

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung der zytotoxischen Wirkung des
KR7-zonamycin“

verfasst von

Hebaa AL-QASAB

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 996 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Studium für die Gleichwertigkeit UG2002
Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

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

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2 ALLGEMEINES	2
2.1 Zelltod	2
2.1.1 Apoptose	2
2.1.2 Nekrose	3
2.2 Signalweg während der Apoptose	5
2.2.1 Caspasen	6
2.2.2 Der extrinsische Weg	7
2.2.3 Der intrinsische Weg	9
2.2.4 Regulator der Apoptose p53	13
2.2.5 Regulator der Apoptose p21	16
3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Die Testsubstanz	20
3.2 Zelllinien und zugehörige Nährmedien	21
3.2.1 Krebs-Zelllinien	21
3.2.2 Nicht entartete Zelllinien	21
3.2.3 Nährmedien	21
3.3 Kultivierung der Zellen	22
3.3.1 Allgemeines	22
3.3.2 Auftauen der Zellen	22
3.3.3 Wechseln des Nährmediums	22
3.3.4 Passagieren	23
3.3.5 Bestimmung der Zellzahl	24
3.4 EZ4U-Zytotoxizitätstest	27

4	RESULTATE UND DISKUSSION	30
4.1	Zytotoxizität auf Cervixkarzinom-Zelllinie (KB -3-1)	30
4.2	Zytotoxizität auf HEK-Zellen	32
4.3	Zytotoxizität auf A549 Zellen	33
4.4	Zytotoxizität auf CACO2 Zellen	34
4.5	Zytotoxizität auf HCT116 Zellen	35
4.6	Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC₂₅	36
4.7	Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC₅₀	37
4.8	Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC₇₅	38
5	SCHLUSSBETRACHTUNG	39
6	ZUSAMMENFASSUNG	40
7	ABSTRACT	41
8	QUELLENVERZEICHNIS	42
9	ABBILDUNG QUELLENVERZEICHNIS	49
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	50
11	TABELLENVERZEICHNIS	51

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Lemmens-Gruber für die Betreuung der vorliegenden Diplomarbeit und für das interessante Thema bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau Pakiza Rawanduzi für die geduldige und sehr gute Begleitung über den gesamten Verlauf der Arbeit herzlich bedanken.

Auch muss ich mich bei meiner Freundin Dr. Blaha bedanken, die viel Zeit in die Korrektur meiner Arbeit investiert hat. Zahlreiche Kommata, Satzstellungen und Rechtschreibfehler flogen dank ihrer Hilfe hinaus. Den Wald hätte ich selber vor lauter Bäume oft nicht mehr gesehen.

Dank an meinen Mann, der mich in allen Entscheidungen unterstützte.

Abschließend ein großen Dank an meine Eltern für die liebevolle Unterstützung, den Rückhalt und den Zuspruch.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

KR7 ist ein antibiotisch wirksamer Schimmelpilzmetabolit. Das Herstellungsverfahren und die dazu notwendigen Mikroorganismen sind bekannt.

Im Rahmen eines Forschungsprojekts am Department für Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Wien wurde das oben genannte Antibiotikum auf seine zytotoxische Wirksamkeit getestet.

Meine Arbeit bestand darin, die zytotoxische Wirkung von KR7 mit verschiedenen Hemmkonzentrationen an diversen Krebszelllinien und nicht entarteten Zelllinien zu untersuchen. Außerdem sollte der Zustand der Zellen nach dem Kontakt mit dem Toxin ermittelt werden. Dabei wurde die zytotoxische Wirkung, die zur Apoptoseinduktion führt, geprüft.

Sämtliche Untersuchung sollten auch dazu dienen, erste Hinweise über KR7 zu erhalten, ob es sich bei dieser Substanz um einen Stoff handelt, von dem es sich lohnt diesen später zu einem Chemotherapeutikum weiter zu entwickeln.

2 ALLGEMEINES

2.1 Zelltod

2.1.1 Apoptose

Griechisch apoptosis: das Abfallen, APO =weg und ptosis = fallen.

Der programmierte Zelltod gehört zu den elementaren Vorgängen in jedem Organismus, sowohl bei hochentwickelten Säugetieren, als auch bei einfachen, mehrzelligen Organismen. Er dient zur Beseitigung beschädigter, überflüssiger oder potentiell gefährlicher Zellen.

Bevor der Begriff „Apoptose“ eingeführt wurde, benützte man den Begriff „Programmierter Zelltod“, der von den Pionieren auf diesem Gebiet, nämlich Richard A. Lockshin und Caroll Williams eingeführt wurde. Von ihnen wurden Vorgänge des zellulären Untergangs erstmals untersucht und eine Reihe von Genen, die den programmierten Zelltod kontrollieren, entdeckt (Lockshin et al., 2004).

Während der Apoptose bleibt das umgebende Gewebe unversehrt. Äußere Faktoren wie UV-Strahlung, chemische Substanzen, Schwermetalle oder bakterielle und virale Infektionen, können Zellen zur Apoptose veranlassen.

Der Begriff „Apoptose bezeichnet eine spezielle Form des programmierten Zelltodes, der durch charakteristische morphologische Eigenschaften gekennzeichnet ist. Die Zelle setzt aktiv eine Signalkaskade in Gang, die zu physiologischen und morphologischen Veränderungen führt. Zunächst schrumpft die Zelle, wobei Proteine fragmentiert werden, Chromatin kondensiert und DNA degradiert wird. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Caspasen. Durch diese werden Proteine gespalten, die die Kernmembran stützen. Dadurch wird die DNA freigelegt und durch Nukleasen zerkleinert. Außerdem werden Proteine des Zytoskeletts und Adhäsionsmoleküle degradiert, wodurch sich die Zelle aus dem Zellverband löst und sich abrundet. Negativ geladene Phospholipidmoleküle wandern von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran, wodurch die Zelle markiert wird.

Auf diese Weise können die markierten Zellen rasch von Makrophagen abgebaut werden (Savill und Fadok, 2000).

Beispiele für Apoptose:

- Keratinocyten werden physiologischerweise nach 21 Tagen apoptotisch
- T-Zell-Selektion im Thymus
- Im Knochenmark und Darmepithel sterben jede Stunde Milliarden von Zellen ab
- Das Abstoßen der Zellen in der Gebärmutterschleimhaut bei der Menstruation
- Im sich entwickelnden Nervensystem der Wirbeltiere sterben 50% der Nervenzellen kurz nach ihrer Entstehung bzw. nach der Geburt wieder ab.
- Apoptose spielt auch bei Osteoporose, Netzhautdegeneration, Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit, und vielen anderen Erkrankungen eine Rolle (Favaloro et al., 2012).

2.1.2 Nekrose

Eine weitere Form des Zelltodes stellt die Nekrose dar. Lange Zeit stand der nekrotische Zelltod für eine unkontrollierte, zufällige und nicht programmierte Form des Zelltodes. Zellen, die zum Beispiel mit Gefrierschock oder mit Detergenzien behandelt wurden, starben einen unregulierten, wenig beschriebenen nekrotischen Zelltod (Krömer et al., 2009). Kommt es zur Nekrose, dann schwillt die Zelle mit ihren Organellen an (Oncosis), die Zellmembran wird, im Gegensatz zur Apoptose, durchlässig und die Membranintegrität wird aufgelöst. Die zellulären Kompartimente werden in den extrazellulären Raum freigesetzt und die Zelle lysiert. Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose werden in Tabelle 1 und Abbildung 1 gegenübergestellt.

	Apoptose	Nekrose
Morphologie	- Typische Chromatinkondensation - DNA-Fragmente bestimmter Länge - Apoptotische Vesikel („apoptotic bodies“) - keine Entzündungsreaktion	- Degradation der DNA - Zerfall der Zellmembranen - Entzündungsreaktion vorhanden
Caspasen	- Notwendig für den Ablauf (z.B. Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3)	- Nicht unbedingt notwendig, aber eine Beteiligung möglich - Zellverdau durch Proteasen
Regulation	- Extrinsisch: Rezeptor- bzw. Granzyme B vermittelt - Bei DNA-Schäden	- Nach irreparablen physikalischen oder chemischen Zellschäden - Bei Energiemangel
Ablauf	- Programmierte Signalkaskade	- Ungeregelter Zellverdau
Mitochondrien-Beteiligung	- Verlust des Transmembranpotentials - Permeabilisation der OMM (äußeren mitochondrialen Membran)	- Keine Mitochondrienbeteiligung
Energie-Abhängigkeit	- Energieabhängig - Aktiver Prozess	- Keine zusätzliche Energie notwendig - Passiver Prozess

Tabelle 1: Unterschiede zwischen dem apoptotischen und nekrotischen Zelltod (Müller, 2007)

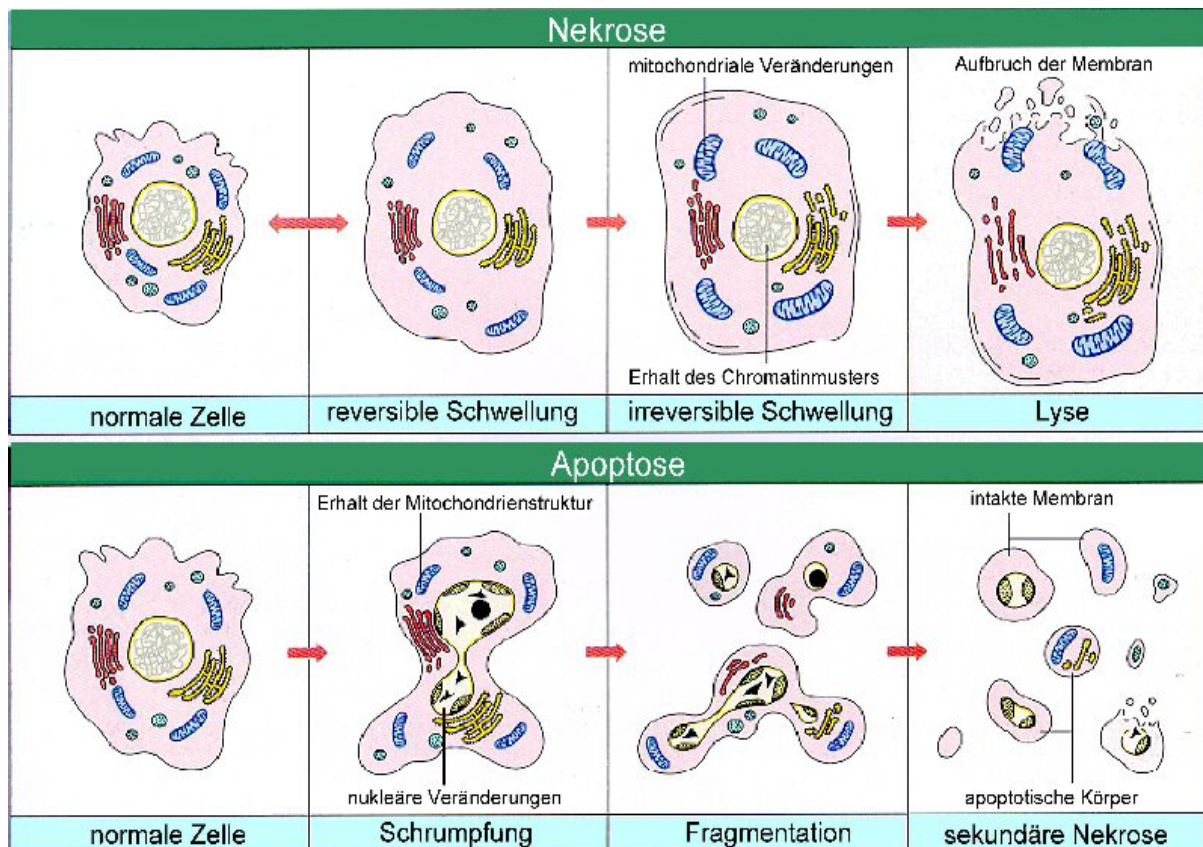


Abbildung 1: Morphologische Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods

2.2 Signalweg während der Apoptose

Die Apoptose kann über einen extrinsischen (rezeptorvermittelten) und einen intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg ausgelöst werden (Abbildung 2). Beide Wege enden über eine Caspasenkaskade in der Aktivierung von Caspase 3. Diese verursachen die typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen von apoptotischen Zellen (Kumar, 2007).

