



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung der zytotoxischen Wirkung des
Schimmelpilzmetaboliten
KR6-Synchromycin “

Verfasserin

Yasmin Dobler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

ao.Univ.Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Lemmens-Gruber für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie, sowie für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch Frau Dr. Rita Dornetshuber-Fleiss, die mir ermöglicht hat am Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien einige Untersuchungen durchzuführen.

Bei Frau Pakiza Rawnduzi möchte ich mich herzlich für die Einschulung in verschiedene Arbeitstechniken und für die Unterstützung bei diversen Problemen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Kollegin und guten Freundin Sandra für die wertvollen Tipps zum Schreiben dieser Diplomarbeit und für die gute Zusammenarbeit während des Studiums.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, die mir das Studium der Pharmazie ermöglicht hat und mich auch in schwierigen Phasen des Studiums immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung und Zielsetzung:	1
2	Allgemeines:	2
2.1	Der Zelltod	2
2.1.1	Formen des Zelltods:	2
2.2	Signalwege der Apoptose:	3
2.2.1	Die Bcl2-Familie	4
2.2.1.1	Bax:	5
2.2.2	p53 und p21 als Regulatoren der Apoptose und des Zellzyklus:	6
2.2.2.1	p21 als Schutz vor Apoptose:	6
2.2.2.2	p21 als Ursache für Cytostatikaresistenz:	7
2.2.2.3	p53 als zentrale Schaltstelle in einem komplexen Gen-Netzwerk:	7
2.2.2.4	p53 als Regulator der Apoptose:	8
2.2.2.5	Krebs als Folge gestörter p53-Funktion:	9
3	Material und Methoden:	10
3.1	Die Testsubstanz:	10
3.2	Zelllinien und zugehörige Nährmedien:	11
3.2.1	Krebs-Zelllinien:	11
3.2.2	Nicht entartete Zelllinien:	11
3.2.3	Nährmedien:	11
3.3	Kultivierung der Zellen:	12
3.3.1	Allgemeines:	12
3.3.2	Auftauen der Zellen:	12
3.3.3	Wechseln des Nährmediums:	12
3.3.4	Passagieren:	12
3.3.5	Bestimmung der Zellzahl:	13

3.4	EZ4U-Zytotoxizitätstest:	15
3.5	Auswaschversuche:	17
3.6	Annexin V-FITC/ PI Färbung:.....	17
3.7	Zellzyklusanalyse:	18
3.8	Fluorescence-Imaging:.....	21
4	Resultate und Diskussion:	23
4.1	Ergebnisse der EZ4U-Zytotoxizitätstests:	23
4.1.1	Zytotoxizität auf KB-3-1 Zellen:.....	23
4.1.2	Zytotoxizität auf A549 Zellen:	24
4.1.3	Zytotoxizität auf CACO2 Zellen:.....	25
4.1.4	Zytotoxizität auf HCT 116 Zellen:	26
4.1.5	Zytotoxizität auf HCT 116 p53/ko Zellen:.....	27
4.1.6	Zytotoxizität auf HCT 116 p21/ko Zellen:.....	27
4.1.7	Zytotoxizität auf HCT 116 bax/ko Zellen:	28
4.1.8	Vergleich der Zytotoxizität zwischen der HCT 116 Mutterzelllinie und den zugehörigen Subzelllinien:.....	28
4.1.9	Zytotoxizität auf HEK Zellen:	33
4.1.10	Zytotoxizität auf Makrophagen (MH-S):	34
4.1.11	Zytotoxizität auf FHs74Int Zellen:	35
4.1.12	Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2 und HCT 116 anhand der EC_{50} :	36
4.1.13	Vergleich der Zytotoxizität auf die Darmzelllinien CACO2, HCT 116 und FHs74Int anhand der EC_{50} :	37
4.1.14	Vergleich der Zytotoxizität auf die „Nicht-Krebszelllinien“ HEK, MH-S und FHs74Int anhand der EC_{50} :	38
4.2	Ergebnisse der Auswaschversuche:.....	39
4.2.1	Auswaschversuche an KB-3-1 Zellen:.....	39

4.2.2	Auswaschversuche an A549 Zellen:	39
4.3	Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung:	41
4.4	Ergebnisse der Zellzyklusanalyse:.....	44
4.4.1	Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S- Exposition:	44
4.4.2	Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S- Exposition:	47
4.5	Ergebnisse der Fluorescence Imaging-Versuche:	51
4.5.1	Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration:.....	51
5	Schlussbetrachtung:.....	53
6	Zusammenfassung:	54
7	Abstract:	55
8	Abbildungsverzeichnis:	56
9	Tabellenverzeichnis:.....	62
10	Quellenverzeichnis:	56
11	Lebenslauf	63

1 Einleitung und Zielsetzung:

Im Dezember 2007 wurde im Rahmen mykologischer Forschungen eine seltene Pilzspezies der Gattung *Chrysosporium* wiederentdeckt. Extrakte dieses Pilzes wurden von Romer Labs Division Holding GmbH in Tulln auf antibiotische Wirkung gescreent. In weiterer Folge wurden am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien rund 300 Extrakte, welche keine antibiotische Wirkung zeigten, auf zytotoxische Wirkung getestet. Knapp 20 Prozent davon waren zytotoxisch. KR6-S ist eine isolierte Substanz aus einem dieser zytotoxisch wirkenden Extrakte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung von KR6-S an diversen Krebszelllinien und nicht entarteten Zelllinien untersucht. Es wurden die jeweiligen Hemmkonzentrationen ermittelt und getestet, ob die Zellen im Stande sind sich nach dem Toxinkontakt wieder zu erholen. Weiters wurde der Einfluss von KR6-S auf den Zellzyklus untersucht und ob die zytotoxische Wirkung durch Apoptoseinduktion oder Nekrose zustande kommt. Um Anhaltspunkte hinsichtlich des Wirkungsmechanismus zu bekommen, wurde geprüft ob KR6-S Einfluss auf die Calciumhomöostase hat. Sämtliche Untersuchungen sollten dazu dienen erste Hinweise zu erhalten, ob KR6-S einen möglichen Entwicklungskandidaten für ein neues Chemotherapeutikum gegen Krebs darstellen könnte.

2 Allgemeines:

2.1 Der Zelltod

Der Zelltod ist ein physiologischer Prozess. Er ist wichtig für die Entwicklung, Homöostase und Gesunderhaltung eines multizellulären Organismus. Zellen, die nicht länger benötigt werden, fehlerhaft arbeiten, oder zum Beispiel virusinfiziert sind, werden eliminiert. Ist die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod gestört, können Krankheiten resultieren. Alzheimer, Parkinson, AIDS und Autoimmunerkrankungen sind nur wenige Beispiele hierfür. Vor allem die Entstehung von Krebs ist durch ein Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod gekennzeichnet [Vaux, 1993; Bröker et al., 2005].

2.1.1 Formen des Zelltods:

Die Apoptose läuft streng kontrolliert ab, weshalb dieser Ausdruck oft synonym mit „programmiertem Zelltod“ verwendet wird, wohingegen die Nekrose unkontrolliert und chaotisch abläuft.

Die **Apoptose** ist gekennzeichnet durch den Tod einzelner isolierter Zellen, wobei keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert, die DNA wird gespalten und der Kern wird fragmentiert. Die Kernschrumpfung findet recht früh statt, wohingegen Veränderungen der Zellorganellen und der Verlust der Membranintegrität erst relativ spät auftreten. Die Zellmembran beginnt Bläschen zu bilden, was zum Freisetzen sogenannter „apoptotic bodies“ führt. Die abgestorbenen Zellen werden von Nachbarzellen phagozytiert. Die umliegenden Zellen erkennen die apoptotische Zelle durch Phosphatidylserin, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Membran befindet und bei der Apoptose an der Außenseite der Membran exponiert wird [Vaux, 1993; Kerr et al., 1972].

Die **Nekrose** hingegen befällt viele aneinandergrenzende Zellen und wird von einer Entzündung und dadurch auch dem Einwandern von phagozytierenden Zellen in das betroffene Gewebe begleitet. Bei der Nekrose schwillt die Zelle an und verliert schon sehr früh die Integrität der Plasmamembran, wodurch der Zellinhalt frei wird und so eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Auch Veränderungen der Zellorganellen finden schon

in einem frühen Stadium statt. Der Zellkern schwillt an. Die Fragmentierung der DNA passiert im Gegensatz zur Apoptose erst sehr spät [Vaux, 1993; Guimaraes et Linden, 2004].

Neben Apoptose und Nekrose existieren weitere alternative Formen des Zelltods, wie zum Beispiel „Paraptose“ und „Autophagie“, welche beide Caspase-unabhängig ablaufen und weiters die „Mitotic catastrophe“, die durch defekte Mitose ausgelöst wird. Außerdem kann es zum Auftreten des sogenannten „Slow cell death“ kommen. Dies geschieht wenn der programmierte Zelltod (PCD) verspätet eingeleitet wird. Anhand der Kernmorphologie lassen sich „apoptosis-like PCD“ und „necrosis-like PCD“ von der Apoptose unterscheiden [Bröker et al., 2005].

2.2 Signalwege der Apoptose:

Die Apoptose kann über verschiedene Wege ablaufen. Grundsätzlich unterscheidet man den extrinsischen (Todesrezeptor-Weg) und den intrinsischen Weg (mitochondrialer Weg).

Der extrinsische Weg wird durch Ligandenbindung an transmembranäre Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie, welche sich auf der Außenseite der Zytoplasmamembran befinden, eingeleitet. Liganden sind TNF- α , Fas-Ligand (CD95L) und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Durch diese Ligandenbindung ändern die Todesrezeptoren ihre Konformation und bilden intrazellulär zusammen mit den Initiator-Procaspasen 8 und 10 einen Rezeptor-Protein-Komplex, den „death initiation signalling complex“ (DISC). Die Initiator-Procaspasen aktivieren sich daraufhin, indem sie sich selbst oder gegenseitig spalten. Die so entstandenen Initiator-Caspasen spalten die nachgeschalteten Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 [Fiandalu und Kyprianou, 2012].

Beim intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien die zentrale Rolle. Apoptose-Signale wie Sauerstoffmangel, reaktive Sauerstoffspezies, Mangel an Wachstumsfaktoren oder DNA-Schäden führen zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien [Gottlieb und Gustaffson, 2007; Ocker und Höpfner, 2012]. Verantwortlich für die Durchlässigkeit der mitochondrialen Plasmamembran sind die Mitglieder der Bcl2-Familie. Das freigesetzte Cytochrom c bildet mit „apoptotic protease-activating factor“(APAf-1) und Procaspase 9 einen Komplex, das sogenannte Apoptosom [Riedl und Salvesen, 2008]. So kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspase 9, welche wiederum die nachgeschalteten Effektor-Caspasen aktiviert.

Der extrinsische und der intrinsische Weg werden also durch verschiedene Stimuli und verschiedene Initiator-Caspasen aktiviert, aber beide führen schlussendlich zur Aktivierung der Effektor-Caspasen [Gottlieb und Gustaffson, 2007], welche wahrscheinlich verschiedene Todessubstrate spalten wie beispielsweise Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) [Basu et al., 2006]. PARP ist involviert in DNA-Reparatur, -Stabilität sowie in die Regulierung der Transkription [Los et al., 2002].

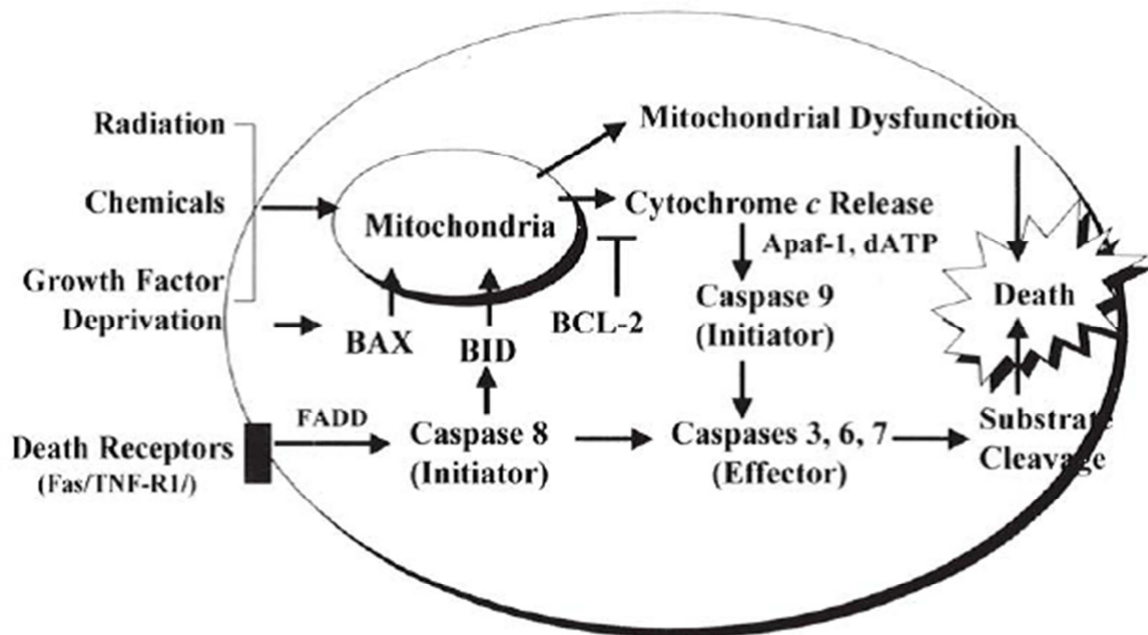


Abbildung 1: Die zwei Hauptwege der Apoptose [Yin, 2000].

Die dritte Möglichkeit die Apoptose einzuleiten, läuft über das Endoplasmatische Reticulum (ER). Änderungen in der Calciumhomöostase sowie Akkumulation fehlgefalteter Proteine verursachen ER-Stress, welcher in weiterer Folge über Aktivierung der Caspase 12 die Apoptose einleiten kann [Rao et al., 2004].

2.2.1 Die Bcl2-Familie

Die Proteine der „B cell lymphoma 2“-Familie sind wichtige Zelltodregulatoren. Bcl2 wurde in B-Zell-Lymphomen als das erste Protoonkogen entdeckt, welches anti-apoptotische Funktionen ausübt. Mehr als 20 „Bcl2 Familie“-Proteine wurden identifiziert. Anhand ihrer Funktion und Struktur werden sie in Gruppen eingeteilt [Jain et al., 2013].

Die „Multidomain“ Proteine wie Bax und Bak besitzen drei Bcl2 homologe (BH) Domänen (BH1-3). Die „BH3-only“-Proteine, wie beispielsweise Bid, Bim, Puma und Noxa besitzen nur

die BH3-Domäne. „Multidomain“ und „BH3-only“ Proteine sind pro-apoptotisch [Barille-Nion et al., 2012]. Die anti-apoptotischen Mitglieder besitzen alle vier BH Domänen. Zu ihnen gehören beispielsweise Bcl2, Bcl-XL, Bcl-W und Mcl-1 [Jain et al., 2013].

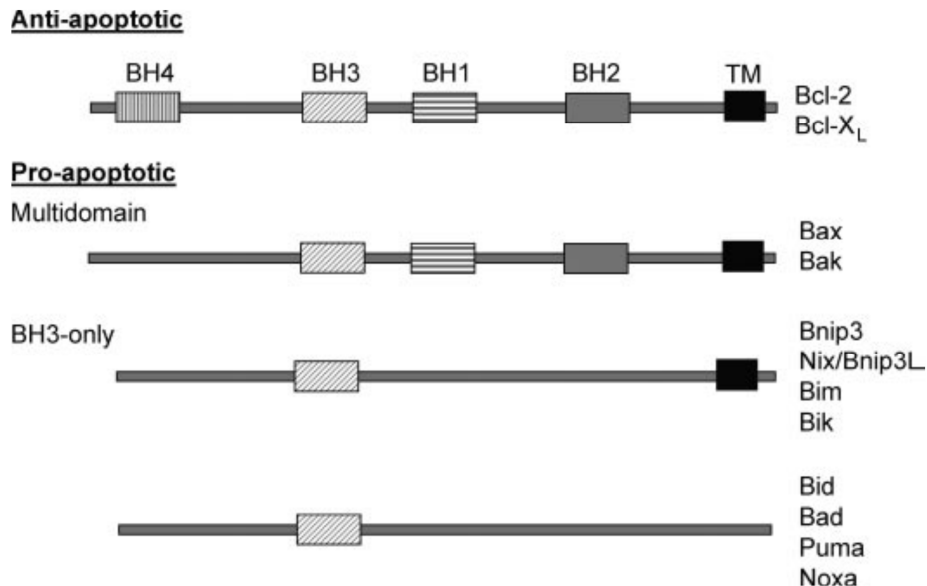


Abbildung 2: Einteilung der Bcl2-Proteinfamilie anhand ihrer Funktion und Struktur (BH1-4 = Bcl2 homologe Domänen; TM = Transmembrandomäne) [GUSTAFFSON und GOTTLIEB, 2007]

Die genauen molekularen Mechanismen, über welche die Bcl2-Familie die Apoptose und andere Formen des Zelltods reguliert, sind bis dato noch nicht gänzlich entschlüsselt. Wenn die Apoptose einsetzt, wechselt der intrazelluläre Standort der Bcl2-Mitglieder. Der intrinsische Apoptoseweg wird über das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen moduliert. Die genaue Reihenfolge der Events, die dann schlussendlich zur Cytochrom c Freisetzung führt, bleibt unklar [Jain et al., 2013].

In Krebszellen werden die anti-apoptotischen Bcl2-Mitglieder häufig überexprimiert. Folglich wird das Überleben dieser Zellen trotz Apoptosesignalen ermöglicht und ihre Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie gefördert [Barille-Nion et al., 2012].

2.2.1.1 Bax:

Apoptotische Signale führen zur Dimerisierung und Translokation von cytosolischem Bax. Bax-bax Homodimere akkumulieren und werden zu integralen Membranproteinen der äußeren Mitochondrienmembran, worauf diese durchlässig für Cytochrom c wird [Burlacu, 2003]. Gefördert wird die Bax-Dimerisierung und Translokation durch Puma [Haupt et al., 2003].

2.2.2 p53 und p21 als Regulatoren der Apoptose und des Zellzyklus:

Als Reaktion auf zellulären Stress wird das p53-Protein stabilisiert und führt zur Apoptose oder indirekt über p21-Induktion zum Zellzyklusarrest. Wie die Zelle zwischen diesen beiden Möglichkeiten wählt, ist noch nicht gänzlich geklärt [Gartel und Tyner, 2002].

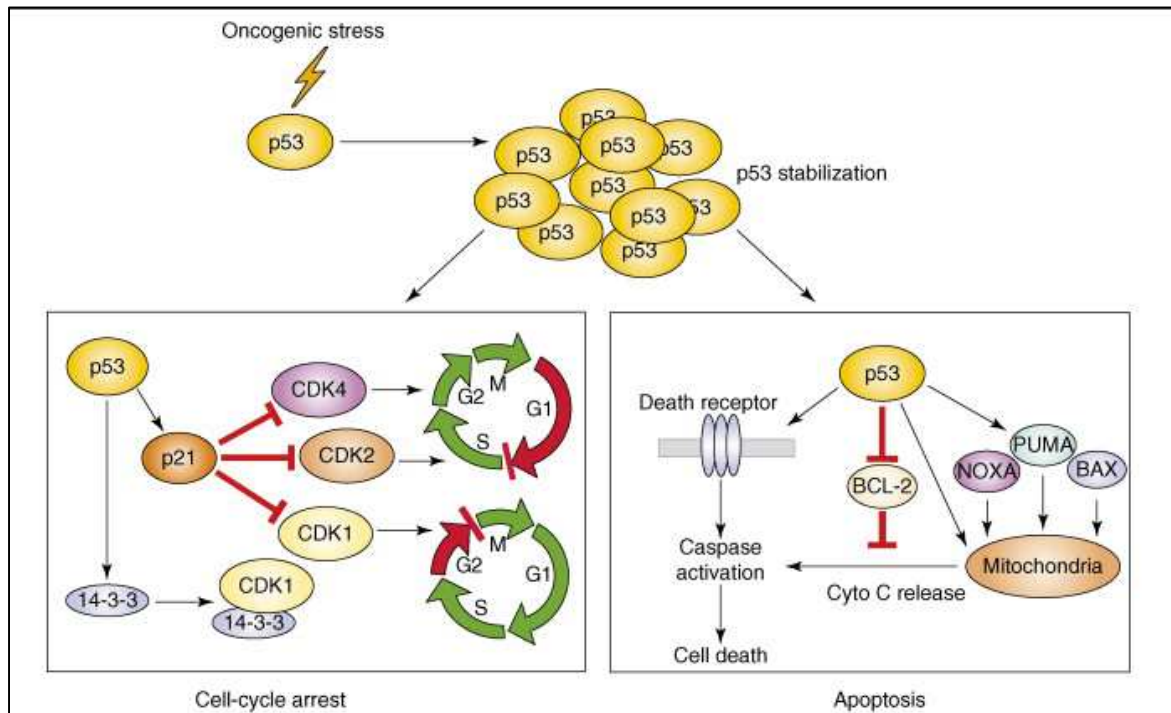


Abbildung 3: Zellzyklusarrest oder Apoptose als Konsequenzen der p53-Aktivierung [Vassilev, 2007].

