Caspase 3-Aktivität in den behandelten Zellen wurden deswegen jeweils 60 μ g Proteinextrakt eingesetzt. Das Protein wurde in 140 μ l Proteinlysepuffer aufgenommen, direkt vor der Messung mit 5 nmol Ac-DEVD-AMC (Biomol, Hamburg) versetzt und auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben (Nunc, Wiesbaden). Die Standardreihe bestand aus 140 μ l Proteinlysepuffer, dem freies AMC in einer Menge von 0 – 5 nmol hinzugegeben wurde. Die Fluoreszenz wurde im Abstand von 2 min über einen Zeitraum von 90 min bei RT an einem Fluorometer (CytoFluor[™] 2350, Millipore, Eschborn) gemessen. Die Exzitationswellenlänge betrug 380 nm, die Emissionswellenlänge des fluoreszierenden Spaltproduktes 460 nm. Die Menge an aktiver Caspase 3 kann in diesem Zeitraum als konstant angenommen werden. Aus den so gewonnenen Daten wurde die Enzymaktivität der Caspase 3 berechnet [pmol umgesetztes Substrat/60 µg eingesetztes Protein/min].

2.6.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Hoechst-Färbung

Der Hoechst-Farbstoff ist ein membranpermeabler DNA-Farbstoff mit besonderer Affinität zu AT-reichen Regionen, der daher zur Darstellung der Zellkernmorphologie, des Chromatins und zur Detektion z. B. von bakterieller Fremd-DNA eingesetzt wird. Unter Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 355 nm emittiert er bläuliches Licht der Wellenlänge 465 nm. Die Hoechstfärbung diente dazu, apoptotische Zellen anhand ihres kondensierten Chromatins und desintegrierten Kerns von nicht-apoptotischen Zellen zu unterscheiden und somit eine quantitative Aussage über den Anteil apoptotischer Zellen treffen zu können.

PLB-985 Zellen wurden zunächst bei 3000 U/min (Minifuge GL, Heraeus Christ) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Formaldehyd 4% aufgenommen, darin für 10 min inkubiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Ethanol 80% resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden auf einen Objektträger gegeben und gleichmäßig ausgestrichen. Der Objektträger wurde für 10 min getrocknet, zur Fixierung für 10 min in Ethanol 70% gegeben und erneut getrocknet. Alle genannten Schritte wurden bei RT durchgeführt.

Zur Rehydrierung der Zellen wurde der Objektträger nacheinander für jeweils 5 min in Färbeküvetten mit Ethanol 100%, 90% und 75% bzw. PBS pH 7,5 gegeben und anschließend für 5 min in einer abgedunkelten Küvette mit Hoechst 33258 2,4 µM in PBS gefärbt. Für weitere 7 min wurde er mit reinem PBS inkubiert. Danach wurden 1 - 2Tropfen Einbettmedium auf das Präparat gegeben, bestehend aus 2.5% Diazabicyclo(2,2,2)octan in einer Lösung von PBS und Glycerol in einem Verhältnis 1 : 1. Ein Deckgläschen wurde zum Verschluss auf das Präparat gelegt und mit handelsüblichem Nagellack an den Rändern fixiert. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4° C.

Die Objektträger wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) fotografiert und ausgewertet. Hierzu wurde ein UV-Filter mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm eingesetzt. Um den Anteil apoptotischer Zellen quantitativ zu erfassen, wurden jeweils mindestens 200 Zellen eines repräsentativen Ausschnitts ausgezählt.

2.7 Statistik

Statistische Berechnungen zur Einschätzung der Signifikanz von Unterschieden bei Messergebnissen wurden mit dem Programm SPSS Version 12.0 durchgeführt. Es lagen jeweils 3 bis 16 unabhängige Versuche vor. Zunächst wurden zur Testung der Normalverteilungshypothese der Kolmogorov-Smirnov-Test sowie der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde eine One-Way-ANOVA-Analyse angeschlossen. Die Auswahl des Post-Hoc-Tests erfolgte nach Ergebnis des Levene-Tests auf Gleichheit der Varianzen des Medians mittels Students-Newman-Keules-Test (Gleichheit der Varianzen) oder Tamhane bzw. Dunnett T3 (nicht anzunehmende Gleichheit der Varianzen). Konnte eine Normalverteilung nicht angenommen werden, wurden Kruskal-Wallis-Test sowie Median-Test als globale Tests verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Differenzierung auf Zellwachstum und Apoptose

3.1.1 Differenzierung mit DMF reduziert die Wachstumsgeschwindigkeit von PLB-985 Zellen

PLB-985 Zellen differenzieren unter Zugabe von DMF 0,5% in granulozytäre Richtung. Ein Merkmal von differenzierten Zellen ist die Einschränkung der Proliferationsfähigkeit. Um dieses Merkmal zu überprüfen, wurden PLB-985 Zellen in einer Dichte von 0,2 bzw. 1,0 x 10⁵/ml Medium über sechs Tage mit 0,5% DMF inkubiert. Täglich wurde die Anzahl der Zellen bestimmt und aus diesen Werten eine Wachstumskurve abgeleitet. Nach Inkubation der PLB-985 Zellen mit 0,5% DMF konnte eine Wachstumsverlangsamung festgestellt werden (Abb. 1). Die Verdopplungszeit in den undifferenzierten PLB-985 Zellen lag bei ca. einem Tag, bei differenzierten Zellen bei etwa 2,5 Tagen. Bei den in höherer Dichte ausgesäten PLB-985 Zellen mit und ohne 0,5% DMF ließ sich am Ende der Beobachtungszeit ein Abflachen der Wachstumskurve beobachten (Abb. 1 B).



Abb. 1: PLB-985 Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte von $0,2 \times 10^5$ /ml Zellen (**A**) bzw. 1 x 10^5 /ml Zellen (**B**) über acht Tage unter Standardbedingungen mit und ohne 0,5% DMF inkubiert. Tägliche Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer und Auswertung als Wachstumskurve (angegeben wurde die Gesamtzellzahl in 10 ml Medium).

3.1.2 Mit DMF differenzierte PLB-985 Zellen produzieren reaktive Sauerstoffspezies ("oxidative burst")

Eine Eigenschaft von differenzierten Granulozyten ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation durch das Peptid fMLP. Um zu überprüfen, ob PLB-985 Zellen diese Differenzierungseigenschaft nach Behandlung mit 0,5% DMF erlangen, wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation gemessen. Über sechs Tage mit DMF 0,5% inkubierte PLB-985 Zellen wurden hierfür nach Zusatz von NADPH mit 1 mM fMLP und 1 μ M TPA stimuliert (Abb. 2). Sie zeigten einen Anstieg der Produktion von Superoxidanionen von 18 auf 819 relative Light Units/s (rLU/s). Der Zeitpunkt der maximalen Lichtemission war nach 43 min erreicht. Die nicht differenzierten PLB-985 Zellen zeigten im Vergleich eine relativ konstante Lichtemission um 15 bis 40 rLU/s.



Abb. 2: Induktion des "oxidative burst" mit 1 mM fMLP und 1 μ M TPA im Lucigenin-Assay. PLB-985 Zellen wurden über sechs Tage mit 0,5% DMF inkubiert (O), Negativkontrolle ohne Zugabe von DMF (\bullet). Nach Zugabe von Lucigenin Messung der Lichtemission als Maß für die Menge an sezernierten ROS mittels Luminometer. Stimulation der ROS-Sekretion durch Zugabe von 1 mM fMLP und 1 μ M TPA 15 min nach Beginn der Messung.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden PLB-985 Zellen nach Differenzierung mit 0,5% DMF über sechs Tage mit steigenden Konzentrationen von NADPH sowie 1 mM fMLP versetzt. Anschließend wurde die Lichtemission nach Zugabe von 1 μ M TPA mit

einer Kontrolle ohne TPA verglichen (Abb. 3). Dabei zeigte sich eine gesteigerte Lichtemission nach Zugabe von TPA (p < 0,05 bei 250 und 500 μ M NADPH). Eine gesteigerte Produktion von Superoxidanionen nach Stimulation der PKC mit TPA konnte anhand dieser Ergebnisse gezeigt werden.



Abb. 3: Induktion des "oxidative burst" mit 1 mM fMLP in Abhängigkeit von TPA im Lucigenin-Assay. PLB-985 Zellen wurden über 6 d mit 0,5% DMF inkubiert. Zugabe des Substrats NADPH in steigender Konzentration. Stimulation der ROS-Sekretion mit 1 mM fMLP sowie von 1 μ M TPA (\bullet), Negativkontrolle ohne TPA (\circ). 45 min nach Zugabe von Lucigenin Messung der Lichtemission als Maß für die Menge an sezernierten ROS mittels Luminometer. n=5, Darstellung von Mittelwert +/- Standardabweichung.

3.1.3 Differenzierung mit DMF schützt PLB-985 Zellen vor Wärme-induzierter Apoptose

PLB-985 Zellen wurden in undifferenziertem Zustand und nach Ausdifferenzierung mit DMF 0,5% über sechs Tage für 1 h bei Temperaturen von 37° C bis 43° C inkubiert und 18 h später untersucht (Abb. 4). Eine etwaige Wärme-induzierte Apoptose wurde anhand der nukleosomalen DNA-Spaltung mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei den unbehandelten PLB-985 Zellen war eine Temperaturabhängigkeit der DNA-Fragmentierung darstellbar: Nach Behandlung mit 37° C ließ sich nur intakte genomische DNA (gDNA) nachweisen. Bei 42° C war eine beginnende DNA-Fragmentierung zu beobachten. Bei 43° C konnte die typische DNA-Leiter 18 h nach Exposition gezeigt werden. Die Zellvitalität sank dabei von 93% ohne Wärmeexposition auf 65% bzw. 55% bei 42° C bzw. 43° C, jeweils bezogen auf eine Vitalität von 100% zum Zeitpunkt 0 h und bestimmt mittels Trypanblau-Färbung.

Im Gegensatz hierzu war bei den über sechs Tage mit DMF behandelten PLB-985 weder bei 42° C noch bei 43° C eine DNA-Leiter zu beobachten. Die Zellvitalität war unter den genannten Temperaturen nicht beeinträchtigt. Sie betrug 92% bzw. 90% 18 h nach Wärmeexposition. Eine Differenzierung der PLB-985 Zellen mit DMF scheint somit vor Wärme-induzierter Apoptose zu schützen.