- Der rezeptorvermittelte oder extrinsische Weg
- Der mitochondriale oder intrinsische Weg

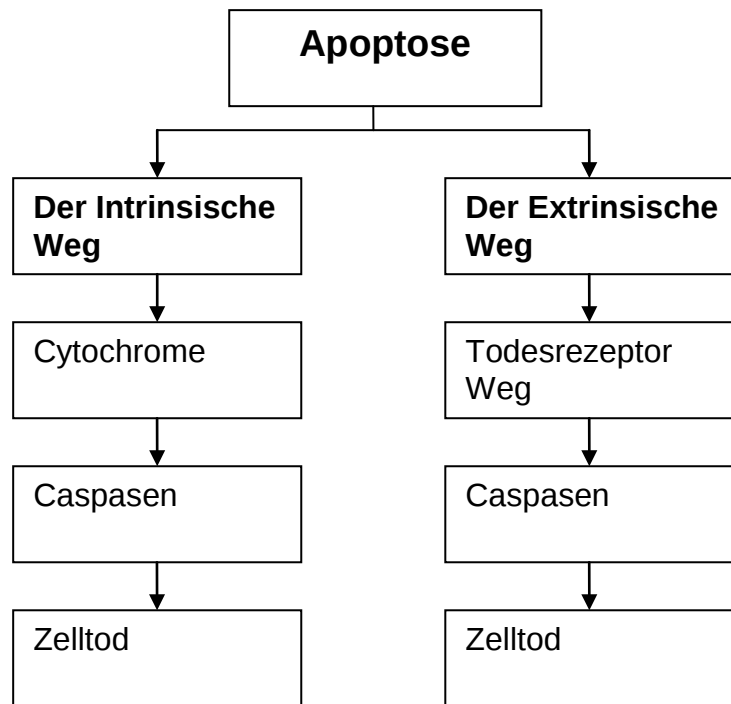


Abbildung 2: Signalweg der Apoptose

2.2.1 CASPASEN

Caspasen (Cysteiny-Aspartasen) spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Es handelt sich um Cysteinproteasen, die Peptidbindungen am C-Terminus von Aspartat spalten können. Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert. Durch Spaltung in ihre Untereinheiten werden sie aktiviert. In apoptotischen Zellen kann dies durch Autoproteolyse oder durch andere Proteasen geschehen.

Caspasen werden in drei Gruppen unterteilt:

- 1) Caspase-2, -8, -9 und -10 zählen zu den Initiatorcaspasen, die nach Autoaktivierung bei der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielen.
- 2) Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die für die Prozessierung der meisten zellulären Proteine verantwortlich sind.
- 3) Caspasen, die neben apoptotischen Funktionen auch an inflammatorischen Prozessen, wie der Zytokinreifung beteiligt sind (Caspase-1 und -11) (Thornberry und Lazebnik, 1998).

2.2.2 Der extrinsische Weg

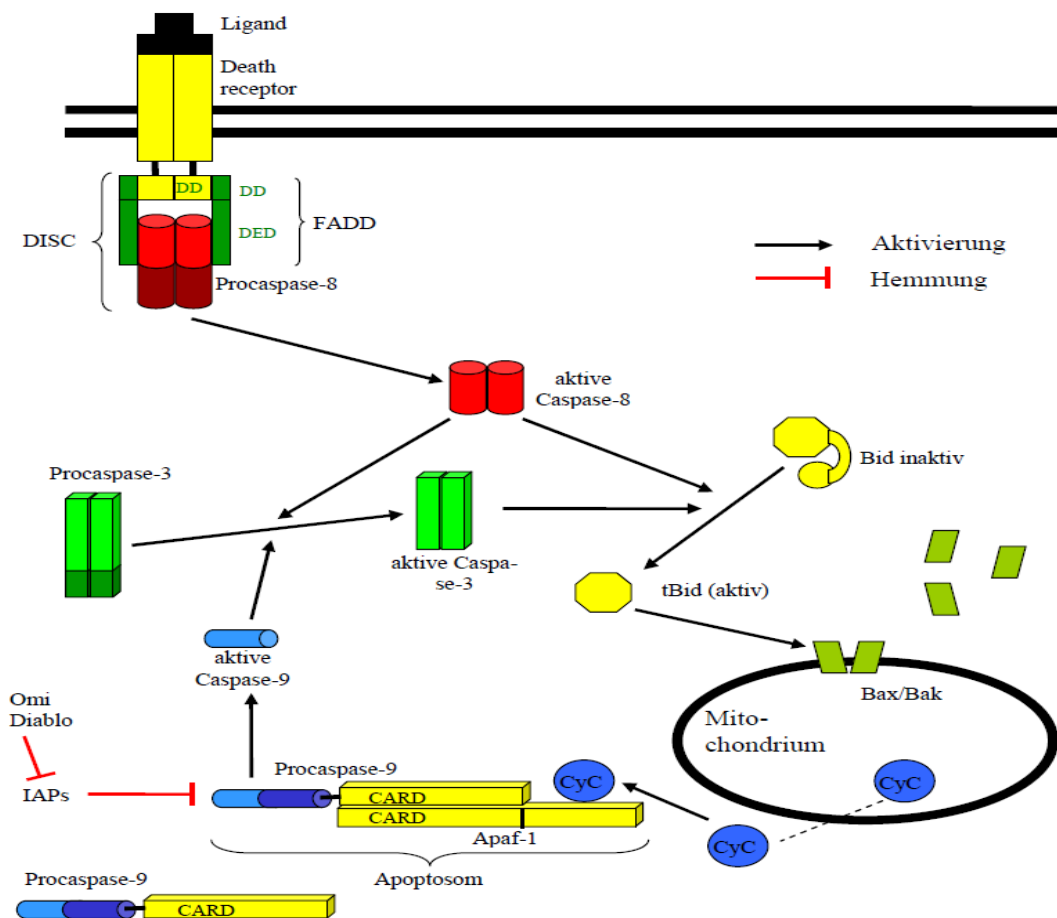
Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von spezifischen Liganden (zum Beispiel TNF-Rezeptor-1, Fas-Rezeptor) an Todesrezeptoren, wie zum Beispiel TNF α oder Fas-Ligand, die sich in der Zellmembran befinden, aktiviert. Todesrezeptoren besitzen ähnliche cystinreiche extrazelluläre Domänen und eine homologe zytoplasmatische Sequenz. Diese wird Todesdomäne (Death Domain = DD) bezeichnet.

Nach Bindung der jeweiligen Liganden folgt die Dimerisierung der intrazellulären Todesdomänen (DD) des heterotrimeren Rezeptors mit den entsprechenden Adapterproteinen TRADD (TNF-R Associated Death Domain protein) oder mit FADD (Fas Associated Death Domain). Die Todeseffektordomäne (DED) von FADD interagiert mit den Procaspasen 8 oder 10. Zusammen bilden sie den DISC-Komplex (Death Including Signalling Complex), der seinerseits die Procaspasen 8 und 10 aktiviert. Die aktivierte Caspase-8 oder -10 verläßt den Komplex, um zytoplasmatische Effektorcaspasen, wie die Caspase-3 zu aktivieren (Strasser et al., 2000).

Der Fas-Rezeptor kann über Bindung der Fas-Liganden aktiviert werden. Er spielt (Kawahara et al., 1998) beim Abtöten von virusinfizierten Zellen oder Krebs-Zellen durch zytotoxische T-Zellen bzw. Killer-Zellen eine wesentliche Rolle. Der Ligand des TNF-Rezeptors TNF α wird durch aktivierte Makrophagen und durch T-Zellen als Antwort auf eine Infektion gebildet (Tartaglia und Goeddel, 1992). TNF α aktiviert Caspase-8, die eine Caspasen-Kaskade zur Apoptose initiiert. Außerdem aktiviert Caspase-8 den intrinsischen Weg über Bid (Abbildung 3).

Die Initiierung der Apoptose über Todesrezeptoren hat bei der Behandlung von Tumoren Bedeutung. Todesrezeptoren aktivieren direkt die Caspasemaschinerie. Todeserezeptoren können auch, unabhängig vom Tumorsuppressorgen p53, das in

mehr als der Hälfte humaner Krebszellen vom inaktiven in den aktiven Zustand mutiert, Tumorzellen in Apoptose führen (Ashkenazi und Dixit, 1998).



Apaf-1: Bestandteil des Apoptosoms, bindet Procaspase-9 über und CyC

Apoptosom: Komplex aus CyC, Apaf-1 und Procaspase-9; führt zur Caspaseaktivierung

Bid: kann nach seiner Aktivierung (= tBid) zur Oligomerisierung von Bax/Bak führen

CyC: Cytochrom C: aus dem Zwischenmembranraum, Bestandteil des Apoptosoms

DD: Death domain: intrazelluläre Bindestelle des Death receptor an Adapterproteine

DED: Death effector domain: Bindestelle des Adaptorproteins an Procaspasen

DISC: Komplex aus Death receptor, Adapterprotein FADD und Procaspase-8

FADD: Adaptorprotein zwischen Death receptor und Procaspase-8

IAP: inhibitor of apoptosis protein: Inhibitor der Caspase: verhindert die Aktivierung der Caspase im Apoptosom, kann durch Omi/Diablo inhibiert werden

Omi und Diablo: im Rahmen der OMM-Permeabilisierung aus Mitochondrien freigesetzt, kann IAPs binden und damit die Caspaseaktivierung ermöglichen

Abbildung 3: Der extrinsische Weg der Apoptose

2.2.3 Der intrinsische Weg

Der intrinsische Weg der Apoptose führt über die Mitochondrien. Er wird hauptsächlich durch Stressfaktoren im Inneren der Zelle ausgelöst. DNA-Schäden, Veränderungen im Oxidations- und Reduktionsstatus der Zelle, Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen aktivieren diese Form des Zelluntergangs. Beeinflusst durch vorher genannte Faktoren kann es zur Ausschüttung von proapoptotischen Komponenten aus dem Intermembranraum der Mitochondrien kommen. Als Folge kommt es zum Verlust des Membranpotentials (Green und Reed et al., 1998).

Ein entscheidender Schritt bei der Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs ist die Freisetzung von Cytochrom C mit anschließender Aktivierung von Caspase-9.

Die Regulation von Überlebensfaktoren und Todessignalen führt zu einem dynamischen Gleichgewicht in der Zelle. Wenn dieses gestört wird kommt es zur Aktivierung des apoptotischen Programms. Bcl-2-Proteine spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie regulieren die mitochondriale Apoptose (Joule und Strasser, 2008). Strukturell und funktional lassen sich drei Untergruppen der Bcl-2-Proteinfamilie unterscheiden. Zum einen gibt es die Bcl-2-like Proteine, die die Apoptose verhindern können. Dazu zählen die Proteine Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w und Mcl1 (Abbildung 4).

Zum Anderen gibt es die Gruppe der Effektoren, zu der die Proteine Bak und Bax gehören. Diese Proteine sind die einzigen, die durch ihre Aktivierung die Ausschüttung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran veranlassen können (Abbildung 4).

Die letzte Gruppe, die eine Apoptose aktivieren kann, ist die der Initiator-Proteine. Die Proteine dieser Gruppe enthalten nur die BH3-Domäne und werden BH3-only Proteine genannt. Zu dieser proapoptotischen Gruppe gehören Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Bmf, Hrk, Noxa und Puma (Abbildung 4). Sie können durch apoptotische Stimuli aktiviert werden.

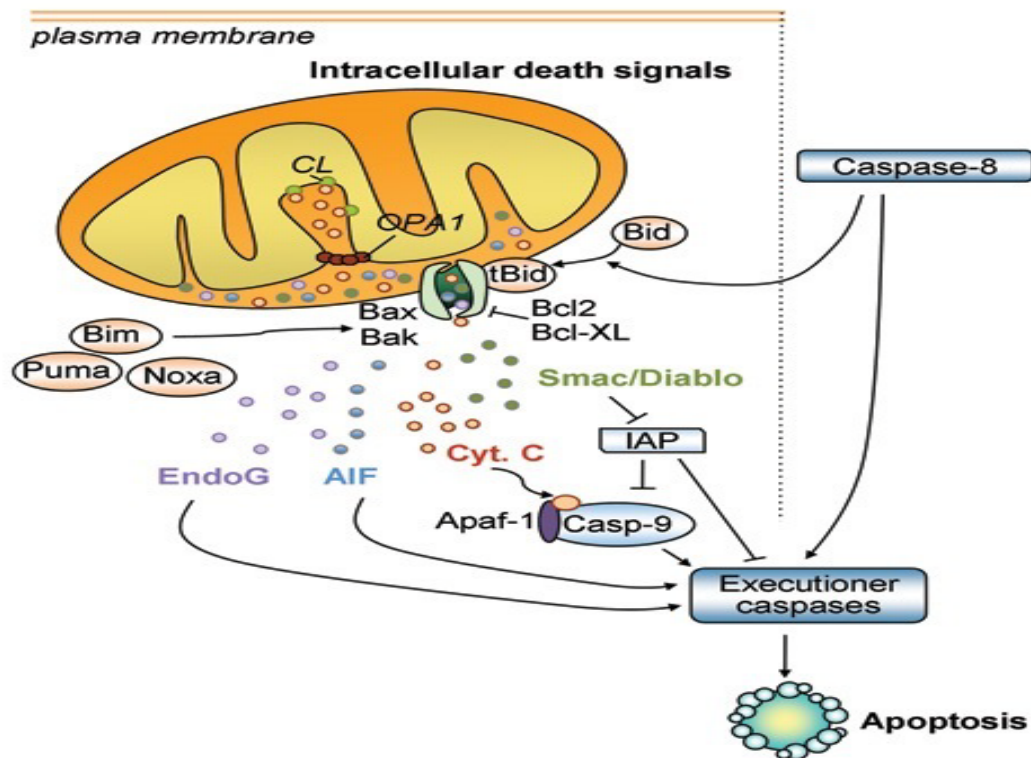


Abbildung 4: Der intrinsische Weg der Apoptose

Für den Ablauf der intrinsischen Apoptose wichtige Faktoren:

- **Bid**
 - Ist in der vitalen Zelle im inaktiven Zustand vorhanden.
 - Nach der Aktivierung durch GrB (Granzyme B) entsteht tBid, dieses führt durch Oligomerisierung von Bax/Bak zu einer CyC-Freisetzung (Luo et al., 1998).
- **Bax/Bak**
 - Sind inaktive Monomere in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) in vitalen Zellen
 - Durch Aktivierung der tBid und fehlende Hemmung der Bcl-2 kommt es zu einer Konformationsänderung und Oligomerisierung.

