

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg

**Identifizierung Apoptose-induzierender Alkaloide der Pflanze
Chelidonium Majus und des Präparates Ukrain
in einem Lymphom-Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Daniel Frédéric Habermehl

aus

Bad Schwalbach

2009

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Jendrossek

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Gleiter

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	1
2.	Abbildungsverzeichnis.....	3
3.	Tabellenübersicht.....	6
4.	Abkürzungsverzeichnis.....	6
5.	Einleitung.....	9
5.1	Maligne Erkrankungen und deren Therapie.....	9
5.2	Ukrain.....	10
5.3	Apoptose – Der programmierte Zelltod.....	11
5.3.1	Definition und physiologische Bedeutung.....	11
5.3.2	Signaltransduktion der Apoptose.....	13
5.3.2.1	Caspasen – zentrale Effektoren des apoptotischen Zelluntergangs.....	13
5.3.2.2	Der Todesrezeptor-Signalweg.....	14
5.3.2.3	Der mitochondriale Signalweg.....	16
5.4	Fragestellung.....	19
6.	Material.....	21
6.1	Zelllinien.....	21
6.1.1	Jurkat T-Lymphom-Zellen.....	21
6.1.2	Chang Zellen (Konjunktivalepithel-Zellen)	21
6.2	Geräte.....	22
6.3	Verbrauchsmaterial.....	22
6.4	Chemikalien.....	23
6.5	Puffer und Lösungen.....	24
6.6	Antikörper und Liganden.....	25
7.	Methoden.....	25
7.1	Zellkultur.....	25
7.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	27

7.3	Lösungen.....	26
7.3.1	Ukrain.....	26
7.3.2	Schöllkrautalkaloide.....	26
7.3.3	Schöllkrautextrakt.....	27
7.3.4	Sonstige.....	27
7.4	Behandlung der Zellen.....	28
7.4.1	Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie.....	28
7.4.2	Messung der Zellmorphologie.....	28
7.4.3	Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$	29
7.4.4	Messung der Caspasen-Aktivierung.....	29
7.4.5	Vitalitätsmessung.....	30
7.4.5.1	Trypan-Blau Färbung.....	30
7.4.5.2	Chromatin-Kondensierung, DNA-Fragmentierung.....	31
7.4.6	Gelelektrophorese.....	31
7.4.6.1	Herstellung der Lysate.....	31
7.4.6.2	Gel-Elektrophorese.....	32
7.4.6.3	Western-Blotting.....	34
7.4.6.4	Detektion der Proteine.....	35
7.5	Statistische Analyse.....	36
8.	Ergebnisse.....	37
8.1	Antineoplastische Wirksamkeit von Ukrain.....	37
8.1.1	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Ukrain.....	37
8.1.2	Normalgewebszellen und maligne Zellen.....	42
8.2	Mechanismen der Ukrain-induzierten Apoptose.....	43
8.2.1	Untersuchung des Todesrezeptor-Signalweges.....	44
8.2.2	Untersuchung des mitochondrialen Signalweges.....	48
8.3	Identifizierung der molekularen Zusammensetzung von Ukrain und Schöllkraut.....	53
8.4	Identifizierung Apoptose-induzierender Alkaloide in Ukrain und einem Schöllkrautextrakt.....	58
8.4.1	Schöllkrautextrakt.....	58
8.4.2	Schöllkrautalkaloide.....	60
8.4.2.1	Allokryptopin.....	61
8.4.2.2	Protopin.....	63
8.4.2.3	Chelerythrin und Sanguinarin.....	65
8.4.2.4	Chelidonin.....	65

9.	Diskussion.....	72
9.1	Wirksamkeit und Wirkmechanismus von Ukrain.....	72
9.2	Identifizierung Apoptose-induzierender Bestandteile von Ukrain und Schöllkraut.....	75
9.2.1	Zusammensetzung von Ukrain.....	75
9.2.2	Proapoptotische Wirksamkeit von Schöllkraut und Schöllkrautalkaloiden.....	75
9.2.2.1	Schöllkraut-Nativextrakt.....	76
9.2.2.2	Chelidonin und Protopin.....	77
9.2.2.3	Allokryptopin.....	79
9.2.2.4	Chelerythrin und Sanguinarin.....	80
9.3	Zur möglichen therapeutischen Anwendbarkeit von Ukrain und Schöllkraut.....	81
10.	Zusammenfassung.....	85
11.	Literaturverzeichnis.....	86
12.	Danksagung.....	98
13.	Publikationen.....	99
14.	Lebenslauf.....	100

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die apoptotischen Signalwege
Abbildung 2	Gelelektrophorese
Abbildung 3	Zytotoxische Wirkung von Ukrain
Abbildung 4	Apoptose-Induktion nach Ukrain-Behandlung
Abbildung 5	Quantifizierung der Ukrain-induzierten Apoptose
Abbildung 6	Ukrain-vermittelte Spaltung von Procaspase-8, Caspase-3 und PARP

Abbildung 7	Rolle der Caspasen in der Ukrain-vermittelten Apoptose
Abbildung 8	Einfluss der Inhibition von Caspasen auf die Ukrain-vermittelte Apoptose
Abbildung 9	Wirkung von Ukrain auf Normalgewebszellen
Abbildung 10	Rolle des Todesrezeptorsignalweges bei der Ukrain-vermittelten Apoptose
Abbildung 11	Einfluss der Ukrain-Behandlung auf die Spaltung von Procaspase-8, Caspase-3 und PARP in Jurkat A3, Caspase-8- sowie FADD-negativen Zellen
Abbildung 12	Wirkung von Ukrain auf Jurkat Zellen, die resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sind
Abbildung 13	Einfluss der Überexpression von Bcl-2 und der Expression einer dominant-negativen Variante der Caspase-9 auf die Ukrain-vermittelte Apoptose (Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie)
Abbildung 14	Einfluss der Überexpression von Bcl-2 und der Expression einer dominant-negativen Variante der Caspase-9 auf die Ukrain-vermittelte Apoptose (Westernblot)
Abbildung 15	Einfluß der Ukrain-Behandlung auf die Bcl-2-Expression bei Jurkat Vector Kontroll- und Bcl-2-überexprimierenden Zellen
Abbildung 16	Einfluss der Ukrain-Behandlung auf die Expression der Bcl-2-Familienmitglieder Bad, Bak und Bid
Abbildung 17	Einfluss des anti-apoptischen Bcl-xL auf die Ukrain-vermittelte Apoptose
Abbildung 18	Strukturformel von Ukrain und kalkuliertes Isotopenmuster
Abbildung 19	LC-UV-MS- und LC-UV-MS/MS-Spektren von Ukrain und extrahiertes Ionen-Chromatogramm
Abbildung 20	Ausgewählte molekulare Inhaltsstoffe von Ukrain und eines Schöllkrautextrakts
Abbildung 21	LC-UV-MS/MS Spektren von Ukrain
Abbildung 22	LC-UV-MS und LC-UV-MS/MS Spektren eines Schöllkrautextrakts

- Abbildung 23 Zelltodeffekte in Jurkat Vector Zellen nach Behandlung mit einem Schöllkrautextrakt
- Abbildung 24 Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Behandlung mit Schöllkrautextrakt
- Abbildung 25 Untersuchung des Schöllkrautalkaloids Allokryptopin hinsichtlich apoptotischer Effekte
- Abbildung 26 Untersuchung des Schöllkrautalkaloids Protopin hinsichtlich apoptotischer Effekte
- Abbildung 27 Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Protopin-Behandlung
- Abbildung 28 Untersuchung der Schöllkrautalkaloide Chelerythrin und Sanguinarin hinsichtlich apoptotischer Effekte
- Abbildung 29 Chelidonin-induzierte Apoptose in Jurkat Vector Zellen
- Abbildung 30 Einfluss von Bcl-2 auf die Chelidonin-induzierte Apoptose in Jurkat Vector und Jurkat Bcl-2 Zellen
- Abbildung 31 Einfluss von Bcl-2 auf die Chelidonin-induzierte Apoptose in Jurkat Vector und Jurkat Bcl-2 Zellen
- Abbildung 32 Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Chelidonin-Behandlung
- Abbildung 33 Wirkung von Chelidonin auf Normalgewebszellen

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Herstellung des Trenngels
Tabelle 2	Herstellung des Sammelgels
Tabelle 3	Ausgewählte molekulare Inhaltsstoffe von Ukrain und eines Schöllkrautextrakts
Tabelle 4	Anteile verschiedener Alkaloide in Schöllkrautextrakten

4. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosinriphosphat
Bad	Bcl-xL/Bcl-2-associated Death Promoter
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma Gene 2
Bcl-xL	Lange Splicevariante des Bcl-x-Gens
BH1-4	Bcl-2 Homology Domaine 1-4
Bid	BH-3 Interacting Domaine Death Agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domaine
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signalling Complex

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DR	Death Receptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	Fas-associated Protein with Death Domaine
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward Scatter
FLICE	FADD like ICE
FLIP	FLICE-inhibitory Protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interleukin-1 β -converting Enzyme
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
SSC	Sideward Scatter
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
zVAD-FMK	Benzyloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
et al.	et alii, et alteri
g	Erdbeschleunigung

h	Stunden
l	Liter
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm

5. Einleitung

5.1 Maligne Erkrankungen und deren Therapie

Jährlich erkranken allein in Deutschland über 400.000 Menschen an bösartigen Neubildungen, also Krebs. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Frauen und Männern 69 Jahre. Die häufigsten Krebsneuerkrankungen bei Männern sind Prostata, Darm- und Lungenkrebs, bei Frauen Brustdrüsen-, Darm- und Lungenkrebs. Beim prozentualen Anteil an der Zahl der Krebssterbefälle führt bei Männern das Lungenkrebsleiden und bei Frauen das Malignom der Brustdrüse. Die Prognose von Krebserkrankungen ist sehr unterschiedlich und hängt unter anderem von der Lokalisation und der Art des Tumors ab, aber auch von Alter und Geschlecht der Erkrankten. Alles in allem ergibt sich eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 58% bei Frauen und 46% bei Männern (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006).

Die Therapiemöglichkeiten von malignen Erkrankungen umfassen chirurgische Verfahren, Strahlentherapie sowie die medikamentöse Therapie, zu der auch die Chemotherapie zählt. Bei der medikamentösen Therapie von Krebserkrankungen werden sehr unterschiedliche Mechanismen und Effekte genutzt, um Tumorzellen untergehen zu lassen. Die Induktion eines zellulären "Selbstmordprogramms", der sogenannten Apoptose, ist ein häufiger Mechanismus vieler zytotoxisch wirkender Chemotherapeutika und der Strahlentherapie. Tumorzellen sind jedoch oft dadurch gekennzeichnet, dass bestimmte Gene dysreguliert sind, die Apoptose-regulierende Proteine kodieren (Guner, 2003; Sturm, 2003). Hierdurch kann es zu erhöhten Leveln anti-apoptotischer oder erniedrigte Level pro-apoptotischer Proteine kommen, die zur Resistenz der Zellen gegenüber anti-neoplastischen Medikamenten oder Strahlentherapie führen. Dies kann in der Folge mit Therapieversagen und schlechter klinischer Prognose einhergehen (Mrozek, 2003). Aus diesem Grund werden neuartige Medikamente benötigt, die an dysregulierten apoptotischen Signalwegen ansetzen oder die Induktion alternativer Zelltod-Signalwege zum Ziel haben, um Therapieresistenzen zu überwinden.

5.2 Ukrain

Das Medikament Ukrain wird von der Herstellerfirma Nowicky Pharma (Wien, Österreich) als halbsynthetisches Derivat aus dem Zytostatikum Thiotepa und dem Alkaloid Chelidonin beschrieben. Chelidonin ist eines der Hauptalkaloide der Pflanze Schöllkraut (lat. *Chelidonium majus*), die zur Familie der Mohngewächse (lat. *Papaveraceae*) gehört. In der postulierten Struktur des Ukrain-Moleküls soll laut Herstellerangaben (Nowicky Pharma) ein zentrales Molekül Thiotepa von drei Molekülen Chelidonin umrundet und kovalent gebunden sein. Dem Präparat wurden bereits in mehreren Untersuchungen anti-neoplastische Wirkungen zugeschrieben (Danilos, 1992; Pengsaa, 1992; Sotomayor, 1992). In letzter Zeit ließen präklinische Untersuchungen auf eine vielversprechende antineoplastische Wirksamkeit von Ukrain schließen: Ukrain wird unter anderem eine selektive Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zugeschrieben, ohne dass normales Gewebe nach Applikation des Medikamentes Schaden nimmt (Hohenwarter, 1992). Kürzlich konnte beispielsweise eine Inhibition von Tumorwachstum und Metastasierung eines Lewis-Karzinoms in C57Bl6-Mäusen gezeigt werden (Grinevich, 2005). Eine weitere neue Publikation deutet auf eine hohe Zytotoxizität Ukrains auf vier Ewing-Sarkom-Zellen hin, die mit der des etablierten Zytostatikums Etoposid vergleichbar ist (Lanvers-Kaminsky, 2007).

Zusätzlich zu den vielversprechenden, präklinischen Daten kommen noch einige klinische Untersuchungen -vorzugsweise aus dem osteuropäischen Raum- hinzu, die einen therapeutischen Benefit für Patienten mit Blasen-, Brust-, Pankreas-, rektalen oder kolorektalen Malignomen zeigen, die mit Ukrain als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika oder Strahlentherapie behandelt wurden (Kurochkin, 2000; Liepins, 1996; Roublevskaia, 2000a+b). Trotzdem sind die molekularen Mechanismen der Ukrain-induzierten Wirkung noch nicht komplett verstanden. Neben der vorgeschlagenen immunmodulatorischen Wirkung und der Induktion eines Zellzyklusarrestes während der G2/M-Phase könnte womöglich die Induktion von Apoptose eine Rolle spielen.

5.3 Apoptose – Der programmierte Zelltod

5.3.1 Definition und physiologische Bedeutung

Der Begriff Apoptose bezeichnet eine physiologische Form des Zelltods, die zum Oberbegriff des "programmierten Zelltodes" (engl.: programmed cell death = PCD) gezählt wird. Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Morphogenese, der Gewebemhomöostase und der Immuntoleranz. Generell gilt, dass Proliferation und Zelltod -also Mitose und Apoptose- ein Gleichgewicht in den Geweben des Körpers gewährleisten. Apoptotische Vorgänge sind somit bei einer Vielzahl von Entwicklungsschritten und Regulationsmechanismen in Metazoen zu beobachten. Ein eindrückliches und oft erwähntes Beispiel ist die Entwicklung der Finger beim Menschen, die zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt durch interdigitales Gewebe miteinander verbunden sind, das jedoch durch Apoptose der betroffenen Zellen im Laufe der Entwicklung untergeht (Jacobson, 1996; Milligan, 1995). Weiterhin werden auf Ebene des Immunsystems beispielsweise B- und T-Lymphozyten, die Antikörper gegen körpereigenes Gewebe oder unbrauchbare antigenspezifische Rezeptoren produzieren, durch Apoptose-Induktion eliminiert (Desoize, 1992). Auch wird Apoptose bei Zellen und Geweben beobachtet, die infolge von zellulärem Stress wie UV- und γ -Strahlung, Hyperthermie oder Komplementaktivierung geschädigt werden. Der Apoptose kommt somit eine physiologische Rolle durch die Entfernung nicht mehr benötigter oder unerwünschter und geschädigter Zellen zu.

Eine gestörte Regulation apoptotischer Prozesse zeigt sich bei vielen Krankheiten. So wird beispielsweise eine Verminderung von Apoptose beim Wachstum maligner Tumoren beobachtet, die sich somit durch ungehemmte Proliferation ausbreiten können. Eine vermehrte Apoptose hingegen konnte bei degenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Multipler Sklerose oder Morbus Alzheimer nachgewiesen werden, aber auch bei AIDS und der Entstehung des Diabetes mellitus.

Bei der Beschreibung von Vorgängen, die zum Untergang von Zellen und

Gewebe führen, muss der apoptotische Zelltod klar von nekrotischen Prozessen getrennt werden. Dies geschah erstmals 1972 als Kerr, Wyllie und Currie den Begriff "Apoptose" einführten. Wyllie (1980) beschrieb Apoptose als einen stereotypen Vorgang, bei dem es zu Zellschrumpfung, Kondensation von Chromatin und Membranausstülpungen mit folgendem Abschnüren von Membranvesikeln ("membrane blebbing") kommt. Desweiteren wurde die Chromatinkondensation durch Aktivierung endogener Enzyme beschrieben, die eine Fragmentierung der DNA zur Folge hat (Wyllie, 1984). Typischerweise entstehen hierbei DNA-Bruchstücke, deren Länge ein Vielfaches von 185 Basenpaaren ist (Arends, 1990). Auf der äußeren Membranseite der Zelle kommt es in Folge der Apoptose-Induktion zu einer Präsentation von Phosphatidylserin, das bei intaktem Zustand der Zelle auf der intrazellulären Seite der Membran ist (Fadok und Henson, 1998). Durch diesen Vorgang wird die Zelle vom angrenzenden Gewebe als apoptotische Zelle erkannt und von phagozytosekompetenten Zellen beseitigt. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein regulierter physiologischer Vorgang auf zellulärer Ebene, der typischerweise zu einem Untergang von Zellen ohne begleitende Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes bzw. dessen Schädigung führt. Während es bei der Nekrose zu einem Anschwellen der Zelle mit folgender Lyse kommt und somit zu einem Freiwerden potentiell toxischer und aggressiver Stoffe aus Zytosol und Organellen, bewirkt Apoptose ein Schrumpfen der Zelle sowie eine Bildung von Membranvesikeln ("apoptotic bodies"), die sich von der Zelloberfläche abschnüren. Durch die Ausschüttung von Lysophosphatidylcholin (LPC), einem sogenannten "eat-me"-Signal der Zelle (Lauber, 2003) und der oben genannten Präsentation von Phosphatidylserin an der Membranaussenseite wird ein geregelter und nicht zur Schädigung des angrenzenden Gewebes führender Abbau von Zellen gewährleistet.

5.3.2 Signaltransduktion der Apoptose

5.3.2.1 Caspasen – zentrale Effektoren des apoptotischen Zelluntergangs

Apoptose kann durch ein Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden, die jedoch alle dazu führen, dass spezialisierte intrazelluläre Cystein-Proteasen, sogenannte "Caspasen" (Cystein-Aspartat-Spezifische-Proteasen), aktiviert werden, welche die eigentlichen Effektoren apoptotischer Vorgänge sind (Thornberry, 1998; Cohen, 1997; Nicholson, 1999).

Caspasen liegen nach ihrer Synthese als katalytisch inaktive Zymogene in der Zelle vor. Sie weisen eine Prodomäne variabler Länge auf, gefolgt von einer großen p20- und einer kleinen p10-Untereinheit. Aktiviert werden Caspasen durch proteolytische Spaltung an spezifischen Aspartat-Resten, die innerhalb der Prodomäne liegen (Thornberry, 1997). Dies führt zur Bildung funktionsfähiger Caspasen, bei denen die Prodomänen abgespalten sind und deren aktives Zentrum in Form eines Heterotetramers, bestehend aus angelagerten p20-p10-Untereinheiten, vorliegt. Auf diese Weise aktivierte Caspasen führen zur Prozessierung bzw. Degradierung einer Vielzahl von Substraten, die mit der Apoptose in Verbindung stehen (Lavrik, 2005).

Das menschliche Genom codiert 11 unterschiedliche Caspasen (Salvesen, 2004), die in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden können, so beispielsweise in Abhängigkeit ihrer Substratspezifität (Thornberry, 1997), der Zusammensetzung ihrer Domänen (Denault und Salvesen, 2002) oder ihrer Funktion (Nicholson, 1999). Typischerweise werden Caspasen anhand ihrer Prodomäne und ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt: In der ersten Gruppe werden die Caspasen-1, -4 und -5 zusammengefasst. Sie spielen eine Rolle bei der Bildung des sogenannten "Inflammosoms" und führen zur Aktivierung der Zytokine IL-1 β und IL-18, die wichtig im Zusammenhang mit der Immunantwort auf mikrobielle Pathogene sind (Martinon und Tschopp, 2004). Zur zweiten Gruppe gehören "Initiator"-Caspasen mit wiederum langer Prodomäne und zur dritten Gruppe die "Effektor"-Caspasen mit kurzer Prodomäne. Die Termini

"Initiator" und "Effektor" beschreiben die jeweiligen Caspasen funktionell. Während die Initiator-Caspasen am Anfang der Caspasen-Kaskade und somit deren sukzessiver Aktivierung stehen, sind die Effektor-Caspasen am Ende der Kaskade zu finden. Diese Funktionalität schlägt sich auch im molekularen Aufbau der Proteasen nieder: Initiator-Caspasen wie beispielsweise Caspase-8, -9 oder -10 haben lange Prodomänen mit sogenannten CARD- (Caspase Recruitment Domain) und DED- (Death Effector Domain) Motiven, die sie zur Interaktion mit anderen Proteinen befähigen (Fesik, 2000). Effektor-Caspasen wie beispielsweise die Caspasen-3, -6 und -7 haben keine CARD- oder DED-Motive, sind jedoch für die irreversible Degradierung der meisten zellulären Proteine und Strukturen nach ihrer Aktivierung durch Initiator-Caspasen verantwortlich. Ihre Substrate umfassen elementar wichtige Proteine aus den folgenden Bereichen einer Zelle: Zytoskelett, Zellzyklus und Replikation, Transkription und Translation, DNA-Reparatur, Proteinkinasen, Zytokinorstufen etc. (Schwerk und Schulze-Osthoff, 2003). Durch diese Effekte lassen sich folgende Konsequenzen für die betroffene Zelle ableiten: Zellzyklusarrest, Inaktivierung von Reparaturmechanismen, Degradierung wichtiger molekularer Strukturen, Verlust der Zellintegrität und Kennzeichnung der Zelle für die Phagozytose.

Die Aktivierung von Caspasen erfolgt entweder über den sogenannten Todesrezeptor-Signalweg (extrinsischer Signalweg) oder den mitochondrialen Weg (intrinsischer Signalweg), die im Folgenden vorgestellt werden.

5.3.2.2 Der Todesrezeptor-Signalweg

Einflüsse vom extrazellulären Raum können über membranständige Rezeptoren Apoptose in Zellen auslösen. Zu den Rezeptoren, die nach Bindung spezifischer Liganden die intrazelluläre Apoptosekaskade aktivieren, gehören die in den meisten Geweben exprimierten "Todesrezeptoren", die zur Superfamilie der TNF- (Tumor Necrosis Factor) Rezeptoren gehören (Leithauser, 1993; Trauth, 1989). Bisher sind acht Todesrezeptoren beschrieben: TNFR1 (auch DR1, CD120a,p55 und p60), CD95 (auch DR2,

APO-1 and Fas), DR3 (auch APO-3, LARD, TRAMP und WSL1), TRAILR1 (auch DR4 und APO-2), TRAILR2 (auch DR5, KILLER und TRICK2), DR6, Ectodysplasin-A-Rezeptor (EDAR), NGFR (French und Tschopp, 2003; Wajant, 2003a+b). Sie sind neben der Transduktion apoptotischer Signale an weiteren grundlegenden biologischen Prozessen wie Differenzierung, Proliferation oder Aktivierung -hier besonders bei Lymphozyten- beteiligt (Locksley, 2001). Den Todesrezeptoren ist gemein, dass sie extrazellulär zwei bis sechs Cysteinreiche Domänen und intrazellulär DD-(Death Domain) Motive aufweisen (Bodmer, 2002). Diese homologen Domänen sind ca. 80 Aminosäuren lang und essentiell für die Auslösung der Apoptose (Tartaglia, 1993).

Der Todesrezeptor CD95 trimerisiert nach Bindung eines spezifischen Liganden und es entsteht umgehend ein Komplex aus mehreren Proteinen, der sogenannte DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Peter und Kramer, 2003), wie Abbildung 1 verdeutlichen soll. In diesem Komplex bindet die intrazelluläre Todesdomäne (DD) des Rezeptors über eine homophile Interaktion an die Todesdomäne des Adapterproteins FADD (Fas-Associated Death Domain containing protein). FADD weist zusätzlich am N-terminalen Ende eine DED auf, die es wiederum erlaubt an Procaspasen zu binden, die ebenfalls eine DED tragen. Dies sind unter den Initiator-Caspasen die Caspase-8 oder -10 (Muzio, 1996). Kommt Caspase-8 in die Nähe des DISC, so erfolgt gemäß des "induced-proximity"-Modells, welches davon ausgeht, dass die beteiligten Proteine bei räumlicher Annäherung eine Reaktion eingehen- sofort ihre autoproteolytische Aktivierung und somit das Auslösen der Apoptose-Kaskade (Medema, 1997; Salvesen und Dixit, 1999). Auch die ebenfalls Todesdomänen aufweisende Caspase-10 wird zum DISC rekrutiert und ebenso wie Caspase-8 prozessiert (Sprick, 2002), doch ist ihre Funktion bisher weitgehend unklar. Der DISC rekrutiert desweiteren das katalytisch inaktive Protein cFLIP (cellular FLICE-Inhibitory Protein), das auch Todesdomänen aufweist, jedoch die Prozessierung von Caspase-8 und -10 -und somit die Apoptose- inhibiert (Krueger, 2001; Peter und Kramer, 2003; Scaffidi, 1999a+b).

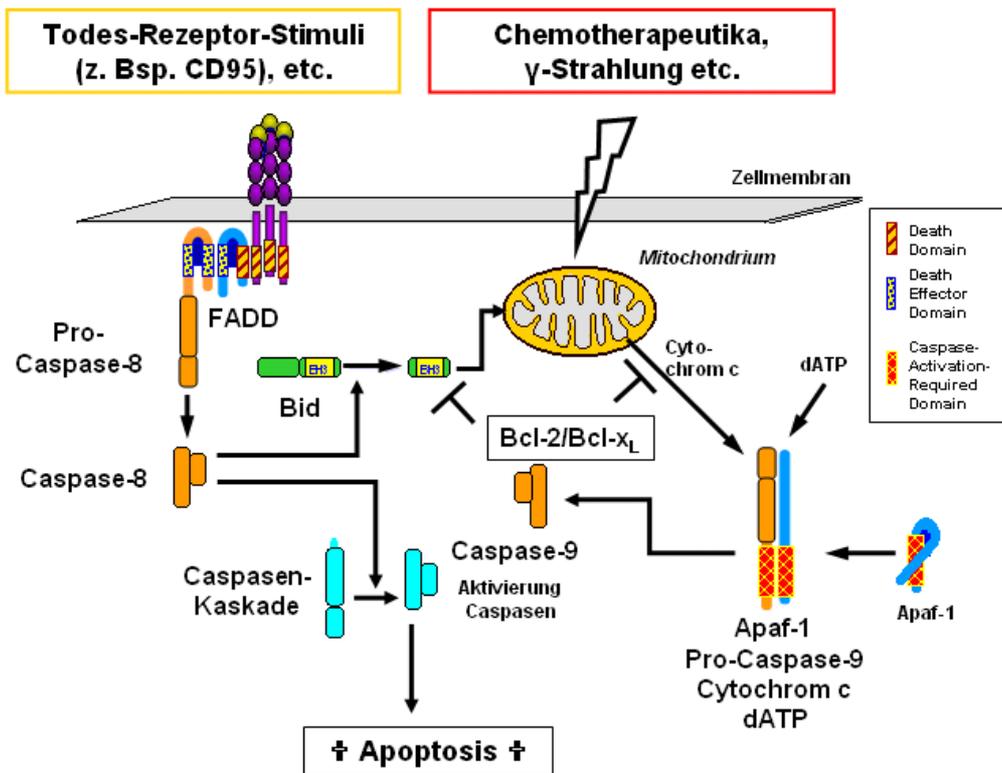


Abb.1: Die apoptotischen Signalwege. Todesrezeptoren wie CD95- oder TRAIL-Rezeptoren werden von Liganden aktiviert und leiten das Signal weiter über das Adapterprotein FADD, das über eine Todesdomäne an den intrazellulären Rezeptor-Teil bindet. FADD bindet über die Todeseffektordomäne an die inaktive Procaspase-8, die sich in der Folge selbst spaltet und aktiv wird. Weiter downstream kommt es zur Aktivierung von Effektorcaspasen. Zelluläre Stressoren wie z. Bsp. Chemotherapeutika führen über Aktivierung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und somit zum Austreten von Proteinen aus dem intermembranären Raum. Hierzu gehört u. a. Cytochrom c, das zusammen mit APAF-1 die Initiator-Caspase-9 aktiviert, die wiederum Effektorcaspasen aktiviert. Eine Querverbindung der beiden Signalwege ist in manchen Zellen durch Bid gegeben, das durch die aktivierte Caspase-8 in t-Bid (*truncated Bid*) überführt werden kann und Apoptose über den mitochondrialen Weg auslösen kann. Modifiziert nach Los et al., 1999.