Abb. 4: A DNA-Gelelektrophorese von PLB-985 Zellen 18h nach einstündiger Wärmeexposition bei 37°, 40,5°, 41°, 42°, 43°C. *Pre*: Negativkontrolle ohne Wärmebehandlung. **B** DNA-Gelelektrophorese von PLB-985 Zellen nach Inkubation mit 0,5% DMF über 6d nach Wärmebehandlung mit der angegebenen Temperatur für 1h. Spalte 1: 100 bp – Marker. Vitalitätstestung durch Trypanblaufärbung.

3.2 Einfluss von Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose bei PLB-985 Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose untersucht. Dazu wurde die PKC durch Zugabe von 5 oder 50 nM TPA stimuliert. In einem Vorversuch wurde der Einfluss der eingesetzten Chemikalien auf die Zellvitaliät in nicht wärmebehandelten PLB-985 Zellen untersucht. Statistisch zeigte sich eine signifikante Vitalitätsminderung nach Einwirkung von 50 nM TPA, wobei die Vitalität noch 88% betrug (Abb. 5). Nach Zugabe von 5 nM TPA hingegen kam es zu einer statistisch signifikanten Vitalitätssteigerung auf 106%. Das Lösungsmittel DMSO hatte in entsprechender Konzentration keinen Effekt auf die Vitalität.



Abb. 5: Zellvitalität von PLB-985 Zellen nach PKC-Stimulation mit TPA. MTT-Assay von PLB-985 Zellen ohne Zusatz (---) sowie nach Inkubation für 24 h mit 5 bzw. 50 nM TPA oder 0,005% DMSO. n=16, Darstellung von Mittelwert +/- Standardabweichung. * p < 0,05.

3.2.1 TPA induziert die Isoformen α , β , γ , δ und ι der PKC und bewirkt eine Translokation in die Partikelfraktion

Der Phorbolester TPA aktiviert die klassischen und neuen Isoformen der PKC. Die Aktivierung geht typischerweise mit einer Translokation der Isoformen aus der Zytosolfraktion in die Partikelfraktion einher. Um zu überprüfen, ob die Behandlung der PLB-985 Zellen mit 5 bzw. 50 nM TPA zu einer Aktivierung der PKC führt, wurde die zelluläre Lokalisation der verschiedenen PKC-Isoformen untersucht. PLB-985 Zellen wurden für 1 bzw. 24 h mit TPA 5 bzw. 50 nM inkubiert. Danach wurden eine Zellfraktionierung (Partikelfraktion und Zytosolfraktion) mittels Ultrazentrifugation sowie anschließende Westernblots der einzelnen Proteinfraktionen durchgeführt (Abb. 6). Als Kontrolle für den Expressionsnachweis der verschiedenen PKC-Isoformen wurde ein Proteinextrakt aus Rattenhirngewebe verwendet (Positivkontrolle). In den PLB-985 Zellen ließ sich eine starke Induktion der Isoformen α , β , γ , δ und ι nach 1 bzw. 24 h Vorbehandlung mit 5 nM TPA im Vergleich zu unbehandelten PLB-985 Zellen nachweisen. Die genannten Isoformen ließen sich sowohl in der Zytosol- als auch in der Partikelfraktion nachweisen. Bei den Isoformen α und γ war außerdem nach 24 h eine Zunahme des Anteils in der Partikelfraktion gegenüber der zytosolischen Fraktion zu beobachten, was für eine Aktivitätssteigerung der PKC spricht. Nach Inkubation mit 50 nM TPA für eine Stunde war für die Isoformen α , β , γ , δ und ι ebenfalls eine Induktion zu beobachten, wobei die Isoformen α , β und γ nach 24 h in beiden Fraktionen nur noch in geringem Maße nachweisbar waren. Die Isoformen δ und ι waren auch nach 24 h noch in beiden Fraktionen deutlich nachweisbar. Die Isoform ε war kaum TPA-abhängig induzierbar und am ehesten nach Inkubation mit 5 nM TPA für 24 h und mit 50 nM für 1 h bei nahezu vollständiger Translokation in die Partikelfraktion nachweisbar. Anhand dieser Westernblots konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der PLB-985 Zellen mit 5 bzw. 50 nM TPA in der Tat zu einer gesteigerten Expression und Aktivierung der PKC führt.



Abb. 6: Nachweis der PKC-Isoformen α , β , γ , δ , ε und ι aus PLB-985 Zellen nach Zellfraktionierung. Inkubation von PLB-985 Zellen mit und ohne 5 bzw. 50 nM TPA über 1 bzw. 24 h. Gewinnung von Zytosolund Partikelfraktion durch Zellfraktionierung mittels Ultrazentrifugation. Positivkontrolle aus Rattenhirn. Proteinnachweis mittels Westernblot.

3.2.2 Vitalität von PLB-985 Zellen nach Wärmebehandlung

Der Einfluss der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose wurde in PLB-985 Zellen zunächst mittels MTT-Assay untersucht. Dazu wurden die Zellen parallel zur Wärmebehandlung mit PKC-Aktivator TPA in den Konzentrationen 5 und 50 nM behandelt. 24 h nach

Wärmeexposition gegenüber 43° C zeigte sich in allen Versuchsansätzen ein signifikanter Rückgang der Vitalität (p < 0,001), so z. B. in den unbehandelten Zellen von 100% auf ca. 37% (Abb. 7). Eine Verminderung der Vitalität nach Wärmebehandlung ließ sich in der gleichen Größenordnung auch nach Inkubation mit TPA nachweisen. Die Vitalität lag unter 50 nM TPA jedoch nur bei 30% und war damit signifikant geringer als die der unbehandelten PLB-985 Zellen (p < 0,05). Eine Inkubation mit 5 nM TPA oder DMSO 0,005% hatte zusätzlich zur Wärmebehandlung keinen Einfluss auf die Vitalität.



Abb. 7: Zellvitalität von PLB-985 Zellen nach PKC-Stimulation und Wärmebehandlung. Behandlung von PLB-985 Zellen mit 5 bzw. 50 nM TPA oder 0,005% DMSO, Kontrolle: unbehandelte PLB-985 (---). Wärmebehandlung der PLB-985 Zellen für 1 h bei 43° C. MTT-Assay 24 h nach Wärmebehandlung. pre = PLB-985 Zellen ohne Wärmebehandlung. n=16, Darstellung von Mittelwert +/- Standardabweichung. * p < 0,05, ° p < 0,001.

3.2.3 Lineare Abhängigkeit von Caspase 3-Aktivität und Proteinmenge

Die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 ist ein Hauptmerkmal des apoptotischen Zelltodes. Die Aktivität der Caspase 3 in Zell-Lysaten wurde anhand einer fluorometrischen Messung bestimmt. Dabei wurde ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Peptid, welches die Caspase 3-Erkennungssequenz trägt, eingesetzt. Spaltung des Peptids durch die aktive Caspase 3 führt zu einem Anstieg des messbaren Fluoreszenzsignals. Um zu überprüfen, ob in der verwendeten Nachweismethode die messbare Fluoreszenz mit der Menge der eingesetzten aktiven Caspase 3 korreliert, wurde zunächst die Aktivität der Caspase 3 in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge untersucht. In diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass für die verwendete Methode der fluorometrischen Aktivitätsbestimmung eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Proteinmenge und Aktivität der Caspase 3 besteht (Abb. 8). Daher kann im verwendeten Messbereich von einer Proportionalität zwischen gemessener Fluoreszenz und Aktivität der Caspase 3 ausgegangen werden.



Abb. 8: Lineare Abhängigkeit der Aktivität von Caspase 3 von der eingesetzten Proteinmenge. Fluorometrische Messung der Caspase 3-Enzymaktivität in Zell-Lysaten aus PLB-985 Zellen 18 h nach einstündiger Wärmebehandlung bei 43°C in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge. Enzymaktivität dargestellt als umgesetztes Substrat pro Zeiteinheit [pmol/min], Fluoreszenzfarbstoff Ac-DEVD-AMC. n=3, Darstellung von Mittelwert +/- Standardabweichung.

3.2.4 Abhängigkeit der Caspase 3-Aktivität von der PKC-Stimulation durch TPA in wärmebehandelten PLB-985 Zellen

Zur Beurteilung des Einflusses der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose in PLB-985 Zellen wurde die Caspase 3-Aktivität nach PKC-Stimulation mittels 5 bzw. 50 nM TPA fluorometrisch untersucht.

Die Caspase 3-Aktivität stieg 18 h nach einstündiger Exposition gegenüber 43° C je nach Versuchsansatz auf das drei- bis achtfache der Ausgangsaktivität an (p < 0,001) (Abb. 9).


Abb. 9: Bestimmung der Caspase 3-Aktivität durch fluorometrische Messung in PLB-985 Zellen. pre, ohne Wärmebehandlung bzw. 18 h nach Wärmebehandlung mit 43° C für 1 h. Vorinkubation für 1 h mit 5 bzw. 50 nM TPA. Kontrolle: unbehandelte PLB-985 Zellen (---). n=5, Darstellung von Median (Balken) sowie oberer und unterer Quartile (Box). * p < 0.05, ° p < 0.001.

Hierbei gab es einen signifikanten Unterschied mit Verstärkung der apoptotischen Enzymaktivität unter 50 nM TPA im Vergleich zu 5 nM TPA (p < 0,05), ein Unterschied zu nicht behandelten PLB-985 Zellen war zwar erkennbar, aber statistisch nicht signifikant.

In den nicht wärmebehandelten Zellen war ein statistisch signifikanter Unterschied mit Verminderung der Caspase 3-Aktivität unter 50 nM TPA im Vergleich zu 5 nM TPA bzw. unbehandelten PLB-985 Zellen zu beobachten (p < 0,05). Allerdings waren die absoluten Extinktionsunterschiede so gering, dass die Relevanz fraglich bleibt.