2.2.2.1 p21 als Schutz vor Apoptose:

Aufeinanderfolgende Aktivierungen von Cyclin/Cdk (Cyclin-dependent Kinase)-Komplexen regulieren den Verlauf des Zellzyklus. Aktivierte Cyclin/Cdk-Komplexe führen zur Zellproliferation. CKIs (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) inhibieren diese Komplexe. p21 ist ein bedeutendes Mitglied der CKI-Familie und spielt eine essentielle Rolle im Einleiten des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung. p21-Überexpression führt zu G₁-, G₂-, oder S-Phase Arrest. Diese Pause im Zellzyklus gibt der Zelle die Chance Schäden zu reparieren und danach mit der Zellteilung fortzufahren. p21 schützt die Zelle also vor der Apoptose. Dies bewerkstelligt p21 indem es beispielsweise die Spaltung der Initiatorcaspasen hemmt und mit Procaspase 3 interagiert was zur Resistenz gegenüber Fas induziertem Zelltod führt. Die Expression von p21 wird weitgehend über p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen auf der transkriptionellen Ebene gesteuert. Sowohl p53 kann an den p21-Promotor binden und so zur p21-Transkription führen als auch eine Menge anderer

Transkriptionsfaktoren, welche durch verschiedenste Signalwege induziert werden. p21 wirkt einerseits als Tumorsuppressor, indem es die Proliferation hemmt, auf der anderen Seite agiert es durch seine anti-apoptotische Aktivität als Onkogen [Gartel und Tyner, 2002].

2.2.2.2 p21 als Ursache für Cytostatikaresistenz:

Ein Beispiel für die schützende Wirkung von p21 vor der Apoptose liefert die Behandlung mit dem DNA-schädigenden Anthracyclinantibiotikum Doxorubicin. Es induziert über p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen die Apoptose, wohingegen die p53-abhängige und p53-unabhängige p21-Expression die Zellen vor Doxorubicin induziertem Zelltod schützt. Die humane Colonkarzinomzelllinie HCT 116 wird nach Doxorubicin-Behandlung dem Zellzyklusarrest unterzogen, wohingegen HCT 116 Zellen, bei welchen das p21-Gen deletiert wurde (p21/ko), der Apoptose unterliegen. p21 schützt also vor Chemotherapie induzierter Apoptose. Ein weiteres Beispiel hierfür sind Mammakarzinome welche HER-2/neu überexprimieren was zur Aktivierung von p21 führt und somit zur Resistenz gegenüber Taxol-induziertem Zelltod führt.

Auf der anderen Seite kann p21 aber auch pro-apoptotisch fungieren. Überexpression von p21 verstärkt in einigen Krebszelllinien die apoptotische Wirkung von Cisplatin und führt zur Induktion des pro-apoptotischen Bax-Proteins. In den meisten Fällen wird allerdings von der anti-apoptotischen Funktion von p21 berichtet [Gartel und Tyner, 2002].

2.2.2.3 p53 als zentrale Schaltstelle in einem komplexen Gen-Netzwerk:

Der Tumorsuppressor p53, ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, fungiert in einem komplexen Gen-Netzwerk als zentrale Schaltstelle. Welche Auswirkung das Umlegen dieses Schalters hat, ist Zelltyp- und Stimulus-spezifisch. Hunderte von Zielgenen wurden identifiziert. p53 Zielgene sind z.B. p21 und 14-3-3 σ , welche Zellzyklusarrest induzieren, wohingegen die p53 Zielgene Bax, Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis) und Noxa die Apoptose einleiten [Sullivan et al., 2012]. p53 wird durch externe und interne Stresssignale, welche z.B. DNA-Schäden, vorzeitige Onkogenexpression, Sauerstoffmangel, Verlust von normalen Zellkontakten und Nucleotiddepletion sein können, aktiviert, was zu einer Akkumulation aktiver p53-Proteine im Zellkern und dadurch zu gesteigerter Transkriptionsaktivität führt. Die wachstumsinhibierenden Aktivitäten von p53 verhindern die Proliferation von Zellen mit geschädigter DNA. Zusätzlich nimmt p53 an zellulären Prozessen, wie Differenzierung, DNA-Reparatur und Angiogenese teil. Der p53-Inhibitor

MDM2 hemmt die transkriptionelle Aktivität von p53 und fördert seine Degradierung durch das Proteasom. P53 induziert auch selbst seinen Suppressor MDM2 [Haupt et al., 2003].

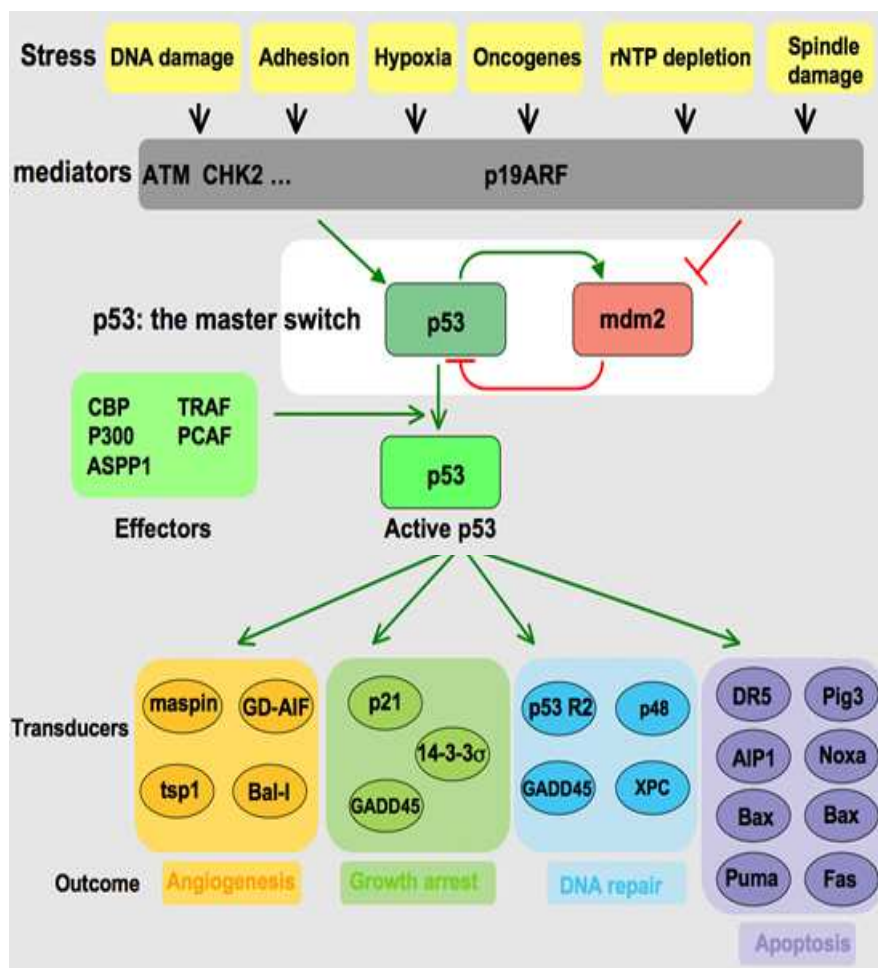


Abbildung 4: p53 als zentrale Schaltstelle in einem komplexen Gen-Netzwerk
[http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html]

2.2.2.4 p53 als Regulator der Apoptose:

p53 ist für die Regulation des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges mitverantwortlich. p53 fördert die Apoptose nicht nur transkriptionsabhängig, sondern auch transkriptionsunabhängig. p53 kann den extrinsischen Weg über Expression von Todesrezeptoren wie z.B. Fas in Gang setzen. Der intrinsische Weg wird durch p53 über Expression von Bax, Puma und Noxa in Gang gesetzt. p53 induziert weiters auch die APAF-1- oder Caspase 6 Expression. Transkriptionsunabhängig aktiviert p53 Caspase 8 und inhibiert anti-apoptotische Bcl-xl und Bcl-2, was zur Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran führt [Haupt et al., 2003].

2.2.2.5 Krebs als Folge gestörter p53-Funktion:

Nahezu jeder Tumor exprimiert p53. In ungefähr der Hälfte dieser Tumoren wurde p53 durch eine einfache Punktmutation inaktiviert, was folglich die tumorsuppressive Funktion von p53 zerstört. In der anderen Hälfte der Tumoren wird nur wenig p53 exprimiert, welches durch Überexpression an MDM2 und/oder MDM4 inhibiert wird [Sullivan et al., 2012].

3 Material und Methoden:

3.1 Die Testsubstanz:

Die Testsubstanz KR6-S wurde von Dr. Roman Labuda (Romer Labs Division Holding GmbH; 3430 Tulln, Austria) zur Verfügung gestellt. KR6-S wurde in DMSO gelöst und um die gewünschten Konzentrationen für die Versuche zu erhalten mit Nährmedium entsprechend verdünnt. Bei der Zugabe des Mediums fiel KR6-S allerdings wieder aus, so dass alle Tests mit einer Suspension durchgeführt wurden. Deshalb musste die Flüssigkeit vor jeder Verdünnung und Zugabe stets gut gemischt werden, um eine gleichmäßige Verteilung von KR6-S zu gewährleisten. Es wurden 8 unterschiedliche Konzentrationen verwendet.

Parallel zu meiner praktischen Arbeit wurde an der TU-Wien versucht die Struktur von KR6-S aufzuklären. Das Molekulargewicht wurde mit 682 g/mol angegeben. Ausgehend von diesem Wert wurden die Verdünnungen angefertigt. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Konzentrationen in μM und in $\mu\text{g/l}$ angegeben.

verwendete KR6-S-Konzentrationen								
μM	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	30
$\mu\text{g/l}$	6,82	20,46	68,2	204,6	682	2046	6820	20460

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten KR6-S-Konzentrationen

3.2 Zelllinien und zugehörige Nährmedien:

Die Toxizität der Substanz wurde an sieben Krebs-Zelllinien und an drei nicht entarteten Zelllinien getestet.

3.2.1 Krebs-Zelllinien:

- KB-3-1: Cervixkarzinomzellen (von ATCC)
- A549: Lungenkarzinomzellen (von ATCC)
- CACO2: Colonkarzinomzellen (von ATCC)
- HCT116: Colonkarzinomzellen (zur Verfügung gestellt von Dr. Vogelstein, John Hopkins Universität Baltimore)

Von der HCT116-Zelllinie wurden außerdem folgende drei isogene Subzelllinien mit homozygot deletiertem p53, p21 oder bax Gen verwendet:

- o HCT116 p53/ko
- o HCT116 p21/ko
- o HCT116 bax/ko

3.2.2 Nicht entartete Zelllinien:

- FHs74Int: Darmzellen (von ATCC)
- HEK-293: Humane embryonale Nierenzellen (von ATCC)
- MH-S: Makrophagen (von ATCC)

3.2.3 Nährmedien:

Die Zelllinien KB-3-1, A549 und CACO2 wurden mit RPMI-1640 Medium (Sigma®), welchem 10% fötales Rinderserum (Sigma®) und 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma®) zugesetzt wurde, gezüchtet.

Die HCT116-Zelllinien wurden mittels McCoy's 5A Medium (Gibco®), welchem 10% fötales Rinderserum und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde, kultiviert.

CCL-241 und Makrophagen wurden mit RPMI-1640 Medium, welchem 10% Kalbserum (Sigma®) und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde, gezüchtet.

Die HEK-Zellen wurden mittels DMEM/F-12 (1X) (Gibco®), welchem 10% fötales Rinderserum und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt wurde, kultiviert.

3.3 Kultivierung der Zellen:

3.3.1 Allgemeines:

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C (5% CO₂) gezüchtet. Sie befanden sich in 25 cm² bzw. 75 cm² Schräghalskulturflaschen. Die kleineren Flaschen wurden mit Nährmedium auf 5 ml aufgefüllt, die größeren auf 10 ml. Das Nährmedium wurde vorher im Heizbad auf 37°C erwärmt.

Sämtliche Zelllinien wuchsen adhärent. Das bedeutet, die im Nährmedium schwimmenden Zellen setzen sich mit der Zeit ab und haften sich am Boden des Kulturgefäßes an, wo sie dann wachsen und sich vermehren. Abgestorbene Zellen lösen sich vom Boden ab und schwimmen frei im Medium.

3.3.2 Auftauen der Zellen:

Die verschiedenen Zelllinien waren in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wurden bei Bedarf aufgetaut. Jede Zelllinie befand sich in einem eigenen Eppendorf-Gefäß.

Das jeweilige Gefäß wurde dem Stickstoffbehälter entnommen und kurz am Wasserbad erwärmt bis sich der Inhalt verflüssigt hat. Die Zellsuspension wurde mittels Einmalpipette entnommen und in eine zuvor beschriftete Kulturflasche mit geeignetem Nährmedium überführt. Dann wurde die Flasche bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium gewechselt um zelltoxisches DMSO, welches den Zellen vor dem Einfrieren zugesetzt wurde, zu entfernen.

3.3.3 Wechseln des Nährmediums:

Da die Inhaltsstoffe des Nährmediums im Laufe der Zeit von den Zellen metabolisiert werden, musste das Medium 1 bis 2 mal pro Woche gewechselt werden.

Hierzu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Dabei wurden auch bereits abgestorbene Zellen, die frei im Nährmedium schwimmen, entfernt. Die lebenden Zellen hingegen blieben in der Kulturflasche, da sie am Boden anhafteten.

3.3.4 Passagieren:

Da sich die Zellen in der Kulturflasche kontinuierlich vermehren ist je nach Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie nach einigen Tagen der Boden der Flasche zur Gänze zugewachsen

(konfluent). Unter diesen Bedingungen können sich die Zellen nicht weiter vermehren und sterben ab. Deshalb wurde jeden Tag unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen noch ausreichend Platz haben. Sobald in etwa 90% des Bodens bedeckt waren, wurde ein Teil der Zellen entnommen und in eine neue Kulturflasche überführt. Dieser Vorgang wird auch Passagieren genannt. Die Passagenzahl wurde auf den Kulturgefäßen notiert.

Um die Zellen entnehmen zu können, müssen sie sich zuerst vom Boden der Kulturflasche lösen. Dies wurde durch den Zusatz von Trypsin (Trypsin/ 0,53 mM EDTA; Vitacell®) erreicht. Wichtig ist, dass man die Zellen nicht zu lange mit Trypsin inkubiert, da dieses zytotoxisch ist und die Zellen absterben würden.

Durchführung:

1) Trypsinisieren:

Das Nährmedium wurde aus der Kulturflasche entfernt und das restliche Medium ausgewaschen indem etwas Trypsin/EDTA Gemisch hinzu pipettiert wurde, welches nach kurzem Schwenken sofort wieder abgesaugt wurde. Dann wurde abermals Trypsin zugesetzt (700 µl für 25cm² Kulturflaschen; 2 ml für 75cm² Kulturflaschen) und je nach Zelllinie 2 bis 10 min lang inkubiert bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Hierzu wurde das Kulturgefäß alle 1 bis 2 min aus dem Inkubator genommen und unter dem Mikroskop kontrolliert. Dann wurde die Trypsinwirkung gestoppt, indem 2 bis 4 ml Nährmedium hinzu pipettiert wurden.

2) Splitten:

Von der so erhaltenen Zellsuspension wurde ein Teil in ein frisches Kulturgefäß überführt und dieses mit frischem Medium auf 5 bzw. 10 ml aufgefüllt. Dieser Vorgang nennt sich Splitten. Die so erhaltene neue Passage wurde im Inkubator weiterkultiviert. Die nicht mehr benötigte Zellsuspension wurde abgesaugt und die alte Kulturflasche verworfen.

3.3.5 Bestimmung der Zellzahl:

Das Ansetzen der Zellen in Mikrotiterplatten erfordert die Kenntnis der Zellzahl pro ml Zellsuspension.

Durchführung:

Die durch Trypsinisieren erhaltene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert um durch anschließendes Absaugen des Überstandes das Trypsin zu entfernen. Zu dem so erhaltenen Zellpellet wurden etwa 5 ml Medium hinzu pipettiert und mittels vortexen die Zellen gleichmäßig suspendiert.

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden nun 10 μ l der Suspension entnommen, mit 10 μ l Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4%; Sigma®) vermischt und davon 10 μ l unter das Deckblatt einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zugabe von Trypanblau dient dazu tote Zellen blau anzufärben. Das Zählen erfolgte unter dem Mikroskop:

Man sieht ein Netz aus vier großen Quadraten, welche jeweils, um die Auszählung zu erleichtern, nochmal in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Lebende Zellen sind als helle Punkte auf dunklem Grund sichtbar. Blaue Zellen wurden nicht mitgezählt.

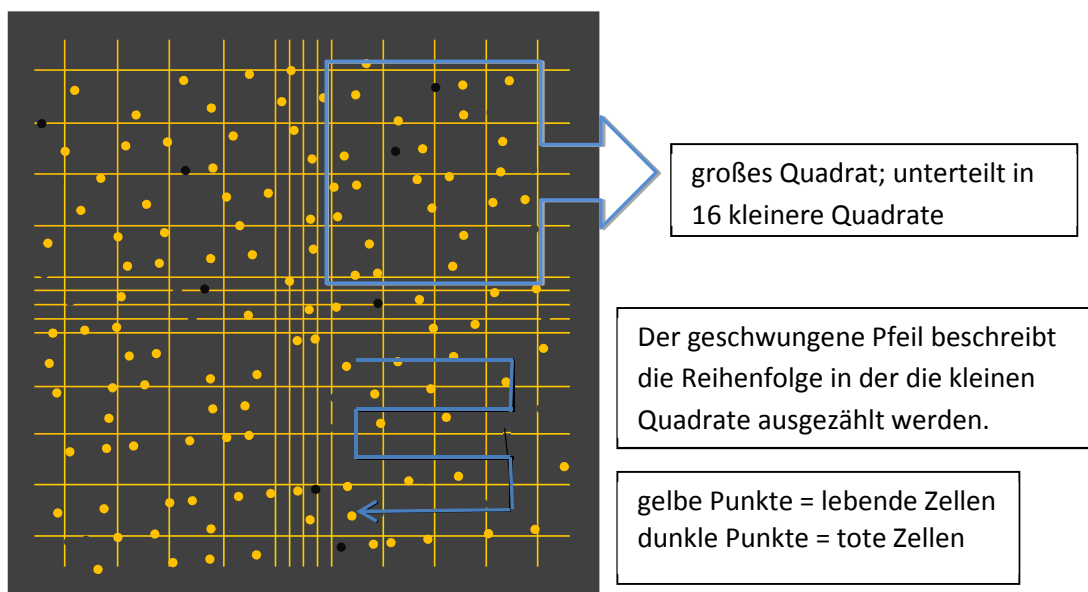


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Zählkammer

Um Zellen, die sich genau auf einer Randlinie eines Quadrats befinden nicht doppelt zu zählen, wurden pro Feld immer nur die Punkte auf der linken und oberen Randlinie beachtet. Jedes der vier großen Quadrate wurde separat ausgezählt, die jeweilige Anzahl der Zellen notiert und dann aus den vier Werten der Mittelwert berechnet. Da die Zellsuspension vorher 1:1 mit Trypanblau verdünnt wurde, wurde der Mittelwert mit dem Faktor 2 multipliziert. Das erhaltene Produkt wurde wiederum mit 10^4 multipliziert. Das Ergebnis beschreibt die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension.