5.3.2.3 Der mitochondriale Signalweg

Der mitochondriale Apoptoseweg ist charakterisiert durch einen über den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ ausgelösten apoptotischen Zelluntergang. Als Antwort auf bestimmte Stimuli kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (kurz MOMP: "mitochondrial outer membrane permeabilization"), die zu einer Diffusion von Proteinen aus dem intermembranären Raum in das Zytosol führt (Danial and

Korsmeyer, 2004). So diffundiert auch Cytochrom c aus dem Mitochondrium und führt zur Oligomerisierung des Adapterproteins APAF-1 ("apoptotic protease activating factor-1"). APAF-1 induziert die Dimerisierung der Initiator-Caspase Caspase-9. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Effektor-Caspasen wie Caspase-3 und -7. Letztendlich kommt es hierdurch zur Degradation zellulärer Proteine und im Laufe dessen zum apoptotischen Zelluntergang.

Es sind eine Fülle von proapoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen bekannt, die nach Stimulation interagieren können und für den mitochondrialen Apoptoseweg relevant sind. Ergebnis dieser Wechselwirkungen ist dann entweder das Überleben der Zelle oder der apoptotische Zelluntergang. Eine Gruppe von Proteinen, die das Überleben der Zelle sichern können, umfasst die Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 und Bcl-B. Sie schützen die Zelle vor diversen zytotoxischen Stress-Stimuli. Zwei andere Gruppen von Proteinen, die auch zur Bcl-2-Familie gehören, haben hingegen proapoptotische Wirkungen. Dies sind:

- (1) Proteine, die große Ähnlichkeit mit Bcl-2 aufweisen und mit dem Protein mehrere Domänen gemein haben, besonders die sogenannten drei "Bcl-2-homologen"-Domänen (BH1, BH2 und BH3). Man nennt diese Proteine deswegen auch *Multi-Domain Proteins* (MDPs). Vertreter sind beispielsweise Bax, Bak, Bok.
- (2) Die andere proapoptotische Sub-Familie wird gebildet durch die sogenannten *BH3-only Proteine* (BOPs) wie Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa, Bik, Bmf und Hrk, die sich bis auf die identische BH3-Domäne stark von einander sowie von Bcl-2 unterscheiden. Für die proapoptotische Wirkung ist die BH3-Domäne ausschlaggebend (Huang, 2000; Willis, 2005).

MDPs scheinen eine intrinsische Zelltod-induzierende Aktivität zu besitzen. Im Gegensatz dazu benutzen BH3-only Proteine die BH3-Domäne lediglich, um den Einfluss anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie zu modulieren, entweder zur Suppression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL oder zur

Aktivierung von MDPs wie beispielsweise Bax und Bak (Lindsten, 2000; Wei, 2001; Zong, 2001). Sie kontrollieren das MOMP, indem sie sich an Mitochondrienmembranen oligomerisieren und führen somit zu noch nicht komplett verstandenen Defekten in der äußeren Mitochondrienmembran (Green, 2005; Newmeyer, 2003), die zu einem Freiwerden intramitochondrialer Proteine führen (Kuwana, 2002). Die beiden proapoptotischen Proteine Bax und Bak, die drei BH-Domänen gemein haben, scheinen hierbei essentiell für MOMP zu sein (Wei, 2001). Bcl-2 und Bcl-xL wirken in diesem Zusammenhang hingegen als upstream-Modulatoren, welche die Apoptose-promovierenden Aktionen der MDPs an mitochondrialen Membranen antagonisieren (Cheng, 2001; Wei, 2001).

Viel spricht dafür, dass die proapoptotischen Proteine in einem inaktiven Zustand vorliegen bevor sie funktionell in Erscheinung treten. Bax liegt beispielsweise in den meisten Geweben eher im Zytosol als an Membranen von Zellorganellen vor und transloziert erst nach Zelltod-Stimuli zu den Mitochondrien (und zum Endoplasmatischen Retikulum). Als Antwort auf apoptotische Stimuli ändert Bax seine Konformation, bildet Dimere und fügt sich in Membranen ein. Die beiden anderen MDPs, Bak und Bok, scheinen hingegen konstitutiv an Membranen verankert zu sein (Green, 2005; Kuwana, 2002; Nechushtan, 1999; Newmeyer, 2003; Wei, 2001).

Stress-induzierte Apoptose setzt das Vorhandensein von MDPs und BOPs voraus. BOPs scheinen als "Schadens-Sensoren" zu agieren sowie als direkte Bcl-2-Antagonisten (und anderer Überlebens-Proteine) während Bax- und Bax-like-Proteine weiter downstream die Permeabilisierung von Membranen der Mitochondrien sowie des Endoplasmatischen Retikulums verursachen. Unter den bereits mehr als 20 bekannten BOPs konnte bisher erst für Bid und Bim gezeigt werden, dass sie an MDPs binden und diese aktivieren können (Strasser, 2000; Wei, 2000).

Das BH3-only-Protein Bid hat in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung, denn es stellt eine Verbindung zwischen dem Todesrezeptor-Weg und

dem mitochondrialen Apoptoseweg her. Über eine Caspase-8-induzierte Spaltung von Bid in tBid (truncated Bid) kann es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ mit Freiwerden von Cytochrom c und Aktivierung des Apoptosoms kommen (Wajant, 2002). Bid-Aktivierung führt hierbei zur Oligomerisierung von Bak und Bax, wodurch sich Poren in der Mitochondrienmembran bilden und Cytochrom c austritt (Korsmeyer, 2000). Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges hängt aber auch von der Zellart ab und gewährleistet vor allem in Zellen mit insuffizienter Rekrutierung von FADD und Caspase-8 zum DISC nach Todesrezeptorstimulation das Ausführen der Apoptose (Luo, 1998; Rudner, 2005).

5.4 Fragestellung

Dem Medikament Ukrain werden antineoplastische Eigenschaften zugeschrieben, über die diesbezügliche Signaltransduktion ist jedoch wenig bekannt. Bisher gibt es nur wenige Publikationen, die glaubwürdige und valide Daten über die molekularen Wirkmechanismen von Ukrain beschreiben. Auch alle bisher erfassten klinischen Studien mit Ukrain werden in einer aktuellen Metaanalyse als methodisch nicht einwandfrei kritisiert, wenngleich die Autoren eine antineoplastische Wirksamkeit des Medikamentes für belegt erachten (Ernst und Schmidt, 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse zytotoxischer Effekte des Medikamentes Ukrain. Hierbei richtet sich das Hauptaugenmerk auf die Potenz des Präparates zur Apoptoseinduktion in einem T-Lymphom-Modell. Mit Hilfe verschiedener Zellklone soll die Beteiligung der beiden Hauptsignalwege, nämlich des Todesrezeptor- und des mitochondrialen Signalweges, auf ihren Einfluss bezüglich der Ukrain-induzierten Effekte hin untersucht werden. Chelidonin gilt als Hauptalkaloid von Schöllkrautextrakten und ist in Ukrain enthalten, so dass in der vorliegenden Arbeit auch die möglichen Apoptose-induzierenden Effekte dieses bisher in der Literatur kaum beschriebenen Alkaloids untersucht werden.

Aufgrund zweifelhafter Herstellerangaben zur molekularen Struktur von Ukrain

(Panzer, 2000) wurde zudem dessen Zusammensetzung untersucht: Die benutzten Chargen werden massenspektrometrisch analysiert (Fremddaten Dr. Kammerer, Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen).

Letztendlich soll diese Arbeit die zellulären Mechanismen erörtern, die Grundlage für die bisher gemachten Beobachtungen zur Wirksamkeit von Ukrain auf verschiedene Tumorentitäten sind. Darüber hinaus soll geklärt werden inwiefern Alkaloide aus dem Schöllkraut Verursacher der beobachteten Effekte sind.

6. Material

6.1 Zelllinien

6.1.1 Jurkat T-Zell-Lymphom Zellen

Jurkat T-Lymphom-Zellen wurden ursprünglich 1976 aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen entnommen, der an einer akuten lymphoblastischen Leukämie erkrankt war. In der vorliegenden Arbeit wurden Jurkat Vector, Jurkat A3- und Jurkat J16-Zellen benutzt. Darüber hinaus wurden verschiedene Sub-Klone dieser Zelllinie mit definierten genetischen Veränderungen eingesetzt, darunter Caspase-8-negative, Fas-Associated-Death-Domain-negative (FADD-negative) Zellen, Jurkat-Zellen, die eine dominant-negative Variante der Caspase-9 exprimieren (Caspase-9 DN) und c-FLIP-L-exprimierende Zellen (cellular FLICE-like inhibitory protein). Jurkat J16 und Jurkat c-FLIP-L-exprimierende Zellen wurden freundlicherweise von J.Tschopp (Epalinges, Schweiz) zur Verfügung gestellt. CD95/TRAIL-resistente Jurkat-Zellen, Bcl-2- und Bcl-xl-überexprimierende Jurkat-Zellen wurden verwendet (Belka, 2000; Jendrossek, 2003 b; Rudner, 2001). Jurkat A3 T-Lymphom-Zellen wurden über die American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. CD95/TRAIL-resistente Jurkat A3 Zellen wurden durch Dauerkultur infiziert und mit steigenden Konzentrationen an aktivem CD95 und TRAIL erhalten. Jurkat-Zellen sind Suspensionszellen und wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert, das mit 10% FCS und 5% Penicillin und Streptomycin angereichert wurde.

6.1.2 Chang Zellen (Konjunktivalepithel-Zellen)

Als Modell für Normalgewebszellen kamen humane Konjunktivalepithelzellen (Chang-Zellen) zum Einsatz, die ebenfalls von der ATCC bezogen wurden. Sie wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert, das mit 5% FCS versetzt wurde.

6.2 Geräte

Brutschränke	Heraeus Instruments
Elektrophoresekammer	Biometra
FACS	Becton Dickinson
Filmentwickler	Sterling, Diagnostic Imaging
Mikroskop	Wilovert, Wild Leitz
Schüttler	Biometra
Sterilbank	Heraeus Instruments
Tankblot	BioRad
Zentrifugen	Hettich (für Zellkultur) Eppendorf (Tischzentrifuge)

6.3 Verbrauchsmaterial

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Einfrierröhrchen	Greiner
Falcon-Tubes	Falcon, Becton Dickinson
Filterpapier	Whatman 3MM
Kopierfolie	Xerox
PVDF-Membran	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Röntgenfilm	Hyperfilm, Amersham / Kodak
Zellkulturflaschen	Falcon

6.4 Chemikalien

Allokryptopin	Sigma
APS	Sigma
b-Mercaptoethanol	Sigma
Biocoll	Biochrom-Seromed
Bromphenolblau	Sigma
CCCP	Sigma
Chelerythrin	Sigma
Chelidonin	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Etoposid	Alexis Biochemicals
FCS	Gibco
FITC-VAD	Promega
Glycerin	Sigma
Glycin	Sigma
Kulturmedium RPMI	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Protopin	Sigma
Rainbowmarker	Amersham
Sanguinarin	Sigma
Schöllkrautextrakt	Caesar & Loretz (Hilden)
SDS	Sigma
SDS-Puffer 10-fach	Roth
Streptomycin	Invitrogen
TEMED	Roth
TMRE	Mobitech
Tris-HCl	Merck
Trisbase	Merck
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Sigma
Ukrain	Nowicky Pharma
Z-VAD-Caspasen-Inhibitor	Alexis Biochemicals

6.5 Puffer und Lösungen

CST-Lyse-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerol 50 mM DTT 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Sammelpuffer	0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
Transferpuffer	0,19 M Glycin 25 mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol 0,3% (v/v) SDS, 20 % pH 8,3
Trennpuffer	0,15 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS auf pH 8,8 mit HCl eingestellt
TBS	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 8,0
PBS	9,7 mM NaCl 1,5 mM KCl 0,14 M NaHPO ₄ 2,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

6.6 Antikörper und Liganden

Anti-Caspase-3 (Rabbit)	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-Caspase-3, cleaved	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-Caspase-8	BioCheck (Münster, Deutschland)
Anti-Caspase-9	Upstate (Hamburg, Deutschland)
PARP (Rabbit)	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-PARP, cleaved (Rabbit)	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-Bcl-2 (Mouse)	Santa Cruz Biotech (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Bim (Rabbit)	Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Bak NT (Rabbit)	Upstate (Hamburg, Deutschland)
Anti-Bad (Rabbit)	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-Bid (Rabbit)	R & D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
TRAIL	R & D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
Anti-IgG (Mouse, Rabbit)	Peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper, Santa-Cruz-Biotech (Heidelberg, Deutschland)
Anti-IgG (Schaf)	Peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper, Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)

7. Methoden

7.1 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37,0°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Chang-Zellen wurden mit 5%-igem FCS und ohne Streptomycin sowie Penicillin kultiviert.

7.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden etwa 1×10^7 Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1,5ml Einfriermedium (75 % RMPI, 20 % FCS, 5 % DMSO) aufgenommen. Die

Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C stufenweise eingefroren.

Das Wiederauftauen erfolgte im Wasserbad bei 37°C . Anschließend wurden die Proben einmal mit Medium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Nach zwei Tagen erfolgte dann zur Abtrennung toter Zellen mit dem Ficoll-Aufreinigungsverfahren. Hierbei wurden die Zellen zunächst pelletiert (5 Minuten, $500\times g$) und dann wieder in 5ml Zellkulturmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend vorsichtig auf 5ml vorgelegte Ficoll-Lösung geschichtet. Hiernach folgte ein zwanzig-minütiger Zentrifugationsvorgang ($500\times g$, ohne Bremse). Der Interphasering, in dem die lebenden Zellen angereichert vorliegen, wurde abgenommen, in 5ml Zellkulturmedium überführt und vorsichtig durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, $500\times g$, mit Bremse) wurde das Pellet wiederum in 5 ml Zellkulturmedium gelöst, in die Kulturflasche überführt und diese schließlich mit 15-20ml Zellkulturmedium aufgefüllt.

7.3 Lösungen

7.3.1 Ukrain

Das Präparat "Ukrain" wurde von der Firma Nowicky Pharmaceuticals (Wien, Österreich) in einer Konzentration von $1\text{mg}/1\text{ml}$ (bezogen auf das "Ukrain-Molekül") zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine braun-gelbliche Flüssigkeit, die den Herstellerangaben entsprechend gelagert wurde. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit $5\mu\text{g}/\text{ml}$, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ und $50\mu\text{g}/\text{ml}$ Ukrain.

7.3.2 Schöllkrautalkaloide

Die Alkaloide Chelidonin, Chelerythrin, Sanguinarin, Protopin und Allocryptopin wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) erworben. Zu Versuchszwecken wurden Stammlösungen der einzelnen Stoffe hergestellt. Hierzu wurden Allocryptopin, Chelerythrin und Protopin in Wasser, Chelidonin in DMSO und Sanguinarin in Methanol gelöst. Die Konzentrationen der

einzelnen Stammlösungen betragen 1mM, 10mM oder 100mM.

7.3.3 Schöllkrautextrakt

Der Nativ-Extrakt der Schöllkraut-Pflanze lag in 58% Ethanol gelöst vor. Nach Herstellerangaben beinhaltete die Lösung des Nativ-Extraktes 0,35% (w/w) alkalische Bestandteile, die als Gehalt am Hauptalkaloid Chelidonin angegeben waren. Zu Versuchszwecken wurde eine Stammlösung von 1mM Chelidonin hergestellt.

7.3.4 Sonstige

Das Medikament Etoposid wurde in DMSO gelöst. Es wurden Stammlösungen in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 25 μ M hergestellt.

Tetramethylrhodamin-Ethyl-Ester (TMRE) zur durchflusszytometrischen Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) (Firma Mottac, Göttingen, Deutschland) wurde in Wasser gelöst und es wurde eine 25 μ M Stammlösung hergestellt.

Hoechst 33342 (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) und Propidium-Jodid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurden in Wasser gelöst und bei 4° C (Hoechst 33342) und -20° C (Propidium-Jodid) aufbewahrt. Hoechst 33342 wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ml und Propidium-Jodid in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml im Versuchsansatz angewandt. Für Zytotoxizitäts-Assays wurde Trypan-Blau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einer 0,04%-Lösung verwendet.

Bei Versuchen mit dem irreversiblen Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk (Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon), der in DMSO gelöst wurde, wurde eine Konzentration von 30 μ M im Versuchsansatz eingestellt. Die Proben wurden 2 Stunden vor der Behandlung mit anderen Stoffen zum Ansatz hinzugegeben.

7.4 Behandlung der Zellen

7.4.1 Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ("FACS" = Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen sowie die Analyse von physikalischen Eigenschaften von Zellen und einzelnen Molekülen in einem Flüssigkeitsstrom. Sie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von speziell markierten, intrazellulären Proteinen (oder von Oberflächenmolekülen). Die zu untersuchenden Zellen werden "hydrodynamisch fokussiert", d. h. in einer Lösung einzeln an einem gebündelten Laserstrahl (Argonlaser, Wellenlänge 488nm) mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt.

7.4.2 Messung der Zellmorphologie

Nach Auftreffen der Laserlichtes auf die Zellen entsteht ein für die jeweilige Zellmorphologie charakteristisches Streulicht, das in ein "Vorwärts"- (engl.: Forward Light Scatter = FSC) und ein "Seitwärts"- (Side Scatter = SSC) Streulicht eingeteilt werden kann. Ersteres beschreibt die Größe der untersuchten Zellen und zweiteres die intrazelluläre Granularität. Bei dieser Art der Untersuchung wählt man als Visualisierung zumeist ein "dotplot"-Diagramm, bei dem jede einzelne Messung als Punkt in einem Diagramm abgebildet wird, das auf der x-Achse die Seitwärtsstreuung und auf der y-Achse die Vorwärtsstreuung darstellt. Apoptotische Zellen sind im Vergleich zu vitalen Zellen eher klein und weisen einen hohen Grad an intrazellulärer Granulierung auf. Somit kann mit der oben beschriebenen Analyse eine Aussage über den Gehalt einer Probe an apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften getroffen werden. Zur Messung des $\Delta\psi_m$ wurden 2×10^5 Zellen abzentrifugiert (500xg, 5 min) und dann in 300 μ l Zellkulturmedium aufgenommen oder die Daten wurden parallel zu TMRE- oder FITC-VAD-Messungen erhoben.

7.4.3 Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$

Mit Hilfe des lipophilen, kationischen (positiv geladen) und potentialsensitiven Farbstoffes TMRE (Tetramethylrhodamin-Ethyl-Ester) kann eine Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ vorgenommen werden. In Abhängigkeit dieses Potentials verteilt sich TMRE unterschiedlich im zytosolischen Raum und in Mitochondrien (negativ geladen). Das Verhältnis von zytosolischem und mitochondrialem TMRE gibt Auskunft über $\Delta\psi_m$. TMRE wird durch die Wellenlänge des Lasers angeregt und emittiert daraufhin Licht einer differenten Intensität. Die Intensität des Signals verkleinert sich mit der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials.

Zur Darstellung wird ein Histogramm verwendet, bei dem die gemessene Intensität des emittierten Lichts in einer Häufigkeitsverteilung aufgetragen ist. Apoptose führt charakteristischerweise zu einer (frühen) Reduktion bzw. einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, das in der Folge zum Untergang der betroffenen Zellen führt.

Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen mit CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon), einem effektiven Depolarisations-Agens, behandelt, mit dem bei jeder Meßreihe ein vollständiger Zusammenbruch der mitochondrialen Membran exemplarisch dargestellt werden kann. Zur Messung des $\Delta\psi_m$ wurden die Zellen abzentrifugiert (500xg, 5 min), dann in einer 25nM TMRE-Lösung aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Probe wurde mit 1µM CCCP inkubiert und als Positivkontrolle für eine komplette Depolarisation der mitochondrialen Membran benutzt.

7.4.4 Messung der Caspasen-Aktiverung

Die Aktivierung von Caspasen wurde mit Hilfe von CaspACE® FITC-VAD-fmk gemessen, einem zellpermeablen Pan-Caspaseninhibitor, der irreversibel an Caspasen bindet. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl und folgender Abgabe der Energie wird Energie in Form

von Photonen frei, die von einem Photodetektor registriert wird. Die Konzentration an Photonen, die registriert wird ist proportional der Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes und somit zur Menge an aktiven Caspasen. Die Darstellung der Analysen erfolgte mit Hilfe eines Histogramms, bei dem die Intensität der gemessenen Photonen in einer Häufigkeitsverteilung aufgetragen ist.

Zur Messung des Caspasen-Aktivierung wurden 2×10^5 Zellen abzentrifugiert (500xg, 5min), dann in 300 μ l einer 10 μ M CaspACE® FITC-VAD-fmk-Lösung aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die Zellen in einem "Waschvorgang" abzentrifugiert (500xg, 5min) und in 300 μ l PBS aufgenommen. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsgang (500xg, 5min), wonach das Pellet erneut in 300 μ l PBS resuspendiert wurde.

7.4.5 Vitalitätsmessung

7.4.5.1 Trypan-Blau Färbung

Zur Bestimmung der Zahl lebender und toter Zellen wurden die in der Zellkulturflasche suspendierten Zellen mit einer 1:10 verdünnten Trypan-Blau-Lösung (gelöst in PBS) in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskopes gezählt. Die Zytotoxizität von Ukrain wurde ebenfalls mit Hilfe der Trypanblau-Anfärbung gemessen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der in anionischer Form an Zellproteine bindet. Er gelangt durch defekte Zellmembranen von toten Zellen und trägt somit zur Blauverfärbung des Zytoplasmas bei. Trypanblau wurde bei dieser Untersuchung in einer Konzentration von 0,04% verwendet. Zu Versuchszwecken wurden 10^5 Zellen für 10 Minuten mit dieser Lösung inkubiert, anschließend wurden die Anzahl an lebenden (transparentes, helles Erscheinungsbild) und toten (Blaufärbung) Zellen mit einem Lichtmikroskop bestimmt.

7.4.5.2 Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung

Der Zelltod wurde weiterhin fluoreszenzmikroskopisch durch Färbung mit den Farbstoffen Hoechst 33342 und Propidium-Jodid untersucht. Beide Farbstoffe haben die Eigenschaft in die DNA zu interkalieren und können nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 380nm durch Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bestimmt werden. Während Hoechst 33342 in lebenden und toten Zellen an DNA bindet, zeigt Propidium-Jodid diese Eigenschaft nur in toten Zellen. Eine Differenzierung in Apoptose und Nekrose erfolgt nach Färbung mit diesen Fluoreszenzfarbstoffen anhand der für diese beiden Phänomene charakteristischen DNA-Morphologie. Hierzu wurden 10^5 Zellen 15 Minuten im Dunkeln mit $1,5 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 oder mit $1,5 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 und $2,5 \mu\text{g/ml}$ Propidium Jodid inkubiert. Apoptotische Zellen zeigten nach Färbung mit Hoechst 33342 kondensierte Chromatinstrukturen und nukleäre Fragmentierung, die sich bei der oben beschriebenen Wellenlänge von 380 nm blau darstellen. Fragmentierte Kerne und kondensierte DNA, die sich mit Propidium-Jodid rot anfärben, weisen auf späte Apoptose hin. Eine leichte Rotfärbung durch Propidium-Jodid ohne erkennbare Fragmentierung oder Kondensation der DNA und des Chromatins weist auf Nekrose hin. Somit konnten die beiden Zelltodformen bei gleichzeitiger Färbung mit beiden Fluoreszenzstoffen von einander differenziert werden. Gezählt wurden mindestens 250 Zellen für einen Messwert bei 40-facher Vergrößerung. Ergebnisse wurden mit Hilfe einer CCD Kamera (Zeiss AxioCam Mrm) dokumentiert.

7.4.6 Gelelektrophorese/Western Blot

7.4.6.1 Herstellung der Lysate

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium ausgesät und behandelt. Nach Behandlungsende wurden die Proben abzentrifugiert ($500\times g$, 5 Minuten) und die Zellzahl erneut bestimmt. Im folgenden wurden die Zellen in PBS in Anteilen zu $2/3$ aufgenommen und anschließend wurde in Anteilen zu $1/3$ 3-fach konzentrierter, auf 100°C erhitzter Lyse-Puffer aufgenommen. Danach wurden

die Proben 10 Minuten bei 100° C erhitzt. Sofort im Anschluß wurden die Proben bei -20° C eingefroren. Die Konzentration der Zellen betrug in allen Proben 10^7 Zellen/ml.

7.4.6.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Benötigt werden hierfür eine Elektrophoresekammer, zwei Glasplatten, in die das Gel eingebettet ist und Laufpuffer, der in einem oberen und unteren Pufferreservoir vorliegt (Abb. 2). Das aus Acrylamid bestehende Elektrophorese-Gel hat zwei Komponenten: Sammel- und Trenngel. Die Proben werden in eigenen Taschen -kleinen rechteckigen Einbuchtungen- des Sammelgels aufgetragen nachdem sie zuvor 5 Minuten bei 100° C erhitzt wurden. In eine Tasche wurden 10µl der Zelllysate eingebracht. Dies entspricht einer Anzahl von 10^5 lysierten Zellen. In der Folge wurde ein konstanter Stromfluß über das Gel gelegt (60mA), der dazu führte, dass die aufgetragenen, durch SDS des Lysepuffers negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wanderten. Nachdem die Proben komplett durch das Sammelgel gelaufen waren, wurde der Stromfluss auf 160mA erhöht. Die Proteine wandern im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode und werden dabei lediglich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Abb. 2). Weiterhin kann die Porengröße des Gels durch Veränderung der Acrylamidkonzentration variiert werden, so dass je nach Fragestellung eine optimale Auftrennung der Proteine ergibt.

Die in der vorliegenden Arbeit im Westernblot nachgewiesenen Proteine sind zuvor gelelektrophoretisch unter Verwendung von 12%-igem Trenngel aufgetrennt worden. Lediglich für den Nachweis des Proteins PARP wurde 10%iges Trenngel eingesetzt.

