Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von
Diplom Biologin
Ellen Niederberger

Betreuer: Prof. Dr. Zankl

Kaiserslautern 1998

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:18.12.1998

Prüfungskommision:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Cullum

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zankl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 1995 und Juni 1998 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine freundliche Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Zankl danke ich für die externe Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Cullum möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen:

APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C	konservierte Regionen
cdk	cyclin-dependent kinase
Ci	Curie
DAG	Diacylglyzerin
DAPI	4´,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether-)-N,N,N,N´-tetraessigsäure
FKS	Foetales Kälberserum
FUF	freie ungesättigte Fettsäuren
GDP	Guanosindiphosphat
G-Phase	Gap-Phase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IC_{50}	Inhibitory concentration (50% Wachstumshemmung)
i.p.	intraperetoneal
IP_3	Inositol 1,4,5 triphosphat
KD	Kilo-Dalton
kDNA	Kinetoplasten-DNA
LMP-Agarose	Low-Melting-Point-Agarose
LXFL529L	Lung Xenograft Fiebig Large Cell 529 Line
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MARCKS	myristoyliertes, alanin-reiches C-Kinase Substrat
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minute
M-Phase	Mitose-Phase
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MTP	Mikrotubuliprotein
µM	mikromol/l
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar

OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline (physiologischer Phosphatpuffer)
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
PIP2	Phosphoinositol 4-5 bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
REA	Reassembly-Puffer
RT	Raumtemperatur
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
S-Phase	Synthese-Phase
SR 101	Sulforhodamin 101
SRB	Sulforhodamin B
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N´-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TPA	11-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
U	Unit

1 Einleitung

In der Krebstherapie stellen die operative Entfernung und Bestrahlung von Tumoren, sowie die Chemotherapie die Hauptbehandlungsmethoden dar, wobei jede dieser Praktiken massive Nachteile mit sich bringt. Für die Chemotherapie werden permanent neue aktive Substanzen gesucht, die spezifisch an den betreffenden Tumorzellen angreifen, das umgebende Gewebe weitgehend unversehrt lassen und nur relativ wenig Nebenwirkungen mit sich bringen.
Dabei rücken natürliche Inhaltsstoffe von pflanzlichen, tierischen, pilzlichen und mikrobiellen Organismen zunehmend in den Vordergrund. Die meisten dieser Substanzen stellen Sekundärmetaboliten der jeweiligen Organismen dar, die vermutlich während der Evolution entstanden sind, um schädlichen Effekten von Toxinen und Mutagenen entgegenzuwirken oder vor natürlichen Freßfeinden zu schützen [Wall und Wani, 1995].
Viele Medikamente in der traditionellen Heilkunde beruhen auf natürlichen Inhaltsstoffen. In der chinesischen Medizin werden seit Jahrhunderten pflanzliche Extrakte gegen verschiedenartige Krankheiten, darunter auch Krebs, verabreicht. Der genaue Wirkmechanismus der Inhaltsstoffe ist dabei häufig nicht aufgeklärt. Dieser Aufklärung gilt daher die Aufmerksamkeit vieler Forschungsansätze.
Seit die Weltgesundheitsorganisation im Jahre 1978 offiziell die traditionelle Medizin in Entwicklungsländern befürwortete, stieg das Interesse an einer Integration von traditioneller Medizin in moderne Gesundheitssysteme [Chi, 1994]. Derzeit sind mindestens 25% der in den Industrieländern eingesetzten Arzneimittel pflanzlicher Herkunft oder wurden nach dem Vorbild pflanzlicher Inhaltsstoffe hergestellt. Der Anteil solcher Medikamente steigt kontinuierlich weiter an [Lozoya,1994].
Ein Beispiel für einen antineoplastisch wirkenden Naturstoff ist das Alkaloid Camptothecin aus der chinesischen Pflanze *Camptotheca acuminata.* Durch spezifische Hemmung von zellulären Topoisomerasen hemmt es das Wachstum von Tumorzellen. Topotecan, ein halbsynthetisches Derivat von Camptothecin wird erfolgreich in der Klinik gegen metastasierende Ovarialkarzinome eingesetzt.
Taxol, ein natürliches Chemotherapeutikum aus Eiben *(Taxus brevifolia, Taxus baccata*), hemmt die Depolymerisation von Mikrotubuliproteinen und wird gegen Ovarialkarzinome und metastasierende Mammakarzinome eingesetzt. Weitere Beispiele für chemotherapeutisch wirksame Naturstoffe sind die Vinca-Alkaloide Vincristin und Vinblastin, Colchicin aus Herbstzeitlosen und Staurosporin aus *Streptomyces staurosporaeus*. Die Suche nach neuen antineoplastischen Substanzen in der Natur scheint somit ein vielversprechender Ansatz für die weitere Krebsforschung zu sein.
Die mit Topotecan bereits angesprochene synthetische bzw. semisynthetische Herstellung von Naturstoffen und/oder ihren Derivaten ermöglicht es, die zum Teil aufwendige und teure Gewinnung wirksamer Substanzen direkt aus der Pflanze durch billigere effizientere Methoden zu ersetzen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Wirkstoffe

2.1.1 Alkaloide

Alkaloide sind vorwiegend in höheren Pflanzen vorkommende, basische Naturstoffe mit einem oder mehreren, meist heterozyklisch eingebauten, Stickstoffatomen im Molekül, die häufig eine ausgeprägte pharmakologische Wirkung haben.
Die Einteilung der Alkaloide ist aufgrund ihrer Heterogenität sehr schwierig und erfolgt daher meist aufgrund ihrer Herkunft. Da in einigen Pflanzenfamilien bestimmte Alkaloide gehäuft auftauchen, werden sie dieser taxonomischen Gruppe zugeordnet, z.B. Papaveraceae-, Solanaceae- oder Amaryllidaceae-Alkaloide. Vermutlich werden sie als Nebenprodukte des Aminosäurestoffwechsels in peripheren Pflanzenteilen (Blätter, Wurzeln, Rinden, Früchten) abgelagert. Üblicherweise enthält eine Pflanzengattung nicht nur ein einzelnes Alkaloid, sondern eine ganze Gruppe verwandter Stoffe, die sich durch unterschiedliche Stereochemie oder Stellungsisomerie ihrer Substituenten unterscheiden.
Alkaloide wurden schon sehr früh in der Pharmazie als Betäubungs- und Schmerzmittel sowie als Zytostatika eingesetzt [Römpp Chemielexikon].

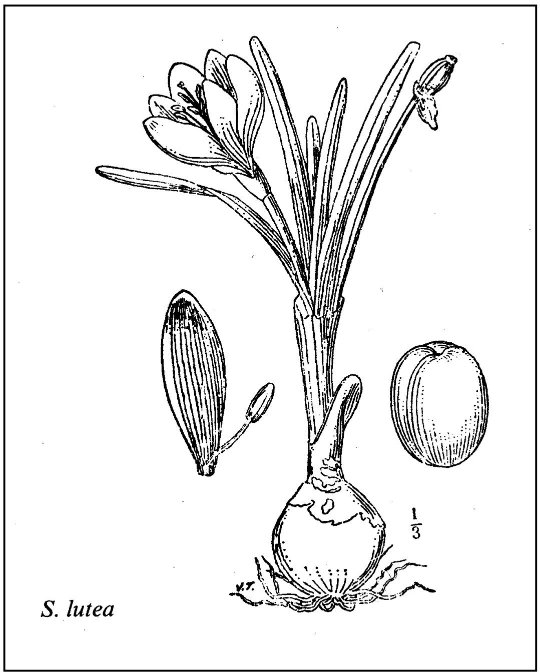


Abbildung 1: ***Sternbergia lutea***

In unserer Arbeitsgruppe wurden Alkaloide aus der Familie der *Amaryllidaceae* untersucht. Für viele Mitglieder dieser Familie sind antivirale [Gabrielsen et al., 1992] und anti-Malaria-Wirkungen [Likhitwitayawuid et al., 1993] sowie Wirkung auf das zentrale Nervensystem [Thomson und Kewitz, 1990] beschrieben. Die antineoplastische Wirkung verschiedener Amaryllidaceae-Alkaloide ist ebenfalls bekannt [Furasawa et al., 1980; Pettit et al., 1984; Weniger et al., 1995].
Die Alkaloide können durch Extraktion aus den Zwiebeln von verschiedenen Amaryllidaceae-Arten gewonnen werden. In unseres Arbeitsgruppe wurde die Art *Sternbergia lutea* (Abbildung 1) ausgewählt, die große Mengen an Alkaloiden, vor allem Lycorin, enthält.

2.1.1.1 Lycorin

Das Alkaloid Lycorin (Abbildung 2) ist ausschließlich in *Amaryllidaceae* zu finden, dort aber über viele Arten verbreitet.

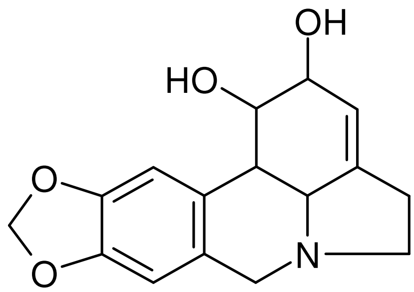


Abbildung 2: Strukturformel von Lycorin

Bei Untersuchungen an 11 verschiedenen humanen und murinen Tumorzellinien *in vitro* erwies sich die Substanz als hochpotenter Wachstumshemmstoff [Lin et al., 1995]. Außerdem wird das Wachstum von Maus Ascites Tumoren *in vivo* gehemmt [Chattopadhyay et al., 1984]. Inhibitorische Effekte auf die Proteinbiosynthese in pflanzlichen und tierischen Zellen sind beschrieben [Kukhanova et al., 1983; Ghosal et al., 1985]. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Die inhibitorische Wirkung beruht wahrscheinlich auf der Blockierung eines Peptidyltransferasezentrums, was die Elongation und Termination der Proteinsynthese hemmt [Kukhanova et al., 1983]. Der Einfluß von Lycorin auf die virale Proteinsynthese wurde an polio-infizierten Hela-Zellen untersucht. Dabei ergaben sich Hinweise, daß die Substanz die Termination der Proteinsynthese dadurch blockiert, daß die Verfügbarkeit eines Terminationsfaktors beeinflußt und somit die Trennung der Peptidkette von der Peptidyl-tRNA verhindert wird [Vrijsen et al., 1985].

2.1.1.2 Lycobetain (Ungeremin)

Lycobetain (auch Ungeremin genannt) liegt ebenfalls in den Zwiebeln von *Amaryllidaceae,* häufig als natürlicher Metabolit des Lycorins, vor [Ghosal et al., 1986; Lee et al., 1994]. Experimentell kann es durch Oxidation von Lycorin mit Seleniumdioxid (Abbildung 3) [Ghosal et al., 1986] oder durch Totalsynthese gewonnen werden [Lauk et al., 1991].

Lycobetain ist als eine *in vitro* wachstumshemmende Substanz an der Zellinie S180 beschrieben [Ghosal et al., 1986]. Es zeigte zudem *in vivo* nach intraperitonealer (i.p.)-Injektion wachstumshemmende Wirkung gegen Ehrlich-Ascites Karzinome, Ascites Hepatome, gegen die Leukämien L1210 und P388 sowie gegen Lewis-Lungen-Karzinome und Yoshida-Ascites-Sarkome in Mäusen und Ratten [Zhang et al., 1981].

In klinischen Studien zeigte Lycobetain bei der Behandlung von Ovarial- und Magenkarzinomen einen relativ hohen Prozentsatz an Remissionen. Die Toxizität der Substanz war relativ niedrig und es konnten keine Veränderungen am Blutbild, am Elektrokardiogramm (EKG) und an der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)[1] nachgewiesen werden [Xu,1991].

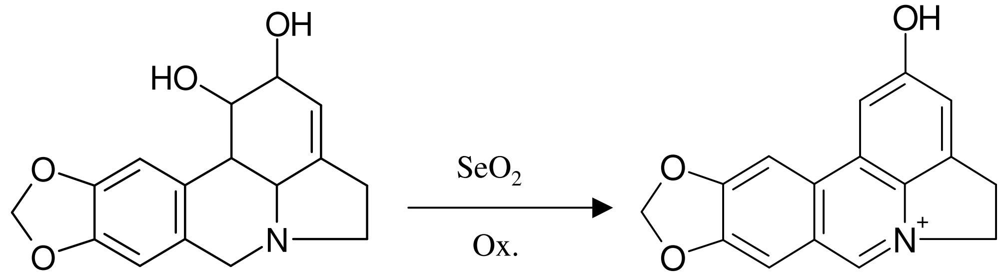


Abbildung 3:Umsetzung von Lycorin zu Lycobetain

Lycobetain interkaliert in doppelsträngige DNA. Untersuchungen mit Oligonukleotiden zeigten, daß GC-reiche Regionen in der DNA bevorzugt werden, wobei die Substanz nicht kovalent an die DNA bindet und auch keine alkylierende Aktivität zeigt [Liu et al., 1989].
In durchflußzytometrischen Studien an erythroleukämischen Mauszellen zeigte Lycobetain einen signifikanten G_2-Arrest im Zellzyklus [Xu, 1981].

2.1.2 Flavonoide und Flavone

Flavonoide sind wichtige, in allen höheren Pflanzen vorkommende, Phenyl-Propan-Derivate mit dem C_{15}-Gerüst des Flavans. Sie liegen vorwiegend wasserlöslich in den Vakuolen pflanzlicher Zellen in glykosylierter Form vor und sind häufig mit Säuren verestert. Die Aglyka der Flavonoide werden nach dem Oxidationsgrad in verschiedene Klassen unterteilt wie z.B. Anthocyanidine, Flavonole, Flavone und Isoflavone [Richter, 1988]. Flavonoide wurden hinsichtlich einer großen Vielfalt von biologischen Effekten untersucht, nicht zuletzt deshalb, weil sie in sehr vielen Lebensmitteln, vor allem in Früchten und Gemüse in großen Mengen vorkommen [Hollmann et al., 1996]. Flavonoiden wird in Lebensmitteln eine antioxidative Wirkung zugeschrieben [Vinson et al., 1995]. Die Antitumor-Wirkung des häufig vorkommenden Flavons Quercetin und des Isoflavons Genistein ist detailliert beschrieben. Beide Substanzen hemmen wichtige zelluläre Enzyme wie zum Beispiel Topoisomerasen oder Proteintyrosinkinasen [Levy et al., 1984; Okura et al, 1988; Constantinou et al., 1990; Constantinou et al, 1995].
In der vorliegenden Arbeit wurden 5 Flavonoide (Baicalin, Baicalein, Wogonin, Wogonosid und Skullcapflavon II) (Abbildung 4) aus dem Rhizom der chinesischen Heilpflanze *Scutellaria baicalensis* auf ihre antineoplastische Wirkung und ihren Wirkmechanismus untersucht.

[1] GPT = veraltete Bezeichnung für Alaninaminotransferase (ALT): Enzym der Leber, das die Umwandlung von L-Glutamat und Pyruvat zu L-Alanin und Alphaketoglutarat katalysiert. Medizinisch dient es der Überprüfung von Leberfunktionen.

Flavonoide von *Scutellaria baicalensis* sind Bestandteile des in China und Japan eingesetzten Medikamentes Sho-Saiko-to (TJ-9). Sho-Saiko-to setzt sich aus Extrakten von sieben verschiedenen Pflanzen, darunter *Bupleuri radix*, *Pinelliae tuber*, *Scutellaria radix*, *Zizyphi fructus*, *Ginseng radix*, *Glycyrrhizae radix* und *Zingiberis rhizoma* zusammen [Mizushima et al., 1995; Matzuzaki et al., 1996]. Bei den Inhaltsstoffen handelt es sich zum Großteil um Saponine und Flavonoide [Matzuzaki et al., 1996].
In der traditionellen Medizin wird es gegen chronische Leberbeschwerden wie zum Beispiel Hepatitis oder Leberzirrhose eingesetzt [Mizushima et al., 1995; Motoo und Sawabu, 1994]. Antineoplastische und apoptoseinduzierende Wirkungen sind beschrieben [Matzuzaki et al., 1996; Yano, 1994].

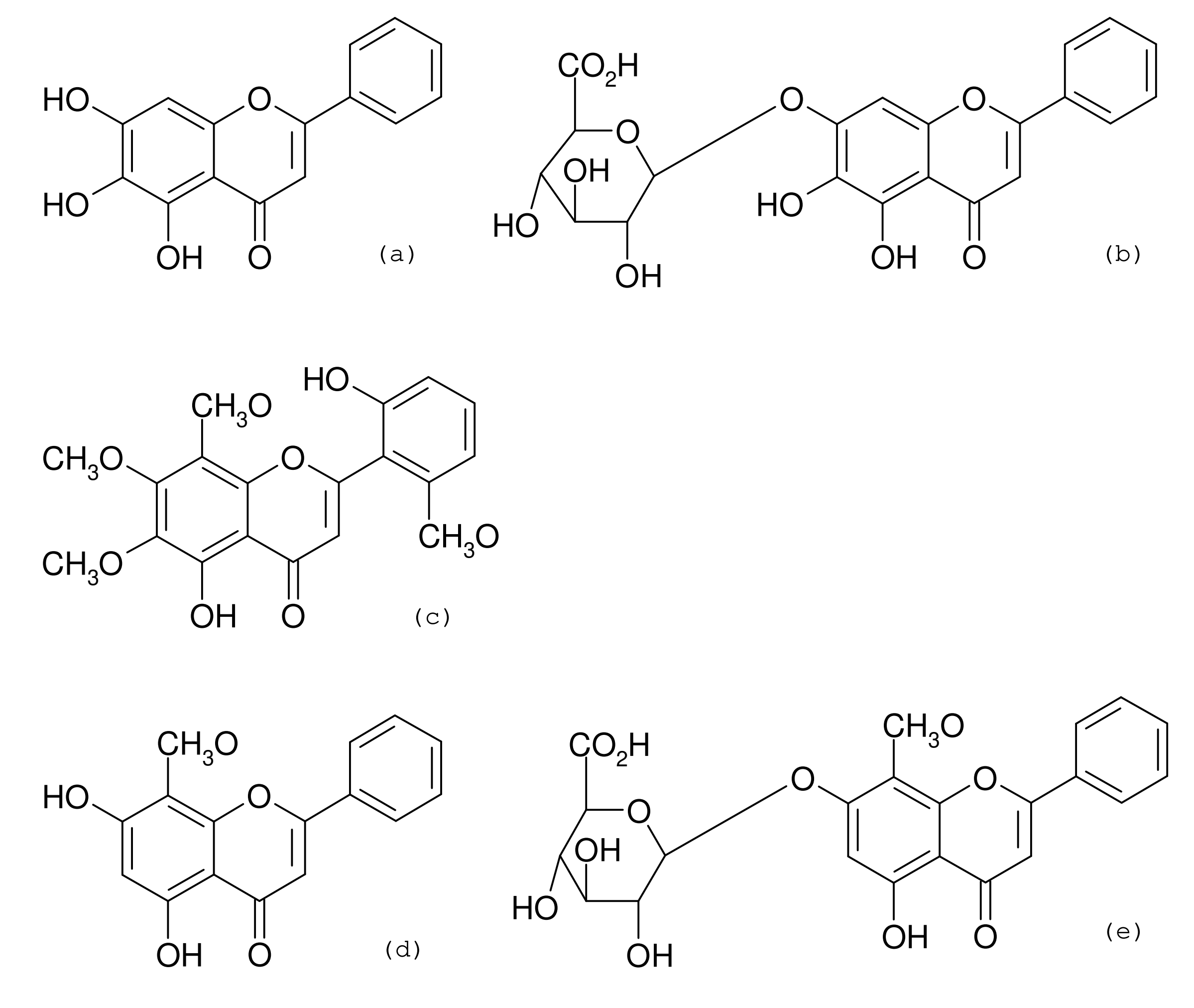


Abbildung 4: Flavonoide aus *Scutellaria baicalensis*: Baicalein (a), Baicalin (b), Skullcapflavon II (c), Wogonin (d) und Wogonosid (e)

Bisher durchgeführte Untersuchungen zu den Flavonoiden aus *Scutellaria baicalensis* zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Baicalin, Baicalein und Wogonin wurden bereits auf ihre entzündungshemmende Wirkung an Ratten untersucht, wobei Baicalin am besten wirkte. Baicalein zeigte keine entzündungshemmende Wirkung [Lin, 1996]. Baicalin hemmte außerdem selektiv die Infektiösität und Replikation des HI-1 Virus in lymphoiden Zellinien sowie in humanen mononuklearen Blutzellen [Li, 1993]. Bei der Untersuchung von Baicalin, Baicalein und Wogonin konnte in Zytotoxizitätstests an 7 Lungenkarzinomen und 3 Leberkarzinomen nur für Baicalin signifikante Antitumoraktivität nachgewiesen werden. Im Vergleich mit gesunden humanen Knochenmarkszellen und Lymphozyten zeigte die Substanz Selektivität für Tumorzellen [Mizushima et al., 1995]. In einer Studie an humanen Leberkarzinomzellen konnte für Baicalin eine dreifach höhere wachstumshemmende Wirkung als für Baicalein beobachtet werden [Motoo und Sawabu, 1994]. Für Baicalein und Baicalin wurde an humanen leukämischen T-Lymphozyten antiproliferative Aktivität nachgewiesen, wobei Baicalein eine ca. sechsfach höhere Aktivität zeigte als Baicalin. In weiterführenden Versuchen mit Baicalein konnte die Inhibierung von Protein-Tyrosinkinasen beobachtet werden. Untersuchungen mit isolierter Proteinkinase C zeigten konzentrationsunabhängige Hemmung des Enzyms. Zusätzlich reduzierte Baicalein die mRNA des Blutplättchen-Wachstumsfaktors (platelet-derived growth factor, PDGF) [Huang, 1994].

2.1.3 Bisindole

2.1.3.1 Indigoide Bisindole

2.1.3.1.1 Indigo

Abbildung 5: Natürlicher Indigo, *Indigofera tinctoria*

Indigo ist einer der ältesten bekannten organischen Farbstoffe. Der blaue Farbstoff wurde in Europa schon im Mittelalter u.a. aus der europäischen Färberwaidpflanze *(Isatis tinctoria)* und dem indischen Indigo *(Indigofera tinctoria)* (Abbildung 5) gewonnen und zum Färben pflanzlicher und tierischer Fasern verwendet [Römpp Chemielexikon]. Natürlicher Indigo wird offiziell in chinesischen Arzneibüchern geführt und in der traditionellen chinesischen Heilkunde als Hämostatikum, Antipyretikum sowie als entzündungshemmendes und beruhigendes Medikament bei bakteriellen und viralen Krankheitsbefällen angewendet. Nachdem die antileukämischen Eigenschaften des natürlichen Indigos entdeckt wurden, wurde Indirubin als aktiver Inhaltsstoff isoliert [Fang und Wu, 1982]. Strukturell handelt es sich bei Indigo um ein 2´,2-verknüpftes Bisindol (Abbildung 6).

2.1.3.1.2 Indirubin (Indigorot)

Indirubin (Abbildung 6), ein 2´,3-Bisindol, ist das rote Isomer von Indigo, das in pflanzlichem Indigo bis zu 60% enthalten sein kann. Indirubin hemmt die DNA-Synthese von humanen granulozytären Leukämiezellen sowie verschiedenen Tumoren *in vivo* und *in vitro*. Man geht dabei von einer Hemmung der DNA-Polymerisation aus, die durch Veränderungen der DNA-Struktur oder durch Hemmung der DNA-Polymerase verursacht wird [Wu et al., 1982]. In klinischen Studien mit Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie konnte bei 26% der Betroffenen eine Totalremission und bei 33% der Patienten partielle Remission beobachtet werden [Indirubin Cooperative Group, 1980]. Schwerwiegende Nebenwirkungen konnten nicht nachgewiesen werden. Ein Nachteil von Indirubin ist seine geringe Bioverfügbarkeit in Folge von schlechter Löslichkeit [Gu et al., 1989].

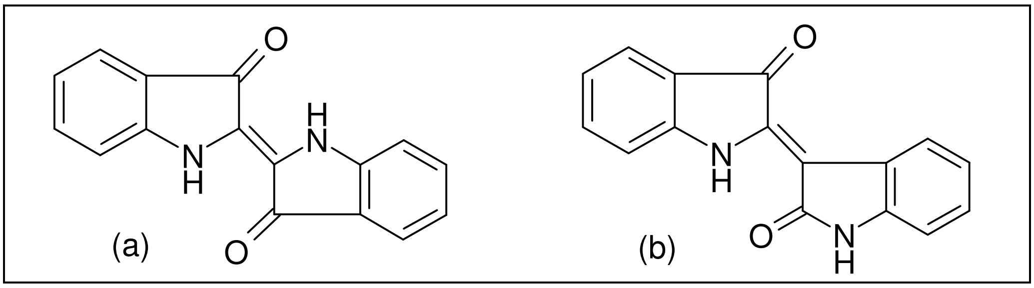


Abbildung 6: Strukturformeln von Indigo (a) und Indirubin (b)

2.1.3.1.3 Indirubin-Derivate

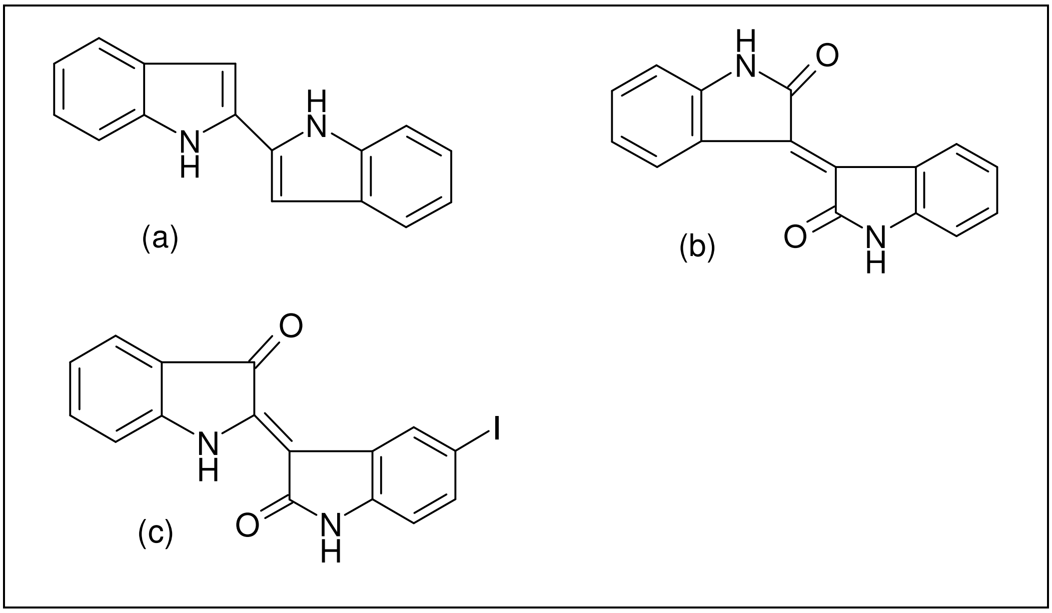


Abbildung 7: Strukturformeln von 2-(2´-bisindolyl)indol (a), Isoindigo (b) und 5-Jod-Indirubin (c)

In unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene Derivate von Indirubin synthetisiert, die auf ihre antineoplastische Wirkung untersucht werden sollten.

Dazu gehören das Isoindigo und ein 2-(2-Bisindolyl)indol, sowie verschiedene substituierte Indirubine. Modifizierte Indirubin-Derivate wurden bereits früher getestet und zeigten ebenfalls Antitumoraktivität (Abbildung 7) [Gu et al., 1989].

2.1.3.1.4 Deoxytopsentin

Schwämme produzieren zu ihrem eigenen Schutz vielfältige Sekundärmetaboliten, die das Wachstum von Einzellern und Bakterien hemmen und größere Tiere vom Fraß abhalten. Sie umfassen eine große Anzahl verschiedener chemischer Strukturen, die zytotoxische, antibakterielle, antivirale, anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkungen zeigen und deshalb für die Naturstoff-Forschung interessant sind [Müller und Schröder, 1997].
Bartik et al. entdeckten 1987 drei neue Substanzen im methanolischen Extrakt des Mittelmeerschwammes *Topsentia genitrix.* Dazu gehörten Topsentin, Deoxytopsentin (Abbildung 8) und Bromtopsentin.
Topsentine gehören ebenso wie Indigo und seine Derivate der Stoffklasse der Bisindole an. Für Deoxytopsentin wurde Toxizität gegenüber der Fischart *Lebistes reticulatus* (LD = 15-20 mg/l) beobachtet [Bartik, 1987]. Außerdem wurde wachstumshemmende Wirkung an der Maus-Leukämiezellinie P388 (IC_{50} = 12 µg/ml) und dem Maus-Hepatitis-Virus A-59 beschrieben [Tsujii und Rinehart, 1988].
In unserer Arbeitsgruppe wurde Deoxytopsentin synthetisch gewonnen.

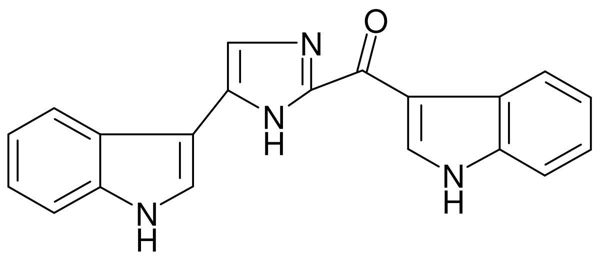


Abbildung 8: Strukturformel von Deoxytopsentin

2.1.3.2 Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide

Indolocarbazole gehören zur Familie der Indol-Alkaloide. Diese kommen in Mikroorganismen, Pilzen, Flechten und in höheren Pflanzen vor. Grundkörper der Indolocarbazole sind Indol, Indolenin und Indolin, denen Carbazolringe in 2,3-Stellung angegliedert sind. Verschiedene Indolocarbazole und Strukturanaloge sind für ihre antineoplastische Wirkung beschrieben. Ein Problem stellt dabei häufig die geringe Selektivität der Wirkstoffe für ein bestimmtes Enzym dar. Staurosporin (Abbildung 9), ein Indol-Alkaloid aus *Streptomyces staurosporaeus,* ist ein potenter Proteinkinase C Inhibitor [Tamaoki et al., 1986], ebenso wie das Antibiotikum K252a (Abbildung 9)[Bailly et al., 1997]. Beide zeigen jedoch auch Aktivität an einem Spektrum weiterer zellulärer Proteinkinasen. Durch Modifikation der Reste an den

Indolringen entstand das Bisindolylmaleimid GF109203X (Abbildung 9), das weit höhere Selektivität für Proteinkinase C zeigt [Toullec et al., 1991].
NB 506 (Abbildung 9), ein Derivat des natürlichen Rebeccamycins, welches nur wenig antineoplastische Aktivität zeigt, ist für seine Topoisomerase-Hemmung beschrieben [Ohkuboo, 1997]. Neueste Studien zeigen, daß Mitglieder der Substanzklasse auch Tyrosinkinasen, speziell den PDGF-Rezeptor [Spacey et al., 1998] wie auch den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R) [Traxler et al., 1997], wirkungsvoll hemmen.

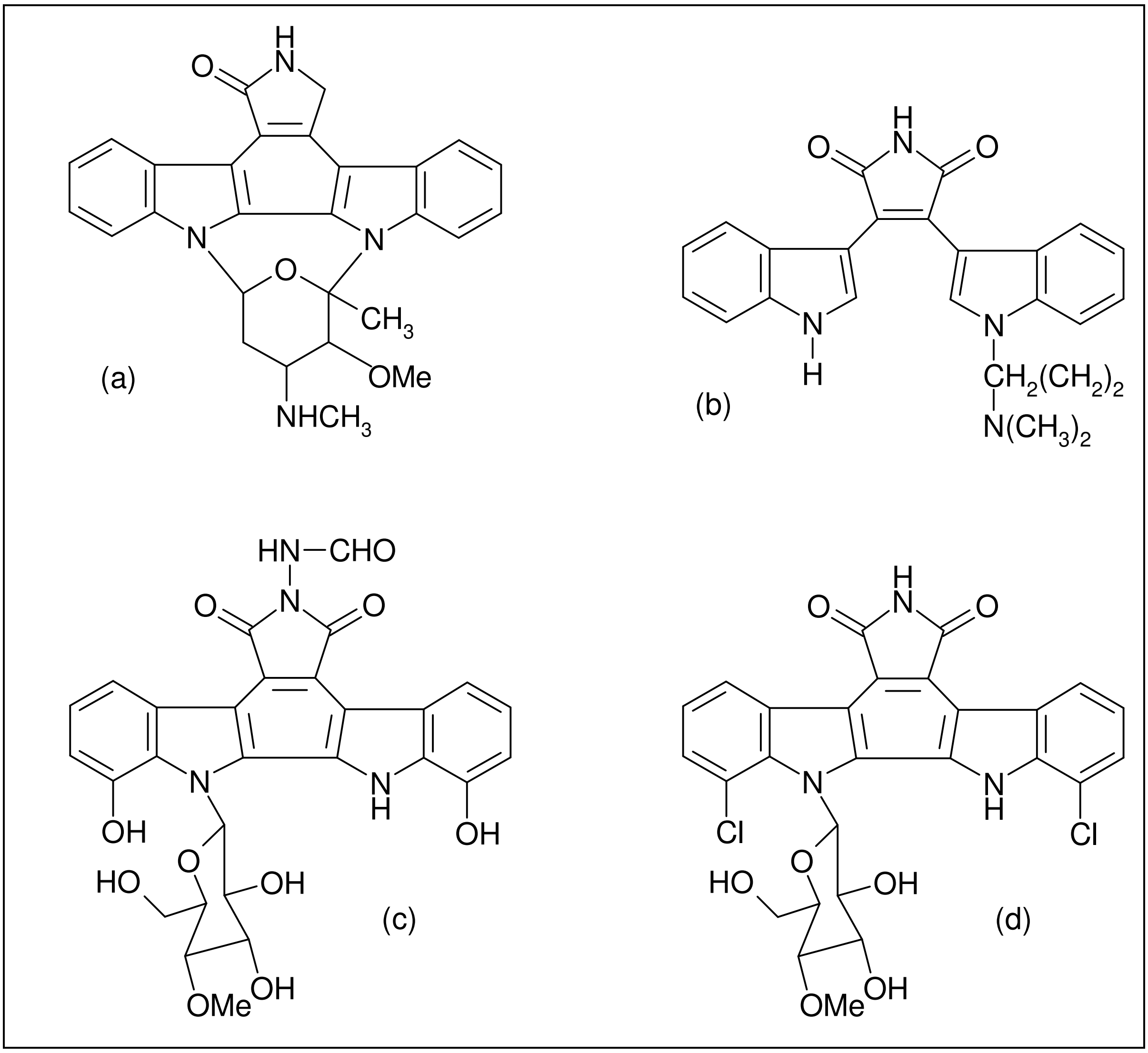
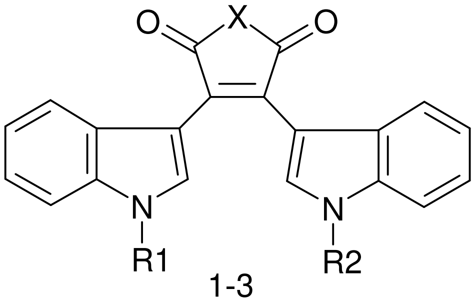
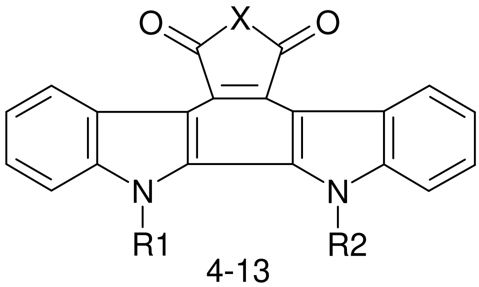


Abbildung 9: Staurosporin(a) und Strukturanaloge: GF 109 203 (b) , NB-506 (c), Rebeccamycin (d)

Indolocarbazole sind in mehrerer Hinsicht für die Krebsforschung interessant, da sie sowohl verschiedene Zielstrukturen ansprechen, als auch durch Modifikationen im Molekül sehr vielseitig veränderbar sind. In der Gruppe von Melnik, Moskau, wurden Analoge von Staurosporin synthetisiert, die sich in den Resten R1, R2 und an der Position X unterscheiden [Melnik et al., 1996 a) und b); Bakhmedova et al., 1997]. Diese Wirkstoffe (Tabelle 1, Abbildung 10) wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre antineoplastische Wirkung untersucht.



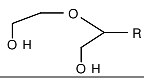
1-3



4-13

Abbildung 10: Grundkörper der Substanzen 1-3 (Bisindolylmaleimide) und 4-13 (Indolocarbazole) (vergl. Tabelle 1)

Tabelle 1: Strukturelemente und Molekulargewichte der untersuchten Staurosporinderivate (die Numerierung wurde in der Reihenfolge von Melnik beibehalten)

Substanz	MW	X	R1	R2
1	474	- O	α-L-Arabinose	- CH_3
2	473	- NH	α-L-Arabinose	- CH_3
3	459	- NH	β-D-Xylose	- H
4	457	- NH	α- L-Arabinose	- H
5	471,47	- NH	β-D-Xylose	- CH_3
6	471,47	- NH	α- L-Arabinose	- CH_3
7	457,45	- NH	β-D-Xylose	- H
8	457,45	- NH	β-D-Ribose	- H
9	501,47	- NH	β-D-Galactose	- CH_3
10	471,47	- NH	β-D-Ribose	- CH_3
11	472,46	- O	β-D-Xylose	- CH_3
12	487,45	- NH	β-D-Galactose	- H
13	443,44	- NH		- CH_3

2.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

2.2.1 Mikrotubuliproteine

Mikrotubuli (MTs) bilden zusammen mit Actin-Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten das Zytoskelett eukaryotischer Zellen. Erhaltung der Zellform, Zellbeweglichkeit, Chromosomenbewegungen und der intrazelluläre Transport von Pigmenten und Organellen sind Zellfunktionen, an denen Mikrotubuli maßgeblich beteiligt sind [Osborn und Weber, 1976]. Mikrotubuli werden durch Polymerisation von Tubulinuntereinheiten aufgebaut, die in der Zelle als Heterodimer von α- und β-Tubulin mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 50 kD vorliegen. Strukturell sind sie zylinderförmige Röhren mit einem Innendurchmesser von 15 nm und einem Außendurchmesser von 25 nm. MT sind zusammengesetzt aus 13 gestaffelt aneinandergelagerten Protofilamenten, die aus alternierend angeordneten globulären Tubulin-α- und -β-Untereinheiten bestehen und so eine helikale Struktur ausbilden [Wallin, 1991](Abbildung 11).

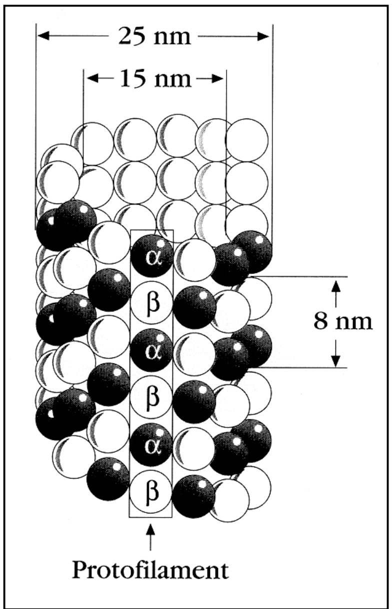


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Mikrotubulus, [Becker und Deamer, 1991]

α- und β-Tubuline sind stark konservierte Proteine mit bekannter Aminosäuresequenz und über 40% Sequenzhomologie. Es gibt viele verschiedene Isoformen, die durch Expression verschiedener Isogene und posttranslationale Modifikation zustande kommen [Boucher, 1994]. Die beiden Untereinheiten werden auf separaten Genen codiert [Ranganathan, 1996]. An der Oberfläche von α- und β-Tubulin sind longitudinal mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) angeordnet, die für die Polymerisation (MAP1, MAP2, tau-Protein) und die Stabilität (MAP1, MAP2) der Mikrotubuli mitverantwortlich sind [Wallin, 1991].

Die beiden Enden eines einzelnen Mikrotubulus unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Assoziationrate von Tubulinmolekülen. Die in *in vitro* Experimenten untersuchten Geschwindigkeiten für die An- bzw. Ablagerung von Tubulin an den MT sind am Plus-Ende doppelt so hoch wie am Minus-Ende. Daher wachsen und schrumpfen MTs vor allem am Plus-Ende.

Das Modell von langsamem Wachstum und schnellem Abbau der Mikrotubuli wurde von Kirschner und Mitchinson (1986) als dynamische Instabilität dargestellt (Abbildung 12).

Bei der Polymerisation von Tubulin bindet jedes Molekül Tubulin zwei Moleküle GTP und wird vom Plus-Ende aus in den wachsenden Mikrotubulus eingebaut (T-Bestandteile in Ab-

bildung 12). GTP wird bei der Bindung von Tubulindimeren an den Mikrotubulus zu GDP und P_i hydrolysiert (D-Bestandteile in Abbildung 12).
Erfolgt die Hydrolyse vor der Bindung, so lagern sich GDP-tragende Untereinheiten an, die schnell vom Mikrotubulus abgespalten werden. Das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Abbau ist abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit von GTP an Tubulinmonomeren und von der Verfügbarkeit von Tubulin-GTP-Untereinheiten. In Gegenwart hoher Tubulin-GTP-Konzentration bildet der MT ein sogenanntes GTP-Cap, das den Mikrotubulus stabilisiert und weitere Polymerisation ermöglicht. Sinkt die Tubulin-GTP-Konzentration nimmt die Polymerisationsgeschwindigkeit ab. Durch Hydrolyse kommt es zum Verlust des GTP-Cap. Dadurch wird der MT instabil und schrumpft schnell [Kirschner und Mitschinson, 1986].

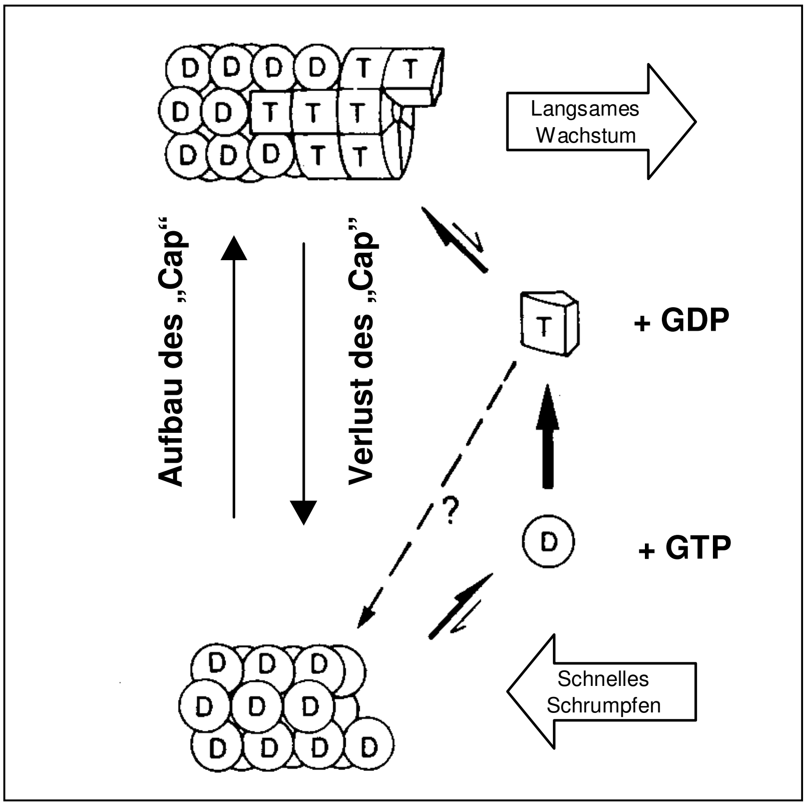


Abbildung 12: Dynamische Instabilität von Mikrotubuliproteinen [Kirschner und Mitschinson, 1986]

In der Zelle sind Mikrotubuli unter anderem am Aufbau der Mitosespindel beteiligt. Dabei wird die Polarität der MT durch die Verankerung des Minus-Endes an das Mikrotubuli-Polymerisationszentrum (MTOC) oder Zentromer festgelegt. Während der Interphase werden die MT vom MTOC aus strahlenförmig auf- und abgebaut.
Substanzen, die auf Mikrotubuli wirken, sind unter Umständen für eine Krebstherapie interessant, da durch die Wechselwirkung der Substanz mit der Mitosespindel die Zellproliferation beeinflußt werden kann.
Der Einfluß von Modulatoren auf das Polymerisations- und Depolymerisationsverhalten von Mikrotubuliproteinen kann im zellfreien System mit Hilfe des sogenannten *in vitro*-Polymerisationsassays untersucht werden.

Als Beispiele für Substanzen, die mit Tubulin interagieren seien Colchicin (Abbildung 13) aus *Colchicinum autumnale*, Vincristin und Vinblastin aus *Vinca minor* genannt, die durch Polymerisationshemmung die Aggregation von Tubulin behindern.
Colchicin bindet an die β-Untereinheit von Tubulindimeren und hemmt den Aufbau des mitotischen Apparates. Die Beeinträchtigung der Polymerisation führt zur unvollständigen und unter Umständen falschen Polymerstruktur, zur Störung der Mitose, strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen und damit eventuell zum Zelltod.
Vinca-Alkaloide können sowohl an die α- als auch die β-Untereinheit der Tubulindimere binden und die Polymerisation hemmen [Wallin et al., 1991].

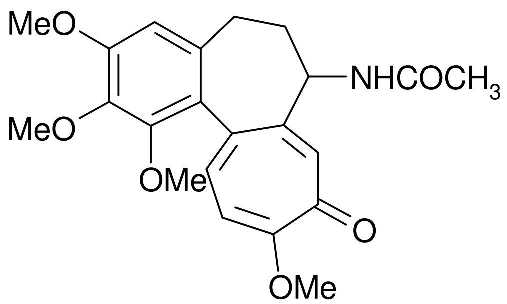


Abbildung 13: Strukturformel von Colchicin

Taxol (Abbildung 14) wurde 1967 erstmals aus der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert und wird heute zur Behandlung von Ovarialkarzinomen eingesetzt. Taxol fördert die Aggregation und hemmt die Depolymerisation von Mikrotubuliproteinen und stabilisiert so die Mitosespindel der Zelle. Der Hemmstoff bindet dabei bevorzugt an die ß-Tubulinuntereinheiten der Polymere und weniger an die Tubulin-Dimere. Dies führt zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes und vermittelt durch die dauerhafte Störung vitaler Zellfunktionen den therapeutischen Effekt [Wall und Wani, 1995].