Beispiel:

	Zellzahl:	Mittelwert:	Verdünnungsfaktor:	Ergebnis:
1. Quadrat	90	85	x2	170×10^4 Zellen/ ml
2. Quadrat	88			
3. Quadrat	80			
4. Quadrat	82			

Tabelle 2: Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension

3.4 EZ4U-Zytotoxizitätstest:

Testprinzip:

Lebende Zellen besitzen die Fähigkeit Tetrazoliumsalze zu rot gefärbten Formazanderivaten zu reduzieren. Über die Intensität der Färbung lässt sich daher der Anteil lebender bzw. toter Zellen feststellen [Beipacktext EZ4U „Easy for you“-nonradioactive cell proliferation and cytotoxicity assay; Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG].

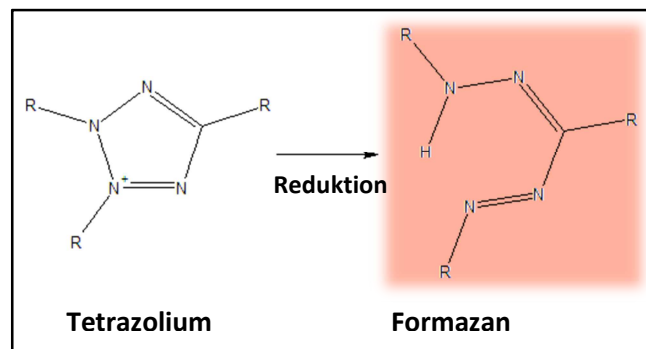


Abbildung 6: Umsetzung: Tetrazolium → Formazan

Durchführung:

Ansetzen der Zellen auf 96-Wellplatten:

Nach Ermittlung der Zellzahl, wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration verdünnt [Tabelle 3] und in jedes Well jeweils 100 µl der eingestellten Suspension pipettiert. Der Rand der Platte wurde nur mit reinem Medium befüllt um zu gewährleisten, dass sämtliche Zellen unter den selben Bedingungen kultiviert werden. Die Platten wurden nun einen Tag lang inkubiert, bis sich die Zellen auf dem Boden abgesetzt haben.

		Zelllinien		
		KB-3-1 A549 CACO2 HCT116	FHs74Int	HEK NH-S
Inkubationszeit (h)	4, 8, 16	5x10 ⁴ Zellen/ml	5x10 ⁴ Zellen/ml	1x10 ⁵ Zellen/ml
	24, 48, 72	2x10 ⁴ Zellen/ml	5x10 ⁴ Zellen/ml	5x10 ⁴ Zellen/ml

Tabelle 3: verwendete Zellzahl/ml in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der jeweiligen Zelllinie

Zugabe der Testsubstanz:

Das Toxin wurde mit Medium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. (Dabei wurde die 1:1 Verdünnung in der Platte berücksichtigt und deshalb das Toxin stets doppelt so hoch konzentriert.) Es wurden jeweils drei Wells mit der selben Toxinkonzentration befüllt. Pro Well wurden 100 µl zugesetzt. In die erste Wellreihe wurde nur reines Medium pipettiert um einen Kontrollwert zu erhalten. Die Platten wurden dann inkubiert und nach der gewünschten Inkubationszeit ausgewertet.

Auswertung mittels EZ4U-Testkit:

Das EZ4U-Substrat wurde zunächst in 2,5 ml Aktivator gelöst und dann 1:10 mit Nährmedium verdünnt. Das Medium in den Platten wurde abgesaugt und pro Well je 100 µl dieser Mischung zugesetzt. Um einen Leerwert zu erhalten, wurde dies auch mit drei Rand-



Abbildung 7: EZ4U-Zytotoxizitätstest

Wells, in welchen sich keine Zellen befinden, durchgeführt. Die Platten wurden nun für 1,5 bis 3 Stunden inkubiert. Sobald sich die Kontrolle ziegelrot gefärbt hatte, wurden die Platten mittels Photometer ausgewertet. Es wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 450 nm (mit 620 nm als Referenzwellenlänge) gemessen.

Berechnung:

Aus den drei jeweils zusammengehörigen Wells wurden die Mittelwerte berechnet. Von diesen wurde dann der Leerwert abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden in Prozent umgerechnet, wobei die Kontrolle als Grundwert (= 100%) galt. Das Ergebnis beschreibt wie viel Prozent der Zellen überleben. Die Berechnungen und das Erstellen der Graphiken erfolgten mittels Excel bzw. Sigma Plot.

3.5 Auswaschversuche:

Testprinzip:

Die Versuche sollen zeigen ob sich Zellen, die für einen kurzen Zeitraum mit dem Gift in Kontakt waren, und anschließend in reinem Medium weiterkultiviert wurden, wieder von der Giftwirkung erholen können.

Durchführung:

Das Ansetzen der Zellen und die Zugabe des Toxins erfolgten wie beim EZ4U-Zytotoxizitätstest. Nach bestimmter Inkubationszeit wurde die Testsubstanz allerdings abgesaugt und die Wells mit Nährmedium gespült. Dann wurden die Zellen mit reinem Nährmedium weiter inkubiert. Die Zytotoxizität wurde 24 h nach dem 1. Toxinkontakt mittels EZ4U- Testkit ermittelt.

3.6 Annexin V-FITC/ PI Färbung:

Testprinzip:

Unter physiologischen Bedingungen ist Phosphatidylserin nur auf der inneren Seite der Zellmembran anzufinden. Während der Apoptose wechselt Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite um den umliegenden Zellen zu signalisieren die tote Zelle zu phagozytieren. Annexin V, an welches ein Fluorochrom konjugiert ist, bindet exponiertes Phosphatidylserin in Gegenwart von millimolaren Konzentrationen 2-wertiger Kationen. Die Zellen binden Annexin V noch bevor die Membran durchlässig für Propidiumjodid (PI) wird. PI dient als Marker für die Membrandurchlässigkeit. Da PI nach langer Inkubationszeit auch in intakte Zellen eindringen kann, sollte die Analyse schon kurz nach der PI-Zugabe durchgeführt werden. Die Mischung dieser beiden Farbstoffe ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Detektion erfolgt mittels FACS-Durchflusszytometrie.

- Lebende Zellen zeigen nur minimale Annexin V- und PI-Fluoreszenz.
- Im frühen Apoptosestadium zeigen die Zellen starke Annexin V-Fluoreszenz, aber keine PI-Färbung, da die Membran noch soweit intakt ist um PI auszuschließen.

- Im späteren Apoptosestadium (sekundäre Nekrose) werden die Zellen von beiden Farbstoffen intensiv gefärbt. Auch primär nekrotische Zellen zeigen beide Färbungen, da Annexin V über die zerstörte Plasmamembran ins Innere der Zelle gelangt und Phosphatidylserin an der Innenseite der Membran bindet [Darzynkiewics et al., 2011].

Durchführung:

Die Zellen wurden in einer 6-Wellplatte angesetzt und über Nacht inkubiert bis sie am Boden adhärent waren. Dabei wurden pro Well 2 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen / ml verwendet. Am nächsten Tag wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Wells mit verschiedenen konzentrierten KRS-6-Lösungen befüllt, wobei in jedes Well wiederum 2 ml pipettiert wurden. Das erste Well wurde, um einen Kontrollwert zu erhalten, nur mit reinem Medium befüllt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mittels Trypsinisieren in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1200 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit je 100 µl Annexin V Binding Buffer (ABB) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann in FACS-Röhrchen, in welche zuvor je 2 µl Annexin V-FITC und 2 µl PI (50 µg/ml) pipettiert wurden, überführt. Hierbei wurde auf ausreichend Lichtschutz geachtet, da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind. Dann wurden die Röhrchen 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, in jedes noch einmal 200 µl ABB hinzu pipettiert, kurz gemischt und sofort mittels FACS-Durchflusszytometer (Becton Dickinson) vermessen. Die Auswertung und Erstellung der Histogramme erfolgte mittels FACSCComp™-Software.

3.7 Zellzyklusanalyse:

Testprinzip:

Die Durchflusszytometrie mittels FACS (fluorescence activated cell sorter) ermöglicht die Ermittlung des DNA-Gehalts einzelner Zellen und so die Zuordnung zu den einzelnen Phasen im Zellzyklus. Als Fluorochrom für die DNA dient Propidiumjodid. Dieses interkaliert jedoch auch mit RNA weshalb vor der Anfärbung mit Propidiumjodid RNase zugesetzt wird [Darzynkiewics und Pozarowski, 2004].

In der G_0 -Phase und G_1 -Phase beträgt der DNA-Gehalt $2n$. Diese Phasen sind somit nicht unterscheidbar und werden gemeinsam als G_0 - G_1 -Phase detektiert. In der S-Phase beginnt die Replikation der DNA, der Gehalt liegt somit zwischen $2n$ und $4n$. In der G_2 - und der M-Phase liegt der Gehalt konstant bei $4n$ [Training-Handbuch Durchflusszytometrie, Becton Dickinson].

Apoptotische Zellen enthalten DNA-Bruchstücke oder verlieren DNA-Teile als „apoptotic bodies“ ans umgebende Medium. Diese Bruchstücke liefern im Histogramm den „sub- G_1 “ peak [Darzynkiewics und Pozarowski, 2004].

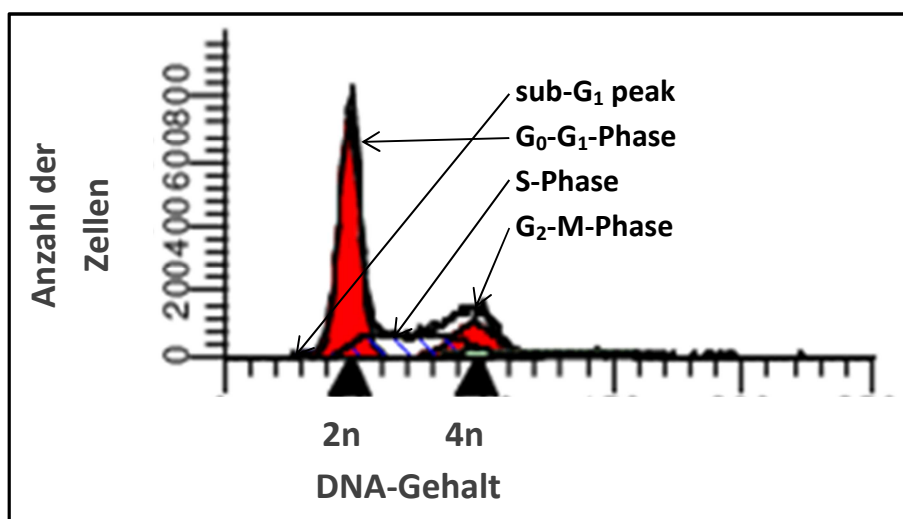


Abbildung 8: Schema eines DNA-Histogramms

Durchführung:

Ansetzen der Zellen in 6-Wellplatten:

Die Zellen wurden in 6-Wellplatten angesetzt, wobei jedes Well mit 2 ml Zellsuspension ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ ml) befüllt wurde. Die Platten wurden einen Tag lang inkubiert bis sich die Zellen auf den Boden abgesetzt hatten.

Zugabe der Testsubstanz:

Dann wurde das Medium abgesaugt und in jedes Well 2 ml einer bestimmten Toxinverdünnung pipettiert. Das erste Well diente als Kontrolle und wurde daher nur mit reinem Medium befüllt.

Trypsinisieren:

Nach gewünschter Inkubationsdauer wurden die Toxinverdünnungen der einzelnen Wells in je ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Wells wurden mit je 500 µl Trypsin gespült, welches danach ins jeweilige Röhrchen pipettiert wurde. Dann wurden abermals 500 µl Trypsin zugesetzt und die Platten solange inkubiert bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Die Trypsinwirkung wurde gestoppt indem das Trypsin mit den darin schwimmenden Zellen in das jeweilige Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Dann wurde mit etwas Inhalt der Röhrchen jedes Well noch einmal gespült und die Flüssigkeit zurück in die Röhrchen pipettiert.

Ziel war es aus jedem Well alle Zellen zu erhalten, die lebenden sowie die abgestorbenen, da man schlussendlich erfahren wollte wie viel Prozent der Zellen sich in welcher Zyklusphase befanden oder wieviele bereits tot waren.

Waschen:

Dann wurden die sechs Röhrchen 8 min mit 1200 U/min zentrifugiert und das so entstandene Zellpellet gewaschen, indem man den Überstand absaugte und je 3 ml FACS-PBS hinzu pipettierte. Die Röhrchen wurden gevortext und abermals 8 min mit 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend wieder abgesaugt und zu jedem Pellet 100 µl 0,9% NaCl-Lösung hinzu pipettiert.

FACS PBS:

11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	} gelöst in 1 l H_2O
2 g KH_2PO_4	
2 g KCl	
80 g NaCl	

Einfrieren:

Am Vortag wurden sechs Eppendorf-Gefäße (2ml Füllmenge) mit je 1,8 ml 70% EtOH vorbereitet und bei -20° C eingefroren.

Die Röhrchen, welche die Zellen in der 0,9% NaCl-Lösung enthalten, wurden nun gevortext und die Zellsuspensionen langsam in die vorbereiteten EtOH-Behältnisse getropft. Die Eppendorf-Gefäße wurden nun bei -20°C für einige Tage eingefroren.

Anfärbung mit Propidiumjodid:

Die Röhrchen wurden 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert und die Zellpellets mit je 0,5 ml FACS PBS resuspendiert. Anschließend wurden je 2 µl RNase (10 µg/ ml) hinzu pipettiert und die Röhrchen 30 min bei 37° C inkubiert. Dann wurden je 5 µl PI (1mg/ ml PBS) hinzugefügt und für 30 min bei 4° C gelagert.

Messung:

Die so angefärbten Zellsuspensionen wurden in FACS- Röhrchen überführt und mittels FACS-Durchflusszytometer (Becton Dickinson) die Fluoreszenz gemessen. Die Auswertung und Erstellung der Histogramme erfolgte mittels FACSComp™-Software.

3.8 Fluorescence-Imaging:

Testprinzip:

Mittels Fluorescence-Imaging wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration gemessen. Als Fluorescence-Farbstoff dient Fura 2-AM (Sigma®). An Fura 2 sind zwei Acetoxymethylgruppen gebunden, welche die Passage durch die Zellmembran ermöglichen. In der Zelle werden diese Gruppen enzymatisch abgespalten, woraufhin der Farbstoff polar wird und im Zellinneren gefangen bleibt. Die Fluorescence-Anregung erfolgt bei 340 nm bzw. 380 nm. Das Emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 500 nm.

Bindet Calcium an Fura 2 wird dessen Fluorescence-Emission verändert. Ist die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht, bindet mehr Calcium an den Farbstoff. Dadurch sinkt die durch Anregung bei 380 nm entstehende Emissionsintensität, wohingegen die Emissionsintensität durch Anregung bei 340 nm steigt. Diese beiden Emissionsintensitäten werden zueinander ins Verhältnis gesetzt und so die sogenannte Ratio berechnet. Ein Anstieg der Ratio bedeutet, dass die intrazelluläre Calcium-Konzentration gestiegen ist [Haugland, Handbook of fluorescent probes and research chemicals].

$$R = \frac{\text{Emissionsintensität (340 nm)}}{\text{Emissionsintensität (380 nm)}} \quad \text{Ca}^{2+}_i \uparrow \rightarrow R \uparrow$$

Durchführung:

Die Zellsuspension wurde in kleine Petrischalen, in welchen sich jeweils ein Deckglas befand, überführt und über Nacht inkubiert damit sich die Zellen an das Deckglas anhaften konnten. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Tyrode-Lösung gewaschen und Fura 2-AM mit einer Konzentration von 10 μM zugesetzt, sowie Pluronic für die Dispersion des lipophilen Farbstoffs. Nach 90 min Einwirkzeit wurden die Zellen abermals mit Tyrode-Lösung gewaschen und für weitere 30 min stehen gelassen. Dann wurde das Deckglas mit den sich darauf befindenden Zellen ins Mikroskop eingespannt. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm. Das Emissionslicht wurde von einer Kamera aufgenommen und am Computer mit dem Programm Axon Imaging Workbench 2.2 in ein Bild umgewandelt. Nach Aufnahmebeginn wurde die Testsubstanz in kontinuierlich steigenden Konzentrationen zugesetzt und alle zehn Sekunden ein neues Bild der Zellen aufgenommen um festzustellen wie sich die Fluoreszenz durch KR6-S-Zugabe verändert.

4 Resultate und Diskussion:

4.1 Ergebnisse der EZ4U-Zytotoxizitätstests:

Die Zellen wurden verschiedenen KR6-S-Konzentrationen ausgesetzt und nach bestimmten Inkubationszeiten der Prozentsatz der Überlebenden detektiert.

Es konnte eine zytotoxische Wirkung auf alle getesteten Zelllinien festgestellt werden.

4.1.1 Zytotoxizität auf KB-3-1 Zellen:

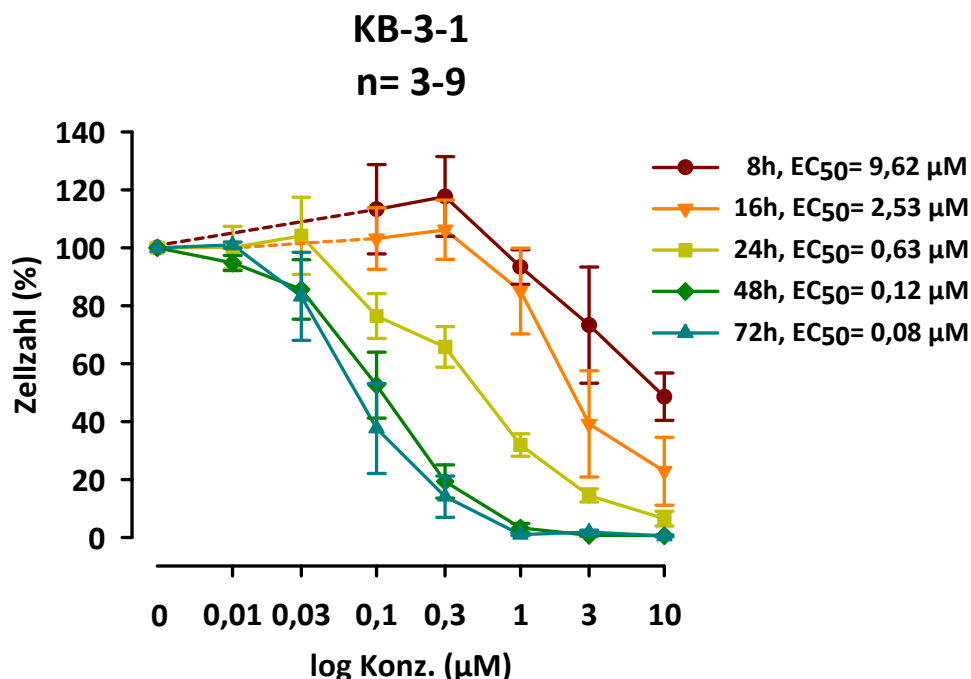


Abbildung 9: Zytotoxizität auf KB-3-1 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Bei der Cervixkarzinom-Zelllinie KB-3-1 wurde ersichtlich, dass die Zytotoxizität stark abhängig von der Expositionsdauer ist. Eine Konzentration von beispielsweise 0,3 µM KR6-S regt die Zellen zuerst zur Proliferation an (nach 8- bzw. 16-stündiger Inkubation stieg die Zellzahl auf mehr als 100% an). Nach längerer Einwirkdauer sterben die Zellen allerdings ab (nach 24 Stunden leben noch 70 %, nach 48 bzw. 72 Stunden leben nur mehr 20 %). Bei der höchsten getesteten Konzentration (10 µM KR6-S) werden nach 8 Stunden 50 Prozent getötet, nach 16 Stunden 70 %, nach 24 Stunden 90 % und nach 48 bzw. 72 Stunden geht die Überlebensrate gegen null Prozent. Alle Zellen werden durch KR6-S bei einer Konzentration von 1µM abgetötet, bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Dosis-Wirkungskurven

von 48 und 72 Stunden unterscheiden sich nur minimal voneinander, also ist der größte Effekt bereits nach 48 Stunden zu erwarten.