	1 Trenngel		
	10%	12%	14%
Trennpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Wasser	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml
Gel 30	5,0 ml	6,0 ml	7,0 ml
APS (100mg/ml H ₂ O)	75 µl	75 µl	75 µl
Temed	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl

Tab. 1: Zusammensetzung Trenngel

	2 Sammelgele
Sammelpuffer	1,75 ml
Wasser	4,20 ml
Gel 30	1,05 ml
APS (100 mg/ml H ₂ O)	70 µl
Temed	7 µl

Tab. 2: Zusammensetzung Sammelgel

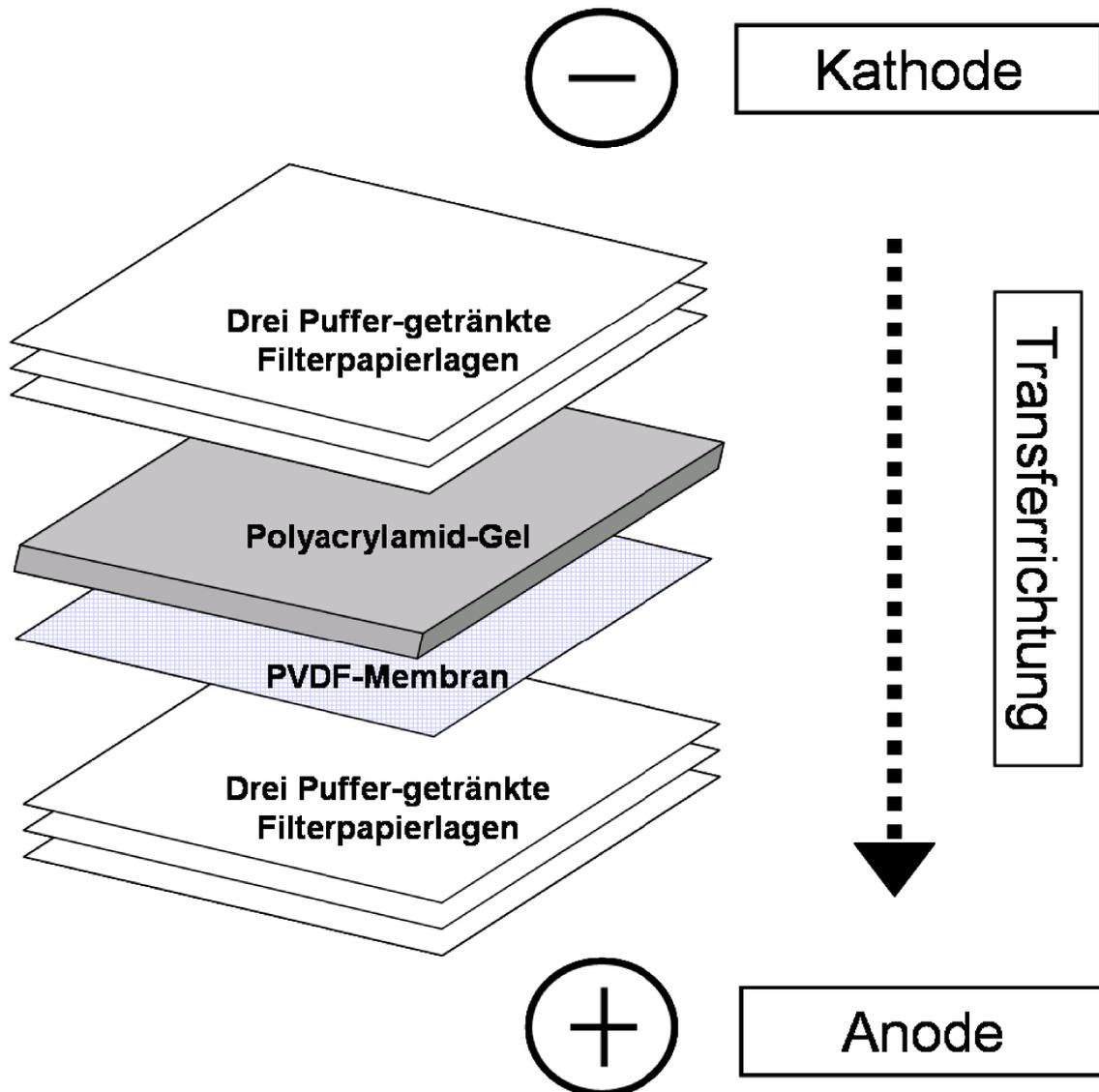


Abb. 2: Gelelektrophorese. Die auf dem Gel fixierten Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert indem in einem elektrischen Feld eine konstante Spannung angelegt wird. Die negativ geladenen Proteine wandern daraufhin in Richtung der positiv geladenen Anode und setzen sich auf diesem Wege auf der PVDF-Membran fest. Dieser Vorgang wird in einer speziellen Elektrolytlösung (Transferpuffer) initiiert. Polyacrylamid-Gel sowie PVDF-Membran sind zwischen drei Puffer-getränkten Filterpapiereinlagen und Schwämmchen eingebettet.

7.4.6.3 Western-Blotting

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennt vorliegenden Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurde das Gel von den Glasplatten abgelöst und auf die erwähnte Membran gelegt.

Zusätzlich wurden drei Lagen Filterpapier sowohl hinter die PVDF-Membran als auch hinter das isolierte Gel angebracht. Weiterhin werden aussen zwei Schwammeinlagen positioniert und alles zusammen in eine Transferkassette überführt. Diese Transferkassette wird nun in eine Pufferlösung gebracht, in der ein elektrisches Feld angelegt wird. Dieses bewirkt einen Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran. Der Blot-Vorgang erfolgt bei einer konstanten Spannung von 80 Volt und dauert 90 Minuten.

7.4.6.4 Detektion der Proteine

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran eine Stunde in TBS-Puffer mit 0,05% Tween-20 und 5% Milchpulver (Ausnahme: 3% Milchpulver bei Caspase-9-Antikörper) geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert (gleiche Lösung wie beim Blocken).

Nach vier wiederholten Waschschritten mit TBS-Tween-20 (0,05%) am Folgetag wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper (Verdünnung richtet sich nach dem jeweiligen Primärantikörper) in TBS-Tween-20 (0,05%) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran folgten erneut vier Waschschrritte mit TBS-Tween-20 (0,05%). Antikörper-Bindungen wurden durch ein Chemoluminiszenz-Verfahren (ECL Western blotting analysis system, Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) dargestellt. Dieses Verfahren besteht darin, dass bei den gebildeten Enzym-Antikörper-Konjugaten durch Zugabe des Enzyms eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert wird. Das durch die Lumineszenz emittierte Licht kann beispielsweise auf einer Röntgenfilmkassette dargestellt werden.

Nachfolgend wurde deswegen die Enzyme enthaltende Detektionslösung für 1 Minute auf die Membran gegeben, die in einer Röntgenfilmkassette positioniert wurde. Die Membran wurde zwischen Klarsichtfolie und zu entwickelndem Film positioniert. Die Belichtungsdauer variierte je nach Antikörper zwischen zwei Minuten und 24 Stunden. Auf dem entwickelten Film wurden danach die für den Antikörper charakteristischen Banden sichtbar. Die gleichmäßige Proteinladung

wurde mittels Comassie-Blue-Färbung der Membran kontrolliert.

7.5 Statistische Analyse

Die aufgeführten Experimente (Hoechst 33342/Propidium-Jodid-Färbungen, durchflusszytometrische Analysen) wurden mindestens drei mal wiederholt. Die Daten werden in den Diagrammen als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt. In manchen Fällen wurde die "spezifische Apoptose" dargestellt (% Apoptose in behandelten Zellen minus % Apoptose in unbehandelten Kontrollzellen). Unterschiede zwischen den Messwerten wurden gegebenenfalls mittels "one-way ANOVA" oder t-Test auf Signifikanz überprüft, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ gesetzt wurde. Diese Berechnungen wurden unter Zuhilfenahme des Software-Programms GraphPad InStat (Version 3.00 für Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Die so errechneten p-Werte sind in den jeweiligen Diagrammen dargestellt. Konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$), so ist die Bezeichnung "n.s." (nicht signifikant) aufgeführt.

8. Ergebnisse

8.1 Antineoplastische Wirksamkeit von Ukrain

8.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Ukrain

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das Präparat Ukrain hinsichtlich zytotoxischer Wirkungen auf maligne Zellen überprüft werden, wie sie in der Literatur bereits für verschiedene maligne Zellen gezeigt wurde. Die zytotoxischen Wirkungen des Präparates Ukrain wurden zunächst mit Hilfe des Trypan-Blau-Ausschlusses untersucht. Mit dieser Methode ist es möglich Zelluntergang nachzuweisen, da die Zellmembranen abgestorbener Zellen nicht mehr intakt sind und durchlässig werden. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff hingegen nicht ins Zellinnere auf und sind somit von den untergegangenen Zellen zu unterscheiden.

In Abbildung 3 (links und rechts) ist die Abhängigkeit des Zelluntergangs von der Ukrain-Konzentration sowie von der Zeit nach Ukrain-Behandlung dargestellt. Es zeigte sich dabei, dass Ukrain in Jurkat Zellen dosis- und zeitabhängig Zelltod induziert, was durch die bereits in der Literatur beschriebenen zytotoxischen Effekte zu erwarten war.

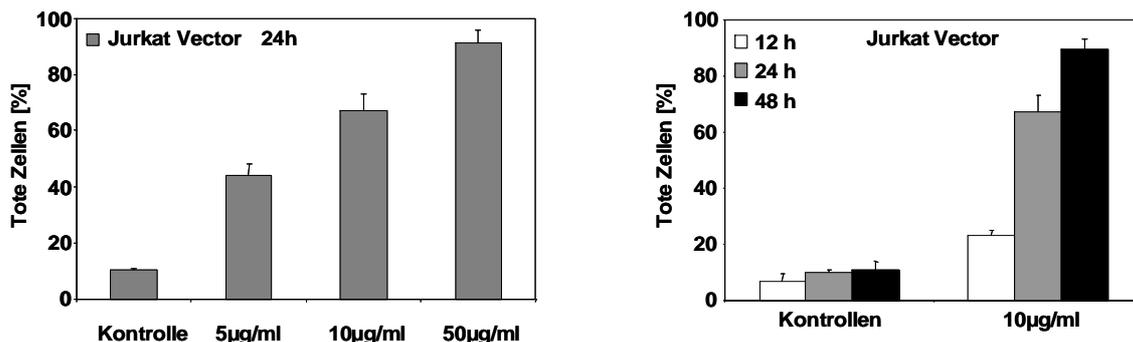


Abb. 3: Zytotoxische Wirkung von Ukrain. Links: Jurkat Vector Zellen wurden 24h mit den Konzentrationen 0, 5, 10 und 50µg/ml Ukrain behandelt, anschliessend mit Trypan-Blau versetzt und lichtmikroskopisch beurteilt. Rechts: Jurkat Vector Zellen wurden für 12, 24 und 48h mit 10µg/ml Ukrain behandelt und anschliessend mittels Trypan-Blau-Färbung analysiert. Darstellung der Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob und in welchem Umfang Apoptose-Induktion zur beobachteten zytotoxischen Wirksamkeit beiträgt.

Hierzu wurden Jurkat Vector- und A3-Zellen konzentrations- und zeitabhängig mit Ukrain behandelt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 4). Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 bindet an das im Zellkern vorliegende Chromatin und erlaubt bei gleichzeitiger UV-Belichtung eine Aussage über das Vorliegen einer für die Apoptose charakteristischen Morphologie, nämlich der Chromatinkondensation und der nukleären Fragmentierung. Es zeigte sich, dass eine Behandlung der Zellen mit beispielsweise 10µg/ml Ukrain zu einer deutlichen Apoptose-Morphologie führt.

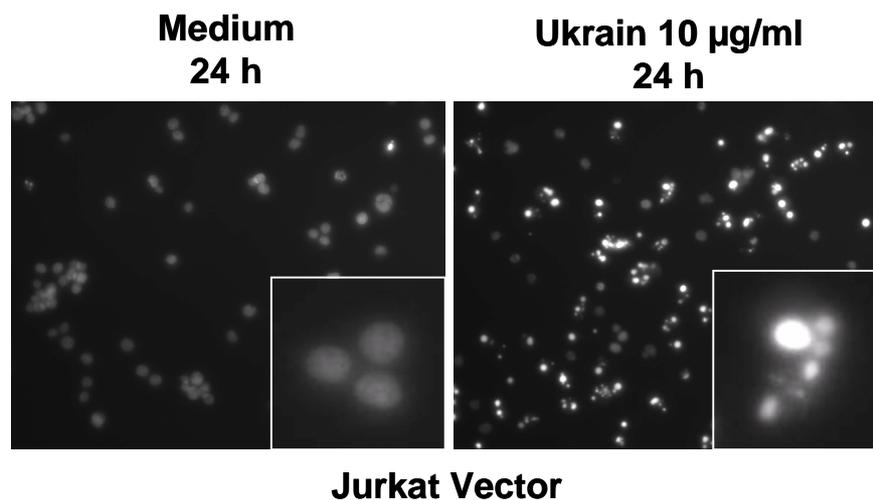


Abb. 4: Apoptose-Induktion nach Ukrain-Behandlung. Jurkat Vector Zellen wurden mit 10µg/ml Ukrain behandelt, nach 24h mit dem Farbstoff Hoechst inkubiert und anschliessend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Auf dem linken Bild ist der unbehandelte Ansatz zu sehen, auf dem rechten der für 24h mit 10 µg/ml Ukrain behandelte. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Versuche. Im rechten unteren Bildabschnitt ist jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnittes abgebildet.

Zur weiteren Überprüfung und Quantifizierung der entdeckten apoptotischen Effekte nach Ukrain-Behandlung maligner Zellen, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe der Light Scatter-Darstellung konnte gezeigt werden, dass Ukrain-Behandlung bei Jurkat Vector Zellen zum konzentrations- und zeitabhängigen apoptotischen

Zelluntergang führte (Abb. 5). Eine weitere Verifizierung des apoptotischen Zelluntergangs ist mit der Messung der Alteration des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ möglich. Jurkat Zellen wurden nach Behandlung mit Ukrain durchflusszytometrisch unter Zuhilfenahme des Fluoreszenzfarbstoffes TMRE untersucht (Abb. 5). Bei diesen Versuchen konnte ein charakteristischer Zusammenbruch des Potentials gezeigt werden, der auf apoptotischen Zelluntergang hinweist. Die Aktivierung von Caspasen -ein wesentliches Merkmal der Apoptose- wurde mit Hilfe des FITC-gekoppelten Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk durchflusszytometrisch untersucht. In den nachfolgenden Versuchen wurden Jurkat Zellen wie auch schon bei den vorhergehenden Experimenten mit Ukrain behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit Ukrain zur dosis- und zeitabhängigen Aktivierung von Caspasen in Jurkat Zellen führt.

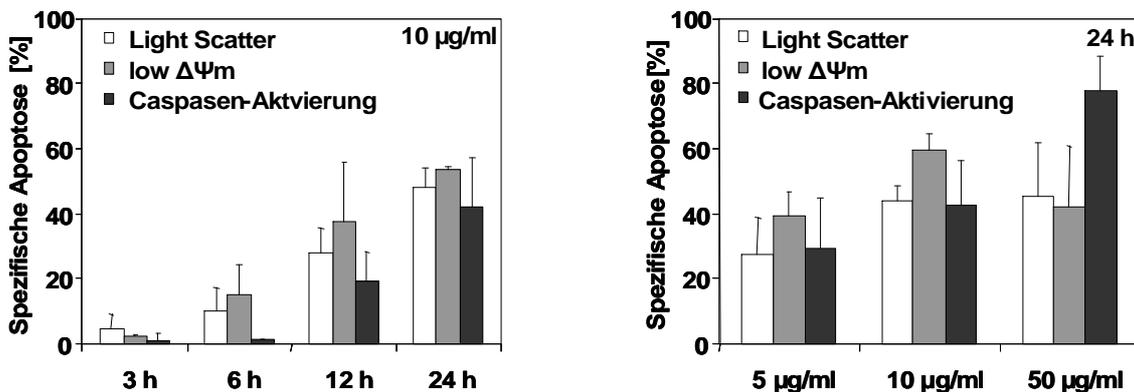


Abb. 5: Quantifizierung der Ukrain-induzierten Apoptose. Links: Jurkat Vector Zellen wurden für 3, 6, 12 und 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt und danach durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollen und behandelten Zellen wurden im Light Scatter (weiße Balken), mittels TMRE-Färbung zur Bestimmung des Zusammenbruchs von $\Delta\psi_m$ (graue Balken) und mittels FITC-VAD zur Caspasenaktivierung (schwarze Balken) untersucht. Rechts: Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 5, 10 und 50µg/ml Ukrain behandelt. Die Darstellung der unterschiedlichen Methoden ist analog dem linken Diagramm. Darstellung der Mittelwerte (n≥3) mit Standardabweichung.

Caspasen sind Proteine, die bei Aktivierung im Rahmen der Apoptose gespalten werden. Diese Spaltung bewirkt eine veränderte Größe der Proteine, die mittels Darstellung der jeweiligen Spaltfragmente im Western Blot nachgewiesen werden kann. Die Caspasen-3 und -8 sowie das DNA-

Reparaturenzym PARP werden zum Beispiel typischerweise bei Apoptose gespalten. Die Zellysate zuvor mit 10µg/ml Ukrain behandelte Jurkat Vector Zellen zeigten im Western Blot eine charakteristische Spaltung der oben genannten Proteine (Abb. 6) im zeitlichen Verlauf. So trat nach 12h eine PARP-Fragmentierung und eine deutliche Spaltung der Caspasen 3 und 8 auf. Diese Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass die Behandlung mit Ukrain zu Apoptose-typischen Phänomenen führt, wie der Spaltung von Caspasen und PARP.

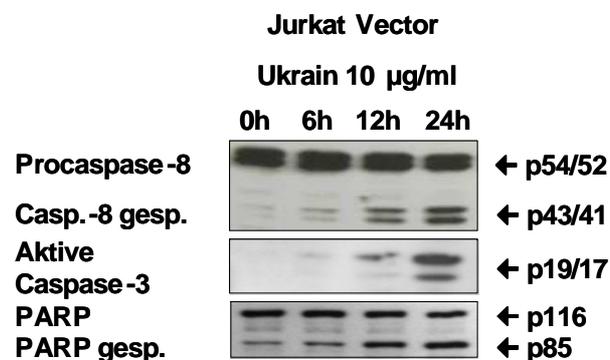


Abb. 6: Ukrain-vermittelte Spaltung von Procaspase-8, Caspase-3 und PARP. Jurkat Vector Zellen wurden 0, 6, 12 und 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt, danach lysiert und mittels Western-Blot analysiert. Die Spaltung und somit erfolgte Aktivierung der Caspasen-3 und -8 sowie die Spaltung und gleichzeitige Inaktivierung von PARP wurden mittels Antikörpern gegen die Spaltprodukte analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

Die autokatalytische Spaltung der Caspasen führt ausserdem zu einer charakteristischen Kaskade, welche die Aktivierung weiterer proapoptotischer Faktoren zur Folge hat und zur typischen Degradierung zellulärer Bestandteile führt. Die vorangegangenen Versuche legen den Schluss nahe, dass Ukrain durch Caspasenaktivierung Apoptose in Jurkat Vector Zellen induziert. In weiteren Versuchen wurde dieses Phänomen näher untersucht. Eine Hemmung von Caspasen -wie sie beispielsweise mit Hilfe des Pan-Caspasen-Inhibitors zVAD durchgeführt werden kann- sollte demzufolge die durch Ukrain induzierte Apoptose hemmen (Abb. 7). Der Pan-Caspasen-Inhibitor zVAD inhibiert Caspasen irreversibel, so dass apoptotische Vorgänge blockiert oder zumindest

deutlich abgeschwächt werden.

Im folgenden Versuch wurden die mit Ukrain behandelten Jurkat A3-Zellen vorher für 2h mit zVAD inkubiert. Hiernach wurden die Zellen für 12h und 24h mit jeweils 0 und 10µg/ml Ukrain behandelt und nach Färbung mit Hoechst 33342 mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Der Versuch ist in Abb. 7 dargestellt und zeigt, dass mit zVAD inkubierte Jurkat A3-Zellen nach 12 und 24h Behandlung mit 10µg/ml Ukrain in signifikant geringerem Ausmaß Apoptose zeigten als Zellen, die nicht mit einem Pan-Caspasen-Inhibitor behandelt wurden. Die Behandlung des Versuchsansatzes mit zVAD allein führte nicht zu einer vermehrten Apoptose-Induktion. Aufgrund dieser Beobachtungen muss davon ausgegangen werden, dass Caspasen essentiell für die Ukrain-induzierte Apoptose sind.

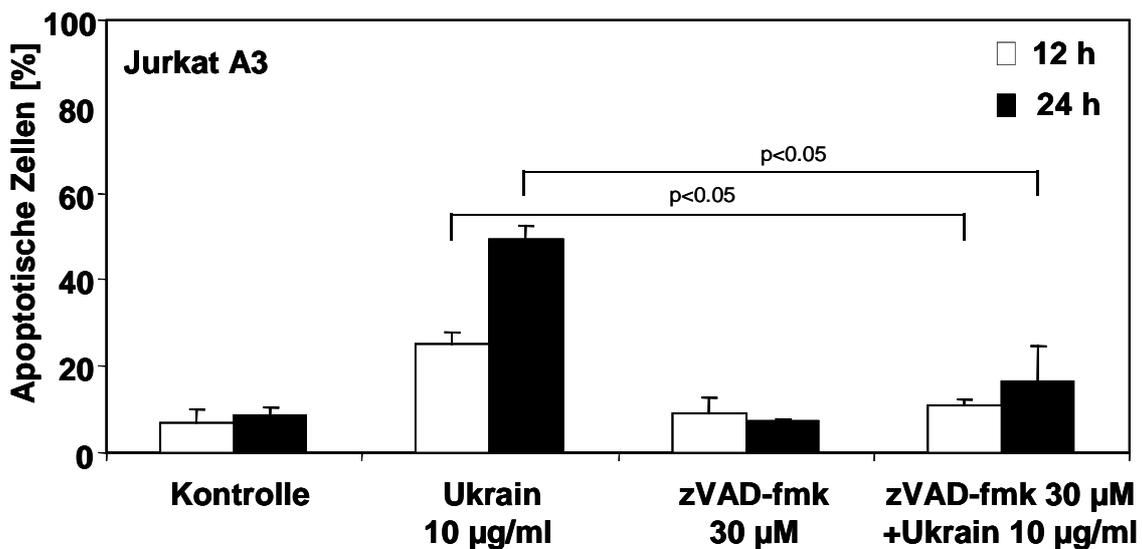


Abb. 7: Rolle der Caspasen in der Ukrain-vermittelten Apoptose. Jurkat A3-Zellen wurden für 12 und 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt, danach mit Hoechst 33342 versetzt und mikroskopisch untersucht. Ein Versuchsansatz (ganz rechts) wurde zuvor für 2h mit dem irreversiblen pan-Caspaseninhibitor zVAD-fmk inkubiert, der zur Inhibition von Caspasen führte, und danach für die entsprechenden Zeiträume mit der angegebenen Ukrain-Konzentration behandelt. Ausserdem sind zwei Kontrollen dargestellt (control und zVAD-fmk 30µM). Darstellung der Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt.

In Abbildung 8 ist ein repräsentativer Ausschnitt des oben beschriebenen

Versuchsansatzes abgebildet. Nach 24h Behandlung der Jurkat A3-Zellen mit 10µg/ml Ukrain sind im zVAD-präinkubierten Ansatz deutlich weniger Zellen mit nukleärer Fragmentierung und kondensiertem Chromatin zu erkennen als im Ansatz ohne vorhergehende Zugabe des Pan-Caspasen-Inhibitors zVAD, was die Notwendigkeit aktivierter Caspasen hinsichtlich der Ukrain-induzierten Apoptose verdeutlicht.

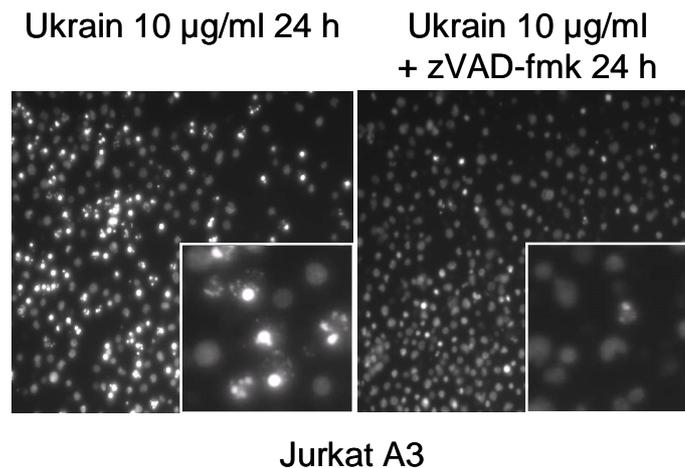


Abb. 8: Einfluss der Inhibition von Caspasen auf die Ukrain-vermittelte Apoptose. Repräsentative Ausschnitte aus den in Abb. 7 beschriebenen Versuchen. **Links:** Jurkat A3-Zellen wurden für 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt. Jeweils ein Versuchsansatz wurde mit dem pan-Caspaseninhibitor zVAD-fmk inkubiert (**rechts**) und danach mit 10µg/ml Ukrain für 24h behandelt. Hiernach wurden die Ansätze mit dem Farbstoff Hoechst 33342 inkubiert und mikroskopisch untersucht. Es handelt sich bei den Bildern um repräsentative Ausschnitte des Versuches. Am rechten unteren Bildrand ist zur Verdeutlichung jeweils eine Vergrößerung des Bildausschnittes abgebildet.

8.1.2 Normalgewebszellen und maligne Zellen

Eine antineoplastische Therapie ist vor allem dann besonders effektiv, wenn spezifisch Zelltod in Tumorzellen erzeugt werden kann. Normalgewebszellen sollten hierbei möglichst von apoptotischen und weiteren zum Zelltod führenden Mechanismen durch Chemotherapeutika verschont bleiben. Aus diesem Grund wurde die Wirkung Ukrain auf Normalgewebszellen untersucht. Hierzu wurden Chang-Zellen (Konjunktivalepithelzellen) mit einer Konzentration von 5 bis 50µg/ml Ukrain behandelt und mittels Hoechst 33342-Färbung und anschließender Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 9).

Es zeigte sich, dass Ukrain im angegebenen Konzentrationsbereich nach 24h Behandlungszeit Apoptose in Chang-Zellen auslöste, aber in weitaus geringerem Ausmaß als in Jurkat Vector Zellen. Ukrain führte also nicht nur in malignen Zellen zu Apoptose sondern entfaltet auch in Normalgewebszellen seine Zytotoxizität in Form eines apoptotischen Zelluntergangs.

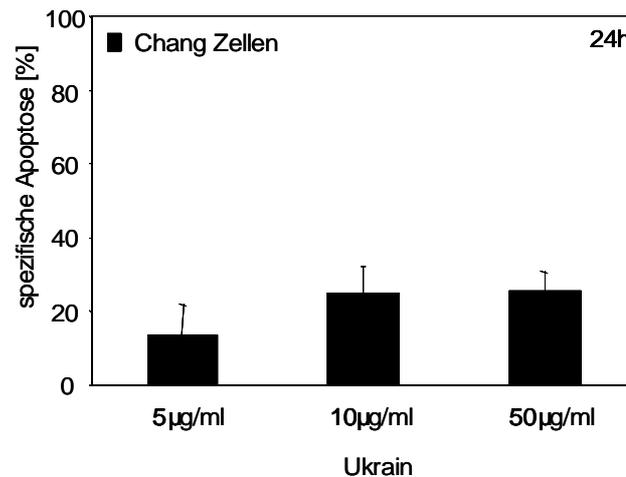


Abb. 9: Wirkung von Ukrain auf Normalgewebszellen. Humane Chang-Konjunktivalepithelzellen wurden 24h mit 5, 10 und 50 µg/ml Ukrain behandelt, mit dem Farbstoff Hoechst 33342 inkubiert und mikroskopisch untersucht. Darstellung der Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

8.2 Mechanismen der Ukrain-induzierten Apoptose

Bisher konnte gezeigt werden, dass Ukrain dosis- und zeitabhängig Apoptose in malignen Zellen induzieren kann. Es ist bekannt, dass apoptotische Zelltodvorgänge über verschiedene intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden können: zum einen über den Todesrezeptor-vermittelten Signalweg, bei dem beispielsweise das Adapterprotein FADD (Fas-Associated-Death-Domain) und die Initiatorcaspase Caspase-8 rekrutiert werden oder über einen mitochondrialen Signalweg, der beispielsweise durch das anti-apoptotische BH3-Familien-Protein Bcl-2 blockiert werden kann und die Initiator-Caspase-9 involviert. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern einer der beiden Signalwege für die Ukrain-induzierte Apoptose von Bedeutung ist.