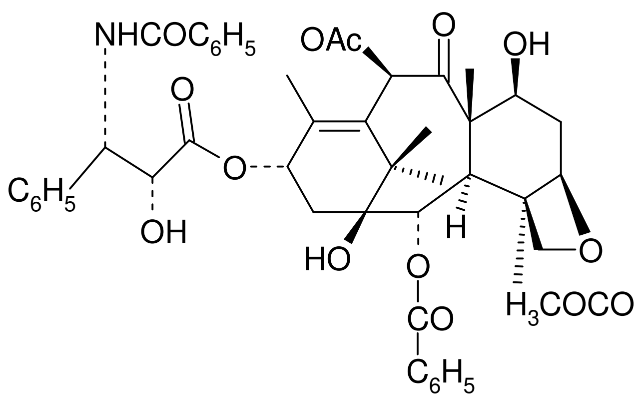


Abbildung 14: Strukturformel von Taxol

2.2.2 Proteinkinase C

Die Proteinkinasen C (PKC) bilden eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung in der Zelle und üben Kontrolle auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung aus [Nishizuka, 1992]. Die Aktivierung der Enzyme erfolgt über die Kofaktoren Ca^{2+}, Diacylglyzerin (DAG) und Phospholipide.

Die Proteinkinasen C sind monomere Proteine, die aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Domäne bestehen. Die regulatorische Domäne der PKC enthält eine Pseudosubstratregion, die in der inaktiven Form des Enzyms mit der Substratbindungsstelle in der katalytischen Domäne interagiert und die Enzymaktivität blockiert. Durch Bindung von Kofaktoren wie Ca^{2+}, Phosphatidylserin oder DAG kommt es zu einer Konformationsänderung des Polypeptids und zur Freigabe der katalytischen Region [Grunicke und Überall, 1992; Azzi et al., 1992]. Die C1-Region der regulatorischen Domäne enthält zwei cysteinreiche Domänen, an denen die Bindung von DAG und Phorbolestern erfolgt.

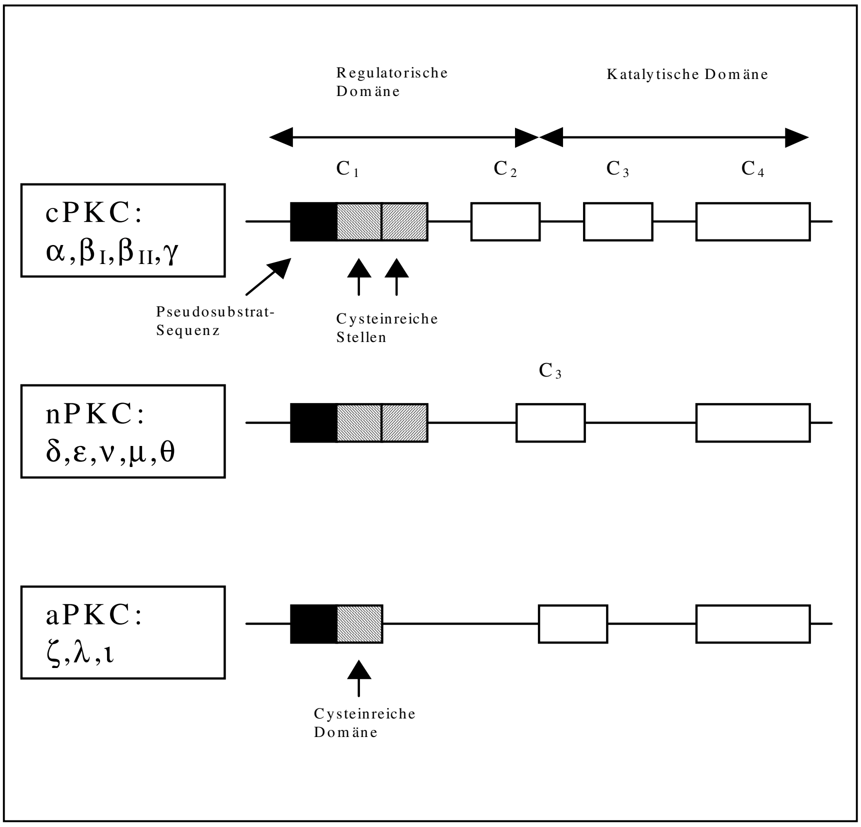


Abbildung 15: Struktur der PKC Isoenzyme, [Gordge und Ryves, 1994, modifiziert]

C für konservierte Regionen, C_1 beinhaltet die Pseudosubstratbindungsstelle und cysteinreiche Regionen (His-X_{12}-Cys-X_2-Cys-$X_{10\text{-}14}$-Cys-X_2-Cys-X_4-His-X_2-Cys-X_7-Cys). Hier werden Phorbolester, DAG und Phosphatidylserin gebunden. C_2 ist die Calcium-Bindungsstelle. Die C_3-Region besitzt eine ATP Bindungssequenz. Die Funktion der C_4 ist noch unbekannt.

Der C2-Abschnitt enthält die Ca^{2+}- Bindungsstelle, ist aber nicht bei allen Isoenzymen der Proteinkinase C-Familie zu finden. Die konservierten C3- und C4-Abschnitte bilden die katalytische Domäne mit den Bindungsstellen für ATP und Substratproteine.
In Säugern unterscheidet man 12 Isoenzyme, die aufgrund biochemischer Eigenschaften und Sequenzhomologien in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 15).
Zu den klassischen PKCs (cPKC) gehören die Isotypen α, β_I, β_{II} und γ. Diese sind Ca^{2+}-abhängig (d.h. sie besitzen die C2-Calcium-Bindungsstelle) und durch Phorbolester bzw. DAG aktivierbar. Eine weitere Gruppe sind die neuartigen PKCs (nPKCs) δ, ε, η, θ und μ. Sie besitzen keine Ca^{2+}-Bindungsregion, sind deshalb Ca^{2+}-unabhängig, lassen sich aber durch Phorbolester aktivieren. Die dritte Gruppe bilden die atypischen PKCs (aPKCs) ζ, λ und ι. Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie weder Ca^{2+}-abhängig noch durch Phorbolester aktivierbar sind [Gordge und Ryves, 1994; Newton, 1995].

2.2.2.1 Aktivierung der PKC

Die Aktivierung der Proteinkinase C erfolgt hauptsächlich über den Inositolphospholipid-Weg. Nach Bindung eines Liganden an einen membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor oder einen Tyrosinkinaserezeptor, werden die Phospholipasen C β oder γ aktiviert. Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in DAG und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG bewirkt zusammen mit Phosphatidylserin an der Plasmamembran die Aktivierung der PKC. IP_3 setzt Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Ca^{2+} bewirkt die Translokation der PKC an die Plasmamembran und wirkt synergistisch mit DAG. Tumorpromovierende Substanzen wie Phorbolester konkurrieren mit DAG um die gleiche Bindungsstelle bei der Aktivierung der Proteinkinase C [Nishizuka, 1984; Berridge und Irvine, 1984].
Während DAG in der Zelle sehr schnell abgebaut wird, sind Phorbolester metabolisch stabil und bewirken dadurch eine andauernde Aktivierung [Shariff und Luna, 1992]. DAG und Phorbolester bewirken eine Translokation der PKC vom Zytosol an die Zytoplasmamembran [Newton, 1995].
Eine weitere Rolle in der Aktivierung der PKC kommt den Phospholipasen A und D zu. Diese dienen vor allem der länger andauernden Aktivierung der PKC. Dabei dienen Phospholipide aus der Zellmembran, vor allem Phosphatidylcholin (PC), als Substrate. PC wird von der Phospholipase D zu Phosphatidsäure hydrolysiert, aus der nach Abspaltung des Phosphatrestes ebenfalls DAG entsteht. Phospholipase D wird durch Ca^{2+} in submikromolaren Konzentrationen aktiviert. Phospholipase A setzt aus Membran-Phospholipiden freie Fettsäuren (hauptsächlich Arachidonsäure) und Lysophospholipide frei. Eine direkte Aktivierung der PKC durch Fettsäuren ist mehrfach beschrieben. Die Stimulation der Phospholipase A erfolgt durch rezeptorvermittelte Aktivierung [Asaoka et al., 1992; Liscovitch, 1992].
Ein weiterer aktivierender Prozess wird der Protease Calpain zugeschrieben. Das Enzym spaltet die Proteinkinase C an einer sogenannten „Hinge“-Region zwischen regulatorischer

und katalytischer Domäne und setzt dabei ein katalytisch aktives Fragment frei, das keiner Regulation durch die Kofaktoren mehr zugänglich ist [Newton, 1995].

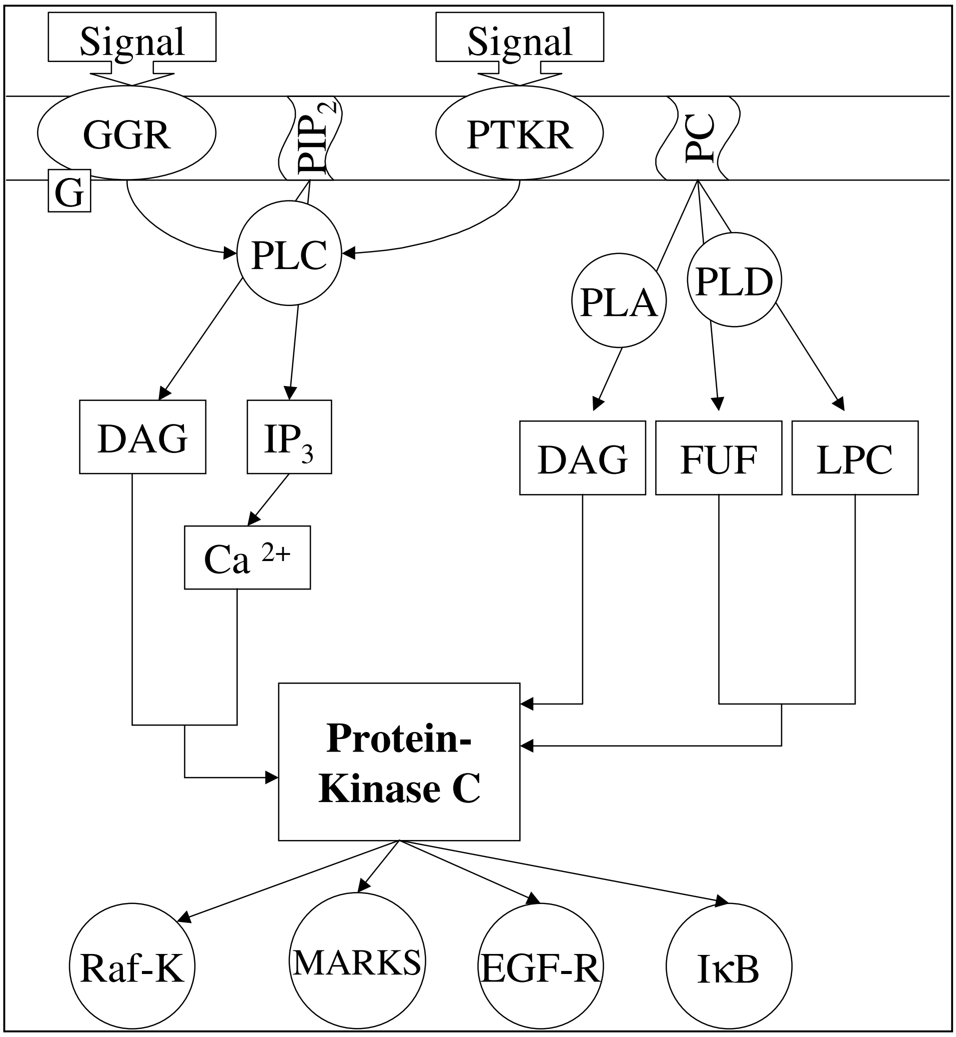


Abbildung 16: Schematische Übersicht über den PKC-Signalübertragungsweg. GGR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PTKR = Proteintyrosinkinase Rezeptor, PIP_2 = Phospatidylinositol 4,5-bisphosphat, PC = Phosphatidylcholin, PLC = Phopholipase C, PLA = Phospholipase A, PLD = Phospholipase D, DAG = Diacylglyzerin, IP_3 = Inositol-1,4,5-triphosphat, FUF = freie ungesättigte Fettsäuren, LPC = Lyso-Phosphatidylcholin, MARKS = myristoyliertes, alanin-reiches C-Kinase Substrat, EGF-R = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, IκB = Inhibitor von NFκB [modifiziert nach Asaoka et al., 1992 und Krauss, 1997]

Unter den sehr vielfältigen Substraten der PKC befinden sich der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor, die Raf-Kinase, die an der Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) beteiligt ist, das Inhibitorprotein des Nuklearen Faktors κB und die sogenannten MARKS-Proteine (myristoyliertes, alanin-reiches C-Kinase Substrat), die mit dem Actin-Zytoskelett in Zusammenhang stehen.

2.2.2.2 Inhibitoren der PKC

PKC-Inhibitoren lassen sich in zwei Gruppen aufteilen, abhängig von ihrer Interaktion mit der katalytischen oder der regulatorischen Domäne des Enzyms. Dabei ist es schwierig spezielle Wirkmuster herauszustellen, da viele Hemmstoffe neben der Hemmung der PKC weitere Zielenzyme beeinflußen. Hemmstoffe, die mit ATP an der katalytischen Domäne konkurrieren, sind z.B. Staurosporin und das Bisindolylmaleimid GF109203X.
Die Mehrheit der PKC-spezifischen Modulatoren wirkt durch Interaktion mit der regulatorischen Domäne. Diese Hemmstoffe konkurrieren häufig um die DAG/Phorbolesterbindungstelle (z.B. Bryostatin) oder blockieren die PKC-Phospholipid-Interaktion. [Gordge und Ryves, 1994].
Bryostatin wirkt ähnlich einem Phorbolester, indem es die Proteinkinase C-Aktivität aktiviert, zeigt allerdings nicht dessen tumorpromovierende Wirkung. Die Substanz befindet sich in der klinischen Phase I-Studie [Bear et al., 1996].

2.2.3 DNA-Topoisomerasen

Die doppelhelikale Struktur der DNA bringt bei zellulären Vorgängen wie Replikation oder DNA-Reparatur das Problem der Torsionsspannung mit sich. Topoisomerasen sind Enzyme, die die topologische Struktur der DNA verändern können. Dadurch sind sie für die Kontrolle

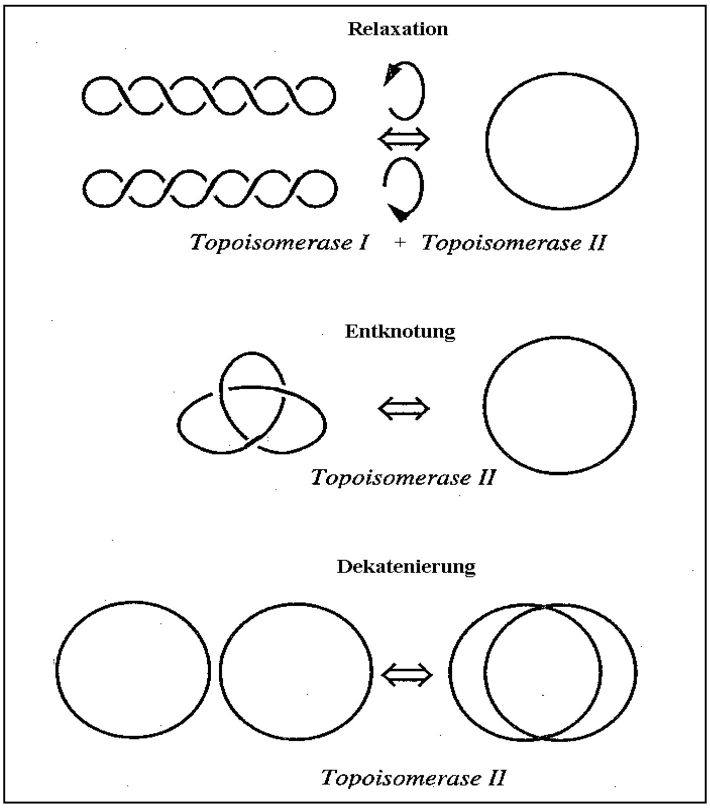


Abbildung 17: Enzymaktivität von Topoisomerase I und II [Boege, 1996]

zellulärer Vorgänge wie DNA-Replikation, -Transkription, -Reparatur sowie Schwesterchromatidentrennung und Chromosomen(de)kondensation essentiell.
Durch ihre Fähigkeit, Strangbrüche in der DNA zu generieren, aber auch wieder zu verschließen, sind sie in der Lage komplexe DNA-Strukturen zu entspiralisieren, zu entknoten, zu entwirren und wiederherzustellen (Abbildung 17). Topoisomerasen kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und sind im Zellkern lokalisiert. In eukaryotischen Zellen sind zwei Klassen des Enzyms bekannt, die in Topoisomerase I und Topoisomerase II unterschieden werden [Wang, 1985; Osheroff, 1989].

2.2.3.1 Topoisomerase I

Eukaryotische Topoisomerase I wurde 1972 erstmals in Extrakten von Mauszellen gefunden und seitdem in allen eukaryotischen Zellen nachgewiesen [Juan et al., 1988]. Topoisomerase I ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 100 kD.

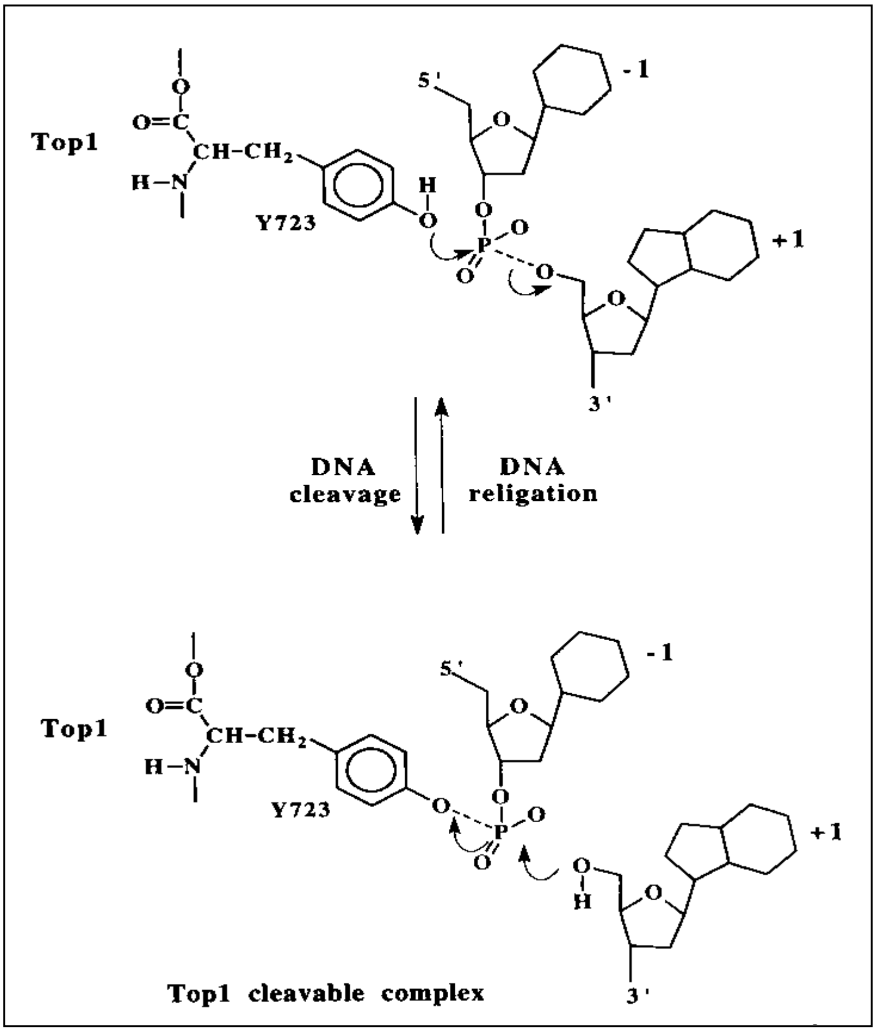


Abbildung 18: Topoisomerase I (Top 1) induzierte Spaltung (cleavage) und Religation von DNA, Y 723 stellt den Tyrosinrest der Top 1 dar, der die Bindung mit der DNA eingeht. Die DNA-Basen neben dem Strangbruch werden mit –1 und +1 für den 3´- und den 5´-Terminus gekennzeichnet. [Pommier et al., 1998]

Charakterisiert ist die Topoisomerase I durch die Ausbildung eines katalytischen Intermediates, des sogenannten „Cleavable-Complex“ (Abbildung 18).
Dabei generiert das Enzym einen Einzelstrangbruch in der DNA und bildet eine kovalente Bindung zwischen einem katalytischen Tyrosinrest der Topoisomerase I und dem 3´-Ende der gespaltenen DNA. Die aus dem Strangbruch hervorgehende Relaxation von negativen und positiven Verdrillungen ist für den Ablauf der Replikation und Transkription unerläßlich.
Die Relaxationsreaktion kann in vier Schritte eingeteilt werden:

1) Bindung des Enzyms an die DNA, wobei das eukaryotische Enzym ausschließlich an Doppelstrang-DNA bindet und gebeugte oder superspiralisierte Abschnitte bevorzugt werden [Jaxel et al.,1991; Krogh et al., 1991]

2) Induktion des Einzelstrangbruches durch kovalente Bindung der Tyrosin-Hydroxylgruppe der Topoisomerase I an das 3´-Phosphatende der DNA („Cleavable-Complex“) [Lynn et al., 1989]

3) Einzelstrang-Passage durch den Strangbruch

4) Religation, wobei die 5´-Hydroxylgruppe als Nukleophil dient, das an der Phosphotyrosinbindung angreift und die gespaltene DNA wieder verschließt [Potmesil, 1994].

Topoisomerase I wird durch ein “single-copy“-Gen auf Chromosom 20q12-13.2 kodiert [Juan et al.,1988]. Das Enzym liegt mit Chromatin assoziiert vor, ist im Zellkern angereichert und wird während des gesamten Zellzyklus konstitutiv exprimiert [Corbett und Osheroff, 1993].

2.2.3.2 Topoisomerase II

Topoisomerase II benötigt für ihre katalytische Aktivität ATP und verändert die DNA-Struktur durch das Einführen eines transienten Doppelstrangbruches, durch den eine zweite intakte Doppelhelix passieren kann [Osheroff, 1986]. Säugetiere besitzen zwei Isoformen der Topoisomerase II, die in α und β mit Molekulargewichten von 170 und 180 kD unterschieden werden. Die Isoformen werden durch separate Gene auf den Chromosomen 17q21-22 und 3p24 codiert, zeigen aber ca. 70% Aminosäurehomologie [Jenkins et al., 1992; Tsai-Pflugfelder et al., 1988]. Trotz dieser hohen Sequenzhomologie handelt es sich um zwei Enzyme mit verschiedenen Funktionen, die unterschiedlich reguliert werden und auch verschiedenartige Expression in Geweben zeigen. Der Topoisomerase IIα-Level in der Zelle steigt in Phasen rapider Proliferation. Das Enzym wird mit dem Verlauf des Zellzyklus reguliert und erreicht seine größte Expression ebenso wie seine höchste Aktivität in G_2/M. Topoisomerase IIβ erreicht die höchste Aktivität in der Plateauphase des Wachstums. Sie wird während des gesamten Zellzyklus und in ruhenden Zellen exprimiert [Giaccone, 1994]. Die subzelluläre Lokalisation unterscheidet sich insofern, daß die Isoform α im Nukleoplasma vorhanden ist, während β sowohl im Nukleoplasma als auch in den Nukleoli lokalisiert ist [Isaacs et al., 1995].

Topoisomerase II kann in drei distinkte Domänen aufgeteilt werden. Die N-terminale Domäne enthält die Konsensus-Sequenz für die ATP-Bindung, während die zentrale Domäne den Tyrosinrest enthält, der die kovalente Bindung zur DNA während der Schneidereaktion ausbildet. Die C-terminale Region ist sehr variabel und enthält mehrere Phosphatbindungsstellen, die für die physiologische Regulation des Enzyms notwendig sind (Abbildung 19) [Corbett und Osheroff, 1993].

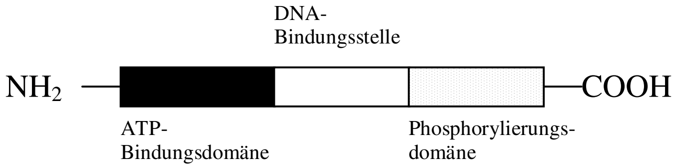


Abbildung 19: Domänenstruktur der Topoisomerase II, [Corbett und Osheroff, 1993, modifiziert].

Topoisomerase II bildet wie Topoisomerase I ein katalytisches Intermediat zwischen DNA und Enzym in Form eines Cleavable-Complex. Der katalytischen Zyklus wird initiiert durch die Bindung des Enzyms an eine spezifische DNA-Sequenz unter Ausbildung eines Doppelstrang-Spaltungs- und Religationsgleichgewichtes. Die Schnittstelle befindet sich an einer spezifischen Erkennungssequenz. Es wird ein 5´-Phosphat/3´-Hydroxyl-Doppelstrangbruch eingeführt mit einem Überhang von 4 Basen am 5´-Ende. Wenn die Topoisomerase II einen Doppelstrangbruch in die DNA eingeführt hat, wird ein zweiter Strang durch die Lücke geführt, danach erfolgt die Religation des Strangbruches [Corbett und Osheroff, 1993].

Die Topoisomerase II ist ein Phosphoprotein. Durch Phosphorylierung erhöht sich die enzymatische Aktivität *in vitro*, wofür die Casein Kinase II sowie die Proteinkinase C verantwortlich gemacht werden [Takano, 1992].

2.2.3.3 Hemmstoffe von Topoisomerasen

Hemmstoffe von Topoisomerasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen [Pommier, 1998; Capranico et al., 1997]:

Topoisomerase-Gifte stabilisieren das kovalente DNA-Topoisomerase-Intermediat und hemmen dadurch die katalytische Aktivität der Topoisomerase. Die Ausbildung des stabilen Intermediates resultiert in DNA-Strangbrüchen und Apoptose.

Topoisomerase-Inhibitoren hemmen die DNA-Bindung bzw. die Spaltungsreaktion der Topoisomerase und dadurch die katalytische Aktivität ohne die Induktion von Strangbrüchen.

Auch aufgrund ihrer Affinität zur DNA kann man die Hemmstoffe in verschiedene Gruppen einteilen. Viele Topoisomerase-Hemmstoffe sind bekannt für ihre Fähigkeit an die DNA zu

binden. Einige sind reine Interkalatoren, d.h. sie lagern sich zwischen zwei Basenpaaren in die DNA ein, andere sind Liganden der kleinen Furche der DNA, während einige auch Affinität für beides zeigen [Capranico et al., 1996].
In Abbildung 20 ist die Struktur der DNA mit Ausbildung von kleiner und großer Furche schematisch gezeigt.

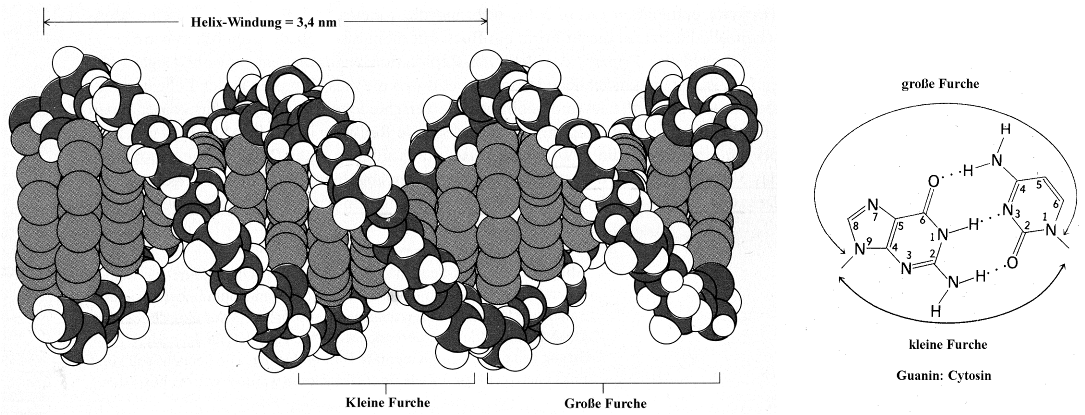


Abbildung 20: Kalottenmodell einer B-DNA mit Ausbildung von großer und kleiner Furche und Guanin-Cytosin Basenpaar [Alberts et al., 1995, Streyer, 1991]

<u>Topoisomerase I-Hemmung</u>

Der bekanntester Vertreter der Topoisomerase I Hemmstoffe ist das natürliche Alkaloid Camptothecin (Abbildung 21), das aus dem chinesischen Baum *Camptotheca acuminata* gewonnen wird.

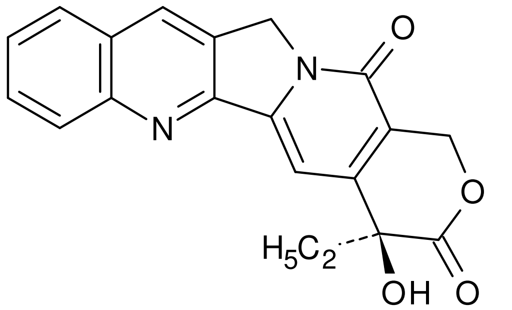


Abbildung 21: Strukturformel von Camptothecin

Die Substanz wurde bekannt durch ihre Inhibierung der Nukleinsäuresynthese, sowie als Verursacher von Strangbrüchen in chromosomaler DNA. Es zeigte sich, daß diese Strangbrüche durch Bindung von Camptothecin an Säuger-Topoisomerase I in Form eines ternären Substanz-Topoisomerase-DNA-Komplexes induziert werden [Hsiang,1985; Hertzberg, 1989].
Camptothecin bindet reversibel an den Komplex zwischen DNA und Topoisomerase I und stabilisiert dadurch das kovalente Intermediat. Aufgrund der nicht reversiblen DNA-Synthesehemmung wurde angenommen, daß Camptothecin eine S-Phase spezifische Zytotoxizität mit Topoisomerase I als Zielprotein besitzt. Der durch Camptothecin stabilisierte Cleavable-Complex blockiert die Fortbewegung der Replikationsgabel. Dadurch kommt es zu ei-

ner Kollision, die zu DNA Schäden in Form von DNA-Strangbrüchen führen kann. Dies resultiert schließlich in einem Zellzyklus-Arrest in der G_2-Phase und dem programmierten Zelltod [Hsiang, 1989].

Mittlerweile wurden mehrere Camptothecin-Derivate entwickelt, die sich vor allem durch bessere Löslichkeit im wässrigen Milieu auszeichnen.

Weitere Topoisomerase I-Gifte sind Substanzen aus der Klasse der Benzoanthrazene (z.B. Saintopin), der Benzophenanthridine (z.b. Nitidin und Fagaronin), der Indolocarbazole (z.B. NB 506) und der Bisbenzimidazole (z.B. Hoechst 33258, Abbildung 22).

Als Topoisomerase-Inhibitoren sind z.B. Lapachone (Abbildung 22) bekannt.

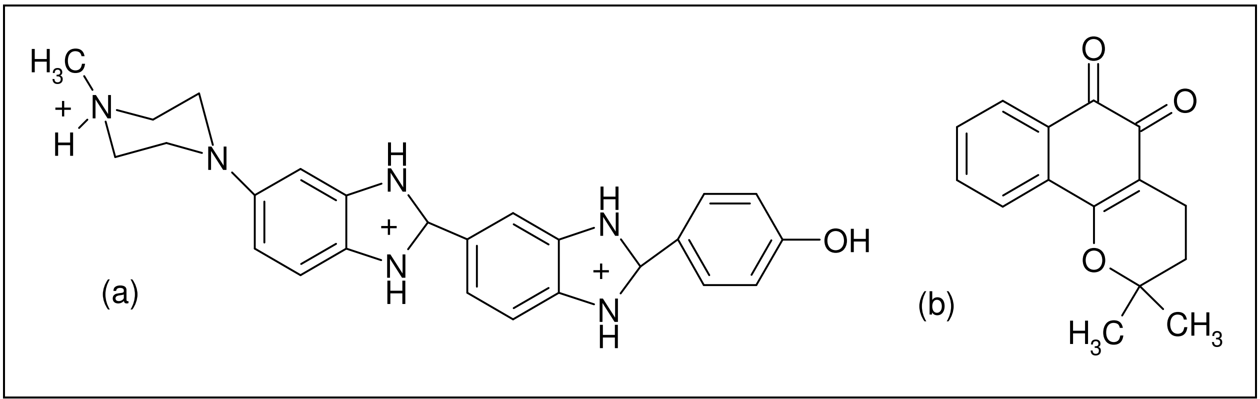


Abbildung 22: Strukturformeln von Hoechst H33258 (a) und ß-Lapachon (b)

Topoisomerase II Hemmung

Als Inhibitoren der Topoisomerase II sind Substanzen aus unterschiedlichen Substanzklassen bekannt. Die meisten dieser Hemmstoffe stabilisieren den Topoisomerase II-DNA Cleavable-Complex. Dabei wird nicht, wie bei den meisten Enzym-Inhibitoren, die katalytische Aktivität direkt gehemmt, sondern die dauerhafte Instandhaltung des Cleavable-Complex führt zur Induktion von massiven DNA-Doppelstrangbrüchen und damit verbundener Lethalität [Corbett und Osheroff, 1993; Pommier et al., 1994; Chen und Liu,1994]. Topoisomerase II Hemmstoffe sind in Zellen mit hoher Topoisomerase II-Konzentration und einer hohen DNA-Replikationsrate am wirksamsten. Da die Konzentration des Enzyms in schnell proliferierenden oder transformierten Zellen ansteigt [Sullivan et al., 1987; Webb et al. 1991], sprechen maligne Tumorzellen bevorzugt auf Behandlung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen an [Chen und Liu, 1994]. Mit Ausnahme der Epipodophyllotoxine und Isoflavonoide sind alle Topoisomerase II-Inhibitoren DNA-Interkalatoren. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt, aber es wird postuliert, daß die Interkalation die Substanz in die richtige Position zur Stabilisierung des Komplexes bringt. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Interkalationsfähigkeit der Substanzen und der Komplexstabilisierung. Die Interkalation bewirkt wahrscheinlich die Inhibierung des Religationsschrittes [Corbett und Osheroff, 1994].

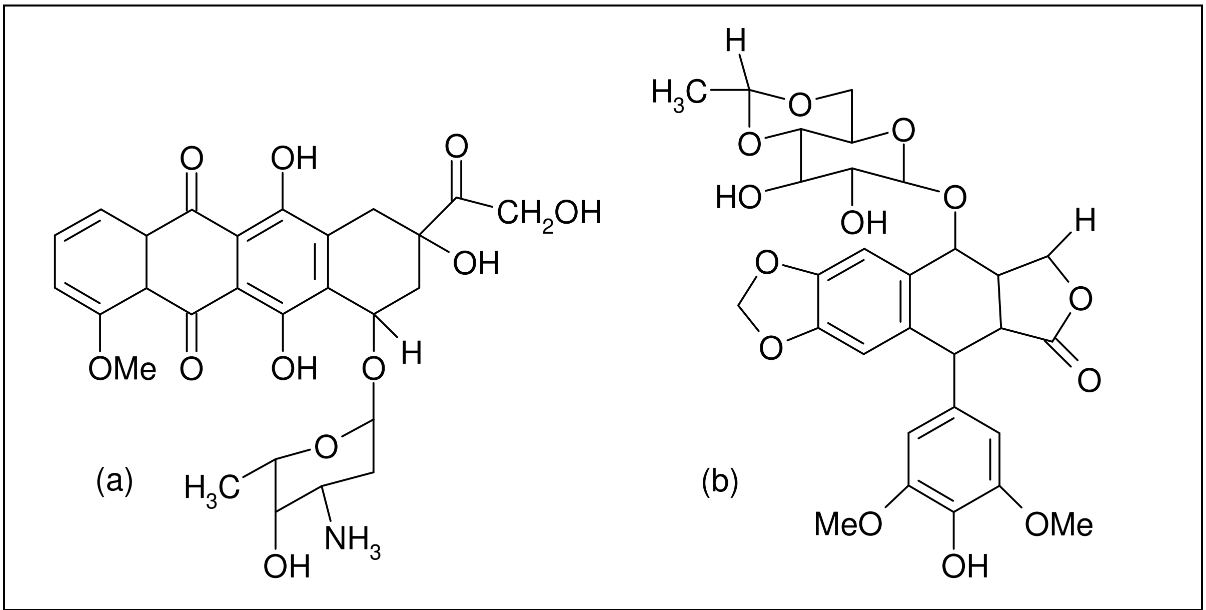


Abbildung 23: Inhibitoren von Topoisomerase II, Adriamycin (Doxorubicin) (a) und Etoposid (b)

Zwei Topoisomerase-Hemmstoffe sollen als Beispiele gezeigt werden(Abbildung 23). Das Epipodophyllotoxin Etoposid wird klinisch als Kombinationspräparat mit Cisplatin gegen kleinzellige Lungenkarzinome eingesetzt. Das Anthracyclin Adriamycin wird ebenfalls klinisch als Zytostatikum benutzt.

2.2.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen unterliegt einer strikten Kontrolle. Cyclinabhängige Kinasen (cdks = cyclin dependent kinases) sind verantwortlich für den Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste. Die katalytischen Aktivierung der cdks erfordert die Bindung der Cycline als regulatorische Untereinheiten. Darüberhinaus wird die Aktivität der Kinasen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung spezifischer Threonin- und Tyrosinreste reguliert [Morgan, 1995].

Die Cycline zeigen im Laufe des Zellzyklus charakteristische Konzentrationsänderungen, während die cdks während des gesamten Zyklus konstitutiv exprimiert werden. Verschiedene Cycline zeigen eine Präferenz für die Bindung an verschiedene Subtypen der cdks [Pines, 1995; Sherr, 1996]. Die Cyclin-cdk-Komplexe können über den Abbau von Cyclinen durch Ubiquitinylierung inaktiviert werden [Pagano, 1997].

Beim Übergang von der G_1-Phase in die S-Phase muß ein sogenannter Restriktionspunkt überschritten werden, an dem über die Progression des Zellzyklus entschieden wird. Dieser Prozess wird hauptsächlich von Cyclinen des D- und E-Typs kontrolliert. In der frühen G_1-Phase spielen vor allem die D-Cycline eine wichtige Rolle. Ihre Synthese und die Bindung an die cdks 4 und 6 sind von der mitotischen Stimulation, z.B. durch Wachstumsfaktoren, abhängig [Sherr, 1996].

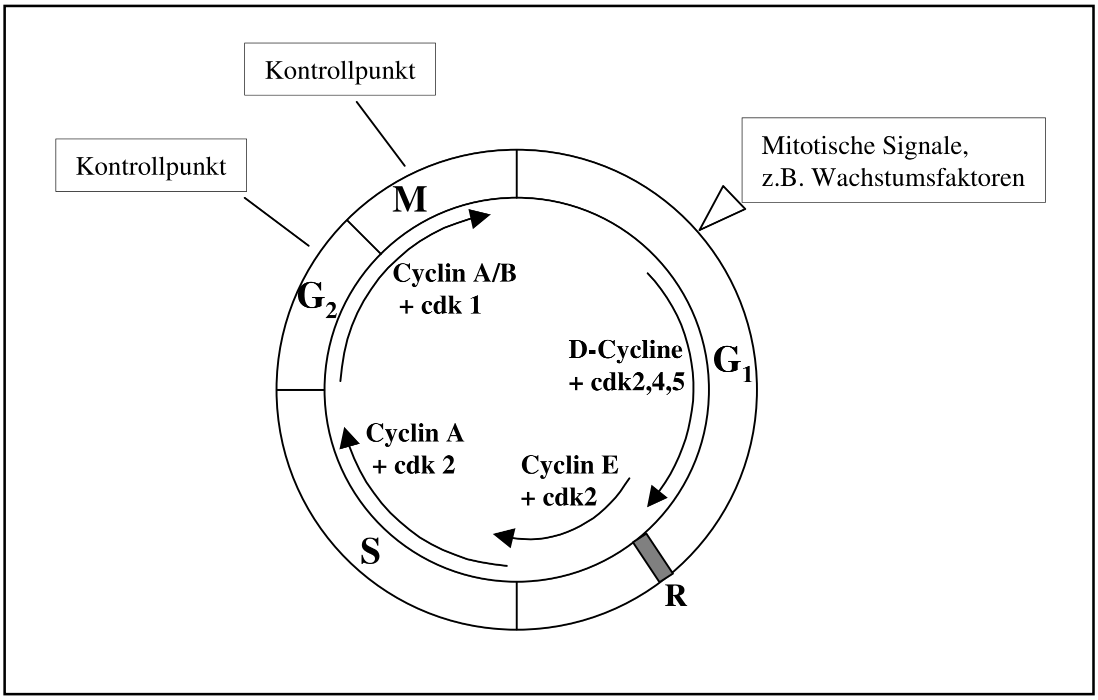


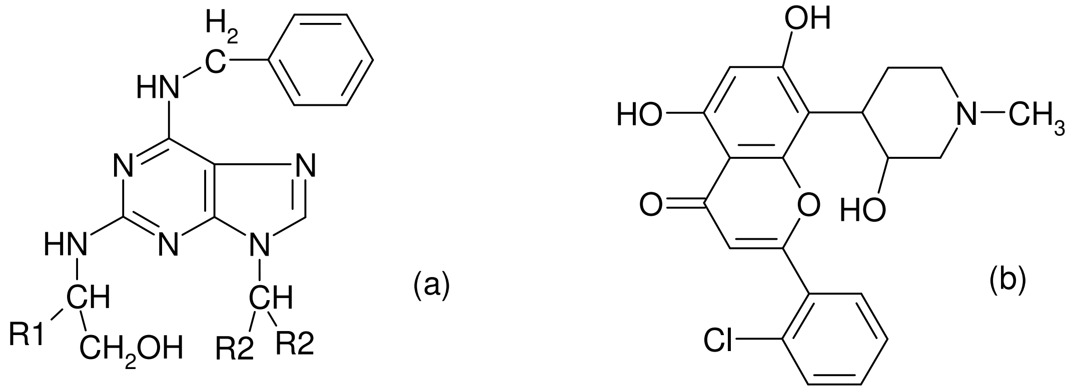
Abbildung 24: Zellzyklus mit zellzyklusspezifischen Proteinen [Marx, 1994, modifiziert]

Die aktivierten Cyclin D-cdk-Komplexe phosphorylieren unter anderem das pRb-Protein, ein Produkt des Retinoblastom(Rb)-Tumorsuppressorgens. In ruhenden Zellen sowie zu Beginn der G_1-Phase liegt das Rb-Protein im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F und anderen Proteinen vor. Die Phosphorylierung bewirkt eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors und eine damit verbundene Aktivierung von Genen, deren Produkte für den Übergang in die S-Phase verantwortlich sind [Nevins, 1992; Ewen, 1993]. Gleichzeitig wird die Konzentration an Cyclin E erhöht. Dieses Cyclin bindet an cdk 2 und wirkt ebenso wie die Cyclin D-cdk-Komplexe auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die den Übergang von G_1 zu S ermöglichen.

Spezifische Cyclin-cdk-Inhibitoren (CKIs) können den Cyclin-cdk-Komplex hemmen und dadurch den Zellzyklus anhalten [Kamb et al., 1994; Serrano et al., 1993]. Bei den CKIs handelt es sich um eine heterogene Familie von Proteinen, die reversibel mit einer cdk oder mit cdk-Cyclin-Komplexen assoziieren können, wodurch die cdk-Aktivität verringert wird. Wichtige Vertreter dieser Proteinfamilie in Säugern sind $p16^{INK4}$, $p15^{INK4}$, $p21^{Cip1}$ und $p27^{KIP}$ [Pines, 1995]. Die Inhibitoren $p16^{INK4}$ und $p15^{INK4}$ sind verwandte Proteine und zeigen eine Präferenz zu cdk 4- und cdk 6-Cyclin-Komplexen, wobei die Inhibierung durch Kompetition mit den Cyclinen erfolgt [Morgan, 1995]. $p21^{Cip1}$ und $p27^{KIP}$ sind ebenfalls nahe verwandt und binden an cdk 2 und cdk 4-Cyclin-Komplexe. Dabei wird eine Blockierung der ATP-Bindungsstelle der cdks postuliert [Russo et al., 1996]. Zusätzlich zu der Hemmung der Cyclin-cdk-Komplexe bindet $p21^{Cip1}$ an das „proliferating cell nuclear antigen" (PCNA), ein Polymerase assoziiertes Replikationsprotein und bewirkt dadurch die Inhibierung der DNA-Replikation [Waga, 1994]. Die Induktion des $p21^{Cip1}$-Proteins wird über das Tumorsuppres-

sorprotein p53 reguliert. Bei DNA-Schäden kommt es zu einer Erhöhung des intrazellulären p53-Gehaltes, der die Transkription von p21^{Cip1} stimuliert [El-Deiry et al.,1993; El-Deiry et al., 1994].
An mehreren Kontrollpunkten wird der korrekte Verlauf des Zellzyklus überprüft. Diese Kontrollstellen liegen am Übergang von der G_1- zur S-Phase (Restriktionspunkt), am Übergang von der G_2- zu der M-Phase und in der Anaphase der Mitose. Treten Fehler oder DNA-Schäden auf, kann der Zyklus angehalten und die Reparatur der Schäden durchgeführt werden. Ist der Schaden zu groß oder die Reparatur nicht mehr möglich, wird die Zelle durch Apoptose eliminiert.

Chemische Inhibitoren von cyclinabhängigen Kinasen blockieren, ebenso wie die natürlichen intrazellulären Proteine, die Zellzyklusprogression und sind deshalb wegen ihrer potentiellen Antitumoraktivität interessant. Zu nennen sind u.a. Staurosporin, Flavopiridol, Roscovitin und Olomoucin (Abbildung 25).



R1 = H, R2 = H Olomoucin
R1 = C_2H_5, R2 = CH_3 Roscovitin

Abbildung 25: Chemische Inhibitoren von cyclinabhängigen Kinasen Olomoucin, Roscovitin (a), Flavopiridol (b)

Ebenso wie einige der natürlichen Inhibitoren konkurrieren die chemischen um die ATP-Bindungsstelle der cdks was durch Kristallstrukturuntersuchungen gezeigt werden konnte [Meijer et al., 1996, Meijer, 1997].

2.2.5 Apoptose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein natürlicher Vorgang, der in Geweben der Erhaltung der zellulären Homöostase dient. Bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen stellt sie eine Möglichkeit dar, um nicht mehr benötigte Zellen gezielt zu eliminieren. Im Immunsystem erfüllt die Apoptose lebenswichtige Funktionen, indem z.B. autoimmunreaktive oder virusinfizierte Zellen beseitigt werden. Bei Schädigung der DNA kann der programmierte Zelltod die Akkumulation von Mutationen verhindern [Raff, 1992; Steller, 1995]. Der Beginn des apoptotischen Programms kann durch physiologische Aktivatoren, chemotherapeutische Substanzen sowie UV-Strahlung ausgelöst werden [Thompson, 1995]. In T-Lymphozyten beeinflußt der Fas-Ligand (Fas-L) die Initiation von Apoptose durch Bindung an einen Fas-Rezeptor (synonym mit CD 95 oder Apo 1). Der Rezeptor des Tumornekrosefaktors (TNF) ist homolog zu Fas und induziert ebenfalls Apoptose in Zielzellen [Suda et al, 1993; Taga und Kishimoto, 1993].