- Die so entstandenen Oligomere führen zu Brüchen in der OMM (äußere Mitochondrialemembran) und setzen CyC frei (Gross et al., 1999).
- **Bcl-2** (B-cell lymphoma 2 protein)

Dieses wurde als erstes Mitglied einer apoptoseregulierenden Genfamilie identifiziert (Tsujimoto et al., 1984). Es gibt weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie, aber auch verwandte Proteine, die aufgrund von Sequenzhomologie oder wegen ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert werden konnten (Chao et al., 1998). Sie können hinsichtlich ihrer Aktivität in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, nämlich in proapoptotische und in antiapoptotische Proteine (Abbildung 5).

Für viele zelluläre Systeme wird angenommen, dass das molare Verhältnis zwischen proapoptotischen (Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bid, Bik, Hrk u.a.) und antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 u.a.) Mitgliedern der Bcl-2-Familie über die Empfänglichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen entscheiden kann (Oltvai et al., 1993). Die Proteine der Bcl-2-Familie, von denen über 28 Mitglieder in Säugerzellen gefunden wurden, sind von entscheidender regulativer Bedeutung bei der mitochondrial vermittelten Apoptose (Gross et al., 1999; Gross, 2001).

Der Namensgeber der Familie, das antiapoptotische Bcl-2, ist ein integrales Protein der Mitochondrienmembran. Viele proapoptotische Mitglieder der Familie, wie z.B. Bid oder Bad, sind hingegen zytosolisch oder nur lose an die Membranen gebunden. Andere, wie z.B. Bcl-XS und Bax konnten erst nach ihrer Aktivierung in der mitochondrialen Membran lokalisiert werden.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Proteine der Bcl-2-Familie ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Homo- wie auch Heterodimeren, zusammen mit anderen Mitgliedern der Familie. Einige Proteine, die ebenfalls zur Bcl-2-Familie gehören (z.B. Bcl-XS und Bad) entfalten ihre proapoptotische Wirkung durch kompetitive Dimerisierung mit antiapoptotischen Proteinen.

Wenn beispielsweise ein Überschuss an Bcl-2 vorliegt, kommt es zur Bildung von Bcl-2-Homodimeren und das hemmt in weiterer Folge die Apoptose. Bei einem Überschuss an Bcl-Xs können hingegen insbesondere Bcl-2/Bcl-Xs-Heterodimere

gebildet werden, wodurch die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2 unterbunden wird (Gross et al., 1999; Kroemer, 1997).

Die Bcl-2-Genfamilie enthält bis zu vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH 1-4). Einige verfügen über eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM). Die Bcl-2-Familie besteht aus pro- und antiapoptotischen Mitgliedern, wobei die proapoptotischen nochmals in Multi-BH-Domänen-Proteine und in BH3-only-Proteine unterteilt werden können (Gross et al., 1999). Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen BH1-BH4 mit jeweils alphahelikaler Struktur (Adams und Cory et al., 1998; Tsujimoto und Shimizu, 2000a, b).

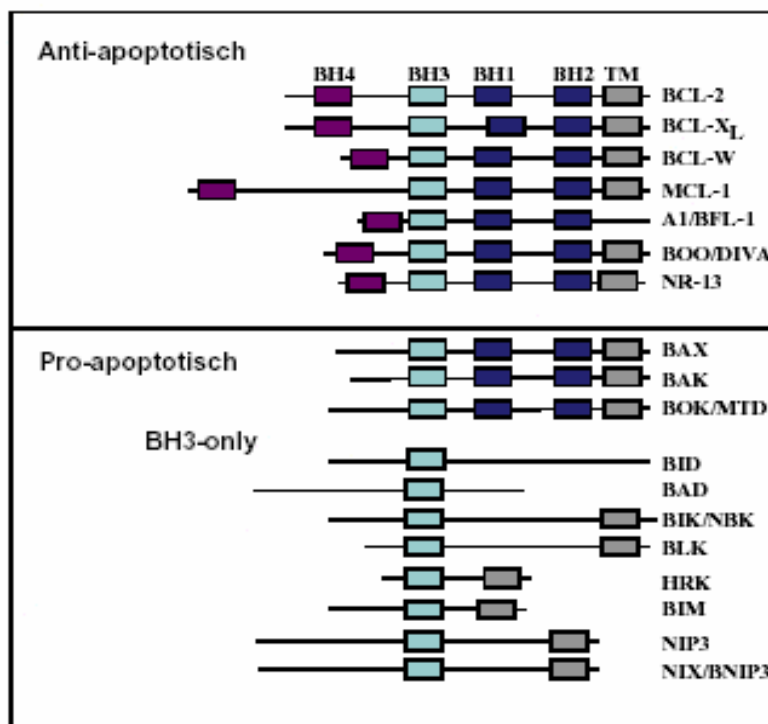


Abbildung 5: Mitglieder der Bcl-2 Familie

Während die antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1 alle vier Domänen tragen, fehlen den proapoptotischen Proteinen entweder die aminoterminal gelegene BH4-Domäne und/oder die BH1- und die BH2-Domäne. Nur die BH3-Domäne, die als potentielle „Todesdomäne“ dient, scheint alle notwendigen Charakteristika der proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie zu beinhalten. Zusätzlich besitzen viele der Mitglieder eine carboxyterminale, hydrophobe Domäne TM, die für die Membranlokalisation entscheidend ist (Nguyen et al., 1993). Wenige

der proapoptotischen Proteine dieser Familie besitzen auch die BH4-Domäne, wie Bcl-XS und Bcl-Rambo.

- **Cytochrom C**

- Ist ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette
- Es wird nach dem Verlust der mitochondrialen Integrität freigesetzt und bildet zusammen mit Apaf-1 und der Caspase-9 das Apoptosom, das dazu führt, dass es zu einer autokatalytischen Aktivierung der Caspase-9 kommt.

- **Smac; HtrA2**

- Proapoptotische Proteine im mitochondrialen Membranzwischenraum
- Zusammen mit CyC aus den Mitochondrien freigesetzt
- Ermöglichen durch Bindung des Caspaseinhibitors XIAP die Aktivierung der Caspase-3

2.2.4 Regulator der Apoptose p53

Das humane Tumorsuppressorprotein p53 besteht aus 393 Aminosäuren (Mucin 387 AS) und hat eine Größe von 53 kDa (Masse Dalton). Seine genetische Information ist auf dem Chromosom 17p3.1 lokalisiert (Lane und Crawford, 1979).

P53 hat antiproliferative und proapoptotische Wirkung, welche durch Kombination von Genaktivierung (zum Beispiel p21WAF1 (Wild-type p53-activated Fragment) und Bax), Genunterdrückung (zum Beispiel IGF II (Insulin Growth Factor) und Bcl-2) und durch direkte Interaktionen zwischen Proteinen (zum Beispiel Helicase und Caspase) vermittelt wird (Lohrum und Vousden, 2000; Gottlieb und Oren, 1998). p53 wirkt als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung. Es kontrolliert den Zellzyklus, kann eine Apoptose induzieren und zur DNA-Reparatur führen. P53 wird aus diesem Grund auch „guard of the genome“ bezeichnet (Kern et al., 1991; Lane, 1992).

Die Rolle des p53 beim Vorgang der Apoptose lässt sich wie folgt schematisiert darstellen (Abbildung 6):

Durch eine DNA-Schädigung (Rich et al., 2000), bedingt durch genotoxischen und nicht genotoxischen Stress (Vogelstein et al., 2000; Vousden und Lu, 2002) werden DNA-abhängige Proteinkinasen aktiviert. Das Ziel dieser Schädigung ist die Phosphorylierung von p53.

Auslöser der p53-Aktivierung können DNA-Schäden oder Schädigungen von Komponenten sein, die für die Kontrolle und die Verteilung des zellulären genetischen Materials notwendig sind, wie z.B. der mitotische Spindelapparat, Ribonucleotid-Depletion, Hitzeschock, Hypoxie, NO-Exposition oder auch durch Onkogene, wie Myc, Ras, E1A (Hermeking und Eick, 1994; Serrano et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor p53 liegt im Normalzustand gebunden mit dem Onkoprotein Mdm2 (murine double minute gen2) und anderen negativen Regulatoren vor (Barak et al., 1993, Wu et al., 1993). Mdm2 blockiert die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von p53. P53 wiederum begünstigt eine Ubiquitinierung und die Proteasom-vermittelte Degradierung.

Durch die Phosphorylierung von p53 und Mdm2 können beide Proteine nicht mehr in Wechselwirkung treten, sodass p53 aufgrund dieser kovalenten Modifikation aktiviert und stabilisiert wird. Somit nimmt die p53-Proteinmenge zu. Dieser Prozess wird auch „overtranslation“ bezeichnet und führt zur Akkumulierung von p53 (Levine, 1997; Perry und Levine, 1993).

Somit erhöht sich auch die Halbwertszeit des normalerweise kurzlebigen Proteins. p53 bindet *in vivo* als Tetramer an die DNA (Lane, 1992; Levine, 1997) und kann in der Folge Zielgene aktivieren oder hemmen und zelluläre Funktionen steuern.

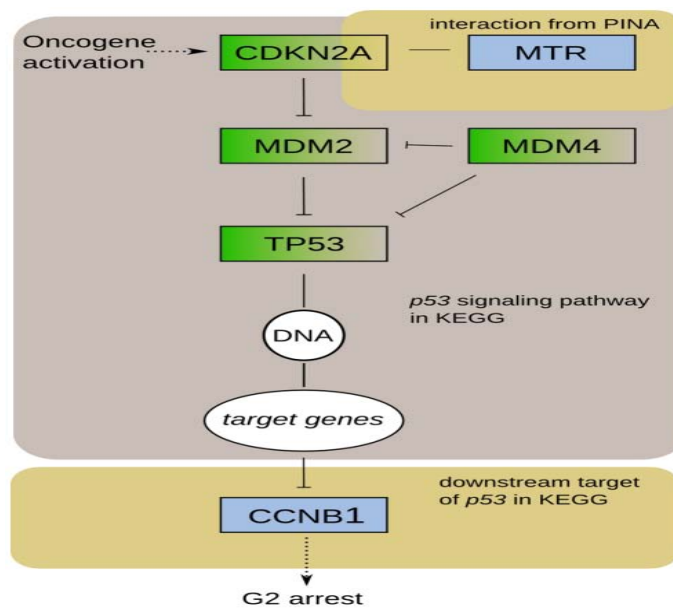


Abbildung 6: p53 Weg (PubMed, 2008)

Das p53-Protein leitet bei irreparablen Schäden durch Aktivierung einer Enzymkaskade, den programmierten Zelltod ein. Dies erfolgt in erster Linie durch die Regulation des bax-Gens, wodurch die Apoptose-Geschwindigkeit kontrolliert wird (Steller, 1995).

Unter normalen Bedingungen bilden bax und bcl-2 Heterodimere und halten dadurch ein Gleichgewicht. p53 induziert die Expression von bax und verändert das Gleichgewicht zu Gunsten von bax, das dann den Apoptoseweg initiiert (Miyashita et al. 1994)

Die bcl-2-Expression wiederum kann die p53-vermittelte Apoptose komplett verhindern. Anstelle einer Auslösung der Apoptose führt dies dann zum Zellzyklus-Arrest.

Dies könnte zu seiner onkogenen und antiapoptotischen Aktivität beitragen (Chiou et al., 1994). Ein alternatives Modell der p53-vermittelten Apoptose bezieht die transkriptionelle Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Reaktive Sauerstoff Spezies) und den oxidativen Abbau mitochondrialer Komponenten mit ein, die zum programmierten Zelltod führen (Polyak et al., 1997). Der Abbau von p53 wird vor allem durch mdm2 (mouse-double-minute-2 protein) und jnk (c-jun N-terminal kinase) gefördert (Oren, 1999).

Das mdm2-Protein spielt in der Regulation von p53 eine zentrale Rolle. Es bindet an p53 und bedeckt dessen Transaktivierungs-Domäne. Dadurch werden p53-abhängige Effekte im Zellzyklus-Arrest und in der Apoptose ausgeschaltet.

Außerdem fördert mdm2-Protein den schnellen proteosomalen Abbau von p53 (Kubbutat et al., 1997). Nach Zellstress wird p53 an verschiedenen Stellen phosphoryliert und verliert die Affinität zu mdm2 mit der Folge reduzierten Abbaus. Dies trägt zur Stabilisierung von p53 bei (Oren,1999).

2.2.5 Regulator der Apoptose p21

Das p21-Protein besteht aus 164 Aminosäuren und besitzt zwei Cyclin-Bindungsmotive (Cy1 und Cy2), die jeweils das Motiv RXL (Arg-X-Leu) als zentralen Bestandteil aufweisen. Dieses ist typisch für CDK (Cyclin-dependent Kinase) und Cyclin-interagierende Proteine. Während Cy1 N-terminal liegt, befindet sich Cy2 innerhalb des C-terminalen Bereiches (Child und Mann, 2006). Das N-terminale CDK-Bindungsmotiv (K) ist zusammen mit der zentral gelegenen 310-Helix für die CDK-Bindung verantwortlich. Der C-Terminus von p21 beinhaltet neben Cy2 ein NLS (Nukleäres Lokalisationssignal) sowie die PCNA (proliferatingcellnuclearantigen)-Bindungsdomäne (Rodriguez-Vilarrupla et al., 2002, Flores – Rozas et al., 1994) (Abbildung 7).

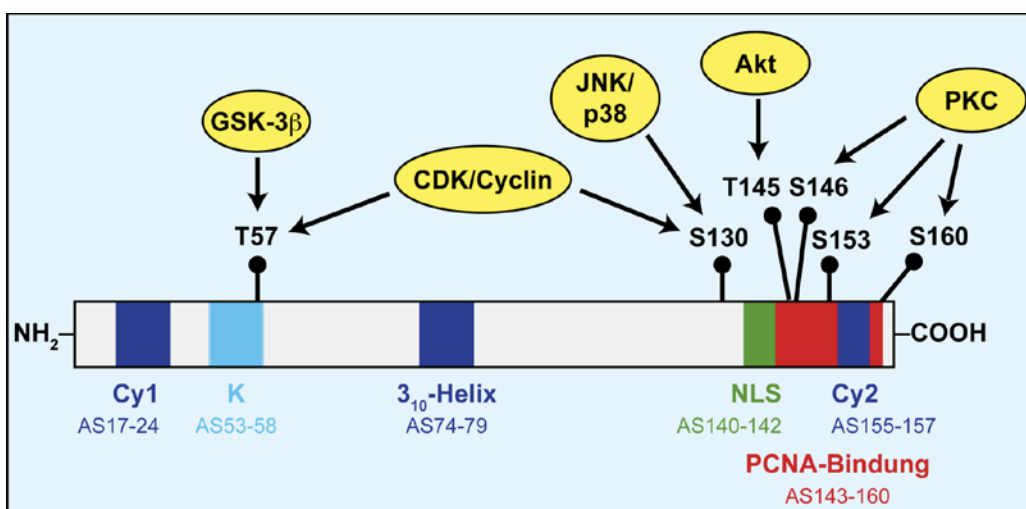


Abbildung7: Struktureller Aufbau des p21-Proteins und wichtige Phosphorylierungsstellen (Child und Mann, 2006).

Die wichtigste Funktion von p21 in der p53-vermittelten Zellantwort auf genotoxischen Stress besteht in der Arretierung der Zelle in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus sowie in der Induktion zellulärer Seneszenz bei irreparablen DNA-Schäden.

Großteils geschieht dies über den Vorgang der Hemmung entsprechender CDK/Cyclin-Komplexe, an denen CDK1 (auch bekannt als CDC2, cell division cycle 2), CDK2, CDK4 oder CDK6 beteiligt sind. Die Inhibition der katalytischen Aktivität dieser CDKs ist auf die Blockierung der ATP-Bindungsstelle durch Tyr77 der 310-Helix von p21 zurückzuführen (Child und Mann, 2006; Russo et al.,1996). p21 verdrängt außerdem, durch die Bindung an die Cyclin-Untereinheit über seine Cy-Domänen jene Substrate vom CDK/Cyclin-Holoenzym, die vergleichbare Cy-Domänen an diese binden (Abbas et al.,2009). Des Weiteren bindet p21 an das PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), das ein wichtiges Hilfsprotein, unter anderem für die DNA-Polymerasen ist, und hindert dieses an seiner Funktion DNA zu synthetisieren (Luo et al.,1995). Auf diese Weise verdrängt p21 verschiedene für die DNA-Replikation essentielle Proteine und ist zusätzlich ein negativer Regulator für PCNA-abhängige DNA Reparaturprozesse (Abbas et al.,2009).

Neben der Zellzyklus-arretierenden Funktion besitzt p21 auch ein großes anti-apoptotisches Potential und kann auf diese Weise das Überleben der Zelle sichern.

An den Mitochondrien erfolgt die Bindung von p21 mittels seiner N-terminalen Domäne an Procaspase-3. Dadurch wird die Aktivierung dieser Effektor-Caspase verhindert (Janicke et al.,2007). Außerdem hemmt p21 durch direkte Interaktion die pro-apoptotische Kinase ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) (Janicke et al., 2007), die bei oxidativem Stress, ER (endoplasmic reticulum)-Stress sowie bei TNF-vermittelten Apoptose-Signalen, wie MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) und c-Jun N-terminal kinase (JNK) aktiviert wird (Takeda et al., 2003). Diese beiden MAPKs können durch p21 aber auch direkt gehemmt werden (Shim et al.,1996). Wichtig für die anti-apoptotische Wirkweise von p21 ist auch die Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen, welche innerhalb des Apoptose-Signalweges unterhalb der Mitochondrien und oberhalb der Caspase-9 Aktivierungen stehen (Janicka et al., 2007; Sohn et al., 2006).

Ein unerwarteter Aspekt der p21-Funktion ist, dass sie unter entsprechenden Umständen proliferationsfördernd wirken kann.

Während große Mengen an nukleärem p21 durch CDK- (Cyclin-Dependent Kinase) Inhibition einen transienten oder irreversiblen Zellzyklus-Arrest induzieren oder die Zelldifferenzierung vorantreiben, zeichnet sich zytosolisches p21 durch die Förderung der Assemblierung von CyclinD mit CDK4 oder CDK6 aus und vermittelt darüber hinaus die Translokation dieser CDK/Cyclin-Komplexe in den Zellkern (Abbas et al., 2009; Cheng et al., 1999; LaBaer et al., 1997). Außerdem verhindert nukleares p21, wenn es nur in geringen Mengen vorliegt, den Export von Cyclin D1 aus dem Zellkern (Alt et al., 2002).

Wie vielfältig p21 wirksam ist, zeigt sich auch anhand seiner positiven und negativen Regulationsmöglichkeiten im Rahmen der Genexpression. Die Gene, die durch p21 regulierbar sind, beteiligen sich auch an der Zellzyklus-Kontrolle, der DNA-Reparatur oder der Seneszenz-Induktion. Außerdem besitzen sie anti-apoptotische Funktionen (Chang et al., 2000). Es konnte zwar eine direkte Bindung von p21 an bestimmte Promotorsequenzen nachgewiesen werden (Zhu et al., 2002), meist jedoch findet eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Co-Aktivatoren statt.

Auf diese Weise kann p21 beispielsweise ausgewählte E2F-Zielgene aktivieren oder reprimieren (Chang et al., 2000; Delavaine et al., 1999; Dimri et al., 1996). Dies findet nicht nur indirekt durch Inhibition des CDK/Rbp- (Retinoblastoma-Protein) Signalweges statt, sondern auch durch direkte Bindung von p21 an den Transkriptionsfaktor E2F (Delavaine et al., 1999; Dimri et al., 1996).

Die Expression des Onkogens c-Myc, welches an der Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung und Apoptose-Induktion beteiligt ist und u. a. die Expression von CDK2/CyclinE positiv reguliert, kann durch p21 gehemmt werden (Vigneron et al., 2006).

Auch zählt c-Myc, wie p300/CBP (CREB-binding-protein) zu den Transkriptionsfaktoren, mit denen p21 interagiert (Coqueret, 2003; Perkins et al.,

2002). Die Bindung von p21 an c-Myc inhibiert dessen transkriptionelle Aktivität und vermittelt wahrscheinlich einen Schutz vor c-Myc-induzierter Apoptose (Janicke et al., 2007). Andererseits kann c-Myc, als transkriptioneller Repressor, die Expression von p21 unterdrücken.

P21 hat, wie man sieht, teilweise völlig gegensätzliche Funktionen. Je nach zellulärem Kontext und dem jeweiligen Zustand der Zelle, zeigt sich, dass dieses Protein sowohl tumorsuppressives als auch onkogenes Potential hat (Abbas et al., 2009).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Die Testsubstanz

Die Testsubstanz KR7 wurde von Dr. Roman Labuda (Romer Labs Division Holding GmbH, 3430 Tulln, Austria) zur Verfügung gestellt. KR7 wurde in autoklaviertem Wasser gelöst. Um die gewünschten Konzentrationen für die Versuche zu erhalten, habe ich das gelöste Konzentrat mit dem Nährmedium verdünnt. Bei der Zugabe von Nährmedium fiel KR7 allerdings aus, sodass alle Tests mit einer Suspension durchgeführt werden mussten. Aus diesem Grund war es wichtig, die Flüssigkeit vor jeder Verdünnung durchzumischen, um sicher zu sein, dass man eine gleichmäßige Verteilung von KR7 erhält. Insgesamt wurden 7 unterschiedliche Konzentrationen angewendet.

Parallel zu meiner praktischen Arbeit wurde an der TU -Wien versucht, die Struktur von KR7 aufzuschlüsseln. Das Molekulargewicht wurde mit 228 g/mol angegeben und die Struktur ist ein 3,6-Dihydro-4-methoxy-6-oxo-2H pyran-2-yl Pentanoat. Ausgehend von diesem Wert wurden von mir die Verdünnungen angefertigt. In der folgenden Tabelle liste ich die verwendeten Konzentrationen in μM auf.

Verwendete KR7- Konzentration							
μM	0,3	1	3	10	30	100	300

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten KR7 Konzentrationen

3.2. Zelllinien und zugehörige Nährmedien

Die Toxizität der Substanz wurde an vier Krebs-Zelllinien und an einer nicht entarteten Zelllinie getestet.

3.2.1. Krebs-Zelllinien

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

3.2.2. Nicht entartete Zelllinien

- HEK293: Humane embryonale Nierenzellen (von ATCC)

3.2.3. Nährmedien

Die Zelllinien KB-3-1, A549 und CACO2 wurden auf RPMI-1640 Medium (Sigma), welche 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.

Die HEK-zellen wurden mittels DMEM/F-12 (x) (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 Wärmebad auf 37°C erwärmt.

Sämtliche Zelllinien wuchsen adhärent. Das bedeutet, dass sich die im Nährmedium schwimmenden Zellen mit der Zeit absetzen und am Boden des Kulturgefäßes anhaften. Dort beginnen sie zu wachsen und sich zu vermehren. Abgestorbene Zellen lösen sich vom Boden ab und schwimmen frei im Medium.

3.3.2. Auftauen der Zellen

Bevor die Zelllinien verwendet werden, sind sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Sie werden bei Bedarf aufgetaut. Jede Zelllinie befindet sich in einem eigenen Eppendorf-Gefäß.

Nach Entnahme des Gefäßes aus dem Stickstoff-Behälter wird dieses kurz in ein Wasserbad gegeben, bis sich der Inhalt verflüssigt. Die Zellsuspension wird mittels Einmalpipette entnommen und in eine zuvor beschriftete Kulturflasche mit geeignetem Nährmedium überführt. Dann wird die Flasche bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Nährmedium gewechselt, um das zelltoxische DMSO, welches den Zellen vor dem Einfrieren zugesetzt wird, zu entfernen.

3.3.3. Wechseln des Nährmediums

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

das alte Nährmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Dabei werden auch bereits abgestorbene Zellen, die frei im Nährmedium schwimmen, entfernt. Die lebenden Zellen hingegen bleiben in der Kulturflasche, da sie am Boden anhaften.



Abbildung 7: Die Zellkulturflasche mit Nährmedium

3.3.4. Passagieren

Nachdem sich die Zellen in der Kultflasche kontinuierlich vermehrt haben, ist je nach Verdopplungszeit der jeweiligen Ziellinie, nach einigen Tagen der Boden der Flasche zur Gänze bedeckt (konfluent). Unter solchen Bedingungen können sich die Zellen nicht weiter vermehren und sterben ab. Aus diesem Grund wird an jedem Tag unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen noch ausreichend Platz haben. Sobald etwa 90% des Bodens bedeckt sind, wird ein Teil der Zellen entnommen und in eine neue Kulturflasche überführt. Dieser Vorgang wird auch „passagieren“ genannt. Die Passagezahl wird auf den Kulturgefäßen notiert.