Hierzu wurden Jurkat-Zell-Klone eingesetzt, die Defekte oder Veränderungen in einzelnen Signalproteinen aufweisen, die essentiell für die über den Todesrezeptor-Signalweg oder den mitochondrialen Signalweg induzierte Apoptose sind.

8.2.1 Untersuchung des Todesrezeptor-Signalweges

Zur Untersuchung des Todesrezeptor-Weges wurden FADD- und Caspase-8 negative Jurkat-Zellen verwendet, sowie Jurkat A3-Zellen als Kontrolle.

Zunächst wurden die genannten Zellklone für 24h mit 5, 10 und 50µg/ml Ukrain behandelt und danach durchflusszytometrisch im Light Scatter untersucht (Abb. 10). Es zeigte sich weiterhin eine konzentrationsabhängiger Anstieg apoptotischer Zellen, der bei allen drei Zelllinien vergleichbar war. Wie Abbildung 10 zeigt, konnte die Abwesenheit von den für den Todesrezeptor-Signalweg benötigten Proteine Caspase-8 und FADD den durch Ukrain induzierten Zelluntergang nicht verringern. Somit scheinen diese Proteine nicht relevant für die intrazelluläre Signaltransduktion Ukrain-vermittelter Effekte zu sein.

Sodann wurde die Alteration des mitochondrialen Membranpotentials nach Ukrain-Behandlung untersucht. Auch in diesen Versuchen zeigte sich kein Einfluss von funktioneller Caspase-8- und FADD-Abwesenheit auf die Ukrain-vermittelte Apoptose. Sowohl bei der durchflusszytometrischen Light Scatter-Untersuchung als auch bei Messung des mitochondrialen Membranpotential-Zusammenbruchs zeigte sich eine Dosis- und Zeitabhängigkeit bei der Apoptose-Induktion sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den Caspase-8- und FADD-negativen Jurkat Zellen.

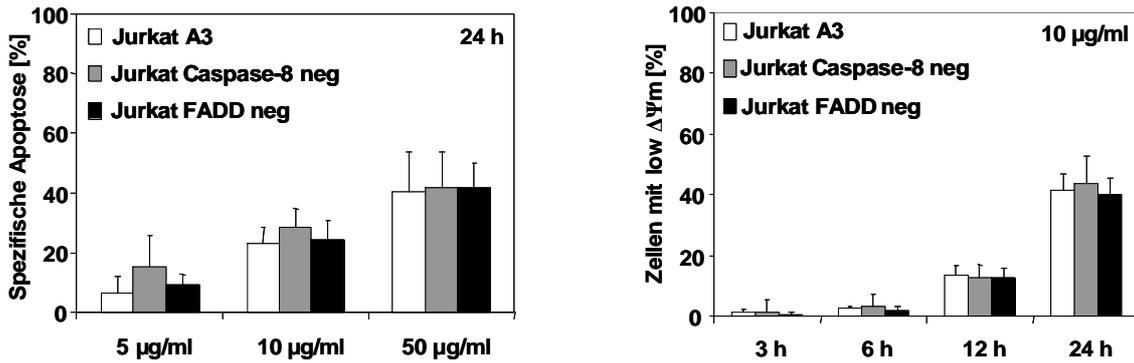


Abb. 10: Rolle des Todesrezeptorsignalweges bei der Ukrain-vermittelten Apoptose. links: Jurkat A3-Kontroll-Zellen sowie Jurkat Caspase-8- und FADD-negative Zellen wurden für 24h mit 5, 10 und 50 µg/ml Ukrain behandelt und anschließend durchflusszytometrisch im Light Scatter analysiert. Rechts: Hier wurden die zuvor genannten Zellklone für 3, 6, 12, und 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt und anschließend der $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch. Darstellung der Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung.

Zum weiteren Verständnis des Ukrain-induzierten Zelltodes bei den oben beschriebenen Zelllinien wurden Westernblot-Analysen von Zelllysaten nach Ukrain-Behandlung angefertigt (Abb. 11). Es wurde analysiert, inwiefern die Initiator-Caspase-8, die Effektor-Caspase-3 und das DNA-Reparatur-Enzym PARP Veränderungen im Verlauf der Behandlung mit Ukrain zeigen. Hierbei wurde nach möglichen Spaltprodukten der drei Proteine geschaut, die im Rahmen der Apoptose entstehen: dem aktiven p19-Fragment von Caspase-3, den beiden Spaltprodukten p43/41 der Procaspase-8 sowie dem PARP-Spaltprodukt p85. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analysen dargestellt. Die Spaltprodukte wurden nach 0, 6, 12 und 24h Behandlungszeit überprüft und im Fall der Caspase-8 auch zusätzlich noch nach 3h. Eine Spaltung der Procaspase-3 und PARP fand sich bei allen drei Zelllinien, wobei die FADD-negativen Jurkat Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien eine leicht geringere beziehungsweise verzögerte Spaltung der beiden Proteine zeigten, was unter Berücksichtigung der durchflusszytometrischen Daten jedoch lediglich als zufällige Varianz zu werten ist. Zwischen den Jurkat A3-Kontrollzellen und den Caspase-8-negativen Zellen zeigten sich bezüglich des Vorliegens der Caspase-3- und PARP-Spaltprodukte keine Unterschiede. Bei den Spaltprodukten der Caspase-8 zeigte sich dann

wiederum kein Unterschied zwischen den Jurkat A3-Kontrollen und den FADD-negativen Jurkat Zellen. FADD-negative Zellen zeigten bezüglich des Vorliegens der Caspase-8-Spaltprodukte dieselbe Kinetik wie die Kontrollzellen.

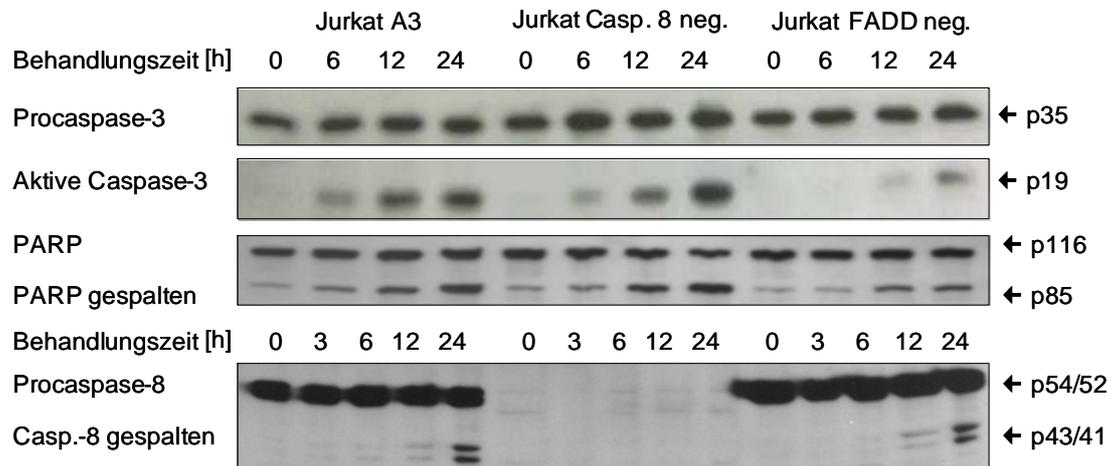


Abb. 11: Einfluss der Ukrain-Behandlung auf die Spaltung von Procaspase-8, Caspase-3 und PARP in Jurkat A3, Caspase-8- sowie FADD-negativen Zellen. Jurkat A3-Kontrollzellen sowie Caspase-8- und FADD-negative Jurkat Zellklone wurden zu den Zeitpunkten 0, (3), 6, 12 und 24h mit 10µg/ml Ukrain behandelt; anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blotting wurde das Auftreten von Caspase-3-, Caspase-8- und PARP-Spaltprodukten mittels spezifischer Antikörper kontrolliert. Die Daten wurden einem repräsentativen Experiment entnommen.

Aufgrund der aus den Western Blot- und durchflusszytometrischen Analysen gewonnenen Daten kann zusammenfassend festgehalten werden, dass das Fehlen von Caspase-8 und FADD, die beide essentiell für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sind, keinen bedeutsamen Einfluss auf die Ukrain-vermittelte Aktivierung von Caspasen hat.

Zur weiteren Absicherung des Befundes, dass die Ukrain-induzierte Apoptose unabhängig vom Todesrezeptorweg ist, wurden weitere Versuche mit Jurkat-Zellen durchgeführt, die das katalytisch inaktive Protein cFLIP (cellular FLICE-Inhibitory Protein) exprimieren (Abb. 12). Dieses inhibiert im Normalfall mit seinen Todesdomänen die Prozessierung von Caspase-8 und -10. Aus diesem Grund sind cFLIP-exprimierende Zellen unempfindlich gegenüber

Todesrezeptor-Stimuli wie beispielsweise TRAIL. Gleichzeitig wurde die Ukrain-induzierte Apoptose bei Jurkat A3-Zellen getestet, die unempfindlich gegenüber einer CD95- und TRAIL-induzierten, also gegenüber einer Todesrezeptor-vermittelten Apoptose, sind.

Abbildung 12 zeigt die graphische Auswertung der oben beschriebenen Versuche. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Jurkat cFLIP- und CD95/TRAIL-resistente Jurkat A3-Zellen keine Sensitivität gegenüber einer TRAIL-Behandlung aufwiesen, wohingegen Jurkat J16-Kontrollzellen wie erwartet apoptotisch untergingen. Ukrain-Behandlung führte bei den drei Zelllinien zu einem deutlichen und quantitativ vergleichbaren apoptotischen Zelluntergang.

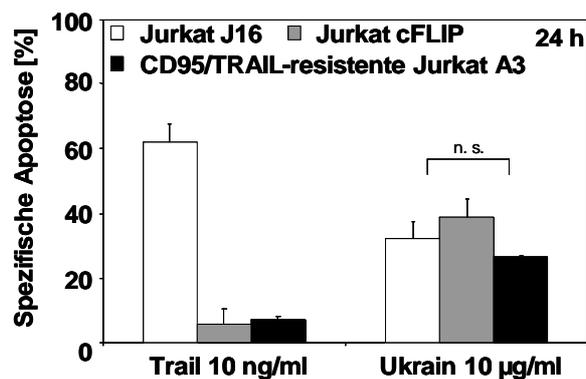


Abb. 12: Wirkung von Ukrain auf Jurkat-Zellen, die resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sind. Jurkat J16-Kontrollzellen sowie Jurkat A3-Zellen, die resistent gegenüber CD95- und TRAIL-induzierter Apoptose sind und Jurkat Zellen, die das Caspase-8-inhibierende Protein cFLIP exprimieren, wurden für 24 h mit dem Apoptose-Induktor TRAIL ($c = 10\text{ng/ml}$) sowie Ukrain ($c=10\mu\text{g/ml}$) behandelt und anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 mikroskopisch dargestellt. Darstellung der Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. Berechnung der Signifikanz mittels ANOVA.

Die Tatsache, dass die Kontrollzellen in etwa gleichem Ausmaß mit apoptotischem Zelltod reagierten wie die cFLIP-exprimierenden und CD95/TRAIL-resistenten Jurkat A3-Zellen, unterstützt die vorangegangenen Untersuchungen hinsichtlich der Feststellung, dass die Ukrain-vermittelte Apoptose nicht durch den Todesrezeptorweg oder durch am Todesrezeptorweg beteiligte Proteine ausgelöst wird.

8.2.2 Untersuchung des mitochondrialen Signalweges

Mit Hilfe von Jurkat-Zellen, die anti-apoptotisches Bcl-2 (Jurkat Bcl-2) überexprimieren oder eine dominant-negative Form der Caspase-9 (Jurkat Caspase-9 DN), wurde die Rolle der mitochondrialen Apoptoseweges im Rahmen der Ukrain-vermittelten Apoptose untersucht.

Zunächst wurden die drei oben genannten Zelllinien für 24h mit 10 μ g/ml Ukrain behandelt und nach Färbung mit Hoechst 33342 mikroskopisch ausgewertet (Abb. 13 links). Hierbei zeigte sich, dass die Apoptose-Induktion bei den beiden Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert ist. Dies weist auf eine Hemmung der Ukrain-induzierten Apoptose auf Ebene der Mitochondrien hin. Um die Rolle der Mitochondrien genauer zu erörtern, wurde in den folgenden Versuchen die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ nach Ukrain-Behandlung der drei Zelllinien untersucht.

Aus diesem Grund wurden Ukrain-induzierte Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ nach Behandlung von Jurkat Vector, Bcl-2 und Caspase-9 DN-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 13 rechts). Für die Dauer von 24h wurden die Zellen mit 5, 10 und 50 μ g/ml Ukrain behandelt. Bei Bcl-2- und Caspase-9 DN-Zellen fiel die apoptotische Antwort im Vergleich zu Jurkat Vector Kontrollzellen immer geringer aus. Diese Beobachtungen sind erklärbar durch die anti-apoptotischen Funktionen der beiden Proteine. Anti-apoptotisches Bcl-2 hemmt den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials aufgrund seiner membranstabilisierenden Wirkung, so dass nach Behandlung mit Ukrain weniger Zellen eine diesbezügliche Potentialänderung aufweisen als die Kontrollzellen. Caspase-9 DN-Zellen hemmen die apoptotische Signaltransduktion unterhalb (downstream) des Mitochondriums, da erst nach dem Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ eine Aktivierung der Caspase-9 erfolgen kann. Die dominant-negative Mutante (Caspase-9 DN) kann aus diesem Grund erst nach erfolgtem Potential-Zusammenbruch die Signaltransduktion hemmen.

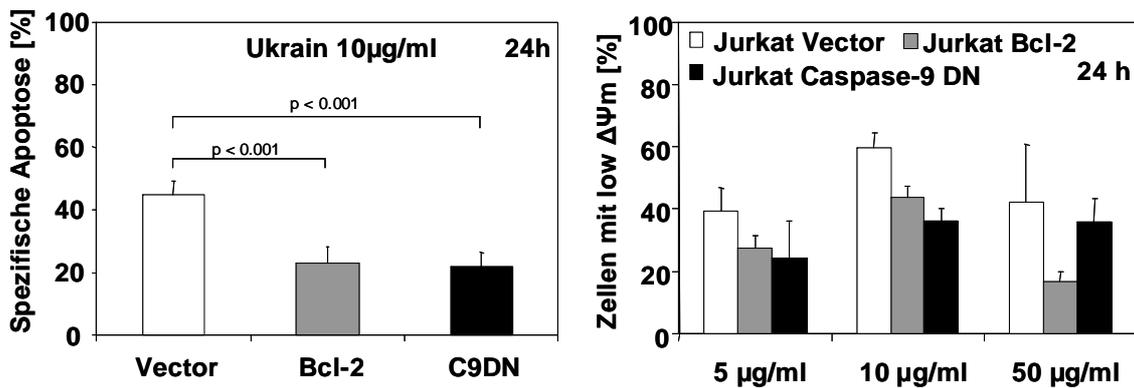


Abb. 13: Einfluss der Überexpression von Bcl-2 und der Expression einer dominant-negativen Variante der Caspase-9 auf die Ukrain-induzierte Apoptose. Links: Jurkat Vector-Kontrollzellen sowie Bcl-2-überexprimierende Zellen und Jurkat-Zellen, die eine dominant-negative Form der Caspase-9 exprimieren, wurden für 24h mit 10 µg/ml Ukrain behandelt, danach mit Hoechst-Farbstoff gefärbt und anschliessend mikroskopisch untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3); Signifikanz wurde mittels ANOVA ermittelt. Rechts: Die genannten drei Zelllinien wurden 24h mit 5, 10 und 50 µg/ml Ukrain behandelt. Nach TMRE-Färbung wurde bei den Zellen durchflusszytometrisch der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n ≥ 3).

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob die beobachtete Hemmung der Apoptose durch die beiden Proteine auch auf Ebene der Caspasen nachweisbar ist. Wie schon bei der Analyse des Todesrezeptorweges im (Kapitel 4.2.1) so wurden auch hier Westernblot-Analysen mit Zelllysaten hinsichtlich des Vorliegens der Spaltprodukte von Procaspase-3 und -8 sowie von PARP nach Ukrain-Behandlung gemacht (Abb. 14). Es kamen Zelllysate der Zelllinien Jurkat Vector, Jurkat Bcl-2 und Jurkat Caspase-9 DN zum Einsatz. Aus den Analysen geht hervor, dass vor allem Bcl-2 Überexpression mit einer deutlich verminderten Spaltung der Caspasen und von PARP einhergeht; die Expression einer dominant-negativen Caspase-9 zeigte hingegen eine verminderte Spaltung der genannten Proteine. Die Überexpression von Bcl-2 in Jurkat Bcl-2-Zellen sowie die Expression einer dominant-negativen Caspase-9 (Caspase-9 DN) sind in Abbildung 14 dargestellt.

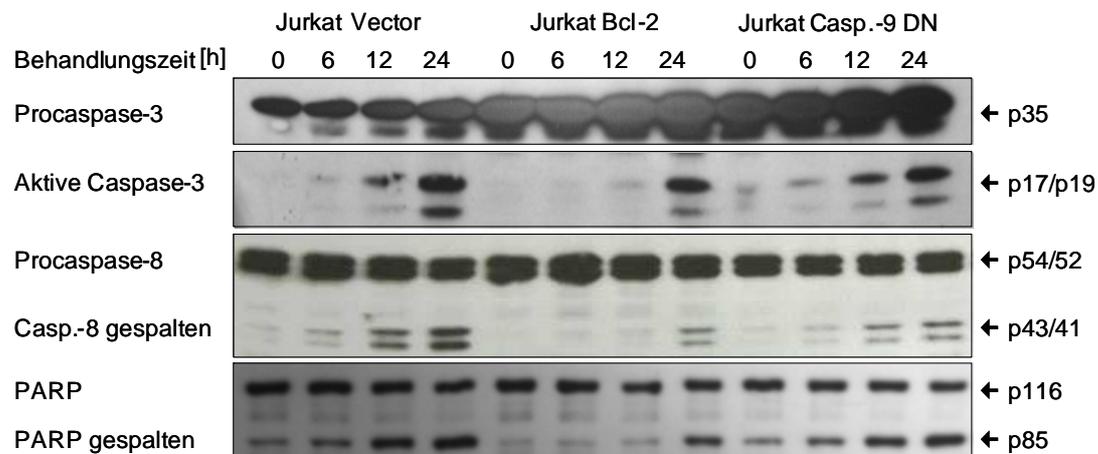


Abb. 14: Einfluss der Überexpression von Bcl-2 und der Expression einer dominant-negativen Variante der Caspase-9 auf die Ukrain-vermittelte Apoptose. Jurkat Vector-Kontrollzellen, Jurkat Bcl-2 und Caspase-9 DN Jurkat-Zellen wurden mit $c=10\mu\text{g/ml}$ Ukrain behandelt und zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 24h geerntet und lysiert. Daraufhin wurden Westernblots angefertigt, um die möglichen Spaltprodukte von Caspase-3, -8 und PARP nachzuweisen. Gezeigt ist ein jeweils repräsentatives Experiment.

Die vorangegangenen Versuche legten den Schluss nahe, dass anti-apoptotisches Bcl-2 einen hemmenden Einfluss auf die Ukrain-vermittelte Apoptose besitzt. Die Wirkung von Bcl-2 (sowohl hinsichtlich Aktivierung als auch Inaktivierung) wird beispielsweise über die quantitative Expression, den Phosphorylierungsstatus und die Interaktion mit anderen pro- und anti-apoptotischen Proteinen wie beispielsweise Bad, Bak und Bid gesteuert. In diesem Zusammenhang wurde die Bcl-2 Expression in Jurkat Vector Kontroll- sowie Jurkat Bcl-2-Zellen nach Ukrain-Behandlung im Westernblot untersucht (Abb. 15). Es zeigte sich bei Jurkat Bcl-2 Zellen keine Veränderung der Bcl-2-Expression bei unterschiedlichen Ukrain-Konzentrationen. Bei Konzentrationen ab $10\mu\text{g/ml}$ Ukrain trat eine Doppelbande oberhalb der Bcl-2-Bande auf, die womöglich auf eine durch Ukrain-bedingte Phosphorylierung des Proteins zurückzuführen ist oder im Rahmen der gesteigerten Protein-degradation durch vermehrten Zelluntergang bei den genannten Konzentrationen auftrat. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass kein Phospho-spezifischer Antikörper eingesetzt wurde.

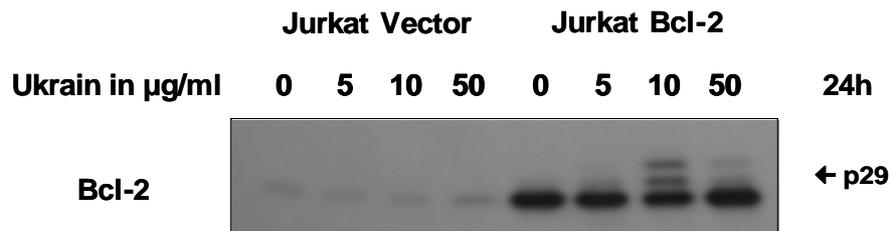


Abb. 15: Einfluss der Ukrain-Behandlung auf die Bcl-2-Expression bei Jurkat Vector Kontroll- und Bcl-2-überexprimierenden Zellen. Jurkat Vector-Kontroll- und Bcl-2 überexprimierende Jurkat-Zellen wurden für 24h mit 0, 5, 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Ukrain behandelt, lysiert und danach im Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 untersucht. Die Daten entstammen einem repräsentativen Experiment.

Außer Bcl-2 können noch andere Proteine, vornehmlich die sogenannten BH3-only Proteine, Apoptose auf Ebene des Mitochondriums auslösen oder verhindern. Dies geschieht beispielsweise über eine Hoch- oder Runterregulation der entsprechenden Proteine. In weiteren Versuchen wurde dies für die Proteine Bad, Bak und Bid überprüft (Abb. 16). Zellysate wurden zum einen für 24h mit 0, 5, 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Ukrain behandelt und zum anderen in einer weiteren Versuchsreihe für 0, 6, 12 und 24h mit 10 $\mu\text{g/ml}$. Es zeigte sich in den Versuchen weder eine zeit- noch eine dosisabhängige Veränderung der Expressionslevel der drei Proteine. Die Behandlung mit Ukrain scheint somit keine Auswirkung auf die Expressionslevel der drei Proteine zu haben, so dass ihre Rolle bei der Ukrain-vermittelten Apoptose wohl von untergeordneter Bedeutung ist.

Während die Ukrain-induzierte Apoptose keinen Einfluss auf die Expression der Proteine Bad, Bak und Bid zeigte, wurde der Einfluss eines weiteren Bcl2-Proteins, nämlich Bcl-xL, auf die Ukrain-vermittelte Apoptose untersucht (Abb. 17). In der Folge wurden Versuche mit Jurkat Vector Zellen unternommen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-xL exprimieren. Diese wurden wie auch Jurkat Vector-Kontrollzellen hinsichtlich einer dosis- sowie zeitabhängigen Apoptose-Induktion untersucht. Bcl-xL-exprimierende Zellen zeigten hierbei eine deutliche und signifikante Reduktion der durch Ukrain vermittelten Apoptose-Induktion im Vergleich zu Jurkat Vector-Kontrollzellen. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-

xL und Bcl-2 scheinen somit potente Inhibitoren der Ukrain-vermittelten Apoptose in Jurkat Vector Zellen zu sein.

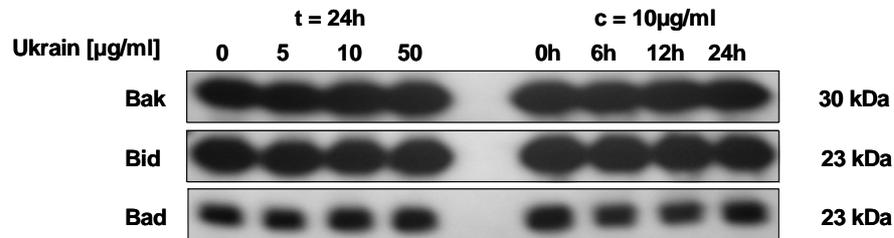


Abb. 16: Einfluss der Ukrain-Behandlung auf die Expression der Bcl-2-Familienmitglieder Bad, Bak und Bid. Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 5, 10 und 50 µg/ml Ukrain behandelt (links) oder für 0, 6, 12 und 24h mit 10µg/ml (rechts). Danach wurden die Zellen lysiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend im Westernblot unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper gegen Bad, Bak und Bid analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

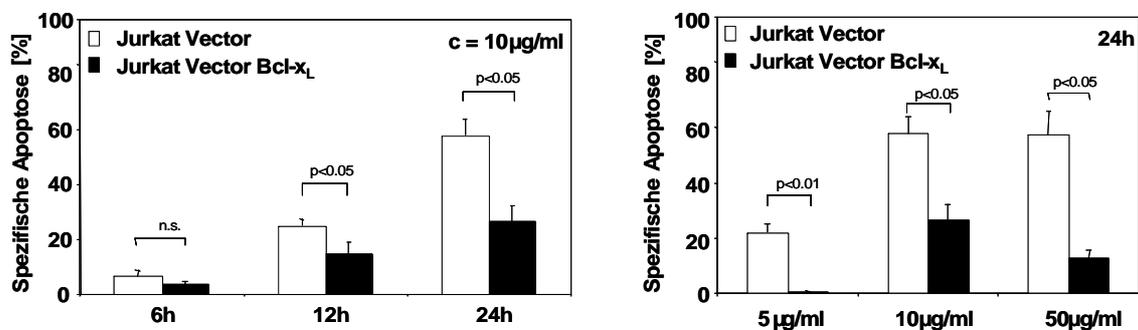


Abb. 17: Einfluss des anti-apoptotischen Bcl-xL auf die Ukrain-vermittelte Apoptose. Jurkat Vector-Kontrollzellen und Jurkat Vector Zellen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-xL exprimieren, wurden mit Ukrain behandelt. **Links:** Die beiden Zelllinien wurden mit 10µg/ml Ukrain für 6, 12 und 24h behandelt, danach mit Hoechst 33342 angefärbt und mikroskopisch untersucht. **Rechts:** Hier wurden die beiden Zelllinien für 24h mit 5, 10 und 50µg/ml Ukrain behandelt und anschliessend nach Hoechst-Färbung analysiert. Die Daten zeigen die spezifische Apoptose (% Apoptose in den behandelten Zellen minus % Apoptose in nicht-behandelten Kontrollzellen) als Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3); Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt.