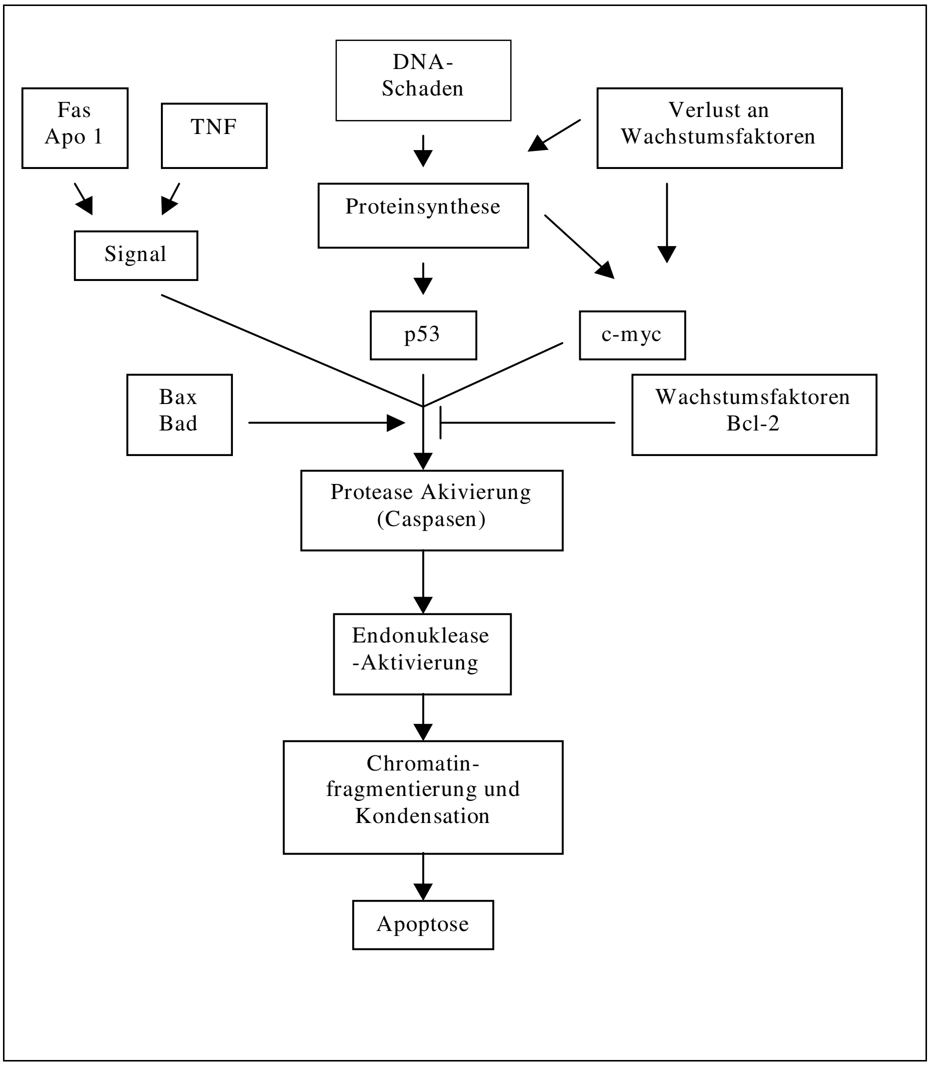


Abbildung 26: Induktion von Apoptose in Säugerzellen [Thompson, modifiziert, 1995]

Nach DNA-Schäden wird das Tumorsuppressorprotein p53 hochreguliert. p53 kontrolliert das Cyclin-cdk Inhibitorprotein p21 sowie die apoptosefördernden Proteine bax und bad und kann so einen Arrest des Zellzyklus und die Induktion von Apoptose bewirken [Lane, 1993; Kasten und Giordano, 1998]. Gene, die normalerweise an der Zellproliferation beteiligt sind, können ebenfalls Einfluß auf Apoptose nehmen. Das Oncogen c-myc löst in Fibroblasten nach Entzug von Wachstumsfaktoren den programmierten Zelltod aus [Evan et al., 1992].
Proteine der Bcl-2 Familie wirken als Schlüsselregulatoren der Apoptose und können sowohl hemmende als auch stimulierende Wirkung ausüben. Bcl-2 hemmt die Apoptose, während bax und bad aktivierend wirken. Eine Überexpression von bcl-2 wird in verschiedenen Tumorzellinien beobachtet [Strasser et al., 1997].
Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Apoptose ist der Verlust der mitochondrialen Funktionsfähigkeit, wobei Cytochrom C als Aktivator von Proteasen (Caspasen) freigesetzt wird [Green und Reed, 1998].
Ein frühes Ereignis in der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen. Dabei handelt es sich um apoptose-spezifische Proteasen, die spezifisch hinter Aspartatresten im Zielprotein spalten. Caspasen inaktivieren Proteine, die Apoptose hemmen, verändern die Struktur des Zytoskeletts und greifen in die Regulation essentieller zellulärer Enzyme ein [Thornberry und Lazebnik, 1998].
Dabei werden Endonukleasen aktiviert, die zu einer Degradierung der DNA und zur Kondensation des Kerns führen. Der Vorgang der Apoptose resultiert letztendlich in der Phagocytose der apoptotischen Zelle durch Nachbarzellen [Fadok et al., 1992].
Fehlregulationen der Apoptose werden mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht. Eine fehlgesteuerte Hemmung von Apoptose wird im Zusammenhang mit der Entstehung maligner Tumoren gebracht, während die fehlerhafte Regulation der Stimulation als Auslöser von AIDS und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson diskutiert wird [Thompson, 1995].

3 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Naturstoffe, die hauptsächlich aus Pflanzen gewonnen wurden und zum Teil bereits aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannt waren, sowie Naturstoffderivate auf ihre antineoplastische Aktivität, ihre molekularen Angriffspunkte und ihren Wirkmechanismus untersucht werden.
Als Substanzklassen standen Alkaloide aus *Amaryllidaceae*, Flavone und Flavonglykoside aus *Scutellaria baicalensis*, indigoide Bisindole nach dem Vorbild des natürlichen Indigos aus *Indigofera tinctoria*, Deoxytopsentin sowie verschiedene Staurosporinderivate zur Verfügung. Die synthetisch gewonnenen oder aus Pflanzenmaterialien isolierten Wirkstoffe sollten zunächst auf ihre wachstumshemmende Wirkung untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Daten der Wachstumstests sollte dann die zelluläre Zielstruktur bzw. der Wirkmechanismus der jeweiligen Substanz mit biochemischen Methoden untersucht werden. Hierzu sollte ein Methodenspektrum etabliert werden, daß bekannte Angriffspunkte antineoplastischer Wirkstoffe umfaßt. Dazu gehören Einflüsse auf zelluläre Signaltransduktionswege, Veränderungen des Zytoskeletts und Hemmung der Topoisomerasen I und II.
Die Proteinkinase C spielt eine wichtige Rolle bei zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung und Tumorpromotion. In der vorliegenden Arbeit sollten Veränderungen der Proteinkinase C-Aktivität als Folge von Substanzexposition im Vergleich zu der Referenzsubstanz GF109203X untersucht werden. Die Inkubationen sollten dabei sowohl am isolierten Enzym als auch in der Zellkultur erfolgen.
Veränderungen des Zytoskeletts können durch Untersuchung der Aktinstruktur, der Intermediärfilamente sowie der Untersuchung von Mikrotubuli und mikrotubuli-assoziierten Proteinen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beeinflussung von Mikrotubuliproteinen untersucht werden. Veränderungen der Mikrotubuli-Polymerisation können zu Wachstumshemmung und zum Zelltod führen. Die Mikrotubuli-Polymerisationsfähigkeit nach Substanz-Inkubation sollte an Mikrotubulipräparationen aus Rinderhirn *in vitro* untersucht werden. Im Falle einer Polymerisationshemmung waren zusätzliche morphologische Untersuchungen in Zellkulturen geplant.
DNA-Topoisomerasen zeigen in schnell proliferierenden Zellen erhöhte Sensitivität gegenüber Hemmstoffen und bieten deshalb dort einen guten Angriffspunkt für antiproliferative Substanzen. Als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Beeinflussung von humanen Topoisomerasen vorgesehen. Topoisomerase I und II sollten aus humanen Tumorzellen gewonnen und der Einfluß der verschiedenen Naturstoffe auf die Aktivität des Enzyms gemessen werden. Im Falle einer Aktivitätshemmung sollte für Topoisomerase I eine Klärung des Wirkmechanismus erfolgen.
Als Folge von Topoisomerase-Hemmung treten häufig DNA-Strangbrüche auf. Diese sollten mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) untersucht werden. Da viele Topoisomerase-Hemmstoffe die Fähigkeit zur Interkalation oder Bindung an die kleine Furche der DNA

besitzen, sollte die Interaktion der zu prüfenden Wirkstoffe mit der DNA überprüft werden. Die Kompetition mit bekannten Interkalatoren wie Ethidiumbromid bzw. Liganden der kleinen Furche wie dem Hoechst Farbstoff H33258 sollten Aufschluß über die Affinität der Substanzen zur Doppelstrang-DNA geben.

Die Hemmung bestimmter zellulärer Enzyme kann Veränderungen am Zellzyklus sowie Induktion des apoptotischen Zelltods verursachen. Der Zeitpunkt des Zellzyklusarrestes sowie die Apoptoseinduktion können zusätzliche Informationen über den Wirkmechanismus der jeweiligen Substanz vermitteln. Aus diesem Grund sollten morphologische sowie durchflußzytometrische Untersuchungen zur Induktion von Apoptose sowie zu Veränderungen des Zellzyklus nach Substanzinkubation durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

Die Substanzen wurden in jedem der in diesem Teil der Arbeit erwähnten Assays untersucht und ausgewertet. Testergebnisse, die nicht auf eine inhibitorische Wirkung hindeuteten, wurden nur beschrieben, wenn die Diskussion des Mechanismus dies erforderte. Ausführliche Ergebnislisten befinden sich im Anhang.

4.1 Alkaloide

4.1.1 Lycorin

4.1.1.1 Wachstumshemmende Wirkung

Im Sulforhodamin B (SRB)-Assay wurde die wachstumshemmende Wirkung von Lycorin an vier Leukämie-Zellinien (HL60, Molt4, K562, U937) und einer Lungenkarzinomzellinie (LXFL529L) untersucht. Humane Tumorzellen wurden mit und ohne Hemmstoff für 72 h inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und mit Sulforhodamin B gefärbt. Die Messung erfolgte photometrisch.

Tabelle 2: Wachstumshemmende Wirkung von Lycorin (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-, BrdU-Assay), Mittelwert und Standardabweichung wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM]

Zellinie	SRB	BrdU
LXFL529L	0,09 ± 0,001	1*
HL60	3 ± 0,5	3*
Molt4	0,9 ± 0,2	2*
K562	2 ± 0,8	2*
U937	1,5 ± 0,5	n.b.

* Test wurde nur einmal zur Kontrolle des SRB-Tests durchgeführt

Lycorin zeigte an allen Zellinien IC_{50}-Werte[2] im niedrig mikromolaren Bereich. Die stärkste Wachstumshemmung konnte bei der Zellinie LXFL529L mit einem IC_{50}-Wert von 0,09 µM beobachtet werden. Für die Zellinien LXFL529L, HL60 und K562 wurden die Ergebnisse im BrdU-Assay bestätigt (Tabelle 2). Bromdesoxyuridin (BrdU) wird von proliferierenden Zellen als Thymidinanalog während der DNA-Synthese in die DNA eingebaut. Mit Hilfe von spezi-

[2] IC_{50} = Inhibitory Concentration: Substanzkonzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle noch 50% der Zellen vital sind

fischen Antikörpern kann die Menge des eingebauten BrdUs als Maß für die DNA-Syntheserate der Zellen bestimmt werden.

4.1.1.2 Veränderungen des Zellzyklus und Induktion von Apoptose

Die Induktion von Apoptose wurde bei allen folgenden Substanzen mittels morphologischer und durchflußzytometrischer Testmethoden untersucht.Veränderungen des Zellzyklus wurden durchflußzytometrisch erfaßt.
Zelltod kann grundsätzlich in Nekrose und Apoptose unterschieden werden. Nekrose äußert sich morphologisch in einem Anschwellen der Zellen, bedingt durch die erhöhte Ionenpermeabilität der Plasmamembran. Dieses Anschwellen resultiert letztlich in einer Zellyse.
Apoptose ist charakterisiert durch Schrumpfung der Zelle, Kondensation des Kernmaterial, blasenartige Ausstülpung der Membran und Fragmentierung des Kerns. Dabei bleibt die Kernmembran intakt [Hockenbery, 1995; Majno und Joris, 1995].

4.1.1.2.1 Morphologie

Nach einer Inkubation von LXFL529L-Zellen mit Lycorin über 24 h wurden die Zellen fixiert und mit DAPI/Sulforhodamin (SR) 101 gefärbt, wobei DAPI den Kern blau und SR 101 das Zytoplasma rot anfärbt. Morphologische Veränderungen an der Zelle waren erkennbar, wiesen aber nicht eindeutig auf Apoptose hin, sondern zeigten eher Merkmale einer späten Nekrose.

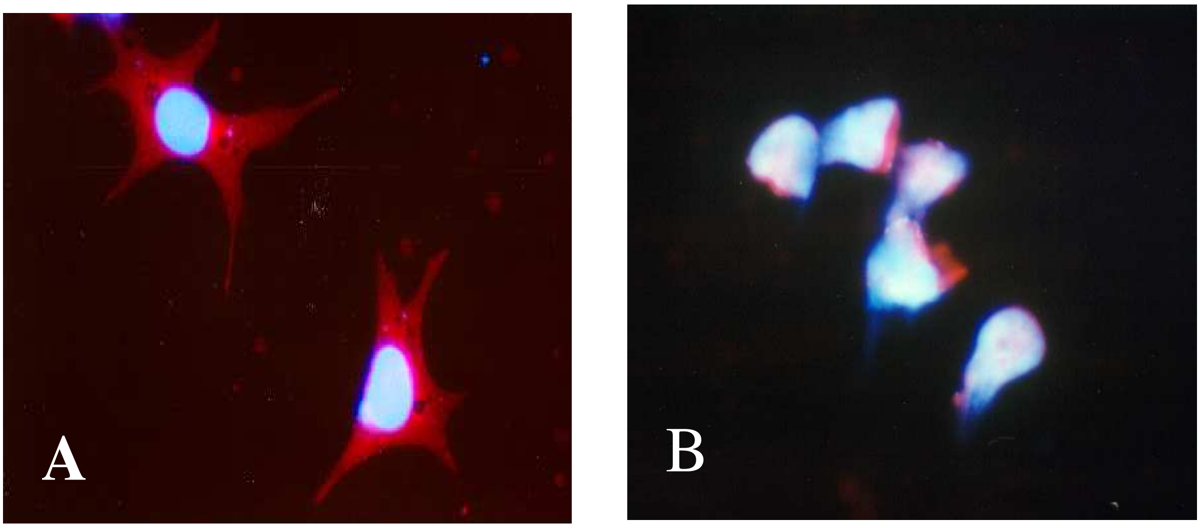


Abbildung 27: Morphologie von LXFL529L-Zellen, Zellen wurden für 24 h mit und ohne Lycorin inkubiert, 15 min in Methanol (4°C) fixiert und dann mit DAPI/SR 101 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert, A Kontrolle, B Lycorin [10 µM]

Die Kontrollzellen zeigten ein gut ausgebildetes Zytoplasma mit für adherente Zellen typischen Ausläufern. Der intakte Kern war rund und nicht fragmentiert. Nach Inkubation mit

Lycorin war das Zytoplasma deutlich reduziert, die Kernmembran war offensichtlich zerstört und das Nukleoplasma schien aus dem Kern auszutreten (Abbildung 27).

4.1.1.2.2 Durchflußzytometrie

Die Induktion von Apoptose läßt sich in durchflußzytometrischen Histogrammen dadurch erkennen, daß apoptotische Zellen einen reduzierten DNA-Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Zellpopulationen aufweisen. Diese Reduktion, der wahrscheinlich die DNA-Fragmentierung zugrunde liegt, führt zu einem verringerten Fluoreszenzsignal, so daß apoptotische Zellen in der zweidimensionalen Darstellung als Sub-G_1- bzw. Sub-G_2-Peak erscheinen.

LXFL529L-Zellen wurden 72 h mit Lycorin inkubiert, fixiert und mit einem Gemisch aus DAPI und Sulforhodamin 101 angefärbt und im Durchflußzytometer vermessen. Auch die durchflußzytometrischen Messungen lieferten keinen Hinweis auf Induktion von Apoptose nach Inkubation mit Lycorin. Der Anteil des „Debris" (apoptotische und stark fragmentierte Zellen) nahm nicht signifikant zu und auch charakteristische Sub-G_1- bzw. Sub-G_2-peaks waren nicht zu beobachten.

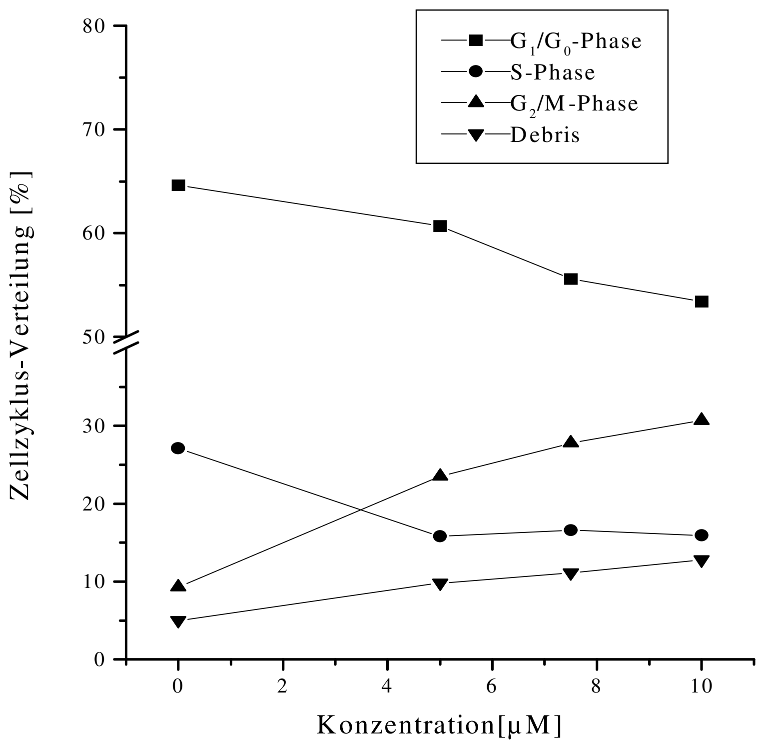


Abbildung 28: Zellzyklusverteilung von LXFL529L-Zellen; nach 72h Behandlung mit Lycorin stieg der Anteil der Zellen in der G_2/M-Phase mit gleichzeitigem Rückgang der G_0/G_1- und der S-Phase. Die Messung erfolgte nach Färbung mit DAPI/SR101 durchflußzytometrisch. Das Diagramm wurde repräsentativ aus mindestens drei unabhängigen Einzeluntersuchungen erstellt.

Messungen zur Zellzyklusverteilung zeigten nach 72stündiger Inkubation von humanen LXFL529L-Zellen mit Lycorin einen signifikanter Anstieg der G_2/M-Phase des Zellzyklus. Gleichzeitig nahm der Anteil der Zellen in der G_0/G_1-Phase und in der S-Phase leicht ab. Der Debris-Anteil stieg ab einer Konzentration von 5 µM kontinuierlich an, woraus sich allerdings nicht eindeutig eine Induktion von Apoptose ableiten läßt (Abbildung 28).

4.1.1.3 Weitere Untersuchungen

Trotz der vielversprechenden Wachstumsinhibierung konnte in keinem der von uns etablierten Assays ein zelluläres Zielprotein bzw. ein Wirkmechanismus ermittelt werden, dem diese Wachstumshemmung zugrunde liegt. Die Substanz interagierte weder mit DNA, noch hemmte sie eines der von uns untersuchten Zielenzyme. Auch die Mikrotubulipolymerisation bzw. Depolymerisation wurde durch Lycorin nicht beeinflußt (siehe Anhang).

4.1.2 Lycobetain

4.1.2.1 Wachstumshemmende Wirkung

Lycobetain zeigte im Sulforhodamin-B Assay an den untersuchten Zellinien signifikante Hemmung der Zellproliferation mit IC_{50}-Werten im niedrig mikromolaren Bereich, vergleichbar mit den IC_{50}-Werten von Lycorin. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls an 3 Zellinien durch BrdU-Assay überprüft (Tabelle 3).

Tabelle 3: Wachstumshemmende Wirkung von Lycobetain, (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-, BrdU-Assay, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM]

Zellinie	SRB	BrdU
LXFL529L	1,2 ± 0,1	1,5*
HL60	1,3 ± 0,5	2 ± 0,8
K562	0,8 ± 0,03	n.b.
Molt4	0,7 ± 0,4	2*
U937	2,5 ± 0,3	n.b.

* Test wurde nur einmal zur Kontrolle des SRB-Assays durchgeführt

4.1.2.2 Zelluläre Lokalisation von Lycobetain

Lycobetain zeigte bei einer Anregungwellenlänge von 350-525 nm und einer Emissionswellenlänge von 420-660 nm Eigenfluoreszenz. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die subzelluläre Verteilung der Substanz untersucht. LXFL529L-Zellen wurden für 3 Stunden mit

Lycobetain in einer Konzentration von 5µM auf Objektträgern behandelt und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 380 nm, Emission: 488 nm) ausgewertet. Auf eine Fixierung wurde in diesem Fall verzichtet, um die Zellen im nativen Zustand zu erhalten. Es zeigte sich, daß Lycobetain nach 3 h Inkubation ausschließlich im Zellkern lokalisiert war (Abbildung 29). Zum Vergleich wurde eine Färbung mit dem Hoechst-Farbstoff H33258 durchgeführt. Da der Farbstoff sich ausschließlich im Kern anlagert, zeigte sich an diesen Zellen im Fluoreszenzmikroskop das gleiche Bild wie bei der Inkubation mit Lycobetain.

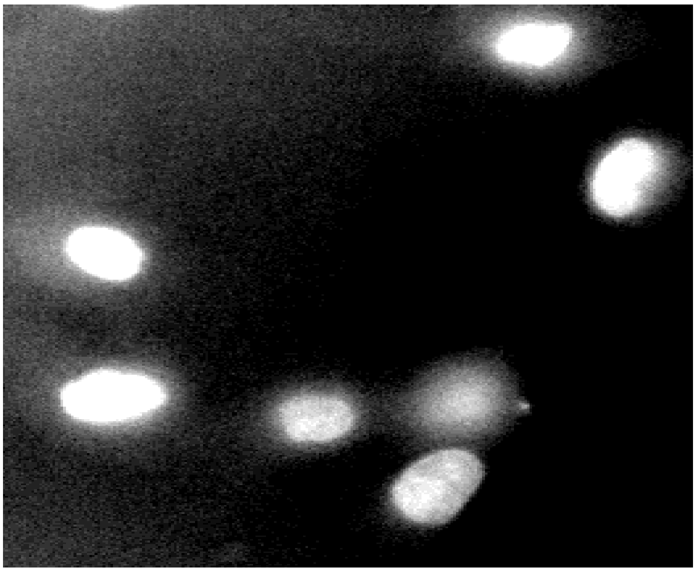


Abbildung 29: Zelluläre Lokalisation von Lycobetain; LXFL529L-Zellen wurden 3h mit 5µM Lycobetain inkubiert, die Detektion erfolgte ohne Fixierung am Fluoreszenzmikroskop

4.1.2.3 Interaktion mit Doppelstrang-DNA

Die Untersuchung auf Interaktion mit Doppelstrang DNA wurde mittels Ethidiumbromid- bzw. Hoechst H33258-Kompetitionsassay durchgeführt. Ethidiumbromid und Hoechst H33258 sind Fluoreszenzfarbstoffe. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA, während Hoechst H33258 einen Liganden der kleinen Furche der DNA mit erhöhter Affinität zu A-T-reichen Regionen darstellt. Im Assay wird die Abnahme der Fluoreszenz eines Ethidiumbromid- bzw. Hoechst H33258-DNA-Gemisches als Folge der Zugabe von Substanzen, die um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, gemessen. Die Verringerung der Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Verdrängung von Ethidiumbromid bzw. Hoechst H33258. Dabei muß eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanz bei den Meßwellenlängen beachtet werden. Die Untersuchungen zur Interkalationsfähigkeit der Substanz (Ethidiumbromidassay) und zur Affinität zur kleinen Furche der DNA (Hoechst H33258-Assay) zeigten, daß Lycobetain sowohl mit Ethidiumbromid konkurrieren kann, was auf Interkalationsfähigkeit hinweist, als auch Hoechst H33258 verdrängen kann und somit möglicherweise Affinität zur kleinen Furche der DNA besitzt. Als Referenzsubstanz für die DNA-Interkalation diente Actinomycin D. Für die Bindung an die kleine Furche der DNA wurden Netropsin und Distamycin A verwendet.

Abbildung 30A zeigt die Ergebnisse des Ethidiumbromidverdrängungsassays. Lycobetain wurde im Vergleich zu dem bekannten Interkalator Actinomycin D aufgetragen.

Der C_{50}-Wert, d.h. die Konzentration der Substanz, bei der 50% des vorgegebenen Ethidiumbromids oder des Hoechst-Farbstoffes verdrängt war, lag im Ethidiumbromidassay für Lycobetain bei 10,5 µM. Für Actinomycin D wurde ein C_{50}-Wert von 1,4 µM gemessen

In Abbildung 30B ist das Ergebnis des Hoechst H33258 Kompetitionsassays dargestellt. Bei der Verdrängung von Hoechst H33258 lag der C_{50}-Wert für Lycobetain bei 1,3 µM. Die Referenzsubstanzen Distamycin und Netropsin ergaben Werte von 0,7 µM und 0,4 µM.

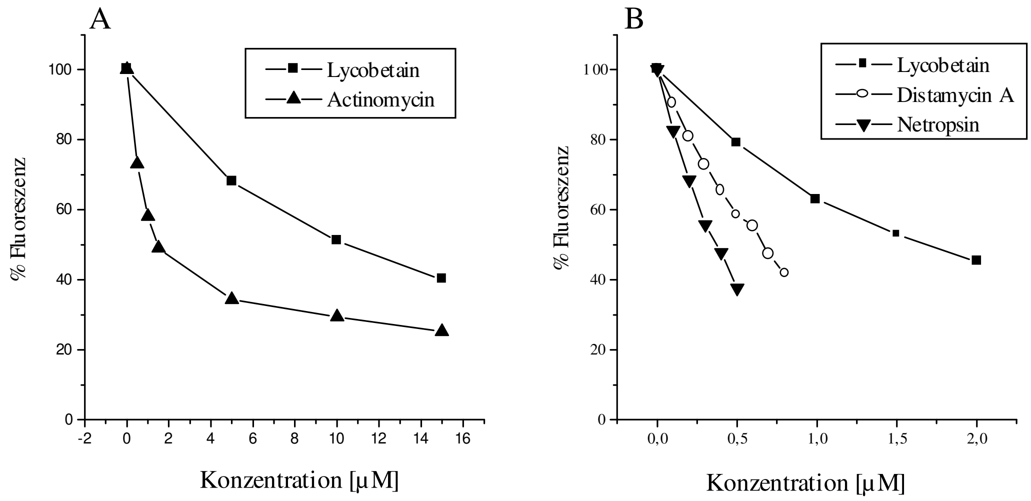


Abbildung 30: Vergleich der Ethidiumbromid- (A) und Hoechst H33258- (B) Kompetition von Lycobetain. Kalbsthymus-DNA wurde mit Ethidiumbromid bzw. Hoechst H33258 inkubiert. Nach Zugabe von interkalierenden Substanzen bzw. Liganden der kleinen Furche der DNA, nahm die Fluoreszenzintensität proportional zur Verdrängung des Fluoreszenzfarbstoffes ab.

4.1.2.4 Hemmung von humanen Topoisomerasen

4.1.2.4.1 Hemmung der Topoisomerase I

Relaxations-Assay

Die Topoisomerase I-Aktivität wurde durch Messung der Entspannung von superspiralisierter pBR322-Plasmid-DNA untersucht. Dafür wurden 250 ng Plasmid-DNA mit 5 U Topoisomerase I mit und ohne Hemmstoff für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Superspiralisierte und relaxierte DNA kann mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden, wobei die superspiralisierte Form aufgrund topologischer Eigenschaften im Gel schneller migriert als die relaxierte Form. Nach Färbung mit Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht detektiert werden. Inkubation mit Topoisomerase I bewirkte eine Relaxierung der DNA, was sich in einer retardierten Bande im Agarosegel zeigte. Nach Inkubation mit Lycobetain stieg der Anteil der superspiralisierten DNA wieder an, was auf eine Hemmung der Topoisomerase I schließen läßt. Bei einer Konzentration von 10 µM Lycobetain war die Topoisomerase I-Aktivität vollständig inhibiert. pBR322 DNA diente als unbehandelte Kontrolle für superspiralisierte DNA.

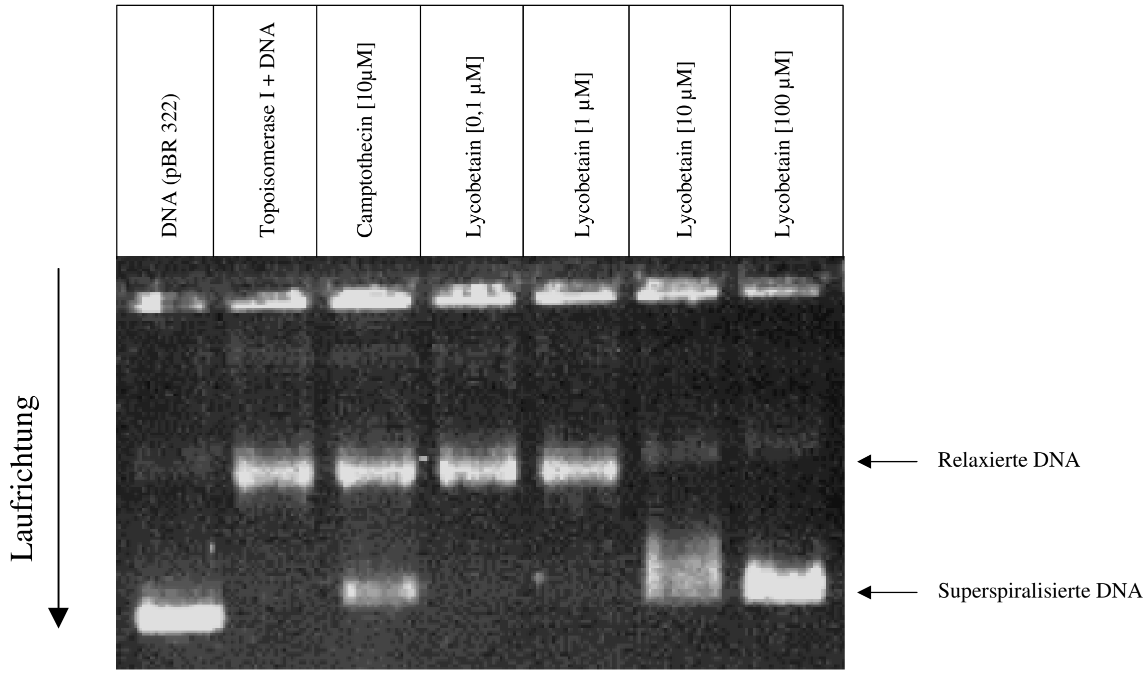


Abbildung 31: Inhibierung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I-Rohextrakt aus humanen HL60 Zellen im Relaxations-Assay. Superspiralisierte pBR322 Plasmid-DNA wurde 30 min bei 37°C mit Topoisomerase I mit und ohne Lycobetain inkubiert und die Entspannung der DNA überprüft; Camptothecin wurde als Vergleich mitgeführt.

Mechanistische Untersuchungen

Mechanistische Untersuchungen sollten zeigen, welcher Wirkmechanismus dieser Topoisomerase I-Hemmung zugrunde liegt. Da diese Testmethoden hohe Topoisomerase-

Konzentrationen mit einem hohen Reinheitsgrad erfordern wurde hier mit rekombinanter, hochaufgereinigter Topoisomerase I gearbeitet.

DNA-Mobility-Shift Assay

Mit Hilfe des DNA-Mobility-Shift-Assays kann untersucht werden, ob eine Substanz die Topoisomerase-Aktivität durch Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Intermediates hemmt. Bei einer Agarosegelelektrophorese unter Zusatz von Ethidiumbromid im Gel nimmt die Mobilität der durch Topoisomerase relaxierten DNA aufgrund der geringen Interaktion mit Ethidiumbromid gegenüber superspiralisierter DNA zu. Durch Zugabe von Camptothecin, welches für die Stabilisierung des sogenannten Cleavable-Complex bekannt ist, induziert Topoisomerase I Einzelstrangbrüche in der DNA, die nicht wieder verschlossen werden können. Nach einer Behandlung des Ansatzes mit Proteinase K wird das Enzym verdaut. Daraus resultiert offene zirkuläre DNA, deren Laufgeschwindigkeit im Gel durch verstärkte Interaktion mit Ethidiumbromid deutlich verlangsamt ist.

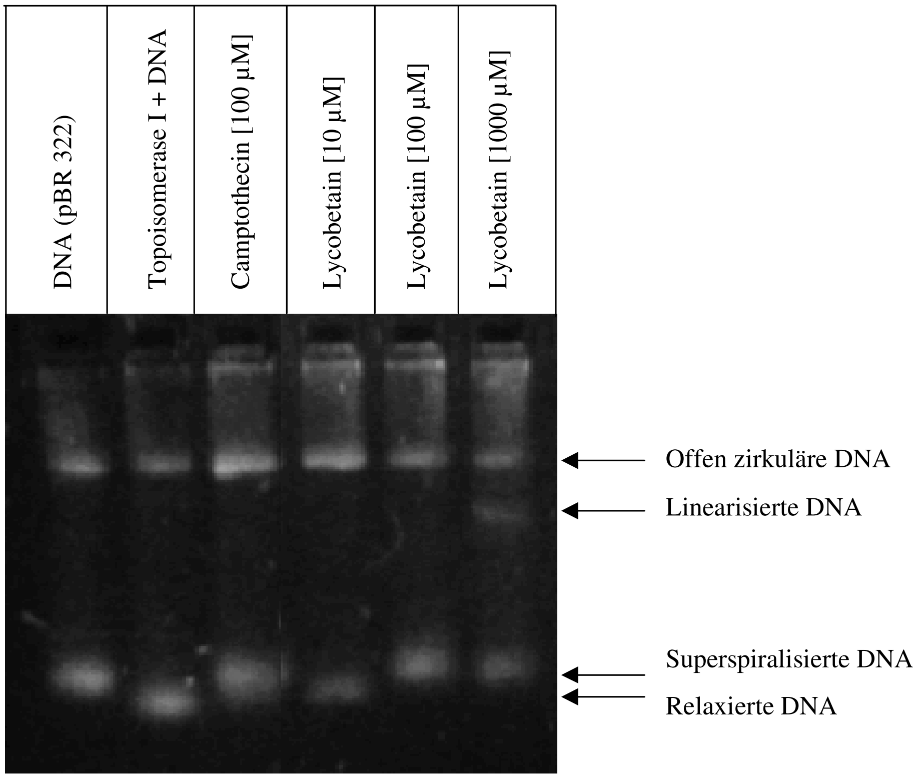


Abbildung 32: Mobility Shift-Assay für Topoisomerase I, 250 ng pBR322 Plasmid-DNA wurde mit 200 U humaner Topoisomerase I in Anwesenheit von Camptothecin oder Lycobetain in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1% SDS gestoppt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C mit 1 mg/ml Proteinase K verdaut. Die Detektion erfolgte mit einem 1%igen Agarosegel, welches 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt.

Durch topologische Gegebenheiten der DNA kann die offene zirkuläre Form wesentlich besser mit Ethidiumbromid wechselwirken als die geschlossene. Linearisierte DNA, die durch Einwirkung der Substanz Doppelstrangbrüche erfahren hat, zeigt weniger Interaktion mit

Ethidiumbromid als offen zirkuläre DNA mit einem Einzelstrangbruch und migriert deshalb im Gel schneller. In Abbildung 32 ist erkennbar, daß Lycobetain bereits bei 10 µM eine verstärkte Bande für die offene zirkuläre Form der Plasmid-DNA verursachte, was auf Stabilisierung des Cleavable-Complex hindeutet. Die relaxierte DNA nahm im Vergleich zur Topoisomerase Kontrolle ab, eine Bande für superspiralisierte DNA war nicht erkennbar. Die Topoisomerase I war bei dieser Substanzkonzentration unter den gegebenen Testbedingungen vermutlich noch partiell aktiv. Bei 100 µM Lycobetain war sowohl offene zirkuläre als auch superspiralisierte DNA detektierbar, wobei die Bande für offene zirkuläre DNA im Vergleich zu 10 µM Lycobetain abnahm. Dies ist vermutlich auf die Interkalationsfähigkeit von Lycobetain zurückzuführen, welches in der Lage ist Ethidiumbromid aus der Doppelstrang-DNA zu verdrängen und somit die Fluoreszenz des Ethidiumbromids zu vermindern. Bei 1000 µM Lycobetain zeigte sich eine zusätzlich Bande für linearisierte DNA.

Immunoband-Depletionsassay

Zur Überprüfung der Ergebnisse des Mobility-Shift-Assays wurde ein Western-Blot-Assay durchgeführt. 200 U humane rekombinante Topoisomerase I wurden mit 4 µg Kalbsthymus DNA mit und ohne Hemmstoff für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1% SDS gestoppt und die Proben einer 10%igen SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend wurden die Proteine mit der Semi-dry-Blotting-Methode auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit Anti-Topoisomerase I-Antikörper detektiert (Abbildung 33).

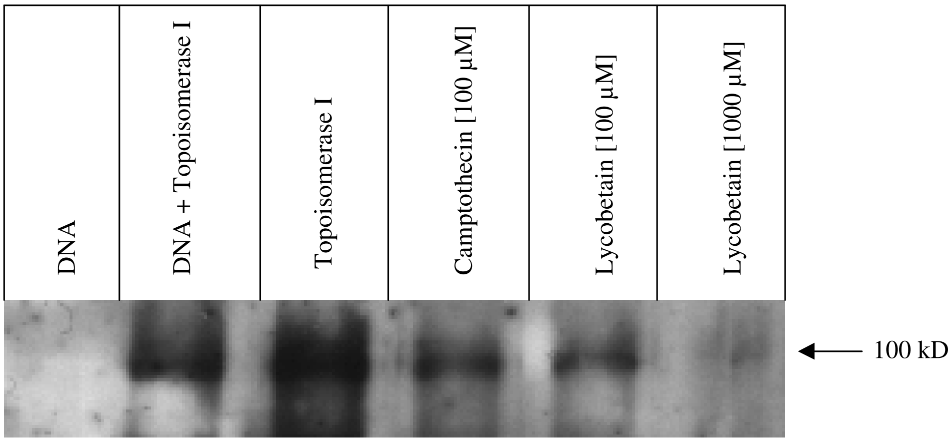


Abbildung 33: Immunoband-Depletionsassay für Topoisomerase I, 200 U humane rekombinante Topoisomerase I wurde mit 4 µg Kalbsthymus DNA mit und ohne Hemmstoff für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1% SDS gestoppt. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel geladen und anschließend einer Western-Blot-Analyse mit Anti-Topoisomerase I–Antikörper unterzogen.

Rekombinante humane Topoisomerase I migriert als Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kD in SDS-Polyacrylamidgelen. Nach Vorinkubation des Enzyms mit 4 µg Kalbsthymus-DNA wird ein kleiner Anteil der Topoisomerase in einer kovalenten Form an die DNA gebunden. Der Komplex kann die aufgrund seiner Größe nicht in das Gel eintreten. Daraus resultiert eine etwas schwächere Protein-Bande im Gel im Vergleich zu Topoisomerase ohne DNA. Inkubation von Topoisomerase I, DNA und 100 µM Camptothecin resultiert in einer starken Verringerung des Western-Blot-Signals, da ein großer Anteil des Enzym durch die Substanz in der DNA-gebundenen Form stabilisiert wird und so nicht in das Gel wandern kann. Nach Inkubation mit Lycobetain zeigte sich ebenfalls eine starke Abnahme der Bande im SDS-Gel, die bei einer Konzentration von 1000 µM fast nicht mehr detektierbar war. Dies läßt darauf schließen, daß Lycobetain ebenso wie Camptothecin das kovalente Intermediat zwischen DNA und Topoisomerase I stabilisiert.

4.1.2.4.2 Hemmung der Topoisomerase II

Mehrere Methoden ermöglichen es, die Hemmung der Topoisomerase II zu messen. Im Dekatenierungs-Assay wird die Entknotung von zirkulärer Kinetoplasten-DNA (kDNA) gemessen. Kinetoplasten-DNA stellt ein Geflecht aus Minizirkeln dar, die ohne Einführen von Doppelstrangbrüchen nicht voneinander getrennt werden können und in unbeschädigter Form nicht in ein 1%iges Agarosegel wandern können. Durch Topoisomerase II-Aktivität können Doppelstrangbrüche eingeführt werden und es entstehen freie DNA in zirkulärer Form bzw. kleinere Geflechte, die in ein Gel eindringen können.
Im Relaxations-Assay wird die Entspannung von zirkulärer superspiralisierter Plasmid-DNA gemessen, wobei es wichtig ist, daß die Topoisomerase I-Aktivität des verwendeten Kern-Rohextraktes durch Zugabe von Camptothecin gehemmt wird und daß ATP sowie Mg^{2+} vorhanden sind, da letztere für die Topoisomerase II-Aktivität essentiell sind.
Für die Messungen der Topo II-Aktivität wurde Probenpuffer mit höherem pH-Wert verwendet. Auf diese Weise kann aufgrund unterschiedlicher pH-Aktivitätsmaxima Topoisomerase II α bei pH 7,9 und Topo II β bei pH 8,9 detektiert werden [Gieseler et al, 1996].

Dekatenierungs-Assay

Im Dekatenierungs-Assay wird kDNA für 60 min bei 37°C mit rekombinanter Topoisomerase II inkubiert und die Reaktion durch 15minütiges Erhitzen der Proben auf 65°C gestoppt. In diesem Assay wird mit aufgereinigter humaner rekombinanter Topoisomerase II gearbeitet, um mögliche Nebeneffekte durch Verunreinigungen im Zellrohextrakt zu vermeiden. Nach Inkubation mit Lycobetain konnte eine signifikante Hemmung der Enzym-Aktivität nachgewiesen werden.
Abbildung 34 zeigt ein 1%-Agarosegel mit Proben aus dem Dekatenierungs-Assay.
Unbehandelte kDNA migriert nicht in das Agarosegel, während mit Topoisomerase II inkubierte DNA, je nach Grad der Entknotung, mehrere Banden zeigt. Diese Banden nahmen nach Inkubation mit 1 µM Lycobetain ab und verschwanden bei einer Konzentration von 10µM, als Folge einer vollständigen Topoisomerase II-Hemmung.

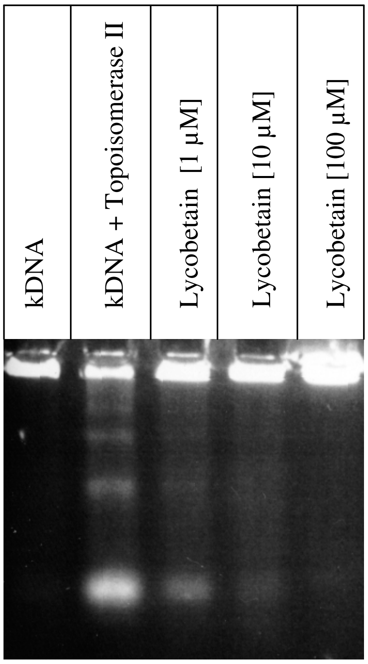


Abbildung 34: Dekatenierungs-Assay, Rekombinante Topoisomerase II wurden mit Kinetoplasten-DNA mit und ohne Lycobetain für 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion 5 minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt . Die Auftrennung erfolgte in einem 1% Agarosegel, gefärbt wurde mit Ethidiumbromid.

Relaxations-Assay

Lycobetain hemmte im Relaxationsassay die Aktivität von Topoisomerase II α und β gleichermaßen mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC = minimal inhibitory concentration) von 10 µM.

4.1.2.5 Induktion von DNA-Strangbrüchen

Mittels Einzelzellgelelektrophorese konnten durch Lycobetain induzierte DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. Humane Leukämiezellen (HL60) wurden für drei Stunden mit 5 und 10 µM Lycobetain inkubiert. Morphologische Untersuchungen hatten gezeigt, daß nach dieser Inkubationszeit noch keine Induktion von Apoptose zu erwarten war. Die Zellen wurden auf Objektträgern in Agarose eingebettet, lysiert und einer Gelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen unterzogen. Der hohe pH führt dabei zu verbesserter Denaturierung der DNA und erhöht die Sensitivität des Assays gegenüber Einzelstrangbrüchen [Singh et al., 1988]. Nach Färbung der DNA mit Ethidiumbromid werden die einzelnen Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Negativ geladene DNA-Fragmente wandern während der Elektrophorese in Richtung Anode und bilden dabei einen Schweif, der das Bild eines Kometen vermittelt. Als Maß für die Schädigung der DNA können die Größe des Kometen und die Fluoreszenzintensität von Kopf und Schweif herangezogen werden [Olive et al., 1990].

Tabelle 4: DNA-Schädigung [%] von HL60 Zellen nach 3h Inkubation mit Lycobetain

Schädigung	Kontrolle	Lycobetain [5µM]	Lycobetain [10µM]
ungeschädigt	97	58	12
mittel	3	32	82
schwer	0	10	6

Zur Auswertung der Schädigung kann ein sogenanntes „tail-moment“ berechnet werden, das ein Produkt aus der Fluoreszenzintensität und der Länge des Kometenschweifes ist [Singh et al., 1988].

In dieser Arbeit wurde eine sogenannte „tail-intensity“, die die Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes erfaßt, mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes („Comet Assay II, Perceptive Instruments) ermittelt. Diese Fluoreszenzintensität kann als Maß für die DNA-Menge im Schweif dienen und gibt somit Hinweise auf das Ausmaß der DNA-Schädigung. Der Grad der Schädigung wird in die Kategorien ungeschädigt, leicht bis mittel stark geschädigt und stark geschädigt unterteilt.

Nach Inkubation mit 5 µM Lycobetain konnte eine Induktion von DNA-Strangbrüchen detektiert werden. Dabei lagen 58% der Zellen ungeschädigt, 32% der Zellen leicht bis mittel stark geschädigt und 10% der Zellen stark bis sehr stark geschädigt vor. Bei einer Konzentration von 10 µM Lycobetain waren nach 3 Stunden Inkubation nur noch 12% der Zellen ungeschädigt, 82% mittel stark geschädigt und 6% stark bis sehr stark geschädigt (Abbildung 35**,** Tabelle 4).