Um die Zellen entnehmen zu können, müssen sie sich zuerst vom Boden der Kulturflasche ablösen. Dies wird 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 wirkt und die Zellen zum Absterben bringen würde.

Durchführung

1) Trypsinisieren

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

2) Splitten

Von der so erhaltenen Zellsuspension wird ein Teil in ein frisches Kulturgefäß überführt und dieses mit frischem Medium auf 5 bzw. 10 ml aufgefüllt. Diesen Vorgang nennt man „Splitten“. Die so erhaltene neue Passage wird im Inkubator weiter kultiviert. Die nicht mehr benötigte Zellsuspension wird 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 wird 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 werden etwa 5 ml Medium hinzu pipettiert und mittels vortexen werden die Zellen gleichmäßig suspendiert.

Um die Zellzahl zu bestimmen werden nun 10 μ l der Suspension entnommen, mit 10 μ l Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4%; Sigma) vermischt und davon wieder 10 μ l unter das Deckblatt einer Neubauer-Zählkammer (Abbildung 8) pipettiert. Die Zugabe von Trypanblau dient dazu tote Zellen blau anzufärben. Das Zählen erfolgte unter dem Mikroskop. Man sieht ein Netz aus vier gleich großen Quadraten, die, um die Auszählung zu erleichtern, nochmals in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Lebende Zellen sind als helle Punkte auf dunklem Grund sichtbar. Blaue Zellen werden nicht mitgezählt.

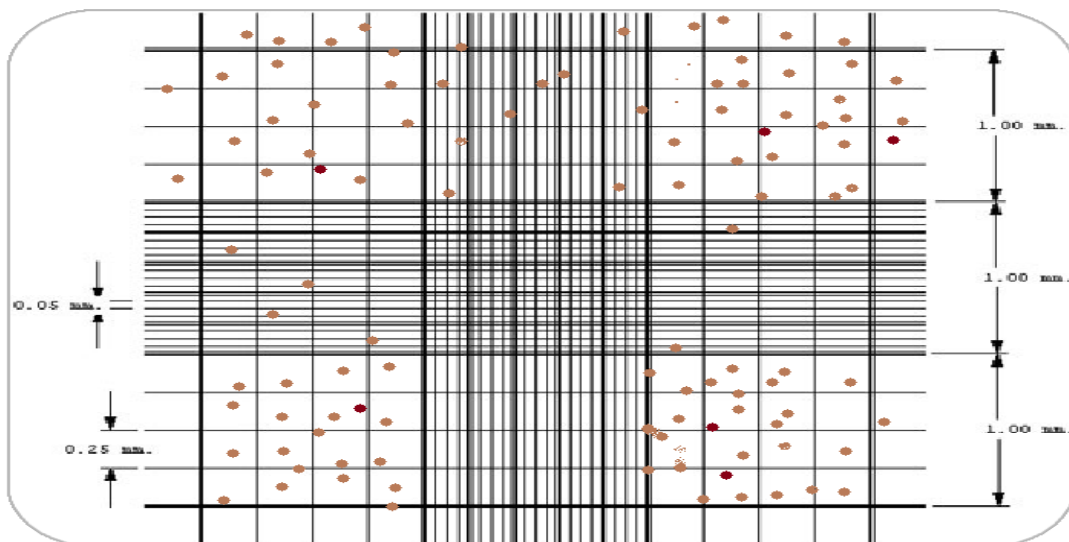


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Zählkammer

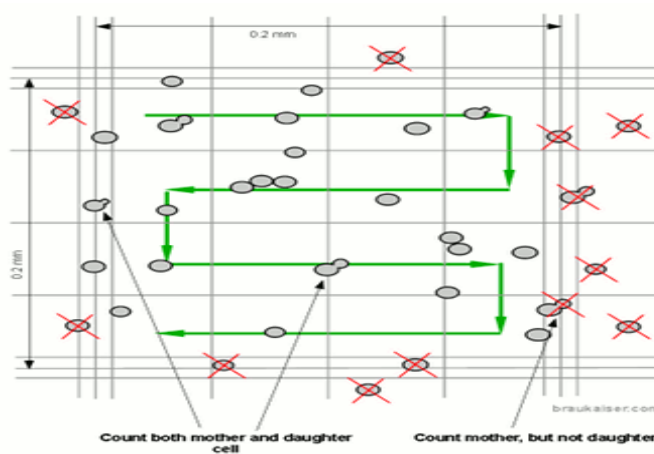


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Zählkammer

Um die Zellen, die sich genau auf einer Randlinie eines Quadrates befinden nicht doppelt zuzählen, werden pro Feld immer nur die Punkte auf der linken und oberen Randlinie beachtet (Abbildung 9). Jedes der vier großen Quadrate wird separat ausgezählt, die jeweilige Anzahl der Zellen notiert und danach aus den vier gewonnenen Werten der Mittelwert bestimmt. Da die Zellsuspension vorher 1:1 mit Trypanblau verdünnt wurde, wird der Mittelwert mit dem Faktor 2 multipliziert. Das Ergebnis beschreibt die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension (Tabelle 3).

Zellzahl:		Mittelwert:	Verdünnungsfaktor:	Ergebnis:
1.Quadrat	116	}111,25	*2	222,5*10 ⁴ Zellen/ml
2.Quadrat	89			
3.Quadrat	113			
4.Quadrat	107			

Tabelle 3: Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension

3.4. EZ4U-Zytotoxizitätstest

Testprinzip

Lebende Zellen besitzen die Fähigkeit Tetrazoliumsalze zu rot gefärbten Formazanderivaten zu reduzieren (Abbildung 10). Über die Intensität der Färbung lässt sich daher der Anteil lebender bzw. abgestorbener Zellen feststellen [Beipacktext EZ4U „Easy for you"—non radioactive cell proliferation and cytotoxicity assay; Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co]



Abbildung 10: Umsetzung: Tetrazolium→Formazan

Durchführung

Ansetzen der Zellen auf 96-Wellplatten:

Nach Ermittlung der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration verdünnt (Tabelle 4) 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 denselben Bedingungen kultiviert werden. Die Platten wurden nun einen Tag lang inkubiert, bis sich die Zellen auf dem Boden absetzten.

		KB-3-1 A549 CACO2H CT116	HEK
	8, 16	$5 \cdot 10^4$ Zellen/ml	$1 \cdot 10^5$ Zellen/ml
Inkubationszeit (h)	24, 48, 72	$2 \cdot 10^4$ Zellen/ml	$5 \cdot 10^4$ Zellen/ml

Tabelle 4: verwendete Zellzahl/ ml in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der jeweiligen Zelllinie

Zugabe der Testsubstanz

Das Toxin wurde mit dem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (dabei wurde die 1:1 Verdünnung auf der Platte berücksichtigt und aus diesem Grund wurde das Toxin stets doppelt so hoch konzentriert). Es wurden jeweils drei Wells mit derselben Toxin-Konzentration 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 anschließend 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-Wells, in welchen sich keine Zellen befanden, durchgeführt. Die Platten wurden nun für 2 Stunden inkubiert. Sobald sich die Kontrolle ziegelrot angefärbt 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 der Leerwert abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden in Prozent umgerechnet, wobei die Kontrolle als Grundwert (= 100%) gilt. Das Ergebnis beschreibt wieviele Prozent der Zellen überlebten. Die Berechnungen und das Erstellen der Graphiken erfolgten mittels Excel bzw. Sigma Plot.

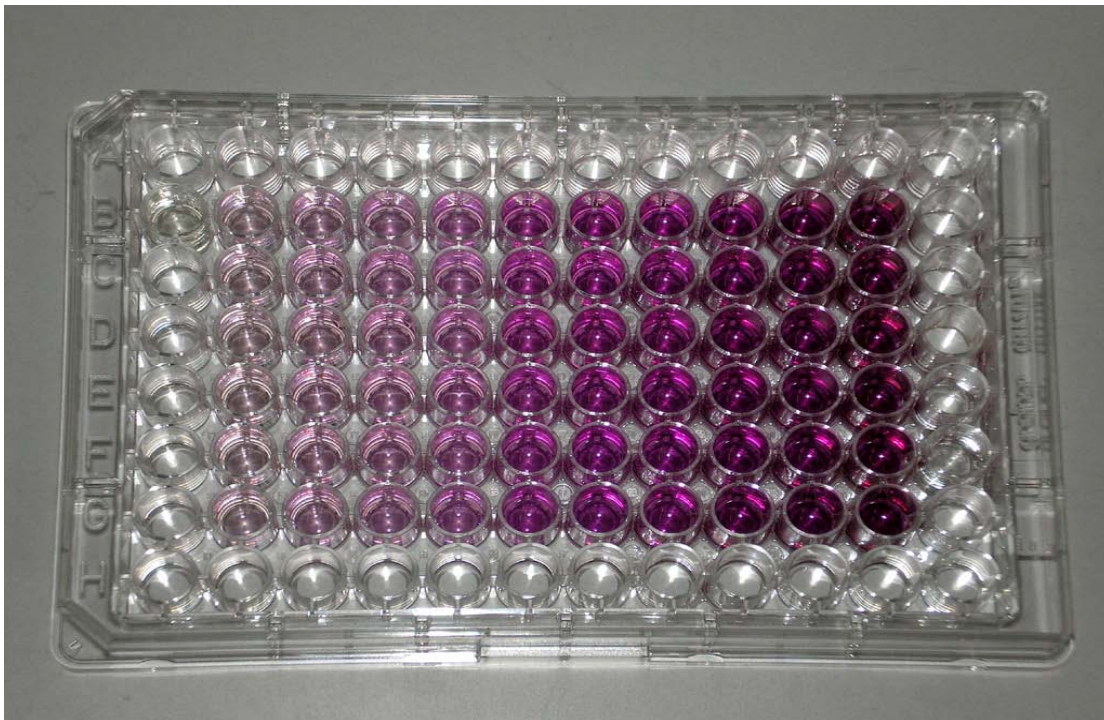


Abbildung 11 : EZ4U- Zytotoxizität Test

4 RESULTATE UND DISKUSSION

4.1 Zytotoxizität auf Cervixkarzinom-Zelllinien (KB-3-1)

Die Cervixkarzinom-Zelllinien KB-3-1 reagierten auf eine geringe Konzentration von KR7 stark proliferierend. Nach 8-stündiger Inkubation mit 0,3 μM KR7 stieg die Anzahl der lebenden Zellen auf 120%. Mit einer Konzentration von 1 μM fand man noch 100% überlebende Zellen nach 24- bzw 48-stündiger Inkubation. Erst ab 30 μM kann man in der graphischen Darstellung, abhängig von der Einwirkungszeit, eine zytotoxische Wirkung erkennen. Nach 8 Stunden Inkubationszeit mit 30 μM fand man jedoch noch immer 90 % lebende Zellen. Die Dosis-Wirkungskurven für 24, 48 und 72 Stunden Inkubation unterscheiden sich nur minimal voneinander (Abbildung 12).

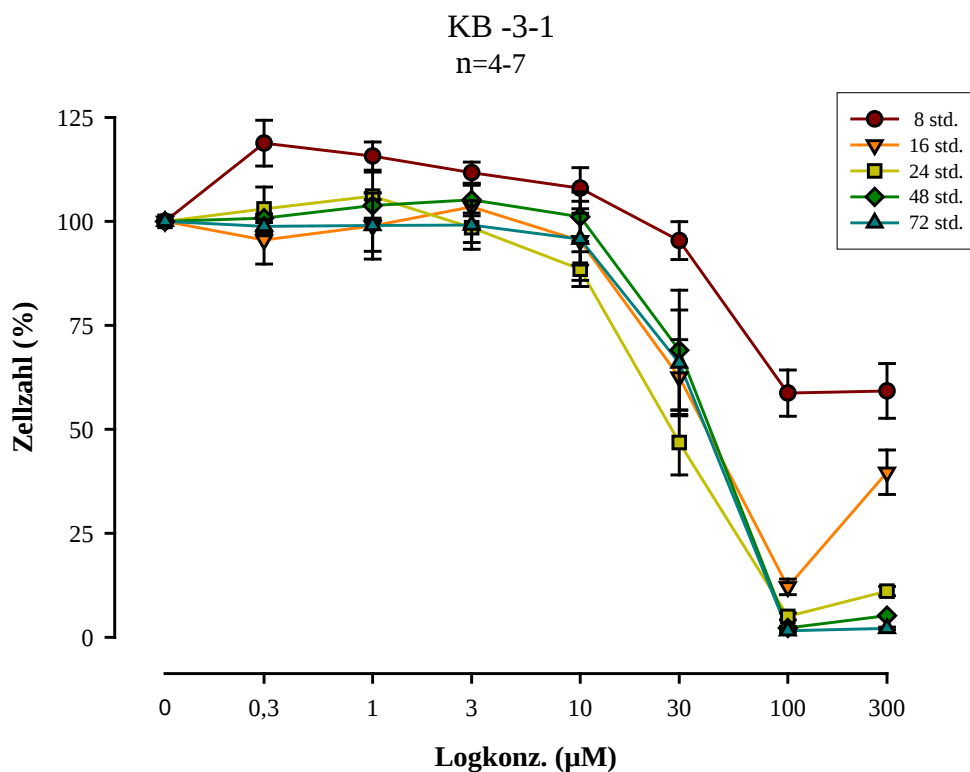


Abbildung 12 : Zytotoxizität auf Cervixkarzinomzellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer

Paradoxerweise kann man z.B. nach 16 stündiger Inkubation und 100 μM KR7 sehen, dass mehr Zellen zu Grunde gingen, nämlich 80 %, als bei einer höheren Konzentration von 300 μM KR7, bei der 40% der Zellen überlebten. Möglicherweise liegt die Erklärung dafür darin, dass die hohe Toxinkonzentration eine gesteigerte Stressreaktion auslöst, die dazu führte, dass die Zellproliferation angeregt wurde. Es ist daher wichtig, die Substanz ausreichend lange einwirken zu lassen, um alle Zellen abzutöten, da sonst möglicherweise ein gegenteiliger, unerwünschter Effekt eintritt.

4.2 Zytotoxizität auf HEK-Zellen

Bei der HEK Zelllinie sah man nach 8-, 48- und 72-stündiger Inkubation bei niedriger Konzentration keine beträchtliche zytotoxische Wirkung (Anzahl der lebenden Zellen beträgt über 100%). Nach 72-stündiger Inkubation, bei einer Konzentration von 10 μM blieb die Anzahl der lebenden Zellen über 100%, bei 30 μM überlebten nach 8-, 16-, 24- und 72-stündiger Inkubation über 50% der Zellen. Nach 8- bzw. 16-stündiger Inkubationszeit bei 100 μM starben 80% der Zellen ab. Bei einer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 Stunden hingegen, wurden alle Zellen durch KR7 bei einer Konzentration von 100 μM abgetötet.

Die Dosis-Wirkungskurven für 48 und 72 Stunden Inkubation unterscheiden sich hier nur minimal von einander. Der größte Effekt ist bereits nach 48 Stunden zu sehen (Abbildung 13).

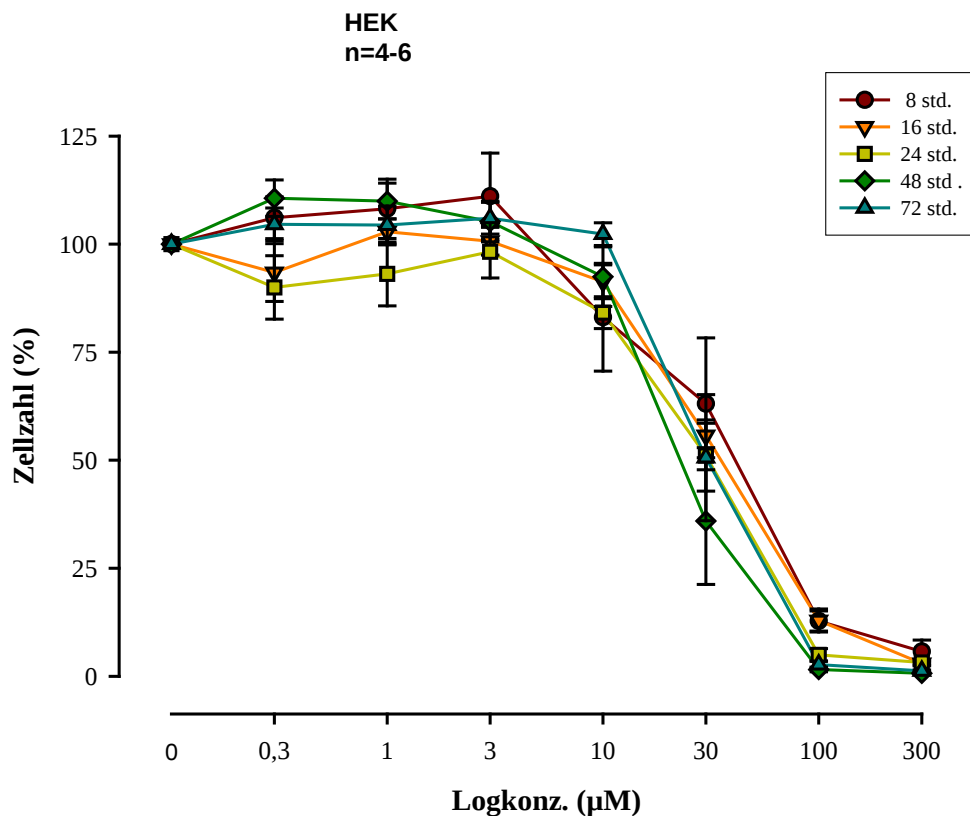


Abbildung 13: Zytotoxizität auf HEK-Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und Expositionsdauer

4.3 Zytotoxizität auf A549 Zellen

Bei der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 sieht man nach 8- bzw. 16-stündiger Exposition keine beträchtliche zytotoxische Wirkung. Bei einer Konzentration von 30 μM starben 15%, bei 100 μM starben 40 %, nach 8 Stunden und nach 16 Stunden 45 % ab. Bei der höchsten Konzentration von 300 μM starben sogar 75% nach 8 Stunden und 70 % nach 16 Stunden ab. Im Bereich der niedrig zugesetzten Konzentrationen von 0,3 bis 3 μM ließ sich eine schwache Wirkung erkennen. Alle Zellen wurden durch KR7 bereits bei einer Konzentration von 100 μM abgetötet, bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden und 72 Stunden (Abbildung 14).

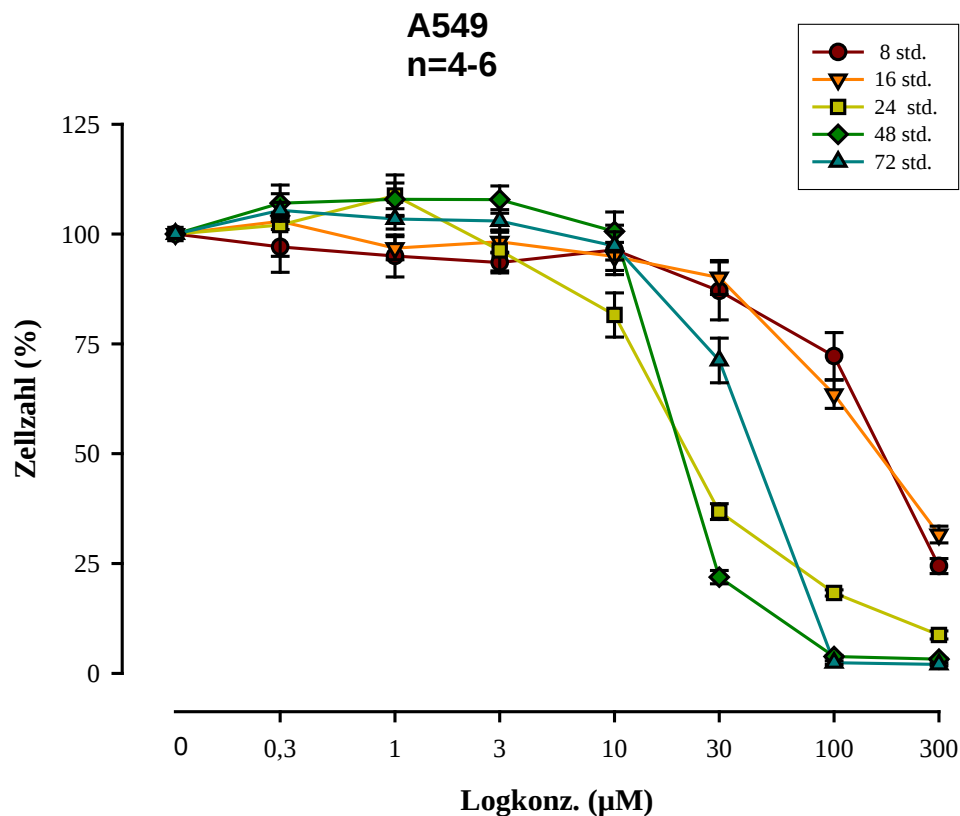


Abbildung 14: Zytotoxizität auf A549 Zellen in Abhängigkeit von der KR7 Konzentration und der Expositionsdauer

4.4 Zytotoxizität auf CACO2 Zellen

Die Colocarzinom-Zelllinie CACO2 reagierte auf KR7 in niedrigen Konzentrationen stark proliferierend. Nach 8-stündiger Inkubation mit 3 μM KR7 erhöhte sich die Anzahl der lebenden Zellen auf 120 %, nach 24 stündiger Inkubation mit 0,3 μM und 3 μM stieg die Anzahl der lebenden Zellen auf 140%, nach 48 Stunden bzw. 72 Stunden fand man eine Zahl von knapp 100% überlebender Zellen vor. Erst ab 10 μM ließ sich eine zeitabhängige, zytotoxische Wirkung erkennen. Nach 24 stündiger Exposition fand noch immer eine Proliferation statt (über 100% lebende Zellen). Bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden und einer Konzentration von 30 μM KR7, oder auch bei einer Inkubationszeit von 48- Stunden und einer Konzentration von 100 μM , wurden alle Zellen abgetötet (Abbildung 15).

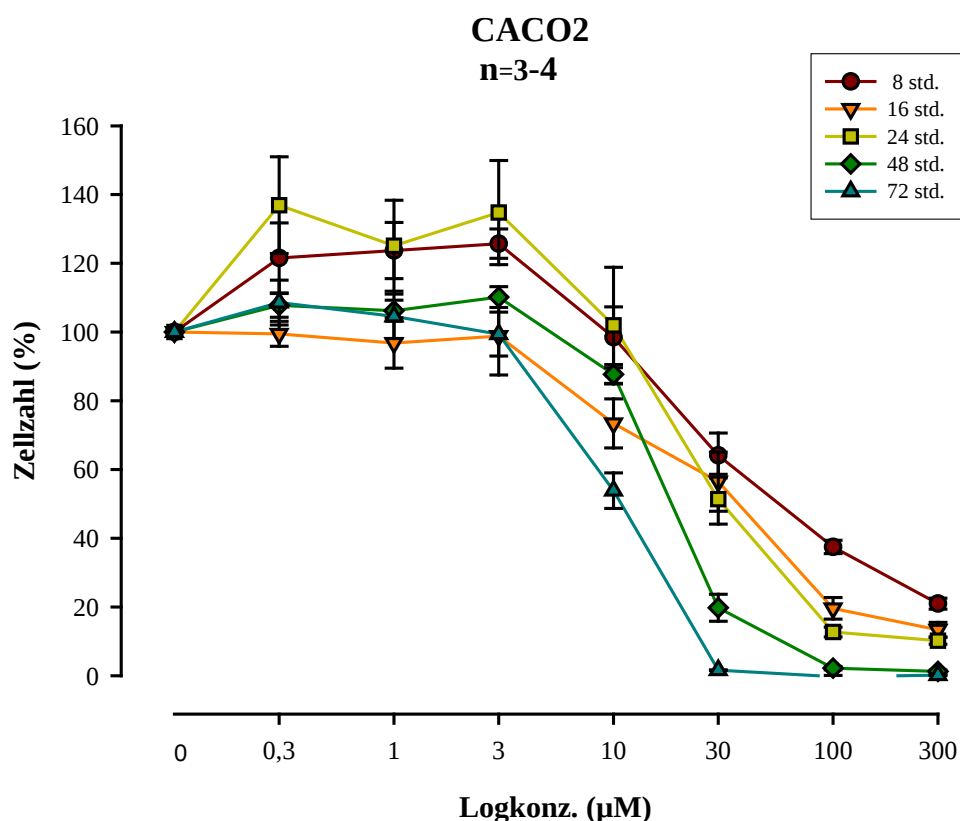


Abbildung 15 :Zytotoxizität auf CACO2-Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer

4.5 Zytotoxizität auf HCT116 Zellen

Bei der Coloncarzinom-Zelllinie HCT116 sah man bereits bei einer niedrigen Konzentration von KR7 keine beträchtliche zytotoxische Wirkung. Die Konzentration von 10 μM KR7 regte die Zellen zur Proliferation an. Die Zellzahl stieg sowohl nach 8, 16, 48 wie auch nach 72 Stunden über 100% an.

Mit einer Konzentration von 30 μM KR7 wurden nach 8- bzw. 72-stündiger Inkubation 10% der Zellen getötet. Nach 16 Stunden waren es 25%, nach 24 Stunden 65% und nach 48 Stunden 40%. Bei Verwendung der höchsten Konzentration (300 μM) KR7 fand man nach 8 stündiger Exposition 65%, nach 16 Stunden 70 % und nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation eine Überlebensrate von ungefähr 2% vor (Abbildung 16).