3.2.5 Einfluss der PKC-Aktivität auf die nukleosomale DNA-Fragmentierung nach Wärmebehandlung von PLB-985 Zellen

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der PKC auf die DNA-Fragmentierung nach Wärmeexposition der PLB-985 Zellen untersucht. Dazu wurde gDNA isoliert und eine DNA-Gelelektrophorese 18 h nach einstündiger Wärmeexposition gegenüber 37°C, 40,5°C, 41°C, 42°C und 43°C durchgeführt. Dabei wurden sowohl unbehandelte PLB-

985 Zellen untersucht als auch PLB-985 Zellen nach Stimulation der PKC mit 5 bzw.50 nM TPA (Abb. 10).



Abb. 10: DNA-Fragmentierung in wärmebehandelten PLB-985 Zellen nach PKC-Stimulation. DNA-Gelelektrophorese von PLB-985 Zellen 18 h nach einstündiger Wärmebehandlung bei 37°, 40,5°, 41°, 42°, 43° C. pre, Kontrolle ohne Wärmebehandlung. M, 100 bp-Marker. A PLB-985 ohne/mit 5 nM TPA. B PLB-985 ohne/mit 50 nM TPA. pre*, Inkubation mit 50 nM TPA über 20 h ohne Wärmebehandlung.

Bei den Versuchsansätzen mit PLB-985 Zellen mit und ohne 5 nM TPA in Abb. 10 A konnte die Ausbildung einer typischen DNA-Leiter nach Exposition gegenüber einer Temperatur von 43° C für 1 h beobachtet werden. Stimulation der PKC mit 5 nM TPA für eine Stunde ohne Wärmeexposition bewirkte keine DNA-Fragmentierung (Abb. 10 A, 5 nM TPA, pre). Eine einstündige Inkubation mit 50 nM TPA allein bewirkte keine Apoptose, allerdings sah man nach Inkubation mit 50 nM TPA für 20 h auch ohne Wärmeexposition eine beginnende DNA-Fragmentierung (Abb. 10 B, pre*). Außerdem war nach einstündiger Vorinkubation mit 50 nM TPA und zusätzlicher Wärmebehandlung bereits bei den Temperaturen 37° und 40,5° C eine beginnende DNA-Fragmentierung zu beobachten, die maximale Ausprägung lag ab einer Temperatur von 41° bzw. 42° C vor. Die nicht mit TPA behandelten PLB-985 zeigten eine DNA-Fragmentierung erst nach Wärmebehandlung mit einer Temperatur von 42° bzw. 43° C.

Anhand der genannten Beobachtungen ist eine Verstärkung wärmeinduzierter Apoptose unter Stimulation der PKC in PLB-985 Zellen mit 50 nM TPA anzunehmen.

3.2.6 Nachweis von apoptotischer Kernfragmentierung mittels Hoechstfärbung

Zur Überprüfung des in der Caspase 3-Messung und in der DNA-Gelelektrophorese erkennbaren Effekts einer verstärkten Wärme-induzierten Apoptose nach PKC-Aktivierung mit 50 nM TPA untersuchten wir abschließend den Einfluss von PKC-Aktivierung auf die Wärme-induzierte Apoptose mittels Hoechst-Färbung als quantitativer Methode (Abb. 11).

18 h nach Wärmebehandlung mit 43° C sahen wir bei unbehandelten PLB-985 Zellen einen Anteil an Zellen mit fragmentiertem Zellkern von ca. 53% (Abb. 11 A und D), unter 50 nM TPA von ca. 66% im Median (Abb. 11 B und D). In der statistischen Auswertung ließen sich jedoch bei großer Streuung keine signifikanten Unterschiede zwischen wärmebehandelten PLB-985 nach Inkubation mit TPA und nicht vorbehandelten Zellen erkennen, sondern nur ein entsprechender Trend (p = 0,178) (Abb. 11 D).

Die aufgrund der Caspase 3-Aktivitätsbestimmung sowie der DNA-Gelelektrophorese aufgestellte Hypothese, dass eine Stimulation der PKC mittels 50 nM TPA die wärmeinduzierte Apoptose verstärken könnte, ließ sich in der Höchstfärbung statistisch nicht bestätigen.



Abb. 11: Hoechstfärbung von PLB-985 Zellen. **A** PLB-985 Zellen 18 h nach Wärmebehandlung von 43° C für 1 h. **B** 18 h nach 43° C nach Vorinkubation für 1 h mit 50 nM TPA. **C** Vergrößerter Ausschnitt mit vitaler und apoptotischer Zelle. **D** PLB-985 Zellen 18 h nach 43° C für 1 h; statistische Auswertung durch Zellzählung, n=3 unabhängige Experimente, Auszählung von min. 200 Zellen.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Zelldifferenzierung für die Auslösung von Apoptose

Beobachtungen, dass Differenzierung von normalen oder entarteten Zellen sich auf deren Proliferation, das Verhalten gegenüber externen Stressoren und ihre Empfindlichkeit gegenüber Apoptose auswirkte, führte zu den hier gewählten Experimenten mit dem in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Modell der wärmeinduzierten Apoptose.

4.1.1 Behandlung von PLB-985 Zellen mit DMF führt zu einer Wachstumsverlangsamung

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Dimethylformamid (DMF)-vermittelter Differenzierung der myelomonozytären Leukämiezelllinie PLB-985 in granulozytärer Richtung auf wärmeinduzierte Apoptose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die 0.5% DMF über differenzierten sich mit acht Tage Zellen in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit gegenüber nicht behandelten PLB-985 signifikant unterscheiden. Die differenzierten PLB-985 Zellen wuchsen langsamer und zeigten eine Verdopplungszeit von 2,5 Tagen gegenüber einer Verdopplungszeit von ca. einem Tag bei PLB-985 Zellen ohne DMF-Behandlung. Dieses verlangsamte Wachstum ist ein typisches Merkmal von differenzierten gegenüber unreiferen Zellen. Die Wachstumsgeschwindigkeit war außerdem abhängig von der Dichte der Zellen, was bei der mehrtätigen wahrscheinlichsten unterschiedlichen Beobachtungsdauer am mit der Substratverfügbarkeit zu erklären ist.

4.1.2 PLB-985 Zellen erfüllen nach Behandlung mit DMF morphologische und funktionelle Kriterien der granulozytären Differenzierung

In Pappenheimfärbungen konnte über die Ausbildung von gelappten Kernen sowie die Bildung von Granula morphologisch die Differenzierung in neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Mit der NBT-Färbung, in der nach Einwirkung von starken Oxidantien ein Farbumschlag von gelb nach blau stattfindet, wurden nach Stimulation mit dem bakteriellen Peptid fMLP reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte mittels eines Lucigeninassays gezeigt werden, dass die mit DMF differenzierten PLB-985 in der Lage waren, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), in diesem Fall Superoxidanionen, nach Stimulation zu sezernieren. Daher besaßen differenzierte PLB-985 nicht nur morphologisch Ähnlichkeit mit differenzierten neutrophilen Granulozyten, sondern waren darüber hinaus auch funktionell aktiv.

Interessanterweise war die Produktion von ROS, die durch fMLP induziert wurde, durch zusätzliche Gabe des PKC-Stimulators TPA noch steigerbar, so dass eine Involvierung der PKC in der Aktivierung der NADPH-Oxidase bei PLB-985 Zellen nahe liegend scheint. Diese Vermutung ist vereinbar mit den Ergebnissen von Pedruzzi et. al., die zeigten, dass bei mit DMF differenzierten PLB-985 die fMLP-induzierte ROS-Produktion durch GF109203X/BIM I, einen Inhibitor der PKC, gehemmt werden kann (Pedruzzi *et al.*, 2002). Außerdem konnte inzwischen die Rolle von Aktivierung der PKC im Rahmen der Aktivierung und Translokalisation der einzelnen Untereinheiten der NADPH-Oxidase in weiteren Zellmodellen bestätigt werden (Inoguchi *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2006).

4.1.3 Differenzierung von PLB-985 Zellen mit DMF inhibiert Wärme-induzierte Apoptose

Nachdem sowohl durch morphologische Methoden als auch in funktionellen Tests die granulozytäre Differenzierung der PLB-985 Zellen mittels DMF bestätigt werden konnte, wurde der Einfluss dieser Differenzierung auf das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell der wärmeinduzierten Apoptose untersucht. Wir konnten zeigen, dass die wärmeinduzierte Apoptose, die ab einer Grenztemperatur von 42° C auftrat, durch die Differenzierung in granulozytäre Richtung mit DMF inhibiert wurde (Katschinski et al., 1999). Außerdem konnte in unserer Arbeitsgruppe in weiterführenden Versuchen nachgewiesen werden, dass der Mechanismus für wärmeinduzierte Apoptose bei PLB-985 Zellen auf einer autokrinen TNF α -Sekretion beruht. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Gonzalez et al, die in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP einen autokrinen Mechanismus für TNF α und TRAIL bei TPA-induzierter Apoptose nachweisen konnten (Gonzalez-Guerrico und Kazanietz, 2005). Auch bei LPS-induzierter Apoptose in Makrophagen scheint autokrin sezerniertes TNF α verantwortlich zu sein (Comalada et al., 2003). Ebenso wurde bei Apoptose nach Exposition von CLL-Zellen gegenüber Fludarabin nach Triggerung von CD40 eine autokrine Sekretion sowohl von TNF α als auch von IFN γ gefunden (de Totero *et al.*, 2003).

Die TNF α -Sekretion von PLB-985 Zellen war nach Differenzierung mit DMF über sechs Tage nicht mehr nachweisbar (Katschinski *et al.*, 1999). Vereinbar mit diesen Ergebnissen

unserer Arbeitsgruppe sind die Beobachtungen von Schling et al., die während der Differenzierung von humanen Monozyten aus peripherem Blut eine reduzierte Expression von TNF α fanden (Schling *et al.*, 2006). Die ebenfalls gefundene reduzierte Expression von TNFR2 steht allerdings im Gegensatz zu den durch unsere Arbeitsgruppe gefundenen Ergebnissen, da in mit DMF behandelten sowie in unbehandelten PLB-985 Zellen die TNFR-Expression unverändert war (Katschinski *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen scheint bei der monozytären Differenzierung der Promyelozyten-Zelllinie HL-60 eine autokrine Sekretion von TNF α vorhanden und für die Differenzierung notwendig zu sein (Peiretti *et al.*, 2003).

In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe wurden Anteile der Signaltransduktion oberhalb der TNF α -Produktion untersucht. Offensichtlich spielten bei der TNF α -Sekretion reaktive Sauerstoffspezies eine Rolle, da die wärmeinduzierte Apoptose bei unbehandelten PLB-985 Zellen durch Zugabe des Antioxidans PDTC verhindert werden konnte. Es ist aus verschiedenen Zelllinien bekannt, dass Differenzierung zu einer höheren Konzentration von antioxidativen Enzymen führt. So konnte z. B. in differenzierten PLB-985 eine gesteigerte Expression von Glutathionperoxidase nachgewiesen werden (Shen et al., 1994). In HL-60 Zellen konnte nach Zugabe von Oxidantien zu differenzierten Zellen eine niedrigere Inzidenz von DNA-Schädigung im Vergleich zu nicht differenzierten Zellen gezeigt werden, was auf einen erhöhten Gehalt an antioxidativen Enzymen zurückgeführt wurde (Covacci et al., 2001). Interessanterweise fanden Champelovier et al. heraus, dass in U937 Zellen, bei denen TPA-induzierte Apoptose ebenfalls durch autokrin sezerniertes TNF α vermittelt wurde, das antioxidative Enzym Mangan-Superoxid-Dismutase einen antiapoptotischen Effekt hatte (Champelovier et al., 2000). Eine Erklärungsmöglichkeit für die Beobachtungen der fehlenden Empfänglichkeit für wärmeinduzierte Apoptose wäre folglich, dass in differenzierten PLB-985 Zellen eine erhöhte Konzentration von antioxidativen Enzymen für niedrigere Konzentrationen von ROS und damit für die fehlende TNF α -Sekretion verantwortlich sein könnte.

Eine weitere Möglichkeit, wie Behandlung und Differenzierung mittels DMF die Sensibilität gegenüber wärmeinduzierter Apoptose verändern könnte, wäre beispielsweise durch die Beeinflussung alternativer Splice-Varianten verschiedener pre-RNAs, wie es Bolduc et al. für DMSO und DMF beschrieben haben (Bolduc *et al.*, 2001). Für verschiedene pro- und antiapoptotische Proteine ist eine Regulation durch alternatives Splicing beschrieben (Schwerk und Schulze-Osthoff, 2005). Hierüber ist zusätzlich zur Transkriptionsebene eine weitere Regulationsmöglichkeit des programmierten Zelltods gegeben. Es wäre daher interessant, in PLB-985 Zellen mit und ohne DMF-Behandlung mittels Westernblot-Analysen nach verschiedenen Splice-Varianten u. a. für Bcl-2 zu suchen.

4.2 PKC und ihre Bedeutung für Wärme-induzierte Apoptose

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir den Einfluss von Stimulation der PKC auf das bereits beschriebene Modell der wärmeinduzierten Apoptose in der Leukämie-Zelllinie PLB-985. Im MTT-Assay zeigte sich eine geringe Toxizität durch 50 nM TPA, die wir bei einer Vitalität von 88% nach Inkubation mit 50 nM TPA als vernachlässigbar ansahen.

4.2.1 Die PKC-Isoenzyme lassen sich durch TPA differentiell induzieren

Die Aktivierung der PKC geht mit mehreren Phosphorylierungsschritten und einer Translokation des Enzyms an membranhaltige Zellbestandteile einher. Dadurch wird eine Nachbarschaft zu entsprechend lokalisierten Substraten verschiedener Unterenzyme der PKC hervorgerufen (Gutcher *et al.*, 2003). Zunächst wurde daher in einem ersten Schritt mittels Zellfraktionierung und anschließendem Westernblot nachgewiesen, dass im zu untersuchenden Zellmodell PLB-985 die Isoformen PKC α , β , γ , δ und ι (sowie in sehr geringem Ausmaß PKC ε) erst nach Stimulation durch 5 und 50 nM TPA exprimiert werden. Dies gilt für die Einwirkung von beiden Konzentrationen über eine Stunde sowie für die Inkubation mit 5 nM TPA für 24 h.

Interessanterweise sind nach Inkubation mit 50 nM TPA für 24 h das Isoenzym α nicht mehr und die Isoenzyme β und γ nur noch in geringem Ausmaß in beiden Fraktionen nachweisbar. Eine Herunterregulation der PKC nach Aktivierung mittels TPA wurde bereits mehrfach beschrieben (Gutcher *et al.*, 2003). Beispielsweise fanden Lu et al. in der Fibroblasten-Zelllinie 3Y1 nach mindestens sechsstündiger Inkubation mit TPA eine Herunterregulation der Isoenzyme α , δ und ε , welche durch Ubiquitinierung und einen anschließenden proteasomalen Abbau hervorgerufen wurde (Lu *et al.*, 1998).

Ebenfalls bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass die Isoform ι, obwohl sie als atypische Isoform eigentlich unabhängig von TPA, DAG und Kalzium aktiviert werden sollte (Gutcher *et al.*, 2003, Toker, 1998), in PLB-985 Zellen durch die Inkubation mit beiden Konzentrationen TPA stark induziert wird. Eine Beeinflussbarkeit der Expression dieses Isoenzyms konnte in anderen Zelllinien, wie z. B. der Fibroblasten-Linie NIH 3T3 oder der Oligondendrozyten-Linie CG-4, nicht gezeigt werden und scheint ein bisher unbekannter Effekt und vom Zelltyp abhängig zu sein (Kazi und Soh, 2007, Kobayashi *et al.*, 2001). Zu diskutieren wäre auch eine klonale Selektion innerhalb der PLB-985 Zellen. Während der neutrophilen Differenzierung durch G-CSF ist eine Aktivierung der PKC u auch bei der Promyelozyten-Linie HL-60 nachweisbar (Kanayasu-Toyoda *et al.*, 2007). Interessanterweise konnten Kim et al. zeigen, dass in HL-60 Zellen, die durch TPA in monozytärer Richtung differenziert werden, über eine Aktivierung der PI3-Kinase eine sekundäre Aktivierung der atypischen PKC ζ stattfindet und diese essentiell für die Entwicklung des monozytären Phänotyps ist (Kim *et al.*, 2001). Eine Aktivierung der PKC u stromabwärts der PI3-Kinase konnte z. B. in der Phäochromozytom-Linie PC-12 bereits beschrieben werden (Wooten *et al.*, 2000).

Da eine direkte Aktivierung der PKC t durch TPA mangels einer entsprechenden Bindungsstelle nicht in Frage kommt, ist eine indirekte Aktivierung, z. B. stromabwärts der PI3-Kinase, zu diskutieren. Entsprechende weiterführende Experimente mit Aktivitätsassays dieses Enzyms und evtl. Vorbehandlung durch einen spezifischen Inhibitor, z. B. Aurothioglucose, wären in der Fortsetzung der vorliegenden Arbeit denkbar (Stallings-Mann *et al.*, 2006).

4.2.2 Wärme-unabhängige Apoptoseinduktion durch TPA

Nach diesen Vorversuchen, in denen eine Stimulation der PKC-Isoformen α , β , γ , δ und ι durch TPA in den Konzentrationen 5 und 50 nM nachgewiesen werden konnte, wurden die eigentlichen Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit wärmeinduzierter Apoptose mittels Stimulation der PKC durchgeführt. Als qualitativen Apoptose-Assay nach Exposition von PLB-985 Zellen gegenüber verschiedenen Temperaturen wählten wir erneut die DNA-Gelelektrophorese zum Nachweis der typischen apoptotischen DNA-Leitern. Wir konnten zeigen, dass eine Stimulation der PKC mittels TPA je nach Inkubationsdauer unterschiedliche Effekte hatte. Eine einstündige Inkubation bewirkte keine Apoptose; nach Inkubation von PLB-985 Zellen mit 50 nM TPA für 20 h waren apoptotische DNA-Leitern nachweisbar. Diese Ergebnisse sind insbesondere in Zusammenschau mit den vorher genannten Ergebnissen bemerkenswert, da in unseren Experimenten nach 24 h andauernder Einwirkung von 50 nM TPA offensichtlich ein verändertes Expressionsmuster der einzelnen PKC-Isoenzyme vorlag.

Zum einen war das Isoenzym PKC ı nachweisbar, welches zusätzlich zur bereits erwähnten Rolle bei der Differenzierung myeloider Leukämiezellen auch für Chemotherapieresistenz vom Leukämiezellen wichtig zu sein scheint, antiapoptotisch wirkt und daher auch als Onkogen bezeichnet wird (Baldwin et al., 2006, Gustafson et al., 2004). Neben diesem antiapoptotischen Isoenzym verblieb nach 24 h aber auch eine gesteigerte Expression der PKC δ , für die proapoptotische Eigenschaften beschrieben sind (Brodie und Blumberg, 2003, Reyland, 2007). So führte in HL-60 Zellen eine Überexpression des katalytischen Fragments dieses Isoenyms zu einer nukleären Fragmentierung und zu Apoptose. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Lamin B ein Substrat der PKC δ ist und die anschließende Spaltung von Lamin B durch Caspase 6 als typisches Ereignis während der Ausbildung des apoptotischen Phänotyps durch spezifische Inhibition der PKC δ verhindert werden konnte (Cross *et al.*, 2000). Auch die spontane Apoptose von neutrophilen Granulozyten sowie die TPA-induzierte Apoptose von Prostatakarzinomzellen wird offensichtlich durch die PKC δ vermittelt, da ihre Inhibition in diesen beiden Zelltypen Apoptose verhindern kann (Brodie und Blumberg, 2003, Fujii et al., 2000, Pongracz et al., 1999).

4.2.3 Lässt sich Wärme-induzierte Apoptose durch TPA verstärken?

a) Gelelektrophoretische Daten

In den Temperaturversuchen zeigte sich nach Stimulation der PKC mittels 50 nM TPA eine Verschiebung der zur Induktion von Apoptose notwendigen Grenztemperatur. Im Gegensatz zu unbehandelten PLB-985 Zellen, die nach Exposition gegenüber 42° – 43° C für 1 h eine typische DNA-Leiter zeigten, konnte bei mit 50 nM TPA behandelten Zellen bereits in geringem Maße nach Exposition gegenüber 37° C, ab einer Temperatur von 41° C dann in voller Ausprägung eine nukleosomal fragmentierte DNA nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Sensibilisierung der PLB-985 Zellen gegenüber wärmeinduzierter Apoptose durch Stimulation der PKC postuliert werden. Eine Inkubation mit 5 nM TPA hatte keinen Effekt auf die DNA-Fragmentierung, so dass eine Dosisabhängigkeit vermutet werden kann.

b) Vitalitätsassay

Erwartungsgemäß zeigte sich im MTT-Assay eine Reduktion der Vitalität aller PLB-985 Zellen 24 h nach Wärmebehandlung bei 43° C für 1 h, z. B. von nicht behandelten PLB- 985 Zellen auf 37%. Durch Stimulation der PKC mittels 50 nM TPA konnte eine signifikante weitere Vitalitätsminderung auf ca. 30% nachgewiesen werden. Die verminderte Zellvitalität unter Vorbehandlung mit TPA ist konsistent mit den im Folgenden diskutierten Daten.

c) Caspase 3-Aktivität

Als quantitativen Nachweis von Apoptose führten wir Aktivitätsbestimmungen der Caspase 3 durch. Darin ließ sich sowohl in unbehandelten als auch in mit TPA inkubierten PLB-985 Zellen ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität 18 h nach Wärmebehandlung mit 43° C für 1 h auf das drei- bis achtfache des Ausgangswertes nachweisen.

Dabei zeigte sich eine Steigerung der Caspase 3-Aktivität nach Stimulation der PKC mit 50 nM TPA gegenüber den nicht mit TPA behandelten Zellen von 5,2 auf 8,3 pmol/min, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Eine signifikant gesteigerte Caspase 3-Aktivität konnten wir lediglich in den mit 50 nM TPA behandelten PLB-985 Zellen im Vergleich zu den Zellen nach Vorbehandlung mit 5 nM TPA zeigen.

Die in den nicht wärmebehandelten PLB-985 Zellen gefundenen Unterschiede mit Verminderung der Caspase 3-Aktivität durch 50 nM TPA sind aufgrund der sehr geringen absoluten Unterschiede in ihrer Relevanz fraglich.

Die genannten Ergebnisse mit gesteigerter Apoptose bzw. Zellsterblichkeit durch Stimulation der PKC mit 50 nM TPA in DNA-Gelelektrophorese, Vitalitätsassay und Caspase 3-Aktivität stehen im Einklang mit früheren Ergebnissen der Gruppen MacFarlane (Macfarlane und O'Donnell, 1993), Hansson und Schaar (Hansson *et al.*, 2005) sowie Han (Han *et al.*, 2007). So diente der Phorbolester TPA sowohl bei von AML-Patienten isolierten primären Leukozyten wie auch in der in Kultur gehaltenen Promyelozytenlinie HL-60 als eigentlicher Apoptosestimulus (Hansson *et al.*, 2005, Schaar *et al.*, 2005). Es wurden aber auch Apoptose fördernde Eigenschaften in Zellmodellen mit anderen Apoptosestimuli nachgewiesen. So wurde in der Promyelozytenlinie NB-4 die durch Natriumselenit induzierte Apoptose durch TPA verstärkt, wobei hier die Eigenschaft des Phorbolesters, die Proteinkinase ERK zu aktiveren, als mögliche Ursache für diesen Effekt angesehen wurde (Han *et al.*, 2007). Interessanterweise phosphoryliert TPA in CLL-Zellen, die durch Glukokortikoide in die Apoptose getrieben werden, das proapoptotische Protein Bim (bcl2 interacting mediator of cell death) ebenfalls via ERK, wodurch im weiteren eine proteasomale Degradierung eingeleitet wird (Iglesias-Serret *et al.*, 2007).

Dadurch spielt TPA bei CLL-Zellen eine den Glukokortikoiden entgegen wirkende antiapoptotische Rolle über die Inhibition von Bim.

Zusätzlich gibt es weitere Veröffentlichungen von Arbeitsgruppen, die im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine antiapoptotische, protektive Wirkung von TPA gefunden haben. So wurde durch die Gruppe von Chow et al. – wie in Hanssons Experimenten ebenfalls in der Promyelozyten-Linie HL-60 – gezeigt, dass TPA eine durch Baicalein induzierte Apoptose verhindern konnte. In diesem Fall war die Aktivierung der PKC für diese Fähigkeit essentiell, da sie durch den spezifischen PKC-Inhibitor BIM I unterdrückt werden konnte (Chow *et al.*, 2006).

Die unterschiedlichen Ergebnisse von 5 bzw. 50 nM TPA lassen sich möglicherweise durch die im Westernblot gezeigte unterschiedliche Expression der unterschiedlichen Isoenzyme erklären. So zeigt sich nach 24-stündiger Inkubation mit 50 nM TPA im Vergleich zu 5 nM TPA eine verminderte Expression der überwiegend antiapoptotisch wirkenden Isoenzym PKC α , β und γ . Für die PKC α ist eine gesteigerte Expression in Endometrium-, Prostata- und Blasenkarzinom-Zellen bekannt. Alle drei Isoenzyme standen zeitweise in Verdacht, eine Rolle bei der Entwicklung der Multi-Drug-Resistance zu spielen (Mackay und Twelves, 2007). Dahingegen wird die auch nach Inkubation mit 50 nM TPA für 24 h noch exprimierte PKC δ wie bereits ausgeführt überwiegend als proapoptotisch angesehen. Möglicherweise sind also die Unterschiede zwischen den verschiedenen TPA-Konzentrationen auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Isoenzymen der PKC zurückzuführen.

d) Hoechst-Färbung

Um beurteilen zu können, ob die in der intrazellulären Signaltransduktionskaskade gesehenen Effekte ein Korrelat im phänotypischen Endzustand haben, wurden die mit Wärme behandelten PLB-985 Zellen mittels Hoechstfärbung analysiert. Dabei werden fragmentierte Zellkerne durch den DNA-Farbstoff Hoechst 33258 sichtbar gemacht und können morphologisch von den intakten Zellkernen nicht apoptotischer Zellen unterschieden werden. Es zeigte sich ein Anteil apoptotischer Zellen von 53% der unbehandelten PLB-985 Zellen 18 h nach Exposition gegenüber 43° C. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied von PLB-985 Zellen ohne Modulation der PKC gegenüber solchen, die mit TPA vorbehandelt waren. Damit konnte der zunächst beobachtete Effekt,

dass eine Stimulation der PKC die Wärme-induzierte Apoptose bei PLB-985 erleichtert, durch die Ergebnisse der Hoechstfärbung statistisch nicht bestätigt werden.

4.2.4 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Eine abschließende Aussage über die Rolle der PKC in der Wärme-induzierten Apoptose bei der myelomonozytären Leukämie-Zelllinie PLB-985 kann aus den hier dargelegten Ergebnissen nicht getroffen werden. Ein Grund hierfür liegt in der Wahl des Phorbolesters TPA als Stimulator der PKC. TPA beeinflusst bereits direkt sowohl die klassischen wie auch die neuen Isoformen der PKC. Da für diese beiden Enzymfamilien gegensätzliche Eigenschaften in Bezug auf Apoptose bekannt sind und sie zusätzlich sehr inhomogen sind, ist eine einheitliche Aussage bei gleichzeitiger Aktivierung mehrerer Enzymfamilien nicht möglich. Als Beispiel wären hier die bisher gefundenen antiapoptotischen Aktionsweisen der Subtypen PKC β , γ und ε zu nennen. Eine Überexpression von PKC β II führt beispielsweise in vivo zu einer Hyperproliferation von Kolonepithel und zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen (Murray *et al.*, 1999). Dieser transformierende Effekt von PKC β scheint via Ras, PKC ι und MEK vermittelt zu sein (Zhang *et al.*, 2004).

Als Mitglied der Familie der neuen PKC ist die PKC δ vorwiegend als proapoptotisches Isoenzym bekannt (Reyland, 2007). Für die derselben Familie zugehörige PKC ε konnte hingegen eine entscheidende Rolle in der Chemotherapie-Resistenz von Zellen eines nicht kleinzelligen Bronchial-Karzinoms (NSCLC), die mit Doxorubicin und Etoposid therapiert worden waren, gezeigt werden (Ding *et al.*, 2002). Ein möglicher Angriffspunkt für die antiapoptotische Wirkung von PKC ε ist die Heraufregulation von Bel-xl und XIAP durch eine Aktivierung von MAPKK-ERK (Pardo *et al.*, 2006).

Neben der Tatsache, dass die einzelnen stimulierten PKC-Subgruppen in sich sehr inhomogen sind, wird die Interpretation der Ergebnisse bei der Verwendung von TPA dadurch erschwert, dass es außer den einzelnen PKC-Isoenzymen weitere Phorbolesterabhängige intrazelluläre Rezeptoren gibt, deren Signaltransduktionswege teilweise mit den durch PKC beeinflussten Wegen interagieren und die Effekte daher in unseren Experimenten nicht voneinander zu trennen sind. Dazu gehören die Proteinkinasen PKD1, 2 und 3, die RasGRP (Ras guanyl nucleotide releasing proteins) und DGK (Diacylglycerol-Kinasen) (Griner und Kazanietz, 2007). Diese enthalten analog zu den cPKC und nPKC eine C1-Domäne und sind daher durch TPA induzierbar. Für die PKD2 ist beschrieben, dass sie in der Reaktion myeloider Leukämiezellen auf oxidativen Stress die Bcr/Ablinduzierte NF κ B-Aktivierung vermittelt (Mihailovic *et al.*, 2004). Transgene Mäuse mit erhöhter RasGRP1-Expression entwickeln häufiger Thymus-Lymphome (Klinger *et al.*, 2005). Die sowohl in der Signaltransduktion der PKC wie auch der erwähnten weiteren Phorbolester-Rezeptoren relevanten intrazellulären Enzyme sind z. B. ERK, das durch RasGRP1 und 3, aber auch durch PKC ε aktiviert werden kann (Coughlin *et al.*, 2005, Pardo *et al.*, 2006) und NF κ B, das sowohl durch PKC β , δ und ζ als auch durch PKD1 und 2 aktiviert wird (Mihailovic *et al.*, 2004, Storz *et al.*, 2004).