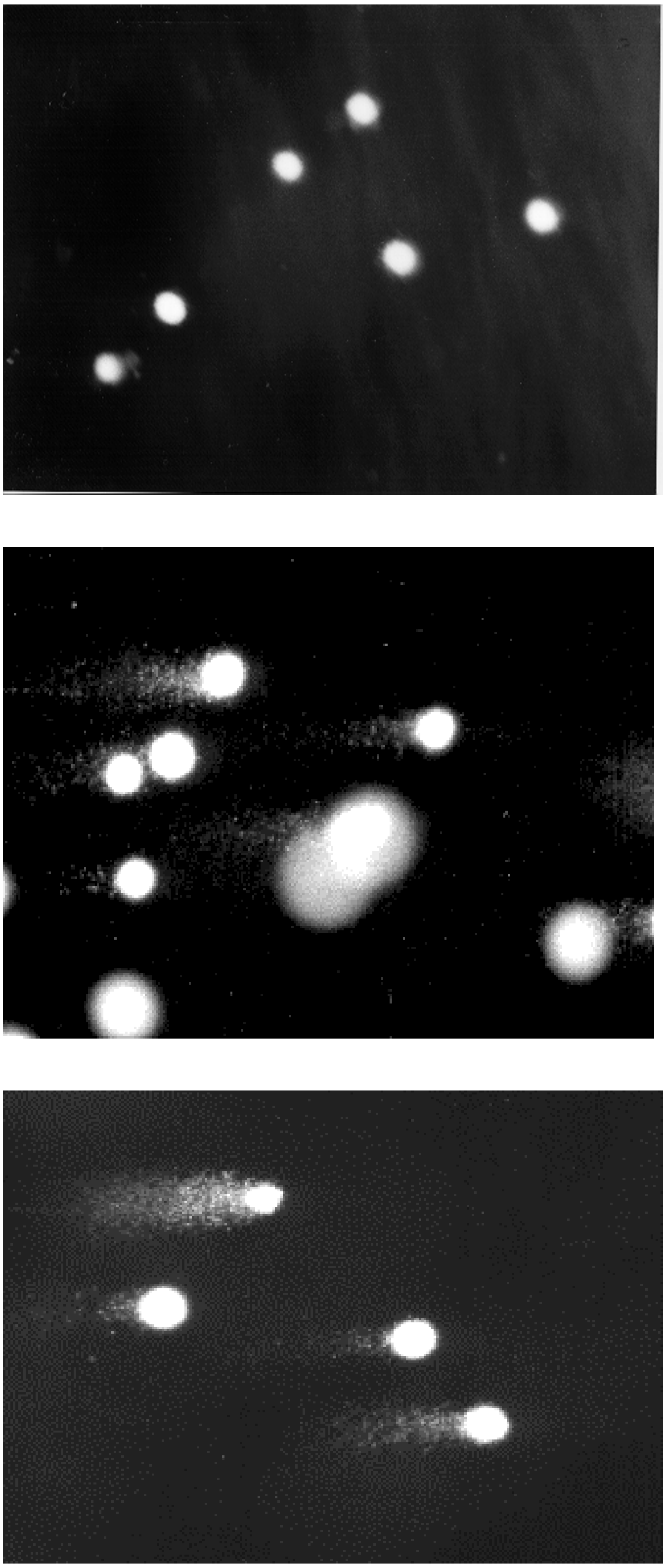


Abbildung 35: Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay), LXFL529L-Zellen wurden 3h mit und ohne Lycobetain inkubiert und dann einer Einzelzellgel-elektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung der Proben mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Detektion, A Kontrolle, B Lycobetain [5 µM], C Lycobetain [10 µM].

4.1.2.6 Veränderungen des Zellzyklus und Induktion von Apoptose

4.1.2.6.1 Morphologie

Zur Untersuchung auf Apoptose-Induktion wurden zunächst morphologische Untersuchungen durchgeführt. LXFL529L-Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und dann für 24 h mit Lycobetain inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen in eiskaltem Methanol fixiert und mit einem Gemisch aus DAPI/Sulforhodamin 101 gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet und fotografisch dokumentiert (Abbildung 36). Kontrollzellen zeigen einen rundlichen, blau gefärbten Kern. Das Zytoplasma ist rot gefärbt und bildet die, für adherente Zellen typischen, Ausläufer. Nach Inkubation mit 5 µM Lycobetain für 24 h beginnt das Zytoplasma die Ausläufer zu reduzieren und die Zelle erscheint geschrumpft und abgerundet. Der Kern nimmt eine für Apoptose typische sichelförmige Gestalt an und zeigt beginnende Fragmentierung. Bei einer Konzentration von 10 µM Lycobetain ist das Zytoplasma nahezu vollständig degeneriert, der Kern ist in mehrere Fragmente aufgespalten.

Probemessungen zu anderen Zeitpunkten zeigten, daß nach drei Stunden Inkubationszeit noch keine Effekte erkennbar waren, während nach 72 Stunden die Schäden bereits ein Ausmaß erreicht hatten, das eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung unmöglich machte.

4.1.2.6.2 Durchflußzytometrie

Mittels Durchflußzytometrie ist eine Auswertung der Zellzyklusverteilung und die Bestimmung der Apoptoseinduktion möglich. Nach Inkubation von LXFL529L-Zellen für 72 h mit Lycobetain zeigte sich dosisabhängig ein Anstieg der Zellen in der G_2/M-Phase, während die Zellen in der S-Phase stark und in der G_0/G_1-Phase leicht abnahmen (Abbildung 38). Bei 10 µM Lycobetain war ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen zu beobachten, die sowohl aus der G_0/G_1-Phase als auch aus der G_2/M-Phase zu entstehen scheinen. Der für Apoptose typische „Sub-G_1-Peak“ war jedoch nicht detektierbar.

A

B

C

Abbildung 36: Morphologie von LXFL529L-Zellen, Zellen wurden für 24 h mit und ohne Lycobetain inkubiert, 15 min in Methanol (4°C) fixiert und dann mit DAPI/SR 101 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert, A Kontrolle, B Lycobetain[5 µM], C Lycobetain [10 µM]

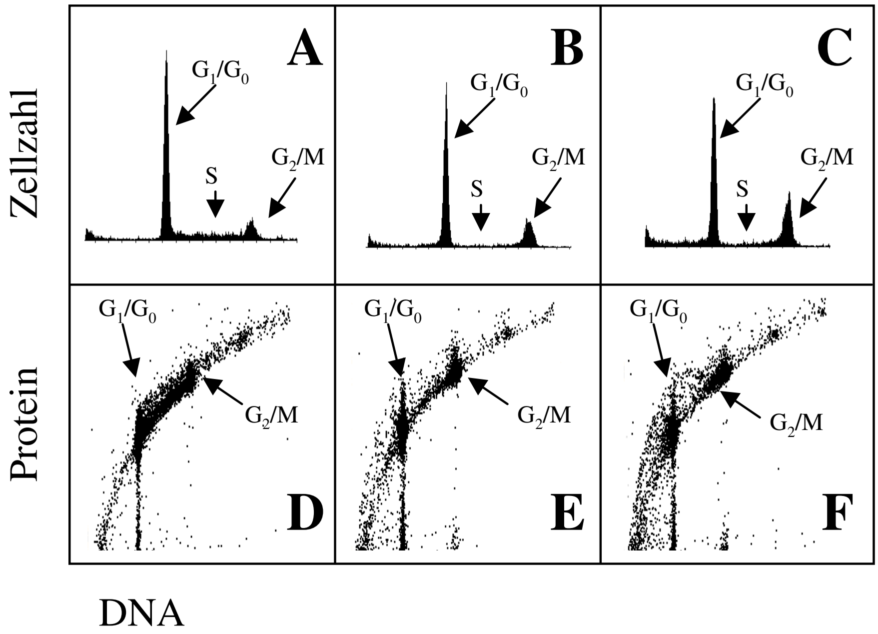


Abbildung 37: Durchflußzytometrische Untersuchung von LXFL529L-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit Lycobetain, A-C Ein-Parameter-Darstellung (DNA gegen Zellzahl), D-F Zwei-Parameter-Darstellung (DNA-Gehalt gegen Proteingehalt, A + D unbehandelte Kontrolle, B + E Lycobetain, [5 µM], C + F Lycobetain [10 µM].

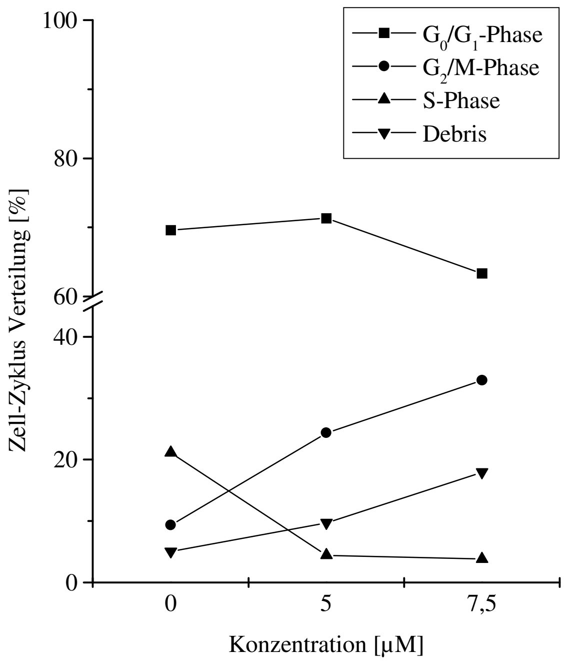


Abbildung 38: Zellzyklusverteilung von LXFL529L. Nach 72h Behandlung mit Lycobetain stieg der G_2/M-Anteil der Zellen gleichzeitig mit dem Debris an, während die Zellen in der G_0/G_1-Phase und in der S-Phase abnahmen. Die Messung erfolgte durchflußzytometrisch.

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.1

Lycorin und Lycobetain sind potente Wachstumsinhibitoren an verschiedenen humanen Tumorzellinien. Nach 72 h Inkubation mit Lycorin konnte ein Arrest von LXFL529L-Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus beobachtet werden. Der Wirkmechanismus der Substanz konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden (s. Anhang).
Lycobetain ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Es konkurriert mit Ethidiumbromid und Hoechst H33258 um Bindungsstellen in der Doppelstrang-DNA. Untersuchungen zur Topoisomerase-Inhibierung zeigten, daß Lycobetain ab einer Konzentration von 10 µM Topoisomerase I unter Ausbildung eines stabilen Intermediates zwischen Topoisomerase I und DNA hemmt. Als Folge auftretende DNA-Strangbrüche konnten mittels Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden. Auch Topoisomerase II wird durch Lycobetain ab 10 µM gehemmt. Durchflußzytometrische und morphologische Untersuchungen ergaben, daß Lycobetain Apoptose induziert und den Zellzyklus in der G_2/M-Phase arretiert.

4.2 Flavonoide aus *Scutellaria baicalensis*

4.2.1 Baicalin und Baicalein

4.2.1.1 Wachstumshemmende Wirkung

Baicalin und Baicalein wurden an 5 humanen Tumorzellinien auf ihre wachstumshemmende Wirkung untersucht. Im Sulforhodamin B-Assay hemmte Baicalin das Wachstum aller Zellinien mit IC_{50}-Werten im Bereich von 30-55 µM. Dabei wurden die adherent wachsenden Zellinien MCF-7 und LXFL529L aus soliden Tumoren stärker beeinflußt als humane Leukämiezellinien.
Baicalein zeigte im gleichen Konzentrationsbereich wie sein Glukuronid Baicalin wachstumshemmende Wirkung an humanen Tumorzellen. Die beste Wirkung konnte an der humanen chronisch-myeloischen Leukämie-Zellinie K562 nachgewiesen werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Wachstumshemmende Wirkung von Baicalin und Baicalein, (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B–Assay), Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM].

Zellinie	Baicalin IC_{50}[µM]	Baicalein IC_{50}[µM]
LXFL529L	38 ± 4	26 ± 1
HL60	45 ± 6	35 ± 6
K562	n.b.	20 ± 5
Jurkat	n.b.	22 ± 4
Molt4	48 ± 2	27 ± 3
U937	44 ± 3	n.b.
MCF-7	31 ± 3	n.b.

4.2.1.2 Interaktion mit Doppelstrang DNA

Im Ethidiumbromidverdrängungsassay konnte keine Konkurrenz von Baicalin mit dem Interkalator nachgewiesen werden. Bei der Kompetition mit Hoechst H33258 war jedoch eine Verdrängung des Farbstoffes durch Baicalin erkennbar, ein C_{50}-Wert konnte jedoch nicht ermittelt werden (>50 µM). Im Vergleich zu Distamycin A, Netropsin und Lycobetain ist die Verdrängung von Hoechst H33258 nur gering. Die Konzentrationen von Baicalin, die Wachstumshemmung induzierten, waren deutlich niedriger, so daß die schwache Bindung an die DNA vermutlich keinen Beitrag zur Wirkung der Substanz liefert.
Baicalein zeigte ebenfalls keinerlei Fähigkeit zur Verdrängung von Ethidiumbromid bis zu Konzentrationen von 50 µM. Der Kompetitionsassay mit Hoechst H 33258 zeigte jedoch, daß

Baicalein mit dem Farbstoff um die Bindungsstelle an der kleinen Furche der DNA konkurriert. Der C_{50}-Wert lag bei 35 µM, was mit den IC_{50}-Werten aus dem SRB-Assay korreliert.

4.2.1.3 Hemmung von humanen Topoisomerasen

Baicalin zeigte in keiner der folgenden Topoisomerase-Untersuchungen eine Inhibierung des Enzyms.

4.2.1.3.1 Hemmung der Topoisomerase I

Relaxations-Assay

Im Relaxations-Assay zeigte sich nach Inkubation mit Baicalein in einer Konzentration von 100 µM eine signifikante Hemmung der Topoisomerase I-Aktivität. Superspiralisierte Plasmid-DNA (pBR322) wurde unter Zusatz von Topoisomerase I vollständig entspannt. Nach Inkubation mit 100 µM Baicalein war nur ein Bruchteil der Plasmid-DNA in relaxierter Form als Bande im Agarosegel detektierbar, während die restliche DNA als Folge der Topoisomerase-Hemmung in superspiralisierter Form vorlag. Nach Inkubation mit Baicalin [100 µM] konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (Abbildung 39).

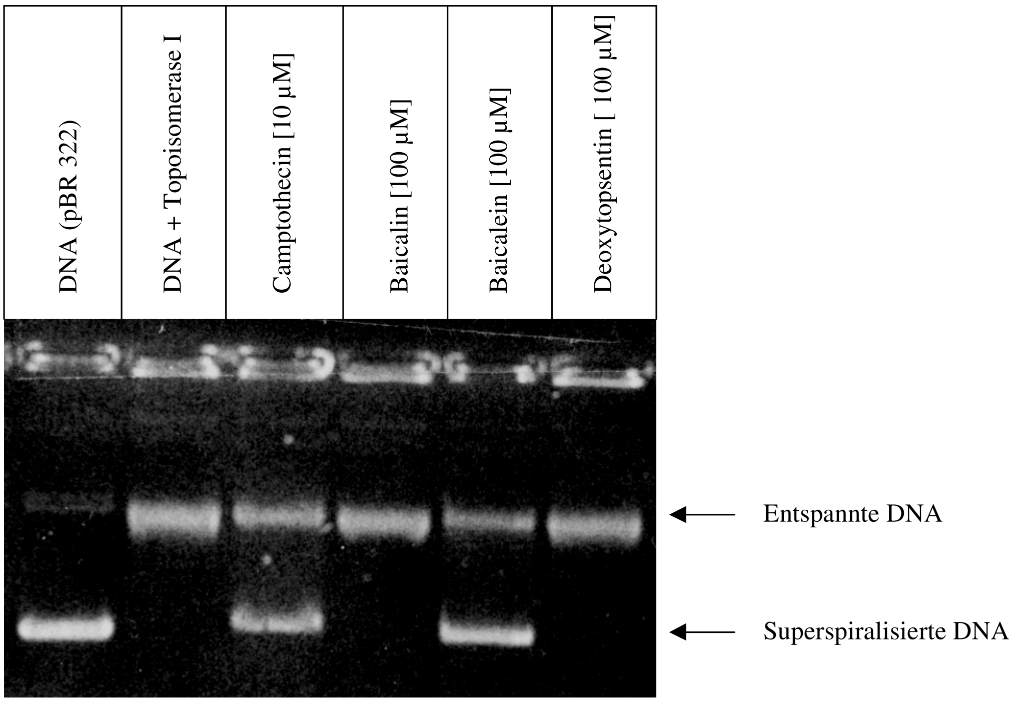


Abbildung 39: Inhibierung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I-Rohextrakt aus humanen HL60 Zellen im Relaxations-Assay. Superspiralisierte pBR322 Plasmid-DNA wurde 30 min bei 37°C mit Topoisomerase I mit und ohne Baicalein inkubiert und die Entspannung der DNA überprüft, Camptothecin wurde als Kontrolle mitgeführt.

Mechanistische Untersuchungen

Mobility-Shift-Assay

Auch für Baicalein wurde, wie für Lycobetain, der Wirkmechanismus der Topoisomerase I-Hemmung näher untersucht. Im Mobility Shift-Assay (s. Lycobetain) (Abbildung 40) zeigte sich auf dem Agarosegel eine Zunahme der Bande für die offen zirkuläre DNA. Gleichzeitig verschwand die Bande für die superspiralisierte DNA und das Signal für entspannte DNA nahm zu. Dieses Ergebnis war ein Hinweis darauf, daß auch Baicalein mechanistisch über die Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Komplexes wirkt.

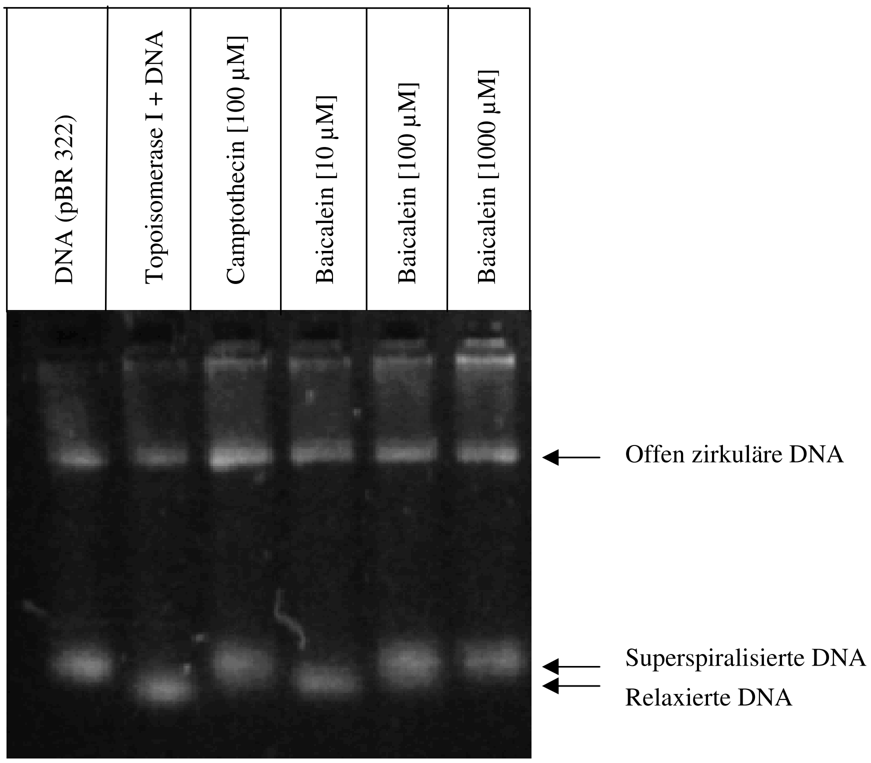


Abbildung 40: Mobility Shift-Assay für Topoisomerase I, 250 ng pBR322 Plasmid-DNA wurde mit 200 U humaner Topoisomerase in Anwesenheit von Camptothecin oder Baicalein in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1% SDS gestoppt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C mit 1mg/ml Proteinase K verdaut. Die Detektion erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt.

Immunoband-Depletion-Assay

Wie auch bei der Untersuchung von Lycobetain diente der Immunoband-Depletionsassay der Kontrolle des Mobility Shift-Assays. Topoisomerase I wurde mit Kalbsthymus-DNA und Baicalein inkubiert. Dabei zeigte sich, daß nach Inkubation mit Baicalein das Western-Blot-Signal, ebenso wie bei der Positivkontrolle Camptothecin, stark abnimmt (Abbildung 41). Somit konnte der Mechanismus der Stabilisierung des DNA-Topoisomerase I-Komplexes auch für Baicalein nachgewiesen werden.

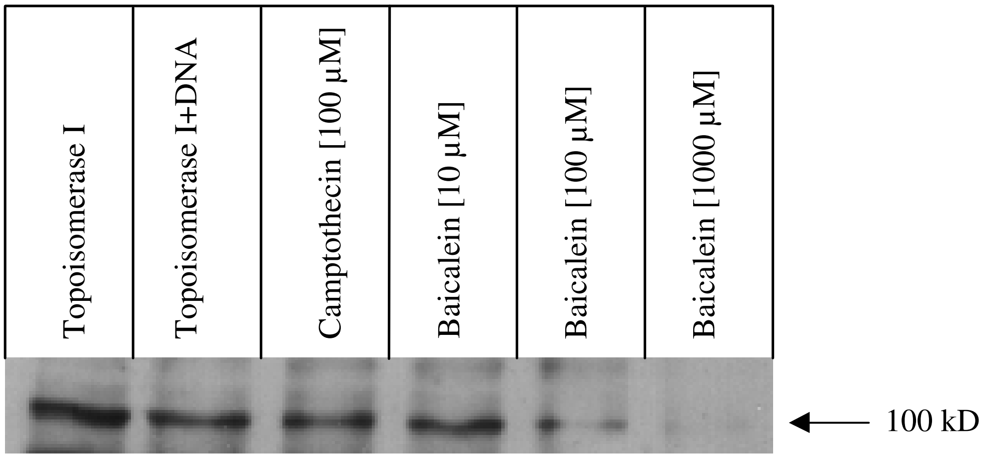


Abbildung 41: Immunoband-Depletionsassay für Topoisomerase I, 200 U humane rekombinante Topoisomerase I wurde mit 4 µg Kalbsthymus DNA mit und ohne Hemmstoff für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1% SDS gestoppt. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Gel geladen und anschließend einer Western-Blot-Analyse mit Anti-Topoisomerase I–Antikörper unterzogen.

4.2.1.3.2 Topoisomerase II

Relaxations-Assay

Im Relaxations-Assay mit Baicalein konnte ab 100 µM Substanzkonzentration eine Hemmung von Topoisomerase II α und II β nachgewiesen werden. Das Enzym war nach 30 min Inkubation mit Baicalein nicht mehr aktiv und konnte keine Doppelstrangbrüche mehr in die DNA einführen.

Dekatenierungs-Assay

Im Dekatenierungs-Assay konnten die Ergebnisse des Relaxations-Assays bestätigt werden. Bei Konzentrationen von 100 µM Baicalein konnten keine Doppelstrangbrüche mehr durch Topoisomerase II in die Kinetoplasten-DNA eingeführt werden, so daß im Gel keine Bande mehr detektierbar war (Abbildung 42).

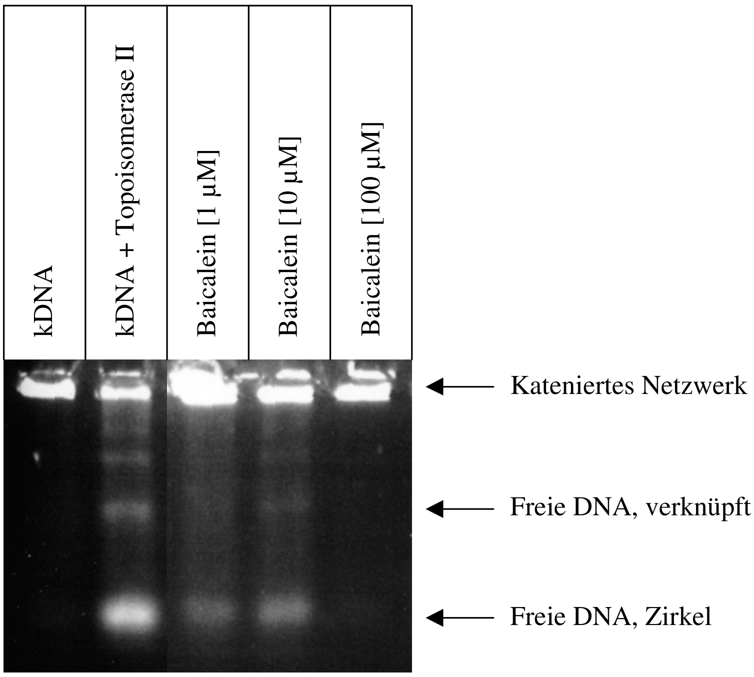
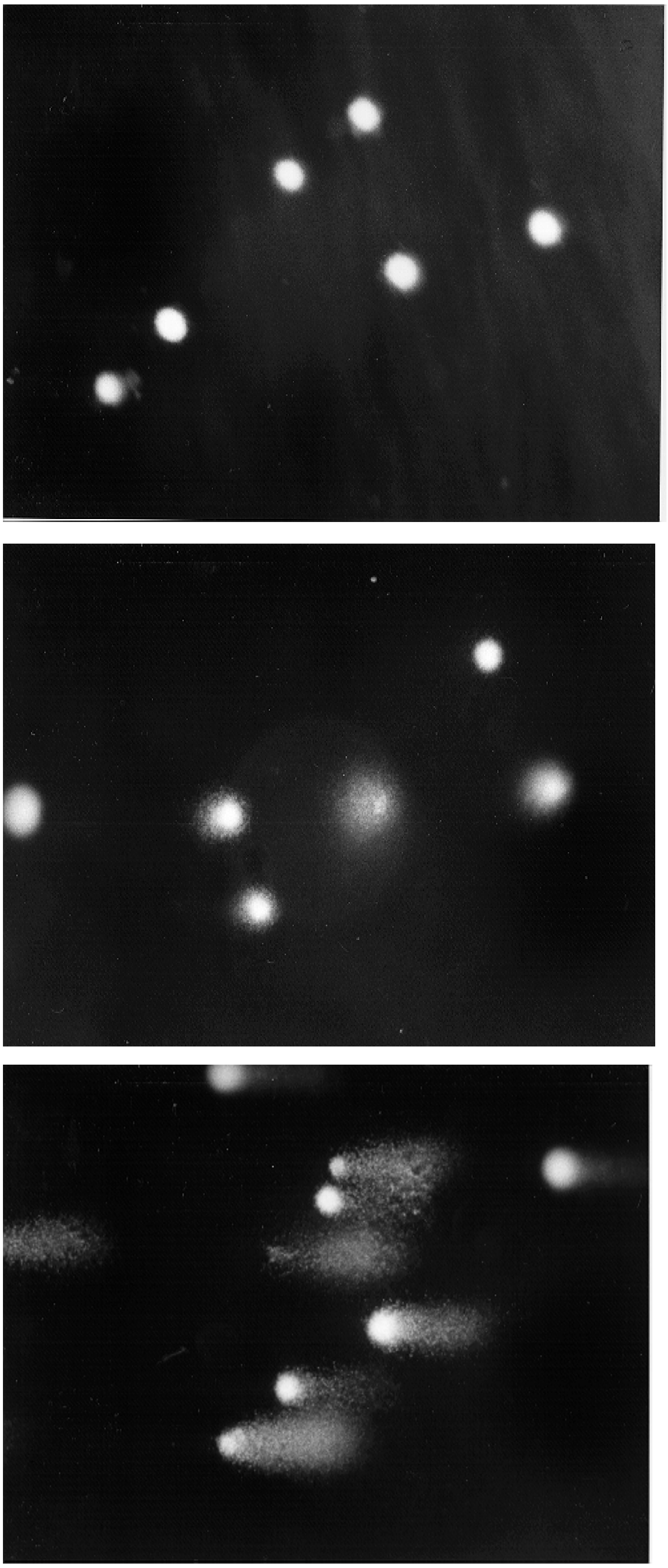


Abbildung 42: Dekatenierungs-Assay, Rekombinante Topoisomerase II wurde mit Kinetoplasten-DNA mit und ohne Baicalein für 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5 minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

4.2.1.4 Induktion von DNA-Strangbrüchen

Nach einer Inkubation von HL60 Zellen mit 50 und 100 µM Baicalein konnten DNA-Strangbrüche mittels Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 50 µM induzierte Baicalein nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 20% der Zellen leichte DNA-Schäden und bei 16% starke DNA-Schäden. Bei einer Konzentrationen von 100 µM waren 100% der DNA nach 3h schwer geschädigt (Abbildung 43).
Für Baicalin waren unter diesen Testbedingungen keine DNA-Strangbrüche detektierbar.



A

B

C

Abbildung 43: : Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay), LXFL529L-Zellen wurden 3h mit und ohne Baicalein inkubiert und dann einer Einzelzellgelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung der Proben mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Detektion, A Kontrolle, B Baicalein [50 µM], C Baicalein [100 µM].

4.2.1.5 Veränderungen des Zellzyklus und Induktion von Apoptose

4.2.1.5.1 Morphologie

Bei einer Inkubation von LXFL529L-Zellen mit 10 µM Baicalin für 24 h war eine starke Schrumpfung des Zytoplasmas mit gleichzeitiger beginnender Fragmentierung des Kerns erkennbar. Inkubation mit höheren Substanzkonzentrationen hatte eine so starke Schädigung der Zelle zu Folge, daß die Zellen sich vom Objektträger ablösten und nicht mehr mikroskopisch detektierbar waren.

Morphologische Untersuchungen mit Baicalein zeigten nach 24 h typisch apoptotische Merkmale. Bei einer Konzentration von 50 µM Baicalein war eine Reduktion des Zytoplasma klar ersichtlich sowie eine beginnende Fragmentierung des Zellkerns. Nach 24 h bei 100 µM Baicalein waren die Zellen vollständig abgerundet und der Kern in mehrere Fragmente zerfallen (Abbildung 44).

Messungen nach 3 Stunden zeigten keine Veränderungen an den Zellen, während nach 72 Stunden die Schädigung bereits soweit fortgeschritten war, daß keine reproduzierbare Auswertung möglich war.

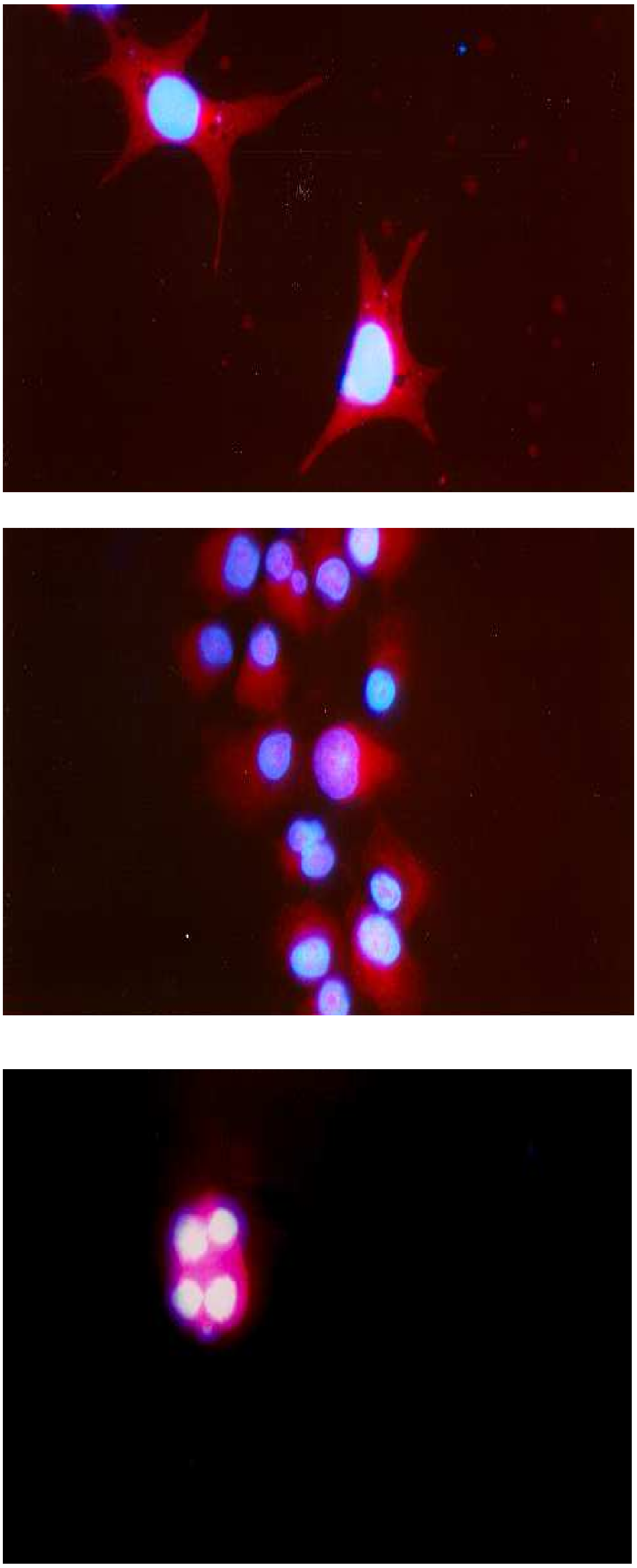
4.2.1.5.2 Durchflußzytometrie

Untersuchungen zur Veränderung am Zellzyklus zeigten ab 10 µM Baicalin nach 72 h Inkubation eine starken Anstieg der Zellpopulation in der G_0/G_1-Phase. Der Debris-Anteil stieg ein wenig verzögert ebenfalls an. Der Anteil an Zellen in der S- und G_2/M-Phase des Zellzyklus nahm dagegen ab (Abbildung 46).

Histogramme zeigten nach 72 h ab Konzentrationen von 25 µM Baicalin einen signifikanten Anstieg an apoptotischen und fragmentierten Zellen. Dies weist ebenso wie die morphologischen Daten auf eine Induktion von Apoptose hin.

Bei einer Substanzkonzentration von 75 und 100 µM Baicalein ließ sich eine Arretierung der Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus beobachten. Dabei stieg gleichzeitig der Anteil der apoptotischen Zellen an, während der Anteil der Zellen in der G_0/G_1 und der S-Phase abnahm (Abbildung 46).

Messungen nach Inkubation mit Baicalein für 72 h zeigten im Durchflußzytometer ebenfalls die Induktion der Apoptose. Diese scheint aus der G_0/G_1 und aus der G_2/M-Phase zu entstehen, was in der 2-Parameter-Auswertung in einem Sub-G_1- als auch einem Sub-G_2-Peak resultierte.



A

B

C

Abbildung 44: Morphologie von LXFL529L-Zellen, Zellen wurden für 24 h mit und ohne Baicalein inkubiert, 15 min in Methanol (4°C) fixiert und dann mit DAPI/SR 101 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert, A Kontrolle, B Baicalein [50 µM], C Baicalein [100 µM]

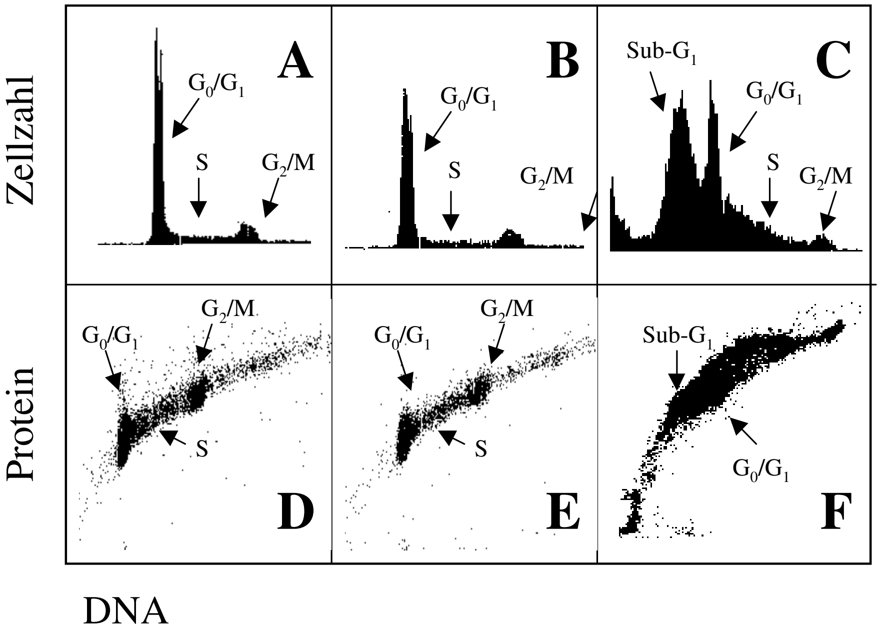


Abbildung 45: Durchflußzytometrische Untersuchung von LXFL529L-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit Baicalein, A-C Ein-Parameter-Darstellung (DNA gegen Zellzahl), D-F Zwei-Parameter-Darstellung (DNA-Gehalt gegen Proteingehalt, A + D unbehandelte Kontrolle, B + E Baicalein, [50 µM], C + F Baicalein, [100 µM].

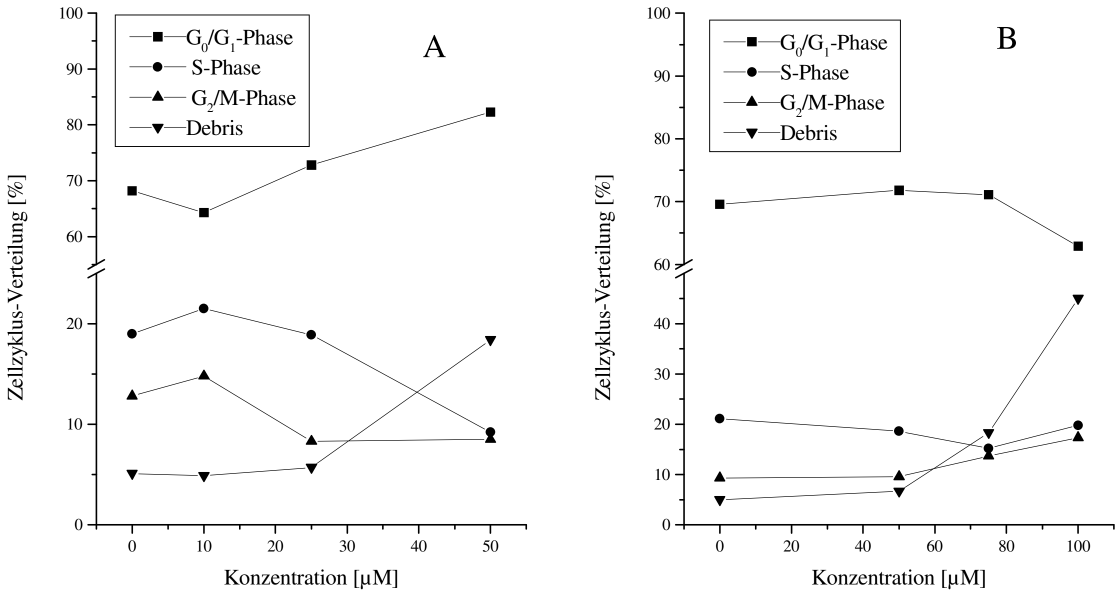


Abbildung 46: Zellzyklusverteilung, Inkubation von LXFL529L-Zellen für 72h mit Baicalin, A, und Baicalein, B, Färbung mit DAPI/SR101.

4.2.2 Skullcapflavon II

Bei Messungen mit der Zellinie LXFL529L ergab sich ein IC_{50}-Wert für die Wachstumshemmung von 10 ± 2 µM. Für die humanen Leukämie-Zellinien K562 und HL60 lagen die IC_{50}-Werte bei 22 ± 3 µM und 5,5 ± 0,5 µM.
Die Substanz war außerdem in der Lage, Topoisomerase I und II mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration von 100 µM zu hemmen. Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen war allerdings nicht meßbar. Mechanistische Untersuchungen zur Topoisomerase I ergaben keinen Hinweis auf Stabilisierung des Cleavable-Complex.
Durchflußzytometrische Untersuchungen zu Veränderungen am Zellzyklus und zur Induktion von Apoptose zeigten ebenfalls keinen Effekt. Morphologische Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf die Induktion von Apoptose.

4.2.3 Wogonin und Wogonosid

Im SRB-Zytotoxizitätstest zeigte Wogonosid an LXFL529L und HL60 Zellen nur eine sehr schwache Hemmung des Wachstums (IC_{50} >100 µM). Wogonin zeigte höhere Aktivität (Tabelle 6), besonders bei der Zellinie K562, wo der IC_{50} im Bereich der Werte für Baicalin und Baicalein lagen.

Tabelle 6: Wachstumshemmende Wirkung von Wogonin (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-Assay), Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM].

Zellinie	SRB
LXFL529L	89 ± 11
K562	32 ± 2
MCF-7	>100
Jurkat	>100

Weitere Versuche ergaben keine Hinweise auf einen potentiellen Wirkmechanismus der Substanzen. Hemmung von Topoisomerase I oder II war nur geringfügig detektierbar (>1000 µM). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie Interaktion mit DNA konnte nicht beobachtet werden. Wogonin zeigte an isolierter cyclinabhängiger Kinase 1 (cdk1) eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität (IC_{50} = 20 µM). Veränderungen am Zellzyklus sowie Induktion von Apoptose waren jedoch nicht nachweisbar.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.2

5 Flavone aus der Wurzel von *Scutellaria baicalensis* wurden auf ihre antineoplastische Wirkung getestet. Alle Substanzen mit Ausnahme von Wogonosid zeigten wachstumshemmende

Wirkung an humanen Tumorzellinien im mikromolaren Bereich. Keine der Substanzen konnte mit Ethidiumbromid konkurrieren, eine geringfügige Affinität zur kleinen Furche der DNA war für Baicalein jedoch meßbar.
Skullcapflavon II, Wogonin und Wogonosid hemmten Topoisomerase I und II bei Konzentrationen von 100-1000 µM, zeigten aber keine Induktion von Strangbrüchen.
Von den hier untersuchten Flavonoiden war Baicalein ein potenter Inhibitor von Topoisomerase I und II. Topoisomerase I wird unter Stabilisierung des Cleavable-Complex gehemmt. Damit einhergehende Strangbrüche konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Baicalein zeigte das Glukuronid Baicalin weder Hemmung der Topoisomerase noch Induktion von Strangbrüchen in der DNA.
Nach Behandlung von LXFL529L-Zellen mit Baicalein und Baicalin konnte Apoptose nachgewiesen werden. Baicalin arretierte dabei die Zellen in der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus, während Baicalein einen Arrest in G_2/M auslöste.

4.3 Indigoide Bisindole

4.3.1 Indirubin und 5-Jod-Indirubin

4.3.1.1 Wachstumshemmende Wirkung

Indirubin und 5-Jod-Indirubin wurden an 7 Zellinien auf ihre wachstumshemmende Wirkung im Sulforhodamin B-Assay untersucht.

Tabelle 7: Wachstumshemmende Wirkung von Indirubin und 5-Jod-Indirubin, (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-, BrdU-Assay), Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM].

	Indirubin		5-Jodindirubin	
Zellinie	**SRB**	**BrdU**	**SRB**	**BrdU**
LXFL529L	9,7 ± 0,1	n.b.	6 ± 0,5	n.b.
HL60	4 ± 1	0,8*	3 ± 0,4	n.b.
K562	3 ± 1	n.b.	6 ± 0,4	n.b.
Molt4	>10	>10	7*	5*
Jurkat	>10	>10	7*	>10*
U937	>10	n.b.	1*	4*
MCF-7	4 ± 2	n.b.	5 ± 1	1*

*Test wurde nur einmal durchgeführt

Durch die schlechte Löslichkeit der Substanzen konnte eine Konzentration von 10 µM im wäßrigen Inkubationsmedium nicht überschritten werden. Indirubin zeigte bei den Zellinien

HL60,K562, LXFL529L und MCF-7 gute Wachstumshemmung, während bei den humanen Leukämien Molt4, Jurkat und U937 bis zu einer Konzentration von 10 µM kaum Effekte meßbar waren.
5-Jod-Indirubin hemmte alle Zellinien mit IC_{50}-Werten unter 10 µM. Zu bemerken ist, daß die Zellinien Molt4, Jurkat und U937 nur jeweils einmal im SRB-Test und im BrdU-Assay getestet wurden. Dabei stimmten die Werte der beiden Tests jedoch gut miteinander überein.

4.3.1.2 Mikrotubuliproteine

4.3.1.2.1 Gewinnung von Mikrotubuliproteinen

Tubulinmoleküle wurden aus Rinderhirn aufgereinigt, da das Vertebratenhirn die ergiebigste Quelle für die biochemische Isolierung darstellt [Ames und Baker, 1979]. Abbildung 47 zeigt ein SDS-Gel mit Tubulin-Proben verschiedener Aufreinigungsschritte, die am Ende der Aufarbeitung reines Tubulin ohne Verunreinigung durch andere Proteine zeigten (Überstand 6).

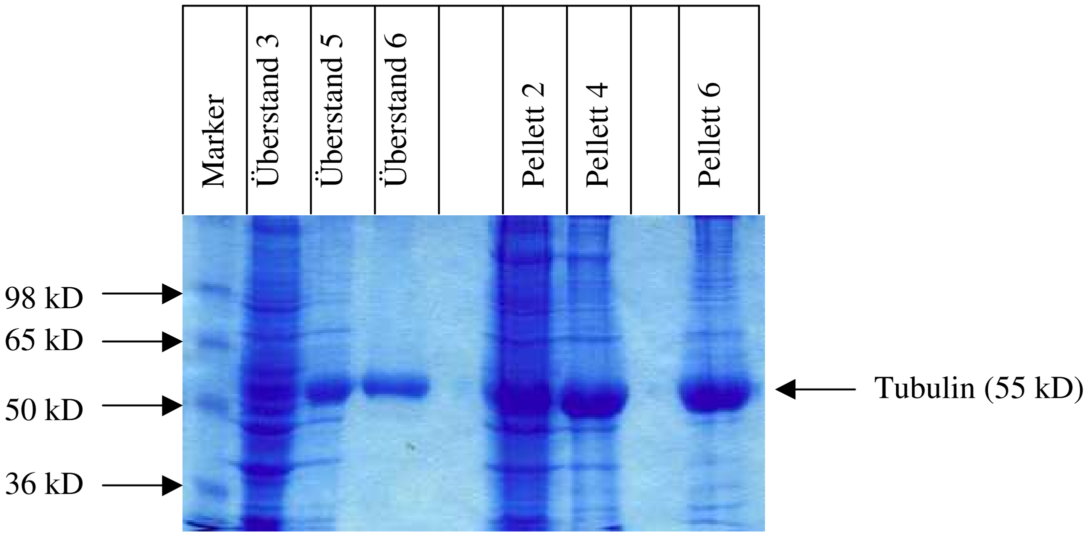


Abbildung 47: 10% SDS-Gel, Färbung mit Coomassie-Blau, ab dem zweiten Aufreinigungsschritt wurde jedes Pellett und jeder Überstand im Kühlschrank gelagert und als Kontrolle der Reinigung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit zunehmender Reinigung verringert sich die Anzahl der Banden im Gel, Überstand 6 ist die endgültige und reinste Form des Proteins.