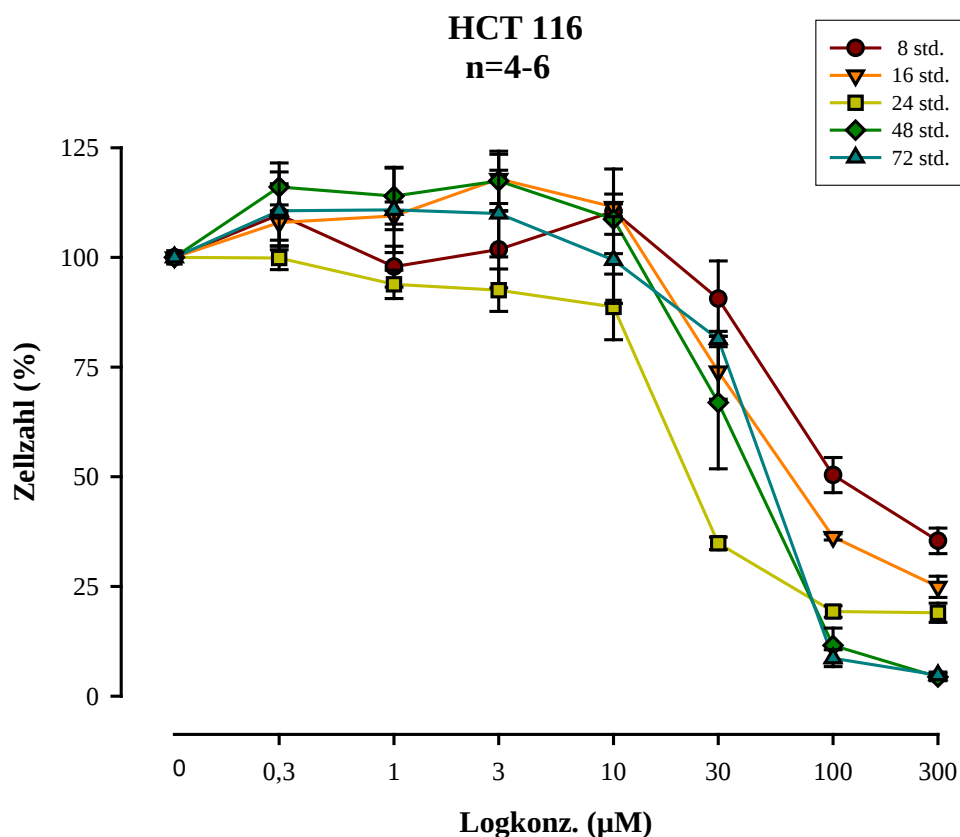


Abbildung 16: Zytotoxizität auf HCT116–Zellen in Abhängigkeit von der KR7 Konzentration und der Expositionsdauer

4.6 Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC_{25}

Im direkten Vergleich der getesteten Zelllinien lässt sich erkennen, dass HEK (nicht entartete Zelllinie) eine ungefähr gleiche Reaktion gegenüber KR7 zeigte wie Krebszelllinien. Damit nach 16-stündiger Exposition 25% der HEK, KB-3-1, HCT116 Zellen abgetötet werden, benötigte es mehr als 22 μ M KR7.

Vergleichsweise wurden bei CACO2 Zellen weniger als 10 μ M KR7 benötigt. Für CACO2 Zellen beträgt die EC_{25} nach 72 stündiger Exposition weniger als 8 μ M. Die anderen Zelllinien benötigten für diese Inkubationsdauer mehr als 15 μ M.

Am wenigsten empfindlich scheint die Zelllinie A549 zu sein (Abbildung 17).

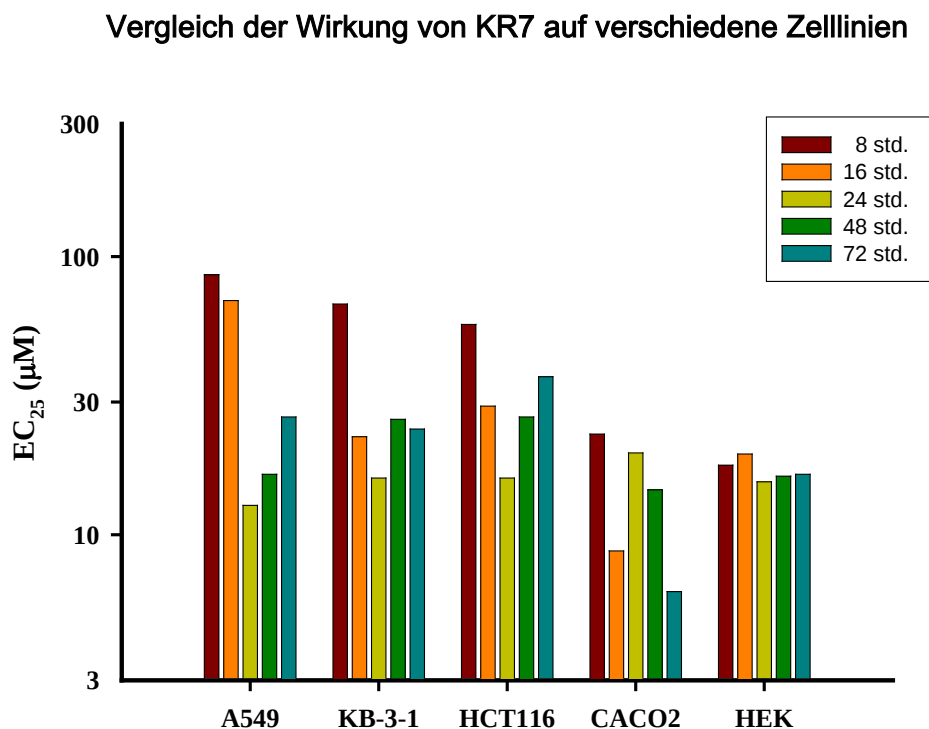


Abbildung 17: Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC_{25} in Abhängigkeit von Expositionsdauer

4.7 Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC_{50}

Vergleicht man die zytotoxische Wirkung von KR7 auf alle Zelllinien, dann wird sichtbar, dass HCT116 nach 24 stündiger Exposition 24,5 μM benötigt, damit 50% der Zelllinien abgetötet werden. Bei den anderen Krebszelllinien und den nicht entarteten Zellen hingegen bedarf es mehr als 28 μM , um dieses Ziel zu erreichen. Die EC_{50} (mittlere effektive Konzentration) liegt bei CACO2 Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Exposition bei über 10 μM . Für die anderen Krebszellen beläuft sich die EC_{50} für den genannten Zeitraum bei über 30 μM . Für A549 beträgt die EC_{50} nach 8- bzw. 16-stündiger Exposition über 200 μM . Bei den anderen Krebszelllinien liegt die EC_{50} für diese Inkubationsdauer unter 100 μM (Abbildung 18).

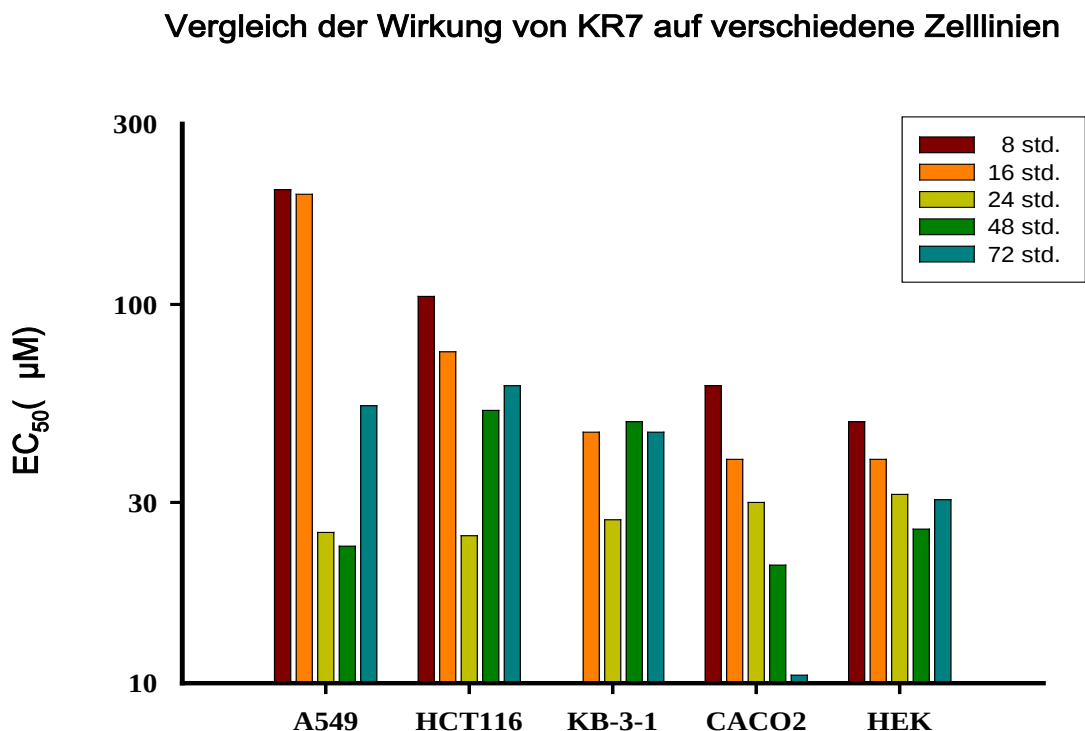


Abbildung 18: Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC_{50} in Abhängigkeit von Expositionsdauer.

4.8 Vergleich der Zytotoxizität auf die Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, und die nicht entartete Zelllinie HEK anhand der EC_{75}

Beim Vergleich der zytotoxischen Wirkung auf entartete und nicht entartete Zelllinien fällt auf, dass HCT116 am wenigsten empfindlich gegenüber KR7 reagierte. Um nach 16-stündiger Exposition 75% der HCT116 Zellen abzutöten, benötigte es 300 μ M KR7. Bei den anderen Zelllinien hingegen benötigte es weniger als 90 μ M.

Die EC_{75} liegt nach 24- stündiger Exposition für alle Zelllinien unter 80 μ M. Nach 48- bzw. 72 stündiger Exposition beträgt sie für CACO2 unter 25 μ M. Bei allen anderen Zelllinien beläuft sich die EC_{75} für die genannte Inkubationsdauer um 70 μ M.

Auffällig ist, dass bei A549 nach 8- bzw. 16-stündiger Exposition mit KR7 überhaupt keine Reaktion aufgetreten war (Abbildung 19).

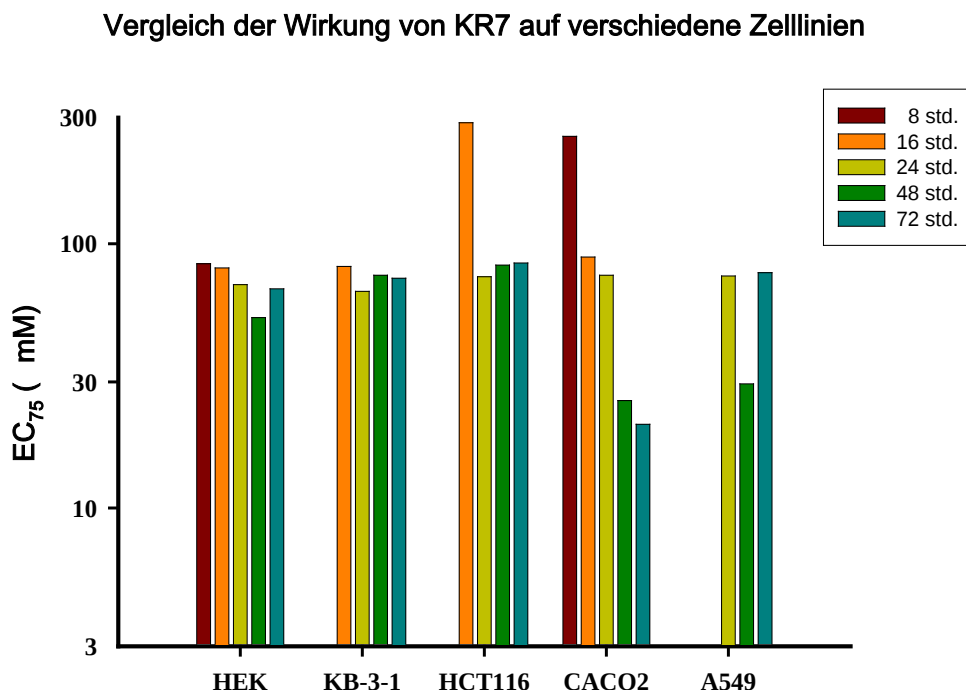


Abbildung 19: Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC_{75} in Abhängigkeit von Expositionsdauer.