Zusammenfassend konnte bis hierher gezeigt werden, dass Ukrain Zelltod mittels Apoptose in Jurkat-T-Lymphom-Zellen induziert. Weiterhin deuten die

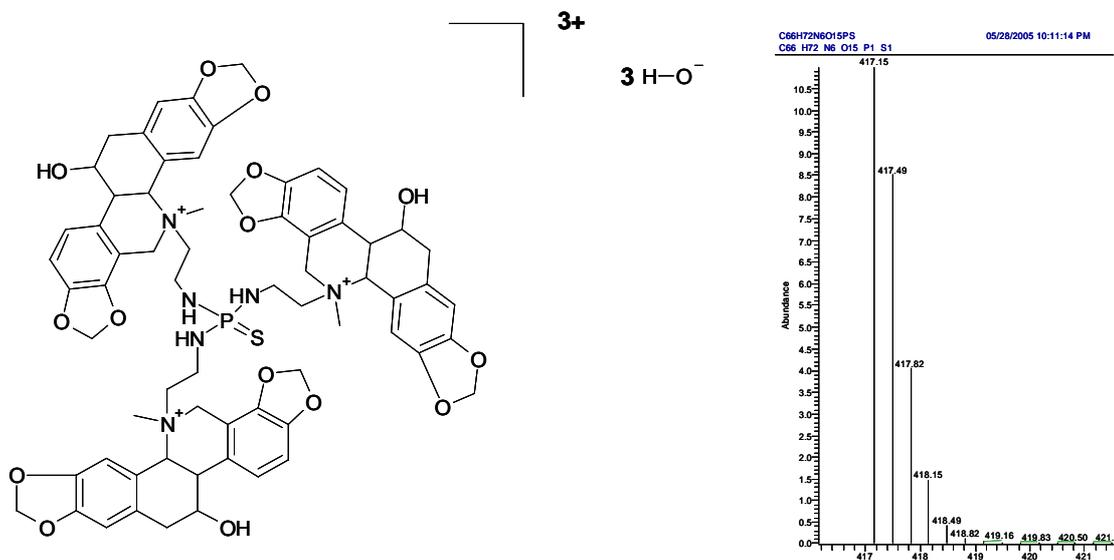
oben gezeigten Untersuchungen des Signalgeschehens auf eine Bedeutung des mitochondrialen Weges hin, da eine deutliche Reduktion der apoptotischen Ereignisse bei Anwesenheit der am Mitochondrium wirkenden, anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL beobachtet werden konnte. Ausserdem bewirkte die Expression einer dominant negativen Variante von Caspase-9 ebenfalls eine -wenngleich auch geringer ausgeprägte- Hemmung der Ukrain-vermittelten Apoptose.

8.3 Identifizierung der molekularen Zusammensetzung von Ukrain und Schöllkraut

Da in der Literatur bereits Publikationen erschienen, die Zweifel an der vom Hersteller Nowicky Pharma postulierten molekularen Zusammensetzung des Präparates Ukrain äußerten, wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen, die Zusammensetzung des verwendeten Präparates auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

Als Hauptwirkkomponente von Ukrain wurde von Herstellerseite ein "Ukrainmolekül" (Abb. 18 links) vorgeschlagen, das aus einem zentralen Thio-tepa-Molekül umgeben von zwei Chelidonin-Molekülen in kovalenter Bindung, besteht. Um die Zusammensetzung des postulierten Präparates zu überprüfen, wurden massenspektrometrische Messungen angefertigt. Überraschenderweise stellte sich im Ionenchromatogramm eines triple-Quadrupol-MS-Systems heraus, dass die postulierte Struktur nicht nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus wurden auch keine dimere oder monomere Kondensate von Thio-Tepa mit zwei oder einem Chelidonin-Produkt gefunden (Abb. 18 rechts).

Bei weiteren massenspektrometrischen Untersuchungen des Präparates wurden fünf Hauptinhaltsstoffe identifiziert, davon auch einige Schöllkrautalkaloide wie Allokryptopin, Chelidonin, Chelerythrin, Protopin und Sanguinarin (Abb. 19, 20, 21, 22). Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Fragmentierungsmuster im MS/MS-Experiment mit Referenzsubstanzen. Desweiteren konnten die gleichen Substanzen ebenfalls in einem kommerziell erhältlichen Schöllkrautextrakt nachgewiesen werden (Abb. 23).



Strukturformel: C₆₆H₇₂N₆O₁₅PS (Kation)

Masse: 1251.45 Da

**Calculated isotopic
pattern of [C₆₆H₇₂N₆O₁₅PS]³⁺**

Abb. 18: Strukturformel von Ukrain und kalkulierte Isotopenmuster. Von Herstellerseite postulierte Struktur eines "Ukrain-Moleküls" (links) und Darstellung eines kalkulierten Isotopenmuster für die Formel [C₆₆H₇₂N₆O₁₅PS]³⁺ (rechts). Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kammerer, Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen.

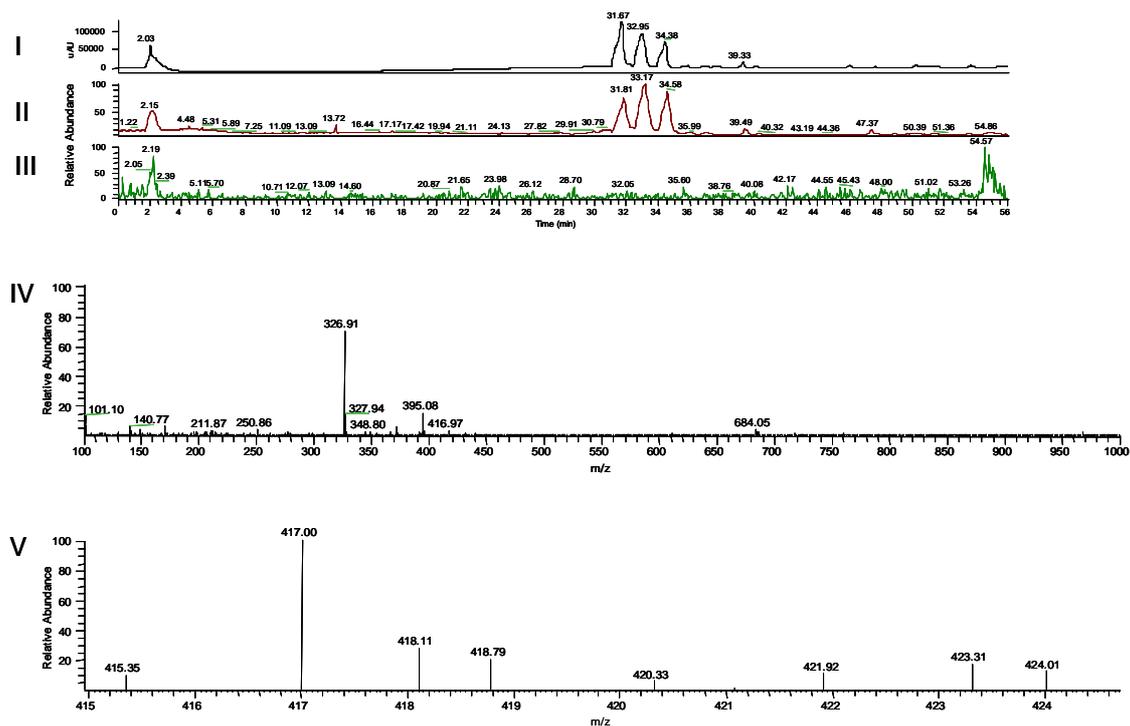


Abb. 19: LC-UV-MS- und LC-UV-MS/MS-Spektren von Ukrain und extrahiertes Ionen-Chromatogramm. (I) LC-UV (290 nm) Chromatogr.; (II) Total ion current (TIC) der Massenverteilung m/z 100 bis 1000; (III) LC-MS Ionen-Chromatogramm von m/z 417,2 (extrahiertes Ionen-Chromatogr.); (IV) Massenspektrum des Peaks mit der Retentionszeit von 54,6 Min.; (V) Vergrößerter Ausschnitt der Massenverteilung von m/z 415 bis 425 mit Isotopen-Muster m/z 417. Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kammerer, Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen.

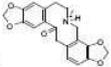
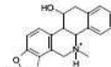
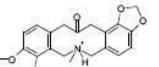
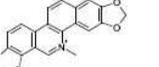
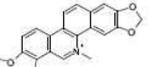
no.	name and structure	m/z	Standard	RT (min)	Ukrain	RT (min)	Chelidonium majus
			fragments (% intensity)		fragments (% intensity)		fragments (% intensity)
1	 Protopine	354.1	148.9 (27.2); 159.0 (8.0); 164.9 (8.6); 188.0 (99.8); 189.0 (100.0); 206.0 (13.0); 235.1 (9.2); 247.0 (17.9); 275.0 (18.4); 320.0 (6.3); 354.1 (10.5)	31.8	148.8 (27.0); 158.9 (7.2); 164.9 (9.0); 187.9 (100.0); 189.0 (91.9); 205.9 (13.7); 234.88 (9.0); 247.0 (17.3); 274.9 (17.3); 319.9 (5.8); 354.1 (8.9)	30.4	149 (26.6); 159.0 (7.9); 165.0 (8.7); 188.0 (97.9); 189.0 (100.0); 206.0 (12.7); 235.0 (9.1); 247.0 (17.6); 275.0 (18.0); 320.0 (6.0); 354.1 (10.2)
2	 Chelidonine	354.1	134.9 (10.2); 163.0 (9.6); 188.0 (7.3); 189.0 (20.1); 217.0 (18.5); 237.1 (6.6); 247.0 (73.2); 275.0 (100.0); 354.1 (<1)	33.2	134.9 (12.3); 162.8 (4.5); 188.1 (8.9); 188.9 (16.9); 217.0 (20.5); 236.9 (4.0); 246.9 (50.8); 274.9 (100.0); 354.1 (<1)	31.7	135.0 (10.5); 163.0 (10.0); 188.0 (6.2); 189.0 (19.3); 217.0 (18.7); 237.1 (6.8); 247.0 (73.9); 275.0 (100.0); 354.1 (<1)
3a and 3b	 Allocryptopine (two isomers)	370.2	149.0 (12.5); 151.0 (8.5); 165.0 (13.4); 166.0 (9.5); 181.0 (8.5); 188.0 (100); 189.0 (53.3); 190.1 (8.8); 206.0 (23.4); 275.0 (10.7); 278.1 (6.3); 290.0 (35.3); 306.0 (8.1); 320.1 (6.9); 336.1 (16.2); 370.2 (6.3)	33.1 and 34.6	148.8 (10.9); 150.9 (7.7); 164.9 (12.2); 165.9 (9.3); 180.9 (8.8); 187.9 (100); 189.0 (48.8); 190.1 (8.3); 205.9 (24.1); 274.9 (9.5); 278.1 (6.3); 290.0 (35.3); 306.0 (8.1); 320.1 (6.9); 336.1 (16.2); 370.2 (6.3)	31.9 and 34.0	149.0 (12.6); 151.0 (8.5); 165.0 (13.5); 166.0 (9.5); 181.1 (9.2); 188.1 (100); 189.0 (52.3); 190.1 (8.8); 206.0 (23.4); 275.0 (10.7); 278.1 (6.3); 290.0 (35.3); 306.0 (8.1); 320.1 (6.9); 336.1 (16.2); 370.2 (6.3)
4a and 4b	 Sanguinarine (two isomers)	332.1	189.1 (12.9); 203.1 (8.7); 215.1 (13.2); 216.1 (36.7); 217.1 (19.9); 218.1 (44.9); 233.1 (11.9); 244.1 (31.9); 246.1 (61.5); 247.1 (16.1); 259.1 (12.2); 261.1 (12.3); 274.1 (100.0); 275.1 (18.9); 304.0 (20.2); 316.1 (12.6); 317.0 (51.47); 332.0 (30.9).	36.1 and 37.2	189.1 (9.5); 203.1 (5.1); 215.1 (8.8); 216.1 (39.4); 217.1 (15.2); 218.1 (51.9); 233.1 (13.9); 244.1 (37.1); 246.1 (71.7); 247.1 (17.2); 259.0 (11.5); 261.0 (10.0); 274.1 (100.0); 275.1 (15.2); 304.0 (27.2); 316.1 (57.6); 317.0 (51.47); 332.0 (38.8).	34.9	Only Q3 full scan data are available m/z: 353.94 (100) (only one isomer was identified)
5a and 5b	 Chelerythrine (two isomers)	348.4	232.1 (8.7); 246.1 (9.7); 274.1 (7.1); 275.1 (7.1); 287.1 (6.3); 290.0 (74.1); 304.0 (75.2); 316.0 (22.2); 318.0 (29.0); 330.1 (26.7); 332.1 (100.0).	39.5 and 40.4	232.1 (10.7); 246.0 (10.7); 274.1 (11.8); 275.0 (9.0); 286.9 (6.9); 290.1 (76.9); 304.0 (72.4); 316.0 (21.2); 318.0 (21.9); 330.1 (29.4); 332.1 (100.0).	38.4	Only Q3 full scan data are available m/z: 347.89 (100) (only one isomer was identified)

Abb. 20: Ausgewählte molekulare Inhaltsstoffe von Ukrain und eines Schöllkrautextrakts. Tabellarischer Vergleich von MS/MS-Fragmentierungen mit den Referenzstandardwerten. Die Nummern (arabische Ziffern) in der ersten Spalte dienen zur Orientierung in den nachfolgenden Abbildungen 21 und 22. Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kammerer, Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen.

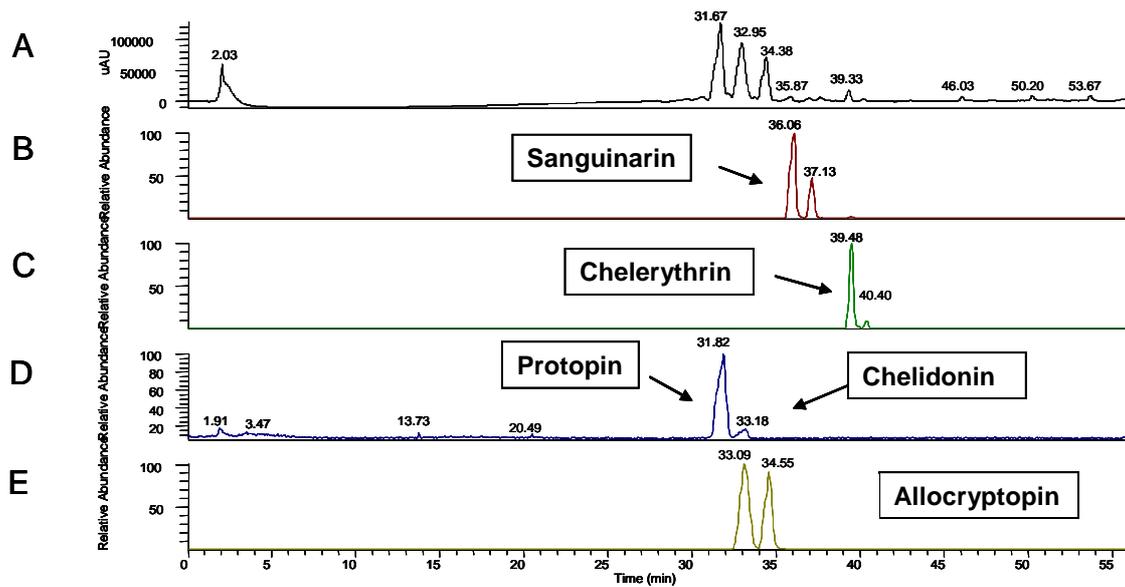


Abb. 21: LC-UV-MS/MS-Spektren von Ukrain. (A) LC-UV (290 nm) Chromatogramm; (B) LC MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 332,1; (C) LC-MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 348,4; (D) LC-MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 354,1; (E) LC-MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 370,2. Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kammerer, Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen.

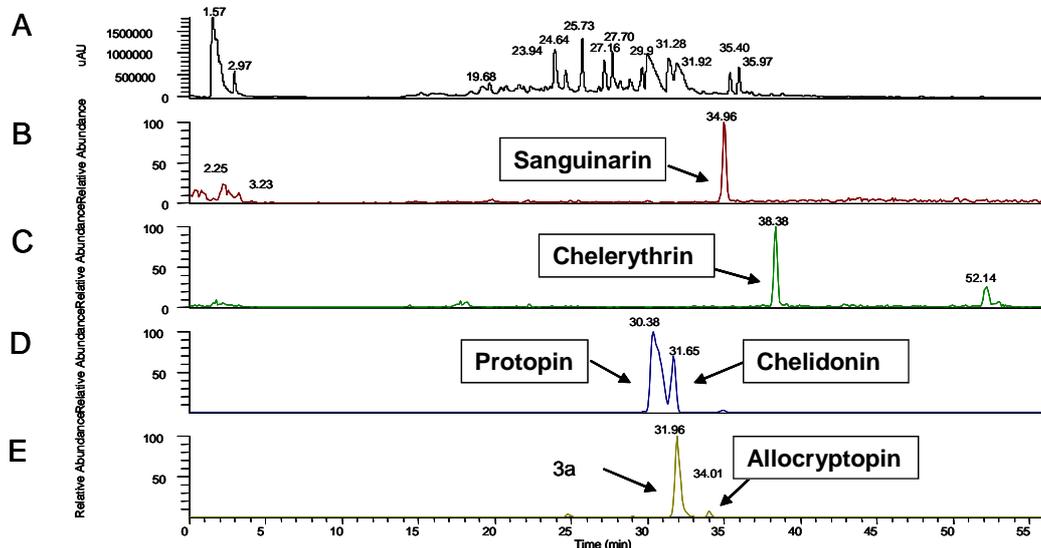


Abb. 22: LC-UV-MS und LC-UV-MS/MS Spektren eines Schöllkrautextrakts; (A) LC-UV (290 nm); (B) LC-MS Ionen-Chromatogramm von m/z 332,1; (C) LC-MS Ionen-Chromatogramm von m/z 348,4; (D) LC-MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 354,1; (E) LC-MS/MS Ionen-Chromatogramm von m/z 370,2. Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kammerer, Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen.

8.4 Identifizierung Apoptose-induzierender Alkaloide in Ukrain und einem Schöllkrautextrakt

8.4.1 Schöllkrautextrakt

Nachdem sich wesentliche Bestandteile des Präparates Ukrain als Alkaloide der Pflanze Schöllkraut (*Chelidonium majus*) herausgestellt hatten, wurde im nächsten Schritt ein Nativextrakt der Pflanze auf zytotoxische Effekte in Bezug auf Jurkat-T-Lymphom-Zellen untersucht. In der Annahme, dass Ukrain ein Gemisch aus Schöllkrautalkaloiden ist und der Schöllkrautextrakt ebenfalls, war es naheliegend davon auszugehen, dass eine Behandlung von Jurkat Vector Zellen mit dem Nativextrakt zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie die Ukrain-Behandlung.

Zunächst wurden Jurkat Vector Zellen mit dem Nativextrakt behandelt und auf Kernfragmentierung und Chromatinkondensation hin untersucht (Abb. 23 A). Die applizierte Konzentration wurde berechnet auf Grundlage des vom Hersteller angegebenen Anteils am Hauptalkaloid Chelidonin im eingesetzten Schöllkrautextrakt. Das Ergebnis zeigt eine dosisabhängige Induktion von Apoptose durch den Schöllkrautextrakt in den behandelten Zellen. Ein repräsentativer Ausschnitt dieses Versuchs ist in Abbildung 23 C dargestellt, bei dem die dosisabhängige Chromatinkondensierung in den behandelten Zellen vor allem in der Ausschnittsvergrößerung deutlich wird. Weiterhin wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit Jurkat Vector Zellen durchgeführt, die morphologische Alterationen, Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und Aktivierung von Caspasen umfassten (Abb. 23 B). Auch hierbei konnte eine dosisabhängige Induktion von Apoptose nachgewiesen werden, die sich am deutlichsten im Light Scatter und in der Zunahme des Anteils an Zellen mit low $\Delta\Psi$ zeigte. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit des Schöllkrautextrakt-induzierten Zelltods von Caspasen mit Hilfe des Pan-Caspasen-Inhibitors zVAD untersucht. Hierbei zeigte sich in der Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem Schöllkrautextrakt eine geringere apoptotische Reaktion.

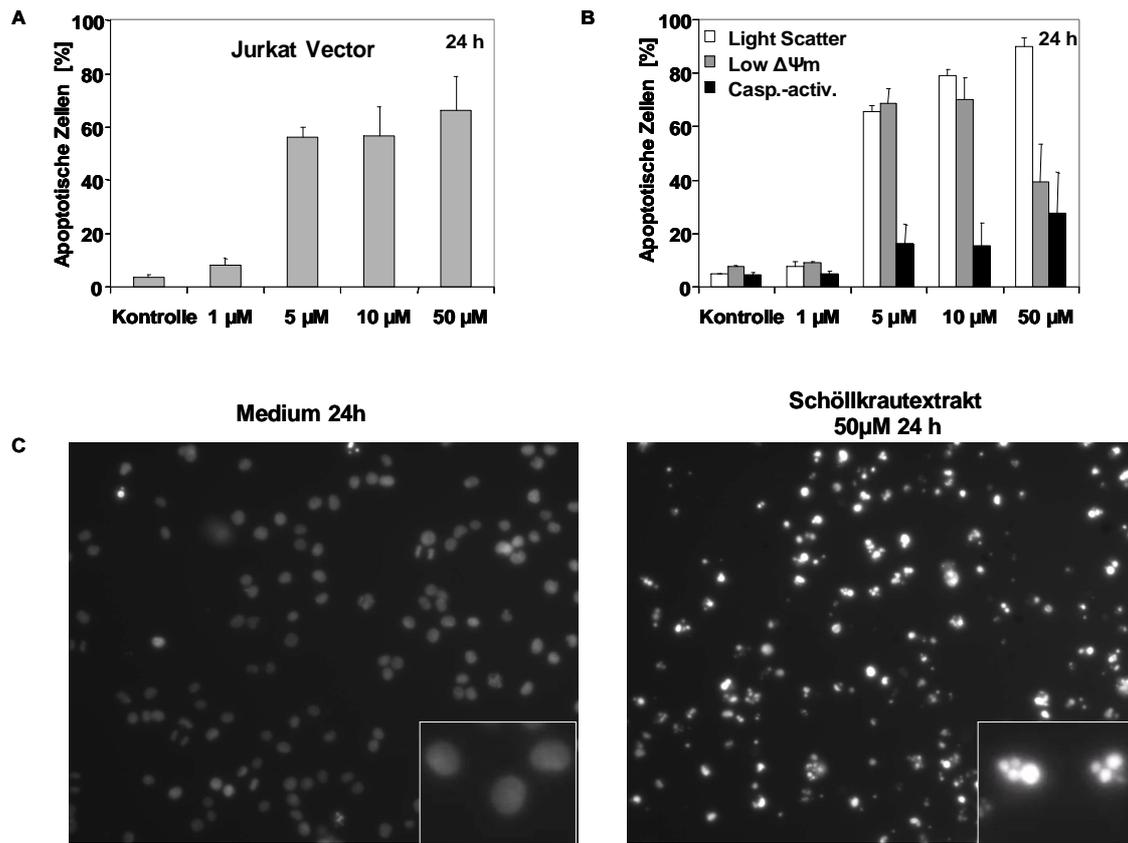


Abb. 23: Zelltodeffekte in Jurkat Vector Zellen nach Behandlung mit einem Schöllkrautextrakt. **A:** Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 1, 5, 10 und 50µM Schöllkrautextrakt behandelt. Apoptose wurde mittels Hoechst-Färbung bestimmt. Darstellung der Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung. **B:** Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 1, 5, 10 und 50µM Schöllkrautextrakt behandelt. Anschliessend wurden die behandelten Zellen durchflusszytometrisch auf Veränderungen im Light Scatter, in der Alteration des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ mittels TMRE-Färbung und in der Caspasen-Aktivierung nach CaspACE[®]-Färbung hin untersucht. Darstellung der Mittelwerte ($n\geq 3$) mit Standardabweichung. **C:** Es sind jeweils repräsentative Ausschnitte aus dem unter A geschilderten Versuch gezeigt. Auf dem linken Bild sind die lediglich mit Medium versetzten Jurkat Vector Zellen in der kombinierten Hoechst 33342/Propidium Jodid-Färbung zu sehen. Im jeweiligen rechten unteren Bildausschnitt ist ein repräsentatives Ereignis vergrößert hervorgehoben.

Die durch den Schöllkrautextrakt ausgelöste Apoptose in Jurkat Vector Zellen geht somit mit einem Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ und einer Rekrutierung von Caspasen einher.

In den vorangegangenen Versuchen mit Ukrain konnte gezeigt werden, dass ein mitochondrialer Apoptoseweg für die Ukrain-vermittelten Effekte verantwortlich ist und Bcl-2 diese Effekte deutlich reduzieren kann. Aus diesem Grund wurde weiterhin untersucht, ob Überexpression des anti-apoptischen

Proteins auch eine Hemmung der durch Schöllkraut induzierten Zelltoderscheinungen bewirken kann. Hierzu wurden Jurkat Vector Zellen und Jurkat Bcl-2 Zellen für 24h mit 0, 1, 5 und 50 μ M Schöllkrautextrakt behandelt (Abb. 24). Anschließend wurde im Westernblot die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP gemessen, um eine mögliche hemmende Wirkung von Bcl-2 auf die Schöllkraut-induzierte Apoptose zu untersuchen. Es zeigte sich bei den Kontrollzellen eine konzentrationsabhängige PARP-Spaltung. Bei den Bcl-2 überexprimierenden Zellen zeigte sich hingegen lediglich eine sehr geringe Spaltung. Dies bedeutet, dass eine gesteigerte Bcl-2-Expression somit nicht nur die Ukrain-vermittelte Apoptose sondern auch die durch den Schöllkrautextrakt vermittelte hemmen kann.

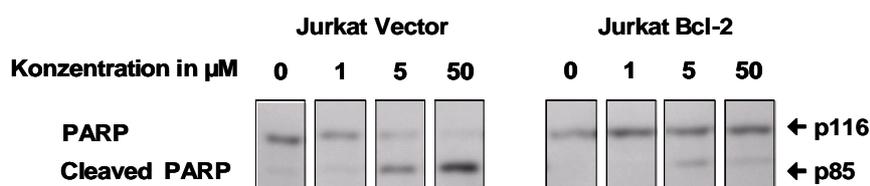


Abb. 24: Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Behandlung mit Schöllkrautextrakt. Jurkat Vector-Kontrollzellen und Bcl-2 überexprimierende Jurkat-Zellen (Jurkat Bcl-2) wurden für 24h mit 0, 1, 5 und 50 μ M Schöllkrautextrakt behandelt, danach lysiert und mittels Westernblot untersucht. Zum Nachweis von PARP und dessen Spaltprodukt kamen spezielle Antikörper zum Einsatz. Die Daten wurden einem repräsentativen Experiment entnommen.

8.4.2 Schöllkrautalkaloide

Weiterhin wurden Versuche mit den in Abbildungen 21 und 22 identifizierten Alkaloiden gemacht, die sowohl im Präparat Ukrain enthalten als auch konstitutionelle Alkaloide des Schöllkrauts sind.

Ausgehend von der Annahme, dass sowohl Ukrain als auch der Schöllkrautextrakt im Wesentlichen aus denselben Einzelalkaloiden besteht, wurden im Folgenden die in Kapitel 4.3 identifizierten Einzelalkaloide Allokryptopin, Protopin, Chelidonin, Chelerythrin und Sanguinarin hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in Jurkat T-Lymphom-Zellen untersucht. Das Ziel dieser

Untersuchungen war insbesondere die Charakterisierung Apoptose-induzierender Eigenschaften dieser Alkaloide und die Identifizierung eines eventuellen Hauptträgers der zytotoxischen Wirkung von Ukrain und des Schöllkrautnativextraktes.

8.4.2.1 Allokryptopin

Zunächst wurde eine mögliche zytotoxische Wirkung des Schöllkraut-Alkaloids Allokryptopin untersucht. Hierzu wurden Jurkat Vector Zellen für 24h mit 0 und 250 μ M Allokryptopin behandelt und danach mittels Hoechst 33342-Färbung mikroskopisch untersucht (Abb. 25). Es zeigte sich hierbei erst eine sehr gering ausgeprägte apoptotische Reaktion im Sinne einer Kernfragmentierung und Chromatinkondensation bei einer Konzentration von 250 μ M Allokryptopin im Versuchsansatz. Durchflusszytometrisch wurden die behandelten Zellen auf eventuelle Aberrationen der Zellmorphologie, des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und der Caspasenaktivierung untersucht. Bei allen drei Methoden ließ sich bis zu einer Konzentration von 150 μ M Allokryptopin keine nennenswerte Apoptose-Induktion nachweisen. Erst bei einer Konzentration von 250 μ M Allokryptopin im Versuchsansatz war ein minimaler Anstieg der Apoptoseparameter wahrnehmbar. Da Allokryptopin nur in sehr hohen Konzentrationen eine schwache zytotoxische Wirkung in den behandelten Jurkat Vector Zellen entfaltetete, wird es nur einen sehr geringen Anteil an der stark Apoptose-induzierenden Wirkung von Ukrain oder des Schöllkraut-Nativextraktes haben.