Durch die gewählten Versuchsbedingungen wurden während der Aufreinigung die mikrotubuli-assoziierten Proteine nicht abgetrennt. Eine Gruppe der MAPs, die vor allem in neuronalen Zellen lokalisiert sind, sind die tau-Proteine [Lee, 1990]. Die Phosphorylierung von tau-Proteinen ist ein wichtiger Faktor für die Stabilität der Mikrotubuli [Lindwall und Cole, 1984] und wird von mehreren Proteinkinasen kontrolliert. Einige davon, unter anderem tau Protein Kinase(TPKII)/cdk5 Komplex liegen an das tau-Protein assoziiert vor [Ishiguro et al.,1992].
Durch Immunoblots mit Antikörper gegen cdk5 konnte eine Assoziation von cdk5 an aufgereinigtes Mikrotubuliprotein nachgewiesen werden (Abbildung 48).

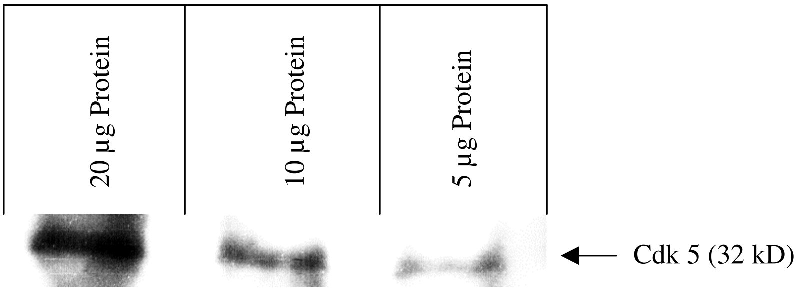


Abbildung 48: Western-Blot-Analyse von aufgereinigtem Mikrotubuliprotein mit polyklonalem cdk5-Antikörper, bei 32kD zeigte sich die Bande für cdk5.

4.3.1.2.2 Tubulinpolymerisationsassay

Das gewonnene Mikrotubuliprotein (MTP) wurde zunächst auf seine Polymerisationsfähigkeit untersucht. Nach Zugabe von GTP [1 µM] wurde 20 min bei 35°C im Photometer (350 nm Wellenlänge) die Trübungszunahme der Flüssigkeit beobachtet. Der Extinktionsanstieg durch die Trübung der Lösung ist ein Maß für die Polymerisationsfähigkeit des MTPs. Durch anschließende Kühlung des Ansatzes für 10 min bei 4°C wurde die Depolymerisationsfähigkeit überprüft. Die Extinktion sollte dann wieder beim Ausgangswert am Polymerisationsstart liegen (Abbildung 49).

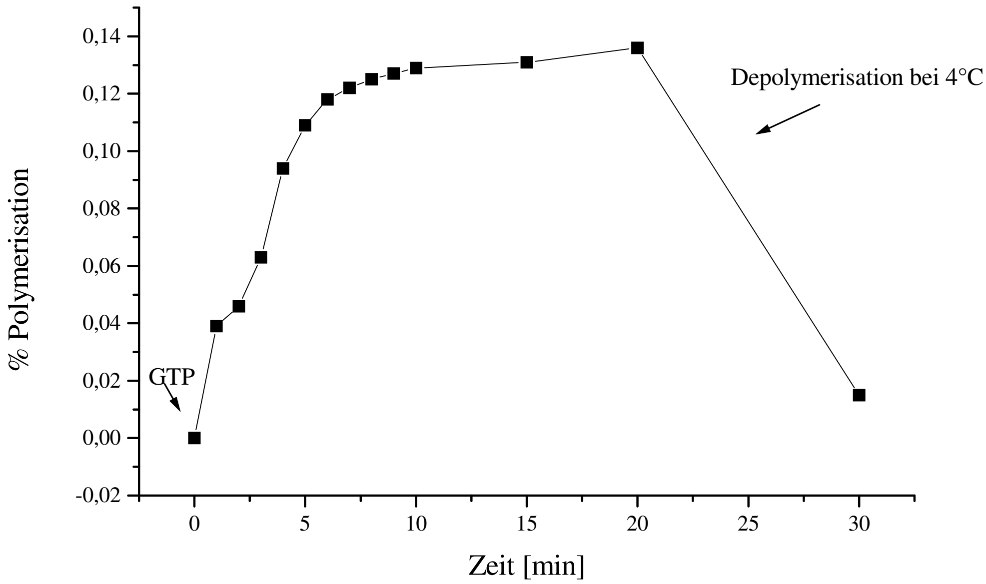


Abbildung 49: Tubulinpolymerisationsassay

In Tabelle 9 sind die verschiedenen getesteten Bisindole im Tubulinpolymerisationsassay im Vergleich aufgelistet. Indirubin zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tubulin-

polymerisation. Der IC_{50}-Wert wurde rechnerisch bei 31µM ermittelt, da die Substanz bei Konzentrationen zwischen 30 und 40 µM ausfiel.
Auf die Depolymerisationsfähigkeit des Mikrotubuliproteins hatte Indirubin keinen Einfluß.
Um Wechselwirkungen mit SH-Gruppen an den Tubulinmonomeren als mögliche Ursache für die hemmende Wirkung zu untersuchen, wurde Indirubin mit Glutathion vorinkubiert und anschließend ein Polymerisationsassay durchgeführt.
Nach Vorinkubation mit GSH war die Polymerisationshemmung durch Indirubin nicht mehr nachweisbar.
5-Jod-Indirubin hemmte im Tubulinpolymerisationsassay ebenso wie Indirubin die Polymerisation von Tubulin. Dabei steigt die Hemmwirkung nicht proportional zur Konzentration an (Tabelle 9). Die Depolymerisationsfähigkeit des Tubulins blieb von 5-Jod-Indirubin unbeeinflußt. Vorinkubation mit GSH bewirkte einen vollständigen Rückgang der Hemmwirkung.
Zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, ob die *in vitro* Messungen am isolierten Mikrotubuliprotein auf das zelluläre System übertragbar sind. LXFL529L-Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und mit Substanz für 24 bzw. 72 h inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit Anti-α-Tubulin als Primärantikörper durchgeführt. An den Sekundärantikörper war der Fluoreszenz-Farbstoff Cy-3 gekoppelt, der unter Fluoreszenzbedingungen rot leuchtet. Als Kontrolle wurden Zellen mit Colchicin inkubiert. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten ein weit ausgedehntes feines Netzwerk von Mikrotubuli, während nach Inkubation mit Colchicin die Struktur völlig zerstört erschien. Nach Behandlung mit Indirubin und 5-Jod-Indirubin zeigte sich weder nach 24h noch nach 72h ein signifikanter Unterschied in der Ausbildung des Mikrotubuligerüstes.

4.3.1.3 Interaktion mit Doppelstrang-DNA

Indirubin und 5-Jod-Indirubin verdrängten sowohl Ethidiumbromid als auch Hoechst H33258 aus Doppelstrang-DNA. Die Ermittlung eines C_{50}-Wertes erwies sich jedoch als schwierig, da die Substanzen sehr früh ausfielen. Der geschätzte C_{50}-Wert liegt für beide Substanzen bei über 60 µM. Auch eine Bindung an die kleine Furche der DNA war erkennbar, jedoch war auch hier keine Ermittlung eines C_{50}-Wertes möglich.

4.3.1.4 Veränderungen des Zellzyklus und Induktion von Apoptose

4.3.1.4.1 Morphologie

Morphologische Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop zeigten bei Inkubation mit 10µM Indirubin keine Veränderungen an LXFL529L-Zellen, die auf Apoptose hindeuten würden.

4.3.1.4.2 Durchflußzytometrie

Nach 72h Inkubation von LXFL529L-Zellen mit Indirubin war keine signifikante Veränderung des Zellzyklus erkennbar. Der Anteil der apoptotischen Debris-Zellen stieg von 5% auf 10% an, während alle anderen Werte annähernd gleich blieben.

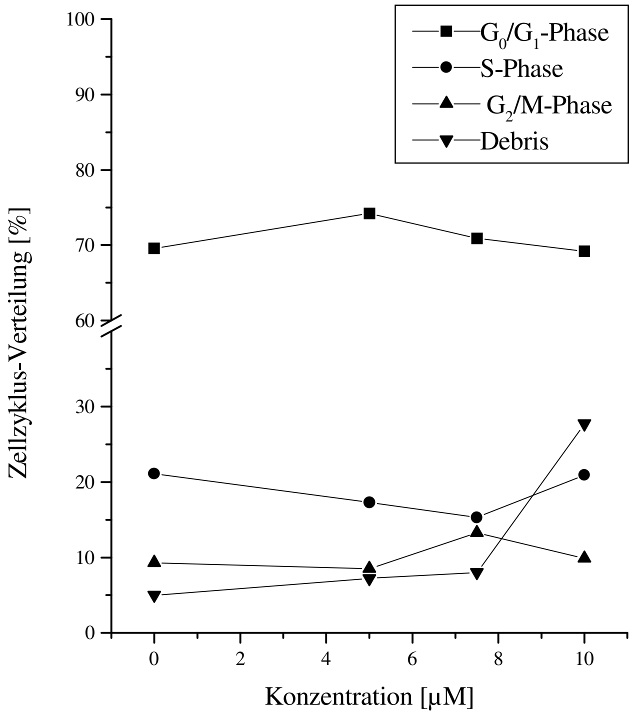


Abbildung 50: Zellzyklusverteilung von LXFL529L nach 72h Behandlung mit 5-Jod-Indirubin

Nach Inkubation von LXFL529L-Zellen mit 5-Jod-Indirubin stieg der Debris-Anteil der Zellpopulation von 5% signifikant auf 28% an, was ein Hinweis auf apoptotische Zellen sein könnte. Der charakteristische Peak für apoptotische Zellen war allerdings auch bei dieser Substanz nicht detektierbar. 5-Jod-Indirubin bewirkte nach 72h Inkubation mit LXFL529L-Zellen keine Veränderung des Zellzyklus (Abbildung 50).

4.3.1.4.3 Hemmung von Zellzykluskinasen

Untersuchungen zur Hemmung der cyclinabhängigen Kinase 1 (cdk1)[3] zeigten, daß Indirubin und 5-Jod-Indirubin potente Hemmstoffe des Enzyms darstellen. Der IC_{50}-Wert lag dabei für Indirubin bei 10 µM und für 5-Jod-Indirubin bei 0,3 µM. Für Indirubin wurden zusätzlich Messungen zur Beeinflussung der cdk5 durchgeführt. Auch diese Kinase wurde mit einem IC_{50}-Wert von 5,5 µM gehemmt.

[3] Alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse zu cyclinabhängigen Kinasen wurden in den Labors von L.Meijer, Roscoff, Frankreich ermittelt.

4.3.2 Deoxytopsentin

4.3.2.1 Wachstumshemmende Wirkung

Deoxytopsentin wurde an 7 humanen Zellinien auf wachstumshemmende Wirkung untersucht. In 6 Zellinien lagen die IC_{50}-Werte zwischen 20 und 50 µM, die Mammakarzinomzellinie zeigte einen IC_{50}-Wert von 8 µM.

Tabelle 8: Wachstumshemmende Wirkung von Deoxytopsentin, (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-, BrdU-Assay), Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, IC_{50} [µM].

Zellinie	SRB	BrdU
LXFL529L	55 ± 10	n.b.
HL60	44*	n.b.
K562	22 ± 0,5	35*
Molt4	28 ± 3	n.b.
Jurkat	36 ± 6	29 ± 7
U937	43 ± 17	n.b.
MCF-7	8*	n.b.

* Test wurde nur einmal durchgeführt

4.3.2.2 Weitere Untersuchungen

Weitere Untersuchungen mit Deoxytopsentin ergaben keinen Hinweis auf den Wirkmechanismus. Trotz der Strukturähnlichkeit mit den indigoiden Bisindolen konnte im Tubulinpolymerisationsassay keine Hemmung der Polymerisation bzw. der Depolymerisation beobachtet werden. Interaktionen mit der DNA, Beeinflussung von humanen Topoisomerasen, Veränderungen des Zellzyklus sowie Induktion von Apoptose konnten nicht nachgewiesen werden.

4.3.3 Indigo, Isoindigo, Diphenylbisindol und Bisindolylindol

Die Substanzen Indigo, Isoindigo, Diphenylbisindol und Bisindolylindol wurden jeweils nur an der Zellinie LXFL529L auf ihre wachstumshemmende Wirkung getestet. Für Indigo und Bisindolylindol waren keine IC_{50}-Werte meßbar, da die Substanzen vor Erreichen eines IC_{50}–Wertes bei ca. 50 µM ausfielen. Der IC_{50}- Wert für Isoindigo lag bei 8 ± 1 µM, für Diphenylbisindol bei 12 ± 3 µM.

Indigo, Isoindigo und Diphenylbisindol zeigten im Tubulinpolymerisationsassay keine Hemmung der Polymerisationsfähigkeit des Proteins. Bei Inkubation mit Bisindolylindol zeigte sich eine leichte Abnahme der Polymerisationsfähigkeit, die Substanz fiel allerdings schon bei sehr niedrigen Konzentrationen aus, so daß keine klare Aussage über die Hemmwirkung getroffen werden konnte. Keine der getesteten Substanzen beeinflußte die Depolymerisationsfähigkeit des Proteins.

Tabelle 9: Vergleich der Tubulin-Polymerisationshemmung von verschiedenen Bisindolen, Angaben in % der Polymerisation

Substanz/ Konz. [µM].	Indigo	Isoindigo	Indirubin	5-Jod-Indirubin	Bisindolyl-indol	Diphenyl-bisindol
0	100*	100	100	100	100	100
10	81,3	n.b.	76	78	86,2	n.b
20	99,6	n.b.	64	78	75,6	n.b.
30	89,9	115	fällt aus	78	fällt aus	n.b.
40	91,6	fällt aus	n.b.	73	n.b.	118

n.b. = nicht bestimmt

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.3

Die untersuchten Bisindole hemmten in unterschiedlichem Maße das Wachstum verschiedener humaner Tumorzellinien. Untersuchungen zur Interkalationsfähigkeit im Ethidiumbromidverdrängungsassay zeigten, daß 5-Jod-Indirubin und Indirubin sowie Indigo mit Ethidiumbromid und Hoechst H33258 kompetieren. Die Bestimmung eines C_{50}-Wertes war allerdings nicht möglich, da die Substanzen im wässrigen Milieu sehr früh ausfielen und so nicht reproduzierbar gemessen werden konnte. Ein weiteres Target für indigoide Bisindole scheinen Mikrotubuliproteine zu sein. Indirubin, 5-Jod-Indirubin und 2-(2´-Bisindolyl)indol hemmten die Tubulinpolymerisation. Auch hier konnte aufgrund der Löslichkeitsprobleme kein IC_{50}-Wert bestimmt werden (Tabelle 9). In zusätzlich durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen war im Vergleich zu der Referenzsubstanz Colchicin kaum eine morphologische Veränderung des Tubulingerüstes erkennbar.

4.4 Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide

In der Arbeitsgruppe von Melnik, Moskau, waren mehrere Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide mit unterschiedlichen Substituenten an X, R1 und R2 synthetisiert worden (Tabelle 1). 13 dieser Substanzen wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre antineoplastische Wirkung untersucht.

4.4.1.1 Wachstumshemmende Wirkung

Untersuchungen der Wachstumshemmung erfolgten im Sulforhodamin B-Assay an der Zellinie LXFL529L. Die Ergebnisse zeigten, daß mit Ausnahme der Substanzen 1, 3 und 11 eine sehr gute wachstumshemmende Wirkung vorlag, wobei die Substanz 4 sich mit einem IC_{50}-Wert von 0,09µM als effektivster Wachstumshemmstoff erwies (Tabelle 10).

Tabelle 10: Wachstumshemmende Wirkung von Indolocarbazolen und Bisindolylmaleimiden, (72 h Inkubationszeit, Sulforhodamin B-Assay), Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens zwei unabhängigen Messungen ermittelt, Zellinie LXFL529L, IC_{50} [µM].

Substanz	SRB
1	41 ± 4
2	6 ± 1
3	22 ± 3
4	0,09 ± 0,03
5	4 ± 2
6	2 ± 0,4
7	3 ± 1
8	1 ± 0,3
9	6 ± 1
10	3,4 ± 0,3
11	>50
12	9 ± 2
13	3 ± 0,2

4.4.1.2 Zelluläre Lokalisation der Substanzen

Da die Substanzen aufgrund ihrer Struktur bei einer Anregungwellenlänge von 350-525 nm und einer Emissionswellenlänge von 420-660 nm fast alle Eigenfluoreszenz zeigten, wurde zunächst die Lokalisation der Substanzen in LXFL529L-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß nach Inkubationszeiten von 1 h und 4 h mit Ausnahme von Substanz 4 alle Substanzen hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert waren. Substanz 4 war im Gegensatz dazu hauptsächlich im Zellkern akkumuliert. In Abbildung 51 sind exemplarisch die Substanzen 4 und 10 dargestellt.

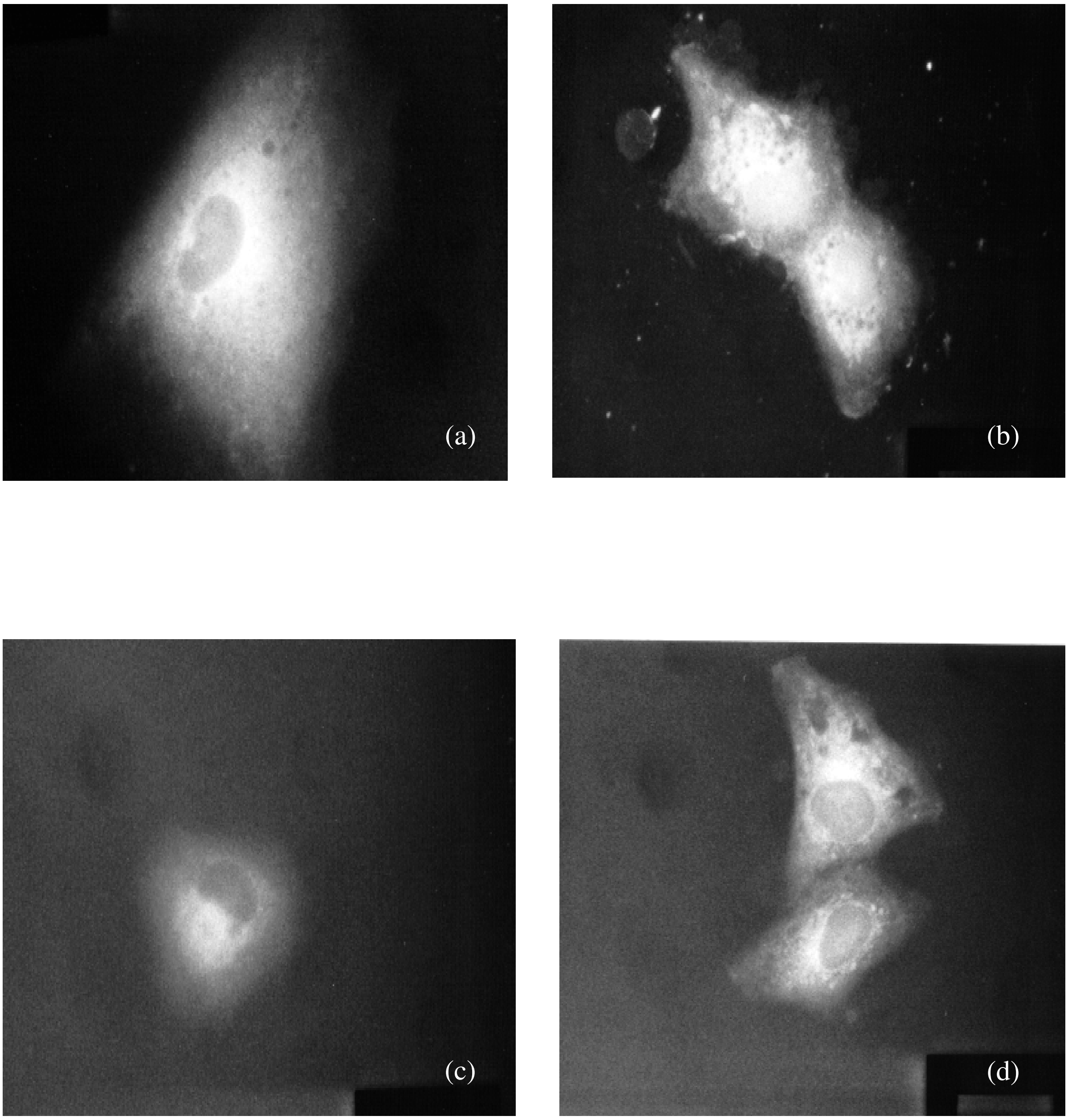


Abbildung 51: Zelluläre Lokalisation der Substanzen 4 und 10 nach 1 und 4 Stunden Inkubation, Zellinie LXFL 529 L; Substanz 4, 1h (a); Substanz 4, 4h (b); Substanz 10, 1h (c), Substanz 10, 4h (d).

4.4.1.3 Proteinkinase C (PKC)

4.4.1.3.1 Hemmung der Enzymaktivität im zytosolischen Rohextrakt

Untersuchungen zur Beeinflussung der Proteinkinase C-Aktivität wurden an LXFL529L-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde ein PKC-haltiger Extrakt aus dem Zytosol unbehandelter Zellen gewonnen. Dieser Extrakt wurde mit den Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und die Übertragung von radioaktiven Phosphatresten auf ein PKC-Peptidsubstrat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen. Mit Ausnahme der Substanzen 1 und 11 hemmten alle Wirkstoffe die Aktivität der zytosolischen Proteinkinase C im Rohextrakt. Die Substanzen 2 und 10 zeigten dabei mit IC_{50}-Werten von 0,7 und 0,4 µM die beste Wirkung.

Tabelle 11: Inhibierung der Proteinkinase C

Substanz	PKC Hemmung an isolierter zytosolischer PKC; IC_{50} [µM].	PKC Hemmung in Zellkultur; 1 h Inkubation, IC_{50} [µM].
1	>50	>50
2	0,7 ± 0,1	33 ± 2,8
3	2 ± 0,6	>50
4	3,6 ± 1,6	3,4 ± 1,5
5	4 ± 0,2	31 ± 3,5
6	8 ± 0,2	>50
7	4,2 ± 0,1	>50
8	3,2 ± 0,4	>50
9	12 ± 0,3	>50
10	0,4 ± 0,5	3,1 ± 0,1
11	>50	>50
12	35 ± 1,1	>50
13	3,4 ± 0,01	>50

4.4.1.3.2 PKC-Hemmung in der Zellkultur

Zum Vergleich mit der isolierten zytosolischen PKC wurden Zellen in der Zellkultur eine Stunde mit Substanz inkubiert und dann die zytosolische PKC-haltige Fraktion gewonnen. Die PKC-Aktivität wurde im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen. Dabei zeigten sich große Unterschiede gegenüber der Messung am isolierten Enzym. Nur noch zwei Substanzen erwiesen sich als potente Proteinkinase C Inhibitoren, bei zwei weiteren ließ sich ein IC_{50}-Wert bei vergleichsweise hohen Konzentrationen ermitteln, während alle anderen Substanzen auch bei der höchsten einsetzbaren Konzentration keine signifikante Hemmung des Enzyms zeigten. Die Substanz 4 erwies sich, zusammen mit Substanz 10 als bester Hemmstoff mit IC_{50}-Werten von 3,4 und 3,1 µM. Für die Substanzen 2 und 5 wurden IC_{50}-Werte von 33 und 31 µM ermittelt. Im Vergleich zu den Substanzen 4 und 10 sowie zur Positivkontrolle GF 109203X, einem Bisindolylmaleimid mit einem IC_{50} von unter 100 nM, liegen diese IC_{50}-Werte jedoch sehr hoch (Tabelle 11).

Tabelle 12: Vergleich von Ethidiumbromid- und Hoechst H33258-Kompetition.

Substanz	**Ethidiumbromid-Verdrängung C_{50} [µM].**	**Hoechst H33258-Verdrängung C_{50} [µM].**
1	>100	18 ± 2,0
2	>100	20 ± 2,0
3	>100	19 ± 0,3
4	>100	0,7 ± 0,1
5	>100	4 ± 1,5
6	>100	3 ± 0,3
7	>100	1 ± 0,1
8	>100	1 ± 0,1
9	>100	2 ± 1,0
10	>100	3 ± 0,4
11	>100	7 ± 0,1
12	>100	0,5 ± 0,1
13	>100	>20

4.4.1.4 Interaktion mit Doppelstrang-DNA

Desweiteren wurde die Interaktion der Substanzen mit Doppelstrang-DNA überprüft. Im Ethidiumbromidkompetitionsassay war keine der untersuchten Substanzen in der Lage Ethidiumbromid aus der Doppelstrang-DNA zu verdrängen. Im Gegensatz dazu konnten fast alle Substanzen im niedrig mikromolaren Bereich an die kleine Furche der DNA binden und dort mit dem Hoechst-Farbstoff H33258 konkurrieren. Die Substanzen 4, 8 und 12 zeigten mit C_{50}-Werten von 0,7; 0,9 und 0,5µM die beste Bindungsfähigkeit. Die Substanz 13 mit dem offenkettigen Substituenten in R1-Position zeigte erst in höheren Konzentrationen eine Wirkung (Tabelle 12).

4.4.1.5 Hemmung von humanen Topoisomerasen

4.4.1.5.1 Topoisomerase I

4.4.1.5.1.1 Relaxations-Assay

Die Hemmung der Topoisomerase I wurde mittels Relaxations-Assay überprüft (Tabelle 13, Abbildung 52).

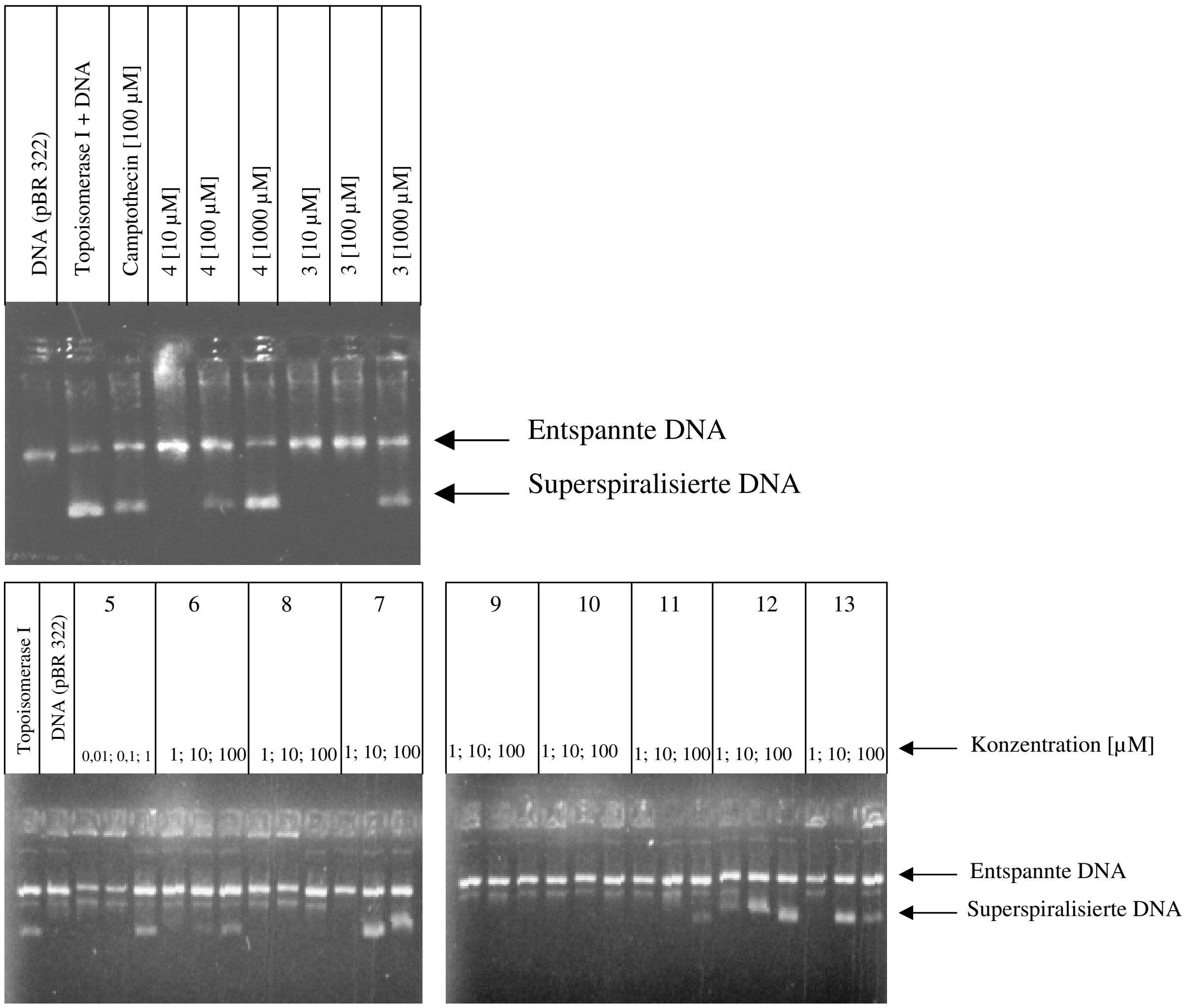


Abbildung 52: Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I-Rohextrakt aus humanen HL60 Zellen im Relaxations-Assay. Superspiralisierte pBR322 Plasmid-DNA wurde 30 min bei 37°C mit Topoisomerase I mit und ohne Substanzen inkubiert und die Entspannung der DNA überprüft, Camptothecin wurde als Kontrolle mitgeführt

Die Substanzen 1-3 zeigten keine Hemmung der Topoisomerase I-Aktivität. Substanz 4 hemmte Topoisomerase mit einem MIC-Wert von 100 µM. Die Substanz 5 hemmte bereits bei Konzentrationen von 0,1-1 µM die Aktivität der Topoisomerase I. Die Substanzen 6, 7, 11, 12 und 13 hemmten bei 10 µM zum ersten Mal sichtbar die Aktivität der Topoisomerase, während alle anderen Substanzen bis 100 µM keine sichtbare Veränderung an der Aktivität des Enzyms zeigten.

Tabelle 13: Hemmung von Topoisomerasen I und II , (MIC = minimal inhibitory concentration)

Substanz	Topoisomerase I MIC [µM].	Topoisomerase II MIC [µM].	Induktion von Strang-brüchen MC [µM].
1	>1000	>100	50
2	>100	>100	100
3	>100	>100	>100
4	100	>100	<10
5	0,1-1	>100	50
6	10	1	50
7	10	1	50
8	>100	1	10
9	>100	1	50
10	>100	10	50
11	10	>100	50
12	10	>100	50
13	10	>100	50

4.4.1.5.2 Topoisomerase II

4.4.1.5.2.1 Dekatenierungs-Assay

Die Beeinflussung der Topoisomerase II-Aktivität wurde mit Hilfe des Dekatenierungs-Assays untersucht. Es stellte sich heraus, daß auch hier einige der untersuchten Substanzen eine Inhibierung des Enzyms bewirken können. Als potentester Hemmstoff erwies sich die Substanz 8. Bereits bei 1µM war eine deutliche Abnahme der Banden im Gel erkennbar, was auf eine Verringerung der Topoisomerase II-Aktivität hindeutet (Tabelle 13, Abbildung 53).

Die oft mit Hemmung der Topoisomeraseaktivität einhergehenden DNA-Strangbrüche wurden mittels Einzelzellgelelektrophorese untersucht. Nur Substanz 4 und 8 zeigten nach 3h Inkubation DNA-Strangbrüchen bei niedrigen Konzentrationen, während alle anderen Substanzen erst ab Konzentrationen von über 50µM Kometen induzierten.

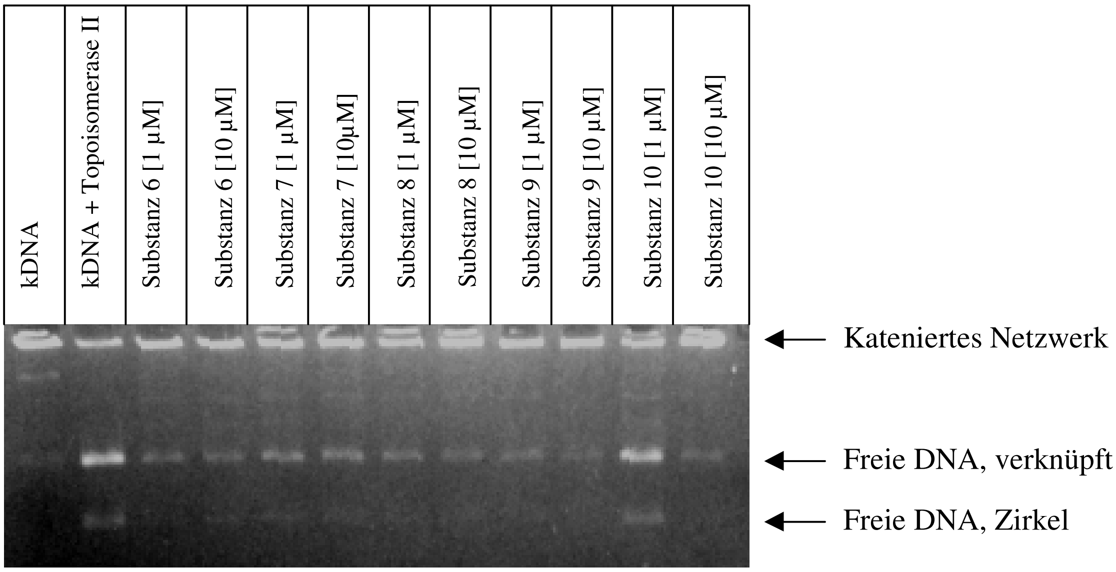


Abbildung 53: Hemmung der Topoisomerase II durch Indolocarbazole im Dekatenierungs-Assay, kDNA wurde für 60 min bei 37°C mit rekombinanter humaner Topoisomerase II inkubiert, die Reaktion durch 5 minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt, die Detektion erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung auf einem 1%igen Agarosegel, gezeigt sind nur Substanzen, die im Vortest hemmende Aktivität unter 100 µM zeigten.

4.4.1.6 Einfluß auf den Zellzyklus und Induktion von Apoptose

Nachdem die Substanzen 4 und 10 sich bei der Untersuchungen der Proteinkinase C als aktivste Substanzen herausgestellt hatten, wurden diese Substanzen auf Apoptose-Induktion und Beeinflussung des Zellzyklus an LXFL529L-Zellen untersucht. LXFL529L-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert und dann mittels Durchflußzytometrie gemessen. Nach 24stündiger Behandlung der Zellen mit Substanz 10 in einer Konzentration von 10µM zeigte sich ein signifikanter Anstieg der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus ohne Erhöhung des Debris-Anteils. Ein Hinweis auf Induktion von Apoptose könnte die Entstehung eines niedrigen Sub-G_2-Peaks sein.
Im Gegensatz dazu ließ sich mit Substanz 4 keine Veränderung des Zellzyklus bei einer Konzentration von 10 µM nachweisen, dafür aber ein starker Anstieg von fragmentierten Zellen unter Ausbildung eines sogenannten Sub-G_1-Peaks in der 2-Parameter-Auswertung, was auf eine Induktion von Apoptose hindeutet.

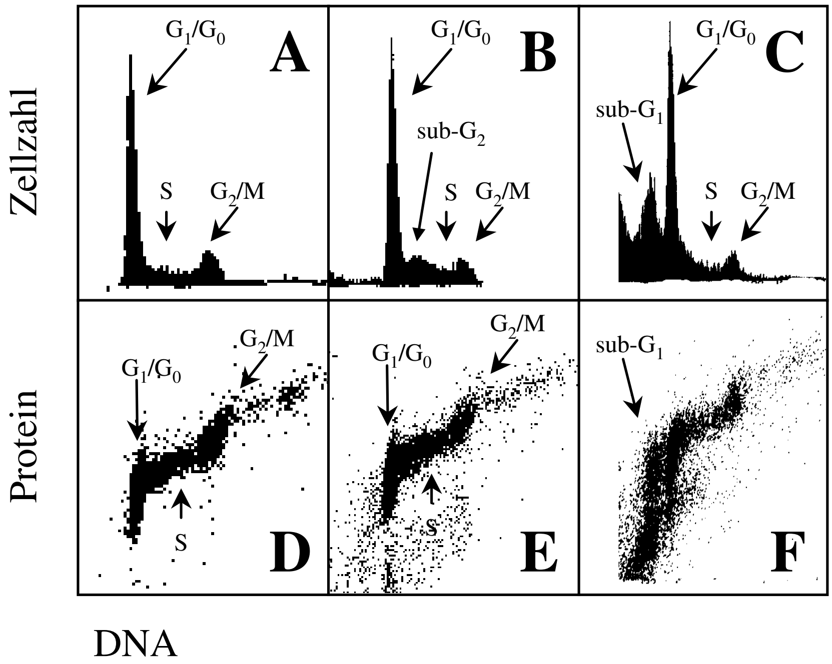


Abbildung 54: Durchflußzytometrische Untersuchung von LXFL529L-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit den Substanzen 4 und 10, A-C Ein-Parameter-Darstellung (DNA gegen Zellzahl), D-F Zwei-Parameter-Darstellung (DNA-Gehalt gegen Proteingehalt), A + D unbehandelte Kontrolle, B + E Substanz 10, [10 µM], C + F Substanz 4, [10 µM].

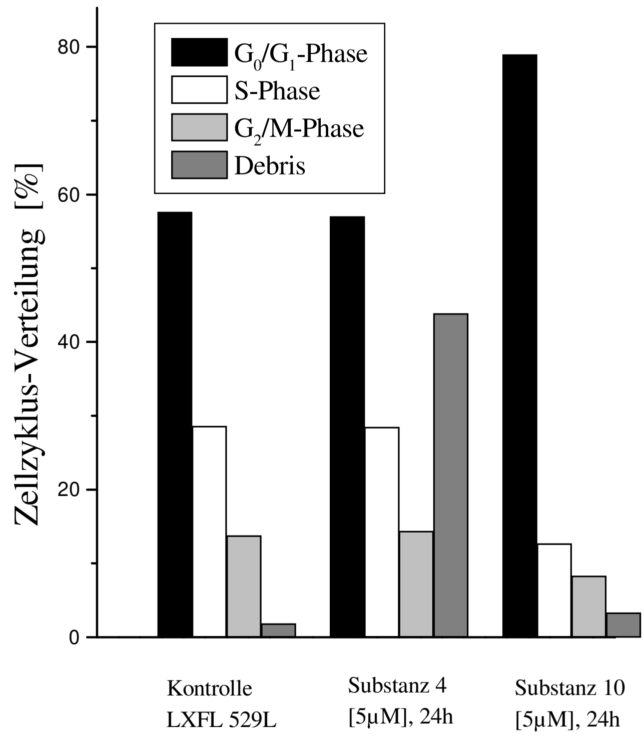


Abbildung 55: Zellzyklusverteilung, Vergleich von Substanz 4 und 10, DAPI/SR101.

Erste durchflußzytometrische Untersuchungen mit den Substanzen 5 und 8 deuteten auf einen Arrest in der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus für die Substanz 5 hin, mit gleichzeitiger Reduktion von Zellen in der G_2/M- und S-Phase. Dabei blieben die Zellen bis zur Konzentration von 10 µM über 24h weitgehend unbeschädigt. Nach 24 Stunden Inkubation von LXFL529L mit Substanz 8 ließ sich ein konzentrationsabhängiger rapider Anstieg der Debris-Zellen beobachten, was auf eine starke Schädigung der Zellen hindeutet. Gleichzeit stieg der Anteil der G_0/G_1-Zellen mit Abfall der S-und G_2/M-Phase-Zellen. Um klare Aussagen über die Auswirkungen dieser Substanzen machen zu können, müssen die durchflußzytometrischen Test wiederholt und abgesichert werden.

4.4.1.7 Hemmung von cdk1

Alle Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole wurden auf ihre Hemmwirkung an der isolierten cyclinabhängigen Kinase 1 (cdk1) überprüft. Mit IC_{50}-Werten zwischen 0,045 und 9 µM hemmten alle Substanzen die Kinaseaktivität. Auch in diesem Testsystem stellte sich Substanz 4 als bester Hemmstoff heraus. Substanz 8 und 13 zeigten die schlechteste Hemmwirkung.

Tabelle 14: Inhibierung der cyclinabhängigen Kinase 1 durch Indolocarbazole

Substanz	cdk1-Hemmung, IC_{50}
1	0,21
2	0,7
3	0,12
4	0,045
5	0,15
6	0,35
7	0,42
8	7
9	0,3
10	0,21
11	1,2
12	0,8
13	9

4.4.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.4

Alle Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole mit Ausnahme von Substanz 1 und 11 hemmten das Wachstum der humanen Tumorzellinie LXFL529L im niedrigen mikromolaren Bereich, wobei Substanz 4 am effektivsten wirkte. Mit Ausnahme der Substanz 4, die im Kern akkumulierte, waren alle Substanzen nach 4 h Inkubationszeit hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Keine der untersuchten Substanzen war in der Lage, den Interkalator Ethidiumbromid aus doppelsträngiger DNA zu verdrängen. Mit Ausnahme von Substanz 13 zeigten jedoch alle Substanzen eine effektive Konkurrenz mit dem Hoechst-Farbstoff H33258, was auf eine erhöhte Affinität der Substanzen zur kleinen Furche der DNA hindeutet.

Bei Untersuchungen zur Hemmung der Topoisomerase I zeigte die Substanz 5 einen MIC-Wert von 0,1 µM und stellt damit in dieser Serie den wirkungsvollsten Topoisomerase I-Hemmstoff dar. Bei diesen Konzentrationen war jedoch keine Induktion von Strangbrüchen zu beobachten.

Die Substanzen 6, 7, 8, und 9 zeigten eine gute Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität bei einem MIC-Wert von 1 µM.

Alle Substanzen mit Ausnahme von 1 und 11 hemmten die Proteinkinase C im Zell-Lysat, während die intrazelluläre PKC nur von den Substanzen 4 und 10 wirkungsvoll inhibiert werden konnte.

Alle Substanzen hemmten die cdk1 mit IC_{50}-Werten unter 10 µM.

5 Diskussion

5.1 Alkaloide

5.1.1 Lycorin

Lycorin, ein Alkaloid aus der Familie der *Amaryllidaceae*, ist bekannt für inhibitorische Effekte an pflanzlichen und tierischen Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte die wachstumshemmende Wirkung der Substanz an humanen Tumorzellinien ebenso wie ein Zellzyklus-Arrest in der G_2/M-Phase nach 72 h Inkubation nachgewiesen werden.

Ghosal et al. (1988) führten die biologische Aktivität von Lycorin auf die, unter bestimmten oxidativen Bedingungen stattfindende, *in situ* Metabolisierung zu Lycobetain zurück. In der Pflanze findet diese Reaktion unter physiologischen Bedingungen statt. Vergleichende Untersuchungen der beiden isolierten Substanzen zeigten für Lycobetain signifikante Hemmung des Wachstums und der Proliferation von S-180 Tumorzellen, während für Lycorin kein Effekt zu beobachten war. Diese Beobachtung läßt sich auf einige der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen projizieren. Die Untersuchung der wachstumshemmenden Wirkung, der Induktion von DNA-Strangbrüchen, sowie der Veränderungen am Zellzyklus und der Induktion von Apoptose erfolgten im zellulären System. In der Zelle liegen einige Enzyme vor, die Oxidationsreaktionen katalysieren können. Die Umsetzung von Lycorin zu Lycobetain ist in der Zelle also theoretisch möglich. Lycobetain und Lycorin zeigten ähnliche wachstumshemmende Wirkung und arretierten beide den Zellzyklus in der G_2/M-Phase, was als Hinweis auf eine Metabolisierungsreaktion von Lycorin zu Lycobetain dienen könnte. Dagegen spricht, daß nach Inkubation mit Lycorin, im Gegensatz zu Lycobetain, keine DNA-Strangbrüche detektiert werden konnten und kein Anhaltspunkt für die Induktion von Apoptose vorliegt.

In anderen Literaturstellen wird die Möglichkeit der Metabolisierung von Lycorin außer acht gelassen. Die häufig beschriebene Hemmung der Proteinbiosynthese könnte als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen dienen, war aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.1.2 Lycobetain

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von LXFL529L-Zellen nach Inkubation mit Lycobetain zeigten, daß die Substanz ausschließlich im Zellkern akkumuliert. Dies läßt auf Zielstrukturen im Zellkern, vornehmlich die DNA und DNA-modifizierende Enzyme, schließen.

Lycobetain konkurrierte mit Ethidiumbromid und dem Hoechst-Farbstoff H33258 um Bindungsstellen an der DNA. Viele Topoisomerase-Hemmstoffe sind DNA-Interkalatoren [Pommier et al., 1987; Corbett und Osheroff, 1993] und wirken dadurch, daß sie Konformationsänderungen an der DNA erzeugen. Liganden der kleinen Furche der DNA wie Distamycin A, Netropsin und Bisbenzimidazol-Farbstoffe hemmen die katalytische Aktivität von Topoisomerase I und II [Chen, 1993; Zhao, 1997]. Für Phenanthridinalkaloide wie Coralyn, Nitidin und Fagaronin ist eine Hemmung von Topoisomerase I und II beschrieben [Wang et al., 1993; Wang et al, 1996; Makhey et al., 1996; Larsen et al., 1993].

In der vorliegenden Arbeit konnte für das Phenanthridinalkaloid Lycobetain die Inhibierung von Topoisomerase I nachgewiesen werden. Im DNA-Mobility-Shift Assay sowie im Immunoband-Depletion Assay konnte gezeigt werden, daß Lycobetain die Topoisomerase I durch Stabilisierung des kovalenten DNA-Topoisomerase I Komplexes hemmt. Dieser Mechanismus ist bereits für das Alkaloid Camptothecin beschrieben [Hsiang et al.,1985; Hertzberg, 1989]. Dabei lagert sich die Substanz an den Komplex von Topoisomerase I und DNA und verhindert so die Religation der DNA zu einem intakten Strang. Der stabilisierte Komplex blockiert die Fortbewegung der Replikationsgabel, arretiert die DNA-Replikation und führt zu DNA Strangbrüchen und schließlich zum apoptotischen Zelltod [Hsiang, 1989]. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde in dieser Arbeit nach 3h Inkubation mit Lycobetain untersucht, da nach dieser kurzen Zeitspanne für diese Substanz noch keine Strangbrüche durch Apoptose-Induktion zu erwarten sind. Dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen konnten mittels Einzelzellgelelektrophorese detektiert werden.

Desweiteren konnte für Lycobetain auch die Hemmung von Topoisomerase II nachgewiesen werden. Der Mechanismus der Stabilisierung des Intermediates ist für Topoisomerase II-Inhibitoren bekannt, wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft.