5 Schlussbetrachtung

KR7 wirkt auf alle getesteten Zelllinien zytotoxisch (Krebszelllinien KB-3-1, A549, CACO2, HCT116, nicht entartete Zelllinie HEK).

Die zytotoxische Wirkung ist irreversibel. Die Folge davon ist, dass die Zellen auch nach kurzem Kontakt mit der Substanz irreparabel geschädigt werden und danach absterben.

Die Zellen zeigten allerdings, bevor sie abstarben, eine teilweise deutlich erhöhte Zellteilungsrate. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass hohe KR7 Konzentrationen die Zellen in einen erhöhten Stresszustand versetzten, wodurch in der Folge die Proliferation angeregt wurde, um das Überleben der Zellen zu sichern.

Bei längerer und höherer KR7 Exposition bestand kein Unterschied in der Empfindlichkeit der Zellen auf KR7; sowohl Krebs- als auch nicht entartete Zelllinien sind, wie oben bereits angeführt, gleich betroffen.

6 Zusammenfassung

Auf der Suche nach einem neuen Antibiotikum entdeckten die Forscher, dass die Züchtung einer genetischen Variante von Mikroorganismen der Gattung *Penicillium* ein Antibiotikum enthält, das antifungale Aktivität gegen krankheitsauslösende Pilze aufweist. Nach Isolierung dieses Antibiotikums fand man heraus, dass es charakteristische, physikochemische Eigenschaften besitzt und benannte es KR7 (Zonamycin).

Im Rahmen meiner Arbeit sollte nun dessen zytotoxische Wirkung an fünf Zelllinien (KB-3-1, CACO2, HCT116, A549, HEK) überprüft werden. Dabei stellte sich heraus, dass KR7 zu einer Apoptose der Zellen führt.

Die Untersuchung hat ferner gezeigt, dass die zytotoxische Wirkung auf nicht entartete Zellen (HEK) gleich stark ist wie die auf die untersuchten Tumorzelllinien. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, dass KR7 als Chemotherapeutikum für diese Art von Tumorzellen nicht geeignet ist. A549 Zellen waren am wenigsten empfindlich und CACO2 Zellen waren die sensitivsten.

Es gibt allerdings auch Forschungsarbeiten (European Patent Application EP0937718A1), die zeigen, dass KR7 möglicherweise inhibitorische Aktivitäten auf die metastasierenden Eigenschaften von Tumorzellen aufweisen, ohne die proliferativen Eigenschaften des Tumors selbst zu beeinflussen.

7 Abstract

In the search of a new antibiotic, the researchers discovered that the breeding of a genetic variant of microorganisms of the genus *Penicillium* contains an antibiotic which has antifungal activity against pathogenic fungi. After isolation of this antibiotic they found out that it has characteristic physicochemical properties and named it KR7 (Zonamycin).

The aim of my work was to test the cytotoxic effects on five different cell lines (KB -3-1, CACO2, HCT116, A549, HEK). It revealed that KR7 lead to apoptotic death of the cells.

The further investigation has shown that the cytotoxic effect on non-malignant cells (HEK) is the same as on tumor cell lines. From these results, it can be concluded that KR7 is not suitable as a chemotherapeutic agent for this type of tumor cells. The A549 cell line was the most resistant one, while CACO2 cells were the most sensitive cells.

However, there are researches showing that KR7 may have inhibitory activity on the metastatic properties of tumor cells, without affecting the proliferative properties of the tumor itself.

8 Quellenverzeichnis

- *) **Abbas**, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat Rev Cancer 9, 400-14 (2009).
- *) **Adams**, J.M., and Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, Science 281:1322 (1998).
- *) **Alt**, J.R., Gladden, A.B. & Diehl, J.A. p21 (Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. J Biol Chem 277, 8517-23 (2002).
- *) **Ashkenazi**, A, Dixit, VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998 Aug 28; 281(5381):1305-8. Review.
- *) **Barak**, Y, Juven, T., Haffner, R, Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. EMBO J Feb;12(2):461-8 (1993).
- *) **Chang**, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V., Roninson, I.B. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 4291-6 (2000).
- *) **Chao**, D.T. and Korsmeyer, S.J. BCL-2 family: regulators of cell death Annu Rev Immunol 16:395-419:395 (1998).
- *) **Cheng**, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., Sherr, C.J. The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. EMBO J 18, 1571-83 (1999).
- *) **Child**, E.S. & Mann, D.J. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. Cell Cycle 5 (2006).

- *) **Chiou S.K.**, Rao, L., White, E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* Apr;14(4):2556-63 (1994).
- *) **Coqueret**, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13, 65-70 (2003).
- *) **Delavaine**, L. & La Thangue, N.B. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 18, 5381-92 (1999).
- *) **Dimri**, G.P., Nakanishi, M., Desprez, P.Y., Smith, J.R. & Campisi, J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 16, 2987-97 (1996).
- *) **Favaloro**, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4(5), 330-349 (2012).
- *) **Flores-Rozas**, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M., Hurwitz, J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994).
- *) **Gottlieb**, T.M., Oren, M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 8(5):359-68 (1998).
- *) **Green**, D. R. and Reed, J. C. "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-1312 (1998).
- *) **Gross**, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 13: 1899-1911 (1999)
- *) **Gross**, A. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program, *IUBMB. Life* 52:231 (2001).
- *) **Gross** A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899 (1999).

- *) **Hermeking**, H., Eick, D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*. Sep 30;265(5181):2091-3 (1994).
- *) **Janicke**, R.U., Sohn, D., Essmann, F. & Schulze-Osthoff, K. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* 6, 407-13 (2007).
- *) **Joule**, R. J., Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1):47-59 (2008).
- *) **Kawahara**, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y. and Nagata, S. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 143: 1353–1360 (1998).
- *) **Kern**, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. Jun 21;252(5013):1708-11 (1991).
- *) **Kroemer**, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3:614 (1997).
- *) **Kroemer**, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 12: 1463–1467 (2008).
- *) **Kumar**, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32–43 (2007).
- *) **Kubbutat**, M.H., Jones, S.N., Vousden, K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. May 15;387(6630):299-303 (1997).

- *) **LaBaer**, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-62 (1997).
- *) **Lane**, D.P., Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. Mar 15;278(5701):261-3 (1979).
- *) **Lane**, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. Comment in: *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):486-7. Comment on: *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):80-3. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):83-6.
- *) **Levine**, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* Feb 7;88(3):323-31 (1997).
- *) **Lockshin**, R.A. and Zakeri, Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23: 2766-2773 (2004).
- *) **Lohrum**, M.A., Vousden, K.H. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol* May;10(5):197-202 (2000).
- *) **Luo**, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. Bid, a Bcl-2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94: 481-490 (1998).
- *) **Luo**, Y., Hurwitz, J. & Massague, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-61 (1995).
- *) **Miyashita**, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. Jun;9(6):1799-805 (1994).
- *) **Müller**, V. Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. Apoptose in Leukämiezellen induziert durch Granzyme B INAUGURAL – DISSERTATION Zur Erlangung des

Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. 2007.

*) **Nguyen**, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence, J Biol Chem 268:25265 (1993).

*) **Oren**, M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem Dec17;274(51):36031-4 (1999).

*) **Oltvai**, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 74:609 (1993).

*) **Perkins**, N.D. Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21 (WAF1/CIP1/SDI1). Cell Cycle 1, 39-41 (2002).

*) **Perry**, M.E., Levine, A.J. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. Curr Opin Genet Dev Feb;3(1):50-4 (1993).

*) **Polyak**, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. Nature Sep 18;389(6648):300-5 (1997).

*) **Rich**, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H. Defying death after DNA damage. Nature Oct 12;407(6805):777-83 (2000).

*) **Rodriguez-Vilarrupla**, A., Díaz, C., Canela, N., Rahn, H.P., Bachs, O., Agell, N. Identification of the nuclear localization signal of p21 (cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. FEBS Lett 531(2002).

*) **Russo**, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. & Pavletich, N.P. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. Nature 382, 325-31 (1996).

- *) **Savill**, J., Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-8 (2000).
- *) **Serrano**, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* Mar 7;88(5):593-602 (1997).
- *) **Shim**, J., Lee, H., Park, J., Kim, H. & Choi, E.J. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 381, 804-6 (1996).
- *) **Sohn**, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. & Janicke, R.U. p21 blocks irradiation induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* 66, 11254-62 (2006).
- *) **Steller**, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* Mar10;267(5203):1445-9 (1995).
- *) **Strasser**, A., L. O'Connor, Dixit, V.M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45 (2000).
- *) **Takeda**, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H. & Ichijo, H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 28, 23-9 (2003).
- *) **Tartaglia**, L.A., Goeddel, D.V. Two TNF receptors. *Immunol Today*. May;13(5):151-3 (1992).
- *) **Thornberry**, N. A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381), 1312-6 (1998).
- *) **Tsujimoto**, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097 (1984).

*) **Tsujimoto**, Y. and Shimizu, S. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 97:577 (2000).

*) **Vigneron**, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E. & Coqueret, O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* 281, 34742-50 (2006).

*) **Vogelstein**, B., Lane, D., Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* Nov 16;408(6810):307-10 (2000).

*) **Vousden**, K.H., Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. Aug;2(8):594-604 (2002).

*) **Wu**, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* Jul;7(7A):1126-32 (1993).

*) **Zhu**, H., Chang, B.D., Uchiumi, T. & Roninson, I.B. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase II alpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 1, 59-66 (2002).

9 Abbildung Quellenverzeichnis

Abbildung 1: aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995

Abbildung 2: [http://molbiol4masters.masters.grkraj.org/html/Co_and_Post_Translational_Events5-Cellular_Protein_Traffic.htm.](http://molbiol4masters.masters.grkraj.org/html/Co_and_Post_Translational_Events5-Cellular_Protein_Traffic.htm/)

Abbildung 3: INAUGURAL – DISSERTATION Zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. Vorgelegt 2007 von Viktoria Müller.

Abbildung 4: Nach Perier & Vila, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine (2012).

Abbildung 5: Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 13(15): 1899-1911.

Abbildung 6: Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061–1068. [PMC free article] [PubMed].

Abbildung 7: Child, E.S. & Mann, D.J. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 5, 1313-9 (2006).

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods	5
Abbildung 2: Signalweg der Apoptose	6
Abbildung 3: Der extrinsische Weg der Apoptose	8
Abbildung 4: Der intrinsische Weg der Apoptose	10
Abbildung 5: Mitglieder der Bcl-2 Familie	12
Abbildung 6: p53 Weg (PubMed, 2008)	15
Abbildung 7: Die Zellkulturflasche mit Nährmedium	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Zählkammer	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Zählkammer	25
Abbildung 10: Umsetzung: Tetrazolium → Formazan	27
Abbildung 11 : EZ4U- Zytotoxizität Test	29
Abbildung 12 : Zytotoxizität auf Cervixkarzinom in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer	30
Abbildung 13: Zytotoxizität auf HEK-Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und Expositionsdauer	32
Abbildung 14: Zytotoxizität auf A549 Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer	33
Abbildung 15 : Zytotoxizität auf CACO2-Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer	34
Abbildung 16: Zytotoxizität auf HCT116 –Zellen in Abhängigkeit von der KR7-Konzentration und der Expositionsdauer	35
Abbildung 17: Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC ₂₅ in Abhängigkeit von Expositionsdauer	36
Abbildung 18 : Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC ₅₀ in Abhängigkeit von Expositionsdauer	37
Abbildung 19: Vergleich der Wirkung von KR7 auf verschiedene Krebszelllinien anhand der EC ₇₅ in Abhängigkeit von Expositionsdauer.	38

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede zwischen dem apoptotischen und nekrotischen Zelltod (Müller et al., 2007)	4
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten KR7 Konzentrationen	20
Tabelle 3: Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension	26
Tabelle 4: verwendete Zellzahl/ ml in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der jeweiligen Zelllinie	28

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Hebaa N. Alqasab
Anschrift: Gregorygasse 16/19/04, 1230 - Wien
Geburtsdatum: 02.04.1983
Familienstand: Verheiratet
Nationalität: Irak
Email: hiba_alqassabb@yahoo.com

AUSBILDUNG:

1989-1995 Volksschule Amer bin Kalthum, Bagdad-Irak
1995-2000 Gymnasium Alaqeeda, Bagdad- Irak
2000/2001 Matura Abschluss, Bagdad- Irak

STUDIUM

2001-2006 Baghdad College of Pharmacy, Bagdad - Irak
Studium Abschluss **B. Sc. Pharmazie**

2009 -2010 Universitätslehrgang Vorstudienlehrgang Uni Wien,
Wien - Österreich
2010 Universität Wien, Pharmazie Institut, Wien - Österreich

PRAKTIKUM UND BERUFSPRAXIS

2005 – 2006 Zainab Apotheke , Bagdad – Irak
Ferialpraktikum
2006 - 2008 Alhusain Apotheke , Kairo - Egypt