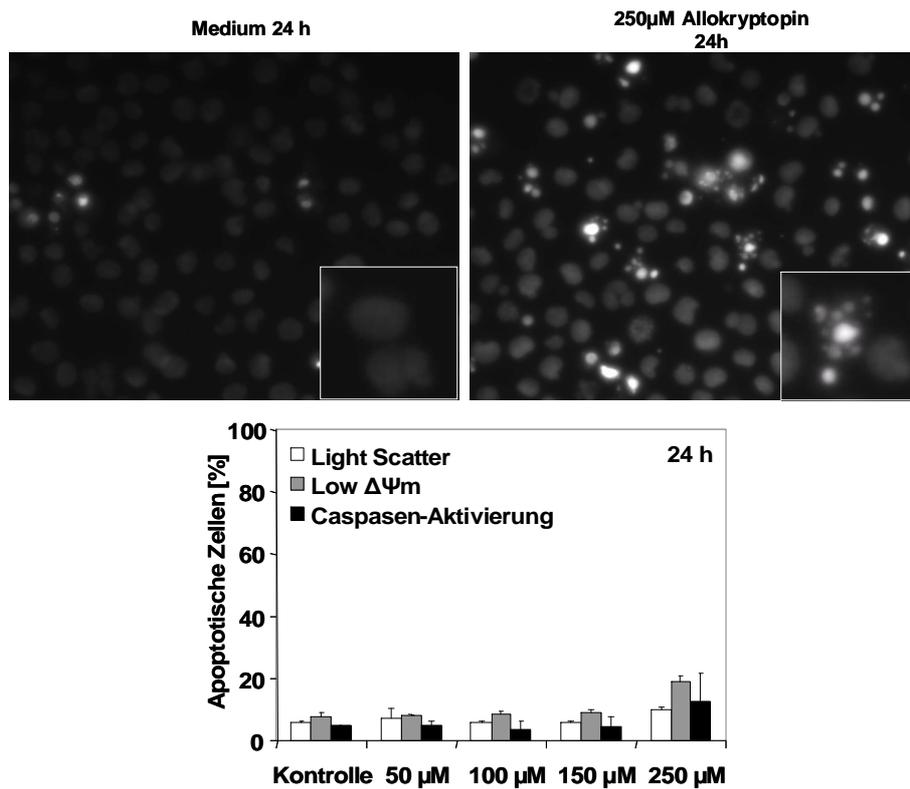


Abb. 25: Untersuchung des Schöllkrautalkaloids Allokryptopin hinsichtlich apoptotischer Effekte. Oben: Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0 und 50 μM Allokryptopin behandelt und danach mittels Hoechst-Färbung mikroskopisch dargestellt. **Unten:** Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 50, 100, 150 und 250 μM Allokryptopin behandelt. Hiernach wurden die Zellen durchflusszytometrisch im Light Scatter, mit TMRE-Färbung zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und nach CaspACE[®]-Färbung untersucht. Darstellung der Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. Im jeweiligen rechten unteren Bildausschnitt ist ein repräsentatives Ereignis vergrößert hervorgehoben.

8.4.2.2 Protopin

Als nächstes wurde die in Kapitel 4.3 massenspektrometrisch identifizierte Alkaloidkomponente Protopin auf potentielle Zelltod-induzierende Wirksamkeit hin untersucht. Hierbei wurden Jurkat Vector Zellen für 24h mit 0 und 50 μ M Protopin behandelt und anschließend mittels Hoechst 33342-Färbung mikroskopisch untersucht (Abb. 26). Es zeigte sich eine dosisabhängige Induktion von Apoptose in Jurkat Vector Zellen gemessen als Kernfragmentierung und Chromatinkondensation. Weiterhin wurden eine Alteration der Zellmorphologie (Light Scatter), ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und eine Caspasen-Aktivierung durchflusszytometrisch bestimmt. Bei den Messungen konnte beginnend mit einer Konzentration von 50 μ M Apoptose in den behandelten Zellen gezeigt werden, die sich durch weitere Dosiserhöhungen nur unwesentlich steigern ließ. Zusätzlich wurde -wie auch bei Ukrain und dem Schöllkrautextrakt untersucht- eine mögliche Inhibition der apoptotischen Wirkung durch Bcl-2-Überexpression untersucht. Hierbei ergab sich ebenfalls eine leicht reduzierte PARP-Spaltung bei Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Vector Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 27). Somit scheint Protopin Apoptose in Jurkat Vector Zellen über einen mitochondrialen Weg auszulösen.

Alles in allem scheint Protopin Apoptose-induzierende Eigenschaften zu besitzen, die sich bei hohen Konzentrationen zeigten (beginnend mit 50 μ M), so dass nicht von Protopin als Hauptwirkkomponente des Schöllkrautextrakts ausgegangen werden kann.

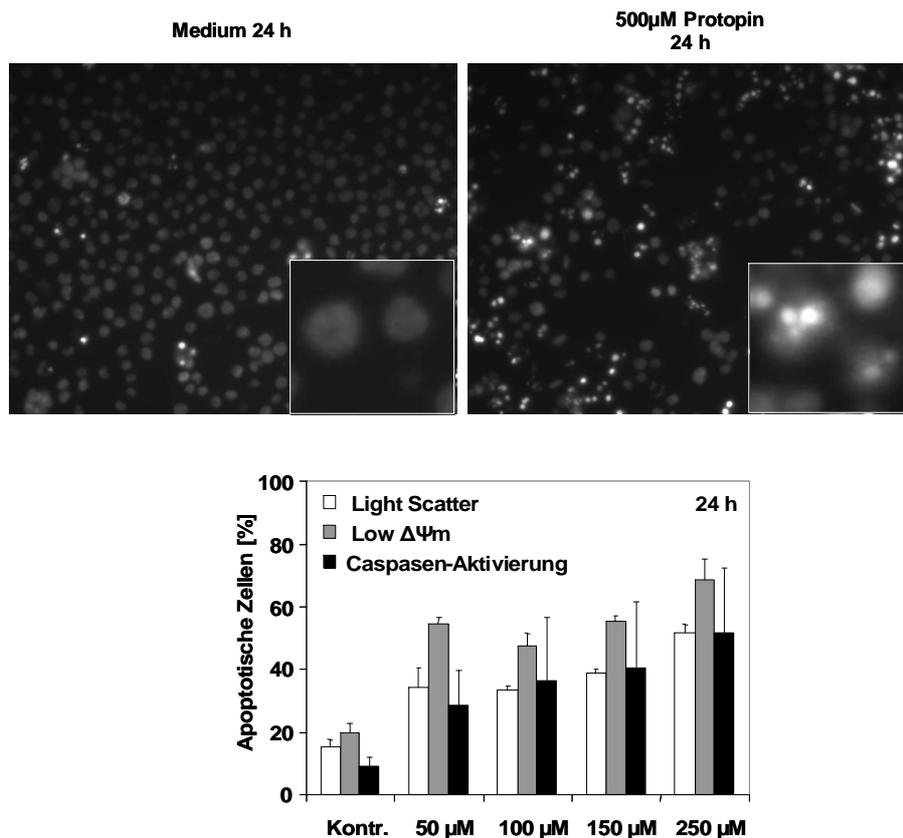


Abb. 26: Untersuchung des Schöllkrautalkaloids Protopin hinsichtlich apoptotischer Effekte. Oben: Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 50, 100, 150 und 250μM Protopin behandelt. Hiernach wurden die Zellen durchflusszytometrisch im Light Scatter, mit TMRE[®]-Färbung zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und nach CaspACE[®]-Färbung untersucht. Darstellung der Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. Unten: Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0 und 500μM Protopin behandelt und danach mittels Hoechst-Färbung mikroskopisch dargestellt. Im jeweiligen rechten unteren Bildausschnitt ist ein repräsentatives Ereignis vergrößert hervorgehoben.

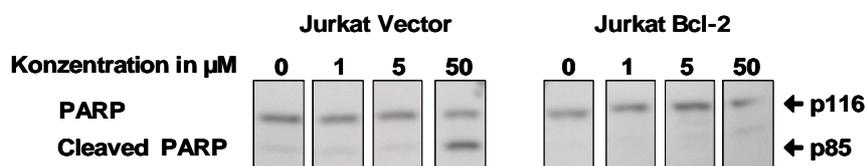


Abb. 27: Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Protopin-Behandlung. Jurkat Vector Kontrollzellen und Jurkat Bcl-2-Zellen wurden für 24h mit 0, 1, 5 und 50μM Protopin behandelt, danach lysiert und mittels Westernblotting auf PARP-Expression sowie dessen Spaltprodukte untersucht. Bei Behandlung von Jurkat-Bcl-2-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen eine geringere PARP-Spaltung, wodurch auf eine geringe Apoptose-Rate bei Bcl-2-Überexpression geschlossen werden kann. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen Versuchs.

8.4.2.3 Chelerythrin und Sanguinarin

Weiterhin wurden -wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt- die beiden Alkaloide Chelerythrin und Sanguinarin sowohl in einem Schöllkrautextrakt als auch in Ukrain nachgewiesen (Abbildungen 21 und 22). Im Folgenden wurden diese beiden Alkaloide hinsichtlich ihrer apoptotischen Wirksamkeit analysiert. Bei der Behandlung von Jurkat Vector Zellen mit den beiden Alkaloiden zeigte sich schon bei niedrigen Konzentrationen eine apoptosetypische Kernmorphologie (Abb. 28). Jedoch verschwanden diese Effekte bei weiterer Erhöhung der Konzentration. Dabei kam es zu nekrosetypischen kernmorphologischen Änderungen wie Platzen und Auflösen der Zellkerne. Hierin unterscheiden sich diese beiden Alkaloide von den zuvor untersuchten. Sie lösen schon in recht niedrigen Konzentrationen von 1µM und 5µM in hohem Maß Nekrose in Jurkat Vector Zellen aus.

Die Tatsache, dass beide Alkaloide schon bei niedrigeren Konzentrationen Nekrose in Jurkat Vector Zellen auslösen, lässt darauf schließen, dass sie einerseits eine hohe Zytotoxizität aufweisen, andererseits jedoch gerade deswegen nicht die hauptsächlichen Wirkträger von Ukrain und des Schöllkraut-Nativextrakts sein, da diese in den applizierten Konzentrationen keine Nekrose induzierten.

8.4.2.4 Chelidonin

Das in der Literatur als Hauptalkaloid des Schöllkrauts beschriebene Alkaloid, das in reiner Form auch in Ukrain nachgewiesen wurde (Kapitel 4.3), ist Chelidonin.

Im Rahmen der Untersuchungen zur möglichen proapoptotischen Wirkung von Chelidonin wurden zuerst Jurkat Vector Zellen mit dem Alkaloid behandelt und danach mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 versetzt. Anschließend wurden die Versuchsansätze hinsichtlich möglicher apoptosetypischer morphologischer Veränderungen wie Chromatinkondensation und nukleärer Fragmentierung mikroskopisch ausgewertet (Abb.

29). Hierzu wurden die Zellen für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chelidonin behandelt. Bei einer Konzentration von 5 μ M zeigte sich bereits eine deutliche Apoptose-Morphologie mit kondensiertem Chromatin und nukleärer Fragmentierung.

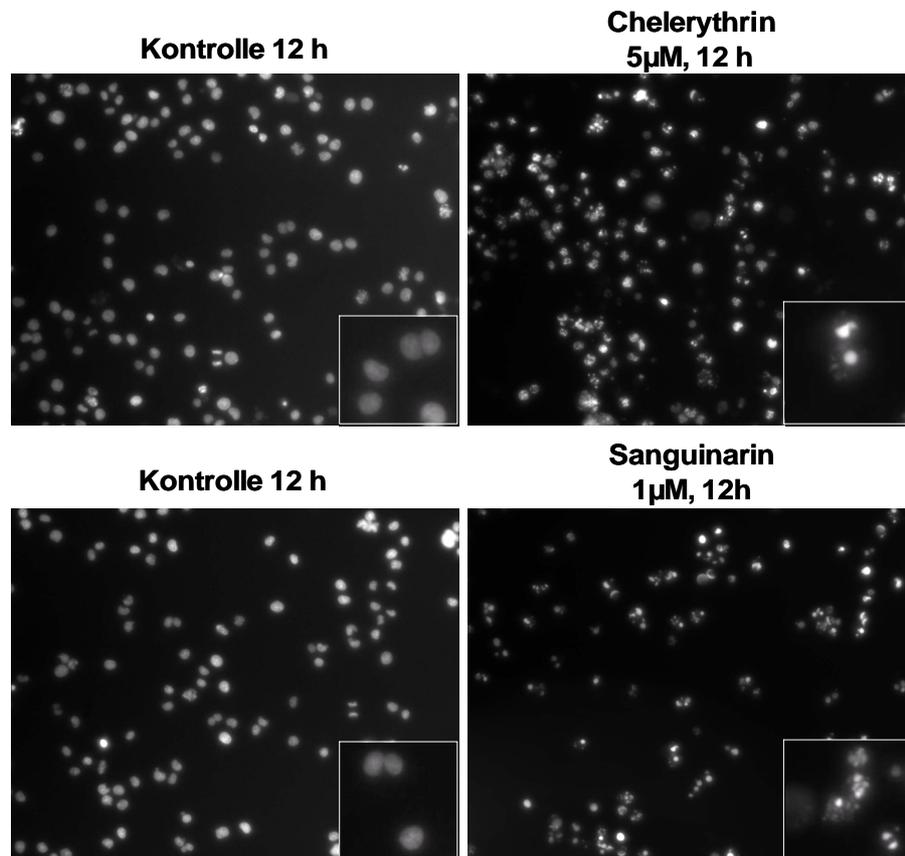


Abb. 28: Untersuchung der Schöllkrautalkaloide Chelerythrin und Sanguinarin hinsichtlich apoptotischer Effekte. Jurkat Vector Zellen wurden für 12h mit Medium und mit Chelerythrin oder Sanguinarin behandelt und danach mittels Hoechst-Färbung mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich bei den verwendeten Konzentrationen kein Überwiegen apoptotischen Zelluntergangs. Es standen Zelltodphänomene im Vordergrund, die am ehesten nekrotischem Zelluntergang zuzuordnen sind. Gezeigt sind jeweils repräsentative Darstellungen eines Experimentes.

Hiernach wurden durchflusszytometrische Untersuchungen angeschlossen, die klären sollten, ob auch im Light Scatter apoptosetypische morphologische Veränderungen auftreten. Weiterhin wurde analysiert, ob das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$ Alterationen zeigt und ob eine Caspasen-Aktivierung erfolgt (FITC-VAD). Es zeigten sich bei den Versuchen apoptosetypische

morphologische Veränderungen von Jurkat Vector Zellen bei Chelidonin-Behandlung (Abb. 29). Nach 24h Behandlung mit 1, 5, 10, 50 und 100 μ M des Alkaloids kam es zu einer deutlichen apoptotischen Morphologie der Zellen im Light Scatter. Ebenfalls kam es unter derselben Behandlung zu einem deutlichen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$. Ausserdem konnte mit Hilfe der FITC-VAD-Färbung gezeigt werden, dass es unter Behandlung mit Chelidonin zu einer merklichen Caspasenaktivierung kommt.

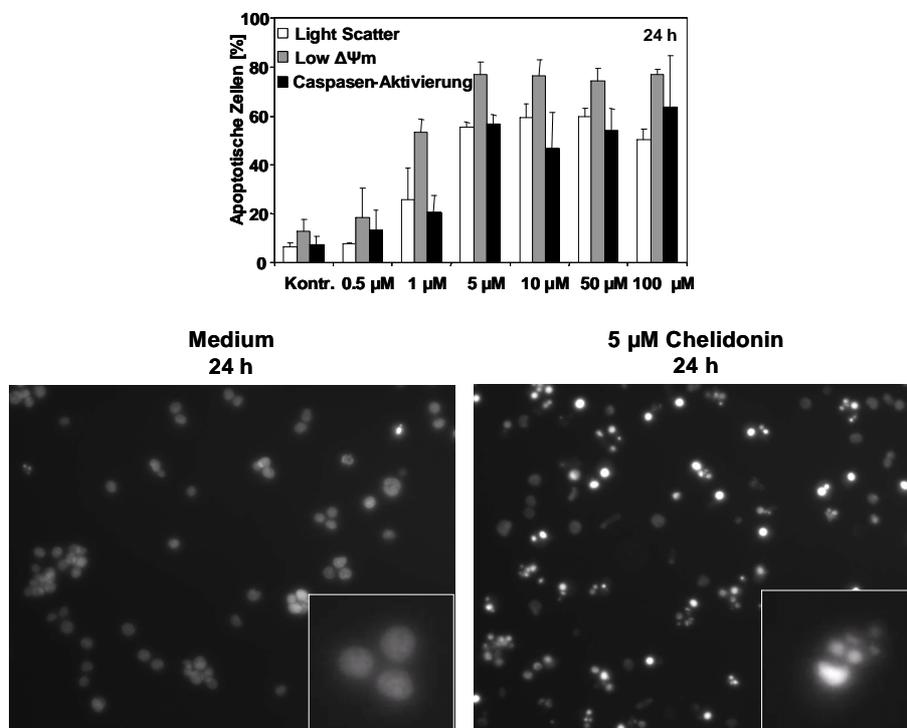


Abb. 29: Chelidonin-induzierte Apoptose in Jurkat Vector Zellen. **Oben:** Jurkat Vector Zellen wurden für 24h mit 0, 0.5, 1, 5, 10, 50 und 100 μ M Chelidonin behandelt und anschliessend durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde eine Light Scatter-Analyse angefertigt und TMRE- sowie CaspACE[®]-Färbungen vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. **Unten:** Jurkat Vector Zellen wurden mit 0 μ M und 5 μ M Chelidonin für 24h behandelt und mittels Hoechst-Färbung mikroskopisch untersucht. Am rechten unteren Bildrand ist jeweils eine repräsentative Vergrößerung aus dem Bildausschnitt zu sehen.

Die Chelidonin-induzierte Apoptose zeigt also insgesamt deutliche apoptosetypische Effekte in Jurkat Vector Zellen wie charakteristische morphologische Änderungen, Zusammenbruch von $\Delta\Psi$ und die Aktivierung von Caspasen. Der oben beobachtete Zusammenbruch von $\Delta\Psi$ könnte auf eine mögliche Rolle der Mitochondrien bei der Chelidonin-vermittelten Apoptose hinweisen wie sie auch bei den durch Ukrain, dem Schöllkrautextrakt und Protopin ausgelösten Zelltodphänomenen nachgewiesen werden konnte.

Um den Einfluss von Bcl-2 auf die Chelidonin-induzierte Apoptose genauer zu untersuchen, wurde eine Reihe durchflusszytometrischer Versuche durchgeführt. Jurkat Vector Kontrollzellen und Bcl-2 überexprimierende Jurkat-Zellen wurden für 24h mit 0, (0.5), 1, 5, 10, 50 und 100 μ M Chelidonin untersucht (Abb. 30). Im Light Scatter zeigten sich deutliche morphologische Alterationen bei beiden Zelltypen. Die Bcl-2 überexprimierenden Zellen zeigten eine deutlich verringerte apoptosetypische Morphologie bei den eingesetzten Konzentrationen. Auch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ mit Hilfe von TMRE zeigte eine verringerte Anzahl von Zellen mit low $\Delta\Psi$ bei Jurkat Bcl-2 Zellen. In einem weiteren Versuch, bei dem die behandelten Zellen mit Hilfe der CaspACE[®]-Färbung auf Caspasen-Aktivierung getestet wurden, bestätigte sich der bereits gewonnene Eindruck, dass Jurkat Bcl-2 Zellen eine geringere apoptotische Antwort auf Chelidonin-Behandlung zeigten. Ab einer Konzentration zeigte sich eine deutlich verringerte Caspasenaktivierung in den behandelten Bcl-2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen.

Neben dieser Quantifizierung, wurde die zuvor beobachtete Apoptose-Inhibition durch Bcl-2-Überexpression qualitativ nach Hoechst-Färbung der behandelten Zellen untersucht (Abb. 31). Charakteristische Veränderungen wie Chromatinkondensation und nukleäre Fragmentierung sind in den für 24h mit 0 und 5 μ M Chelidonin behandelten Jurkat Vector Kontrollzellen weitaus deutlicher zu sehen als in Jurkat Bcl-2-Zellen.

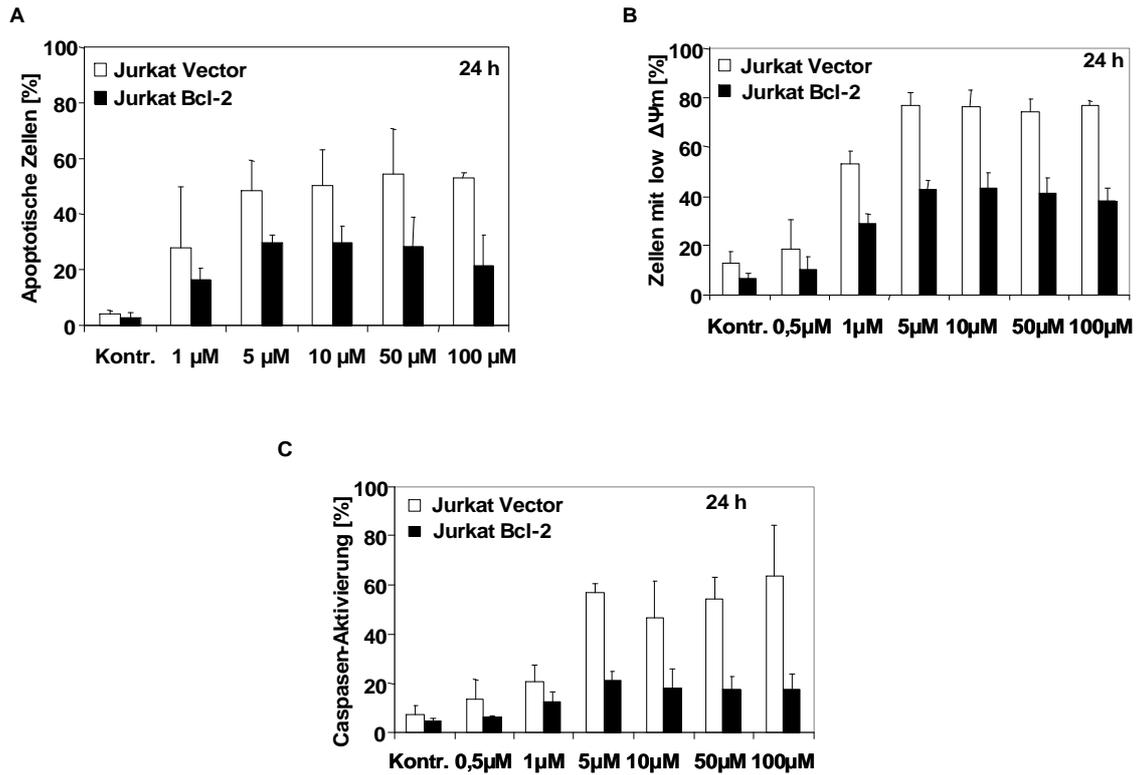


Abb. 30: Einfluss von Bcl-2 auf die Chelidonium-induzierte Apoptose in Jurkat Vector- und Jurkat Bcl-2-Zellen. Jurkat Vector Kontrollzellen und Jurkat-Bcl-2-Zellen wurden für 24h mit 0, 0,5, 1, 5, 10, 50 und 100μM Chelidonium behandelt und danach durchflusszytometrisch untersucht. **(A)** Light Scatter-Analyse. **(B)** Messung von low $\Delta\psi_m$. **(C)** FITC-VAD. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

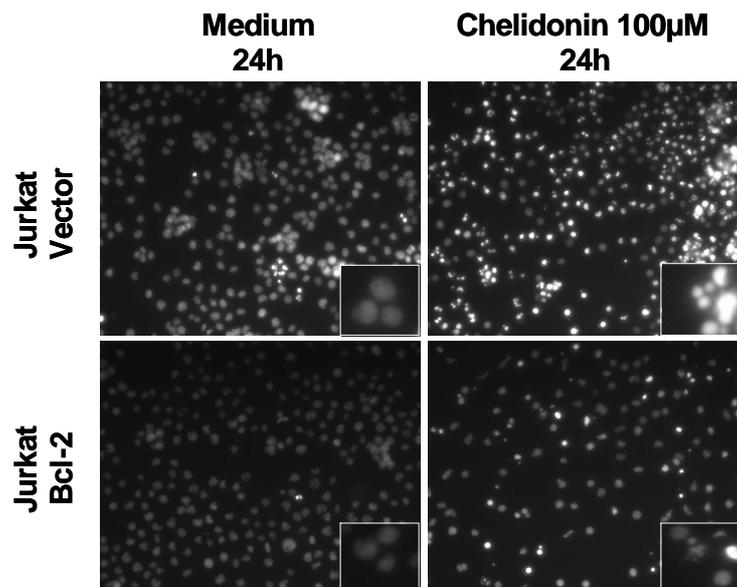


Abb. 31: Einfluss von Bcl-2 auf die Chelidonium-induzierte Apoptose in Jurkat Vector- und Jurkat Bcl-2-Zellen. Jurkat Vector Kontrollzellen sowie Jurkat Bcl-2 wurden für 24h mit 0 und 100μM Chelidonium behandelt und mit Hoechst/Propidium Jodid angefärbt und analysiert.

Der durch das anti-apoptotische Bcl-2 beobachtete Schutz von Jurkat Zellen gegenüber Chelidonin-induzierten apoptotischen Effekten, könnte beispielsweise mit einer veränderten Expression des Proteins zusammenhängen. In weiteren Versuchen wurde aus diesem Grund die Expression von Bcl-2 in behandelten Jurkat Vector Zellen nach Chelidonin-Behandlung kontrolliert. Jurkat Vector Zellen wurden 24h mit 0, 1, 5 und 50 μ M Chelidonin behandelt, danach wurde mittels Westernblot die Bcl-2-Expression untersucht (Abb. 32). Es zeigte sich keine unterschiedliche Expression von Bcl-2 nach Anwendung der verschiedenen Konzentrationen. Bei 5 μ M und 50 μ M tauchte jedoch eine Doppelbande oberhalb der Bcl-2-Bande auf, die auf eine Phosphorylierung des Proteins hindeuten könnte.

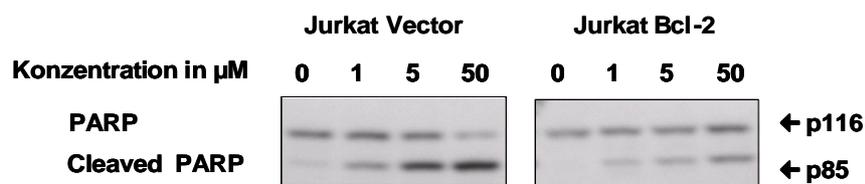


Abb. 32: Einfluss von Bcl-2 auf die PARP-Spaltung nach Chelidonin-Behandlung. Jurkat Vector Kontrollzellen und Jurkat Bcl-2-Zellen wurden für 24h mit 0, 1, 5 und 50 μ M Chelidonin behandelt, danach lysiert und mittels Westernblot auf PARP-Expression sowie dessen Spaltprodukte untersucht. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen Versuchs.

In weiteren Experimenten wurde zudem die Zytotoxizität von Chelidonin bei der Behandlung nicht maligner, humaner Zellen untersucht. Hierzu wurden -wie auch bereits für Ukrain getestet (vgl. Kapitel 4.1.2)- humane Konjunktivalepithelzellen (Chang-Zellen) behandelt und mittels Hoechst/Propidium Jodid-Färbung untersucht (Abb. 33). Chelidonin führte in diesen Versuchen Apoptose (ca. 1/3 der Zellen zeigte Apoptose bei 5 und 50 μ M) in den behandelten Zellen aus. Diese Ergebnisse zeigen große Ähnlichkeit mit der Ukrain-induzierten Apoptose in Chang-Zellen wie in Abb. 9, Kapitel 4.1.2. Dort zeigten die behandelten Zellen nach Applikation von 5, 10 und 50 μ g/ml Ukrain eine fast identische Rate an Apoptose aus wie die hier verwendeten Chelidonin-Konzentrationen von 1, 5 und 50 μ M.

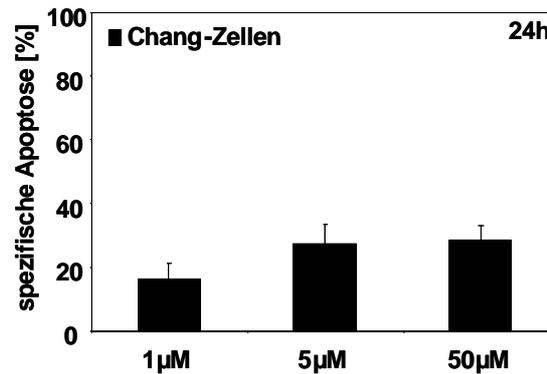


Abb. 33: Wirkung von Chelidonin auf Normalgewebszellen. Chang-Konjunktivalepithelzellen wurden 24h mit 1, 5 und 50µM Chelidonin behandelt und danach mittels Hoechst/Propidium-Jodid-Färbung untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Aus den gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass Chelidonin schon in geringen Konzentrationen Apoptose in Jurkat Vector Zellen, aber auch in Normalgewebszellen induziert. Die Zelltod-induzierende Wirkung kann -wie auch schon bei Ukrain und Schöllkraut- durch Bcl-2 deutlich reduziert werden. Hierbei muss jedoch davon ausgegangen werden, dass weitere Bcl-2-unabhängige Mechanismen wirken. Die Zytotoxizität bezüglich Normalgewebszellen scheint der von Ukrain sehr ähnlich zu sein. Insgesamt scheinen somit sehr ähnliche Mechanismen hinsichtlich der Apoptose-Induktion in malignen wie auch in nicht malignen Zellen bei Ukrain, Schöllkraut und Chelidonin vorzuliegen.

9. Diskussion

9.1 Wirksamkeit und Wirkmechanismus von Ukrain

Für die pharmazeutische Präparation Ukrain ist in vorangehenden Arbeiten eine Apoptose-induzierende Wirkung in malignen Zellen beschrieben worden (Kurochkin, 2000; Liepins, 1996; Nowicky, 1996; Roublevskaia, 2000a). Hierbei konnte ein genauer intrazellulärer Wirkmechanismus nicht aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Ukrain Apoptose in einem humanen Jurkat T-Lymphom-Modell induzieren kann. Darüberhinaus wurden die beteiligten intrazellulären Apoptose-Signalwege zum ersten Mal aufgezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die für die Ukrain-vermittelte Apoptose relevanten Signaltransduktionsmechanismen den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$, die Aktivierung von Caspasen und charakteristische nukleäre Veränderungen mit Chromatinkondensation und nukleärer Fragmentierung umfassen.

Eine Beteiligung des Todesrezeptor-Signalweges konnte ausgeschlossen werden, da weder Zellen, die resistent bezüglich CD95- oder TRAIL-vermittelter Apoptose sind, noch FADD- oder Caspase-8-defiziente Jurkat Zellklone eine Verminderung der Ukrain-induzierten Apoptose zeigten. Auch der Einsatz eines Caspase-8-Inhibitors wie cFLIP zeigte diesbezüglich keinen Effekt. Somit scheint der Todesrezeptor-Signalweg nicht essentiell für die Ukrain-vermittelte Apoptose zu sein.

Hingegen bewirken die Überexpression der an den Mitochondrien wirkenden anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL eine deutliche und die Expression einer dominant-negativen Caspase-9 eine leichte Reduktion des Ukrain-induzierten Zelltodes. Dies zeigt die Bedeutung der mitochondrialen Signalkaskade, die durch pro- und anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie kontrolliert wird. Der beschriebene protektive Effekt von Bcl-2 konnte bereits für humane Keratinozyten gezeigt werden (Roublevskaia, 2000c). Die Feststellung, dass die Ukrain-induzierte Apoptose den mitochondrialen

Apoptoseweg benötigt, wurde darüberhinaus kürzlich von Mendoza et al. (Mendoza, 2006) für HeLa-Zellen gezeigt. Weiterhin zeigte sich neben der Hemmung der Ukrain-vermittelten Apoptose durch Bcl-2-Überexpression keine Veränderung der Expression des Proteins selbst bei unterschiedlichen Konzentrationen des Präparates. Bei den Versuchen zeigte sich jedoch nach Applikation höherer Konzentrationen (10µg/ml) eine Doppelbande oberhalb von Bcl-2, was (allerdings bei Benutzung eines nicht Phospho-spezifischen Antikörpers) auf eine Phosphorylierung des anti-apoptotischen Proteins hinweisen könnte. Die Phosphorylierung von Bcl-2 kann prinzipiell eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung haben (Chang BS, 1997; May, 1994; Yamamoto, 1999). In den meisten Fällen verstärkt sie jedoch die Schutzfunktion des Proteins, so beispielsweise bei Fas- oder Taxol-induzierter Apoptose (Yamamoto, 1999). Ausserdem kommt es durch die Phosphorylierung zu einer längeren Halbwertszeit des Proteins und somit zu einer längeren Wirkdauer (Deng, 2003; Deng 2004; Dimmeler, 1999). Unter Beachtung der Literatur liegt der Schluß nahe, dass phosphoryliertes Bcl-2 einen zellprotektiven Effekt haben sollte und somit anti-apoptotisch wirkt. Anscheinend kommt es erst ab einer gewissen Konzentration (in diesem Fall 10µg/ml) zur möglichen Phosphorylierung, die jedoch nicht zu einer Verringerung der Apoptose in den behandelten Jurkat Vector Zellen führte. Die genannten Faktoren führten lediglich zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Reduktion der Apoptose-Induktion, jedoch nicht zu einem vollständigen Block, so dass es wahrscheinlich ist, dass weitere Faktoren an der Regulation der Ukrain-induzierten Effekte involviert sind. Wie weitere Untersuchungen ergaben, scheinen veränderte Expressionslevel oder die Funktionalität proapoptotischer Bcl-2-Proteine wie Bak, Bid oder Bad nicht unmittelbar an Ukrain-vermittelten Effekten beteiligt zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden desweiteren Versuche mit nicht-malignen, humanen Konjunktivepithelzellen durchgeführt, mit Hilfe derer überprüft wurde, ob Ukrain auch in Normalgewebszellen Apoptose auslöst. Hierbei stellte sich heraus, dass die behandelten Zellen apoptosetypische morphologische Veränderungen zeigten wie Chromatinkondensation und nukleäre

Fragmentierung, wenn auch in geringerem Ausmaß als in Jurkat-Zellen. Ein großer Vorteil eines anti-neoplastisch wirkenden Medikamentes wäre eine selektive Wirksamkeit gegenüber malignen Zellen und eine Schonung nicht-entarteter, gesunder Zellen. In den Herstellerangaben und in einer Veröffentlichung wird diesbezüglich angegeben, dass das Präparat selektiv zytotoxische Effekte in malignen Zellen hervorruft, nicht aber in normalen Zellen (Hohenwarter, 1992; Beipackzettel von Ukrain[®], Nowicky Pharma). Die in dieser Arbeit gezeigten Daten widersprechen diesen Angaben.

Alles in allem ist Ukrain aufgrund der oben beschriebenen Effekte bei malignen Zellen ein interessantes antineoplastisch wirkendes Präparat. Die in der Literatur bereits für andere Zellsysteme beschriebene Apoptose-induzierende Wirkung (Kurochkin, 2000; Liepins, 1996; Nowicky, 1996; Roublevskaia, 2000a) konnte in der vorliegenden Arbeit auch im Jurkat Modell bestätigt werden. Darüberhinaus konnte die diesbezügliche Kenntnis über die damit zusammenhängende Signaltransduktion erweitert werden.

Ausserdem sind Untersuchungen zur Radiosensibilisierung von malignen Zellen durch Behandlung mit Ukrain in der Literatur beschrieben. Hierbei entsprachen die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (1-50µg/ml) den Konzentrationen, die für eine radiosensibilisierende Wirkung bei humanen kolorektalen und Glioblastom-Zelllinien in vitro nötig sind (0,1-50µg/ml) (Cordes, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass in verschiedenen Untersuchungen die Kombination mit Strahlentherapie zu einer erhöhten Induktion von Apoptose in malignen Zellen führte, gesunde Zelllinien unter der Behandlung aber einen gewissen Schutz zeigten (Boyko, 1998; Cordes 2002; Cordes 2003), scheint eine weitergehende Analyse dieser Kombination sinnvoll. Trotz dieser Beobachtungen sind die vereinzelt postulierten, selektiven Effekte Ukrains auf maligne Zellen zur Zeit Gegenstand kontroverser Diskussion (Ernst und Schmidt, 2005).

9.2 Identifizierung Apoptose-induzierender Bestandteile von Ukrain und Schöllkraut

9.2.1 Zusammensetzung von Ukrain

Das Präparat Ukrain wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit chemisch-physikalisch untersucht. Hierbei konnten in einem ersten Schritt mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen der Herstellersubstanz einige bekannte Alkaloide des Schöllkrauts identifiziert werden. Zu diesen Alkaloiden gehören Chelidonin, Chelerythrin, Sanguinarin, Protopin und Allokryptopin. Ein von Herstellerseite postuliertes "Ukrainmolekül" konnte dagegen nicht gefunden werden, ebensowenig dimere oder trimere Chelidonin-Thio-TEPA-Produkte oder Thiotepa selbst (Daten Dr. Kammerer, Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Tübingen).

Interessanterweise konnten dieselben Alkaloide wie im Ukrainpräparat auch in einem kommerziell erhältlichen Schöllkrautnativextrakt gefunden werden. Diese Resultate stimmen mit einer erschienenen Veröffentlichung von Panzer et al. (Panzer, 2000) überein, in der ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) und LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) vergeblich nach dem postulierten "Ukrain-Molekül" gesucht wurde. Zusammengenommen scheint es wahrscheinlich, dass Ukrain aus einem Gemisch verschiedener Schöllkrautalkaloide besteht, die dann wiederum verantwortlich für die beschriebenen proapoptotischen Effekte in malignen Zellen sein könnten. Die Herstellerangaben zu Ukrain sind den oben genannten Untersuchungen zufolge falsch. Aufgrund der unklaren Zusammensetzung und fehlerhafter Herstellerangaben darf Ukrain kein Produkt für die klinische Anwendung sein.

9.2.2 Proapoptotische Wirksamkeit von Schöllkrautextrakt und Schöllkrautalkaloiden

Wie die oben beschriebenen Analysen zeigen, haben Ukrain und der untersuchte Schöllkrautextrakt die gemeinsamen Inhaltsstoffe Chelidonin, Chelerythrin, Sanguinarin, Allokryptopin und Protopin. Diese Alkaloide sind

bereits seit längerem als Schöllkrautalkaloide bekannt. Chelidonin wird in der Literatur stets als Hauptalkaloid aufgeführt, da es den größten mengenmäßigen Anteil in den gewonnenen Extrakten ausmacht (Tab. 4).

Alkaloid	Relativer Anteil [%]
Chelidonin	49
Protopin	13
Stylopin	12
Allokryptopin	9
Berberin	3,2
Coptisin	2,5
Sanguinarin	2,4

Tab. 4: Anteile verschiedener Alkaloide in Schöllkrautextrakten (nach Uglyanitsa, 2000).

9.2.2.1 Schöllkraut-Nativextrakt

Die Behandlung von Jurkat Vector Zellen mit einem Schöllkrautnativextrakt führte bei den oben besprochenen Versuchen zu apoptosetypischen morphologischen Veränderungen. Weiterhin konnten ein sukzessiver Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ sowie die Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden. Jurkat Vector Zellen zeigten nach Behandlung mit dem Schöllkrautextrakt eine vermehrte PARP-Spaltung, die durch Bcl-2-Überexpression vermindert werden konnte. Die hier vorgestellten Untersuchungen weisen auf eine hohe zytotoxische Potenz der Pflanzenbestandteile hin.

Bisher ist in der Literatur keine pro-apoptotische Wirkung eines Schöllkraut-Nativextrakts in Jurkat Zellen beschrieben worden, die überdies durch Bcl-2-Überexpression reduziert werden konnte. In den meisten Fällen wurden bei diesbezüglichen Untersuchungen ausgewählte Alkaloide der Pflanze separat untersucht.

9.2.2.2 Chelidonin und Protopin

Im Rahmen der Untersuchungen konnten für die beiden Alkaloide Chelidonin und Protopin, die gemeinsam über 60% der alkaloiden Bestandteile des Schöllkrauts ausmachen und außerdem in Ukrain nachgewiesen wurden, erstmalig sowohl ein deutlicher Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$, eine Caspasenaktivierung sowie charakteristische morphologische Veränderungen in Jurkat Zellen wie Chromatinkondensation und nukleäre Fragmentierung nachgewiesen werden. Am potentesten erwies sich hierbei das Schöllkraut-„Hauptalkaloid“ Chelidonin, das bereits bei Konzentrationen von $1\mu\text{M}$ in hohem Maß Apoptose in behandelten Jurkat-Zellen induzieren konnte. Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit eine ausgeprägte Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP in Bcl-2 überexprimierenden Jurkat Zellen nach Chelidonin-Behandlung gezeigt werden. Zudem wird erstmalig eine Bcl-2-vermittelte Hemmung der Chelidonin-induzierten Apoptose gezeigt. Zusammen mit dem festgestellten Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ sprechen diese Beobachtungen für eine Apoptose-Induktion über den intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg. Humane, nicht maligne Konjunktivalepithelzellen zeigten ebenfalls eine deutliche Apoptose-Reaktion nach Chelidonin-Behandlung, was zuvor bereits nach Ukrain-Behandlung dieser Zellen beobachtet werden konnte. Chelidonin und Ukrain zeigen somit ganz ähnliche Wirkungen hinsichtlich der Zytotoxizität sowohl bei malignen (Ausmaß der Apoptose-Induktion, Apoptose-Hemmung durch Bcl-2) als auch bei nicht malignen Zellen (ähnliches Ausmaß an Apoptose-Induktion).

Bisher gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die auf eine wachstumshemmende und proapoptotische Wirkung von Chelidonin hinweisen (Kemeny-Beke, 2006; Panzer, 2001). Panzer et al. (Panzer, 2001) konnten beispielsweise eine Induktion des mitotischen Arrests in der G2/M-Phase, eine abnorme Metaphase-Morphologie, eine schwache Inhibition der Tubulin-Polymerisierung sowie eine Aktivierung der Kinasen SAPK und JNK in-vitro beobachten.

Während Chelerythrin, Protopin und Sanguinarin neben Apoptose auch immer Nekrose nach Applikation niedriger Konzentrationen induzierten, wurde nach Behandlung mit Chelidonin fast ausschließlich Apoptose in Jurkat Zellen beobachtet. Selbst bei hohen Konzentrationen kam es nicht zu einer nennenswerten Nekrose der behandelten Zellen. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit publizierten Daten von Kemeny-Beke et al. (Kemeny-Beke, 2006), die ähnliche Effekte bei primären Aderhautmelanomzellen beobachteten.

In Anbetracht der Tatsache, dass ein Schöllkrautnativextrakt in einer vergleichbaren Dosis wie sein Referenzalkaloid Chelidonin -sowie Ukrain-Apoptose in Jurkat T-Lymphom-Zellen induziert, scheint es naheliegend, dass Ukrain zum größten Teil aus einem Gemisch der auch nativ in Schöllkraut enthaltenen Alkaloide besteht und dass dieses Gemisch aus Alkaloiden der Schöllkrautpflanze wie Chelidonin, Chelerythrin, Protopin und Sanguinarin für die beobachteten zytotoxischen Effekte von Ukrain verantwortlich ist.

Desweiteren zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass die zytotoxische Wirksamkeit des Präparates nicht durch das von Herstellerseite proklamierte "Ukrain-Molekül" hervorgerufen werden kann, sondern vielmehr auf einer synergistischen Wirkung der im Ukrainpräparat identifizierten Schöllkrautalkaloide beruht. In diesem Zusammenhang scheint Chelidonin nicht nur den größten Anteil im Schöllkrautextrakt auszumachen sondern hat auch die größte pro-apoptotische Wirksamkeit. Zusammen mit der Tatsache, dass dieses Alkaloid den größten Anteil der in Schöllkraut enthaltenen Alkaloide ausmacht, scheint es sehr wahrscheinlich, dass Chelidonin der Hauptträger der oben beschriebenen Apoptose-induzierenden Eigenschaften des Schöllkrauts ist.

Insgesamt wurden in der Vergangenheit bereits anti-neoplastische, entzündungshemmende, anti-mikrobielle Wirkungen und weitere zelluläre Effekte für Schöllkraut und enthaltene Alkaloide beschrieben (Barreto, 2003; Chaturvedi, 1997; Chung, 2004; Hiller, 1998; Saeed, 1997; Vavreckova, 1996a). Für die Alkaloide Chelerythrin, Sanguinarin und Chelidonin sind

zytostatische und zytotoxische Effekte bei der Behandlung humaner Tumorzelllinien in der Literatur zu finden (Ahmad, 2000; Debiton, 2003; Ding, 2002; Hoffmann, 2002; Kemeny-Beke, 2006; Panzer, 2001; Vavreckova, 1996b). In diesem Zusammenhang wurden die gemeinsamen Mitosehemmenden Eigenschaften von Chelidonin, Chelerythrin und Sanguinarin für die beobachteten anti-neoplastischen Wirkungen verantwortlich gemacht (Panzer, 2001; Wolff, 1993). In einer neueren Veröffentlichung werden die DNA-interkalierenden Eigenschaften der genannten Schöllkrautalkaloide in NK/Ly Lymphomzellen miteinander verglichen (Kaminsky, 2006). Es zeigt sich hierbei, dass Chelidonin keine DNA-Interkalation bewirkt, Sanguinarin und Chelerythrin hingegen schon. Weiterhin korrelierte die DNA-interkalierende Potenz mit zytotoxischen Effekten in dieser Untersuchung.

5.2.2.3 Allokryptopin

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen zeigte Allokryptopin im Vergleich zu den anderen Alkaloiden und dem Schöllkraut-Nativextrakt erst bei sehr hohen Konzentrationen minimale apoptotische Effekte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es bei den hier beschriebenen, durch Ukrain und Schöllkraut vermittelten Effekte keinen Anteil hatte. Zudem ist es nur in geringem Maß überhaupt in Schöllkraut vertreten. Protopin induzierte in höheren Konzentrationen (ab ca. 50 μ M) Apoptose in Jurkat Vector Zellen und führte auch zu Chromatinkondensation und nukleärer Fragmentierung sowie zur PARP-Spaltung. Gleichzeitig zeigte sich aber in der kombinierten Hoechst33342/Propidium-Jodid-Färbung eine deutliche Anzahl nekrotischer Zellen. Diese Effekte sind hier erstmalig beschrieben. Protopin erweist sich demnach als zytotoxisches Schöllkrautalkaloid, das erst in hohen Konzentrationen apoptotisch wirkt, dann aber auch zu Nekrose in den behandelten Zellen führt. Somit unterscheidet es sich von beobachteten Wirkungen Chelidonins und des Schöllkrautextrakts.

Für die beiden Schöllkrautalkaloide Protopin und Allokryptopin sind bisher vielfältige zelluläre Effekte beschrieben: so scheint beispielsweise Protopin

sowohl die NADH-Dehydrogenase (Barreto, 2003) als auch die Phosphodiesterase (Abu-Ghalyun, 1997) zu inhibieren. Für Allokryptopin ist ebenfalls eine Hemmung der NADH-Dehydrogenase beschrieben worden (Barreto, 2003); es wurden aber desweiteren anti-inflammatorische und anti-thrombotische (Saeed, 1997) sowie anti-hepatotoxische (Janbaz, 1998) Wirkungen gefunden. Anti-neoplastische Effekte sind für beide Alkaloide bisher nicht beschrieben worden.

9.2.2.4 Chelerythrin und Sanguinarin

Beide Alkaloide, Chelerythrin und Sanguinarin, zeigten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zytotoxische Effekte in behandelten Jurkat Vector Zellen. Schon nach kurzer Behandlungszeit und in niedriger Konzentration (1 μ M bis 5 μ M) zeigten sich in der kombinierten Hoechst/Propidium Jodid-Färbung Zelltod-Erscheinungen, die mit Nekrose und in geringem Ausmaß Apoptose vereinbar waren. In dieser Hinsicht unterscheiden sich diese beiden Alkaloide wie auch Protopin, das in wesentlich höheren Konzentrationen als Chelerythrin und Sanguinarin ähnliche Effekte zeigte, wiederum vom Schöllkrautnativextrakt sowie Chelidonin.

Das Schöllkrautalkaloid Chelerythrin ist ein bekannter Inhibitor des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL (Chan, 2003). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass es die Proteinkinase C durch Interaktion mit deren katalytischem Zentrum inhibiert (Herbert, 1990) und zudem die Translokation der PKC δ vom Zytoplasma zur Membran hemmt (Chao, 1998). Mehrere Mechanismen sind für Sanguinarin beschrieben. Hierzu gehören eine Suppression von Nf κ B (Chaturvedi, 1997), eine pro-apoptotische Wirkung durch Erhöhung der zellulären Bax-Level und Caspase-3-Aktivierung (Weerasinghe, 2001 a+b). Sanguinarin werden noch weitere antimikrobielle, antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften sowie eine Aktivierung der Caspasen-3, -7, -8, -9, eine Erhöhung der Bax-Level und eine Erniedrigung von Bcl-2 zugeschrieben (Adhami, 2003). In der Arbeit von Adhami et al. (Adhami, 2003) wird außerdem konstatiert, dass Sanguinarin Apoptose über den

mitochondrialen Weg in immortalisierten Keratinozyten auslösen kann. Auch in-vitro-Untersuchungen zur proapoptotischen Wirkung von Sanguinarin in C6 Glioblastom-Zellen zeigten diese Expressions-Veränderungen der Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2 und Bax (Han, 2007). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sanguinarin in Pankreaskarzinomzellen proapoptotische Wirkungen entfalten sowie zu einem Zellzyklus-Arrest in der G0-G1-Phase führt. Auch hier werden die zuvor beschriebenen Einflüsse auf Bcl-2-Familienmitglieder beschrieben: Erhöhung der proapoptotischen Bak, Bax und Bid, Erniedrigung von Bcl-2 und Bcl-xL (Ahsan, 2007). Zusammengenommen fällt bei dieser Auflistung auf, dass die Wirkungen zum größten Teil gut mit anti-neoplastischen und zytostatischen Effekten vereinbar sind.

9.3 Zur möglichen therapeutischen Anwendbarkeit von Ukrain und Schöllkraut

Obwohl bereits zahlreiche Veröffentlichungen über therapeutische Effekte von Ukrain in präklinischen Untersuchungen (Grinevich, 2005), Case Reports und randomisierten (Bondar, 1998; Susak, 1995) sowie nicht-randomisierten klinischen Studien existieren, besteht bis heute noch immer keine gesicherte wissenschaftliche Basis für den Einsatz von Ukrain als Chemotherapeutikum. Es wird desweiteren eine kontroverse Debatte über die vorgeschlagene antineoplastische Potenz von Ukrain geführt (Panzer, 2000a), die -nebenwirkungsfrei- gar selektiv maligne Zellen und Gewebe betreffen soll (Hohenwarter, 1992; Beipackzettel von Ukrain[®] Nowicky Pharma).

Eine vor Kurzem erschienene systematische Übersichtsarbeit über die bisher publizierten klinischen Daten zu Ukrain zeigt, dass die publizierten Studien nicht den strengen Kriterien für randomisierte klinische Studien entsprechen und dass methodische Mängel im Moment keine sichere Aussage über den vermeintlichen Wert von Ukrain als Chemotherapeutikum zulassen (Ernst und Schmidt, 2005). Die mit den vorgestellten Daten erworbenen Erkenntnisse über die Tatsache, dass das Präparat Ukrain eine Mischung verschiedener Schöllkrautalkaloide ist und nicht aus den von der Herstellerfirma

beschriebenen "Ukrain-Molekülen" besteht, verbietet den möglichen klinischen Einsatz des Präparates. Diese Unsicherheit über Zusammensetzung und therapeutische Wirksamkeit führten im Jahr 2001 auch zur Verweigerung der Zulassung als Medikament in Deutschland nach gemeinsamer Stellungnahme durch die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) und der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. mit der Begründung, dass die Arzneimittelsicherheit nicht gewährleistet sei (Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98, Heft 7, 16. Februar 2001). Deswegen sei die Anwendung von Ukrain nur innerhalb klinischer Studien am Patienten zulässig.

Die Pflanze Schöllkraut findet schon seit Jahrhunderten Verwendung in der traditionellen chinesischen Medizin und ist vor allem in Europa und im westasiatischen Raum weit verbreitet (Tutin, 1964). So setzte man schon früh Präparationen aus dem Pflanzenextrakt zur lokalen Behandlung von Warzen, Papillomen und Kondylomen ein. Darüberhinaus fanden Schöllkrautextrakte Anwendung bei verschiedenen Gallen- und Lebererkrankungen. Den Extrakten wurden spasmolytische und leicht analgetische Wirkungen zugeschrieben (Vahensieck, 1995; Lenfeld, 1981; Wyczolkowska, 1996). In der Literatur sind positive Wirkungen bei Leber- und Gallenblasenbeschwerden, Appetitlosigkeit und Gastroenteritis beschrieben. Schöllkrautextrakte finden sich daher aktuell in vielen kommerziellen Präparaten wieder. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um Präparate (oftmals Kombinationspräparate, die außer Schöllkrautalkaloiden noch andere Phytopharmaka enthalte), die bei geringgradigen Leber- und Gallenerkrankungen oder unspezifischen gastrointestinalen Beschwerden zur Spasmolyse verabreicht werden können.

Bisher konnten diese Wirkungen jedoch nicht durch klinische Studien bewiesen werden (Ernst und Schmidt, 2005). Es existieren hingegen Berichte über schwerwiegende Nebenwirkungen, die nach oraler Einnahme von Schöllkrautextrakten auftraten. Hierbei wurden in einigen Fällen toxische Hepatitiden nach Einnahme des Extraktes beobachtet (Benninger, 1999; Bone, 2000; Rifai, 2006; Stickel, 2003). Dies könnte beispielsweise durch einen apoptotischen Untergang von Hepatozyten erklärt werden, der durch die in der

Leber stattfindende Metabolisierung der alkaloiden Bestandteile des Schöllkrauts zustande kommt. Bei Schöllkrautextrakten und daraus gewonnenen Aufbereitungen sollte stets an mögliche dermatotoxische und vor allem hepatotoxische Nebenwirkungen gedacht werden, die im Zusammenhang mit Schöllkrautapplikationen vielfach beschrieben sind (Benninger, 1999; Bone, 2000; Stickel, 2003).

Mit der therapeutischen Anwendung insbesondere von Ukrain stehen weiterhin folgende Beobachtungen im Zusammenhang: Erhöhung der Körpertemperatur (Susak, 1996; Uglyanitsa, 2000), unspezifisches Brennen (Uglyanitsa, 2000) und Blutungen (Gansauge, 2007). Bei der intravenösen Verabreichung der Substanz sind bei Studien keine Nebenwirkungen beobachtet worden (Ernst und Schmidt, 2005).

Aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen von Schöllkrautpräparaten, die unter anderem durch proapoptotische Effekte bedingt sind, kann die Schlußfolgerung gezogen werden, dass Schöllkrautpräparationen nicht für den klinischen Einsatz geeignet sind. Vielmehr scheint die Suche nach wirksamen Komponenten des Schöllkrauts sinnvoll, die womöglich weniger Nebenwirkungen aufweisen.

Während sich der Einsatz von zugelassenen Schöllkrautpräparaten bisher weitestgehend auf gastroenterologische Indikationen beschränkt, scheint eine weitere Überprüfung einzelner Alkaloide der Pflanze auf antineoplastische Effekte sinnvoll. Hierbei sollten insbesondere das potente Apoptose-induzierende Alkaloid Chelidonin untersucht werden, für das eine anti-tumorigene Wirkung nachgewiesen ist. In diesem Zusammenhang empfiehlt sich eine Überprüfung der Behandlung weiterer Zelllinien, der intrazellulären Mechanismen und des klonogenen Überlebens behandelter Zellen. Die Alkaloide haben zudem gegenüber dem Präparat Ukrain, das lediglich von Nowicky Pharma (Wien, Österreich) vertrieben wird, den Vorteil der einfacheren Beschaffung, der niedrigeren Kosten und der verlässlichen und einheitlichen Präparation. Der Einsatz von Ukrain hingegen verbietet sich zum derzeitigen

Stand. Dies liegt vor allem an fehlerhaften Informationen und Unklarheiten hinsichtlich der Zusammensetzung des Präparates und der mangelhaften Studienlage.

Alles in allem weisen Schöllkrautalkaloide ein wissenschaftlich noch wenig erschlossenes Potenzial hinsichtlich des Einsatzes innerhalb onkologischer Therapiemöglichkeiten auf. Die sukzessive Analyse der Inhaltsstoffe und synergistischer oder additiver Effekte der verschiedenen Alkaloide untereinander sowie in Kombination mit etablierten Therapieformen (Chemotherapie, Hormontherapie, Antikörpertherapie, Strahlentherapie) scheint aussichtsreich.

10. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zytotoxische und apoptotische Wirkungen des Präparates Ukrain, eines Schöllkraut-Nativextraktes und darin enthaltener Alkaloide in einem Jurkat T-Lymphom-Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Apoptose-Induktion mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ und Caspasen-Aktivierung zur zytotoxischen Wirksamkeit dieser Präparate beitrug. Bis auf Allokryptopin zeigten auch Chelerythrin, Protopin und Sanguinarin eine pro-apoptotische Wirkung obwohl eine Behandlung mit diesen Alkaloiden stets zu einem höheren Anteil nekrotischer Zellen führte. Die hemmende Wirkung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL sowie einer dominant-negativen Caspase-9 belegt die Bedeutung des intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Signalweges.

Sowohl Ukrain als auch der in den Untersuchungen verwendete Schöllkraut-Nativextrakt wurden massenspektrometrisch auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht (Daten freundlicherweise von Herrn Dr. Kammerer, Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ukrain aus einem Gemisch von Schöllkrautalkaloiden besteht, das Chelidonin, Protopin, Allokryptopin, Chelerythrin und Sanguinarin beinhaltet. Die von Herstellerseite postulierte pharmazeutische Zusammensetzung konnte nicht bestätigt werden (Dr. Kammerer, Klinische Pharmakologie, Universität Tübingen). Aus den Untersuchungen geht letztendlich hervor, dass die in Ukrain enthaltenen Schöllkrautalkaloide für die apoptotischen Effekte verantwortlich sind und nicht das von Herstellerseite angegebene hypothetische "Ukrain-Molekül".

Insgesamt verbietet die gegenwärtige Datenlage den therapeutischen Einsatz von Ukrain, da die Zusammensetzung der Präparation vom Hersteller falsch ausgewiesen wird und bisherige klinische Studien deutliche Mängel aufweisen. Vielmehr scheint eine weitere Untersuchung der antineoplastischen Eigenschaften einzelner Schöllkrautalkaloide hinsichtlich intrazellulärer Signalwege und möglicher Wirksamkeit in klinischen Versuchen aussichtsreich.

11. Literaturverzeichnis

- Abu-Ghalyun Y, Masalmeh A, al-Khalil S: **Effects of allocryptopine, an alkaloid isolated from *Glaucium arabicum* on rat isolated ileum and urinary bladder.** *General pharmacology* 1997, **29**(4):621-623.
- Adhami VM, Aziz MH, Mukhtar H, Ahmad N: **Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(8):3176-3182.
- Ahmad N, Gupta S, Husain MM, Heiskanen KM, Mukhtar H: **Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(4):1524-1528.
- Ahsan H, Reagan-Shaw S, Breur J, Ahmad N: **Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins.** *Cancer letters* 2007, **249**(2):198-208.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: **Apoptosis. The role of the endonuclease.** *The American journal of pathology* 1990, **136**(3):593-608.
- Barreto MC, Pinto RE, Arrabaca JD, Pavao ML: **Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids.** *Toxicology letters* 2003, **146**(1):37-47.
- Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ: **Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis.** *The EMBO journal* 2004, **23**(5):1207-1216.
- Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K: **Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis.** *Oncogene* 2000, **19**(9):1181-1190.
- Benninger J, Schneider HT, Schuppan D, Kirchner T, Hahn EG: **Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*).** *Gastroenterology* 1999, **117**(5):1234-1237.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J: **The molecular architecture of the TNF superfamily.** *Trends in biochemical sciences* 2002, **27**(1):19-26.
- Bondar GV, Borota AV, Yakovets YI, Zolotukhin SE: **Comparative evaluation of the complex treatment of rectal cancer patients (chemotherapy and X-ray therapy, Ukrain monotherapy).** *Drugs under experimental and clinical research* 1998, **24**(5-6):221-226.

- Boyko VN, Zholus RB: **A comparative evaluation of the influence of the complex drug Ukrain and its components on the effects of radiation.** *Drugs under experimental and clinical research* 1998, **24**(5-6):331-333.
- Chan SL, Lee MC, Tan KO, Yang LK, Lee AS, Flotow H, Fu NY, Butler MS, Soejarto DD, Buss AD *et al*: **Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(23):20453-20456.
- Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB: **Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2.** *The EMBO journal* 1997, **16**(5):968-977.
- Chao MD, Chen IS, Cheng JT: **Inhibition of protein kinase C translocation from cytosol to membrane by chelerythrine.** *Planta medica* 1998, **64**(7):662-663.
- Chaturvedi MM, Kumar A, Darnay BG, Chainy GB, Agarwal S, Aggarwal BB: **Sanguinarine (pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(48):30129-30134.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ: **BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis.** *Molecular cell* 2001, **8**(3):705-711.
- Chung HS, An HJ, Jeong HJ, Won JH, Hong SH, Kim HM: **Water extract isolated from Chelidonium majus enhances nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in mouse peritoneal macrophages.** *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2004, **56**(1):129-134.
- Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *The Biochemical journal* 1997, **326** (Pt 1):1-16.
- Cordes N, Plasswilm L, Bamberg M, Rodemann HP: **Ukrain, an alkaloid thiophosphoric acid derivative of Chelidonium majus L. protects human fibroblasts but not human tumour cells in vitro against ionizing radiation.** *International journal of radiation biology* 2002, **78**(1):17-27.
- Cordes N, Blaese MA, Plasswilm L, Rodemann HP, Van Beuningen D: **Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain in human tumour and normal cells in vitro.** *International journal of radiation biology* 2003, **79**(9):709-720.

- Crijus APG, De Smet PAGM, van den Heuvel M, Schot BW, Haagsma EB: **Acute hepatitis after use of herbal preparation with greater celandine.** *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; **146**:124-8.
- Danial NN, Korsmeyer SJ: **Cell death: critical control points.** *Cell* 2004, **116**(2):205-219.
- Danilos J, Zbroja-Sontag W, Baran E, Kurylcio L, Kondratowicz L, Jusiak L: **Preliminary studies on the effect of Ukrain (Tris(2-([5bS-(5ba,6b,12ba)]- 5b,6,7,12b,13,14-hexahydro-13-methyl[1,3] benzodioxolo[5,6-v]-1-3- dioxolo[4,5-i]phenanthridinium-6-ol]-EthaneaminyI)Phosphinesulfide.6HCl) on the immunological response in patients with malignant tumours.** *Drugs under experimental and clinical research* 1992, **18 Suppl**:55-62.
- Debiton E, Madelmont JC, Legault J, Barthomeuf C: **Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion.** *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2003, **51**(6):474-482.
- Denault JB, Salvesen GS: **Caspases: keys in the ignition of cell death.** *Chemical reviews* 2002, **102**(12):4489-4500.
- Deng X, Gao F, May WS, Jr.: **Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS.** *Blood* 2003, **102**(9):3179-3185.
- Deng X, Gao F, Flagg T, May WS, Jr.: **Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(1):153-158.
- Desoize B, Sen S: **[Apoptosis or programmed cell death: concepts, mechanisms and contribution in oncology].** *Bulletin du cancer* 1992, **79**(5):413-425.
- Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM: **Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(11):1815-1822.
- Ding Z, Tang SC, Weerasinghe P, Yang X, Pater A, Liepins A: **The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death.** *Biochemical pharmacology* 2002, **63**(8):1415-1421.
- Ernst E, Schmidt K: **Ukrain - a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials.** *BMC cancer* 2005, **5**(1):69.

- Fadok VA, Henson PM: **Apoptosis: getting rid of the bodies.** *Curr Biol* 1998, **8**(19):R693-695.
- French LE, Tschopp J: **Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):117-123.
- Gansauge F, Ramadani M, Schwarz M, Beger HG, Lotspeich E, Poch B: **The clinical efficacy of adjuvant systemic chemotherapy with gemcitabine and NSC-631570 in advanced pancreatic cancer.** *Hepato-gastroenterology* 2007, **54**(75):917-920.
- Green DR: **Apoptotic pathways: ten minutes to dead.** *Cell* 2005, **121**(5):671-674.
- Grinevich Y, Shalimov S, Bendyuh G, Zahriychuk O, Hodysh Y: **Effect of Ukrain on the growth and metastasizing of Lewis carcinoma in C57BL/6 mice.** *Drugs under experimental and clinical research* 2005, **31**(2):59-70.
- Guner D, Belka C, Daniel PT: **Disruption of cell death signaling in cancer: impact on disease prognosis and response to therapy.** *Current medicinal chemistry* 2003, **3**(5):319-326.
- Han MH, Kim SO, Kim GY, Kwon TK, Choi BT, Lee WH, Choi YH: **Induction of apoptosis by sanguinarine in C6 rat glioblastoma cells is associated with the modulation of the Bcl-2 family and activation of caspases through downregulation of extracellular signal-regulated kinase and Akt.** *Anti-cancer drugs* 2007, **18**(8):913-921.
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP: **Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C.** *Biochemical and biophysical research communications* 1990, **172**(3):993-999.
- Hiller KO, Ghorbani M, Schilcher H: **Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and Chelidonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum.** *Planta medica* 1998, **64**(8):758-760.
- Hoffmann TK, Leenen K, Hafner D, Balz V, Gerharz CD, Grund A, Ballo H, Hauser U, Bier H: **Antitumor activity of protein kinase C inhibitors and cisplatin in human head and neck squamous cell carcinoma lines.** *Anti-cancer drugs* 2002, **13**(1):93-100.
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J: **The CARD domain: a new apoptotic signalling motif.** *Trends in biochemical sciences* 1997, **22**(5):155-156.
- Hohenwarter O, Strutzenberger K, Katinger H, Liepins A, Nowicky JW: **Selective inhibition of in vitro cell growth by the anti-tumour drug Ukrain.** *Drugs under experimental and clinical research* 1992, **18** Suppl:1-4.

- Huang Z: **Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design.** *Oncogene* 2000, **19**(56):6627-6631.
- Jacobson MD: **Reactive oxygen species and programmed cell death.** *Trends in biochemical sciences* 1996, **21**(3):83-86.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC: **Programmed cell death in animal development.** *Cell* 1997, **88**(3):347-354.
- Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH: **An assessment of the potential of protopine to inhibit microsomal drug metabolising enzymes and prevent chemical-induced hepatotoxicity in rodents.** *Pharmacol Res* 1998, **38**(3):215-219.
- Jendrossek V, Handrick R, Belka C: (a) **Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway.** *Faseb J* 2003, **17**(11):1547-1549.
- Jendrossek V, Muller I, Eibl H, Belka C: (b) **Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis.** *Oncogene* 2003, **22**(17):2621-2631.
- Kaminsky VO, Lootsik MD, Stoika RS: **Correlation of the cytotoxic activity of four different alkaloids, from Chelidonium majus (greater celandine), with their DNA intercalating properties and ability to induce breaks in the DNA of NK/Ly murine lymphoma cells.** In., vol. 1: Springer; 2006: 2-15.
- Kemeny-Beke A, Aradi J, Damjanovich J, Beck Z, Facsko A, Berta A, Bodnar A: **Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine.** *Cancer letters* 2006, **237**(1):67-75.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH: **Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.** *Cell death and differentiation* 2000, **7**(12):1166-1173.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S: **Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(23):20633-20640.
- Kurochkin SN, Kolobkov SL, Votrin, II, Voltchek IV: **Induction of apoptosis in cultured Chinese hamster ovary cells by Ukrain and its synergistic action with etoposide.** *Drugs under experimental and clinical research* 2000, **26**(5-6):275-278.

- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD: **Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane.** *Cell* 2002, **111**(3):331-342.
- Lanvers-Kaminsky C, Nolting DM, Koster J, Schroder A, Sandkottter J, Boos J: **In-vitro toxicity of Ukrain against human Ewing tumor cell lines.** *Anti-cancer drugs* 2006, **17**(9):1025-1030.
- Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S *et al*: **Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal.** *Cell* 2003, **113**(6):717-730.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH: **Caspases: pharmacological manipulation of cell death.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(10):2665-2672.
- Leithauser F, Dhein J, Mechttersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P: **Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1993, **69**(4):415-429.
- Lenfeld J, Kroutil M, Marsalek E, Slavik J, Preininger V, Simanek V: **Antiinflammatory Activity of Quaternary Benzophenanthridine Alkaloids from *Chelidonium majus**,**.** *Planta medica* 1981, **43**(10):161-165.
- Liepins A, Nowicky JW, Bustamante JO, Lam E: **Induction of bimodal programmed cell death in malignant cells by the derivative Ukrain (NSC-631570).** *Drugs under experimental and clinical research* 1996, **22**(3-5):73-79.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K *et al*: **The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues.** *Molecular cell* 2000, **6**(6):1389-1399.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.** *Cell* 2001, **104**(4):487-501.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: **The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons**

- from knockout mice. *Immunity* 1999, **10**(6):629-639.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X: **Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.** *Cell* 1998, **94**(4):481-490.
- Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J: **Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome.** *Curr Biol* 2004, **14**(21):1929-1934.
- Martinon F, Tschopp J: **Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases.** *Cell* 2004, **117**(5):561-574.
- May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA, Davidson NE: **Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(43):26865-26870.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME: **FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC).** *The EMBO journal* 1997, **16**(10):2794-2804.
- Mendoza J, Zamora R, Gallardo JC, Ceballos G, Aldana A, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J: **NF-kappaB does not influence the induction of apoptosis by Ukrain.** *Cancer biology & therapy* 2006, **5**(7):788-793.
- Mrozek A, Petrowsky H, Sturm I, Kraus J, Hermann S, Hauptmann S, Lorenz M, Dorken B, Daniel PT: **Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(4):461-467.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R *et al.*: **FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex.** *Cell* 1996, **85**(6):817-827.
- Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ: **Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death.** *The EMBO journal* 1999, **18**(9):2330-2341.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S: **Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death.** *Cell* 2003, **112**(4):481-490.

- Nicholson DW: **Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.** *Cell death and differentiation* 1999, **6**(11):1028-1042.
- Nowicky JW, Hiesmayr W, Nowicky W, Liepins A: **Influence of Ukrain on human xenografts in vitro.** *Drugs under experimental and clinical research* 1996, **22**(3-5):93-97.
- Panzer A, Joubert AM, Eloff JN, Albrecht CF, Erasmus E, Seegers JC: (a) **Chemical analyses of Ukrain, a semi-synthetic Chelidonium majus alkaloid derivative, fail to confirm its trimeric structure.** *Cancer letters* 2000, **160**(2):237-241.
- Panzer A, Hamel E, Joubert AM, Bianchi PC, Seegers JC: (b) **Ukrain(TM), a semisynthetic Chelidonium majus alkaloid derivative, acts by inhibition of tubulin polymerization in normal and malignant cell lines.** *Cancer letters* 2000, **160**(2):149-157.
- Panzer A, Joubert AM, Bianchi PC, Hamel E, Seegers JC: **The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways.** *European journal of cell biology* 2001, **80**(1):111-118.
- Pautou MP: **[Morphogenesis of the chick embryo foot].** *Journal of embryology and experimental morphology* 1975, **34**(2):511-529.
- Pengsaa P, Wongpratoom W, Vatanasapt V, Udomthavornsuk B, Mairieng E, Tangvorapongchai V, Pesi M, Krusan S, Boonvisoot V, Nowicky JW: **The effects of thiophosphoric acid (Ukrain) on cervical cancer, stage IB bulky.** *Drugs under experimental and clinical research* 1992, **18** Suppl:69-72.
- Peter ME, Krammer PH: **The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):26-35.
- Rifai K, Flemming P, Manns MP, Trautwein C: **58-jähriger Patient mit schwerer cholestatischer Hepatitis.** In., vol. 47: Springer; 2006: 749-751.
- Roublevskaia IN, Haake AR, Polevoda BV: (a) **Bcl-2 overexpression protects human keratinocyte cells from Ukrain-induced apoptosis but not from G2/M arrest.** *Drugs under experimental and clinical research* 2000, **26**(5-6):149-156.
- Roublevskaia IN, Haake AR, Ludlow JW, Polevoda BV: (b) **Induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP by Ukrain.** *Drugs under experimental and clinical research* 2000, **26**(5-6):141-147.

- Roublevskaia IN, Polevoda BV, Ludlow JW, Haake AR: (c) **Induced G2/M arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma cell lines by semisynthetic drug Ukrain**. *Anticancer research* 2000, **20**(5A):3163-3167.
- Rudner J, Belka C, Marini P, Wagner RJ, Faltin H, Lepple-Wienhues A, Bamberg M, Budach W: **Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells**. *International journal of radiation biology* 2001, **77**(1):1-11.
- Rudner J, Jendrossek V, Lauber K, Daniel PT, Wesselborg S, Belka C: **Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies**. *Oncogene* 2005, **24**(1):130-140.
- Saeed SA, Gilani AH, Majoo RU, Shah BH: **Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine**. *Pharmacol Res* 1997, **36**(1):1-7.
- Salvesen GS, Dixit VM: **Caspase activation: the induced-proximity model**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(20):10964-10967.
- Saunders JW, Jr.: **Death in embryonic systems**. *Science (New York, NY)* 1966, **154**(749):604-612.
- Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME: (a) **Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex**. *Methods (San Diego, Calif)* 1999, **17**(4):287-291.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME: (b) **The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis**. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(3):1541-1548.
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K: **Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation**. *Biochemical pharmacology* 2003, **66**(8):1453-1458.
- Sotomayor EM, Rao K, Lopez DM, Liepins A: **Enhancement of macrophage tumouricidal activity by the alkaloid derivative Ukrain. In vitro and in vivo studies**. *Drugs under experimental and clinical research* 1992, **18** Suppl:5-11.
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H: **Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8**. *The EMBO journal* 2002, **21**(17):4520-4530.
- Stickel F, Poschl G, Seitz HK, Waldherr R, Hahn EG, Schuppan D: **Acute**

- hepatitis induced by Greater Celandine (*Chelidonium majus*).** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2003, **38**(5):565-568.
- Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, Cullen L, Cory S, Adams JM: **The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, **917**:541-548.
- Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dorken B, Daniel PT: **Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(4):477-484.
- Susak YM, Yaremchuk OY, Zemskov VS, Kravchenko OB, Liepins A, Yatsyk IM et al.: **Randomised clinical study of Ukrain on colorectal cancer.** *Eur J Cancer* 1995; **31**:S153 Abstract 733.
- Susak YM, Zemskov VS, Yaremchuk OY, Kravchenko OB, Yatsyk IM, Korsh OB: **Comparison of chemotherapy and X-ray therapy with Ukrain monotherapy for colorectal cancer.** *Drugs under experimental and clinical research* 1996, **22**(3-5):115-122.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV: **A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.** *Cell* 1993, **74**(5):845-853.
- Thorburn A: **Death receptor-induced cell killing.** *Cellular signalling* 2004, **16**(2):139-144.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP et al.: (a) **A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.** *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(29):17907-17911.
- Thornberry NA: (b) **The caspase family of cysteine proteases.** *British medical bulletin* 1997, **53**(3):478-490.
- Thornberry NA, Lazebnik Y: (a) **Caspases: enemies within.** *Science (New York, NY)* 1998, **281**(5381):1312-1316.
- Thornberry NA: (b) **Caspases: key mediators of apoptosis.** *Chemistry & biology* 1998, **5**(5):R97-103.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH: **Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.** *Science (New York, NY)* 1989, **245**(4915):301-305.

- Tutin M: **[the Treatment of Hemochromatosis.]** *Le Progres medical* 1964, **92**:145-148.
- Uglyanitsa KN, Nefyodov LI, Doroshenko YM, Nowicky JW, Volchek IV, Brzosko WJ, Hodysh YJ: **Ukrain: a novel antitumor drug.** *Drugs under experimental and clinical research* 2000, **26**(5-6):341-356.
- Vahlensieck U, Hahn R, Winterhoff H, Gumbinger HG, Nahrstedt A, Kemper FH: **The effect of Chelidonium majus herb extract on choleresis in the isolated perfused rat liver.** *Planta medica* 1995, **61**(3):267-271.
- Vavreckova C, Gawlik I, Muller K: (a) **Benzophenanthridine alkaloids of Chelidonium majus; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism.** *Planta medica* 1996, **62**(5):397-401.
- Vavreckova C, Gawlik I, Muller K: (b) **Benzophenanthridine alkaloids of Chelidonium majus; II. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes.** *Planta medica* 1996, **62**(6):491-494.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: **TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy.** *Apoptosis* 2002, **7**(5):449-459.
- Wajant H: (a) **Death receptors.** *Essays in biochemistry* 2003, **39**:53-71.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: (b) **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):45-65.
- Weerasinghe P, Hallock S, Liepins A: (a) **Bax, Bcl-2, and NF-kappaB expression in sanguinarine induced bimodal cell death.** *Experimental and molecular pathology* 2001, **71**(1):89-98.
- Weerasinghe P, Hallock S, Tang SC, Liepins A: (b) **Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death.** *Cell biology and toxicology* 2001, **17**(6):371-381.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ: **tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c.** *Genes & development* 2000, **14**(16):2060-2071.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ: **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.** *Science (New York, NY)* 2001, **292**(5517):727-730.
- Willis SN, Adams JM: **Life in the balance: how BH3-only proteins induce**

- apoptosis.** *Current opinion in cell biology* 2005, **17**(6):617-625.
- Wolff J, Knipling L: **Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids.** *Biochemistry* 1993, **32**(48):13334-13339.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: **Cell death: the significance of apoptosis.** *International review of cytology* 1980, **68**:251-306.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D: **Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.** *The Journal of pathology* 1984, **142**(1):67-77.
- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ: **BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M.** *Molecular and cellular biology* 1999, **19**(12):8469-8478.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB: **BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak.** *Genes & development* 2001, **15**(12):1481-1486.

12. Danksagung

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Verena Jendrossek und Herrn Prof. Dr. Claus Belka für das freundliche Überlassen des Dissertationsthemas, die professionelle Betreuung und die inspirierenden und anregenden Gespräche.

Herrn Dr. René Handrick und Herrn Dr. Marco Henkel möchte ich für die vielen interessanten Gespräche und die unermüdliche Hilfsbereitschaft beim täglichen experimentellen Arbeiten im Labor ganz herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank dem Laborteam der AG Belka/Jendrossek, also Ilka Müller, Heidi Faltin, Barbara Goecke, Amelie Rübel, Therese Eldh und Jutta Kuhn, die stets für eine gute und angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Maximilian Nyiazi danke ich für die Beratung bei Fragen zur statistischen Auswertung.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Kammerer aus der Abteilung Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Tübingen. Er hat durch die massenspektrometrischen Untersuchungen von Ukrain und dem Schöllkrautextrakt maßgeblichen Anteil an der Erörterung des Themas.

Ausserdem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken, die mich bei dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ unter dem Vorsitz Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Rammensees unterstützte.

Letztendlich möchte ich meiner lieben Familie für die dauernde finanzielle, aber vor allem seelische Unterstützung während der Dauer der Dissertation danken.

13. Publikationsliste

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

1. *„Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway.“*
Habermehl D, Kammerer B, Handrick R, Eldh T, Gruber C, Cordes N, Daniel PT, Plasswilm L, Bamberg M, Belka C, Jendrossek V
BMC Cancer 2006, **6**:14.

2. *„Die zytotoxische Wirksamkeit von Ukrain beruht auf der Wirkung von Chelidonium majus L.-Alkaloiden und wird über einen mitochondrialen Apoptosesignalweg vermittelt“*
Habermehl D, Kammerer B, Handrick R, Eldh T, Plasswilm L, Bamberg M, Belka C, Jendrossek V
Poster, 12. Jahreskongress der DEGRO (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie) 2006 in Dresden, P9-38

3. *„Identifizierung von apoptoseinduzierenden Alkaloiden des Schöllkrauts“*
Habermehl D, Kammerer B, Eldh T, Belka C, Jendrossek V
Poster, 11. Jahreskongress der DEGRO (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie) 2005 in Karlsruhe, P17.24

14. Lebenslauf

Geburt:	24. September 1979 in Bad Schwalbach
1990-1999:	Deutsch-Französisches Gymnasium, Saarbrücken
Abschluss:	Deutsch-Französisches Abitur (Note 1,0)
1999-2000:	Zivildienst, Ausbildung zum Rettungssanitäter auf der Rettungswache des Arbeiter-Samariter Bundes in Saarbrücken-Brebach
Ab WS 2000/01:	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls Universität Tübingen
2002- 2007:	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
06.09.2002	Ärztliche Vorprüfung
23.09.2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2003-	Promotionsstipendiat im Graduiertenkolleg „ <i>Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse</i> “ (Leiter: Prof. Dr. Rammensee) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
Frühjahr 2004:	
2004/2005:	Famulaturen am <i>St. Vincentius-Krankenhaus</i> Landau (Innere Medizin), am <i>Allgemeinen Krankenhaus</i> Wien (Psychiatrie), am Krankenhaus <i>Hasan Sadikin</i> in Bandung/Indonesien (Tropenmedizin) und an der Universitätsklinik Tübingen (Strahlentherapie)
21.09.2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2006-	Praktisches Jahr
Herbst 2007	- Innere Medizin und Chirurgie (Klinikum am Steinenberg, Reutlingen) - Wahlfach “Klinische Pathologie” (Kantonsspital Winterthur und Pathologisches Institut der Universität Tübingen)
06.11.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,83)
12.11.2007	Approbation
Seit 02.01.2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum Düsseldorf (Chefarzt: Prof. Dr. W. Budach)