4.1.2 Zytotoxizität auf A549 Zellen:

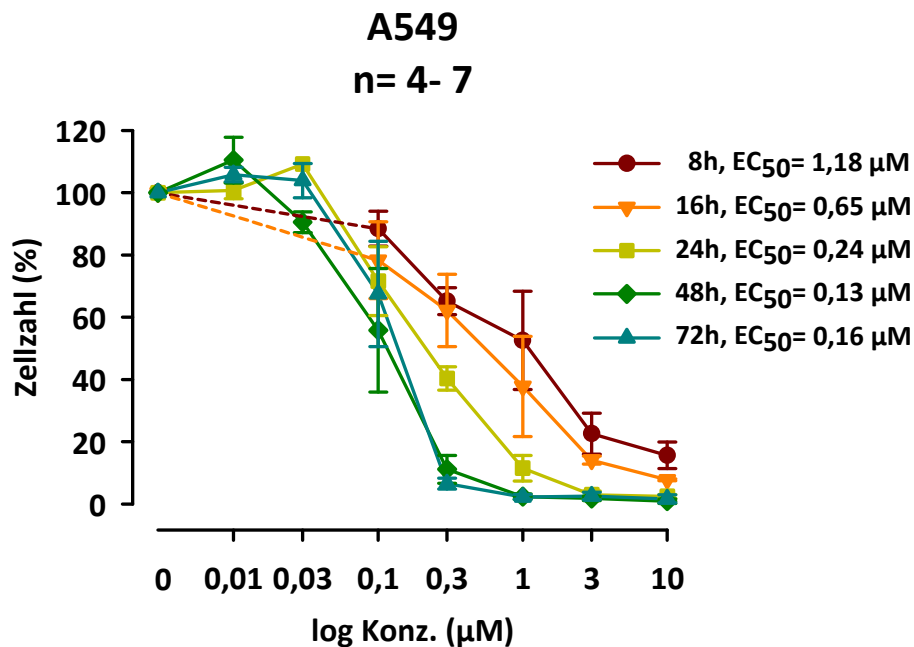


Abbildung 10: Zytotoxizität auf A549 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Bei der Lungenkrebs-Zelllinie A549 sieht man schon nach 8-stündiger Exposition eine beträchtliche zytotoxische Wirkung. Bei einer Konzentration von 0,1 µM sterben 10 %, bei 1 µM sterben beinahe 50 % und bei der höchsten Konzentration von 10 µM sterben sogar 80 %. Im Bereich der niedrig zugesetzten Konzentrationen von 0,01 bis 0,03 mM lässt sich eine schwach proliferative Wirkung erkennen. Alle Zellen werden durch KR6-S bereits bei einer Konzentration von 1 µM abgetötet, bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden, oder nach 24 Stunden mit einer Konzentration von 3 µM. Die Dosis-Wirkungskurven von 48 und 72 Stunden unterscheiden sich auch hier nur minimal voneinander, weshalb auch hier der größte Effekt bereits nach 48 Stunden zu erwarten ist.

4.1.3 Zytotoxizität auf CACO2 Zellen:

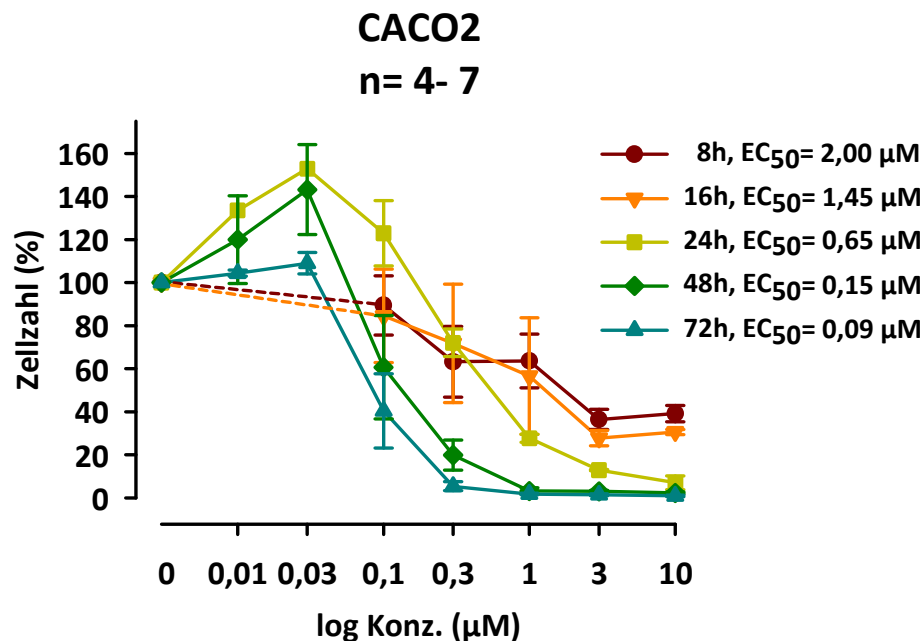


Abbildung 11: Zytotoxizität auf CACO2-Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Die Coloncarzinom-Zelllinie CACO2 reagiert auf KR6-S in kleineren Konzentrationen stark proliferierend. Nach 24-stündiger Inkubation mit 0,03 µM KR6-S steigt die Anzahl der lebenden Zellen auf 150 %, nach 48 Stunden auf 140 % und auch nach 72 Stunden liegt die Zahl der Überlebenden auch noch knapp über 100 %. Erst ab 0,1 µM lässt sich eine zeitabhängige zytotoxische Wirkung erkennen. Während nach 24 Stunden die Zellen immer noch proliferieren (Zunahme auf 125 %), beginnen sie nach 48-stündiger Exposition zu sterben (Überlebende 60 %). Alle Zellen werden durch KR6-S bereits bei einer Konzentration von 1µM abgetötet, bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden, oder nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 10 µM.

4.1.4 Zytotoxizität auf HCT 116 Zellen:

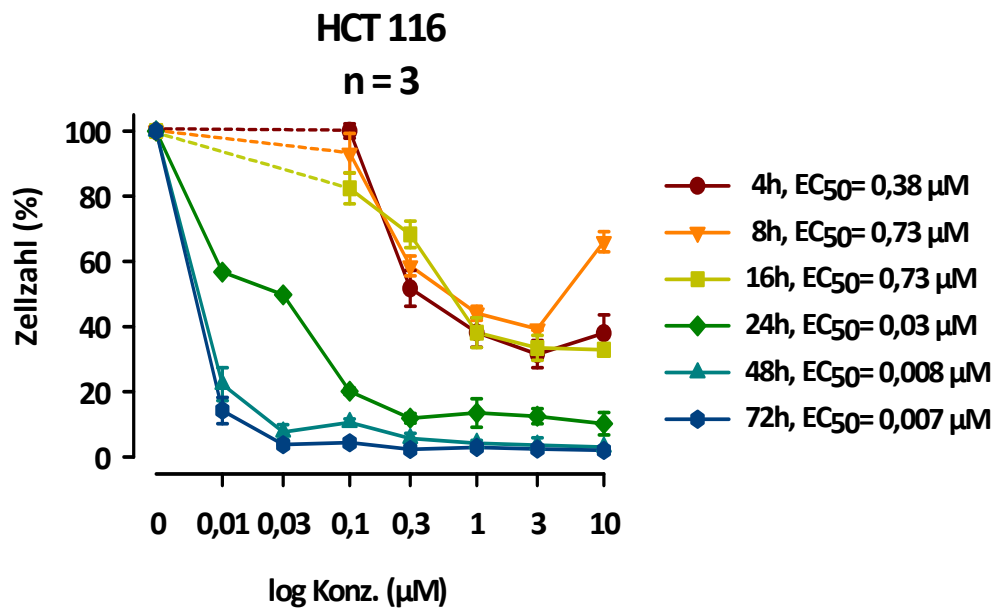


Abbildung 12: Zytotoxizität auf HCT 116 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Die Coloncarzinom-Zelllinie HCT 116 zeigt bereits zytotoxische Wirkung im Bereich der kleinsten getesteten KR6-S Konzentration. Bei 0,01 µM überleben nach 24 Stunden nur mehr knapp 60 Prozent, nach 48 bzw. 72 Stunden nur noch 20 Prozent. Die Überlebensrate geht bereits nach 48-stündiger Exposition bei einer Konzentration von 0,03 µM KR6-S gegen null. Die Dosis-Wirkungskurven von 48 und 72 Stunden unterscheiden sich auch hier nur minimal voneinander, weshalb auch hier der größte Effekt bereits nach 48 Stunden zu erwarten ist. Paradoxerweise wird beispielsweise nach 8-stündiger Inkubation ersichtlich, dass bei 3 µM KR6-S mehr Zellen sterben (50 %) als bei der höheren Konzentration von 10 µM (Überlebensrate 75 %). Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass hohe Toxinkonzentrationen die Zellen zu einer gesteigerten stressinduzierten Proliferation anregen. Daher ist es wichtig die Substanz ausreichend lange einwirken zu lassen um die Zellen abzutöten, da man sonst möglicherweise den gegenteiligen Effekt erzielt.

Um zu sehen ob die Zellzyklus- und Apotoseregulatoren p53, p21 und Bax eine Rolle in der zytotoxischen Wirkung von KR6-S spielen, wurden auch die HCT-Tochterzelllinien, bei welchen jeweils eines dieser Gene deletiert wurde, dem EZ4U-Zytotoxizitätstest unterzogen.

4.1.5 Zytotoxizität auf HCT 116 p53/ko Zellen:

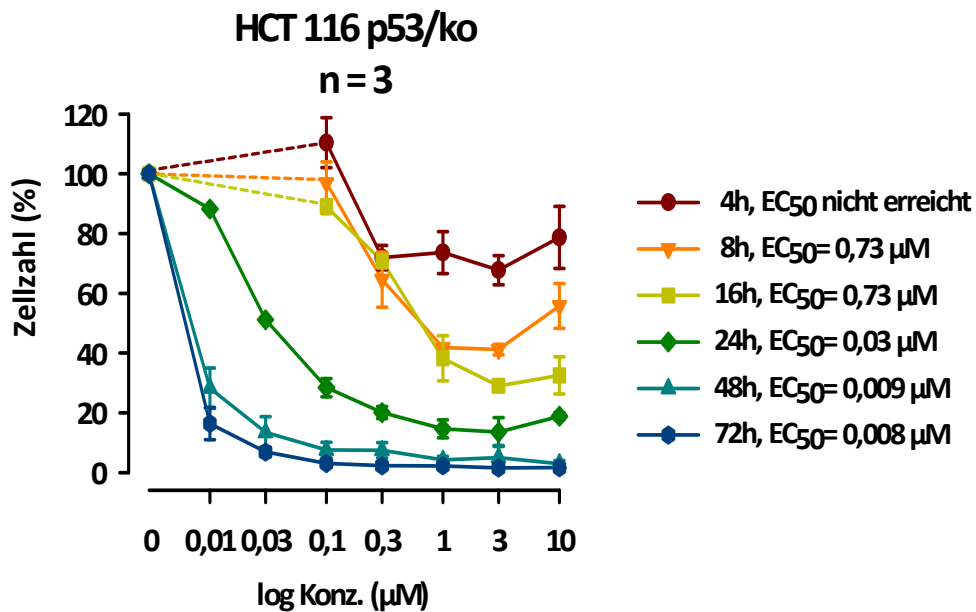


Abbildung 13: Zytotoxizität auf HCT 116 p53/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

4.1.6 Zytotoxizität auf HCT 116 p21/ko Zellen:

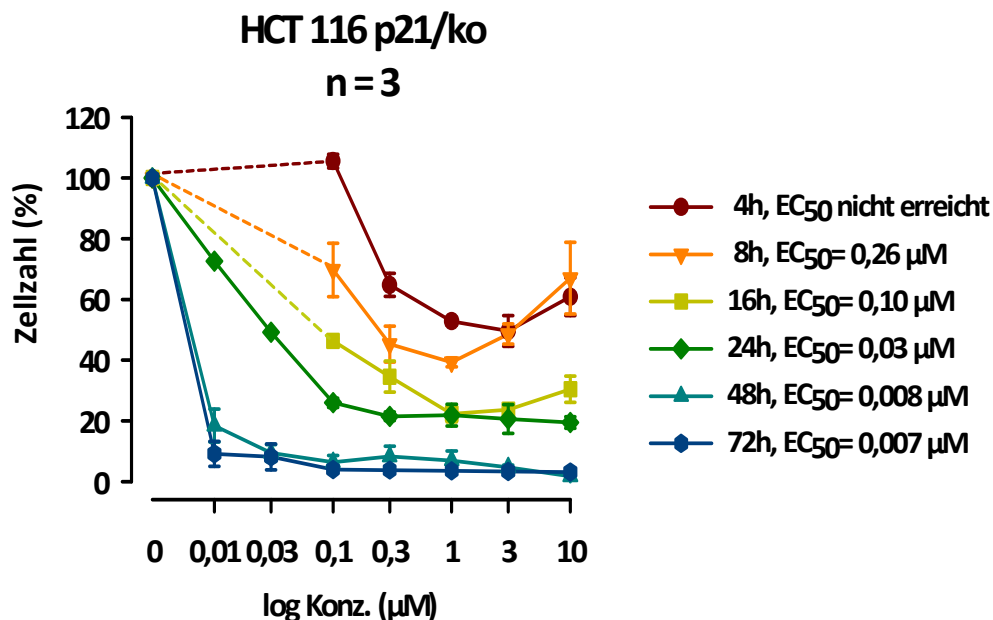


Abbildung 14: Zytotoxizität auf HCT 116 p21/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

4.1.7 Zytotoxizität auf HCT 116 bax/ko Zellen:

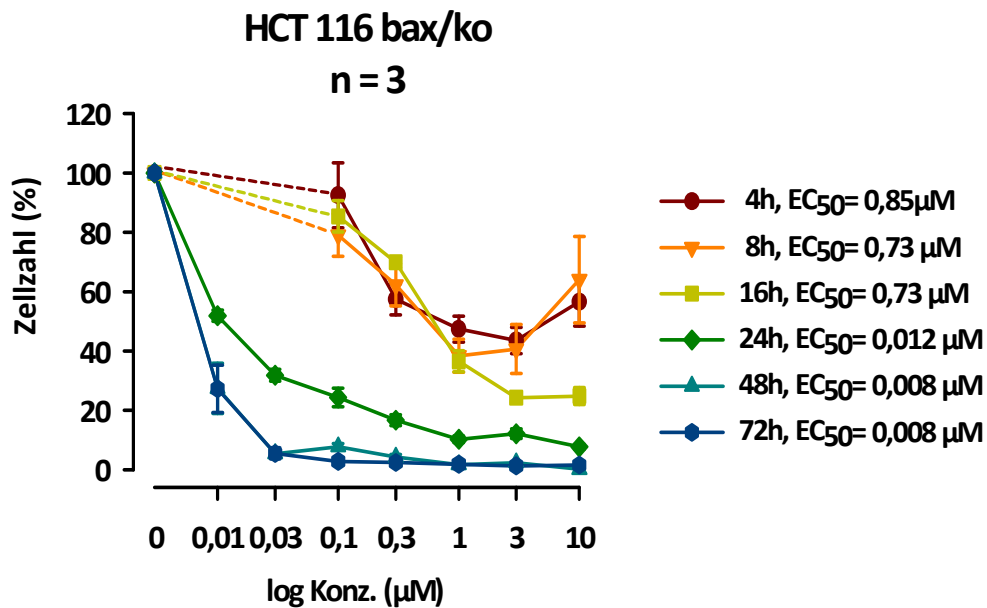


Abbildung 15: Zytotoxizität auf HCT 116 bax/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

4.1.8 Vergleich der Zytotoxizität zwischen der HCT 116 Mutterzelllinie und den zugehörigen Subzelllinien:

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Dosiswirkungskurven der einzelnen HCT 116-Zelllinien jeweils für dieselbe Inkubationsdauer übereinandergelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklus- bzw. Apoptoseregulatoren p53 und p21 bei kürzeren Expositionsauern eine Rolle in der Zytotoxizität von KR6-S spielen. Bei längerer KR6-S-Exposition werden allerdings alle Zelllinien, unabhängig welches ihrer Gene deletiert wurde, im gleichen Ausmaß von KR6-S gehemmt. Für Bax konnte allgemein keine signifikante Wirkung gezeigt werden.

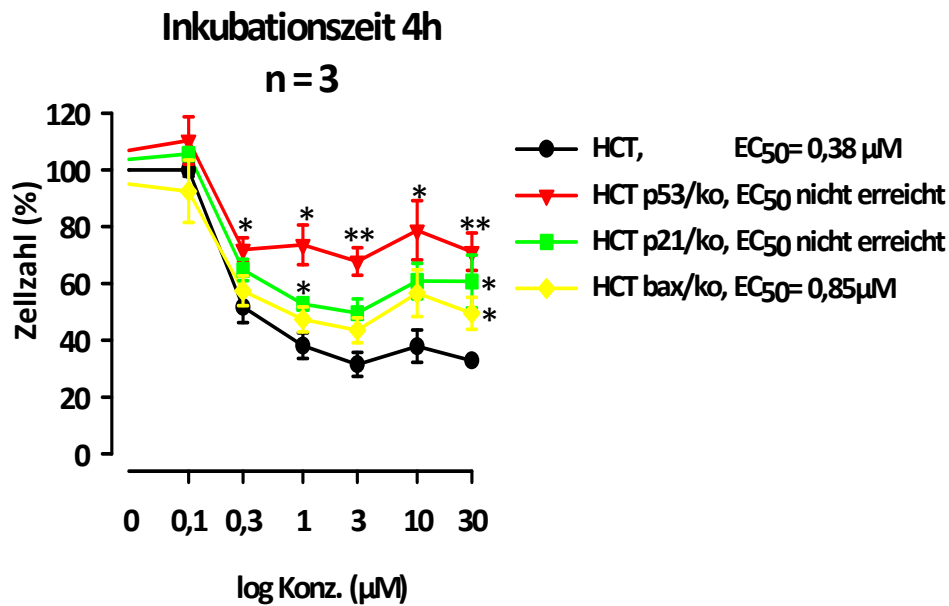


Abbildung 16: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 4-stündiger KR6-S-Exposition.

Es wurde berechnet ob zwischen der Mutterzelllinie und den Subzelllinien statistisch signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit auf KR6-S bestehen, wobei immer Bezug zur Mutterzelllinie genommen wurde. Zeichenerklärung: *...signifikant ($p < 0,05$)

**...signifikant ($p < 0.01$)

***...hoch signifikant ($p < 0.001$)

Nach 4-stündiger Inkubationszeit besteht ein Unterschied in der Empfindlichkeit der HCT 116-Zelllinien auf KR6-S. Das Wachstum der Mutterzelllinie wird am stärksten gehemmt. Besonders die Zelllinie ohne p53 Gen zeigt signifikant weniger Empfindlichkeit auf die zytotoxische KR6-S Wirkung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass p53 in Stresssituationen die Apoptose fördert. Ist dieses Gen, wie bei dieser Zelllinie, nicht vorhanden, wird die Zelle nicht so schnell in die Apoptose geschickt.

Da bei kurzen Inkubationszeiten die überlebende Zellzahl bei 10 μM größer war, als bei 3 μM, wurde die KR6-S Konzentration weiter auf 30 μM erhöht, um zu sehen ob die Teilungsrate der Zellen bei so hohen Konzentrationen weiterhin zunimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die proliferierende Wirkung bei 30 μM im Vergleich zu 10 μM wieder abnimmt und eine Tendenz zu stärkerer Zytotoxizität besteht.