Für die meisten Topoisomerase I und II Hemmstoffe ist die Induktion von Apoptose beschrieben. Mikroskopische Untersuchungen der Zellmorphologie von LXFL529L-Zellen nach 24h Inkubation mit 5 µM Lycobetain zeigten typische Merkmale apoptotischer Zellen wie Schrumpfung des Zytoplasmas und Fragmentierung des Zellkerns. Auch die durchflußzytometrischen Studien deuteten auf Induktion von Apoptose hin. Der Anteil der Debris-Zellen, d.h. der Zellen mit kondensierter bzw. geschädigter DNA stieg an. Ein für Apoptose typischer „Sub-G_1“ bzw. „Sub-G_2“-Peak konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zum sicheren Beweis einer Induktion von Apoptose müßten demnach weitere Tests, wie zum Beispiel Agarosegelelektrophorese zum Nachweis internukleosomaler DNA-Fragmente, die bei apoptotischen Zellen im Entstehen einer typischen DNA-Leiter resultieren.

Durch die Schäden an der DNA kommt es nach Inkubation von Zellen mit Topoisomerase-Inhibitoren meistens zu einem G_2/M-Arrest, der der Reparatur der DNA vor dem Eintritt in die Mitosephase dienen soll [d´Arpa und Liu, 1989].

Ein Arrest der Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus konnte für Lycobetain mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigte Lycobetain typische Merkmale von Topoisomerase-Hemmstoffen und scheint somit ein neuer wirkungsvoller Inhibitor von Topoisomerasen zu sein.

5.2 Flavonoide

5.2.1 Baicalin

Baicalin hemmte im Sulforhodamin B-Assay das Wachstum von mehreren humanen Leukämiezellinien sowie einer Lungentumorzellinie. Hinweise auf Induktion von Apoptose gaben morphologische Untersuchungen nach 24h und durchflußzytometrische Messungen nach 72h Inkubation von LXFL529L-Zellen. Die typischen Apoptose-Peaks konnten in der zweidimensionalen Darstellung nicht detektiert werden, so daß auch hier weiterführende Untersuchungen unerläßlich scheinen. Bei der Zellzyklusanalyse ließ sich ein Arrest der Zellen in der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus beobachten, im Gegensatz zum Aglykon Baicalein, welches einen Arrest in der G_2/M-Phase auslöst.
Da die Wachstumshemmung des glukuronidierten Flavons Baicalin sehr gut mit den Werten von Baicalein korreliert, könnte eine intrazelluläre Abspaltung des Glukuronylrestes diskutiert werden. Dieser Mechanismus wurde bereits in Säugern gezeigt [Hackett, 1986]. Metabolisch ist auch die umgekehrte Reaktion der Glukuronidierung von Baicalein als Phase II-Reaktion möglich. Bei der Inkubation von Baicalein im zellulären System könnte also eine Metabolisierung zu Baicalin stattfinden.
Die Wirkung der beiden Substanzen unterscheidet sich jedoch in zellulären Tests und bei Untersuchungen an isolierten Enzymen. Baicalin bewirkt nicht wie Baicalein die Induktion von DNA-Strangbrüchen und hat auch keinen Einfluß auf die Aktivität von Topoisomerasen. Die beiden Substanzen scheinen also unterschiedliche Wirkmechanismen zu besitzen, was sich auch an der unterschiedlichen Zellzyklusverteilung nach Substanzinkubation zeigt. Möglicherweise kann die Frage nach der metabolischen Umsetzung der beiden Substanzen durch HPLC-Untersuchungen nach Substanzinkubation von Zellen beantwortet werden.
Derzeit ist kein Wirkmechanismus bekannt, der für die wachstumshemmende Wirkung von Baicalin verantwortlich gemacht werden könnte.

5.2.2 Baicalein

Flavone und ihre Derivate haben zum Teil sehr vielseitige Wirkmechanismen. Für Baicalein wurde bereits die Hemmung von reverser Transkriptase und DNA-Polymerase beschrieben, [Austin et al., 1992] sowie die Hemmung von Protein-Tyrosinkinasen und isolierter Proteinkinase C [Huang 1994]. In einer weiteren Studie wurde die Topoisomerase II-Inhibierung durch Stabilisierung des Cleavable-Complex gezeigt [Austin et al., 1992].
Die Beeinflussung der isolierten Proteinkinase C wurde in dieser Arbeit am isolierten Enzym sowie in der Zellkultur untersucht, eine Hemmung der Enzymaktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach Austin et al., 1992, gibt es strukturelle Mindestanforderungen für Flavone, die eine Hemmung der Topoisomerase II bewirken. Dabei wird eine Hydroxysubstitution an C-5 und C-7 sowie an C-3´und C-4´ verlangt, die Reste an C-3, C-6 und C-5´sind variabel (Abbildung 56).

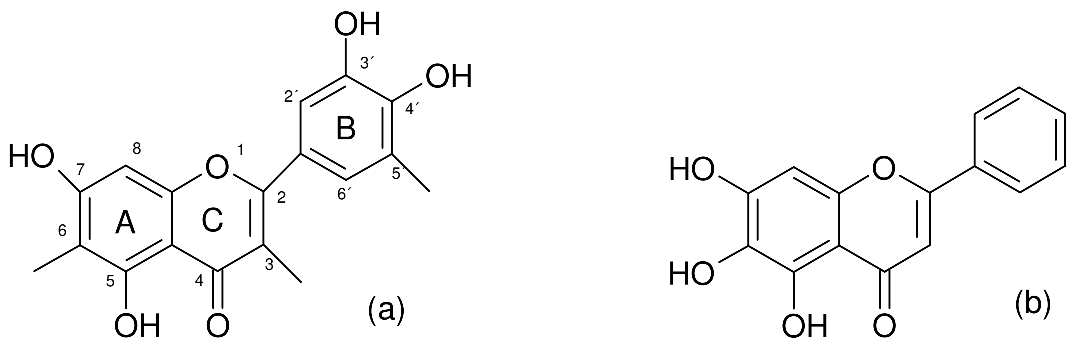


Abbildung 56: Mindestanforderungen an die Flavonstruktur für Topoisomerase II Hemmstoffe [Austin et al., 1992] (a) im Vergleich zur Struktur von Baicalein (b)

Constatinou et al. forderten 1995 für Flavonoide mit Topoisomerase I und II Inhibierung OH-Substitutionen an C-3 und C-7 sowie an C-3´und C-4´. Zudem scheint die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 für die hemmende Wirkung an den Topoisomerasen essentiell zu sein, was für eine Flavonstruktur spricht. Boege et al. (1996) fanden, daß Topoisomerase I nur durch Flavone, nicht durch Chalkone, Flavanone und Isoflavone gehemmt werden kann. Die Fähigkeit zur Ausbildung eines planaren konjugierten A-C Ringsystems muß gegeben sein. Boege et al. zeigten außerdem, daß die Hemmung der Topoisomerase I durch Flavone auf verschiedenen Wegen erfolgen kann. Flavone stabilisieren entweder das DNA-Topoisomerase-Intermediat oder hemmen die Bindung des freien Enzyms an die DNA. Substanzen wie Quercetin, die das Intermediat stabilisieren, sollten Hydroxygruppen an C-5 und C-7 besitzen, sowie eine –OH oder –OCH_3- Gruppe an C-4´. Ohne diese Elemente wären die Substanzen inaktiv.

Baicalein besitzt Hydroxysubstitutionen an C-5 und C-7 sowie die Doppelbindung zwischen C-3 und C-2, ist am B-Ring allerdings völlig unsubstituiert. Eine Hydroxygruppe an C-6 scheint ein zusätzlicher positiver Faktor für die Topoisomerase-Hemmung zu sein. Somit sind mehrere Anforderungen für einen potentiellen Topoisomerase Inhibitor erfüllt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Baicalein sowohl Topoisomerase I als auch Topoisomerase II hemmt. Mechanistische Untersuchungen zeigten, daß die Hemmung von Topoisomerase I über die Stabilisierung des Cleavable-Complex erfolgt.

Damit einhergehende Strangbrüche konnten ebenfalls mittels Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden. Der relativ hohe Wert für die minimal effektive Konzentration (MC-Wert = 50µM) könnte sich möglicherweise aus der fehlenden B-Ring Substitution an C-4´ erklären. Topoisomerase Inhibitoren nehmen Einfluß auf den Zellzyklus, da die Zellen meistens nach Inkubation mit Topoisomerase-Inhibitoren in der G_2-Phase arretieren, um mögliche

DNA-Reparaturen durchzuführen. Längerer Arrest in G_2 führt zur Induktion von Apoptose [d´Arpa und Liu, 1989]. Nach 72h Inkubation von LXFL529L-Zellen mit Baicalein zeigte sich ein deutlicher Arrest in der G_2/M-Phase des Zellzyklus. Die Durchflußzytometrie zeigte gleichzeitig die Induktion von Apoptose aus der G_1-und der G_2-Phase mit den typischen Sub-G_1- und Sub-G_2-Peaks. Durch morphologische Studien konnten ebenfalls apoptotische Merkmale nachgewiesen werden.
Zusammenfassend kann Baicalein als potenter Topoisomerase I und II Hemmstoff gewertet werden, wobei dieser Mechanismus nicht die einzige Wirkung der Substanz darzustellen scheint. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, daß auch die Hemmung von Proteintyrosinkinasen, insbesondere des EGF-Rezeptors, einen vielversprechenden Wirkmechanismus der Substanz darstellt.

5.2.3 Skullcapflavon II

Skullcapflavon II zeigte an zwei humanen Leukämie-Zellinien und einer großzelligen Lungentumorzellinie eine gute Hemmung des Zellwachstums. Strukturell trägt die Substanz Methoxy-Substitutionen an C-6, C-7, C-8, an Position C-5 befindet sich eine Hydroxygruppe. Am B-Ring befinden sich an C-2´ eine Hydroxygruppe und an C-6´eine Methoxygruppe. Durch die Vielzahl der Methoxygruppen ähnelt Skullcapflavon eher den von Boege et al. (1996) beschriebenen synthetischen Flavonen, die die Bindung der Topoisomerase I an die DNA verhindern. Skullcapflavon II hemmte in der vorliegenden Arbeit Topoisomerase I ab Konzentrationen von 100 µM. Eine Stabilisierung des DNA-Topoisomerase Intermediates war nicht nachweisbar. Es ist also anzunehmen, daß tatsächlich ein anderer Wirkmechanismus zugrunde liegt. Zusätzlich konnten keine für den DNA-Topoisomerase-Komplex typischen Strangbrüche nachgewiesen werden, was diese These unterstützt.
Da die MIC-Werte bei der Topoisomerase-Inhibierung aber weit über den IC_{50}-Werten in der Wachstumsinhibierung liegen, scheidet die Hemmung der Topoisomerase als primäres Zielprotein wahrscheinlich aus und es müssen andere zelluläre Angriffspunkte für die Substanz gefunden werden. Die Untersuchungen auf Apoptose-Induktion sowie auf Veränderungen des Zellzyklus brachten kein klares Ergebnis.

5.2.4 Wogonin und Wogonosid

Wogonosid ist das Glukuronid des Wogonins. Analog zu Baicalin und Baicalein zeigte das Aglykon Wogonin eine bessere wachstumshemmende Wirkung als Wogonosid, welches nahezu inaktiv ist. Der Wirkmechanismus von Wogonin konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Aufgrund einer nur geringfügigen Hemmung von Topoisomerase I und II können diese Enzyme als primäres Target außer acht gelassen werden. Als erste Hinweise für die Hemmwirkung von Wogonin am isolierten Enzym dienen Messungen zur Inhibierung von cdk1. Veränderung des Zellzyklus konnten jedoch nach Inkubation mit Wogonin nicht beobachtet werden.

5.2.5 Zusammenfassung von 5.2

Von den untersuchten Flavonen konnte nur für Baicalein ein potentieller Wirkmechanismus aufgestellt werden. Baicalein ist ein potenter Inhibitor für Topoisomerase I und II, während das Glukuronid Baicalin einen anderen, bislang nicht geklärten Wirkmechanismus hat. Für Skullcapflavon, Wogonin und Wogonosid konnten keine potentiellen Targets gefunden werden.

5.3 Bisindole

5.3.1 Indigoide Bisindole

Alle untersuchten Bisindole zeigten in unterschiedlichem Maße Wachstumshemmung an fünf humanen Leukämiezellinien, einer Mammakarzinom- und einer Lungentumorzellinie. Indirubin, 5-Jodindirubin und Isoindigo interagierten im Ethidiumbromidassay und im Hoechst H33258-Assay mit Doppelstrang-DNA. Im Vergleich mit den Positivkontrollen Actinomycin D, Netropsin und Distamycin A war die Wirkung in den einzelnen Tests jedoch schwach. Actinomycin D interkaliert in die Doppelstrang-DNA mit einem C_{50}–Wert von 1,4 µM; im Vergleich dazu liegt der geschätzte C_{50}-Wert für Indirubin mit ca. 60 µM ungefähr 40mal höher.
Indirubin, 5-Jodindirubin und 2-(2´-Bisindolyl)indol hemmten außerdem die Tubulin-Polymerisation *in vitro*. Im Mikrotubuli-Polymerisationsassay lag der IC_{50}-Wert von Indirubin, der wirksamsten Substanz, bei 31 µM. Im Vergleich zur eingesetzten Positivkontrolle Colchicin mit einem IC_{50}-Wert von 3,3 µM liegen die gemessenen Werte um ca. Faktor 10 schlechter. Die Vorinkubation der Substanzen mit GSH sollte Hinweise liefern, ob die Polymerisationshemmung der Bisindole mit ihrer SH-Reaktivität korreliert. Glutathion liegt in Säugerzellen sowohl in reduzierter (GSH) als auch in oxidierter (GSSG) Form vor. Das Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG ist wichtig für den Redoxstatus der lebenden Zelle und dient dem Schutz thiolhaltiger Enzyme vor oxidativer Inaktivierung. Eine weitere wichtige Funktion des Glutathions ist die Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe durch Glutathionkonjugation.
In der Zelle übt GSH unter anderem eine Schutzfunktion für die Mikrotubuliproteine vor substanzinduzierten Schäden aus. Der durchgeführte Test kann lediglich Anhaltspunkte dafür geben, ob die Substanz durch ihre Struktur Wechselwirkungen mit Thiolgruppen eingehen kann. Um fundierte Aussagen über die Wechselwirkung mit SH-Gruppen treffen zu können

müßten daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden wie zum Beispiel die Ellman-Methode zur Bestimmung freier Thiolgruppen oder die Tietze-Bestimmung zur Determinierung des Gesamtgehaltes an GSH und GSSG nach Inkubation von Substanz und GSH.
GSH greift als Nukleophil u.a. an α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen an, eine Struktureinheit, die in den indigoiden Bisindole vorliegt. Die Vorinkubation von Indirubin und 5-Jod-Indirubin mit GSH bewirkte eine Aufhebung der Polymerisationshemmung, weshalb eine kovalente Bindung der Substanzen an Thiol-Gruppen diskutiert werden kann. Die Vorinkubation führt zu einer Reaktion der Substanzen mit den Thiolgruppen des GSH, wodurch die für eine Polymerisation essentiellen Thiolgruppen im Tubulinmolekül nicht mehr oder nur noch begrenzt reagieren. Dies würde den Schluß zulassen, daß die Substanzen durch eine Reaktion mit den SH-Gruppen des Tubulinmoleküls eine Polymerisationhemmung hervorrufen. Möglicherweise sind an dieser Reaktion auch mikrotubuli-assoziierte Proteine beteiligt, was in dieser Arbeit allerdings nicht geklärt werden konnte.
Eine andere Alternative wäre eine mögliche Redoxreaktion zwischen Wirkstoff und GSH, was die Reaktion des Bisindols mit den Mikrotubuliproteinen beeinträchtigen könnte.
Untersuchungen zur Inhibierung von Zellzykluskinasen weisen darauf hin, daß es sich bei der vorliegenden Stoffklasse um potente Hemmstoffe von cyclinabhängigen Kinasen handelt. Dabei wurden die Messungen am isolierten Enzym durchgeführt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das zelluläre System muß noch überprüft werden.
Western-Blot-Untersuchungen haben gezeigt, daß die Zellzykluskinase cdk5 ein Bestandteil der hier eingesetzten Mikrotubuli-Präparation ist. Da die cdk5 an den mikrotubuli-assozierten tau-Proteinen assoziiert ist, kann eine Interaktion der Bisindole mit cdk5 im *in vitro* Polymerisationsassay nicht ausgeschlossen werden. Die Hemmung der cdk5 könnte die Phosphorylierung der mikrotubuli-stabilisiernden tau-Proteine beeinträchtigen und damit neben der SH-Reaktivität der Substanzen ebenfalls ein Mechanismus sein, der die Polymerisationsfähigkeit der Tubulin-Untereinheiten behindert.

5.3.2 Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide

Für eine Reihe von Indolocarbazolen ist eine Antitumorwirkung beschrieben. Diese wird unter anderem durch Hemmung der Proteinkinase C oder durch die Hemmung der Topoisomeraseaktivität bewirkt. Unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen bestimmen die Selektivität der Substanz für ein bestimmtes Zielprotein. Die Anforderungen an PKC und Topoisomerase-Hemmstoffe unterscheiden sich dabei deutlich. Die Topoisomerase-Hemmstoffe, (Derivate von Rebeccamycin) unterscheiden sich dabei von den PKC-Inhibitoren (Derivate von Staurosporin) durch die Bindung des Glykosylrestes an nur einen der beiden Indolstickstoffe, während bei den PKC-Hemmstoffen der Zuckerrest an beide Indolstickstoffe gebunden ist [Moreau et al., 1998]. Der Zuckerrest am Molekül scheint für Topoisomerase- und Proteinkinase C-Hemmung essentiell zu sein [Fabre et al., 1994; Bailly et al., 1997]. Rebeccamycinderivate, die entweder am Maleimid, am Indolring oder am Zucker modifiziert waren, zeigten

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide. Die Substanzen wurden nach Strukturmerkmalen sortiert, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich zu machen. 1-3 = Bisindolylmaleimide, 4-13 = Indolocarbazole, Azyklo = offenkettiger Zucker, gemeinsame Strukturmerkmale sind fett gedruckt

Sub- stanz	Substituenten an R1, R2 und X		SRB IC_{50}[µM]	PKC Zellkultur IC_{50}[µM]	PKC isoliert IC_{50}[µM]	TopoI Hem- mung MIC [µM]	TopoII Hem- mung MIC [µM]	Hoechst- Komp. C_{50} [µM]	Induktion von Strangbrü- chen MC [µM]	Cdk1 Hemmung IC_{50}[µM]
11	X R2 R1	**O** CH_3 Xyl	> 50	>50	>50	10	n.n.	7 ± 0,1	50	1,2
1	X R2 R1	**O** CH_3 Ara	41 ± 4	>50	>50	n.n.	n.n.	18 ± 2	50	0,21
2	X R2 R1	NH CH_3 Ara	6 ± 1	33 ± 3	0,7 ± 0,1	n.n.	n.n.	20 ± 2	100	0,7
3	X R2 R1	NH H Xyl	22 ± 3	>50	2 ± 0,6	n.n.	n.n.	19 ± 0,3	n.n.	0,12
4	X R2 R1	**NH** **H** Ara	0,1 ± 0,03	3,4 ± 1,5	4 ± 2	100	n.n.	0,7 ± 0,1	<10	0,045
7	X R2 R1	**NH** **H** Xyl	3 ± 1	>50	4 ± 0,1	10	1	1 ± 0,1	50	0,42
8	X R2 R1	**NH** **H** Rib	1 ± 0,3	>50	3 ± 0,01	n.n.	1	0,9 ± 0,1	10	7
12	X R2 R1	**NH** **H** Gal	9 ± 2	>50	35 ± 0,5	10	n.n.	0,5 ± 0,1	50	0,8
6	X R2 R1	**NH** $\mathbf{CH_3}$ Ara	2 ± 0,4	>50	8 ± 0,2	10	1	3 ± 0,3	50	0,35
5	X R2 R1	**NH** $\mathbf{CH_3}$ Xyl	3 ± 1	31 ± 3,5	4 ± 0,2	0,1-1	n.n.	4 ± 1,5	50	0,15
10	X R2 R1	**NH** $\mathbf{CH_3}$ Rib	3 ± 0,3	3 ± 0,1	0,4 ± 0,5	n.n.	10	3 ± 0,4	50	0,21
9	X R2 R1	**NH** $\mathbf{CH_3}$ Gal	6 ± 1	>50	12 ± 0,3	n.n.	1	2 ± 1	50	0,3
13	X R2 R1	**NH** $\mathbf{CH_3}$ Azy- klo	3 ± 0,2	>50	3 ± 0,4	10	n.n.	>20	50	9

deutliche Unterschiede in ihrer inhibitorischen Aktivität. Eine Methyl-Substitution am Imid bewirkte eine Verringerung der PKC-Inhibierung, ohne den Einfluß auf die Topoisomerase zu verändern. ß-N-Glykoside waren durch verbesserte Interkalationsfähigkeit wirksamere Topoisomerase I-Inhibitoren. Dechlorierte Rebeccamycinderivate mit Methylrest am Imid waren 10mal bessere Topoisomerase-Hemmstoffe als natürliches Rebeccamycin [Bailly et al., 1997; Anizon, 1997].

Die von der Arbeitsgruppe von Melnik synthetisierten Indolocarbazole variierten in den Zuckerresten am Indolstickstoff, wobei β-D-Ribose, β-D-Xylose, β-D-Galactose sowie α-L-Arabinose verwendet wurde. Eine weitere Variation war der Austausch der –NH-Gruppe im Maleimidring gegen ein Sauerstoffatom. Am R2 stand entweder eine Methylgruppe oder ein Wasserstoffatom.
In Tabelle 15 sind die Ergebnisse aller Untersuchungen mit den Indolocarbazolen und Bisindolylmaleimiden noch einmal als Übersicht aufgelistet.

5.3.2.1 Wachstumshemmende Wirkung

Untersuchungen der Substanzen im Sulforhodamin B-Assay zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Beim Strukturvergleich stellte sich heraus, daß Substanz 4 mit α-L-Arabinose, einer -NH-Gruppe am Imid und einer Methylgruppe an R2 die höchste wachstumshemmende Wirkung zeigte.

Ein Sauerstoffatom Position X scheint im Gegensatz zu einer NH-Gruppe die wachstumshemmende Aktivität der Substanz stark herabzusetzen. In Bezug auf die Methylsubstitution an R2 ist keine klare Tendenz erkennbar. Das Glykosid an R1 scheint ebenfalls eine wichtige Rolle für die wachstumshemmende Wirkung der Substanzen zu spielen. Dabei wirken Indolocarbazole insgesamt besser als Bisindolylmaleimide.

5.3.2.2 Hemmung von Topoisomerase I und II

Bei der Untersuchung der Topoisomerase-Hemmung waren keine einheitlichen Ergebnisse zu beobachten. Einige Substanzen hemmten ausschließlich Topoisomerase I oder II, während andere beide Enzyme hemmen konnten. Für die Substanzen 1-3 konnte keine Topoisomerase-Hemmung nachgewiesen werden.

Hemmung von Topoisomerase I

Topoisomerase I wurde von sechs Substanzen im niedrig mikromolaren Bereich (0,1- 10 µM) gehemmt, wovon drei einen Xylose-Rest an R1 aufwiesen. Weiterhin ließ sich beobachten, daß sowohl Moleküle mit Wasserstoff als auch mit einer Methylgruppe an R2 die Aktivität der Topoisomerase I beeinflußten. Bei den mit Arabinose (4) und Xylose (7) substituierten Indolocarbazolen zeigte sich eine zehnfache Verbesserung der Topo I Hemmung durch Einführung eines Methylrestes an R2 (6 und5). Bei den Galactopyranosylen wurde die Topo I

Hemmung durch Einführung des Methylrestes vollständig unterdrückt (12 und 9). Ein Austausch der NH-Gruppe am Imid gegen ein Sauerstoffatom bewirkte die Abnahme der inhibitorischen Aktivität.

Hemmung von Topoisomerase II

Bei den Hemmstoffen der Topoisomerase II konnten ebenfalls keine einheitlichen strukturellen Anforderungen festgestellt werden. Die Substitution an R2 scheint jedoch eine wichtige Rolle zu spielen. Die Einführung der Methylgruppe verschlechterte oder verbesserte die Topoisomerase-Hemmung, anscheinend abhängig von der Kombination mit verschiedenen Zukkern. Bei Xylose und Ribose verschlechterte die Methylgruppe die Hemmwirkung, während bei Arabinose und Galactose eine Verbesserung auftrat.

Induktion von DNA-Strangbrüchen:

Da Topoisomerase-Inhibitoren oft für die Induktion von DNA-Strangbrüchen verantwortlich sind, wurde die Induktion der Strangbrüche nach Inkubation von HL60 Zellen mit den entsprechenden Substanzen überprüft. Dieser Test wurde im Gegensatz zur isolierten Topoisomerase im zellulären System durchgeführt, wo auch die Aufnahmefähigkeit der Substanz in die Zelle insbesondere in den Zellkern eine Rolle spielt. Von den Topoisomerase-Inhibitoren war nur Substanz 8 in der Lage, Strangbrüche in niedriger Konzentration zu induzieren. Dabei stimmten die Werte für die Wachstumshemmung, die Topoisomerase Hemmung und die Induktion von Strangbrüchen überein. Substanz 8 ist also als potentieller Topoisomerase II-Inhibitor zu beurteilen, wenngleich auch keine Interkalation festgestellt werden konnte.

Substanz 4 bewirkte ebenfalls die Induktion von Strangbrüche in der DNA, konnte aber nicht als guter Topoisomerasehemmstoff eingeordnet werden. Für diese Substanz wurde allerdings gefunden, daß sie im Gegensatz zu den anderen Vertretern in den Zellkern aufgenommen wird. Die Kompetition mit Hoechst H33258 deutet darauf hin, daß eventuell die Anlagerung an die kleine Furche der DNA zu Strangbrüchen führen könnte.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der Topoisomerase I Hemmung unterscheiden sich grundlegend von denen der Topoisomerase II, was darauf hindeutet, daß Topo I und Topo II-Hemmstoffe unterschiedlichen strukturellen Anforderungen unterliegen. Ein Beweis dafür könnte sein, daß Strukturanforderungen, die für Topoisomerase I-Hemmung essentiell scheinen (Methylrest, Xylose) bei Topoisomerase II keinen Effekt hervorrufen.

Topoisomerase II kann als potentielles Target für Substanz 8 diskutiert werden.

5.3.2.3 Interaktion mit Doppelstrang-DNA

Keine der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zeigte die Fähigkeit zur Verdrängung von Ethidiumbromid bis zu Konzentrationen von 100 µM, während die meisten Substanzen in der

Lage waren, mit dem Hoechst-Farbstoff H33258 um die Bindung an die kleine Furche der DNA zu konkurrieren. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Indolocarbazolen und Bisindolylmaleimiden. Letztere zeigten eine deutlich geringere Affinität zur kleinen Furche als Indolocarbazole, was sich durch größere Planarität und Starrheit des Indolocarbazolgerüstes erklären läßt.

Für alle Substanzen mit Wasserstoffsubstitution an R2 konnte eine bessere Verdrängung von Hoechst H33258 nachgewiesen werden als für methylsubstituierte Substanzen. Vergleicht man die Substanzen mit Methylrest an R2 mit dem strukturgleichen Indolocarbazol mit offenkettigem Zuckerrest, zeigt sich, daß der Ringschluß des Zuckers wahrscheinlich eine große Bedeutung für die Anlagerung an die DNA hat.

5.3.2.4 Proteinkinase C

Frühere Studien zur Expression der verschiedenen PKC-Isoenzyme in der Zellinie LXFL529L zeigten, daß LXFL529L die Isoenzyme α im Zytosol, ζ in Zytosol, Membran und Zellkern sowie ι in der Membran- und in der nukleären Fraktion exprimiert. Die höchste PKC-Aktivität befand sich mit über 70% in der zytosolischen Fraktion [Dickmann, 1996]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die zytosolische Fraktion auf ihre Hemmbarkeit untersucht.

Untersuchung von isolierter PKC:

Mit Ausnahme der beiden Substanzen 1 und 11 waren alle Substanzen in der Lage, isolierte PKC in niedrigen mikromolaren Konzentrationen zu hemmen. β-D-Galactoside zeigten dabei eindeutig die niedrigste inhibitorische Aktivität, während β-D-Riboside eine besonders gute Hemmung zeigten. Am isolierten Enzym zeigte sich im Vergleich von Bisindolylmaleimiden und Indolocarbazolen, daß beide Strukturen wirksam sind, aber die Bisindolylmaleimide deutlich besser wirkten. Die Variation der R2 Substitution zeigten keine eindeutige Tendenz. Bei Arabinose an R1 führte die Einführung des Methylrestes zu einer Verschlechterung der PKC-Hemmung, bei Xylose ließ sich kein Unterschied erkennen und bei Ribose und Galactose wurde die Wirkung durch Entfernung des Methylrestes verschlechtert.

Untersuchungen an intrazellulärer PKC:

Nach Inkubation in der Zellkultur waren lediglich die Substanzen 4 und 10 in der Lage, die Proteinkinase C wirkungsvoll zu hemmen. Zunächst könnte man zu dem Schluß gelangen, daß bei allen anderen Substanzen Probleme bei der Passage der Zellmembran auftreten, aber da die meisten der untersuchten Substanzen sich im SRB-Zytotoxizitätstest als potente Wachstumshemmstoffe zeigten, ist diese Möglichkeit auszuschließen. Auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß die Substanzen in die Zelle aufgenommen werden können. Dabei waren alle Substanzen außer Substanz 4 im Zytosol lokalisiert, während Substanz 4 hauptsächlich im Zellkern akkumulierte. Eine mögliche Erklärung für die Verringerung der Hemmwirkung im zellulären System könnte sein, daß die Substanz ihr Zielprotein in der Zelle vermutlich nicht erreichen kann. Auffällig ist, daß Substanz 10 sich durch Ersetzen der Ribose durch Xylose sowohl am isolierten Enzym als auch in der Zellkultur um Faktor 10 verschlechterte.

Substanz 4 und 10 zeigen beide das Grundgerüst der Indolocarbazole mit einer NH-Substitution an der Position X. Die Reste an den Indolringen unterscheiden sich jedoch. Substanz 4 ist an R1 mit einem Arabinosyl- und Substanz 10 mit einem Ribosylrest substituiert. An R2 hat Substanz 4 ein Wasserstoffatom während Substanz 10 mit einer Methylgruppe substituiert ist. Die Kombination des Zuckers mit den Resten an R2 scheint also für die Hemmung der Proteinkinase C von Bedeutung zu sein.

Zusammenfassung:

Im Vergleich der Messungen am isolierten Enzym mit den Messungen nach Inkubation in der Zellkultur zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Allgemein scheint für die Hemmung der PKC das Grundgerüst des Indolocarbazols sowie die NH-Gruppe an Position X von Vorteil zu sein. Die Reste an den Indolringen scheinen isoliert betrachtet nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben, deren Kombination jedoch für die Hemmwirkung wichtig zu sein scheint.

5.3.2.5 Hemmung der cdk1

Untersuchungen zur Hemmung der cyclinabhängigen Kinase 1 (cdk1) zeigten, daß Indolocarbazole potente Inhibitoren von Zellzykluskinasen sind. Die Fähigkeit von Indolocarbazolen, Zellzykluskinasen zu hemmen, wurde bereits für den Proteinkinase Inhibitor UCN-01 [Akiyoma et al., 1997] sowie für Staurosporin [Meijer et al., 1995] beschrieben.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Substanzen hemmten wirkungsvoll die Aktivität der isolierten cdk1 mit IC_{50}-Werten unter 10 µM. Substanz 4 mit 0,045 µM zeigte auch in diesem Testsystem die höchste inhibitorische Aktivität. Beim Vergleich der cdk1-Hemmung mit der Wachstumshemmung im SRB-Test konnten mit Ausnahme der Substanzen 1, 3, 8, 11 und 13 gute Korrelationen ermittelt werden. Dabei muß allerdings beachtet werden, das diese Untersuchungen am isolierten Enzym durchgeführt wurden. Wie bei den Untersuchungen zur Proteinkinase C könnte in der Zelle ein völlig verändertes Ergebnis erhalten werden.

Unter diesen Testbedingungen zeigten auch die Substanzen mit Sauerstoff an Position X inhibitorische Aktivität. Bei allen anderen durchgeführten Untersuchungen konnte mit diesen Substanzen keine oder nur eine schwache Hemmung des Zielproteins festgestellt werden. Die Substitution an Position X scheint bei der Hemmung der cdk1 nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Variation der Reste an den Indolringen gab keine eindeutigen Hinweise auf die Struktur-Wirkungsbeziehung der Substanzen. Substanz 13 mit offenkettigem Zucker zeigte deutlich geringere Aktivität als die Substanzen mit zyklisierten Zuckern, was darauf hindeutet, daß der glykosidische Rest eine Rolle bei der Inhibierung der cdk1 spielt. Die Einführung der Methylgruppe führt teilweise zur Erhöhung und teilweise zur Verringerung der Hemmwirkung.

5.3.2.6 Vergleich der Substanzen 4 und 10 mittels Durchflußzytometrie

Substanz 4 und Substanz 10 hemmten als einzige der getesteten Wirkstoffe die Aktivität der Proteinkinase C in der Zellkultur. Dabei lag der IC_{50}-Wert für Substanz 10 im Bereich der Wachstumshemmung. Substanz 4 zeigte im Sulforhodamin B-Assay eine sehr viel stärkere Hemmung als an der Proteinkinase C. Daher kann für Substanz 10 ein Wirkmechanismus als PKC-Hemmstoff diskutiert werden, während Substanz 4 vermutlich über einen anderen Mechanismus wirkt. Die Hemmung der cdk1 scheint dabei einen potentiellen Angriffspunkt darzustellen. Um weitere Hinweise auf den möglichen Wirkmechanismus zu gewinnen, wurden die beiden Substanzen nach Inkubation mit LXFL529L-Zellen durchflußzytometrisch vermessen und eine Zellzyklusanalyse erstellt. Es zeigte sich, daß die beiden Substanzen anscheinend völlig unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Substanz 4 induzierte Apoptose aus der G_0/G_1-Phase des Zellzyklus, ohne den Zellzyklus sichtbar zu beeinflussen. Dieses Phänomen läßt sich dadurch erklären, daß die Zellen vor der Substanzinkubation nicht synchronisiert wurden. Cdk1-Inhibitoren interagieren auch häufig mit cdk2, wobei cdk1 Hemmung einen Arrest des Zellzyklus in der G_2/M-Phase des Zellzyklus auslöst, während cdk-2 Inhibierung einen G_0/G_1-Arrest zur Folge hat. Ohne Synchronisierung der Zellkultur überlagern sich diese beiden Effekte in der Durchflußzytometrie [Meijer, 1996].

Für Substanz 10 konnte eine Arretierung des Zellzyklus in der G_0/G_1-Phase mit einer möglichen Apoptose-Induktion aus der G_2/M-Phase beobachtet werden. Substanz 10 kann als potentieller Proteinkinase C-Inhibitor diskutiert werden. PKC-Inhibitoren zeigen unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus. Für Staurosporin und UCN-01 ist G_0/G_1-Arrest beschrieben, während GF109203X eine Akkumulation in G_2/M auslöst [Courage et al., 1996]. Somit wäre der G_0/G_1-Arrest der Substanz 10 mit deren Funktion als PKC-Hemmstoff vereinbar.

5.3.2.7 Zusammenfassung von 5.3.2

Alle untersuchten Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole mit Ausnahme von Substanz 1 und 11 hemmten wirkungsvoll das Wachstum von LXFL529L-Zellen. Der Austausch der NH-Gruppe im Maleimidring gegen ein Sauerstoffatom resultierte bei allen untersuchten Zielproteinen in einer Verminderung der inhibitorischen Aktivität. Im SRB-Zytotoxizitätstest und bei der Untersuchung der Proteinkinase C war bei beiden Substanzen mit Sauerstoff an Position X (1,11) keine Hemmwirkung detektierbar. Einzig bei den Untersuchungen mit isolierten Enzymen war eine geringe Aktivität erkennbar, wobei geprüft werden muß, ob diese auch im zellulären System erhalten bleibt. Außer den Substanzen 1 und 11 hemmten alle untersuchten Wirkstoffe die isolierte Proteinkinase C aus Zellrohextrakt. Die Substanzen 4 und 10, die sich sowohl im Zuckerrest als auch in R2 unterscheiden, waren die einzigen getesteten Substanzen, die die Proteinkinase C auch intrazellulär hemmen konnten. Für Substanz 10 scheint aufgrund der vorliegenden Daten ein Wirkmechanismus als Proteinkinase C-Hemmstoff möglich.

Mehrere Substanzen waren in der Lage, Topoisomerase I oder Topoisomerase II oder auch beide Enzyme wirkungsvoll zu hemmen. Dabei waren die Strukturmerkmale sehr heterogen. Topoisomerase II scheint bei Betrachtung aller Daten ein mögliches Zielprotein der Substanz 8 zu sein.

Die Hemmung der cyclinabhängigen Kinase 1 scheint derzeit ein möglicher Wirkmechanismus für die Mehrzahl der untersuchten Substanzen zu sein. Die cdk1-Hemmung muß jetzt aber ebenfalls noch intrazellulär nachgewiesen werden.

Da in unserer Arbeitsgruppe nur 13 Derivate der Indolocarbazole zur Verfügung standen, sind Struktur-Aktivitätsstudien nur begrenzt möglich. Was sicher scheint ist, daß eine NH-Gruppe an Position X sehr viel besser wirksam ist als ein Sauerstoffatom. Die Substitution an R2 mit H oder CH_3 scheint ebenso wie die Art des Zuckerrestes nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Wirkstoffe aus unterschiedlichen Substanzklassen auf ihre antineoplastische Aktivität an humanen Tumorzellinien untersucht. Einige der getesteten Substanzen zeigten gute Ansätze für einen möglichen späteren Einsatz in der Tumortherapie.
Die Alkaloide Lycorin und Lycobetain zeigten im Sulforhodamin B-Assay eine sehr gute Wachstumshemmung. Der IC_{50}-Wert der Substanzen lag bei allen getesteten humanen Tumorzellinien unter 3 µM. Trotz der hervorragenden Wachstumshemmung konnte für Lycorin kein Wirkmechanismus gefunden werden. Ein Arrest der Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus konnte jedoch gezeigt werden.
Für Lycobetain kristallisierte sich eine duale Hemmung von Topoisomerase I und II als möglicher Wirkmechanismus heraus. Die Aktivität von Topoisomerase II konnte durch 100 µM Lycobetain vollständig inhibiert werden. Bereits bei 10 µM Lycobetain war keine Topoisomerase I Aktivität mehr detektierbar, was nachweislich auf der Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Komplexes beruhte. Diese resultierte in einer Induktion von DNA-Strangbrüchen, Arrest der Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus und schließlich der Induktion von Apoptose. Alle diese Eigenschaften deuteten auf eine Topoisomerase-Hemmung als Wirkmechanismus von Lycobetain hin.
Untersuchungen von fünf Flavonoiden aus der chinesischen Heilpflanze *Scutellaria baicalensis* zeigten, daß Baicalin, Baicalein, Skullcapflavon II und Wogonin das Wachstum verschiedener humaner Tumorzellinien hemmten, während Wogonosid bis zu Konzentrationen von 100 µM keine Wirkung zeigte.
Baicalein und Baicalin wiesen trotz großer Strukturübereinstimmung keinen einheitlichen Wirkmechanismus auf. Baicalein hemmt, wie Lycobetain, die Aktivität der Topoisomerasen I und II, wobei für Topoisomerase I eine Stabilisierung des binären Intermediates von Topoisomerase und DNA nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu Lycobetain interkaliert Baicalein nicht in doppelsträngige DNA, kompetiert jedoch mit dem Hoechst-Farbstoff H33258 um die Bindung an die kleine Furche der DNA. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen, sowie der Arrest der Zellen in der G_2/M-Phase des Zellzyklus und die Induktion von Apoptose konnten auch für Baicalein gezeigt werden.
Messungen mit Baicalin ergaben keinen Hinweis auf Hemmung von humanen Topoisomerasen. Zellzyklusanalysen zeigten einen Arrest in der G_0/G_1-Phase, was im Gegensatz zu Baicalein auf einen völlig unterschiedlichen, bisher nicht geklärten, Mechanismus hindeutet.
Skullcapflavon II hemmte Topoisomerase I und II ab Konzentrationen von 100 µM. Die Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Komplexes konnte jedoch für diese Substanz nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Struktur könnte jedoch auf einen anderen Mechanismus der Topoisomerase-Inhibierung, möglicherweise die Bindung an die freie Topoisomerase I und die damit verbundene Hemmung der Komplexbildung, geschlossen werden. Für Wogonin konnte in dieser Arbeit kein Wirkmechanismus gefunden werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene indigoide Bisindole synthetisiert [Hössel, 1996; Hössel, nicht veröffentlicht], die ebenfalls auf ihre antineoplastische Wirkung untersucht wurden. Ein großes Problem stellte dabei die schlechte Löslichkeit dieser Substanzklasse dar.

Der Vergleich der Substanzen im Sulforhodamin B-Assay an der Zellinie LXFL529L ergab sehr unterschiedliche Ergebnisse. Indirubin und 5-Jod-Indirubin waren die besten Wachstumshemmstoffe mit IC_{50}-Werten unter 10 µM. Die indigoiden Bisindole besaßen die Fähigkeit in Doppelstrang-DNA zu interkalieren und an die kleine Furche der DNA zu binden, während dies für Deoxytopsentin nicht nachzuweisen war. Im Tubulinpolymerisationsassay hemmten Indirubin, 5-Jod-Indirubin und Bisindolylindol die Polymerisation von Tubulinmonomeren. Im Vergleich zur Referenzsubstanz Colchicin war diese Hemmung jedoch für die Wirkung der Substanzen nicht von Bedeutung.

Messungen zur Hemmung der cyclinabhängigen Kinase 1 (cdk1) weisen darauf hin, daß die indigoiden Substanzen ein inhibitorisches Potential für Zellzykluskinasen besitzen. Neben cdk1 hemmen Indirubin und 5-Jod-Indirubin unter anderem cdk5, eine Kinase, die an Mikrotubuliproteinen assoziiert vorliegen kann. Mittels Western-Blotting konnte gezeigt werden, daß die eingesetzte Tubulinpräperation cdk5 enthält. Die geringfügige Hemmung der Tubulinpolymerisation läßt sich möglicherweise durch die Hemmung von mit Tubulin assoziierter cdk5 erklären.

Aus dem Labor von Stalina Melnik, Moskau, Rußland wurden unserer Arbeitsgruppe 13 Wirkstoffe zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Bei den Substanzen handelte es sich um Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide, die sich durch verschiedene Zuckersubstitutionen an R1 sowie verschiedene Reste an X und R2 unterschieden. Im Sulforhodamin B-Assay konnte mit Ausnahme der Substanzen 1 und 11 für alle Substanzen ein IC_{50}-Wert unter 10 µM ermittelt werden, was auf eine hohe wachstumshemmende Potenz hinweist. Wegen der Strukturähnlichkeit mit Staurosporin wurde zunächst die Inhibierung der Proteinkinase C überprüft. Am isolierten zytosolischen Extrakt konnte, ebenfalls mit Ausnahme der Substanzen 1 und 11, eine Hemmung der PKC nachgewiesen werden, wobei sich die IC_{50}-Werte zwischen 0,4 und 34 µM bewegten. Im Gegensatz dazu waren nur zwei Substanzen (4 und 10) in der Lage in der Zellkultur die PKC-Aktivität im niedrigen Konzentrationsbereich zu hemmen. Bei den Substanzen 2 und 5 war ein IC_{50}-Wert ermittelbar, der aber mindestens zehnfach höher lag als bei der Messung am isolierten Enzym. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß die Substanz das Zielprotein in der Zelle nicht erreichen kann.

Die Strukturverwandschaft mit den Topoisomerase-Inhibitoren NB 506 und Rebeccamycin, deutete auf humane Topoisomerasen als potentiellen Angriffspunkt der Wirkstoffe hin. Tatsächlich erwiesen sich mehrere Substanzen als mögliche Hemmstoffe von Topoisomerase I und/oder II (siehe Tabelle 13). Ein weiteres Phänomen war die Fähigkeit aller Substanzen, sich an die kleine Furche der DNA anzulagern, während keine Interkalationsfähigkeit nachweisbar war.

Die Induktion von Strangbrüchen war lediglich für die Substanzen 4 und 8 im unteren mikromolaren Bereich nachweisbar, während die meisten erst ab 50 µM DNA-Schäden induzierten. Die beste Wirkung zeigten aber auch diese Substanzen bei Untersuchungen zur Hemmung von cyclinabhängigen Kinasen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß es sich bei der cdk1 um ein isoliertes Enzym handelt und die Hemmung im zellulären System möglicherweise nicht meßbar ist.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Daten konnte für drei Indolocarbazole ein potentieller Wirkmechanismus gefunden werden. Für Substanz 8 ist die Hemmung von Topoisomerasen ein möglicher Wirkmechanismus, während Substanz 10 sich als möglicher Proteinkinase C-Hemmstoff herausstellte. Substanz 4 scheint einen potentiellen cdk1 Hemmstoff darzustellen.

7 Material und Methoden

7.1 Material

Geräte:

Analysenwaage AE 163	Mettler
Mikropipetten	Eppendorf
pH-Meter pH 521	WTW
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultrazentrifugen Centrikon T-2055	Kontron
Ultra-Turrax T25	Janke und Kunkel, Ka.-Labortechnik
Vortex Genie	Bender und Hobein

Elektrophorese:

Mini-Protean II	Bio-Rad
Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad
Sub-Cell GT	Bio-Rad
Midi-Gelkammer	MWG Biotech
Gel Dryer Modell 543	Bio-Rad
Blotting-Kammer Semi-Phor	Hoefer Scientific Instruments
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad
Nitrozellulose Membran Hybond C	Amersham

Mikroskopie:

Durchlicht/Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Axioskop

Fluoreszenz-Filtereinsatz 365; FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitband Charakter, UV-Anregung Filter 365/366 nm), Fluoreszenz-Filtereinsatz BP 450-490; FT 510; LP 520

Objektive: Plan Neofluar 100/1.30
Plan Apochromat 63×/ Oil

Okular: P1 10×/20

Farbkamera MC-3309

Alle Materialien von Zeiss

Zellkultur:

Zellkulturmaterial	Greiner, Sarstedt, Falcon
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Life Technology

Foetales Kälberserum (FKS)	Life Technology
Penicillin/Streptomycin(10.000 I.E./10.00µg)	Life Technology
Sterilbank Laminar.Air HLB 2472 BS	Heraeus
Brutschrank Cytoperm	Heraeus
Lichtmikroskop Labovert	Leitz
Neubauer Zählkammer	
Multipipette	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipettus-Akku	Tecnorama
Biofreezer	Forma
Vakuumsaugpumpe	KNF-Neuberger
Varioklav-Dampfsterilisator 500 E	H+P Labortechnik
Trockenschrank	Memmert

Zellinien

Bei der Zellinie HL60 handelt es sich um eine akut myeloische humane Leukämie-Zellinie. Die Zellen sind nicht transformiert und werden als Suspensionen kultiviert.