Für die Bewertung der differentiellen Effekte von TPA auf Wärme-induzierte Apoptose ist zusätzlich seine Eigenschaft als Induktor monozytärer Differenzierung bei myeloiden Leukämiezellen von Bedeutung (Matsumoto *et al.*, 2006). In unseren Experimenten entwickelten die Zellen nach Inkubation mit TPA Eigenschaften monozytärer Differenzierung wie Adhärenz an der Zellkulturflasche und Ausbildung von Pseudopodien (Daten nicht gezeigt). Passend hierzu wurde in unseren Versuchen die Isoform PKC β induziert, für die eine essentielle Rolle in der monozytären Differenzierung bereits beschrieben war (Laouar *et al.*, 2001, Slosberg *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur Differenzierung in neutrophile Richtung scheint die Differenzierung in monozytäre Richtung mittels TPA die PLB-985 Zellen nicht vor Wärme-induzierter Apoptose zu schützen. Hier wären weiter führende Experimente zu diskutieren, in denen adhärente mit nicht adhärenten Zellen nach TPA-Exposition miteinander verglichen werden, insbesondere im Hinblick auf die Expression der unterschiedlichen PKC-Isoenzyme und auf das Ausmaß an apoptotischen Zellen.

Um den Einfluss der PKC und ihrer Isoformen auf die z. B. durch Wärme induzierte Apoptose weiter einzugrenzen, dienen üblicherweise außerdem Versuche mit einem spezifischen Inhibitor. Im Rahmen dieser Dissertation hatten wir uns für das häufig eingesetzte Bisindolylmaleimid I (BIM I) entschieden, der für die PKC α , β I, β II, γ , δ und ϵ spezifisch ist. Die durchgeführten Experimente lieferten allerdings inkonsistente Ergebnisse und wurden daher nicht gezeigt. Letztlich gilt auch für die Wahl des PKC-Inhibitors, dass Aussagen über die Rolle der PKC in Wärme-induzierter Apoptose wahrscheinlich nur dann getroffen werden können, wenn die gewählte Substanz nur eine einzelne Isoform beeinflusst und deren Effekt spezifisch untersuchen lässt, was für BIM I nicht gilt. Unabhängig vom verwendeten PKC-Stimulator bzw. –Inhibitor hat auch die Wahl der Zelllinie entscheidende Auswirkungen auf die Ergebnisse, da die Expression der PKC-Isoenzyme und der Ankerproteine RACKs, die deren intrazelluläre Translokation nach Aktivierung bestimmen, je nach Zelltyp sehr unterschiedlich ist (Liu und Heckman, 1998).

Der gewählte Apoptose-Stimulus Wärme stellt einen weiteren Einflussfaktor dar. Wärme kann auf verschiedene Weisen zum Zelltod führen, neben der Apoptose kann auch die Nekrose der exponierten Zellen resultieren. In der Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Assay, die eine signifikante Minderung nach Exposition gegenüber TPA zeigte, werden sowohl nekrotische als auch apoptotische Zellen erfasst, so dass die Diskrepanz zu den Daten aus der Hoechst-Färbung, die lediglich einen Trend in Richtung einer Apoptosesteigerung unter TPA zeigten, zum Teil möglicherweise auf einen Anteil an nekrotischen Zellen zurück zu führen ist.

Die Fragestellung nach der Bedeutung der PKC innerhalb der apoptotischen Signaltransduktion ist aufgrund der beschriebenen Interaktionen als äußerst komplex anzusehen. Wie anhand unserer Arbeit gezeigt werden konnte, ist für weitere Arbeiten die Wahl spezifischerer Modulatoren einzelner Isoenzyme der PKC notwendig, beispielsweise von LY333531 oder Enzastaurin als spezifische Inhibitoren der PKC β (Mackay und Twelves, 2007, Serova et al., 2006). Ergänzend wären auch Untersuchungen mit Hilfe von Überexpression einzelner Unterformen durch Transfektion von Zellkulturen oder in in vivo-Modellen denkbar. Ob sich aus den so gewonnenen Kenntnissen therapeutische Möglichkeiten ergeben, z. B. um mittels gezielter PKC-Modulation - im Sinne einer "targeted therapy" – Tumorerkrankungen behandeln zu können, bleibt bislang offen. Es gab allerdings einige viel versprechende Ergebnisse: Bereits 1998 wurde TPA intravenös zur Therapie der AML FAB M3 eingesetzt, unter der Rationale, den Differenzierungsstopp auf der Stufe der Promyelozyten zu überwinden (Han et al., 1998, Strair et al., 2002). Aufgrund von Nebenwirkungen wie passagerem Fieber, Dyspnoe und Makrohämaturie wurde dieses Therapiekonzept bei nur geringem klinischem Erfolg und inkonsistenten Auswirkungen auf den immunologischen Phänotyp der Leukämiezellen bislang nicht weiter verfolgt. Außerdem kam das Antisense-Oligonucleotid Aprinocarsan als PKC a-Inhibitor in Phase I und II-Studien in Kombination mit Carboplatin und Gemcitabine bei NSCLC zum Einsatz (Ritch *et al.*, 2006), wobei der sich initial abzeichnende Erfolg in Phase III-Studien bislang nicht bestätigen ließ (Paz-Ares *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier beschriebenen Ansätze der Beeinflussung von Apoptose durch Differenzierung und Stimulation der PKC in der aktuellen Literatur anhaltend kontrovers diskutiert werden. Die Ergebnisse präklinischer und klinischer Studien sind aufgrund der dargestellten Verquickung der verschiedenen Signaltransduktionskaskaden teilweise widersprüchlich. Dennoch bleibt die Kontrolle von Apoptose ein wichtiges Ziel gegenwärtiger Forschungsbestrebungen (Hanahan und Weinberg, 2000) – und die Hoffnung, dass mit genauerer Entschlüsselung ihrer Mechanismen und der Entwicklung von spezifischeren Modulationsmöglichkeiten die grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse zu neuen, klinischen Therapiemöglichkeiten führen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose ist ein zentraler Mechanismus in der Embryonalentwicklung, der Regulation des Immunsystems sowie in der Hämatopoese. Fehlregulationen der Apoptose spielen in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle, nicht zuletzt in der Entstehung von Malignomen, so dass deren Beeinflussung ein wünschenswertes Ziel darstellt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Differenzierung und Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose in der myelomonozytären Leukämiezelllinie PLB-985 untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass Differenzierung von PLB-985 Zellen in granulozytäre Richtung vor Wärme-induzierter Apoptose schützt. Die Differenzierung mit DMF 0,5% führte zu einer Proliferationshemmung sowie zu einer PKC-abhängigen ROS-Produktion und damit zu einem funktionellen Merkmal granulozytärer Differenzierung. In weiterführenden Arbeiten konnte unsere Gruppe zeigen, dass die Wärme-induzierte Apoptose bei PLB-985 Zellen auf einer autokrinen TNF α -Sekretion beruht, welche durch Differenzierung mit DMF inhibiert wird (Katschinski *et al.*, 1999).

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir den Einfluss von Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose bei PLB-985 Zellen. Wir konnten einen konzentrationsabhängigen Effekt des Phorbolesters TPA auf die differentielle Expression der einzelnen PKC-Isoformen nachweisen, einhergehend mit einer Translokation in die Partikelfraktion und zeitabhängiger Herunterregulation einzelner Isoenzyme. Nach Wärmeexposition konnte eine Vitalitätsminderung unter TPA gezeigt werden. Zusätzlich war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptose in der DNA-Gelelektrophorese nachweisbar. Auch in der Caspase 3-Messung zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Wärme-induzierten Apoptose durch TPA. In der Hoechst-Färbung konnte lediglich ein Trend zu einer gesteigerten Apoptose nach Stimulation der PKC gezeigt werden.

Mit diesen Ergebnissen lässt sich die Modulierbarkeit der Wärme-induzierten Apoptose in der Leukämiezelllinie PLB-985 zeigen. Differenzierung schützt vor Wärme-induzierter Apoptose und stellt damit eine Möglichkeit zur Apoptosemodulation dar. Über den Effekt

der Stimulation der PKC auf Wärme-induzierte Apoptose lässt sich keine abschließende Aussage treffen, u. a. weil die PKC-Isoformen sehr heterogen sind, daher einzeln betrachtet werden müssten und zusätzlich TPA neben der PKC weitere Signaltransduktionswege beeinflusst.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams JM, Cory S: Apoptosomes: engines for caspase activation. Curr Opin Cell Biol 14, 715-720 (2002)

Ali SZ, Taguchi A, Rosenberg H: Malignant hyperthermia. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 17, 519-533 (2003)

Allford S, Grimwade D, Langabeer S, Duprez E, Saurin A, Chatters S, Walker H, Roberts P, Rogers J, Bain B, Patterson K, McKernan A, Freemont P, Solomon E, Burnett A, Goldstone A, Linch D: Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RARalpha rearrangement in newly diagnosed AML. The Medical Research Council (MRC) Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol 105, 198-207 (1999)

Alvarez RH, Kantarjian H, Cortes JE: The biology of chronic myelogenous leukemia: implications for imatinib therapy. Semin Hematol 44, S4-14 (2007)

Baldwin RM, Garratt-Lalonde M, Parolin DA, Krzyzanowski PM, Andrade MA, Lorimer IA: Protection of glioblastoma cells from cisplatin cytotoxicity via protein kinase Ciotamediated attenuation of p38 MAP kinase signaling. Oncogene 25, 2909-2919 (2006)

Bao Q, Shi Y: Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. Cell Death Differ 14, 56-65 (2007)

Barragan M, Campas C, Bellosillo B, Gil J: Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 44, 1865-1870 (2003)

Berthold F, Hero B, Simon T, Faldum A: GPOH NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma, Version 1.00, 01.04.2005; Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Uniklinik Köln (2004) Bolduc L, Labrecque B, Cordeau M, Blanchette M, Chabot B: Dimethyl sulfoxide affects the selection of splice sites. J Biol Chem 276, 17597-17602 (2001)

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254 (1976) Brodie C, Blumberg PM: Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. Apoptosis 8, 19-27 (2003)

Calderwood SK, Ciocca DR: Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. Int J Hyperthermia 24, 31-39 (2008)

Champelovier P, Richard MJ, Seigneurin D: Autocrine regulation of TPA-induced apoptosis in monoblastic cell-line U-937: role for TNF-alpha, MnSOD and IL-6. Anticancer Res 20, 451-458 (2000)

Chow JM, Shen SC, Wu CY, Chen YC: 12-o-Tetradecanoylphorbol 13-acetate prevents baicalein-induced apoptosis via activation of protein kinase C and JNKs in human leukemia cells. Apoptosis 11, 1999-2011 (2006)

Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 326, 1-16 (1997)

Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lopez-Lopez C, Pennington DJ, Celada A: PKC epsilon is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF-alpha, which induces apoptosis in macrophages. Am J Physiol Cell Physiol 285, C1235-1245 (2003)

Conradt B, Xue D: Programmed Cell Death. In: The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, http://www.wormbook.org (2005) (Tag des letzten Zugriffs 28.01.2010)

Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC: Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. Biochim Biophys Acta 1761, 633-654 (2006)

Coughlin JJ, Stang SL, Dower NA, Stone JC: RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. J Immunol 175, 7179-7184 (2005)

Covacci V, Torsello A, Palozza P, Sgambato A, Romano G, Boninsegna A, Cittadini A, Wolf FI: DNA oxidative damage during differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Chem Res Toxicol 14, 1492-1497 (2001)

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM: Serine/threonine protein kinases and apoptosis. Exp Cell Res 256, 34-41 (2000)

de Totero D, Tazzari PL, Capaia M, Montera MP, Clavio M, Balleari E, Foa R, Gobbi M: CD40 triggering enhances fludarabine-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B-cells through autocrine release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma and tumor necrosis factor receptor-I-II upregulation. Haematologica 88, 148-158 (2003)

Degos L, Wang ZY: All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. Oncogene 20, 7140-7145 (2001)

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med 347, 472-480 (2002)

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279, L429-438 (2000)

Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L: Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. J Biol Chem 277, 35305-35313 (2002)

Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M: Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med 344, 1038-1042 (2001)

Fuchs E: Scratching the surface of skin development. Nature 445, 834-842 (2007)

Fujii T, Garcia-Bermejo ML, Bernabo JL, Caamano J, Ohba M, Kuroki T, Li L, Yuspa SH, Kazanietz MG: Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. J Biol Chem 275, 7574-7582 (2000)

Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM: Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. J Leukoc Biol 79, 896-903 (2006)

Giebel B, Zhang T, Beckmann J, Spanholtz J, Wernet P, Ho AD, Punzel M: Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. Blood 107, 2146-2152 (2006)

Gonzalez-Guerrico AM, Kazanietz MG: Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta. J Biol Chem 280, 38982-38991 (2005)

Griner EM, Kazanietz MG: Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat Rev Cancer 7, 281-294 (2007)

Gustafson WC, Ray S, Jamieson L, Thompson EA, Brasier AR, Fields AP: Bcr-Abl regulates protein kinase Ciota (PKCiota) transcription via an Elk1 site in the PKCiota promoter. J Biol Chem 279, 9400-9408 (2004)

Gutcher I, Webb PR, Anderson NG: The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. Cell Mol Life Sci 60, 1061-1070 (2003)

Han B, Wei W, Hua F, Cao T, Dong H, Yang T, Yang Y, Pan H, Xu C: Requirement for ERK activity in sodium selenite-induced apoptosis of acute promyelocytic leukemiaderived NB4 cells. J Biochem Mol Biol 40, 196-204 (2007)

Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, Liu XJ, Cao GS, Newmark HL, Conney AH, Chang RL: Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 5357-5361 (1998)

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70 (2000)

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 119, 203-210 (1989)

Hansson A, Marin YE, Suh J, Rabson AB, Chen S, Huberman E, Chang RL, Conney AH, Zheng X: Enhancement of TPA-induced growth inhibition and apoptosis in myeloid leukemia cells by BAY 11-7082, an NF-kappaB inhibitor. Int J Oncol 27, 941-948 (2005)

Harmon BV, Corder AM, Collins RJ, Gobe GC, Allen J, Allan DJ, Kerr JF: Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int J Radiat Biol 58, 845-858 (1990)

Hildebrandt B, Hegewisch-Becker S, Kerner T, Nierhaus A, Bakhshandeh-Bath A, Janni W, Zumschlinge R, Sommer H, Riess H, Wust P: Current status of radiant whole-body hyperthermia at temperatures >41.5 degrees C and practical guidelines for the treatment of adults. The German 'Interdisciplinary Working Group on Hyperthermia'. Int J Hyperthermia 21, 169-183 (2005)

Howley B, Fearnhead HO: Caspases as therapeutic targets. J Cell Mol Med 24, 24 (2008) Iglesias-Serret D, de Frias M, Santidrian AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Barragan M, Domingo A, Gil J, Pons G: Regulation of the proapoptotic BH3-only protein BIM by glucocorticoids, survival signals and proteasome in chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia 21, 281-287 (2007)

Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H: Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. J Am Soc Nephrol 14, S227-232 (2003)

Issels RD, Lindner LH, Wust P, Hohenberger P, Jauch K, Daugaard S, Mansmann U, Hiddemann W, Blay J, Verweij J: Regional hyperthermia (RHT) improves response and survival when combined with systemic chemotherapy in the management of locally advanced, high grade soft tissue sarcomas (STS) of the extremities, the body wall and the abdomen: A phase III randomised pros. ASCO Meeting Abstracts. J Clin Oncol 25, 10009 (2007)

Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T: Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ciota in neutrophilic differentiation cells. J Cell Physiol 211, 189-196 (2007)

Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J: Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. Cancer Res 59, 3404-3410 (1999)

Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J: Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. J Biol Chem 275, 21094-21098 (2000)

Kaushansky K: Lineage-specific hematopoietic growth factors. N Engl J Med 354, 2034-2045 (2006)

Kazi JU, Soh JW: Isoform-specific translocation of PKC isoforms in NIH3T3 cells by TPA. Biochem Biophys Res Commun 364, 231-237 (2007)

Kersse K, Vanden Berghe T, Lamkanfi M, Vandenabeele P: A phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. Biochem Soc Trans 35, 1508-1511 (2007)

Kim MS, Lim WK, Cha JG, An NH, Yoo SJ, Park JH, Kim HM, Lee YM: The activation of PI 3-K and PKC zeta in PMA-induced differentiation of HL-60 cells. Cancer Lett 171, 79-85 (2001)

Klinger MB, Guilbault B, Goulding RE, Kay RJ: Deregulated expression of RasGRP1 initiates thymic lymphomagenesis independently of T-cell receptors. Oncogene 24, 2695-2704 (2005)

Kobayashi M, Kidd D, Hutson E, Grafton J, McNulty S, Rumsby M: Protein kinase C activation by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate in CG-4 line oligodendrocytes stimulates turnover of choline and ethanolamine phospholipids by phospholipase D and induces rapid process contraction. J Neurochem 76, 361-371 (2001)

Kumar S: Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ 14, 32-43 (2007)

Langdon SP, Hickman JA: Alkylformamides as inducers of tumour cell differentiation--a mini-review. Toxicology 43, 239-249 (1987)

Laouar A, Glesne D, Huberman E: Protein kinase C-beta, fibronectin, alpha(5)beta(1)integrin, and tumor necrosis factor-alpha are required for phorbol diester-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells. Mol Carcinog 32, 195-205 (2001)

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ: Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. Science 281, 2042-2045 (1998)

Lehmann S, Paul C, Torma H: Retinoid receptor expression and its correlation to retinoid sensitivity in non-M3 acute myeloid leukemia blast cells. Clin Cancer Res 7, 367-373 (2001)

Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, Buchner T, Hehlmann R: Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol 56, 261-274 (2005)

Liu WS, Heckman CA: The sevenfold way of PKC regulation. Cell Signal 10, 529-542 (1998)

Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME: The consequences of apoptosis in autoimmunity. J Autoimmun 31, 257-262 (2008)

Logue SE, Martin SJ: Caspase activation cascades in apoptosis. Biochem Soc Trans 36, 1-9 (2008)

Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster D: Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. Mol Cell Biol 18, 839-845 (1998)

Luo HR, Loison F: Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. Am J Hematol 83, 288-295 (2008)

Macfarlane DE, O'Donnell PS: Phorbol ester induces apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells but not in HL-60 PET mutant. Leukemia 7, 1846-1851 (1993)

Mackay HJ, Twelves CJ: Targeting the protein kinase C family: are we there yet? Nat Rev Cancer 7, 554-562 (2007)

Matsumoto E, Hatanaka M, Bohgaki M, Maeda S: PKC pathway and ERK/MAPK pathway are required for induction of cyclin D1 and p21Waf1 during 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced differentiation of myeloleukemia cells. Kobe J Med Sci 52, 181-194 (2006)

Mayne GC, Murray AW: Evidence that protein kinase Cepsilon mediates phorbol ester inhibition of calphostin C- and tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 histiocytic lymphoma cells. J Biol Chem 273, 24115-24121 (1998)

Mihailovic T, Marx M, Auer A, Van Lint J, Schmid M, Weber C, Seufferlein T: Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells. Cancer Res 64, 8939-8944 (2004)

Munoz LE, Frey B, Pausch F, Baum W, Mueller RB, Brachvogel B, Poschl E, Rodel F, von der Mark K, Herrmann M, Gaipl US: The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. Curr Med Chem 14, 271-277 (2007)

Murray NR, Davidson LA, Chapkin RS, Clay Gustafson W, Schattenberg DG, Fields AP: Overexpression of protein kinase C betaII induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. J Cell Biol 145, 699-711 (1999)

Nagata S: Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res 256, 12-18 (2000)

Nicholson DW: From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature 407, 810-816 (2000)

Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM: Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. European Society for Hyperthermic Oncology. Lancet 345, 540-543 (1995)

Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM: Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. Int J Hyperthermia 12, 3-20 (1996)

Pardo OE, Wellbrock C, Khanzada UK, Aubert M, Arozarena I, Davidson S, Bowen F, Parker PJ, Filonenko VV, Gout IT, Sebire N, Marais R, Downward J, Seckl MJ: FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. Embo J 25, 3078-3088 (2006)

Paz-Ares L, Douillard JY, Koralewski P, Manegold C, Smit EF, Reyes JM, Chang GC, John WJ, Peterson PM, Obasaju CK, Lahn M, Gandara DR: Phase III study of gemcitabine

and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 24, 1428-1434 (2006)

Pedruzzi E, Fay M, Elbim C, Gaudry M, Gougerot-Pocidalo MA: Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Br J Haematol 117, 719-726 (2002)

Peiretti F, Bernot D, Lopez S, Bonardo B, Deprez-Beauclair P, Juhan-Vague I, Nalbone G: Modulation of PAI-1 and proMMP-9 syntheses by soluble TNFalpha and its receptors during differentiation of the human monocytic HL-60 cell line. J Cell Physiol 196, 346-353 (2003)

Pongracz J, Webb P, Wang K, Deacon E, Lunn OJ, Lord JM: Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. J Biol Chem 274, 37329-37334 (1999)

Quest AF: Regulation of protein kinase C: a tale of lipids and proteins. Enzyme Protein 49, 231-261 (1996)

Reyland ME: Protein kinase Cdelta and apoptosis. Biochem Soc Trans 35, 1001-1004 (2007)

Ritch P, Rudin CM, Bitran JD, Edelman MJ, Makalinao A, Irwin D, Lilenbaum R, Peterson P, John WJ: Phase II study of PKC-alpha antisense oligonucleotide aprinocarsen in combination with gemcitabine and carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer 52, 173-180 (2006)

Rosenbauer F, Tenen DG: Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol 7, 105-117 (2007)

Samara C, Tavernarakis N: Autophagy and cell death in Caenorhabditis elegans. Curr Pharm Des 14, 97-115 (2008)

Savill J, Fadok V: Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 407, 784-788 (2000)

Schaar DG, Liu H, Sharma S, Ting Y, Martin J, Krier C, Ciardella M, Osman M, Goodell L, Notterman DA, Strair RK: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced dual-specificity phosphatase expression and AML cell survival. Leuk Res 29, 1171-1179 (2005)

Schafer ZT, Kornbluth S: The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. Dev Cell 10, 549-561 (2006)

Schling P, Rudolph C, Heimerl S, Fruth S, Schmitz G: Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation. Cytokine 33, 239-245 (2006)

Schwerk C, Schulze-Osthoff K: Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. Mol Cell 19, 1-13 (2005)

Sell S: Leukemia: stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. Stem Cell Rev 1, 197-205 (2005)

Serova M, Ghoul A, Benhadji KA, Cvitkovic E, Faivre S, Calvo F, Lokiec F, Raymond E: Preclinical and clinical development of novel agents that target the protein kinase C family. Semin Oncol 33, 466-478 (2006)

Shen Q, Chada S, Whitney C, Newburger PE: Regulation of the human cellular glutathione peroxidase gene during in vitro myeloid and monocytic differentiation. Blood 84, 3902-3908 (1994)

Shi Y: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell 9, 459-470 (2002) Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A: Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. Leuk Res 31, 277-286 (2007)

Slee EA, Adrain C, Martin SJ: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. J Biol Chem 276, 7320-7326 (2001)

Slosberg ED, Yao Y, Xing F, Ikui A, Jirousek MR, Weinstein IB: The protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells the protein kinase C beta-specific inhibitor LY379196 blocks TPA-induced monocytic differentiation of HL60 cells. Mol Carcinog 27, 166-176 (2000)

Stallings-Mann M, Jamieson L, Regala RP, Weems C, Murray NR, Fields AP: A novel small-molecule inhibitor of protein kinase Ciota blocks transformed growth of non-small-cell lung cancer cells. Cancer Res 66, 1767-1774 (2006)

Storz P, Doppler H, Toker A: Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase Ddependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. Mol Cell Biol 24, 2614-2626 (2004)

Strair RK, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin KV, Eid J, Senzon R, Cui XX, Han ZT, Knox B, Rabson AB, Chang R, Conney A: Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Clin Cancer Res 8, 2512-2518 (2002)

Strasser A, Bouillet P: The control of apoptosis in lymphocyte selection. Immunol Rev 193, 82-92 (2003)

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 231-241 (2008)

Tenen DG: Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat Rev Cancer 3, 89-101 (2003)

Toker A: Signaling through protein kinase C. Front Biosci 3, D1134-1147 (1998)

Tsiftsoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS: Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. Pharmacol Ther 100, 257-290 (2003)

Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Jr., Rado TA: Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB- 985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. Blood 70, 372-378 (1987)

Walczak H, Krammer PH: The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. Exp Cell Res 256, 58-66 (2000)

Walczak H, Haas TL: Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. Methods Mol Biol 414, 221-239 (2008)

Westermann AM, Wiedemann GJ, Jager E, Jager D, Katschinski DM, Knuth A, Vorde Sive Vording PZ, Van Dijk JD, Finet J, Neumann A, Longo W, Bakhshandeh A, Tiggelaar CL, Gillis W, Bailey H, Peters SO, Robins HI: A Systemic Hyperthermia Oncologic Working Group trial. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide combined with 41.8 degrees C whole-body hyperthermia for metastatic soft tissue sarcoma. Oncology 64, 312-321 (2003)

Wooten MW, Seibenhener ML, Neidigh KB, Vandenplas ML: Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. Mol Cell Biol 20, 4494-4504 (2000)

Wu WS, Tsai RK, Chang CH, Wang S, Wu JR, Chang YX: Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. Mol Cancer Res. 4, 747-758. (2006) Yoshida A, Pommier Y, Ueda T: Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. Int J Hematol 84, 31-37 (2006)

Youle RJ, Strasser A: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 9, 47-59 (2008)

Zhang J, Anastasiadis PZ, Liu Y, Thompson EA, Fields AP: Protein kinase C (PKC) betaII induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC iota/Rac 1-dependent signaling pathway. J Biol Chem 279, 22118-22123 (2004)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP / ATP	Adenosindiphosphat / Adenosintriphophat
AIF	apoptosis inducing factor
AMC	3-Amino-7-Methylcoumarin
AML	akute myeloische Leukämie
Apaf-1	Apoptotischer Peptidase-aktivierender Faktor-1
ATRA	all-trans-Retinoinsäure
bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaar
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIM I	Bisindolylmaleimid I
CAD	Caspase-aktivierte DNAse
CARD	Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
CML	chronische myeloische Leukämie
DAG	Diacylglycerol
DD	death domain
DED	death effector domain
DGK	Diacylglycerol-Kinase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FAB	French/American/British classification
FADD	Fas-associated protein with death domain
FKS	fetales Kälberserum
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
G-CSF / GM-CSF	granucolyte (and macrophage)-colony stimulating factor
HRPO	horse radish peroxidase
HSC	haematological stem cells
HSP	heat shock protein
IAP	inhibiting apoptosis protein

ICAD	inhibitor of CAD
ICE	interleukin 1β-converting enzyme
IFN	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase, MEK
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK
MTT	3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinamid-Adenosindinukleotidphosphat-Hydrogenase
NBT	Nitroblautetrazolium
ΝΓκΒ	nuclear factor κ B
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NSCLC	non small cell lung cancer
OD	optic density
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PDK-1	Phosphoinositol-3-abhängige Kinase-1
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
РКС	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PML-Protein	promyelocytic leukemia-Protein
PS	Phosphatidylserin
RACK	Rezeptor aktivierter C-Kinase
RAR α	retinoic acid receptor α
Ras / RasGRP	Rat sarcoma proto-oncogene / guanyl nucleotide releasing protein
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SCF	stem cell factor
tbid	truncated bid
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNFR 1/2	Tumornekrosefaktor α -Rezeptor 1/2
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
WBH	whole body hyperthermia
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Katschinski DM, Robins HI, <u>Schad M</u>, Frede S, Fandrey J: Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. Cancer Res 59, 3404-3410 (1999).

Katschinski DM, Schindler SG, Frede S, Boos K, <u>Schad M</u>, Fandrey J: Leukemia cell suicide after heat exposure. Pflügers Archiv 437 Supplement (5) R 99 (1999).

<u>Schad M</u>, Schindler S, Katschinski DM: Einfluß der Proteinkinase C auf Wärme-induzierte Apoptose. Vortrag auf der Hanseatischen Physiologentagung, Rostock, 2001.

9. DANKSAGUNGEN

Vielen Dank an alle, die mich auf dem langen Weg bis zum Abschluss dieser Arbeit unterstützt haben; insbesondere an...

... meine Doktormutter Dörthe Katschinski für die Überlassung des Themas, für die exzellente Betreuung in Theorie und Praxis und für die Bereitschaft, meine Arbeit auch nach so langer Zeit noch zu korrigieren

... Herrn Professor Jelkmann für die Möglichkeit, in seinem Institut in konstruktiver, lehrreicher und freundlicher Atmosphäre arbeiten und lernen zu können

... Susann Schindler für die Einarbeitung im Labor, für Tips und Tricks bei Blots aller Art und dafür, dass sie immer da war, wenn in der Zellkultur mal wieder mehr wuchs als PLB-985 Zellen

... meine Mitdoktoranden, insbesondere Christian Reimann für kurzweilige und spannende Tage und Abende im Labor, an Just Genius zusätzlich für die Hilfe bei den Luminometerversuchen

... meine Freundin Kristina Boos für das abwechselnde Hüten unserer Zellen im Wasserbad und die immer wieder kehrende Ermunterung, diese Arbeit abzuschließen

... meinen Bruder Andreas für die Hilfe bei Formatierung und Layout dieser Arbeit und bei allen ennervierenden Fragen hinsichtlich der Microsoft Produkte, auf denen sie basiert

... meine Eltern dafür, dass sie mir Studium und Dissertation ermöglicht haben und mich zu allen Zeiten in jeder Hinsicht unterstützt haben; meinem Vater noch einmal insbesondere auch für's Korrekturlesen

... Tobias neben allem anderen für den Verzicht auf diverse Urlaube und Wochenenden und für Ermutigung in jeglicher Form.
10. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Martina Schad
Geburtsdatum	15.06.1975, Münster

Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule Bad Arolsen
1985 – 1994	Christian-Rauch-Schule Bad Arolsen
Juni 1994	Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

1994 – 1995 St. Josephs-Hospital, Wiesbaden

Studium

1995 - 2002	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
1997	Physikum
1998	1. Staatsexamen
2001	2. Staatsexamen
Juni 2002	3. Staatsexamen
seit 1998	Dissertation am Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck,
	Prof. Dr. med. D. M. Katschinski und Prof. Dr. med. W. Jelkmann

Berufliche Tätigkeit

9/2002 - 12/2004	Medizinische Klinik III, UKSH, Campus Lübeck
1/2005 - 1/2007	Medizinische Klinik, Sana Kliniken Lübeck
1/2007 - 2/2007	Innere Medizin 1, St. Franziskus-Hospital Münster
seit 5/2007	Medizinische Klinik D, Universitätsklinikum Münster
5/2009	Facharztprüfung Innere Medizin