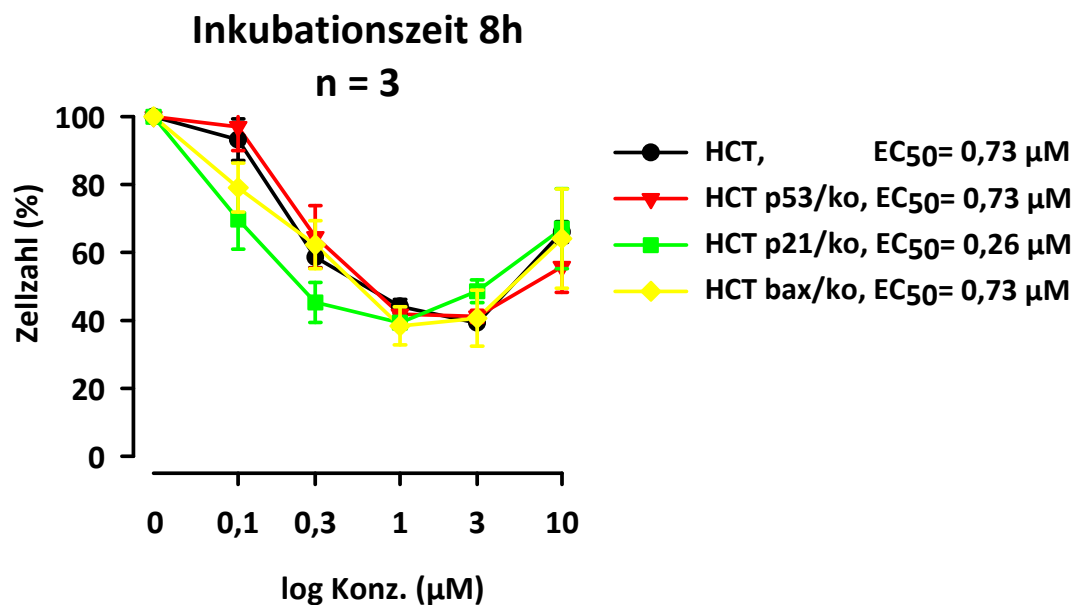


Abbildung 17: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 8-stündiger KR6-S-Exposition.

Nach 8 Stunden sehen die Dosiswirkungskurven der vier HCT 116-Zelllinien beinahe identisch aus. Die Zelllinie ohne p21 Gen zeigt bei den niedrigeren KR6-S-Konzentrationen tendentiell stärkere, aber statistisch nicht signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber KR6-S.

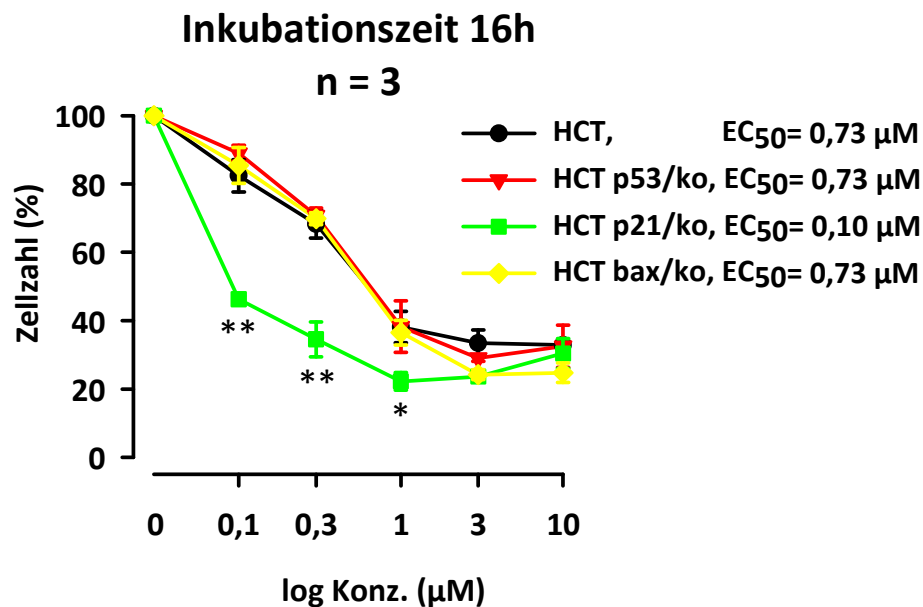


Abbildung 18: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 16-stündiger KR6-S-Exposition.

Es wurde berechnet ob zwischen der Mutterzelllinie und den Subzelllinien statistisch signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit auf KR6-S bestehen, wobei immer Bezug zur Mutterzelllinie genommen wurde.

Zeichenerklärung: *...statistisch signifikant ($p < 0,05$)

**... statistisch signifikant ($p < 0,01$)

***... statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$)

Nach 16-stündiger Expositionsdauer lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Empfindlichkeit der einzelnen HCT 116 Zelllinien feststellen. Während die Zelllinien ohne p53 und ohne Bax Gen gleich empfindlich wie die Mutterzelllinie reagieren, zeigt sich bei der Zelllinie ohne p21 Gen eine signifikant höhere zytotoxische Wirkung. Diese stärkere Zytotoxizität auf p21/ko-Zellen ist logisch nachvollziehbar, da p21 die Zelle vor Apoptose schützt und dieser Schutz bei p21/ko-Zellen eben nicht gegeben ist.

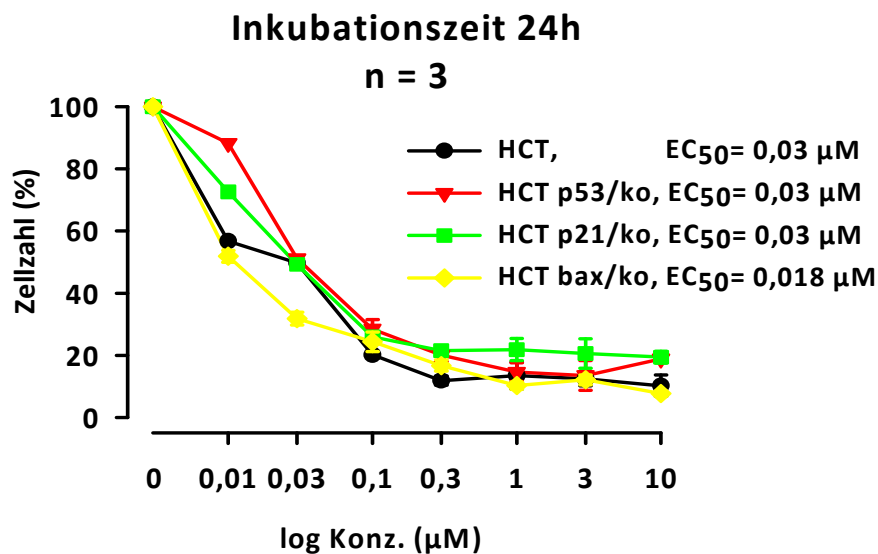


Abbildung 19: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 24- stündiger KR6-S-Exposition.

Nach 24-stündiger Expositionsdauer nähern sich die Kurven der verschiedenen HCT 116-Zelllinien weiter aneinander an. Die p21/ko-Zellen werden nicht mehr stärker gehemmt als die anderen. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr in der Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien.

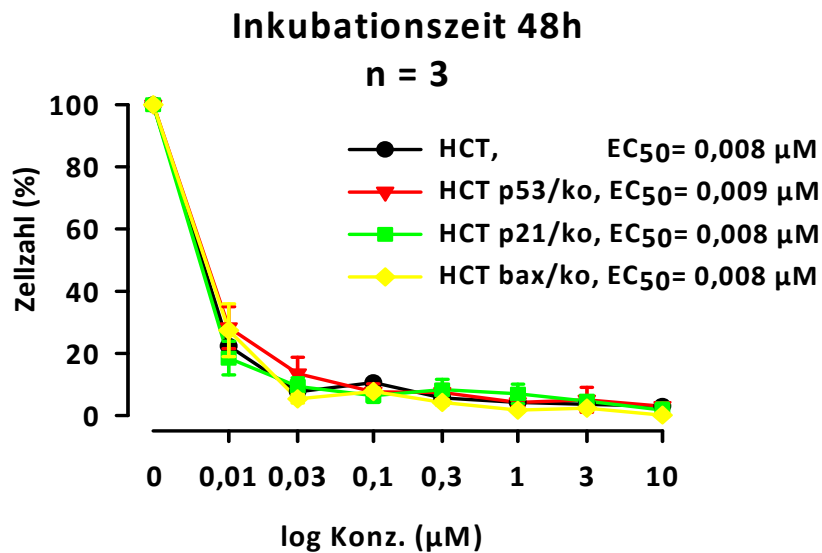


Abbildung 20: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 48-stündiger KR6-S-Exposition.

Die Dosiswirkungskurven der einzelnen Zelllinien sind nach 48-stündiger Inkubation beinahe identisch, was bedeutet, dass nach langer Inkubationszeit die Apoptoseregulatoren p53, p21 und Bax keinen Einfluss mehr auf die Zytotoxizität von KR6-S haben.

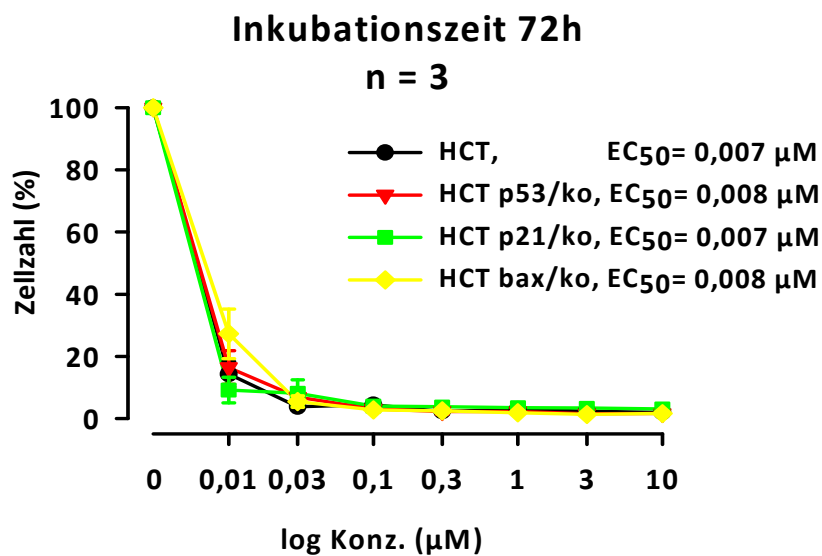


Abbildung 21: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 72-stündiger KR6-S-Exposition.

Die Dosiswirkungskurven nach 72-stündiger Inkubation sind beinahe identisch mit jenen von 48 Stunden. Somit wird bereits nach 48 Stunden der maximal zytostoxische Effekt erreicht.

4.1.9 Zytotoxizität auf HEK Zellen:

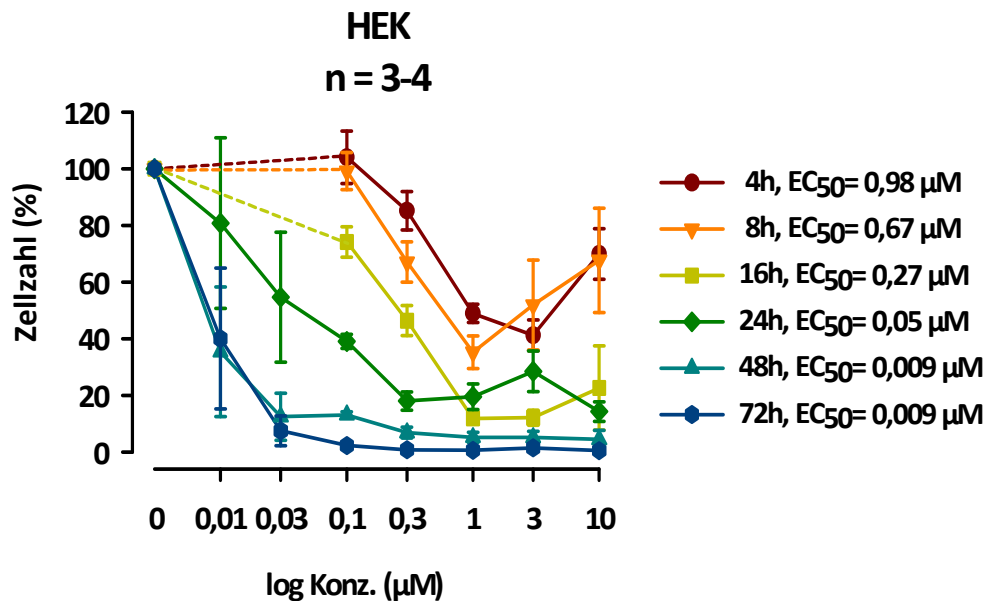


Abbildung 22: Zytotoxizität auf HEK-Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Bei der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK, sieht man schon im Bereich der kleinsten Konzentrationen (0,01 bzw. 0,03 µM) eine beträchtliche zytotoxische Wirkung. Nach 48-stündiger KR6-S Exposition sterben bei einer Konzentration von 0,03 µM schon 90 Prozent der Zellen ab. Die Inkubationsdauer spielt aber auch hier eine große Rolle, da nach 8 Stunden auch mit der größten Konzentration (10 µM) nur 25 Prozent der Zellen getötet werden. Am effektivsten war die Zytotoxizität nach 8 Stunden allerdings bei 1 µM wodurch 60 Prozent abgetötet wurden. Auch hier wird also wahrscheinlich durch sehr hohe Konzentrationen zuerst die Proliferation angeregt, bevor es nach längerer Expositionsdauer zum Absterben kommt.

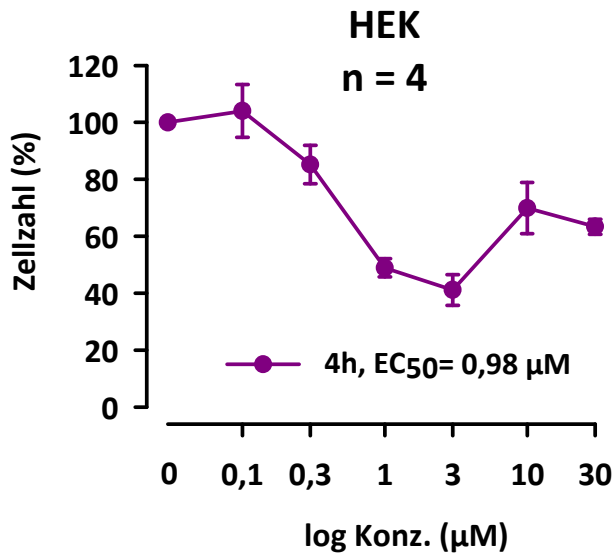


Abbildung 23: Zytotoxizität auf HEK-Zellen nach 4-stündiger KR6-S-Exposition

Bei kurzer KR6-S-Exposition (4h, 8h) sinkt die Zytotoxizität ab einer Konzentration von 3 μM, obwohl die KR6-S-Konzentration weiter auf 10 μM erhöht wurde. Deshalb wurde die Toxinkonzentration weiter erhöht um zu testen ob die Zytotoxizität bei steigender Konzentration noch weiter abnimmt. Das Ergebnis zeigt, dass bei 30 μM die Zytotoxizität im Vergleich zu 10 μM wieder zunimmt.

4.1.10 Zytotoxizität auf Makrophagen (MH-S):

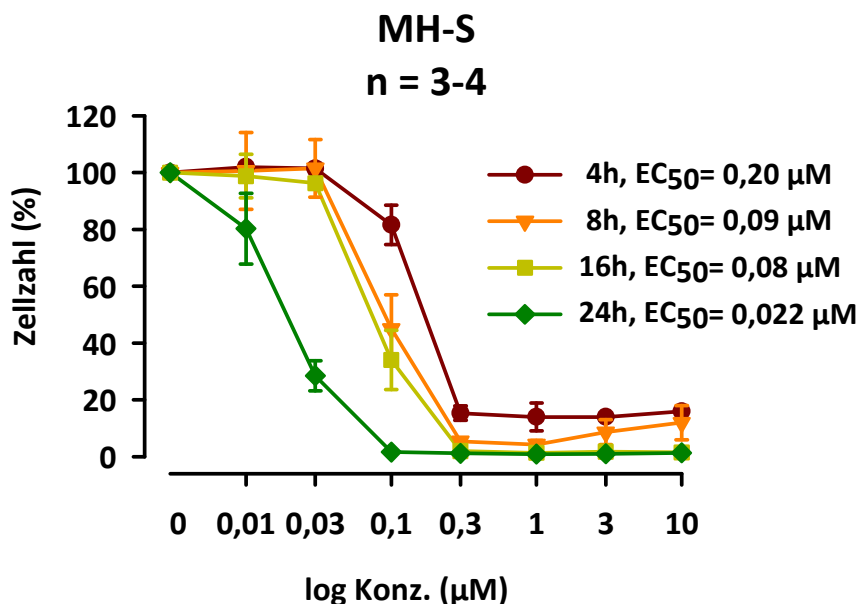


Abbildung 24: Zytotoxizität auf Makrophagen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

KR6-S führt bei den Makrophagen MH-S bereits nach vier Stunden zu einer deutlichen Zytotoxizität. Durch 0,3 μM werden bereits mehr als 80 Prozent der Zellen getötet. Schon bei einer Konzentration von 0,1 μM werden nach 24 Stunden 100 Prozent der Makrophagen abgetötet. KR6-S wirkt demnach stark immunotoxisch.

4.1.11 Zytotoxizität auf FHs74Int Zellen:

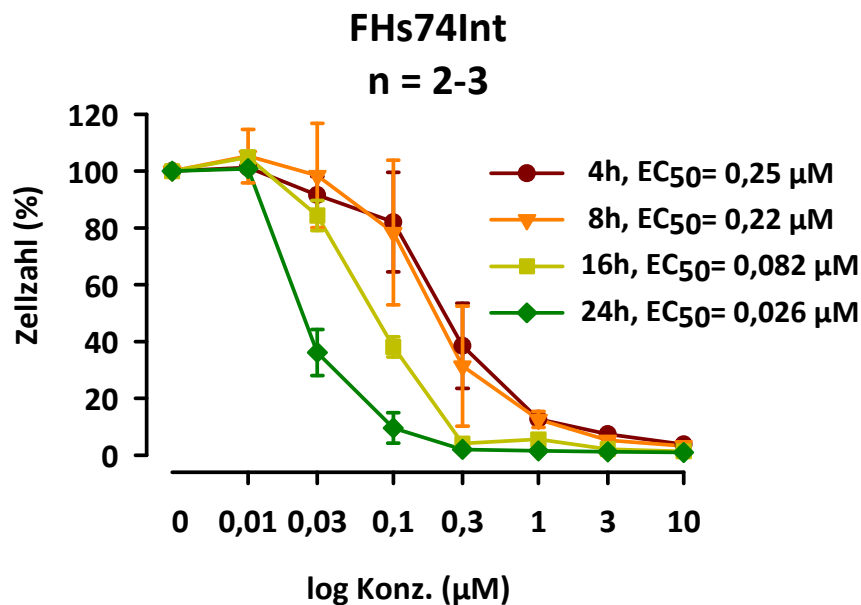


Abbildung 25: Zytotoxizität auf die Darmzelllinie FHs74Int in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer

Auch die nicht entartete Darmzelllinie FHs74Int reagiert sehr empfindlich auf KR6-S. Schon nach vier Stunden werden durch 0,3 μM KR6-S mehr als 50 Prozent der Zellen abgetötet und nach insgesamt 16 Stunden sind bei dieser Konzentration bereits alle Zellen abgestorben.

4.1.12 Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2 und HCT 116 anhand der EC_{50} :

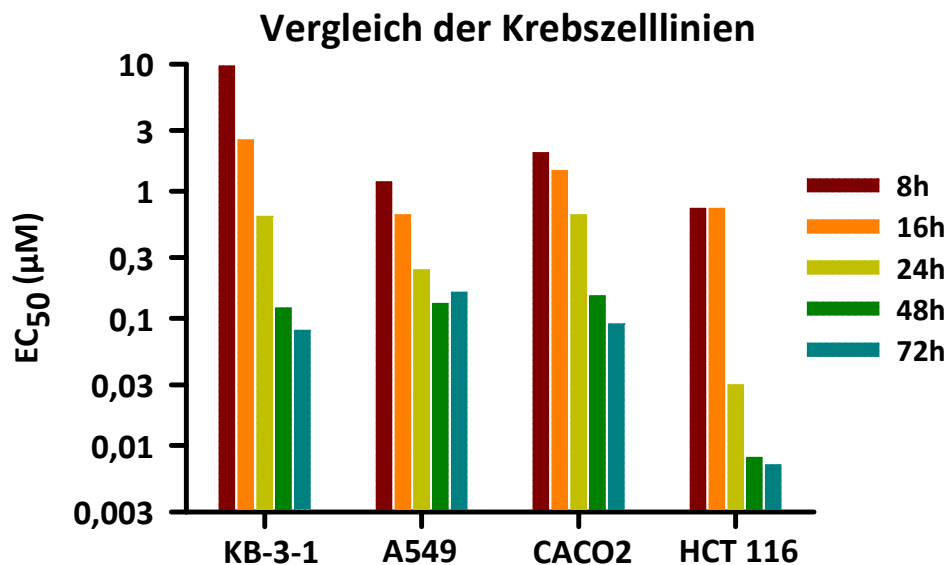


Abbildung 26: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC_{50} in Abhängigkeit von der Expositionsdauer

Im direkten Vergleich der getesteten Krebszelllinien, lässt sich erkennen dass HCT 116 am empfindlichsten gegenüber KR6-S reagiert. Um nach 24-stündiger Exposition 50 Prozent der HCT 116-Zellen zu töten benötigt es nur 0,03 μM KR6-S, wohingegen es bei den anderen Krebszelllinien mehr als 0,2 μM benötigt. Die EC_{50} liegt nach 48- bzw. 72-stündiger Exposition für HCT 116-Zellen unter 0,01 μM . Bei den anderen Krebszelllinien liegt die EC_{50} für diese Inkubationsdauer um 0,1 μM und ist somit beträchtlich höher. Am unempfindlichsten scheint die Cervixkarzinomzelllinie KB-3-1 zu sein, da sie bei 8-stündiger Exposition die höchste getestete Konzentration (10 μM) benötigt um auf 50 Prozent abgetötet zu werden.

4.1.13 Vergleich der Zytotoxizität auf die Darmzelllinien CACO2, HCT 116 und FHs74Int anhand der EC₅₀:

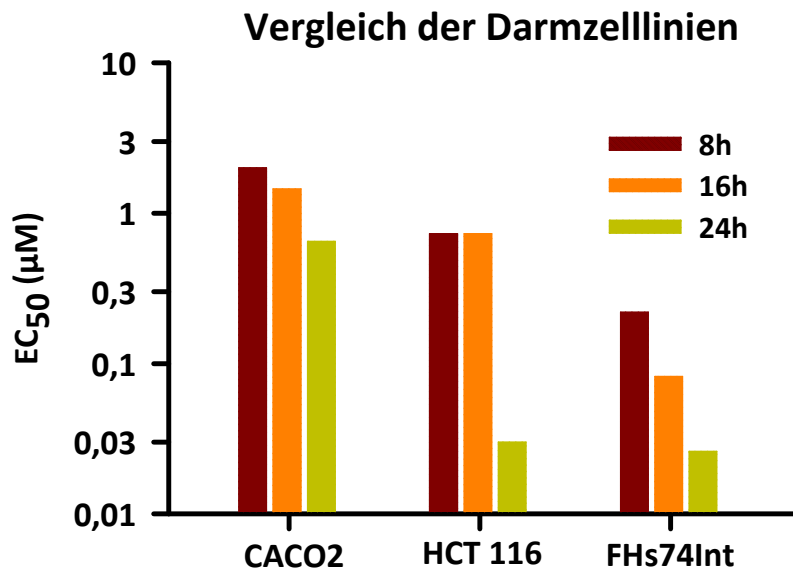


Abbildung 27: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf verschiedene Darmzelllinien anhand der EC₅₀ in Abhängigkeit von der Expositionsdauer

Vergleicht man die zytotoxische Wirkung von KR6-S auf Darmzelllinien, geht leider hervor, dass die nicht entartete Darmzelllinie FHs74Int am empfindlichsten gegenüber KR6-S reagiert. Um beispielsweise nach 16 Stunden die Hälfte der FHs74Int-Zellen abzutöten benötigt es nur 0,08 µM KR6-S, wohingegen es über 0,7 µM benötigt um 50 Prozent der Darmkrebszelllinien abzutöten.

4.1.14 Vergleich der Zytotoxizität auf die „Nicht-Krebszelllinien“ HEK, MH-S und FHs74Int anhand der EC₅₀:

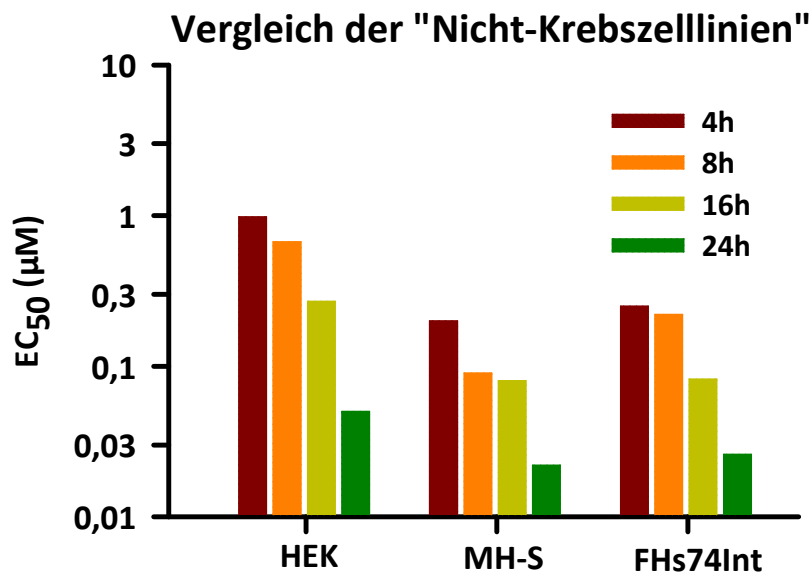


Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf „Nicht-Krebszelllinien anhand der EC₅₀ in Abhängigkeit von der Expositionsdauer

Vergleicht man die zytotoxische Wirkung von KR6-S zwischen den getesteten nicht entarteten Zelllinien, geht hervor, dass HEK-Zellen am widerstandsfähigsten und Makrophagen am empfindlichsten sind. Die Substanz ist demnach nicht nur stark zytotoxisch sondern auch stark immunotoxisch.

4.2 Ergebnisse der Auswaschversuche:

Es wurde getestet, ob sich KR6-S aus den Zellen auswaschen lässt und ob die Zellen anschließend in der Lage sind, sich vom Toxinkontakt wieder zu erholen.

4.2.1 Auswaschversuche an KB-3-1 Zellen:

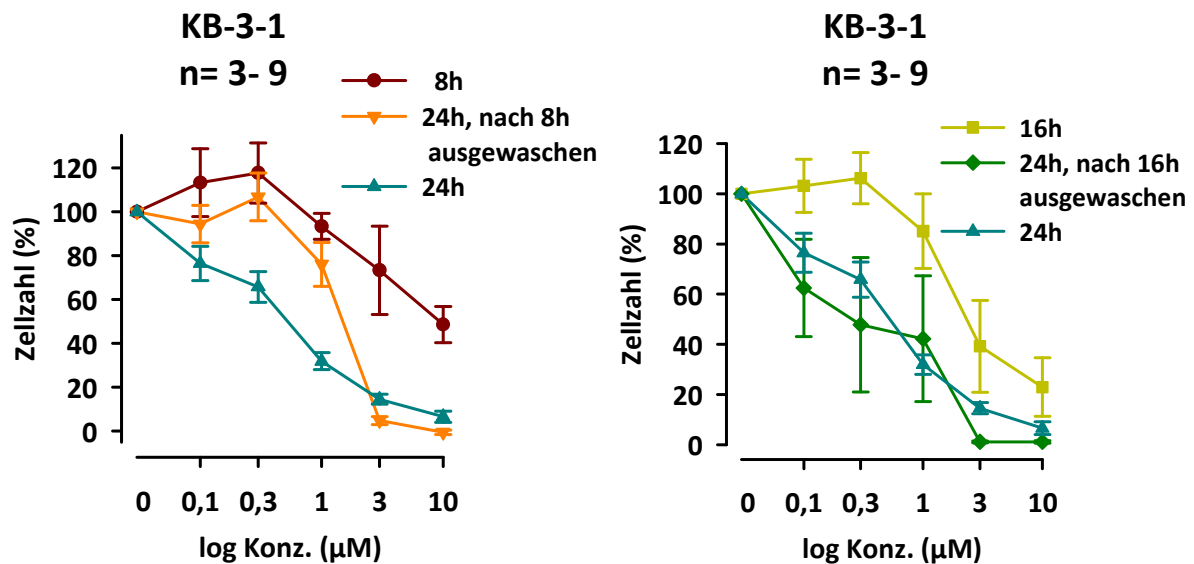


Abbildung 29: Auswaschversuche an der Zelllinie KB-3-1 nach 8- bzw. 16-stündiger KR6-S-Exposition

4.2.2 Auswaschversuche an A549 Zellen:

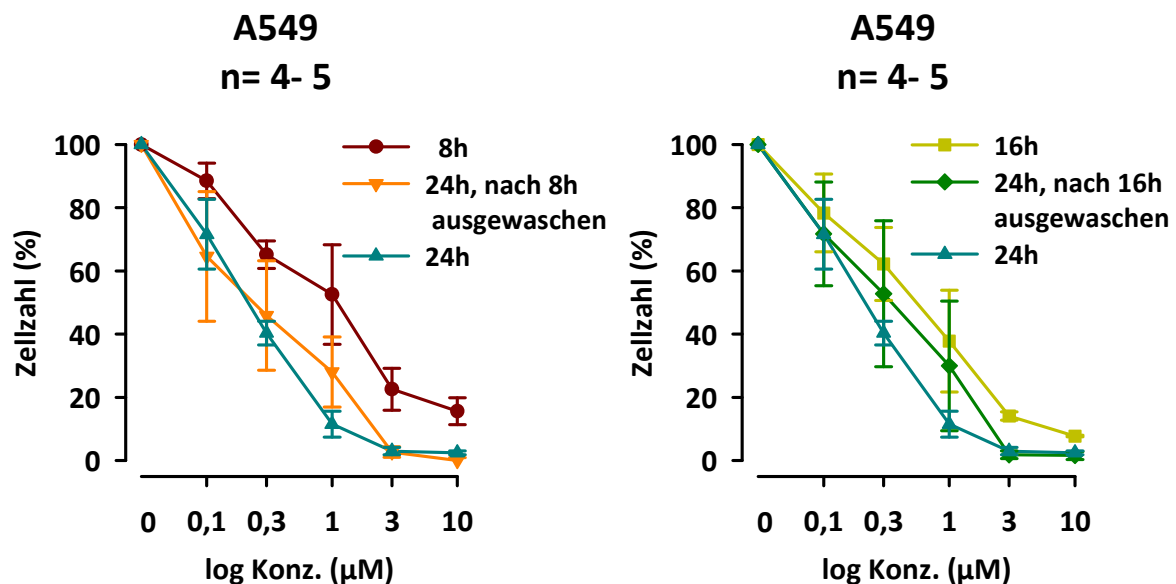


Abbildung 30: Auswaschversuche an der Zelllinie A549 nach 8- bzw. 16-stündiger KR6-S-Exposition

Bei beiden Zelllinien zeigt der Auswaschversuch, dass trotz dem Versuch KR6-S nach 8 bzw. 16 Stunden auszuwaschen, die Zellen weiter absterben, da bei jeder getesteten

Konzentration die Dosis-Wirkungs-Kurven unter jenen von 8 bzw. 16 Stunden liegen. Vor allem bei hohen Toxinkonzentrationen (ab 3 μM) werden trotz Waschens 100 % der Zellen abgetötet. Wohingegen bei der Zelllinie A549 nach nur 8 h Expositionszeit bei einer Konzentration von 3 μM noch über 20 % der Zellen leben, bzw. nach 16-stündiger Exposition noch mehr als 10 % überleben. Bei der Zelllinie KB-3-1 leben nach 8 Stunden bei 3 μM sogar noch drei Viertel aller Zellen, nach 16 Stunden noch 40 %.

Da trotz den Auswaschversuchen die Zellen weiter absterben, kann davon ausgegangen werden, dass die zytotoxische Wirkung von KR6-S irreversibel ist. Das hat zur Folge, dass trotz kurzem Toxinkontakt, die Zellen irreparabel geschädigt und in weiterer Folge abgetötet werden.

4.3 Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung:

Die Annexin V-FITC/ PI Färbung liefert einen Hinweis ob die zytotoxische Wirkung von KR6-S auf Apoptose oder Nekrose beruht.

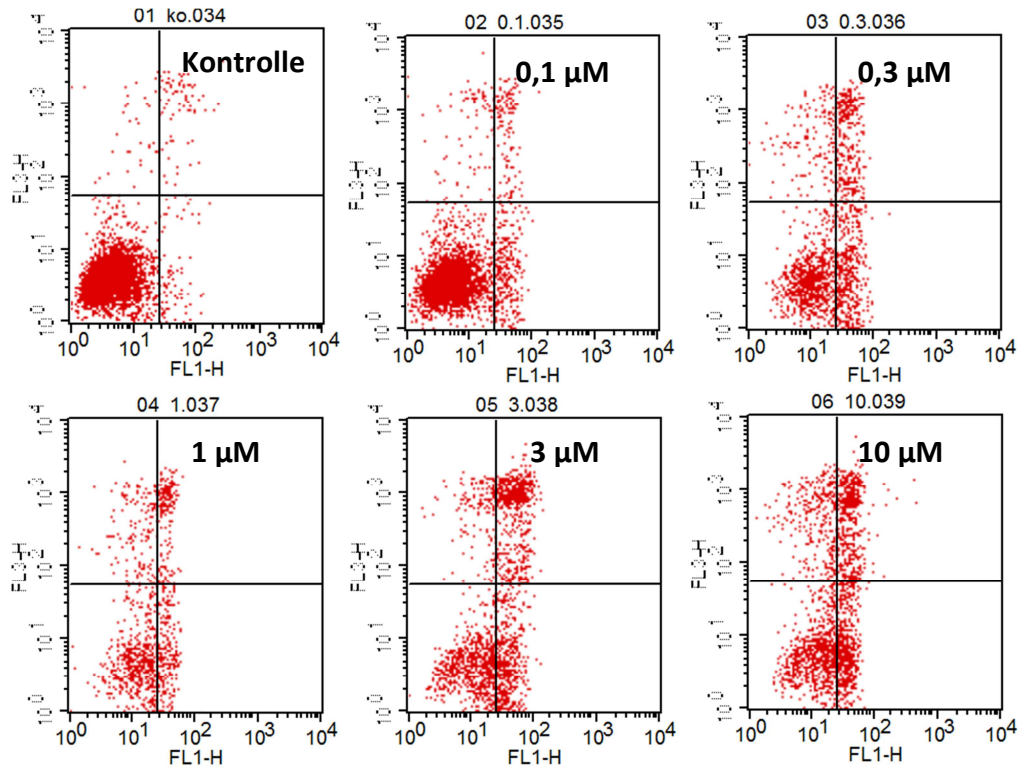


Abbildung 31: FACS-Histogramme nach Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen KR6-S Konzentrationen:

Jedes der Histogramme ist in vier Rechtecke aufgeteilt:

Oben links: Annexin V neg.; PI pos. → nekrotische Zellen

Oben rechts: Annexin V und PI pos. → nekrotische Zellen und Zellen in der späten Apoptose

Unten links: Annexin V und PI neg. → lebende Zellen

Unten rechts: Annexin V pos.; PI neg. → apoptotische Zellen

KB-3-1 (24h)	Zelltod durch:		
KR6-S (µM)	Apoptose (%)	Nekrose (%)	späte Apoptose oder Nekrose (%)
0	1,89	0,93	2,08
0,1	4,88	2,49	3,18
0,3	25,06	9,64	15,25
1	20,99	12,92	15,69
3	28,43	8,45	26,01
10	24,30	14,19	23,53

Tabelle 4: Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen KR6-S-Konzentrationen

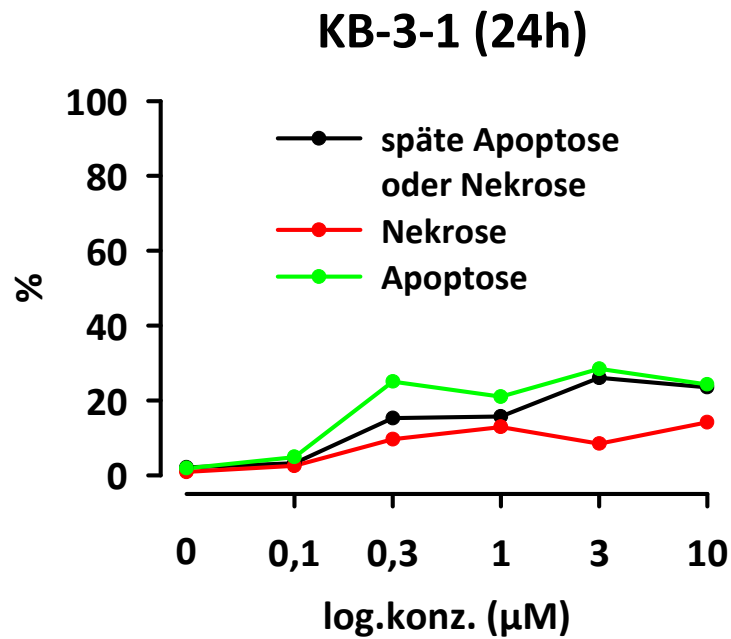


Abbildung 32: Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen KR6-S-Konzentrationen

In der Krebstherapie möchte man durch Zytostatika gezielt die Apoptose entarteter Zellen induzieren. Gehen die Zellen durch Nekrose zugrunde, würde eine unerwünschte Entzündung des Gewebes erfolgen. Um zu identifizieren auf welche Art die Zellen von KR6-S abgetötet werden, wurde die Annexin V-FITC/ PI Färbung durchgeführt, welche ermöglicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu differenzieren.

Vergleicht man die Apoptose- mit der Nekrosekurve, geht hervor dass bei beliebigen KR6-S-Konzentrationen immer ungefähr doppelt so viel Apoptosen wie Nekrosen auftreten. Ein direkter Vergleich dieser beiden Kurven ist allerdings mit Vorsicht zu genießen, da es ja auch eine dritte Kurve gibt, die späte Apoptosestadien oder/und Nekrosen anzeigt, die man durch diese Färbung nicht voneinander differenzieren kann.

Würden alle nicht differenzierbaren Events Apoptosen sein, würde KR6-S drei- bis fünfmal so viel Apoptosen wie Nekrosen auslösen, was in der Chemotherapie von Vorteil wäre. Würden allerdings alle nicht differenzierbaren Events Nekrosen sein, würde KR6-S zu einem Fünftel bis zu einem Drittel mehr zu Nekrosen wie zu Apoptosen führen, außer bei einer Konzentration von 0,3 μM KR6-S. In dieser Konzentration wirkt KR6-S unabhängig davon um welche Todesart es sich im nicht differenzierbaren Anteil handelt, mit Sicherheit mehr apoptotisch, da selbst wenn alle Zellen des nicht differenzierbaren Anteils nekrotisch wären und man sie zur Nekrosekurve addieren würde, insgesamt noch immer mehr Apoptosen sichtbar wären. Bei den anderen Konzentrationen kann man verallgemeinert sagen, dass

auch wenn die Zugehörigkeit der nicht differenzierbaren Events unklar bleibt, die Wirkung im besten Fall bis zu fünfmal mehr apoptotisch ist, wohingegen sie im schlechtesten Fall nur zu einem Drittel mehr nekrotisch ist.

Um demnach eindeutig zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können, müssten noch andere Testverfahren wie DAPI-Färbungen, LDH-Release oder JC-1 Messungen herangezogen werden. Erst dann kann eindeutig festgestellt werden ob KR6-S Apoptose oder Nekrose induziert.

4.4 Ergebnisse der Zellzyklusanalyse:

Die Zellzyklusanalyse ermöglicht KR6-S nicht nur hinsichtlich seiner zytotoxischen Wirkung zu testen, sondern gibt auch Aufschluss über die Zellteilungsrate. Dies ist insofern interessant, da schon beim EZ4U-Zytotoxizitätstest Hinweise auf eine proliferationsfördernde Wirkung festgestellt wurden.