Die Zellinie Jurkat wurde aus Patienten mit T-Zell-Leukämie gewonnen und ebenfalls als Suspension kultiviert.

K562-Zellen entstammen aus Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.

Die Zellinie U937 wurde aus histiozytischen Lymphomen gewonnen.

Molt4-Zellen stellen akut lymphoblastische T-Zell-Leukämie dar.

Auch diese drei Zellinien sind nicht transformiert und wachsen als Suspensionen Alle humanen Leukämie-Zellinien wurden uns freundlicherweise von der Abteilung Humanbiologie der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt.

Die humane Tumorzellinie LXFL529L (großzelliges Lungenkarzinom) wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.H. Fiebig von der Universität in Freiburg überlassen.

Die Mammakarzinomzellinie MCF7 wurde freundlicherweise von Dr. Faderl von der Universität in Regensburg zur Verfügung gestellt.

Zytotoxizitätstests

Mikrotiterplatten	Greiner. Sarstedt, Falcon
Sulforhodamin B	Sigma
Essigsäure p.a.	Riedel-de Haen
Anti-bromdesoxyuridin-POD, Fab Fragmente	Boehringer Mannheim
Photometer Uvikon Spectrometer 930	Kontron
EIA-Platereader	Bio-Rad

Einzelzellgelelektrophorese:

aufgeraute Objektträger Dakin fully frosted	Labcraft
Agarose MEEO	Merck

Low Melting Point (LMP)-Agarose	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad
Auswertesystem „Comet Assay II“	Perceptive Instruments, Suffolk, UK

Proteinkinase C Assay:

Proteine kinase C enzyme assay system	Amersham
γ-[^{32}P]-ATP (spez. Akt >3000µCi/mmol)	Hartmann Analytics
Flüssigszintillationscoktail Aqualuma	Baker
Macrovials	Zinsser Analytic
Szintillationszähler Betamatik I	Kontron
Phosphorsäure(86%)	Riedel de Haen

Ethidiumbromidverdrängungsassay:

Ethidiumbromid	Sigma
Kalbsthymus DNA	Boehringer Mannheim
Spektrofluorimeter	Beckmann

Hoechst-Verdrängungsassay:

Hoechst H33258	Hoechst

Topoisomerase-Assay:

Rekombinante gereinigte Topoisomerasen I und II wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Fritz Boege (medizinische Poliklinik Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Plasmid-DNA (pBR322)	Boehringer Mannheim
Kinetoplasten-DNA (kDNA)	TopoGen
Anti human Topoisomerase I	TopoGen
Spermin, Spermidin	Sigma
Proteinase K	Sigma

Mikrotubuliproteine:

Rinderhirn	Schlachthof Kaiserslautern Metzgerei Braun, Kusel
GTP	Merck
Anti-α Tubulin	Sigma

Western-Blot-Analyse

ECL	Amersham
Röntgenfilm	Boehringer Mannheim
Entwickler und Fixierer	Ilford Speed

Alle weiteren verwendeten Substanzen wurden von Sigma, Boehringer Mannheim, Bio-Rad, Merck , Promega und Calbiochem in p.a. Qualität bezogen.

7.2 Methoden

7.2.1 Zellkultur

7.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zellinien werden in sterilem RPMI 1640 Medium der Fa. Life Technologie kultiviert, dem nachträglich 10% Foetales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wird. Das foetale Kälberserum wird vorher 20 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert. Die Kultivierung erfolgt in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit.

7.2.1.2 Passagieren von Zellen

Alle Zellen werden regelmäßig zwei-dreimal/Woche steril passagiert, d.h. mit neuem Medium und somit mit neuen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt.
Zu diesem Zweck wird bei Suspensionszellen ca.75% des verbrauchten Mediums abgeschüttet und mit frischem Medium wieder aufgefüllt. Einmal in der Woche werden die Suspensionszellen von der Kulturflasche in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und 10 min bei 150-200 × g abzentrifugiert, um tote Zellen, die leichter sind und deshalb nicht so schnell sedimentieren, mit dem Überstand zu entfernen. Dem resultierenden Zell-Pellett wird frisches Medium hinzugefügt und die Zellen werden wieder in neue Zellkulturflaschen überführt.
Monolayerzellen müssen zunächst vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden, um dann verdünnt mit frischem Medium weiterkultiviert zu werden. Dies geschieht mittels Trypsinbehandlung. Das verbrauchte Medium wird abgeschüttet und der Zellrasen einmal mit 5ml PBS abgespült, bevor man 1ml einer gebrauchsfertigen Trypsinlösung auf den Monolayer gibt und wartet, bis die Zellen sich von der Oberfläche der Zellkulturflasche lösen. Um Trypsin zu inaktivieren wird RPMI-Medium mit FKS hinzugefügt, die Zellen auf ca. 25% ihres ursprünglichen Volumens verdünnt und dann wieder frisches Medium nachgefüllt.
Bei Monolayer Zellen muß zusätzlich beachtet werden, daß sich mit sehr hohen Passagenzahlen die physiologischen Eigenschaften der Zellen sehr stark verändern können. Deshalb wird darauf geachtet, daß für eine Zellinie nicht mehr als 15 Passagen durchgeführt werden. Danach werden die Zellen verworfen und neue Zellen kultiviert.

7.2.1.2.1 Reagenzien

<u>PBS:</u> (phosphate buffered saline)	5g NaCl 0,72g Na_2HPO_4 0,125g KCl 0,125g KH_2PO_4 mit aq.bidest. auf 500 ml auffüllen, pH 7,4
<u>Trypsinlösung</u>:	50,12g Trypsin (Rinderpankreas, 2,4 IU/mg) 25 mg EDTA mit PBS auf 100 ml auffüllen, über Nacht im Eisbad rühren und dann sterilfiltrieren

7.2.1.3 Untersuchung auf Mykoplasmenkontamination

Alle Zellen werden in regelmäßigen Abständen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Mykoplasmen sind bakterienähnliche Kleinstlebewesen, die parasitär in enger Vergesellschaftung mit Tier- und Pflanzenzellen leben [Alberts et al., 1995].
Adhärente Zellen werden auf Objektträger ausgestreut (5000 Zellen/Objektträger) und über 24 Stunden auf der Oberfläche des Objektträgers anwachsen gelassen. Zur Fixierung der Zellen werden die Objektträger in eiskaltes Methanol überführt und dort mindestens 15 min inkubiert. Suspensionszellen werden aus der Kultur mit Medium entnommen und mittels Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht.
Zur Detektion von Mykoplasmen wird ein Gemisch aus DAPI/Propidiumjodid und Antifade auf die Objektträger pipettiert und die Färbung der Zellen bzw. der Mykoplasmen im Fluoreszenzmikroskop beobachtet, wobei DNA blau und Zytoplasmaproteine rot angefärbt werden.
Da Mykoplasmen zum größten Teil nur aus DNA bestehen, sieht man sie als kleine Punkte im Zytoplama und im Interzellularraum.
Im Falle einer Mykoplasmenkontamination werden die Zellen mindestens eine Woche lang mit Mykoplasmen-Entfernungs Reagenz (MRA) behandelt und noch mindestens zweimal passagiert, bevor wieder damit gearbeitet werden kann.

7.2.1.3.1 Reagenzien

<u>Antifade-Puffer:</u>
100 mg p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid werden in 10 ml PBS gelöst, der pH wird mit 0,5 M Carbonat-Dicarbonat-Puffer auf 8,0 eingestellt, mit Glyzerin wird auf 100 ml aufgefüllt und bei –20°C gelagert.

Farbstofflösungen:
1mg DAPI auf 1ml aq. bidest.
1 mg Propidiumjodid auf 1ml aq. bidest

DAPI/Propidiumjodid/Antifade-Lösung:
Je 1 µl der Farbstofflösungen auf 1ml Antifade-Puffer

7.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Um im Falle einer Kontamination auf einen Vorrat an Zellen zurückgreifen zu können empfiehlt es sich Zellen in Kryoröhrchen in ausreichender Menge einzufrieren und bei –180°C in flüssigem Stickstoff zu lagern. Suspensionszellen werden aus der Kultur entnommen, adherente Zellen zunächst abtrypsiniert; die Zellsuspension wird zentrifugiert und das Pellet mit RPMI 1640 Medium auf eine Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach Zugabe von 10% Vol. DMSO als Gefrierschutz werden die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

7.2.1.5 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen werden aus der Kryolagerung entnommen und bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut. Nach Zugabe von Medium werden die Zellen 10 min bei 150-200 × g abzentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wird mit frischem Medium aufgenommen und die Zellen können dann im Brutschrank inkubiert werden.

7.2.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität

7.2.2.1 Sulforhodamin B-Assay

Der photometrische Assay [Shekan, 1991] beruht auf der Anfärbung von Lebendprotein in der Zelle durch den Farbstoff Sulforhodamin B.
Dabei werden Zellen einer unbehandelten Kontrolle mit Zellen verglichen, die mit verschiedenen Konzentrationen einer bestimmten Substanz über 72h inkubiert wurden.

Durchführung:

Inkubation
Die Zellen werden in serumhaltigem Medium in 24 Loch-Mikrotiterplatten ausgestreut (Zellzahl 5×10^4/well bei Suspensionszellen, 4000 Zellen/well bei adhärenten Zellen)
Adhärente Zellen werden 24 h anheften lassen; danach wird das Medium abgesaugt und durch frisches Medium, welches die Substanz in der entsprechenden Konzentration bereits enthält,

ersetzt. Suspensionszellen können direkt mit Substanz inkubiert werden. Zur Inkubation mit Substanz werden 4 wells parallel angesetzt, wobei die Lösungsmittel-Konzentration zwischen 0,1% und 1% DMSO eingestellt wird. Die Kontrollansätze werden ebenfalls unter Zusatz der entsprechenden DMSO-Konzentration kultiviert.

Fixierung

Am Ende der Inkubationszeit werden die Zellen mit 1/10 Vol 50%TCA fixiert. Suspensionszellen müssen vorher in der Platte 10 min bei 300×g zentrifugiert und sehr vorsichtig behandelt werden, um ein erneutes Lösen vom Plattenboden zu vermeiden.

Die Fixierung erfolgt über 1h bei 4°C. Danach wird das TCA-haltige Medium abgeschüttet und die Platte 4-5x mit fließend kaltem Wasser abgespült, um TCA-Reste zu entfernen. Die Trocknung der Mikrotiterplatte erfolgt über Nacht bei RT oder 1h bei 60°C im Trockenschrank.

Färbung und Messung

Die fixierten Zellen werden dann mit 250µl/well Sulforhodamin B (gelöst 0,4%ig in 1% Essigsäure) 30min bei Raumtemperatur angefärbt. Die SRB-Lösung wird dann abgeschüttet und die Platte 4-5x mit 1% Essigsäure gespült.

Nach einem erneuten Trocknungsschritt (s. oben) wird der Farbstoff durch Zugabe von 10 mM Tris, pH 10,5 (1ml/well) gelöst und die Extinktion im Photometer bei 546nm gemessen. Die Färbung der Lösung ist direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen im well.

7.2.2.1.1 Reagenzien

Trichloressigsäure (TCA)-Lösung: 50%ig in H_2O bidest.

Essigsäure-Lösung: 1% Essigsäure in H_2O

Sulforhodamin B-Lösung: 0,4% Sulforhodamin B in 1%iger Essigsäure

Tris Base: 10 mM in H_2O bidest, pH 10,5

7.2.2.2 Anti-BrdU-ELISA

Die DNA-Synthese ist ein Maß für die Proliferationsrate lebender Zellen. Wird den Zellen zusätzlich zu ihrer eigenen Nucleotidausstattung Bromdesoxyuridin angeboten, so wird dieses ebenfalls in den DNA-Strang eingebaut und gibt nach einigen Stunden einen Aufschluss über die DNA-Syntheserate der Zellen.

Die Detektion des eingebauten BrdUs erfolgt in diesem Test über eine Antikörperreaktion mit Anti-BrdU Antikörper.

Durchführung:

Inkubation

Zellen werden mit einer Zelldichte von $1x10^5$ Zellen/ml in 96-well-Platten ausgestreut (100µl Volumen). Adhärente Zellen werden zunächst anwachsen gelassen, Suspensionszellen können direkt inkubiert werden.

Die Inkubation mit Substanz in der gewünschten Konzentration erfolgt über 72h. Dabei wird ebenfalls auf die DMSO-Konzentration geachtet und Kontrollansätze mit der entsprechenden DMSO-Konzentration mitgeführt.

BrdU-Markierung und Fixierung der Zellen

Am Ende der Inkubationszeit wird dem Kulturmedium 1/10 Volumen BrdU-Markierungslösung hinzugefügt und die Zellen für 4 Stunden weiterinkubiert. Danach wird bei adhärenten Zellen das BrdU-haltige Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Suspensionszellen werden zunächst 10 min bei 300g zentrifugiert und der Überstand erst dann mit einer Kanüle abgesaugt. Nach Zugabe von 100 µl Fixierungslösung werden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur fixiert.

Detektion

Die Fixierungslösung wird entfernt und die Platte 3× mit PBS/ 10% FKS als Blockierungsreagenz gewaschen. Zu den fixierten und gewaschenen Zellen wird 100 µl/well anti-BrdU-POD- Lösung hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Mikrotiterplatte 3× mit PBS gewaschen. Pro Loch werden 100 µl ABTS-Substratlösung zugesetzt und 5-30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine deutlich sichtbare Färbung auftritt. Die Absorption der Proben wird bei 450 nm im ELISA-Plate Reader gemessen.

7.2.2.2.1 Reagenzien

BrdU-Stammlösung 10 mM, Boehringer Mannheim

BrdU-Markierungslösung 100 µM, Boehringer Mannheim

7.2.3 Einzelzellgelelektrophorese(Comet-Assay)

Die Einzelzellgelelektrophorese [Gedik, 1992] dient der Untersuchung von DNA-Schäden, die unter Einfluß von Schadstoffen oder UV-Strahlung in Form von DNA-Strangbrüchen auftreten können.

Die Methode der Einzelzellgelelektrophorese hat verschiedene Vorteile: Es können individuelle, nicht proliferierende Zellen untersucht werden und die Methode ist relativ schnell und einfach durchzuführen.

Die zu untersuchenden Zellen werden nach Substanz- bzw. allgemeiner Schadstoffexposition in Agarose aufgenommen und auf Objektträger ausgebracht. Dort werden sie lysiert, so daß die im Gel verbleibende DNA nach Denaturierung elektrophoretisch aufgetrennt werden kann.
Wurden durch Schadstoffeinfluß DNA-Schäden induziert, zeigt die negativ geladenen DNA geschädigter Zellen eine Wanderung in Richtung zur Anode. Nach Anfärbung der DNA mit einem Fluoreszenz-Farbstoff zeigt sich im Fluoreszenz-Mikroskop das Bild eines Kometen (deshalb auch Comet-Assay). Die Länge und die Fluoreszenzintensität des Kometen ist ein Maß für den Grad der DNA-Schädigung.

7.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

HL60 Zellen (ca. 1×10^6 /ml) werden in der Zellkultur mit Substanz für 3h inkubiert. Kontrollen mit der entsprechenden Lösungsmittel-Konzentration (DMSO) wurden ebenfalls inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird 1 ml Zellsuspension entnommen und bei 3000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 50µl PBS resuspendiert.

7.2.3.2 Vorbereiten der Objektträger

(1) 300 µl normale MEEO-Agarose 0,75% in PBS auf einen Objektträger (OT) pipettieren und sofort luftblasenfrei ein Deckglas auflegen
(2) für ca. 10 min im Kühlschrank aushärten lassen
(3) Deckglas vorsichtig seitlich vom Objektträger herunterziehen
15µl Zellsuspension mit 100µl LMP-Agarose 0,5% in PBS mischen und mit 100µl des Gemischs vorsichtig die Agarose auf dem OT überschichten; sofort nach Auftrag luftblasenfrei und ohne Druck ein Deckglas auflegen
(4) für ca. 10 min im Kühlschrank aushärten lassen
(5) Deckglas entfernen und als Deckschicht 100µl LMP Agarose auftragen
wieder eindecken und ca. 5 min in den Kühlschrank stellen
(6) Deckglas entfernen und Objektträger für mind. 1h im Kühlschrank in einer Glasküvette mit kaltem Lysepuffer inkubieren

7.2.3.3 Elektrophorese und Anfärben der Objektträger

Die auf Eis gekühlte Elektrophoresekammer wird mit eiskaltem Elektrophoresepuffer gefüllt und die Objektträger mit der Gelschicht nach oben auf die Plattform der Kammer gelegt.

Anschließend wird Elektrophoresepuffer aufgefüllt, bis die Objektträger ca. 2 mm hoch bedeckt sind.
Die Objektträger werden 20 min abgedunkelt äquilibriert. Danach erfolgt eine 20 minütige Elektrophorese bei einer Spannung von 25 Volt und einer Stromstärke von 300 mA (die richtige Stromstärke wird durch Zugeben oder Abnehmen von Elektrophoresepuffer erreicht).
Die Objektträger werden aus der Kammer entnommen und 3× 5 min mit Neutralisationspuffer gewaschen. Zum Anfärben der DNA wird 50µl Ethidiumbromid (20µg/ml) auf jeden Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen. Eine Lagerung der Objektträger für ein bis zwei Tage in einer feuchten Kammer ist möglich.
Die mikroskopische Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop mit CY-3 Filter.

7.2.3.4 Lösungen und Puffer

<u>Lysepuffer-Stammlösung:</u>
2,5M NaCl
100mM EDTA
10mM Tris
1% Na-Sarcosinat (N-Laurylsarcosyl sodium salt)

<u>Lysepuffer-Gebrauchslösung</u>
89% Lysepuffer
1% Triton X-100
10% DMSO

<u>Elektrophorese-Puffer:</u>

300mM NaoH	⇒ 30 ml aus 10M NaOH
1mM EDTA	⇒ 5 ml aus 200 mM EDTA, pH 10
	ad 1000 ml Aqua dest.

<u>Neutralisations-Puffer</u>
0,4M Tris, pH 7,4

7.2.4 Ethidiumbromidverdrängungsassay

Dieser Assay [Morgan, 1979] gibt Aufschluß über die Fähigkeit von Substanzen zwischen die Basenpaare der DNA zu interkalieren. Als Referenzsubstanz dient dabei Ethidiumbromid, welches erwiesenermaßen in die Doppelstrang DNA interkaliert und dabei eine starke Fluoreszenz aufweist [Glazer und Rye, 1992].

Die Reaktion findet in einem ethidiumbromidhaltigen Puffer unter Zusatz von Kalbsthymus DNA und Substanz in verschiedenen Konzentrationen statt.
Die Messung erfolgt an einem Floureszenzspektrometer mit einer Anregung von 546 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm.
Der Nullwert wird mit Ethidiumbromidpuffer (2mM Ethidiumbromid) ohne Zusatz von DNA ermittelt, der Kontrollwert mit Puffer unter Zusatz von DNA (Kalbsthymus DNA 3,8 mg/ml).
Durch Zugabe von interkalierenden Substanzen sinkt der Kontrollwert durch die Verdrängung von Ethidiumbromid.

7.2.4.1 Durchführung

Das Fluoreszenzspektrometer wird auf die Wellenlängen 546nm (Ex) und 595nm (Em) kalibriert und der Nullwert mit 2 ml Ethidiumbromidpuffer in einer Fluoreszenzküvette eingestellt.
6 ml Puffer werden mit 20 µl DNA-Lösung gemischt und von 2 ml des Gemischs die Fluoreszenzintensität gemessen. Nach Zugabe von Substanz werden Veränderungen der Fluoreszenz beobachtet, wobei eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen berücksichtigt werden muß.

7.2.4.2 Lösungen und Puffer

Pufferlösung:
9,3 mmol NaCl
2 Mal Na-Acetat, pH 7,0
0,1 mmol EDTA

Kalbsthymus-DNA:
3,8 mg Kalbsthymus-DNA auf 1 ml H_20

Ethidiumbromidpuffer:
Ethidiumbromidstammlösung 10mg/ml
davon 2µM Lösung mit Puffer

7.2.5 Untersuchung der Verdrängung von Hoechst H 33258

Verschiedene Substanzen sind in der Lage, sich in der kleinen Furche der DNA anzulagern und dort ihre Wirkung auf die Zelle auszuüben. Der Hoechst Fluoreszenz-Farbstoff H33258 lagert sich in der kleinen Furche an mit einer speziellen Affinität für A-T reiche Regionen [Wang et al., 1994]. Nach Zusatz von Substanzen wie zum Beispiel Netropsin oder Distamycin, die ebenfalls die Fähigkeit zur Anlagerung an die DNA besitzen [Chen et al., 1993], wird eine Verdrängung von Hoechst H33258 durch Abnahme der Fluoreszenzintensität bei den Wellenlängen 360 und 450nm gemessen.

7.2.5.1 Durchführung

Das Fluoreszenzspektrometer wird auf die Wellenlängen 360nm(Ex) und 450nm(Em) eingestellt und der Nullwert mit 2ml Ethidiumbromidpuffer in einer Fluoreszenzküvette bestimmt.
6 ml Puffer werden mit 20 µl DNA-Lösung gemischt von 2 ml des Gemischs die Fluoreszenzintensität gemessen. Nach Zugabe von Substanz werden Veränderungen der Fluoreszenz beobachtet, wobei eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen berücksichtigt werden muß.

7.2.5.2 Lösungen und Puffer

Pufferlösung:
9,3 mmol NaCl
2 mmol Na-Acetat, pH 7,0
0,1 mmol EDTA

Kalbsthymus-DNA:
10 mg Kalbsthymus-DNA auf 3,8 ml H_20

Hoechst H33258
Stammlösung 10mg/ml, davon 2µM Lösung mit Puffer

7.2.6 Bestimmung der Proteinkinase C (PKC)-Aktivität

Die Erfassung der PKC-Aktivität erfolgt über die Messung der Übertragungsrate von Phosphatresten auf ein PKC spezifisches Substratpeptid. Durch den Einsatz von radioaktiv markiertem ATP läßt sich die Übertragung im Szintillationszähler messen.

7.2.6.1 Isolierung von Proteinkinase C Rohextrakt

Adhärente Zellen werden in Petrischalen bis 80-90% Dichte kultiviert. Am Ende der Inkubationszeit wird das Medium abgeschüttet und die Zellen 1× mit 5ml PBS gespült.

Von diesem Zeitpunkt an werden alle weiteren Schritte bei 4°C auf Eis durchgeführt, um die Enzymaktivität nicht durch Denaturierungsreaktionen herabzusetzen.
Die Zellen werden in 2× 300µl swelling buffer mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der Petrischale abgelöst, in Eppendorf-Tubes gesammelt und die Zellsuspension 10 sec mit einem Mikro-Ultraschallstab beschallt, um die Zellmembran aufzubrechen. Nach Zugabe des gleiches Volumens an glyzerinhaltigem swelling buffer wird das Zellysat 3 min bei 3000rpm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren. Der Überstand wird vorsichtig in Ultrazentrifugations-Röhrchen überführt und eine Ultrazentrifugation für 30 min bei 100.000g durchgeführt.
Der entstehende Überstand enthält die zytosolische Fraktion, die für die Messung der Gesamtaktivität weiterverwendet wird.

7.2.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgt nach der Methode nach Bradford. Dazu werden 50 µl der jeweiligen Probe mit 1 ml Bradford Reagenz [Bradford, 1976] versetzt und die Färbung des Ansatzes bei 595 nm im Photometer vermessen. Durch Bindung des Farbstoffes Comassie Brilliant Blau G-250 an Proteine kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm, was sich in einem Anstieg der Absorption bei 595 nm äußert. Die Ausbildung des Protein-Farbstoffkomplexes ist nach 5 Minuten abgeschlossen und bleibt eine Stunde lang konstant. Als Referenz wird Rinderserumalbumin in den Konzentrationen 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000µg/ml verwendet. Anhand der erstellten Eichgerade können die Proteingehalte der Proben ermittelt werden.

7.2.6.3 Bestimmung der Kinaseaktivität

Die Messung der PKC-Aktivität erfolgt mit Hilfe eines PKC-enzyme assay kit der Firma Amersham.
Die 4 im Kit mitgelieferten Lösungen enthalten das Peptidsubstrat, PKC-Aktivatoren, Calciumpuffer und Reduktionsmittel. Die 4 Lösungen werden zu gleichen Anteilen miteinander gemischt und 25µl/Reaktionstube eingefüllt.
Dem Ansatz werde je 20 µl der Probelösung und 5µl der zu untersuchenden Substanz hinzugefügt, für die Bestimmung der Nullwerte wird die gleiche Menge an H_2O bzw. Lösungsmittel der Substanz verwendet. Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 5µl Mg-ATP-Puffer mit 0,2µCi [γ^{32}P]-ATP/Tube und die Reaktionsgefäße werden 15 min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgt durch Zugabe von 10µl Stopp-Puffer.
35µl des Reaktionsgemisches werden auf beschriftete Phosphozelluloseblättchen pipettiert und 2×5 min in mind. 500 ml 1% Phosphorsäurelösung gewaschen. Anschließend folgen zwei Waschgänge mit H_2O. Die gewaschenen Blättchen werden in Szintillations-Maxivials verteilt, mit 8 ml Szintillationscocktail (Aqualuma, Baker) aufgefüllt und im Szintillationszähler gemessen.

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität werden Blättchen mit 5µl radioaktivem Mg-ATP-Puffer ungewaschen mitgeführt. Zur Prüfung der Wascheffizienz werden zwei Blättchen mit radioaktivem Mg-ATP-Puffer mitgewaschen und gemessen.

7.2.6.4 Bestimmung der PKC-Aktivität in der Zellkultur

Adhärente Zellen werden bis 80-90% Dichte auf Petrischalen hochwachsen gelassen. 18h vor Substanzinkubation wird das Medium auf 1% FKS reduziert. Die Inkubation erfolgt serumfrei für 1h im Brutschrank. Am Ende der Inkubationszeit wird das Medium abgeschüttet und die Zellen werden 1× mit 5ml PBS gespült.
Die Aufarbeitung der zytosolischen Fraktion erfolgt analog zur Gewinnung des Enzymrohextraktes.
Bei der Messung der Kinaseaktivität besteht der einzige Unterschied darin, daß nicht mit Substanz inkubiert wird. Dieses Volumen wird durch Probenvolumen ersetzt.

7.2.6.5 Lösungen und Puffer

<u>Swelling-Puffer:</u>
30 mM Tris
10 mM KCl
5 mM MgAc
5 mM EGTA
in H_2O bidest, pH 7,5
kurz vor Gebrauch werden zu 10 ml Swelling-Puffer 31 µl ß-Mercaptoethanol zugefügt und 50 µl eines Proteaseinhibitorgemisches

<u>Swelling Puffer mit Glyzerin:</u>
Der Ansatz erfolgt analog zum Swelling-Puffer unter Zusatz von 25% Glyzerin

<u>Protease-Inhibitoren:</u>
Stammlösung:
100 mM PMSF in Isopropanol
7,3 mM Pepstatin A in DMSO
10 mM Leupeptin in H_2O bidest.

<u>Gebrauchslösung</u>
5 ml PMSF
137 µl Pepstatin A
100 µl Leupeptin

mischen, aliquotieren und bei –20°C lagern

Bradford-Reagenz:
100 mg Coomassie Brilliant Blau (G)
50 ml EtOH
100 ml H_3PO_4 (85%)
mit H_2O bidest ad 1l, filtrieren
vor Gebrauch abgedunkelt ca. 4 Wochen stehen lassen

7.2.7 Untersuchung humaner Topoisomerasen

Zur Untersuchung der Topoisomerase-Aktivität verschiedener Zellinien und der Beeinflussung dieser Aktivität durch Zugabe verschiedener Substanzen stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung.
Zunächst unterscheiden sich die Methoden zur Untersuchung von Topoisomerase I und Topoisomerase II. Für Topoisomerase I besteht die Möglichkeit des Relaxations-Assays. Dabei wird überprüft, ob Topoisomerase I in der Lage ist, durch Induktion eines Einzelstrangbruches, die DNA von der superspiralisierten Plasmidform in die relaxierte Form umzuwandeln. Dieser Assay kann unter Zusatz von ATP und MgCl auch für die Untersuchung von Topoisomerase II verwendet werden, wobei die Topoisomerase II wegen unterschiedlicher Aktivitätspeaks bei anderen pH-Werten gemessen wird. Ein spezifischer Test für Topoisomerase II ist der Dekatenierungs-Assay. Dabei wird Kinetoplasten DNA verwendet, die ein Netzwerk von kleinen DNA-Zirkeln darstellt, welches ohne Induktion von Doppelstrangbrüchen nicht entwirrt werden kann. Durch Topoisomerase II-Aktivität können diese Doppelstrangbrüche induziert werden.

7.2.7.1 Gewinnung von Kernextrakt

Zellen werden aus der Zellkultur entnommen; die Zellzahl sollte insgesamt mind. 10^6 Zellen betragen, allerdings 3×10^8 auch nicht überschreiten.
Die Zellen werden bei 150-200× g zentrifugiert und 2× mit PBS oder isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Pellet wird mit 7,5 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert, dem nachträglich 500µl Lysepuffer mit Triton X-100 zugefügt wird. Die Lyse der Zellen erfolgt für 15 min bei 4°C. Das Lysat wird 5 min bei 300g zentrifugiert und das Pellet mit 0,5 ml Lyse-Puffer ohne Triton resuspendiert.
10 µl der Suspension werden mit 10µl 0,1% Trypan-Blau gemischt und die darin enthaltenen Kerne in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Kerne in der Suspension werden anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird mit Extraktionspuffer resuspendiert und auf eine Kernzahl von 3×10^7/ml eingestellt.

Zur Lyse der Zellkerne wird langsam 10% Volumen 5M NaCl hinzugefügt und 15-20 Minuten bei 4°C präzipitieren lassen. Der Kernrohextrakt wird 10 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Tube überführt, ohne die ausgefällte DNA in der Probe mitzuziehen.
Die Lagerung des Extraktes erfolgt bei -20°C in 1,5fachem Vol. an Glyzerin (86-88%).

7.2.7.2 Lösungen und Puffer

Lysepuffer:
0,3 M Sucrose
0,5 mM EGTA pH 8,0
60 mM KCl
15 mM NaCl
15 mM HEPES, pH 7,5
150 µM Spermin
50 µM Spermidin

Lysepuffer + Triton X-100:
Lysepuffer und Triton X-100 im Verhältnis 13,5:1 mischen

Extraktionspuffer:
5 mM K-Phosphat, pH 7,5
100 mM NaCl
1 µl/ml ß-Mercaptoethanol
5 µl/ml 200 mM PMSF in DMSO

7.2.7.3 Bestimmung der Topoisomerase -Aktivität

Zur Bestimmung der Topoisomerase–Aktivität wurden Relaxations-Assays angewendet sowie speziell zur Bestimmung der Topoisomerase II-Aktivität zusätzlich der Dekatenierungs-Assay.
Nach der Methode von Gieseler (1996) müssen zur Bestimmung der Aktivität der verschiedenen Topoisomerasen im Relaxation-Assay mehrere verschiedene pH-Werte gewählt werden , da die Topoisomerase I bei pH 7,2, die Topoisomerase IIα bei pH 7,9 und die Topoisomerase IIβ bei pH 8,9 ihre Aktivitätsmaxima aufweisen.
Eine weitere Topoisomerase-Aktivität ist bei pH 9,5 meßbar, jedoch ist bislang nicht geklärt, um welches der Enzyme es sich handelt. Ein Heterodimer von Topo IIα und Topo IIβ scheint eine Möglichkeit zu sein, die aber mittels Western-Blot noch überprüft werden muß.

Im Assay werden 200-500 ng superspiralisierte Plasmid-DNA(pBR322) mit Kernextrakt inkubiert und zur Aktivierung der Topo II Magnesium und ATP hinzugefügt.
Die verschiedenen entstehenden DNA-Konformationen können im Agarosegel aufgetrennt und densitometrisch quantifiziert werden.

7.2.7.4 Relaxation-Assay

Ansatz:
200ng supercoiled DNA (pBR322)
4µl 10x Assay-Puffer
4µl 10x ATP
4µl Kernextrakt
4µl Camptothecin(aus100µM) → nur für Topo IIα und β und Heterodimer, also pH 7,9; 8,9 und 9,5; bei pH 7,2 (Topo I) wird diese Volumen durch H_2O ausgeglichen
4 µl Substanz
mit H_2O auf 40µl Endvolumen

Die Inkubation der Proben erfolgt für 30 min bei 37°C. Am Ende der Inkubationszeit werden 8µl 6 ×TAE-loading buffer zu jeder Probe pipettiert und die Proben auf ein 1%iges Agarosegel geladen.
Nach einer Elektrophorese in TAE-Puffer mit einer konstanten Spannung von 5V/cm Gel wird das Gel mit 500mg/l Ethidium Bromid 15 min anfärbt, die resultierende Fluoreszenz mit UV-Licht und Rotfilter detektiert und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera photographiert.

7.2.7.4.1 Lösungen und Puffer

10x Assay Puffer:
1M Tris
800 mM L-Glutamat, Na Salz
10 mM $MgCl_2$
150µg BSA
mit HCl auf gewünschten pH titrieren, bei Raumtemperatur lagern

10x ATP-Mix:
10 mM ATP
50 mM DTT
in 100µl Aliquots bei -20° C lagern

TAE-Puffer (50×)
242g Tris

57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
6 ×TAE-loading Puffer:
1ml 10x TAE
1 ml gesättigtes Bromphenolblau
1 ml 1M Xylen-Blau
2 ml H_2O
5 ml 87% Glyzerin

7.2.7.5 Untersuchung der Topoisomerase II mittels Dekatenierungs-Assay

Zur Untersuchung der Topoisomerase II-Aktivität wurde Kinetoplasten DNA aus *Crithida fasciulata* eingesetzt. Diese DNA zeichnet sich durch ein Netzwerk an Minizirkeln aus, die sich ausschließlich durch Topoisomerase II entwirren lassen. Zur Bestimmung der Aktivität werden 270 ng Kinetoplasten DNA mit gereinigter Topoisomerase II 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen der Proben für 5min auf 65°C beendet. Nach Zugabe von 6× Gel-Lade-Puffer erfolgte die Elektrophorese in 1% Agarose mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und anschließender Detektion unter UV-Licht. Gereinigte rekombinante Topoisomerase II wurde von Herrn Prof. Dr. Fritz Boege von der medizinischen Poliklinik in Würzburg zur Verfügung gestellt.

Ansatz:
3 µl Salt-Mix
3 µl Tris-Puffer (100 mM, pH 7,9)
3,6 µl KCl (1M)
3 µl kDNA
0,1-1µg Topoisomerase II
mit H_2O auf 30µl auffüllen
zur Inkubation mit Substanz den Ansatz mit 3µl Substanz versetzen und dieses Volumen an H_2O abziehen

7.2.7.5.1 Lösungen und Puffer

Salt-Mix
10 mM ATP
100 mM $MgCl_2$
5 -mM DTT, 5mM EDTA
0,3 mg/ml BSA

7.2.8 Mechanistische Untersuchungen zur Topoisomerase I

7.2.8.1 Untersuchung des „Cleavable-Complex“

Zur Untersuchung der Bildung eines ternären Komplexes wird gereinigte rekombinante Topoisomerase I (200U) für 30 min bei 37°C mit 250 ng Plasmid-DNA (pBR322) mit oder ohne Substanz inkubiert. Die Reaktion wird mit 1% SDS abgestoppt und unter Zusatz von 1mg/ml Proteinase K für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation erfolgt eine Agarosegelelektrophorese mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid in 1% Agarosegel und Puffer. Die Auswertung erfolgt unter UV Licht.

7.2.8.1.1 Lösungen

Reaktions-Puffer:
10 mM Tris
10 mM $MgCl_2$
10 mM KCl
0,1 mM DTT
10% DMSO pH 7,9

7.2.8.2 Immunoband-Depletion-Assay

Zur weiteren Untersuchung der Bildung eines ternären Komplexes wird gereinigte rekombinante Topoisomerase I (200 U) mit 6 µg Kalbsthymus DNA mit und ohne Substanz 30 min bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zusatz von 1% SDS gestoppt. Die Proben werden auf ein 10% SDS-Gel geladen und einer Elektrophorese mit anschließendem Western Blot unterzogen (siehe Methoden,Western-Blot). Als Antikörper diente Anti-human Topoisomerase I und ein Goat-anti-human IgG-Antikörper. Die Detektion erfolgt über die Enhanced Chemiluminiscence Methode (Amersham).

7.2.8.2.1 Lösungen

Reaktions-Puffer:
10 mM Tris
2 mM $MgCl_2$
10 mM KCl
0,1 mM DTT
10% DMSO
pH 7,9

7.2.9 Untersuchungen von Mikrotubuliproteinen (MTPs)

7.2.9.1 Präparation

Die Präparation erfolgt nach dem Verfahren von Shelanski et al. (1973) und beruht auf dem Prinzip der Aufreinigung durch Zyklen von temperaturabhängiger Polymerisation und Depolymerisation.
Die Gewinnung des Proteins wird unter Verwendung von Glyzerin durchgeführt, was eine größere Ausbeute an Tubulin verspricht.

7.2.9.2 Gewinnung von glyzerinhaltigem Mikrotubuliprotein

Zur Gewinnung von MTP werden 800-1000g schlachtwarmes Rinderhirn benötigt, was ca. 3 Hirnen entspricht. Zwischen Schlachtung und Beginn der Aufarbeitung sollten höchstens 2h liegen, in denen das Hirn auf Eis aufbewahrt werden muß.
Aufarbeitung:
(1) Hirnhäute, Fett und Blutgefäße mit der Pinzette entfernen
(2) 2x mit REA-Puffer waschen zum Entfernen der Blutreste
(3) Portionen von je 100g Hirn mit der Schere zerkleinern und in je 60 ml REA-4M mit Stabmixer oder Ultraturrax homogenisieren
(4) 15 min bei 4°C und 10.000g zentrifugieren; Überstand (Ü1) vorsichtig dekantieren, Volumen bestimmen und das Pellet (P1) verwerfen
(5) Überstand 1h bei 4°C und 100.000g zentrifugieren; erhaltenen neuen Überstand (Ü2) dekantieren, Volumen bestimmen und das Pellet (P2) verwerfen
(6) zu Überstand (Ü2) GTP in einer Endkonzentration von 1mM pipettieren; 30 min bei 37°C inkubieren (Polymerisation zeigt sich in einer zunehmenden Viskosität der Lösung)
(7) nach Ende der Inkubationszeit Lösung 1h bei 30°C und 100.000g zentrifugieren, Überstand (Ü3) verwerfen und tubulinhaltiges Pellet (P3) mit REA waschen
(8) Pellet in eiskaltem REA (¼ desVolumens von Ü2) resuspendieren und 30 min auf Eis depolymerisieren lassen
(9) 1h bei 4°C und 100.000 zentrifugieren, Überstand (Ü4) dekantieren, das Pellet (P4) verwerfen
(10) Ü4 mit gleichem Volumen an REA-8M und GTP in Endkonzentration von 1mM versetzen und bei 37°C für 30 min polymerisieren
(11) getrübte Lösung 1h bei 30°C und 100.000g zentrifugieren, Überstand (Ü5) verwerfen und tubulinhaltiges Pellet (P5) durch Zugabe von eiskaltem REA (1/4 Volumen Ü4) resuspendieren und pottern, anschließend Depolymerisation 30min auf Eis

(12) 1h bei 4°C und 100.000g zentrifugieren, das Pellet (P6) verwerfen, tubulinhaltigen Überstand (Ü6) aliquotieren und direkt in flüssigem Stickstoff einfrieren, Lagertemperatur -70°C

7.2.9.2.1 Lösungen und Puffer

<u>REA-Puffer:</u>
100mM MES
1mM EGTA
0,5 mM $MgCl_2$
mit NaOH pH 6,4 einstellen

<u>REA-4M</u>
wie REA + Glyzerin 4M

<u>REA-8M</u>
wie REA + Glyzerin 8M

<u>GTP-Lösung:</u>
50mM GTP in REA (44mg/1,5ml)

7.2.10 Mikrotubuli-Polymerisationsassay

Im *in vitro* Polymerisationsassay macht man sich die Polymerisationsfähigkeit von unversehrtem Mikrotubuliprotein bei 37°C in Anwesenheit von GTP zu Nutze, um den Einfluß verschiedener Substanzen auf diese Polymerisationsfähigkeit zu überprüfen.
Das Ausmaß der MTP-Polymerisation ist direkt proportional zur Absorption der MTP-Lösung bei 350 nm.

<u>Ansätze:</u>

<u>Positivkontrolle:</u> 62,5 µl Tubulin
437,5 µl REA-Puffer

Die Reaktion wird gestartet mit 10µl GTP (aus 50µM⇒1µM im Ansatz); die photometrische Messung erfolgt bei 350 nm und 37°C.
Über einen Meßzeitraum von 15-20 Minuten wird zu verschiedenen Zeitpunkten die Absorption bestimmt. Nach 20 min wird die Küvette aus dem Photometer entnommen und 10 min auf Eis gestellt, um die Depolymerisation zu überprüfen.
Bei Untersuchung von Substanzen wird der Gesamtansatz mit Substanz 20min auf Eis vorinkubiert.

Hemmstoff-Kontrollen:
Für die Überprüfung der Polymerisationshemmung wird Colchicin aus einer Stammlösung (1mg/ml) 1:250 verdünnt in den Ansatz gegeben (1:25 in REA, dann 50 µl in Gesamtansatz)
Für die Überprüfung der Depolymerisationshemmung wird Taxol aus einer Stammlösung (1mg/ml) 1:120 verdünnt dem Ansatz hinzugefügt(1:12 in REA, dann 50 µl in Gesamtansatz)

Ansätze mit Substanz:
Substanz aus 10^{-3}M Stammlösung entnehmen
für 10µM 5µl
für 20µM 10µl
für 30µM 15µl
Das Puffervolumen muß entsprechend verringert werden.

7.2.10.1 Immunhistochemische Färbung von Mikrotubuliproteinen

Adhärente Zellen werden 24 h auf Objektträgern anheften lassen (Zellzahl ca. 5000 Zellen/Objektträger) und dann für eine gewünschte Zeit mit Substanz inkubiert. Zur Fixierung der Zellen werden die OTs eine Stunde in eiskaltem Methanol bei -20°C gelagert. Nach weiteren 10 min in eiskaltem Aceton im Kühlfach werden die Objektträger 3×5min mit PBS gewaschen.
90 µl/OT Ziegenserum werden zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen zugegeben und 30 min bei 37°C mit Deckglas in feuchter Wärme inkubiert.
Nach 30 min werden die Deckgläser entfernt und die Objektträger kurz mit PBS gespült.
Anschließend erfolgt die Inkubation mit je 100µl/OT Anti-α-Tubulin Antikörper (monoklonal, Sigma-Immunochemicals)(Verdünnung 1:500 in PBS/1%BSA) für 1h bei 37°C in feuchter Hitze.
Nach drei 5minütigen Waschgängen mit PBS erfolgt die Inkubation mit 100µl/OT Cy3-goat anti mouse IgG (Dianova)(Verdünnung 1:150in PBS/1%BSA) für 1h bei 37°C in feuchter Wärme.
Die Objektträger werden weitere 3×5min in PBS gewaschen und mit je 30µl Antifade/DAPI/Propidiumiodid-Gemisch gefärbt.
Die Auswertung der Proben erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie

7.2.11 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine besonders geeignete immunologische Technik zum Nachweis von Proteinen in einer Zelle oder Körperflüssigkeit, die nur in geringen Mengen vorliegen. Sie ermöglicht das Auffinden eines bestimmten Proteins in einer komplexen Mi-

schung. Dafür wird das Protein zunächst einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine werden dann in einer speziellen Blotting-Apparatur auf einen Nitrozellulosefilter übertragen („Blotting“). Diese Technik macht die Reaktion mit einem für ein spezielles Protein spezifischen Antikörper möglich, und es bildet sich auf der Membran ein Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser wird mittels eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, der als Konjugat mit einem radioaktiven Molekül oder mit einem bestimmten Enzym (z.B. Peroxidase) zugegeben wird.
Dies ruft eine Schwärzung auf einem Röntgenfilm bzw. eine spezifische Farbreaktion hervor.

7.2.11.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese(SDS-PAGE)

7.2.11.1.1 Herstellung eines SDS-Geles und Elektrophorese

Die Methode erfolgt nach Laemmli (1970). Die Lösung für das Trenngel wird bis ca. 1 cm unter den Rand der Glasplatten eingefüllt und mit Isobutanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach Polymerisation des Trenngels wird der Alkohol sehr gründlich ausgespült und das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet, die durch Einsetzen eines Kammes Taschen erhält, in die die Proben später hineinpipettiert werden.
Nach Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Proben werden unmittelbar vor der Elektrophorese in die Taschen geladen.
Die Auftrennung der Proteine erfolgt in Elektrophoresepuffer bei einer konstanten Spannung von 100V.

7.2.11.1.2 Lösungen und Puffer

<u>Tris-Puffer:</u>

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
Tris-Hcl,pH6,8	0,5 M

<u>Acrylamidlösung (fertig vorhanden von Life Technology):</u>

30% Acrylamid
0,8% N´N´Methylbisacrylamid

Trenngel:

(Mengen für ein Minigel)

Konz.Trenngel	**8%**	**10%**	**12%**
H_2O	4,72 ml	3,3 ml	3,44 ml
Tris (1,5 M)	2,46 ml	4,1 ml	2,46 ml
Acrylamidlösung	2,66 ml	2,44 ml	3,94 ml
SDS(10%)	98,4 µl	98,4 µl	98,4 µl
APS (10%)	49,2 µl	49,2 µl	49,2 µl
TEMED	4,92µl	4,92 µl	4,92 µl

Sammelgel:

für ein Minigel

H_2O	1,2 ml
Tris (0,5M)	0,5 ml
Acrylamidlösung	0,25 ml
SDS(10%)	20 µL
APS (10%)	20 µl
TEMED	2 µl

Elektrophorese-Laufpuffer:

Tris	25 mM, pH 8,3
Glycin	200 mM
SDS	0,1%

SDS-Probenpuffer (100ml):

Tris(0,5M)	50 ml
Glyzerin	40 ml
ß-Mercaptoethanol	5%
SDS	1,24 g
Bromphenolblau	0,16 g

pH 6,8

7.2.12 Elektroblotting

Die Übertragung und Fixierung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Amersham-Nitrozellulosemembran (Hybond C) erfolgt nach der semi-dry Methode [Towbin et al.,1979]. Dafür wird das Gel kurze Zeit in Blotting-Puffer äquilibriert, sowie alle Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran ebenfalls kurz mit Blotting-Puffer getränkt.