4.4.1 Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S-Exposition:

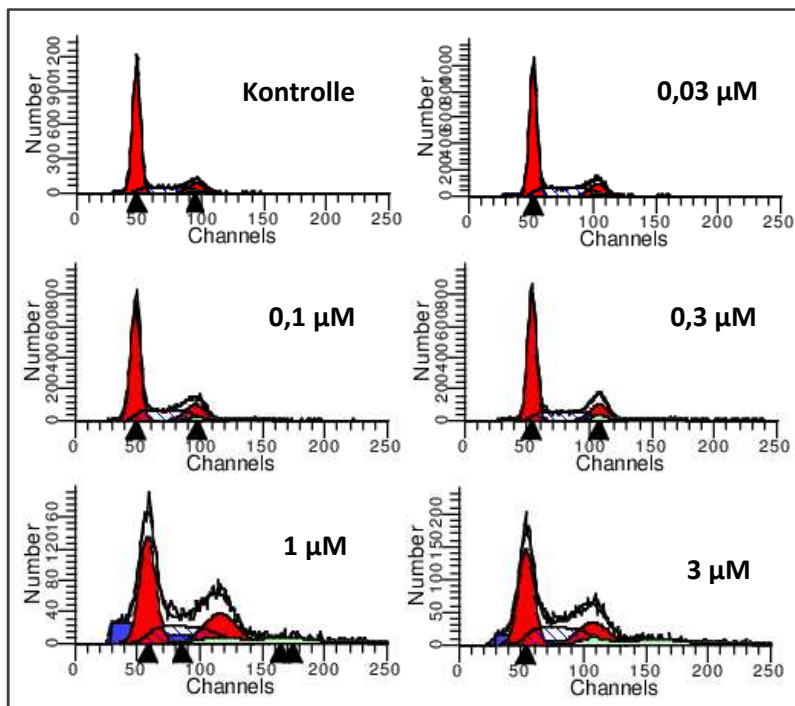


Abbildung 33: FACS-Histogramme des Zellzyklus von KB-3-1-Zellen nach 24-stündiger KR6-S-Exposition

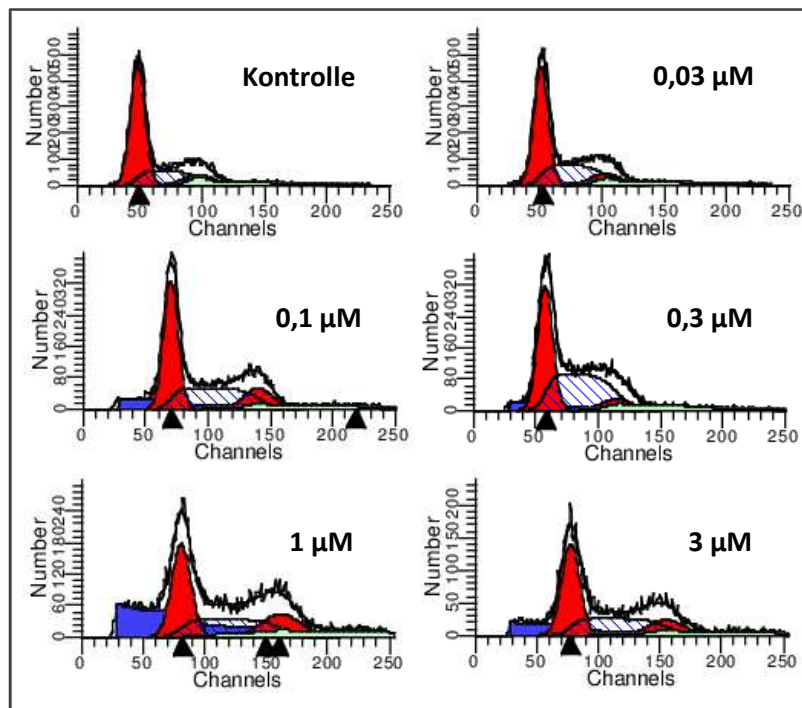


Abbildung 34: FACS-Histogramme des Zellzyklus von KB-3-1-Zellen nach 48-stündiger KR6-S-Exposition

KB-3-1 (24h)	Phasen im Zellzyklus				Modeled Events
KR6-S (µM)	G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M (%)	S (%)	Apoptose (%)	
0	71,76	11,11	17,12	2,09	13040
0,03	63,62	12,59	23,79	1,59	12614
0,1	58,53	16,08	25,36	3,18	13278
0,3	61,32	15,69	22,99	6,01	13191
1	46,48	26,29	27,23	21,29	6901
3	46,97	22,10	30,94	14,11	6523

Tabelle 5: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24-stündiger KR6-S-Exposition

KB-3-1 (48h)	Phasen im Zellzyklus				Modeled Events
KR6-S (µM)	G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M (%)	S (%)	Apoptose (%)	
0	62,90	11,13	25,97	5,28	12410
0,03	55,41	10,84	33,76	5,95	13831
0,1	43,49	7,97	48,54	11,74	13531
0,3	47,56	15,25	37,20	8,04	12782
1	43,77	21,62	34,61	30,22	14130
3	47,17	15,44	37,39	17,16	7881

Tabelle 6: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 48-stündiger KR6-S-Exposition

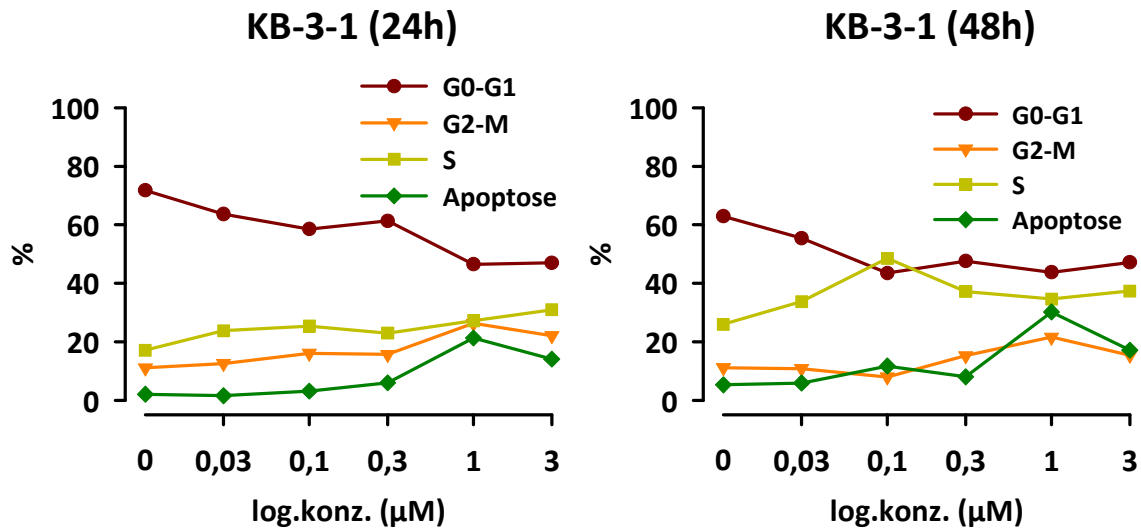


Abbildung 35: Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S-Exposition

Nach 24-stündiger Inkubation nimmt die Anzahl der KB-3-1 Zellen in der G₀-G₁-Phase mit steigender Konzentration von KR6-S kontinuierlich ab. Bei einer Konzentration von 1 μM beträgt die Abnahme im Vergleich zur Kontrolle bereits 35 %. Die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase und der G₂-M-Phase befinden, nimmt hingegen mit steigender Toxinkonzentration stetig zu. Bei einer Konzentration von 1 μM beträgt die Zunahme der Zellen in der S-Phase 59 %, die Anzahl der Zellen in der G₂-M-Phase hat sich im Vergleich zur Kontrolle sogar mehr als verdoppelt (237 %).

Die Anzahl der Apoptosen nimmt mit steigender KR6-S Konzentration sehr stark zu. Im Vergleich zur Kontrolle befinden sich bei einer Konzentration von 1 μM 10-mal so viele Zellen in der Apoptose (21 %).

Nach 48-stündiger Inkubation nimmt die Anzahl der KB-3-1 Zellen in der G₀-G₁-Phase mit steigender Toxinkonzentration zuerst schnell ab und bleibt dann relativ konstant. Die Reduktion beträgt bei 0,1 μM im Vergleich zur Kontrolle 31 %. Ab hier führen höhere Toxinkonzentrationen zu keiner weiteren Abnahme der G₀-G₁-Phasen. Der Anteil der Zellen in der G₀-G₁-Phase pendelt ab 0,1 μM bis 3 μM zwischen 43 und 48 %.

Der Anteil der Zellen in der S-Phase nimmt mit steigender KR6S-Konzentration beträchtlich zu bis er bei 0,1 mM ein Maximum von 49 % erreicht hat. Im Vergleich zur Kontrolle entspricht das der doppelten Anzahl. Mit weiter steigender Toxinkonzentration sinkt der Anteil der Zellen in der S-Phase und pendelt sich zwischen 34 und 38 % ein.

Der Verlauf der G₂-M-Phase ist vergleichbar mit jenem nach 24h. Bei einer Konzentration von 0,1µM hat sich auch hier die Anzahl beinahe verdoppelt.

Die Anzahl der Apoptosen nimmt bei einer Konzentration von 1 µM stark zu. Im Vergleich zur Kontrolle hat sich die Anzahl verfünffacht. Beinahe ein Drittel aller Zellen befindet sich in der Apoptose (30 %).

4.4.2 Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S-Exposition:

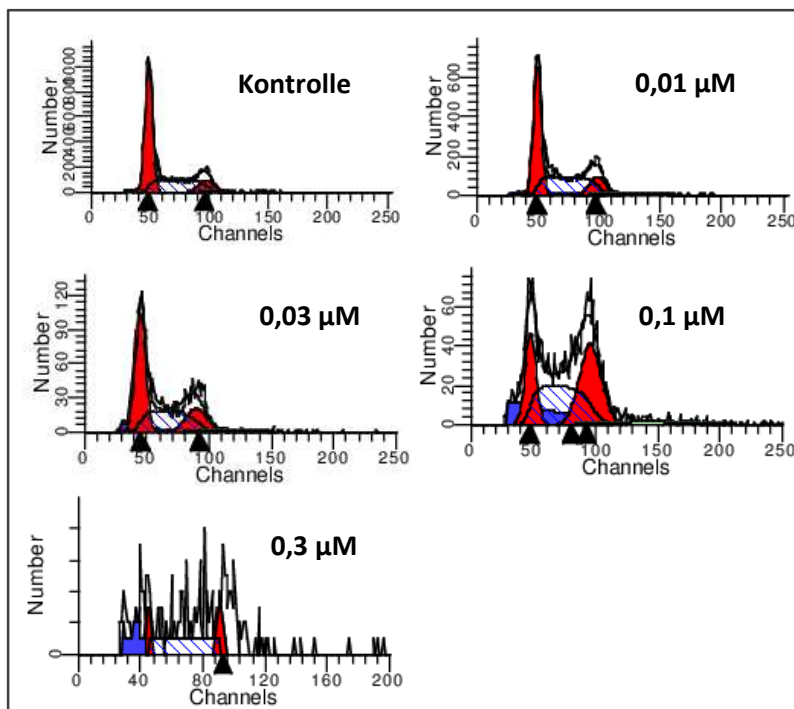


Abbildung 36: FACS-Histogramme des Zellzyklus von CACO2-Zellen nach 24h Inkubation mit KR6-S

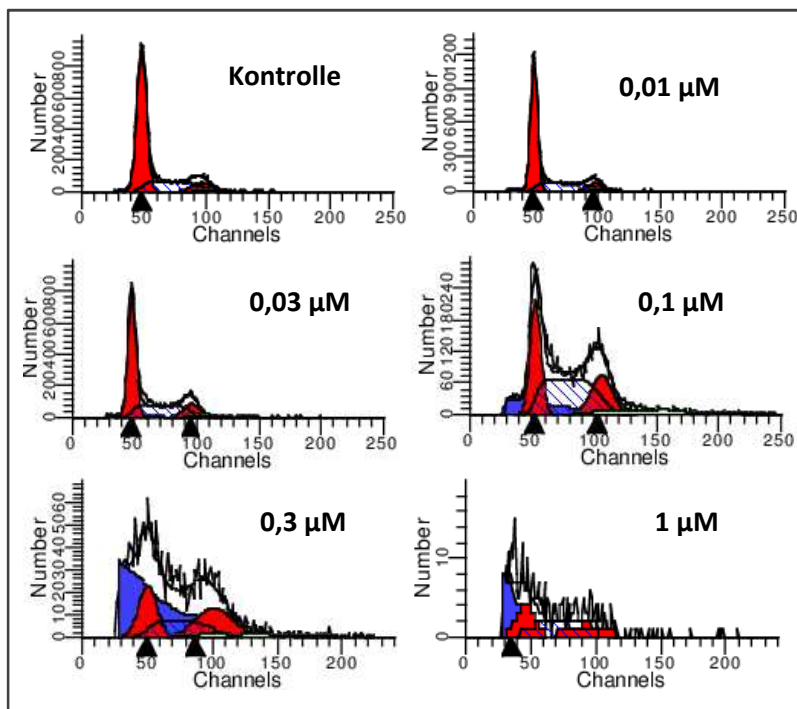


Abbildung 37: FACS-Histogramme des Zellzyklus von CACO2-Zellen nach 48h Inkubation mit KR6-S

CACO2 (24h)	Phasen im Zellzyklus				Modeled Events
KR6-S (µM)	G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M (%)	S (%)	Apoptose (%)	
0	55,56	10,95	33,49	2,14	14723
0,01	46,71	13,46	39,83	3,33	12229
0,03	46,39	18,46	35,15	7,14	2640
0,1	21,67	37,78	40,36	16,76	3069
0,3	8,49	16,37	75,14	0,00	144
1	Messung nicht möglich				<100

Tabelle 7: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24-stündiger KR6-S-Exposition

CACO2 (48h)	Phasen im Zellzyklus				Modeled Events
KR6-S (µM)	G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M (%)	S (%)	Apoptose (%)	
0	67,99	8,51	23,50	2,02	13541
0,01	66,43	7,78	25,79	2,38	12715
0,03	54,67	12,23	33,10	3,18	12028
0,1	31,23	21,19	47,57	13,54	9784
0,3	32,22	37,16	30,62	44,65	2690
1	33,98	26,66	39,35	8,38	350

Tabelle 8: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 48-stündiger KR6-S-Exposition

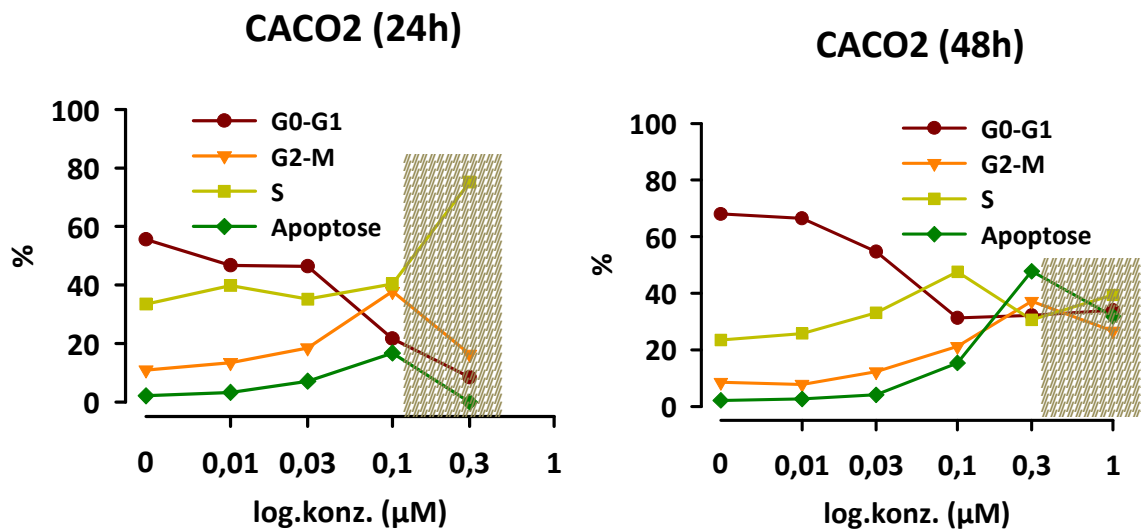


Abbildung 38 : Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24-bzw. 48-stündiger KR6-S-Exposition.

Grau hinterlegte Bereiche: Bei diesen Konzentrationen konnten nur weniger als 1000 Zellen detektiert werden was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen könnte. Die Ergebnisse dieser Bereiche werden daher nicht interpretiert.

Nach 24-stündiger Inkubation nimmt die Anzahl der CACO2-Zellen in der G_0 - G_1 -Phase mit steigender Konzentration von KR6-S stark ab. Bei einer Konzentration von 0,1 µM sinkt die Anzahl um mehr als die Hälfte ab.

Der Anteil der Zellen in der S-Phase bleibt mit steigender Toxinkonzentration relativ konstant. Er pendelt zwischen 33 und 41 %.

Die Anzahl der Zellen in der G_2 -M-Phase nimmt hingegen stetig zu. Bei 0,1 µM befinden sich dreimal so viele Zellen in der G_2 -M-Phase (38 %) als bei der Kontrolle (11 %).

Die Anzahl der Apoptosen nimmt mit steigender Toxinkonzentration stark zu. Im Vergleich zur Kontrolle befinden sich bei einer Konzentration von 0,1 µM 8-mal so viele Zellen in der Apoptose (17%).

Nach 48-stündiger Inkubation nimmt die Anzahl der CACO2-Zellen in der G_0 - G_1 -Phase mit steigender Toxinkonzentration zuerst schnell ab. Ab einer Konzentration von 0,1 mM bleibt sie relativ konstant. Im Vergleich zur Kontrolle befinden sich nur mehr halb so viele Zellen in der G_0 - G_1 -Phase (31 %).

Der Anteil der Zellen in der S-Phase nimmt mit steigender KR6S-Konzentration stark zu bis er bei 0,1 mM ein Maximum von 48 % erreicht hat. Im Vergleich zur Kontrolle hat sich die Anzahl verdoppelt. Mit weiter steigender Toxinkonzentration sinkt der Anteil der Zellen in der S-Phase wieder.

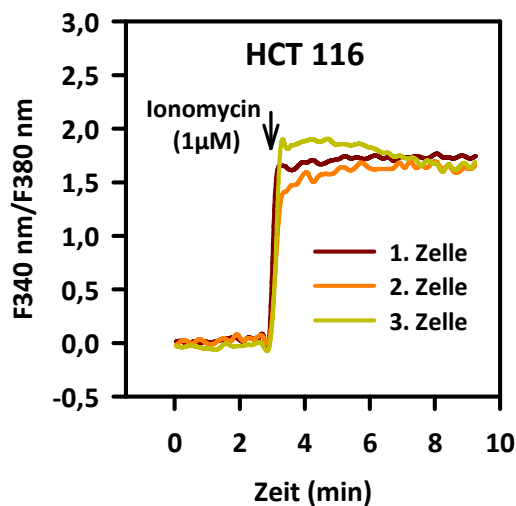
Die Anzahl der Zellen in der G₂-M-Phase nimmt mit steigender KR6-S-Konzentration stetig zu. Bei 0,3 µM befinden sich viermal so viele Zellen in der G₂-M-Phase (37 %) als bei der Kontrolle (9 %).

Die Anzahl der Apoptosen nimmt mit steigender Konzentration sehr stark zu. Im Vergleich zur Kontrolle hat sich die Anzahl bei einer Konzentration von 0,1 µM versechsfacht und bei 0,3 µM sogar verzwanzigfacht. Beinahe die Hälfte aller Zellen befindet sich in der Apoptose (45 %).

Zusammenfassend zeigt die Analyse des Zellzyklus an KB-3-1- und CACO2-Zellen, dass KR6-S dosis- und zeitabhängig zu einer Mischung aus G₂/M und S-Phase Arrest sowie zu einem Anstieg apoptotischer Zellen führt. Weiters bestätigt die Zellzyklusanalyse, dass CACO2-Zellen empfindlicher auf KR6-S reagieren als KB-3-1 Zellen, was bereits mittels EZ4U-Zytotoxizitätstest festgestellt wurde.

4.5 Ergebnisse der Fluorescence Imaging-Versuche:

Der Calcium-Eintritt in die Zelle ist eine wichtige Komponente der Apoptose-Induktion. Die apoptotische Signalübertragung beinhaltet zwei wichtige Faktoren: kontinuierliche Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration und die Abnahme der Calcium-Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum. Bei einigen Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin oder Tamoxifen konnte ein Eingriff in die Calcium-Homöostase festgestellt werden [Dubois et al., 2013]. Um festzustellen ob auch KR6-S in den Calcium-Haushalt der Zelle eingreift, wurden Fluorescence-Imaging-Versuche, bei welchen der intrazelluläre Anstieg der Calcium-Konzentration gemessen wurde, an verschiedenen Krebszelllinien durchgeführt.



Um eine positive Kontrolle zu erhalten, wurde derselbe Versuch auch mit dem Ionophor Ionomycin durchgeführt. Ionomycin macht die Membran für 2-wertige Kationen durchlässig, besonders für Calcium. Folglich steigt die intrazelluläre Calcium-Konzentration, wie in Abbildung 39 veranschaulicht wird.

Abbildung 39: Die Wirkung von Ionomycin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von HCT 116-Zellen

4.5.1 Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration:

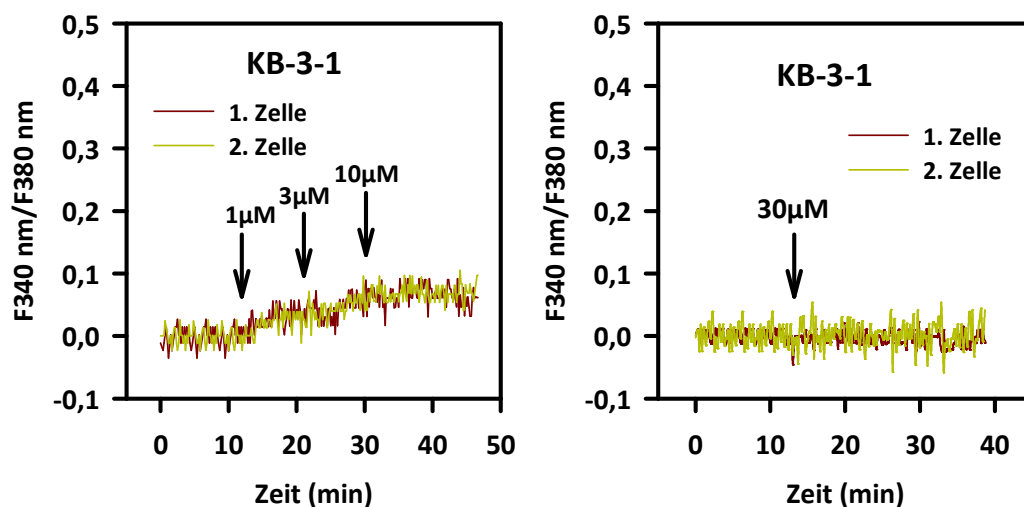


Abbildung 40: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von KB-3-1-Zellen

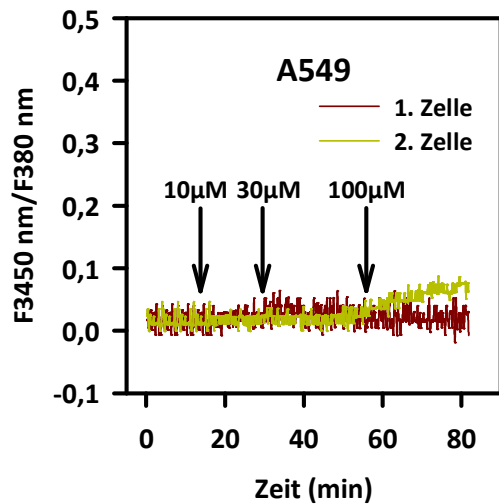


Abbildung 41: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von A549-Zellen

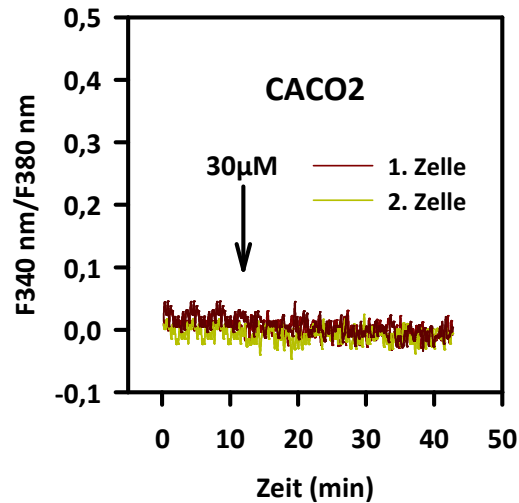


Abbildung 42: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von CACO2-Zellen

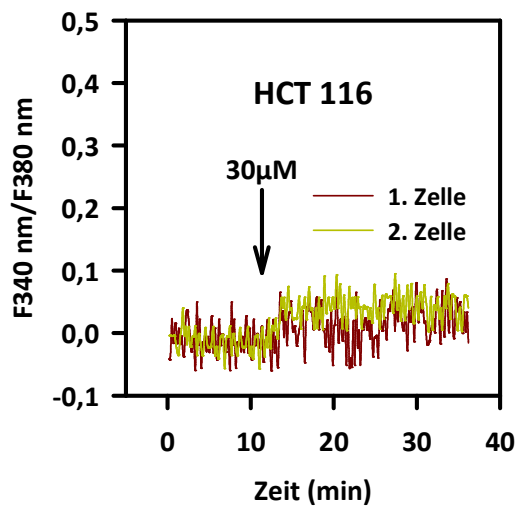


Abbildung 43: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von HCT 116-Zellen

Die Fluorescence-Imaging Versuche zeigen bei keiner der getesteten Krebszelllinien einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, weshalb man ausschließen kann, dass KR6-S die Calciumhomöostase beeinflusst.

5 Schlussbetrachtung

KR6-S wirkt auf alle getesteten Zelllinien zytotoxisch (Krebszelllinien: KB-3-1, A549, CACO2, HCT 116, HCT 116 p53/ko, HCT 116 p21/ko, HCT 116 bax/ko; nicht entartete Zelllinien: HEK, MH-S, FHs74Int). Am empfindlichsten reagieren leider nicht tumorigene Darmzellen (FHs74Int) und Makrophagen (MH-S), was bei der Anwendung am Menschen zu einer hohen Immunotoxizität führen würde. Die Zytotoxizität vieler Chemotherapeutika geht mit einer Erhöhung der interzellulären Calciumkonzentration einher. KR6-S zeigt allerdings keinen Einfluss auf die Calciumhomöostase. Durch welchen Mechanismus KR6-S zur Apoptose führt, bleibt weiterhin unklar. Die Zytotoxizität ist irreversibel. Das hat zur Folge, dass trotz kurzem Toxin-Kontakt, die Zelle irreparabel geschädigt und in weiterer Folge abgetötet wird. Die Zellen zeigen allerdings bevor sie absterben teilweise eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass hohe KR6-S Konzentrationen die Zelle einem höheren Stress aussetzen und so die Proliferation angeregt wird um das Überleben der Zelle zu sichern. Die Substanz besitzt also möglicherweise selbst mutagenes Potential. Weiters wurde herausgefunden, dass Zellen ohne „dem vor Apoptose schützenden Gen p21“ bei kurzer und niedriger KR6-S-Exposition, schneller den programmierten Zelltod einleiten als Zellen mit gänzlich intaktem Genom. Bei längerer und höherer KR6-S-Exposition besteht allerdings kein Unterschied mehr in der Empfindlichkeit, was darauf schließen lässt, dass bei höheren Toxinkonzentrationen bzw. längeren Expositionszeiten, die Zellen durch Nekrose zu Grunde gehen, da hier p21 keinen Einfluss ausübt. Darum wurde durchflusszytometrisch der Anteil an Apoptosen und Nekrosen bestimmt und bestätigt, dass KR6-S neben dem erwünschten programmierten Zelltod auch in beträchtlichem Ausmaß Nekrosen auslöst, wodurch beim Patienten eine nicht gewollte Entzündung des Gewebes erfolgen würde.

KR6-S ist als Chemotherapeutikum also ungeeignet, weil es auch zytotoxisch auf nicht entartete Zellen wirkt, hohe Immunotoxizität zeigt, über Nekrosen zu Entzündungen führen würde und mutagenes Potential nicht auszuschließen ist.

Strukturähnliche Metabolite dieses Pilzes oder KR6-S-Derivate wären aber möglicherweise als Zytostatika geeignet, weshalb es interessant wäre auch diese zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Aus einer Pilzspezies der Gattung *Chrysosporium* wurde der Metabolit KR6-Synchromycin isoliert. Es wurde festgestellt, dass KR6-S nicht antibiotisch, jedoch stark zytotoxisch wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dessen zytotoxischen Wirkung an sieben Krebszelllinien (KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, HCT116 p53/ko, HCT116 p21/ko, HCT116 bax/ko) sowie an drei nicht entarteten Zelllinien (HEK, MH-S, FHS74Int) getestet. Es stellte sich heraus, dass KR6-S auf all diese Zelllinien zytotoxisch wirkt. Am empfindlichsten gegenüber KR6-S sind FHS74Int und MH-S. Mittels HCT116-Subzelllinien konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren p53 und p21 bei kurzen (<24 h) nicht aber bei längeren (>24 h) Expositionszeiten einen Einfluss auf die Wirkung von KR6-S haben. Durch Zellzyklusanalysen konnte weiters festgestellt werden, dass KR6-S dosis- und zeitabhängig zu einem G2/M-S-Phase Arrest und zu einem Anstieg der apoptotischen Zellpopulation führt. Außerdem wurde herausgefunden, dass KR6-S nicht nur zu Apoptose sondern auch zu Nekrose führt. Durch Auswaschversuche konnte festgestellt werden, dass auch ein kurzfristiger Kontakt der Zellen mit KR6-S und anschließender Erholungsphase in frischem Medium reicht um die Zellen irreparabel zu schädigen und in weiterer Folge abzutöten. Mittels Fluorescence-Imaging wurde ausgeschlossen, dass KR6-S Einfluss auf die Calciumhomöostase hat.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist KR6-S als Chemotherapeutikum nicht geeignet, da die zytotoxische Wirkung auf nicht entartete Zellen teilweise größer ist als auf Tumorzellen und da KR6-S stark immunotoxisch wirkt. Möglicherweise wären aber strukturähnliche Metabolite dieses Pilzes, bzw. KR6-S-Derivate als Zytostatika geeignet, weshalb es interessant wäre auch diese zu untersuchen.

7 Abstract

The metabolite KR6-Synchromycin was isolated from a fungal species of the genus *Chrysosporium*. KR6-S exerts not antibiotic but cytotoxic activities.

To gain more insights into its cytotoxic activities, in this work, KR6-S was tested on seven cancer cell lines (KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, HCT116 p53/ko, HCT116 p21/ko, HCT116 bax/ko) as well as on three normal proliferating cell lines (HEK, MH-S, FHs74Int). In general cytotoxic effects of KR6-S were found for all of these cell lines, with FHs74Int and MH-S being most sensitive. Using HCT116 cells with deleted p53, p21 and bax genes, it was shown that the cytotoxic activity of KR6-S is influenced by p53 and p21 in short term experiments (<24 h) but not after longer exposure. Additionally, it was shown by cell cycle analysis that KR6-S leads to a G2/M-S phase arrest and a higher amount of apoptotic cells. Furthermore KR6-S induced cell death might be based on apoptosis as well as on necrosis induction. Moreover it became apparent, that the cytotoxic effect is irreversible. Consequently, in spite of short toxin contact, cells are harmed irreversibly and accordingly die. Employing Fluorescence-Imaging it became clear, that KR6-S has no effect on calcium homeostasis.

Due to these results, KR6-S can't be used as chemotherapeutic agent since the cytotoxic effect on non neoplastic cells is partially higher than on cancer cells and because KR6-S acts severely immunotoxic. Perhaps other metabolites of this fungus with similar structure or KR6-S-derivatives are suitable as cytostatics, so it would be interesting to investigate these.

8 Quellenverzeichnis

BARILLÉ-NION S., BAH N., VÉQUAUD E., JUIN P. Review: Regulation of Cancer Cell Survival by BCL2 Family Members upon Prolonged Mitotic Arrest: Opportunities for Anticancer Therapy. *Anticancer Res.* (2012) 32: 4225-4234

BASU A., BOUZIANE M.,CASTLE V.P. et al. Crosstalk between Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways in Pancreatic Cancer: Synergistic Action of Estrogen Metabolite and Ligands of Death Receptor Family. *Cancer Res.* (2006) 66: 4309-4318

BRÖKER L.E., KRUYT F.A.E., GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* (2005) 11: 3155-3162

BURLACU A. Review: Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* (2003) Vol 7, No 3: 249-257

DARZYNKIEWICZ Z., SKOMMER J., TELFORD W., WLODKOWIC D. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods Cell Biol.* (2011) 103: 55-98.

DARZYNKIEWICS Z., POZAROWSKI P. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* (2004) 281: 301-11

DUBOIS C., VANDEN ABEELE F., PREYARSKAYA N. Review: Targeting Apoptosis By The Remodeling Of Calcium Transporting Protein In Cancerogenesis. *FEBS J.* 2013 Mar 16. doi: 10.1111/febs.12246. [Epub ahead of print]

FIANDALO M.V., KYPRIANOU N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp. Oncol.* (2012) 34(3): 165-75

GARTEL A.L., TYNER A.L. Review: The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* (June 2002) 1: 639–649

GOTTLIEB R.A., GUSTAFSSON A.B. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2007) 292: C45-C51

GUIMARAES C.A. et LINDEN R. Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* (2004) 271, 1638–1650

HAUGLAND R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals (Hrsg Larison K.D.), Molecular Probes Inc., 1992

HAUPT S., BERGER M., GOLDBERG Z., HAUPT Y. Apoptosis – the p53 network. J. Cell Sci. (2003) 116: 4077-4085

JAIN M., PACZULLA A., KLONISCH T., DIMGBA F. , RAO S., ROBERG K., SCHWEIZER F., LENGERKE C., DAVOODPOUR P., PALICHARLA V., MADDIKA S., LOS M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development, J. Cell. Mol. Med. (2013) 17(1): 12-29

KERR J.F., WYLLIE A.H., CURRIE A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer (1972) 26: 239

LOS M., MOZOLUK M., FERRARI D., STEPCZYNSKA A., STROH C., RENZ A., HERCEG Z., WANG Z., SCHULZE-OSTHOFF K. Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. Mol. Biol. Cell (2002) 13: 978 –988

OCKER M., HÖPFNER M. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. Eur. Surg. Res.(2012) 48(3): 111-20

RAO R.V., ELLERBY H.M., BREDESEN D.E. Review: Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ. (2004) 11: 372–380

RIEDL S.J., SALVESEN G.S. Caspase mechanisms. Adv. Exp. Med. Biol. (2008) 615: 13-23

SULLIVAN K.D., GALLANT-BEHM C.L., HENRY R.E.,FRAIKIN J., ESPINOSA J.M. Review: The p53 circuit board. Biochim. Biophys. Acta (2012) 1825: 229–244

VASSILEV L.T. Review: MDM2 inhibitors for cancer therapy. Trends Mol. Med. (January 2007) 13(1): 23-31

VAUX David L. Toward understanding of the molecular mechanisms of an physiological cell death. Review. Nadl. Acad. USA Proc. Sci.(February 1993) 90: 786-789

YIN XIAO-MING Review: Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways.

Cell Res. (2000) 10: 161-167

Beipacktext EZ4U „Easy for you“-nonradioactive cell proliferation and cytotoxicity assay;
Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG

Training-Handbuch Durchflusszytometrie, Becton Dickinson, 7. 1. 1. 1

http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zwei Hauptwege der Apoptose.....	4
Abbildung 2: Einteilung der Bcl2-Proteinfamilie anhand ihrer Funktion und Struktur.....	5
Abbildung 3: Zellzyklusarrest oder Apoptose als Konsequenzen der p53-Aktivierung.....	6
Abbildung 4: p53 als zentrale Schaltstelle in einem komplexen Gen-Netzwerk.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Zählkammer.....	14
Abbildung 6: Umsetzung: Tetrazolium → Formazan.....	15
Abbildung 7: EZ4U-Zytotoxizitätstest	16
Abbildung 8: Schema eines DNA-Histogramms.....	19
Abbildung 9: Zytotoxizität auf KB-3-1 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer	23
Abbildung 10: Zytotoxizität auf A549 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer	24
Abbildung 11: Zytotoxizität auf CACO2 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer	25
Abbildung 12: Zytotoxizität auf HCT 116 Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	26
Abbildung 13: Zytotoxizität auf HCT 116 p53/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	27
Abbildung 14: Zytotoxizität auf HCT 116 p21/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	27
Abbildung 15: Zytotoxizität auf HCT 116 bax/ko Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	28
Abbildung 16: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 4-stündiger KR6-S-Exposition	29
Abbildung 17: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 8-stündiger KR6-S-Exposition	30
Abbildung 18: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 16-stündiger KR6-S-Exposition	30
Abbildung 19: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 24-stündiger KR6-S-Exposition	31

Abbildung 20: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 48-stündiger KR6-S-Exposition	32
Abbildung 21: Vergleich zwischen den einzelnen HCT 116 Zelllinien nach 72-stündiger KR6-S-Exposition	32
Abbildung 22: Zytotoxizität auf HEK-Zellen in Abhängigkeit von der KR6-S-Konzentration und der Expositionsdauer	33
Abbildung 23: Zytotoxizität auf HEK-Zellen nach 4-stündiger KR6-S-Exposition	34
Abbildung 24: Zytotoxizität auf Makrophagen in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	34
Abbildung 25: Zytotoxizität auf die Darmzelllinie FHs74Int in Abhängigkeit von der KR6-S- Konzentration und der Expositionsdauer	35
Abbildung 26: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC ₅₀ in Abhängigkeit von der Expositionsdauer	36
Abbildung 27: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf verschiedene Darmzelllinien anhand der EC ₅₀ in Abhängigkeit von der Expositionsdauer	37
Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von KR6-S auf „Nicht-Krebszelllinien anhand der EC ₅₀ in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.....	38
Abbildung 29: Auswaschversuche an der Zelllinie KB-3-1 nach 8- bzw. 16-stündiger KR6-S- Exposition	39
Abbildung 30: Auswaschversuche an der Zelllinie A549 nach 8- bzw. 16-stündiger KR6-S- Exposition	39
Abbildung 31: FACS-Histogramme nach Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen KR6-S Konzentrationen	41
Abbildung 32: Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1-Zellen	42
Abbildung 33: FACS-Histogramme des Zellzyklus von KB-3-1-Zellen nach 24-stündiger KR6-S-Exposition	44
Abbildung 34: FACS-Histogramme des Zellzyklus von KB-3-1-Zellen nach 48-stündiger KR6-S-Exposition	45
Abbildung 35: Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S- Exposition	46
Abbildung 36: FACS-Histogramme des Zellzyklus von CACO2-Zellen nach 24h Inkubation mit KR6-S.....	47

Abbildung 37: FACS-Histogramme des Zellzyklus von CACO2-Zellen nach 48h Inkubation mit KR6-S.....	48
Abbildung 38 : Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24- bzw. 48-stündiger KR6-S-Exposition.	49
Abbildung 39: Die Wirkung von Ionomycin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von HCT 116-Zellen.....	51
Abbildung 40: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von KB-3-1-Zellen.....	51
Abbildung 41: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von A549-Zellen.....	51
Abbildung 42: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von CACO2-Zellen	52
Abbildung 43: Die Wirkung von KR6-S auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von HCT 116-Zellen.....	52

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten KR6-S-Konzentrationen.....	10
Tabelle 2: Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension.....	15
Tabelle 3: verwendete Zellzahl/ml in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der jeweiligen Zelllinie	16
Tabelle 4: Ergebnisse der Annexin V-FITC/ PI Färbung von KB-3-1-Zellen	41
Tabelle 5: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 24-stündiger KR6-S- Exposition.....	45
Tabelle 6: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie KB-3-1 nach 48-stündiger KR6-S- Exposition.....	45
Tabelle 7: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 24-stündiger KR6-S- Exposition.....	48
Tabelle 8: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie CACO2 nach 48-stündiger KR6-S- Exposition.....	48

13 Lebenslauf

Persönliches:

Name:	Yasmin Dobler
Geburtsdatum:	25.11.1986
Geburtsort:	Neunkirchen/NÖ
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Österreich

Ausbildung:

1993-1997	Volksschule Otterthal
1997-2005	Gymnasium Sachsenbrunn
Herbst 2005	Innenarchitektur an der New Design University in St. Pölten
2006-Lfd.	Diplomstudium der Pharmazie/Universität Wien

Ferialjobs und Praktika:

Sommer 2002-2004	Fa. Huyck Austria, Gloggnitz
30.01-30.06.2006	Neupack GmbH, Hirschwang
September 2007	Apotheke „Zum hl. Peter und Paul“, Ternitz
Sommer 2009-2011	Festspiele Reichenau
März 2010	Messtätigkeit für die Apothekerkammer
August 2011	Merkur Apotheke, Neunkirchen
Sept.-Dez. 2011	Merkur Apotheke, Neunkirchen (1/10)
Feb. und August 2012	Linden-Apotheke, Hernals
März 2012-Lfd.	Linden-Apotheke, Hernals (1/10)

.