Blotaufbau:
1. Anode
2. 2 Filterpapiere
3. Nitrozellulosefilter
4. SDS-Gel
5. 2 Filterpapiere
6. Kathode

Alle Filterpapiere und die Nitrozellulose werden luftblasenfrei übereinander gelegt, was für eine einwandfreie Übertragung sehr wichtig ist.
Das Blotten erfolgt bei einer Stromstärke von 50 mA/Gel für 90min.
Nach Abschluß des Elektro-Blottings wird die Nitrozellulose für das Immunoblotting weiterverwendet.
Nach dem Blotten besteht die Möglichkeit das Gel mit Comassie-Brilliant-Blue-Lösung über Nacht zu färben, da auch bei sehr guter Übertragung immer noch Proteinreste auf dem Gel zurückbleiben, die nach zweistündiger Entfärbung des Gels sichtbar werden.

7.2.12.1.1 Lösungen und Puffer:

<u>Blotting-Puffer:</u>

Glycin	39 mM
Tris	48 mM
SDS	0,037%
Methanol	20%

<u>Färbelösung:</u>
ComassieBrilliantBlue
Essigsäure 10%

<u>Entfärber:</u>
10% Essigsäure in H_2O

7.2.12.2 Immunoblotting

Nach Entnahme der Nitrozellulose aus der Blotting-Apparatur wird die Membran zum Blokkieren aller nicht mit Protein besetzten Stellen entweder 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer frisch angesetzten PBS-3% BSA-Lösung inkubiert.
Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit Primär-Antikörperlösung in benötigter Verdünnung 1-1,5 h bei RT inkubiert, danach 3×10min mit PBS/Tween (0,3%) gewaschen, um einen Überschuß an Primärantikörper zu entfernen.

Die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundär-Antikörper erfolgt für 1-1,5 h bei Raumtemperatur, wobei wiederum mit drei Waschschritten mit PBS/Tween(0,3%) der Antikörper-Überschuß entfernt wird.
Zur Detektion der gesuchten Proteine wird die Nitrozellulosemembran 1min in Enhanced-Chemiluminiscence-Lösung geschwenkt, die aufgrund der Reaktion mit dem peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper Lichtsignale auslöst, die auf einem Röntgenfilm eine Schwärzung hervorrufen.

7.2.13 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion

7.2.13.1 Morphologische Untersuchungen

Morphologische Veränderungen von mit Substanz inkubierten Zellen werden durch die Anfärbung von Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und Sulforhodamin 101 untersucht. DAPI färbt die DNA des Zellkerns, während Sulforhodamin 101 das Zytoplasma anfärbt .
Adhärente Zellen werden auf Objektträger ausgestreut (10000 Zellen/OT) und nach dem Anwachsen mit Substanz inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit werden die Zellen in Methanol bei – 20°C für mindestens 1h fixiert, mit dem Farbstoffgemisch angefärbt, im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und photographiert.
Zellsuspensionen wurden in der Kulturflasche bei einer Zelldichte von 1×10^6/ml inkubiert und am Ende der Inkubation mit einer Zell-Zentrifuge auf Objektträger zentrifugiert. Danach erfolgte die Färbung und die Detektion im Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 380 nm; Emission: 488 nm).

7.2.13.2 Durchflußzytometrie

Zur Untersuchung der apoptoseinduzierenden Wirkung von Substanzen wird zusätzlich die Methode der Durchflußzytometrie eingesetzt. Dafür wurden Petrischalen mit 10 mm Durchmesser mit 10^6 Zellen/Schale angesetzt und mit Substanz inkubiert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 24 und 72 h. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gespült und dann abtrypsiniert. Dabei wird die gesamte Flüssigkeit in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und bei 150-200 × g abzentrifugiert. Das Pellett wird erneut mit PBS gewaschen und dann zur Aufbewahrung bei 4°C in 1ml Ethanol (70%). aufgenommen.
Für die Durchflußzytometrie werden die Zellen wieder abzentrifugiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur in 500 µl Kernisolationspuffer lysiert. Zur Färbung des Zellkerns und des Zytoplasmas wird anschließend ein Gemisch aus DAPI/Sulforhodamin 101 hinzugefügt und mindestens 30 min bei RT inkubiert.
Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

DAPI/ Sulforhodamin 101:

Tris-HCl, pH 7,6	0,2 M
NaCl	0,2 M
DAPI	8 µM
SR 101	50 µM

mit H_2O bidest. lösen

8 Literaturverzeichnis

Akiyama T., Yoshida T., Tsujita T., Shimizu M., Mizukami T., Okabee M. und Akinaga S., G1 Phase accumulation induced by UCN-01 is associated with dephosphorylation of Rb and CDK 2 proteins as well as induction of CDK inhibitor p21/Cip1/WAF1/Sdi1 in p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells, Cancer Research, **57**, 1495-1501, 1997

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Molekularbiologie der Zelle, 3.Auflage, Garland Publishing Inc., New York, 1995

Ames L.A., Baker T.S., The three dimensional structure of tubulin protofilaments, Nature, **279**, 607-612, 1979

Anizon F., Belin L., Moreau P., Sancelme M., Voldoire A., Prudhomme M., Ollier M., Severe D., Riou J.F., Bailly C., Fabbro D. and Meyer T., Synthesis and biological activities (Topoisomerase inhibition and antitumor and antimicrobial properties) of rebeccamycin analogues bearing modified sugar moieties and substituted on the imide nitrogen with a methyl group, Journal of medical chemistry, **40**, 3456- 3465, 1997

Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K., and Nishizuda Y., Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation, TIBS, **17**, 414-417, 1992

Austin C.A., Patel S., Ono K., Nakane H., and Fisher L.M., Site-specific cleavage by mammalian topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives, Biochemical Journal, **282**, 883-889, 1992

Azzi A., Boscoboinik D., Hensey C., The protein kinase C family, European Journal of Biochemistry, **208**, 547-557, 1992

Bailly C., Riou J.F., Colson P., Houssier C., Rodrigues-Pereira E., and Prudhomme M., DNA cleavage by topoisomerase I in the presence of indolocarbazole derivatives of rebeccamycin, Biochemistry, **36**, 3917-3929, 1997

Bakhmedova A.A., Garaeva L.D., Goryunova O.V., Miniker T.D., Plikhtyak I.L., Ektova L.V., Adanin V.M., Ivanova T.P., Yartseva I.V., and Melnik S.Y., N-Glykosides of indolo[2,3-α]carbazole derivatives, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, **23** (8), 667-674, 1997

Bartik K., Braekman J.C., Daloze D., and Stoller C., Topsentins, new toxic bis-indole alkaloids from the marine sponge *Topsentia genitrix*, Canadian Journal of Chemistry, **65**, 2118-2121, 1987

Bear H.D., McFadden A.W.J., Kostuchenko P.J., Lipshy K.A., Hamad G., Turner A.J., Roberts J.D., Carr M., Carr S., and Grant S., Bryostatin 1 activates splenic lymphocytes and induces sustained depletion of splenocyte protein kinase C activity in vivo after a single intravenous administration, Anti-cancer drugs, **7**, 299-306, 1996

BerridgeM.J. and Irvine R.F., Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, Nature, 312, (5992), 315-321, 1984

Boege F., Straub T., Kehr A., Boesenberg C., Christiansen K., Andersen A., Jakob F., and Köhrle J., Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I, Journal of biological chemistry, **271** (4), 2262-2270, 1996

Boege F., Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects, European Journal of Clinical Chemistry and clinical Biochemistry, **34**, 873-888, 1996

Boucher D., Larcher J.C., Gros F., and Denoulet P., Polyglutamation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein tau and tubulin, Biochemistry, **33**, 12471-12477, 1994

Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, **72**, 248-254, 1976

Capranico G., Binaschi M., Borgnetto M.E., Zunino F., and Palumbo M., A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons, Trends in pharmacological science **18**, 323-329, 1996

Capranico et al., DNA topoisomerase II poisons and inhibitors, Cancer Chemother.Biol. Respose Modif., **17**, 114-131, 1997

Chattopadhyay U., Chaudhuri L., Das S., Kumar Y. and Ghosal S., Activation of lymphocytes by lycorine-1-O-ß-D-glucoside, Pharmazie, **39**, 855-856, 1984

Chen A.Y., Chiang Y., Gatto B. and Liu L.F., DNA minor groove binding ligands: A different class of mammalien DNA topoisomerase I inhibitors, Proceeding of the national academy of science USA, **90**, 131-135, 1993

Chen A.Y., and Liu L.F., DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets, Annual reviews in Pharmacological toxicology, **34**, 191-218, 1994

Chi C., Integrating traditional medicine into modern health care sytems: examing the role of chinese medicine in taiwan, Soc. Sci. Med., **39** (3), 307-321, 1994

Constantinou A., Kiguchi K. and Huberman E., Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL60 and K562 leukemia cells by genistein, Cancer research, **50**, 2618-2624, 1990

Constantinou A., Mehta R., and Runyan C., Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships, Journal of Natural Products, **58** (2), 217-225, 1995

Corbett A.H. and Osheroff N., When good enzymes go bad: Conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs, Chemical research in toxicology, **6** (5), 585-591, 1993

Courage C., Snowden R. and Gescher A., Differential effects of staurosporine analogues on cell cycle, growth and viability in A549 cells, British Journal of Cancer, **74**, 1199-1205,1996

D´Arpa P. and Liu L.F., Topoisomerase-targeting drugs, Biochimica et biophysica acta, **989**, 163-177, 1989

Dickmann S., Untersuchungen zur Proteinkinase C Isoenzymausstattung von der humanen Tumorxenograft LXFL 529 und Hemmung durch neue Bisindolylglykoside, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 1996

El-Deiry W.S., Tokino T.,Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W. and Vogelstein B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, Cell, **75**, 817-825, 1993

El-Deiry W.S., Harper J.W., O´Connor P.M., Velculesco V.E., Canman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., Wilman K.G., Mercer W.E., Kastan M.B., Kohn K.W., Elledge S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B., WAF1/Cip1 is induced in p53 mediated G1 arrest and apoptosis, Cancer research **54**, 1169-1174, 1994

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Walters C.M., Penn L.Z., Hancock D.C., Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc, Cell, **69**, 119-128, 1992

Ewen M., Sluss H.K., Whitehouse L.L., Livingston D.M., TGFß Inhibition of cdk-4 synthesis is linked to cell cycle arrest, Cell, **74**, 1009-1020, 1993

Fabre S., Prudhomme M., Sancelme M., and Rapp M., Indolocarbazole protein kinase C inhibitors from rebeccamycin, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2** (2), 73-77, 1994

Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L. and Henson P.M., Exposure of phosphatidylserin on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, Journal of Immunology, **148** (7), 2207-2216, 1992

Fang F.D., Wu G.Y., Advances in the studies of the anticancer effect of indirubin, Chinese Journal of International Medicine **21**, 312-14, 1982

Furusawa E., Irie H., Combs D., and Wildman W.C., Therapeutic activity of prezattine on Rauscher leukemia: Comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids, Chemotherapy, **26** (1), 1980

Gabrielsen B., Monath T.P., Huggins J.W., Kefauver D.F., Pettit G.R., Groszek G., Hollingshead M., Kirsi J., Shannon W.M., Schubert E.M., Dare J., Ugarkar B., Ussery M.A., Phelan M.J., Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances, Journal of Natural Products, **55**, 1569- 1581, 1992

Gedik C.M., Ewen S.W.B. and Collins A.R., Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, Radiation Biology, **62** (2), 313-320, 1992

Ghosal S., Shanthy A., Kumar A. and Kumar Y., Palmilycorine and Lycoroside: Acyoxy and acylglucoyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*, Phytochemistry, **24** (11), 2703-2706, 1985

Ghosal S., Kumar Y., Singh S.K., and Kumar A.: Chemical constituents of Amaryllidaceae, Part 21, Ungeremine and criasbetaine, two antitumor alkaloids from *Crinum asiaticum*, Journal of Chemical Research, 112-113, 1986

Ghosal S., Singh S.K., Kumar Y., Unnikrishnan S., and Chattopadhyay U., The role of ungeremin in the growth-inhibition and cytotoxic effects of lycorine: evidence and speculation, Planta medica, **54**, 114-116, 1988

Giaccone G., DNA topoisomerases and topoisomerase inhibitors, Path. Biology, **42** (4), 346-352, 1994

Gieseler F., Glasmacher A., Kämpfe D., Wandt H., Nuessler V., Valsamas S., Kunze J. and Wilms K., Topoisomerase II activities in AML blasts and their correlation with cellular sensitivity to anthracyclines and epidophyllotoxines, Leukemia, **10**, Suppl. 3, 46-49, 1996

Glazer A.N. and Rye H.S., Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorecence detection, Nature, **359**, 859-861, 1992

Gorczyca W., Gong J, Ardelt B., Traganos F and Darzynkiewicz Z., The cell cycle related differences in susceptitibility of HL-60 Cells to apoptosis induced by various Antitumor Agents, Cancer research **53**, 3186-3192, 1993

Gordge P.C. and Ryves W.J., Inhibitors of protein kinase C, Cellular signaling, **6** (8), 871-882, 1994

Green D.R. and Reed J.C., Mitochondria and apoptosis, Science, **281**,1309-1316, 1998

Grunicke H. and Überall F., Protein Kinase C modulation, Seminars in Cancer Biology, **3**, 351-360,1992

Gu Y.C., Li G.L., Yang Y.P., Fu J.P., and Li C.Z., Synthesis of some halogenated indirubin derivatives, Acta pharmaceutica sinica, **24** (8), 629-632, 1989

Hackett A.M., The metabolism of flavonoid compounds in mammals, Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships, 177-194, 1986

Hertzberg R.P., Caranfa M.J., and Hecht S.M., On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex, Biochemistry, **28** (11), 1989

Hockenbery D., Defining Apoptosis, American Journal of Pathology, **146** (1), 16-18, 1995

Hoessel R., Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 1995

Hollmann P.C.H., Hertog M.G.L., and Katan M.B., Analysis and health effects of flavonoids, Food Chemistry, **57** (1), 43-46, 1996

Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S. and Liu L.F, Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian topoisomerase I, The Journal of Biological Chemistry, **260** (279), 14873-14878, 1985

Hsiang Y.H., Lihou M.G. and Liu L.F., Arrest of replikation forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable-complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, Cancer reseach, **49**, 5077-5082, 1989

Huang H.C., Hsieh L.M., Chen H.W., Lin Y.S. and Chen J.S., Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factor expression in T-lymphoid leukemia cells, European Journal of Pharmacology, **268**, 73-78, 1994

Indirubin Cooperative Group, Clinical study of indirubin in the treatment of 314 patients with chronic granulocytic leukemia, Chinese Journal of Hematology, **1**, 132, 1980

Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. und Imahori K., Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired filaments, The Journal of Biological Chemistry, **267**, 10891-10901,1992

Issacs R.J., Davies S.L., Wells N.J., and Harris A., Topoisomerase II α and β as therapy targets in breast cancer, Anti-Cancer Drugs, **6**, 195-211, 1995

Jaxel C., Capranico G., Kerrigan D., Kohn K.W., Pommier Y., Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin, The Journal of Biological Chemistry, **266**, 20418-20423, 1991

Jenkins J.R., Ayton P., Jones T., Davies S.L., Simmons D.L., Harries A.L., Sheer D., and Hickson I.D., Isolation of cDNA clones encoding the β isoenzyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24, Nucleic Acid Research, **20**, 5587-5592, 1992

Juan C.C., Hwang J.H., Liu A.A., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C.M., Zhang H., Wang J.C., and Liu L., Human topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2, Proceedings of the national academy of science USA, **85**, 8910-8913, 1988

Kamb A, A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types, Science, **264**, 436-440, 1994

Kasten M.M. and Giordano A., pRb and the CDKs in apoptosis and the cell cycle, Cell death and differentiation, **5**, 132-140, 1998

Kirschner M. and Mitchinson T., Beyond self-assembly. From microtubules to morphogenesis, Cell, **45**, 329-342, 1986

Krauss G., Biochemie der Regulation und Signaltransduktion, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 1997

Krogh S., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J., Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature, Nucleid Acid Research, **19**, 1235-1241, 1991

Kukhanova M., Victorova L. and Krayevski A., Peptidyltransferase center of ribosomes, On the mechanism of action of alkaloid lycorine, FEBS, **160** (1,2),129-133, 1983

Lämmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, **227**, 680-685, 1970

Lane D.P., Cancer. A death in the life of p53, Nature, **362**, 786-787, 1993

Larsen A.K., Grondard L., Couprie J., Desoize B., Comoe L., Jardillier J.C., and Riou J.-F., The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerases I and II, Biochemical pharmacology, **46** (8), 1993

Lauk U., Dürst D., Fischer W., Total synthesis of the amaryllidaceae alkaloid ungeremine, Tetrahedron Letters, **32**, 65-68, 1991

Lawrie A. M., Noble M.E.M., Tunnah P., Brown N.R., Johnson L.N., and Endicott J.A., Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with cdk 2, Nature structural biology, **4** (9), 796-800, 1997

Lee G., Tau protein: an update on structure and function. Cell.Motil.Cytoskeleton **15**,199-203, 1990

Lee K.H., Sun L., and Wang H.K., Antineoplastic alkaloids from chinese plants and their analogs, Journal of the chinese chemical society, **41**, 371-384, 1994

Levy J., Teuerstein I., Marbach M., Radian S., and Sharoni Y., Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: inhibition by quercetin, Biochemical and biophysical research communications, **123**, 1227-1233, 1984

Li B.Q., Fu T., Baylor N.W., Ruscetti F.W. and Kung H.F., Inhibition of HIV infection by baicalin - a flavonoid compound purified from chinese herbal medicine, Cellular and Molecular Biology Research, **39**, 119-124, 1993

Likhitwitayawuid K., Angerhofer C.K., Chai H., Pezzuto J.M. and Cordell G.A., Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of Crinum amabile, Journal of Natural Products, **56**, 1331- 1338, 1993

Lin C.C. and Shieh D.E., The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active compounds baicalin, baicalein and wogonin, American Journal of Chinese Medicine, Vol. **XXIV**, 1, 31-36,1996

Lin L.Z., Hu S.H., Chai H.B., Pengsuparp T., Pezzuto J.M., Cordell G.A., and Ruangrungsi N., Lycorine alkaloids from *hymenocallis littoralis*, Phytochemistry, **40** (4), 1295-1298, 1995

Lindwall G. and Cole R.D., Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly, The Journal of Biological Chemistry, **259** (8), 5301-5305, 1984

Liscovitch M., Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases, Trends in biochemical science, **17**, 393-400, 1992

Liu J., Yang S.L., and Xu B., Characteristics of the interaction of lycobetaine with DNA, Acta pharmacologica sinica, **10**, 437-442, 1989

Livneh E. and Fishman D.D., Linking protein kinase C to cell-cycle control, European Journal of Biochemistry, **248**, 1-9, 1997

Lozoya X., Pflanzliche Heilmittel gestern und heute, Spektrum der Wissenschaften, Spezial 6: Pharmaforschung, 1997

Lynn R.M., Bjornsti M.A., Caron P.R., Wang J.C., Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine 727 as the active site tyrosine of Saccharomyces cerevesiae DNA topoisomerase I, Proceedings of the national academy of science USA, **86**, 3559-3563, 1989

Majno G. and Joris I, Apoptosis, Oncosis and Necrosis, An overview of Cell Death, American Journal of Pathology, **146** (1), 3-15, 1995

Makhay D., Gatto B., Yu C., Liu A., Liu L.F. and LaVoie E.J., Coralyne and related compounds as mammalian topoisomerase I and topoisomerase II poisons, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **4** (6), 781-791, 1996

Matzuzaki Y., Kurokawa N., Terni S., Matsumura Y., Kobayashi N. Okita K., Cell death induced by Baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines, Japanese Journal of Cancer Research, **87**, 170-177, 1996

Marx J., How cells cycle towards cancer, Science, **263**, 319-321, 1994

Meijer L., Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, Prog. Cell Cycle research, **1**, 351-363, 1995

Meijer L., Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, Trends in Cell Biology, **6**, 393-397, 1996

Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P.J., Blow J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., and Moulinoux J.P., Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, European Journal of Biochemistry, **243**, 527- 536, 1997

Melnik S.Y., Bakhmedova A.A., Garaeva L.D., Goryunova O.V., Miniker T.D., Plikhtyak I.L., Ektova L.V. and Yartseva I.V., Synthesis and antiproliferative properties of bis(indolyl)furan-2,5-dione and bis(indolyl)-1H-pyrrole-2,5-dione N-Glykosides, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, **22** (6), 397-405, 1996

Melnik S.Y., Bakhmedova A.A., Garaeva L.D., Miniker T.D., Plikhtyak I.L., Ektova L.V. Ivanova T.P., Adanin V.M. and Yartseva I.V., Synthesis and antiproliferative properties of 3-(1H-3-indolyl)-4-(1-glycosyl-3-indolyl)-1H-pyrrole-2,5-diones, Russian Journal of Bio-organic Chemistry, **22** (11), 726-731, 1996

Mizushima Y., Kashii T., Tokimitsu Y., and Kobayashi M., Cytotoxic effect of herbal medicine Sho-saiko-to on human lung cancer cell lines *in vitro*, Oncology Reports, **2**, 91-94, 1995

Morgan A.R., Lee J.S., Pulleyblank D.E., Murray N.L. and Evans D.H., Review: ethidium fluorescence assays. Part 1. Physiochemical studies, Nucleid Acid Research, **7** (3) 547-569, 1979

Morgan D.O., Principles of cdk regulation, Nature, **374**, 131-134, 1995

Moreau P., Anizon F., Sancelme M., Prudhomme M., Bailly C., Carrasco C., Ollier M., Sevére D., Riou J-F., Fabbro D., Meyer T., and Aubertin A.-M., Synthesis and biological evaluation of indolocarbazoles, analogues of rebeccamycin, modified at the imid heterocycle, Journal of medical chemistry, **41**, 1631-1640, 1998

Motoo Y., Sawabu N., Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines, Cancer Letters, **86**, 91-95, 1994

Müller W.E.G. und Schröder H.C., Bioaktive Substanzen aus Schwämmen, Biologie in unserer Zeit, **6**, 389-397, 1997

Nevins J.R., E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins, Science **258**, 424, 1992

Newton A.C., Protein kinase C: Structure, function and regulation, The Journal of Biological Chemistry, **270** (48), 28495-28498, 1995

Nishizuka Y., The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, Nature, **308** (5961), 693-698, 1984

Nishizuka Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, Science, **258**, 607-612, 1992

Ohkuboo M., Kawamoto H., Ohno T., Nakano M. and Morishima H., Synthesis of NB-506 , a new anticancer agent, Tetrahedron, **53** (2), 585-592, 1997

Okura A., Arakawa H., Oka H., Yoshinari T., and Monden Y., Effect of Genistein on topoisomerase activity and on the growth of (val12) Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells, Biochemical and biophysical research Communication, **157**, 183-189, 1988

Olive P.L., Banath J.P., and Durand R.E., Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet"-assay, Radiation research, **122**, 86-94, 1990

Osborn M. and Weber K., Cytoplasmatic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membran, Proceedings of the national academy of science, **73** (3), 867-871, 1976

Osheroff N., Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turn over, Journal of biological chemistry, **261**, 9944-50,1986

Osheroff N., Biochemical basis for the interaction of type I and type II topoisomerases with DNA, Pharmacological therapy, **41**, 223-241, 1989

Pagano M., Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway, FASEB Journal, **11**, 1067-1075, 1997

Pettit G.R., Gaddami V., Goswami A., and Cragg G.M., Antineoplastic agents, 99. Amaryllis belladonna., Journal of Natural Products, **47**, 796-801, 1984

Pines J., Cyclins,CDKs and cancer, Seminars in Cancer Biology, **6**, 63-72, 1995

Pommier Y., Covey J.M., Kerrigan D., Markovits J and Pham R., DNA unwinding and inhibition of mouse leukemia L1210 topoisomerase I by intercalators, Nucleid acid research, **15**, 6713- 6731, 1987

Pommier Y., Leteurtre F., Fesen M.R., Fujimori A., Bertrand R., Solary E., Kohlhagen G., Kohn K.W., Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors, Cancer investigations, **12**, 530-542, 1994

Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D., Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, Biochimica et biophysica acta, **1400**, 83-106, 1998

Pommier Y., Diversity of topoisomerases I and inhibitors, Biochimie, **80** (3), 255-270, 1998

Potmesil M., Camptothecins: From bench research to hospital wards, Cancer Research, **54**, 1431-1439, 1994

Raff M.C., Social controls on cell survival and cell death, Nature, **356**, 397-400, 1992

Ranganathan S., Dexter D.W., Benetatos C.A., Chapman A.E., Tew K.D. and Hudes G.R., Increase of ßIII- and ßIVa-tubulin isotypes in human prostate carcinoma cells as a result of estramustin resistance, Cancer research, **56**, 2584- 2589, 1996

Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y, Kihara M, aand Kobayashi S., Research in Virology, **140**, 115-128, 1989

Richter G., Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 5.Auflage, Thieme Verlag 1988

Römpp Chemielexikon, Version 1.3, CD-ROM, Thieme Verlag, 199?

Russo A.A., Jeffrey D.P., Patten A.K., Massague J. and Pavletich N.P., Crystal structure of the p27^{KIP1} cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-cdk2-complex, Nature, **382**, 325-331, 1996

Serrano M., Hannon G.J. and Beach D., A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cycli D/CDK 4., Nature, **366**, 267, 1993

Shariff E and Luna E.J., Biological actions of DAG that are related to PKC activation cannot be excluded, Science, **256**, 245, 1992

Shekan P., Storeng P. and Scusiero D., New colorimetric assay for anticancer drug screening, National Cancer Institute, **82**, 1107-1112, 1991

Shelanski M.L., Gaskin F., Cantor C.R., Microtubuli assambly in the absence of added nucleotides, Proceeding of the national academy of science USA, **81**, 5989-5993, (1973)

Sherr C.J., Cancer Cell Cycles, Science, **274**, 1672-1677, 1996

Singh N.P., Mc Coy M.T., Tige R.R. and Schneider E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Experimental cell research, **175**, 184-191, 1988

Spacey G.D., Uings I.J., Slater M., Hirst S., and Bonser R.W., Indolocarbazoles, potent and selective inhibitors of platelet-derived growth factor receptor autophosphorylation, Biochemical Pharmacology, **55**, 261- 271, 1998

Steller H., Mechanisms and genes of cellular suicide, Science, **267**, 1445-1449, 1995

Strasser A., Huang D.C., Vaux D.L., The role of bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy, Biochimica et biophysica acta, **1333**, F151-F178, 1997

Stryer L., Biochemie, Spektrum Verlag, 5. Auflage, 1991

Suda T., Takahashi T., Goldstein P., and Nagata S., Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis family, Cell, **75**, 1169-1178, 1993

Sullivan D.M., Latham M.D., Ross W.E., Proliferation-dependent topoisomerase II content as a determinant of antineoplastic drug action in human, mouse, and Chinese hamster ovary cells, Cancer research **47**, 3973-3979, 1987

Taga T. and Kishimoto T., Cytokine receptors and signal transduction, FASEB, **6** (15), 3387-3396, 1992

Takano H., Kohno K., Matsuo K., Matsuda T. and Kuwano M., DNA topoisomerase-targeting antitumor agents and drug resistance, Anticancer Drugs, **3**, 323-330, 1992

Tamaoki T., Nomoto H., Takahashi I,, Kato Y., Morimoto M., Tomita F., Staurosporin, a potent inhibitor of phopsholipid/Ca^{++} dependent protein kinase, Biochemical Biophysical research communications, **135** (2), 397-402, 1986

Thomson T. and Kewitz H., Life Sciences, **46**, 1553-1557, 1990

Thompson C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science, **267**,1456-1462, 1995

Thornberry N.A. and Lazebnik Y., Caspases: Enemies within, Science, **281**, 1312-1316, 1998

Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissini P., Boursier E., Loriolle F., Duhamel L., Charon D. and Kirilovsky J., The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C, The Journal of Biological Chemistry, **266** (24), 15771-15781, 1991

Towbin H., Staehlin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidgels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications., Proceedings of the national academy of science USA, **76**, 4250, 1979

Traxler P., Furet P., Mett H., Buchdunger E., Meyer T. and Lydon N., Design and synthesis of novel tyrosine kinase inhibitors using a pharmacophore model of the ATP-binding site of the EGF-R, Journal of Pharmacology Belg., **52** (2), 88-96, 1997

Tsai-Pflugfelder M., Liu L.F., Liu A.A., Tewey K.M., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C.M., Wang J.C., Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gen to chromosome region 17q21-22, Proceedings of the national academy of science USA, **85** (19), 7177-7181, 1988

Tsujii S., and Rinehart K.L., Topsentin, bromotopsentin, and dihydrodeoyxbromotopsentin: antiviral and antitumor bis(indolyl)imidazol from caribean deep-sea sponges of the family halichondriidae. Structural and synthetic studies, Journal of Org. Chemistry, **53**, 5446-5453, 1988

Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., and Jang J., Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease, Journal of agricular food chemistry, **43**, (11), 1995

Vrijsen R., Dirk A.,Berghe V., Vlietink A.J., and Boeyé A., Lycorine: A eukaryotic inhibitor of termination?, The Journal of Biological Chemistry, **261** (2), 505-507, 1986

Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B., The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor directly controls DNA replication via interaction with PCNA, Nature, **369**, 574-578, 1994

Wall M.E., Wani M.C., Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic - Thirteen Bruce F. Cain memorial award lecture, Cancer research, **55**,753-760, 1995

Wallin M., Microtubules. In: R.Dulbecco: Encyclopedia of Human Biology. Academic Press, New York, 11-29, 1991

Wang H., Gupta R., and Lown W., Synthesis, DNA binding, sequence preference and biological evaluation of minor groove selective N1-alkoxyalkyl-bis-benzimidazoles, Anti-Cancer Drug Design, **9**, 153-180, 1994

Wang J.C., DNA topoisomerases, Annual reviews in biochemistry, **54**, 665-697, 1985

Wang L.K., Johnson R.K. and Hecht S., Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronin, Chemical research in toxicology, **6**, 813-818, 1993

Wang L.K., Rogers B.D. and Hecht S., Inhibition of topoiosmerase I function by coralyne and 5,6-dihydrocoralyne, Chemical research in toxicology, **9**, 75-83, 1996

Webb C.D., Latham M.D., Lock R.B., Sullivan D.M., Attenuated topoisomerase II content directly correlates with a low level of drug resistance in a chinese ovary cell line, Cancer research, **51**, 6543-6549, 1991

Weniger B., Italiano L., Beck J.P., Bastida J., Bergonon S., Codina C., Lobstein A., and Anton R.,Cytotoxic activity of Amaryllidaceae Alkaloids, Planta medica, **61**,77-79, 1995

Wu Y.L., Liu J.Z., Fang F.D., and Zuo J., Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granulocytic leukemia, Scienta Sinica, Ser **B.25**, 1071-1079, 1982

Xu B., The influence of several anticancer agents on cell proliferation, differentiation and the cell cycle of murine erythroleukemia cells, American Journal of Chinese Medicine, **9** (4), 268-276, 1981

Xu B., Recent advances in pharmacological study of natural anticancer agents in china, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **86**, Suppl. II, 51-54, 1991

Yano H., Mizoguchi A., Fukuda K., Haramaki M., Ogasawara S., Momosaki S., and Kojiro M., The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G_0/G_1-Phase, Cancer Research, **54**, 448-454, 1994

Zhang S.Y., Lu F.L., Yang J.L., Wang L.J. and Xu B., Effects on animal tumors and toxicity of lycobetaine acetate, Acta pharmacologica sinica, **2**, 41-45, 1981

Zhao R., al-Said N.H., Sternbach D.L., and Lown J.W., Camptothecin and minor-groove binder hybrid molecules: synthesis, inhibition of topoisomerase I, and anticancer cytotoxicity in vitro, Journal of Medical Chemistry, **40** (2), 216-225, 1997

9 Anhang

9.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

9.1.1 Wachstumshemmende Wirkung

Tabelle 16a: Wachstumshemmende Wirkung von Alkaloiden, Flavonen und indigoiden Bisindolen, Sulforhodamin B-Assay, 72h Inkubation, IC_{50} [µM]

Substanz	LXFL 529L	Molt4	HL60	K562	U937	MCF-7	Jurkat
Lycorin	0,09	0,9 ± 0,2	3 ± 0,5	2 ± 0,8	1,5 ± 1	n.b.	n.b.
Lycobetain	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4	1,3 ± 0,5	0,8 ± 0,03	2,5 ± 0,3	n.b.	n.b.
Baicalin	38 ± 4	48 ± 2	45 ± 6	n.b.	44 ± 2,5	31 ± 3	n.b.
Baicalein	26 ± 0,7	27 ± 3	35 ± 6	20 ± 5	n.b.	n.b.	22 ± 4
Skullcapflavon II	10 ± 2	n.b.	5,5 ± 0,5	22 ± 3	n.b.	n.b.	n.b.
Wogonin	>100	n.b.	>100	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Wogonosid	89 ± 11	n.b.	n.b.	32 ± 2	n.b.	>100	>100
Indirubin	9,7 ± 0,1	>10	4 ± 1	3 ± 1	>10	4,3 ± 2,3	>10
5-Jod-Indirubin	6 ± 0,5	6,7	3,4 ± 0,4	5,5 ± 0,4	0,8	4,5 ± 0,7	6,6
Diphenylbisindol	12 ± 3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Bisindolylindol	>50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Indigo	8 ± 1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Isoindigo	>50	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Deoxytopsentin	55 ± 10	28 ± 3	44	21,5 ± 0,5	43 ± 17	8	37

Tabelle 17b: Wachstumshemmende Wirkung von Inolocarbazolen und Bisindolylmaleimiden, Sulforhodamin B-Assay, 72h Inkubation, IC_{50} [µM], (alle Substanzen werden mit IC abgekürzt)

Substanz	LXFL529L
IC 1	41 ± 4,2
IC 2	6 ± 1,3
IC 3	22 ± 3,1
IC 4	0,09 ± 0,03
IC 5	3,6 ± 1,6
IC 6	1,8 ± 0,4
IC 7	3 ± 1
IC 8	1,1 ± 0,3
IC 9	6 ± 1,3
IC 10	3,4 ± 0,3
IC 11	50
IC 12	8,6 ± 2,4
IC 13	2,8 ± 0,2

9.1.2 Hemmung der Proteinkinase C

Tabelle 17: Inhibierung der Proteinkinase C-Aktivität an Rohextrakt und nach Inkubation in der Zellkultur, IC_{50} [µM]

Substanz	Rohextrakt	Zellkultur
Lycorin	>100	>100
Lycobetain	>100	>100
Baicalin	>100	>100
Baicalein	>100	>100
Skullcapflavon II	n.b	>100
Wogonin	n.b	>100
Wogonosid	n.b	>100
Indirubin	>10	>10
5-Jod-Indirubin	>10	>10
Bisindolylindol	n.b	n.b.
Indigo	n.b	n.b.
Isoindigo	n.b	n.b.
Deoxytopsentin	>100	n.b.
Indolocarbazol(IC)1	>50	>50
IC 2	0,7 ± 0,1	33 ± 3
IC 3	2 ± 0,6	>50
IC 4	3,6 ± 1,6	3,4 ± 1,5
IC 5	4 ± 0,2	31 ± 3,5
IC 6	8 ± 0,2	>50
IC 7	4,2 ± 0,1	>50
IC 8	3,2 ± 0,4	>50
IC 9	12,3 ± 0,3	>50
IC 10	0,4 ± 0,5	3,1 ± 0,1
IC 11	>50	>50
IC 12	35 ± 1	>50
IC 13	3,4 ± 0,01	>50

9.1.3 Hemmung von Topoisomerase I und II

Tabelle 18: Hemmung von humanen Topoisomerasen (Topo), Topoisomerase I im Relaxationsassay; Topoisomerase II im Relaxations- und Decatenationsassay, MIC [µM]

Substanz	Topo I (Relaxation)	TopoII (Relaxation)	TopoII (Decatenation)
Lycorin	>1000	>1000	>1000
Lycobetain	1	10	10
Baicalin	>1000	>1000	>1000
Baicalein	100	100	100
Skullcapflavon II	100	100	n.b
Wogonin	>1000	>1000	n.b
Wogonosid	>1000	>1000	n.b
Indirubin	>10	>10	n.b
5-Jod-Indirubin	>10	>10	n.b
Bisindolylindol	>10	n.b	n.b
Indigo	>10	n.b	n.b
Isoindigo	>10	n.b	n.b
Deoxytopsentin	>1000	n.b	n.b
IC 1	>1000	n.b.	>100
IC 2	>100	n.b	>100
IC 3	>100	n.b	>100
IC 4	100	n.b	>100
IC 5	0,1-1	n.b	>100
IC 6	10	n.b	1
IC 7	10	n.b	1
IC 8	>100	n.b	1
IC 9	>100	n.b	1
IC 10	>100	n.b	10
IC 11	10	n.b	>100
IC 12	10	n.b	>100
IC 13	10	n.b	>100

9.1.4 DNA-Interaktion

Tabelle 19: Ergebnisse zur DNA Interaktion, Hinweise auf DNA-Interkalation im Ethidiumbromidverdrängungsassay, Hinweise auf Bindung an die kleine Furche der DNA im Hoechst H33258-Verdrängungsassay, C_{50}[µM]

Substanz	Ethidiumbromid-Verdrängung	Hoechst H33258-Verdrängung
Lycorin	nicht nachweisbar (n.n.)	n.n.
Lycobetain	10,5 ± 2	1,3 ± 0,6
Baicalin	n.n.	n.n.
Baicalein	>100	35 ± 5
Skullcapflavon II	n.n.	n.n.
Wogonin	n.n.	n.n.
Wogonosid	n.n.	n.n.
Indirubin	*nachweisbar	*nachweisbar
5-Jod-Indirubin	*nachweisbar	*nachweisbar
Bisindolylindol	*nachweisbar	*nachweisbar
Indigo	*nachweisbar	*nachweisbar
Isoindigo	*nachweisbar	*nachweisbar
Deoxytopsentin	n.n	n.n.
Indolocarbazol(IC)1	>100	18 ± 2
IC 2	>100	19,5 ± 2
IC 3	>100	19 ± 0,3
IC 4	>100	0,7 ± 0,1
IC 5	>100	4,4 ± 1,5
IC 6	>100	2,7 ± 0,3
IC 7	>100	1,1 ± 0,1
IC 8	>100	0,9 ± 0,1
IC 9	>100	2,4 ± 1
IC 10	>100	3 ± 0,4
IC 11	>100	7 ± 0,1
IC 12	>100	0,5 ± 0,1
IC 13	>100	>20

.*nachweisbar: IC_{50} nicht ermittelbar, da die Substanzen sehr früh ausfallen

9.1.5 Nachweis von DNA-Strangbrüchen

Tabelle 20: Induktion von DNA-Strangbrüche mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay), MC [µM

Substanz	DNA-Strangbrüche
Lycorin	n.n.
Lycobetain	5
Baicalin	n.n
Baicalein	50
Skullcapflavon II	n.n.
Wogonin	n.n.
Wogonosid	n.n
Indirubin	n.n.
5-Jod-Indirubin	n.n.
Bisindolylindol	n.n.
Indigo	n.n.
Isoindigo	n.n.
Deoxytopsentin	n.n.
IC 1	50
IC 2	50
IC 3	n.n.
IC 4	<10
IC 5	50
IC 6	50
IC 7	50
IC 8	10
IC 9	50
IC 10	50
IC 11	50
IC 12	50
IC 13	50

9.1.6 Hemmung der Tubulinpolymersiation

Tabelle 21: Hemmung der Tubulinpolymerisation im in-vitro-Polymerisationsassay, ID_{50} [µM]

Substanz	Inhibierung der Polymerisation
Lycorin	n.n
Lycobetain	n.n
Baicalin	n.n.
Baicalein	n.n.
Skullcapflavon II	n.n.
Wogonin	n.n.
Wogonosid	n.n.
Indirubin	*nachweisbar
5-Jod-Indirubin	.*nachweisbar
Bisindolylindol	.*nachweisbar
Indigo	.*nachweisbar
Isoindigo	.*nachweisbar
Deoxytopsentin	n.n.
IC 1	n.n.
IC 2	n.n.
IC 3	n.n.
IC 4	n.n.
IC 5	n.n.
IC 6	n.n.
IC 7	n.n.
IC 8	n.n.
IC 9	n.n.
IC 10	n.n.
IC 11	n.n.
IC 12	n.n.
IC 13	n.n.

.*nachweisbar: IC_{50} nicht ermittelbar, da die Substanzen sehr früh ausfallen

9.1.7 Einfluß auf den Zellzyklus

Tabelle 22: Substanz-induzierter Einfluß auf den Zellzyklus:

Substanz	Zellzyklus-Veränderung
Lycorin	G_2/M-Arrest
Lycobetain	G_2/M-Arrest
Baicalin	G_0/G_1-Arrest
Baicalein	G_2/M-Arrest
Skullcapflavon II	n.n.
Wogonin	n.n.
Wogonosid	n.n.
Indirubin	Nicht signifikant
5-Jod-Indirubin	Nicht signifikant
Bisindolylindol	n.n.
Indigo	n.n.
Isoindigo	n.n.
Deoxytopsentin	n.n.
IC 1	n.b
IC 2	n.b
IC 3	n.b
IC 4	Nicht signifikant
IC 5	G_0/G_1-Arrest
IC 6	n.b.
IC 7	n.b.
IC 8	G_0/G_1-Arrest
IC 9	n.b.
IC 10	G_0/G_1-Arrest
IC 11	n.b.
IC 12	n.b.
IC 13	n.b.

9.1.8 Induktion von Apoptose

Tabelle 23: Nachweis der Induktion von Apoptose mittels morphologischer und durchflußzytometrischer Methoden:

Substanz	Morphologie	Durchflußzytometrie
Lycorin	–	+
Lycobetain	++	+
Baicalin	+	+
Baicalein	++	++
Skullcapflavon II	–	–
Wogonin	–	–
Wogonosid	–	–
Indirubin	–	–
5-Jod-Indirubin	–	–
Bisindolylindol	n.b.	–
Indigo	n.b.	–
Isoindigo	n.b.	–
Deoxytopsentin	–	–
Indolocarbazol(IC)1	n.b.	n.b.
IC 2	n.b.	n.b.
IC 3	n.b.	n.b.
IC 4	n.b.	++
IC 5	n.b.	
IC 6	n.b.	n.b.
IC 7	n.b.	n.b.
IC 8	n.b.	
IC 9	n.b.	n.b.
IC 10	n.b.	
IC 11	n.b.	n.b.
IC 12	n.b.	n.b.
IC 13	n.b.	n.b.

– nicht nachweisbar

+ bedingt nachweisbar (kein Sub-G_1-Peak)

++ nachweisbar

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit:

Niederberger E., Meiers S., Genzlinger A., Zankl H., Tang W.C., Eisenbrand G, Marko D
Flavones and inhibition of tumor cell growth: new aspects on the mechanism of action
DFG-Symposium of the Senate Commission on the Evaluation of Food Safety (SKLM), „ Carcinogenic/Anticarcinogeic Factors in Food: Novel Concepts", Kaiserslautern, 4.-7.Oktober 1998

Niederberger E.,Eisenbrand G., Fiebig H.H., Roth T., Schulte K., Spitzmüller B, Tang W.C., Marko D
Traditional chinese drugs revisited: Lycobetaine, an alkaloid from amaryllidaceae, is a potent inhibitor of topoisomerase I
Symposium der APOH; AWO und AIO: Neue molekulare Targets, Substanzen und Konzepte in Onkologie und Hämatologie, Freiburg, 2-4.Juli, 1998

Niederberger E., Marko D., Genzlinger A., Zankl H., Tang W.C., Eisenbrand G.
Inhibition of topoisomerase I and II by flavones from the chinese plant Scutellaria baicalensis
The eighth conference on DNA topoisomerases in therapy, Amsterdam, Niederlande, 15.-17. Oktober, 1997

Marko D., **Niederberger E.**, Dickmann S., Melnik S., Eisenbrand G.
Structure-activity-studies on a series of novel indolocarbazole glycosides and bis(indolyl)-pyrrolo-2,5-dione derivatives
10th NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy, Amsterdam, 16.-19.Juni, 1998

Marko D, **Niederberger E.,** Tang W.C, Spitzmüller B, Fiebig H.H., Eisenbrand G., Roth T.
Lycobetaine, an inhibitor of topoisomerase I and II, inhibited the growth of human tumor xenografts in vitro and in vivo
AACR Annual Meeting, New Orleans, 28.4.-1.5., 1998

Danksagung:

Mein Dank gilt allen früheren und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreis Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Doris Marko möchte ich danken für die Betreuung meiner Arbeit, für ihre Diskussionsbereitschaft und wertvolle Anregungen in praktischen und theoretischen Fragen sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Ralph Hössel, Kerstin Schulte, Wolfgang Petry, Prof. Tang und Frau Stalina Melnik (Moskau) danke ich für ständigen Substanzennachschub.

Elke Litmiansky und Maria Lorez danke ich für Unterstützung in der Zellkultur.

Meinen Forschungspraktikanten Anja Müller, Karl-Heinz Gutzler und Angelika Herzog danke ich für ihre Einsatzbereitschaft und ihre zuverlässige Arbeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Boege und seinen Mitarbeitern in der medizischen Klinik in Würzburg für die Bereitstellung von rekombinanter humaner Topoisomerase und ihre ständige Hilfsbereitschaft in Topoisomerase-Fragen.

Bei Dr. Gieseler und Michael in der medizinischen Klinik in Würzburg bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme und erste Topoisomerase-Hilfeleistungen.

Für die Messungen zu den Zellzykluskinasen kommt mein Dank der Arbeitsgruppe von Laurent Meijer in Roscoff, Frankreich zu

Außerdem danke ich der Abteilung Humanbiologie der Universität Kaiserslautern, besonders Anja Genzlinger für die Hilfe bei der Durchflußzytometrie

Barbara, Sandra, Simone, Sonja und Elke danke ich für das gute Verhältnis im Labor, viele ermunternde Gespräche und Hilfsbereitschaft in Fragen aller Art.

Sandra, Simone, Claudia, Barbara und Markus möchte ich fürs Korrekturlesen danken.

Nicht zuletzt und ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer für mich da ist und bei Markus, der mich unermüdlich immer wieder aufmuntert und ermutigt.

Lebenslauf:

Persönliche Angaben:

Name und Adresse:	Ellen Niederberger Jung-Stilling-Str 1 67663 Kaiserslautern
Geburtsdatum:	22.07.1968
Geburtsort:	Kaiserslautern
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1974-78	Grundschule in Hochspeyer
1978-1987	Staatliches-Albert-Schweitzer-Gymnasium in Kaiserslautern Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1987-1990	Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Kreissparkasse Kaiserslautern

Studium:

1990-1994	Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
1994-1995	Diplomarbeit am deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg <u>Thema:</u> „Untersuchungen zum Einfluß von Erythropoietin auf Tumoren: Expression des Erythropoietinrezeptors auf Proteinebene und Induktion der Signaltransduktion“

Promotion:

1995-1998	Universität Kaiserslautern, Abteilung für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie <u>Thema</u>: „Mechanismus-orientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten“