

Untersuchungen zur Spezifität der Wirkung von Betulinsäure auf humane epidermale Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Pharm. Tino Galgon
geboren am 07.06.1972 in Staßfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Wohlrab
2. Prof. Dr. B. Dräger
3. Prof. Dr. P. Elsner

Halle (Saale), 22.03.2001

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	<u>EINFÜHRUNG UND AUFGABENSTELLUNG</u>	1
2.	<u>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</u>	3
2.1.	Apoptose - biologische Relevanz im Organismus	3
2.2.	Bedeutung apoptotischer Prozesse in der Haut	4
2.2.1.	Charakterisierung apoptotischer Prozesse des Keratinozyten	5
2.3.	Nachweismöglichkeiten der Apoptose	7
2.4.	Vorstellung der Betulinsäure und ihrer biologischen Aktivität	8
3.	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	11
3.1.	Chemikalien	11
3.2.	Verwendete Geräte und Hilfsmittel	13
3.3.	Zellkultivierung	15
3.3.1.	IGR1-Melanomzelllinie	15
3.3.2.	Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM)	15
3.3.3.	HaCaT-Keratinozyten	16
3.3.4.	Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)	16
3.4.	Isolierung der Betulinsäure	17
3.5.	Beschreibung des Inkubationsschemas mit Betulinsäure	21
3.6.	Bestimmung der Zellanzahl und des Proliferationsverhaltens in Mikrotiterplatten	21
3.7.	Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in Mikrotiterplatten	22
3.8.	Nachweis nekrotischer Schädigungen - Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität im Zellüberstand	22
3.9.	Bestimmung intrazellulärer Peroxide - DHR-Test	23
3.10.	Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Apoptoseverhaltens	23
3.10.1.	Durchflusszytometrie	23
3.10.1.1.	Grundlagen der Durchflusszytometrie	23

3.10.1.2.	Umlagerung des Phosphatidylserins in der Zytoplasmamembran Annexin-V-FITC/ Propidiumiodid	24
3.10.1.3.	Nachweis des mitochondrialen Membranproteins - APO2.7	26
3.10.1.4.	Caspaseaktivität am Zytokeratin 18 - M30	27
3.10.1.5.	Gatekeeper des Genoms - p53	28
3.10.1.6.	DNA-Fragmentierung - TUNEL-Methode	29
3.10.2.	Westernblot	29
3.10.3.	Fluoreszenzmikroskopie	31
3.11.	Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten	32
3.11.1.	Filaggrin	33
3.11.2.	Involucrin	34
3.12.	Zellzyklusphasenanalyse	35
3.13.	Ergebnisdarstellung und statistische Auswertungen	36
4.	<u>ERGEBNISSE: WIRKUNG DER BETULINSÄURE AUF HUMANE HAUTZELLKULTUREN</u>	<u>37</u>
4.1.	Vorbemerkungen	37
4.2.	Vorversuche zur Wirkung der Betulinsäure auf humane Zellkulturen	37
4.2.1.	Einfluss der Zellkulturmedien auf die Wirkung der Betulinsäure	37
4.2.2.	Untersuchungen zum Zeitpunkt der Apoptoseauslösung und Einfluss der Permeabilisierung im APO2.7-Test	41
4.2.3.	Bestimmung intrazellulärer Peroxide	43
4.2.4.	Diskussion	44
4.3.	Untersuchungen zur Spezifität der Betulinsäure - Vergleich von Melanomzelllinie und normalen humanen epidermalen Melanozyten	45
4.3.1.	Untersuchungen zur Betulinsäure ausgelösten Apoptose beim malignen Melanom anhand der Melanomzelllinie IGR 1	45
4.3.1.1.	Toxizitätsuntersuchungen	45
4.3.1.2.	Untersuchungen zum Apoptoseverhalten	47
4.3.1.3.	Resistenzentwicklung	51
4.3.2.	Untersuchungen zur Wirkung der Betulinsäure auf normale humane epidermale Melanozyten (NHEM)	52
4.3.2.1.	Toxizitätsuntersuchungen	52

4.3.2.2.	Apoptoseuntersuchungen an normalen humanen epidermalen Melanozyten	52
4.3.3.	Zusammenfassung	55
4.4.	Untersuchungen zur Spezifität der Betulinsäure - Vergleich von Melanozyten und Keratinozyten	59
4.4.1.	Wirkung der Betulinsäure auf die Keratinozytenzelllinie HaCaT	59
4.4.1.1.	Untersuchungen zum Proliferationsverhalten	59
4.4.1.2.	Apoptoseverhalten	60
4.4.1.3.	Untersuchung des Differenzierungsverhaltens	67
4.4.2.	Untersuchungen zur Betulinsäure induzierten Apoptose und Differenzierung an normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK)	68
4.4.2.1.	Untersuchungen zum Proliferationsverhalten	68
4.4.2.2.	Zellzyklusuntersuchungen	69
4.4.2.3.	Apoptoseverhalten	71
4.4.2.4.	Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten	75
4.4.3.	Zusammenfassung	78
5.	<u>DISKUSSION</u>	<u>82</u>
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>91</u>
7.	<u>VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN</u>	<u>101</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BA	Betulinsäure, betulinic acid
BSA	Albumin Bovine Fraktion V
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMEM	Dulbecco' s modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	epidermal growth factor
ED ₅₀	halbmaximale effektive Dosis
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
GC	Gaschromatographie
GC/MS	GC/Massenspektrometrie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
HaCaT	<u>H</u> uman <u>a</u> dult low <u>C</u> alcium high <u>T</u> emperature keratinocytes
IGR1	Melanomzelllinie
LDH	Laktatdehydrogenase
MEM	Minimal Essential Medium
MGM	Melanocytes Growth Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MTP	Mikrotiterplatten
n	Anzahl der Werte pro Meßreihe
NHEM	normale humane epidermale Melanozyten
NEHK	normale humane epidermale Keratinozyten
PBB	PBS / BSA 1%
PBS	phosphate buffered saline
PBT	0,1% Tween [®] 20 in PBB
PI	Propidiumiodid
pos. Kon.	Positivkontrolle
R	Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFM	Serum free (Keratinocytes) Medium
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	<u>T</u> erminale desoxynukleotidyl-transferase-mediated d <u>U</u> TP <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
UV-	ultraviolett

Weitere Abkürzungen werden im Text bei ihrer ersten Verwendung erklärt.

1. EINFÜHRUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Das maligne Melanom ist die bösartigste Krebserkrankung die in der Haut entsteht. Bedingt durch eine Zunahme der Neuerkrankungen in den letzten Jahren und auf Grund der schlechten Prognose bei einem fortgeschrittenen Krankheitsprozess wird verstärkt nach einer Möglichkeit gesucht, die operativen Maßnahmen und die adjuvanten Behandlungen zu verbessern.

Die Neuerkrankungsrate des malignen Melanoms bezogen auf 100 000 Einwohner liegt in Deutschland bei 10 und in Australien bei etwa 60. Hochrechnungen in den USA haben ergeben, dass etwa jeder neunzigste hellhäutige US-Bürger im Laufe seines Lebens an einem Melanom erkranken wird (Hauschild et al., 1998). Das Melanom fordert in den USA jährlich 7000 Todesfälle bei einer Überlebensrate von 1:80 (Johnson et al., 1998).

Der Behandlungserfolg ist derzeit im Wesentlichen von einer Früherkennung des Melanoms abhängig. Die 5-Jahresüberlebensrate nach Entfernung eines Tumors mit einer Dicke $\leq 0,75$ mm beträgt 94,9 % aber nur 47,3 % bei einem Tumor > 4 mm.

Ausschlaggebend für die Bösartigkeit des Melanoms sind Anzahl und Lokalisation der Metastasen (Volkenandt et al., 1999). Grund für die geringen Überlebensraten (10-50 %) in Stadien nach einer Metastasierung ist das geringe Ansprechen dieses Tumors und seiner Metastasen auf Chemotherapeutika (Koh, 1991), deren genereller Wirkmechanismus die Induktion einer Apoptose ist (Fischer, 1994). Der Hauptgrund für den geringen Erfolg der Chemotherapie dürfte sein, dass in Melanomzellen, verglichen mit anderen malignen Zelltypen, nur schwer eine Apoptose induziert werden kann (Li et al., 1998). Daneben zeigen die Zellen des malignen Melanoms ein niedriges Niveau an spontanen Apoptosen (Mooney et al., 1995). Weiterhin korreliert die Resistenz auf eine Chemotherapie mit dem metastasierenden Potenzial des Melanoms (Glinsky et al., 1997).

Neben der operativen Entfernung des Tumors als Therapie der ersten Wahl sind bei generalisiertem Krankheitsprozess eine den gesamten Organismus betreffende Chemo- und/oder Immuntherapie unerlässlich. Insgesamt gesehen können jedoch die Behandlungserfolge mit den bisher geprüften Chemotherapeutika als Mono- oder Polychemotherapie bzw. in Kombination mit anderen Verfahren nicht befriedigen. Darüber hinaus treten bei diesen Therapieverfahren häufig belastende Nebenwirkungen auf, welche die Lebensqualität der Patienten zusätzlich stark beeinträchtigen und trotz einer Senkung der Metastasenlast einen geringen Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate besitzen.

Aus dieser kurz umrissenen Situation der steigenden Inzidenz des malignen Melanoms und der Insuffizienz der bestehenden Therapiemöglichkeiten dieses Tumors bezieht sich unser Anspruch auf weitergehende Forschungsaktivitäten und damit das Interesse an der Betulin-säure.

Der Naturstoff Betulinsäure (BA) wurde als spezifischer Inhibitor des malignen Melanoms mit einem Apoptose auslösenden Signalweg bei sehr geringer Toxizität beschrieben (Pisha et al., 1995).

Ziel dieser Arbeit war es, durch Prüfung der Reaktion verschiedener epidermaler Zellsysteme im Vergleich zum malignen Melanom die Spezifität der Wirkung der BA zu prüfen und den Mechanismus der Reaktion zu beurteilen.

Dabei stellte sich auch die Frage, ob der Einsatz von BA eine Therapiemöglichkeit im Frühstadium der Tumorentstehung bietet, indem maligne entartete Melanomzellen durch den Naturstoff BA selektiv aus der Haut entfernt werden. Kann BA somit für eine vorbeugende Therapie der Haut nach UV-bedingter Zellschädigung eingesetzt werden, ohne das toxische Effekte an der gesunden Haut auftreten?

Zur Untersuchung der Spezifität der BA in der Haut wurden Toxizitätsstudien zum Proliferationsverhalten und Untersuchungen apoptotischer Prozesse an Melanomzellen, normalen Melanozyten und Keratinozyten durchgeführt.

Schwerpunktmäßig wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Kann die in der Literatur beschriebene Apoptoseinduktion beim malignen Melanom an der Melanomzelllinie IGR1 bestätigt werden?
- Zeigen normale humane epidermale Melanozyten ein anderes Ansprechen auf BA im Vergleich zu Melanomzellen?
- Reagieren Keratinozyten ebenfalls auf BA mit Änderungen des Proliferationsverhaltens und Eintritt in einen geregelten Zelltod?
- Wie ist die Wirkung der BA auf Keratinozyten zu beschreiben? Welche Prozesse werden in den Keratinozyten ausgelöst?
- Wie ist nach Beantwortung dieser Fragen das Toxizitätsprofil bei einer topischen Anwendung der BA zu bewerten?

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Apoptose - biologische Relevanz im Organismus

Für den Tod einer Zelle kann es verschiedene Gründe geben. Die Prozesse, die dabei ablaufen, lassen sich anhand der Grundmechanismen in Nekrose und Apoptose einteilen.

Der pathologische Prozess ist die Nekrose. Unphysiologische Bedingungen (Hitze, Strahlung, lytische Viren, extreme Veränderungen der physiologischen Bedingungen) führen zur Zerstörung der Zellmembran und zur Freisetzung des Zytosols. Es folgen Entzündungen und die unspezifische Zerstörung größerer Gewebsareale. Die Nekrose steht nicht in Verbindung mit der normalen Organentwicklung.

Die Apoptose, die häufigste Form des Zelltodes im Organismus, läuft geregelt (programmiert) ab (Kerr et al., 1972). Die Zellen zeigen im mikroskopischen Bild nach einem "Kochen" (boiling o. blebbing) der Zellen ein Abschnüren kleiner membranumschlossener Partikel, den apoptotic bodies, die von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden. Aus diesem Grund kommt es in dieser Phase nicht zu Entzündungen im Gewebe. Im Verlauf der Apoptose werden eine Reihe von Proteinen neu synthetisiert, und es kommt zu einem Ablauf verschiedener Signalkaskaden. Das Chromatin kondensiert, und die DNA wird in Bruchstücke von annähernd 200 bp geschnitten. Die Dauer der Apoptose vom initialen Zellschrumpfen bis zur Abgabe der apoptotischen Körperchen kann schnell (1-3 h, Lymphozyten) oder langsam (48-72 h, Keratinozyten) verlaufen (Hakke et al., 1993).

Zur Apoptose kommt es bei einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse, die dazu dienen, Funktionen und Gestalt der Organe zu erreichen und zu erhalten. Ein Beispiel für die Ausprägung der Gestalt ist die Embryonalentwicklung der Hand. Apoptotische Prozesse sorgen hier dafür, dass Zellen in den Fingerzwischenräumen absterben und die Hand ihre endgültige Form annimmt (Übersicht: Jacobson et al., 1997). Die Apoptose dient zur Homöostase, d. h. zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen proliferierenden und sterbenden Zellen und somit z.B. für eine konstante Dicke der Haut.

Apoptotische Prozesse sind weiterhin zur Ausprägung bestimmter Merkmale der einzelnen Organe notwendig, so bei der Bildung der Hornhaut des Auges, der Umwandlung der Zellen in den Talgdrüsen und der Entstehung von Hautanhangsgebilden. Nicht zuletzt liegen dem komplexen Aufbau der Haut apoptotische Prozesse zu Grunde. Auf die Umwandlung des Keratinozyten zum Korneozyten soll im Kap 2.2.1 noch näher eingegangen werden. Weiterhin führen apoptotische Prozesse nach überstandenen Infektionen durch das Fas/Fas-Ligand System dazu, die Zahl der immunkompetenten Zellen wieder auf einen normalen Wert zu regeln (Trauth et al., 1989, Nagata et al., 1995).

Neben diesen Prozessen dient die Induzierung der Apoptose in geschädigten Zellen dazu, funktionsuntüchtige Zellen in Geweben selektiv zu eliminieren, um sie durch neue ersetzen zu können.

Pathologische Veränderungen in der Zelle können zu einer Verminderung oder Erhöhung der Apoptoserate führen. Wenn bei der Entstehung von Tumoren das Zellwachstum ungebremst verläuft und die Zellen maligne entarten, bilden sich Tumore, in denen eine verringerte Apoptoserate für die Massenzunahme verantwortlich sein kann. Um dem vorzubeugen, gibt es in der Zelle Mechanismen die DNA-Schäden erkennen. Vor der Zellteilung werden diese repariert oder eine Apoptose induziert. Hier sind die p53, c-myc und c-fos Kontrollmechanismen zu nennen.

Eine erhöhte Apoptoserate bei pathologischen Prozessen liegt bei einigen Krankheiten vor so z.B. bei HIV-Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer (Cotman et al., 1995) und Autoimmunerkrankungen, graft versus host-Erkrankungen, akuter Leukämie, viraler Hepatitis und vielen mehr. Bei diesen pathologischen Zuständen werden die natürlichen Regulationsmechanismen umgangen oder sind defekt. Neben dem Schutz des Organismus vor einer zu hohen Viruslast führen diese unphysiologischen, hohen Apoptoseraten zu degenerativen Veränderungen in Geweben.

2.2. Bedeutung apoptotischer Prozesse in der Haut

In der Biologie der Haut besitzen apoptotische Abläufe einen großen Stellenwert.

Sie dienen der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut. Die Differenzierung der Keratinozyten, eine Sonderform der Apoptose, führt zur Ausprägung der typischen Schichtung der Haut und der Funktionsfähigkeit als Abschlussgewebe. Am Ende dieses Umwandlungsprozesses steht die Bildung des Korneozyten.

Die Apoptose spielt eine Rolle bei der Entwicklung der Haut und der Hautanhangsgebilde und hier z.B. eine zentrale Rolle bei der spontanen Haarfollikelregression (Katagen) (Linder et al., 1997).

Die Apoptose ist weiterhin wichtig, um funktionsgeschädigte (z.B. Sunburn Zellen nach UV-Exposition), von Viren infizierte oder genetisch veränderte Zellen zu eliminieren. Der geregelte Zelltod spielt aber auch in der Pathogenese einiger Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Beispiele für Krankheiten, in denen eine gesteigerte oder verminderte Apoptose in der Haut stattfindet, sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Neben der Auslösung der Apoptose aufgrund natürlicher Ereignisse oder pathologischer Prozesse ist der geregelte Zelltod auch bei einigen dermatologisch eingesetzten Therapieformen von Bedeutung. Hierzu zählen unter anderem UV-B-Bestrahlung, PUVA-Therapie, Dithranol, Glukokortikoide, Cyclosporin A, Zink, Dosis-abhängig nach γ -Strahlung, Hyperthermie, Kryotherapie und nach Zytostatikabehandlung (Cyclophosphamid, Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Vincristin, Methotrexat, cis-Platin).

Tabelle 1: Mit apoptotischen Veränderungen assoziierte Hauterkrankungen (Paus et al., 1995, Teraki et al., 1999)

	Verminderung der Apoptose	Zunahme der Apoptose
entzündliche Hauterkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Psoriasis 	<ul style="list-style-type: none"> - Lichen planus - Lupus Erythematosus - Erythema multiforme - Graft versus host Krankheit - fixes Arzneimittelexanthem - Dermatitis nach Applikation von Dithranol, Dichromat oder Krotonöl
Tumor	<ul style="list-style-type: none"> - Basalzellen Karzinom - Squamous Zellkarzinom - Melanom - CTCL 	<ul style="list-style-type: none"> - Basalzellen Karzinom - Regressives Keratoacanthom - Morbus Bowen - Merkelzellen Tumor
Virale Infektionen	<ul style="list-style-type: none"> - Verruca plana - Ebstein Barr-Virusinfektion 	<ul style="list-style-type: none"> - Viruspapillome - AIDS - Herpes-Virusinfektionen - Ebstein Barr-Virusinfektion
UV		<ul style="list-style-type: none"> - Dermatitis solaris (sunburn cells)
autoimmune Störungen	<ul style="list-style-type: none"> - SLE - Sjorgen Syndrom 	<ul style="list-style-type: none"> - Skleroderma
Wundheilung	<ul style="list-style-type: none"> - Keloid 	
Alopezie		<ul style="list-style-type: none"> - Alopecia areata - vernarbende Alopezien - androgene Alopezie - Arzneimittel induzierte Alopezie

2.2.1. Charakterisierung apoptotischer Prozesse des Keratinozyten

Neben diesen unterschiedlichen Bedeutungen des geregelten Zelltodes soll nun auf zwei verschiedene Apoptoseformen des Keratinozyten der Haut eingegangen werden. Keratinozyten sind mit 90 % die häufigste Zellpopulation der Epidermis der Haut (Wokalek et al., 1992).

Diese epithelialen Zellen sind gegenüber den Melanozyten zu zwei unterschiedlichen Formen der Apoptose befähigt. Am Ende der einen Apoptoseform steht die Eliminierung einer geschädigten Zelle. Hier seien Sunburn Zellen genannt, die nach einer UV-Schädigung auftreten, Zunahme der Apoptose bei Entzündungen durch vermehrte Freisetzung von TNF- α und induzierte Apoptose durch das Perforin/Granenzym oder Fas/Fas-Liganden System (Übersichtsartikel Teraki et al., 1999). Diese Form des geregelten Zelltodes geht mit den typischen Ereignissen einher, wie der Bildung von Apoptosekörperchen und DNA-Fragmentierung und verläuft nicht immer ohne Entzündungen. Grund hierfür ist eine erschwerte Phagozytose der Apoptosekörperchen durch den Anteil an Keratinen und Tonofilamenten. Diese Partikel gelangen unter Membranverlust in die Dermis und sind dort als

Kolloidkörperchen (Civatte Körperchen) sichtbar. Diese können Autoimmunreaktionen hervorrufen (Nasemann et al., 1982).

Die zweite Form der Keratinozytenapoptose ist die terminale Differenzierung, die der Keratinozyt durchläuft, um am Ende dieses Prozesses eine ausdifferenzierte, tote Zelle, den Korneozyten, zu bilden. Dieser Signalweg zeigt mit der oben beschriebenen Apoptose Gemeinsamkeiten (Gandarillas et al., 1999, Paus et al., 1995). Am Ende dieser Apoptose steht aber kein Verlust einer Zelle sondern die Bildung des Stratum corneum. Auf diese Umwandlungsprozesse in der Epidermis soll nun näher eingegangen werden.

Die Epidermis, die äußere Schicht der Haut, ist in verschiedene Strukturen unterteilt, die gleichzeitig die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten darstellen. Das Stratum basale beinhaltet den Pool proliferierender Keratinozyten. Diese Zellen sind durch verschiedenste Mechanismen vor toxischen Einflüssen geschützt, so durch die Barrierefunktion des Stratum corneum und durch Melanozyten, die durch die Melaninproduktion einen Schutz vor UV-Strahlung bieten (epidermale Melanineinheit) (Fitzpatrick et al., 1963). Weiterhin trägt ein erhöhter Bcl-2 Spiegel in der kutanen Stammzellenpopulation zur Unterdrückung der Apoptose bei. In diesen Basalzellen erfolgt eine genaue Kontrolle der Zellteilung durch "Checkpoints" des Zellzyklus oder durch extrinsische Faktoren wie den Tumornekrosefaktor (TNF- α) oder den transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β (Funk et al., 1997).

Wird eine der Tochterzellen zur terminalen Differenzierung angeregt, verlässt diese Zelle das Stratum basale und wird zu einer Zelle des Stratum spinosum. Diese Zellen sind durch eine Zunahme des Zellvolumens und der Anzahl der Organellen gekennzeichnet. Die desmosomalen Verbindungen der einzelnen Zellen werden deutlich und so nimmt diese Zelle eine stachelige Form an (Stachelzellen). Im weiteren Verlauf dieser Entwicklung beginnen die Zellen mit der Expressierung von Intermediärfilamentproteinen. Hier ist das Involucrin zu erwähnen, das als ein früher Marker der Differenzierung gilt. Die Differenzierung schreitet fort, indem Keratohyalin granula ausgebildet werden. Die Zellen erscheinen nun granuliert, worauf sich der Name Stratum granulosum (Körnerzellenschicht) begründet. Hauptbestandteil des Keratohyalins ist das Protein Filaggrin, das an der Verdichtung und Vernetzung von Keratin beteiligt ist. Die Expression weiterer Proteine ist in der Abbildung 1 dargestellt. Keratinozyten des Stratum granulosum zeigen neben der Keratinbildung eine Endonuklease-Aktivität und DNA-Fragmentierung (McCall et al., 1991).

In der Übergangszellzone (transitional cell zone) erfolgt nun die Umwandlung des lebenden Keratinozyten zum toten Korneozyten, der in die kompakte Lipidmembran des Stratum corneum eingebettet ist. Das Stratum corneum bildet durch diese komplexen Gemische aus Hautlipiden die Hauptbarriere für eindringende Substanzen, Mikroben und Partikel, aber auch einen Schutz vor epidermale Wasserungsverlust. Das Stratum corneum lässt sich noch einmal in zwei Bereiche einteilen, das Stratum corneum conjunctum, mit einem kompakten Zellverband, und das Stratum corneum disjunctum, in dem die Zellen locker gelagert sind und abgeschilfert werden.

Mit dem Abstoßen der Zellen endet der Lebenszyklus der Keratinozyten. Die durchschnittliche Zeit zwischen Mitose und Abschilferung eines Keratinozyten an der Hautoberfläche beträgt etwa 30 d.

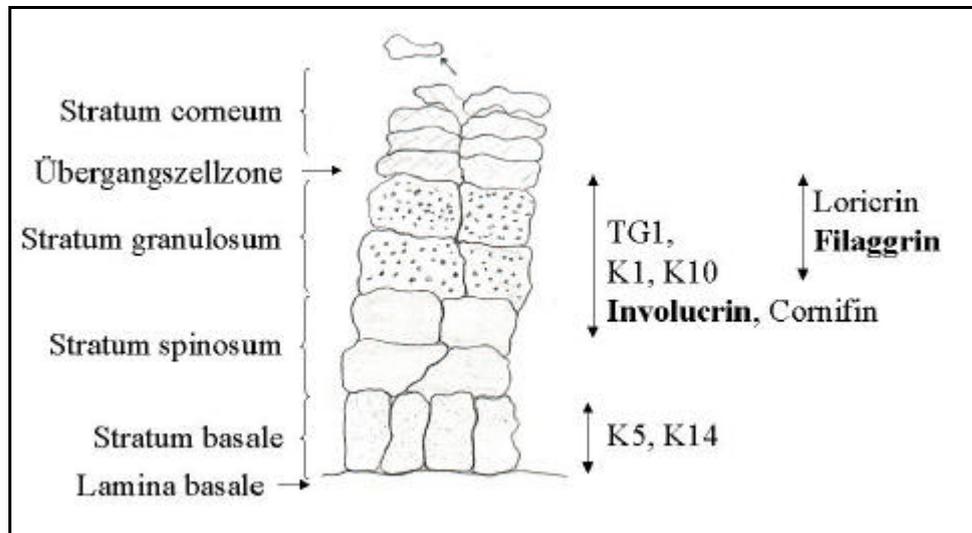


Abbildung 1: Schematische Präsentation von Bereichen der Genexpression wichtiger Proteine in der Epidermis während der terminalen Keratinozytendifferenzierung (nach Eckert et al., 1997) TG = Transglutaminase, K = Keratin. In der TG1 Gruppe werden K1 und K10 später exprimiert als die anderen Marker

2.3. Nachweismöglichkeiten der Apoptose

Nachdem dargelegt wurde, dass die Apoptose eine wichtige physiologische Bedeutung besitzt, sollen nun Möglichkeiten zum Nachweis einer Apoptose erläutert werden.

Neben der visuellen Möglichkeit eine Apoptose von einer Nekrose zu unterscheiden, gibt es viele Methoden, die es erlauben, auf eine nekrotische Schädigung der Zytoplasmamembran zu schließen. Hierzu gehört der Nachweis der bei einer Nekrose freigesetzten zytosolischen Enzyme, wie z.B. basische und saure Phosphatasen, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminasen, Arginosuccinatlyase (Martin et al., 1991) oder die in dieser Arbeit genutzte Lactatdehydrogenase (Courjault et al., 1993).

Die Enzymaktivität korreliert mit der Menge lysierter Zellen (Göhring, 1999). Neben der Freisetzung der Enzyme kann aber auch nach dem Labeln der Zellen die Freisetzung von Fluorochromen oder radioaktiv markierten Aminosäuren im Zellüberstand gemessen werden (Kolber et al., 1988, Danks et al., 1992). Weitere Standardmethoden beruhen auf der Aufnahme oder dem Ausschluss von Farbstoffen, wie Trypan Blau, Eosin, Nigrosin, Ethidiumbromid oder Propidiumiodid (PI) (Cook et al., 1989).

Neben fließenden Übergängen zur Nekrose, z.B. bei Perforin-induzierter Apoptose durch T-Zellen, ist das typische Ereignis des geregelten Selbstmordes der Zelle das Auftreten von DNA-Fragmenten, die sich um ca. 180 bp unterscheiden (Wyllie, 1980). Neben der DNA-Leiter im Agarosegel besteht weiterhin die Möglichkeit, die Fragmentierung am Durchflusszytometer und am Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Am Durchflusszyto-

meter kann die Abnahme der DNA-Menge des Kerns durch eine DNA-Färbung mit Propidiumiodid erfolgen und ist mit dem Auftreten des Apoptose Peaks (Ap-Peak bzw. Sub-G₀/G₁-Peak) bei Zellzyklusuntersuchungen verbunden (Walker et al., 1993, Cohen et al., 1994). Am Fluoreszenzmikroskop ist nach Färbung der DNA eine Kondensation des Chromatins zu beobachten. Außer diesem direkten Nachweis können die entstehenden freien Enden der DNA-Fragmente durch labeling mittels terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TUNEL-Methode) oder mit DNA-Polymerase 1 (Klenow) durch einen ELISA oder durch Fluoreszenzanregung detektiert werden.

Weitere Ereignisse der Apoptose sind neben den typischen Veränderungen der DNA die Translokation des Phosphatidylserins an die äußere Zellmembran (Fadok et al., 1992, Koopman et al., 1994), die Bindung des APO2.7-Antikörpers an ein 38 kDa Protein der mitochondrialen Membran (Zang et al., 1995), die Detektion aktivierter Caspasen oder Caspaseschnittprodukte, z.B. des Zytokeratin 18 mit dem M30 CytoDeath Kit[®] (Caulin et al., 1997) oder PARP. An der Apoptose sind verschiedene Signalkaskaden beteiligt. Eine Detektion der involvierten Proteine und deren Verhältnisse zueinander oder eine Hemmung der Apoptose kann ebenfalls als Nachweis apoptotischer Prozesse dienen.

(<http://www.biochem.boehringer-mannheim.com/techserv/apoptosis/index.htm>)

2.4. Vorstellung der Betulinsäure und ihrer biologischen Aktivität

Die Betulinsäure (BA) ist eine Triterpensäure mit großer biologischer Aktivität und breitem Vorkommen im Pflanzenreich. Der Name dieses sekundären Stoffwechselproduktes leitet sich vom entsprechenden Alkohol ab, dem Betulin, der ein Hauptbestandteil der weißen Borke der Birke ist und zur Gewinnung der BA durch Oxidation dienen kann (Kim et al., 1998). Die Bildung der BA ist nicht auf bestimmte Pflanzenfamilien beschränkt. Sie konnte unter anderem in den folgenden Pflanzenfamilien nachgewiesen werden: Rhamnaceae (Pisha et al., 1995), Simarubaceae (Herz et al., 1972), Ericaceae (Robinson et al., 1970), Platanaceae (Zellner und Ziffer, 1925, Galgon et al., 1999). Ein Vorkommen in tierischem Gewebe wurde bisher noch nicht beschrieben. BA gehört zur Gruppe der Lupensäuren. Es handelt sich um eine 3 β -Hydroxy-lup-20(29)-en-28-säure mit einem lipophilen Grundgerüst und einer tertiären Carboxylgruppe.

Auf der Suche nach neuen Targets oder den wirksamen Bestandteilen alter Arzneipflanzen fand man viele, zum Teil völlig verschiedene Wirkungen der BA. Die Vielzahl der Publikationen in den letzten Jahren zum Thema BA bringt ein breites Wirkspektrum zum Ausdruck. Im Folgenden soll nun auf diese Ergebnisse eingegangen werden, um die arzneistoffliche Potenz der BA zu charakterisieren und unser Interesse an diesem Naturstoff zu begründen.

hältnisses der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie nachgewiesen.

Speziell der p53-abhängige Weg der Apoptoseregulierung wird derzeit noch kontrovers in der Literatur diskutiert (Correspondence re: Fulda et al., Rieber und Strasberg Rieber, 1998). Rieber und Strasberg-Rieber (1998) konnten nach 52 h einen Anstieg des p53-Gehaltes im Verhältnis des cdk Inhibitors p21WAF1 belegen. Wobei Wick et al. (1999) in p53 überexprimierenden versus Wildtyp versus p53 null Zelllinien keine BA-Resistenzen aufzeigen konnten.

Die Melanomspezifität der BA zu erhöhen, ist ein weiteres Ziel verschiedener Autoren und Patente (Kim et al., 1998, Jeong et al., 1999, Dasgupta WO 9629068 A2).

Eine weitere mögliche therapeutische Anwendung wird in der Behandlung der HIV-Erkrankung gesehen. BA wurde als Hemmer des Eindringens des HI-Virus Typ 1 in die Zelle und als Proteaseinhibitor beschrieben (Mayaux et al., 1994, Fujjoka et al., 1994, Soller et al., 1996, Evers et al., 1996, Kashiwada et al., 1996, Ma et al., 1999). Seither wurde vor allem an der Synthese und Targetfindung gearbeitet (Hashimoto et al., 1997, Kashiwada et al., 1998, Vlietinck et al., 1998).

Darüber hinaus wurden in vitro (Dunstan et al., 1998) und in vivo (Mukherjee et al., 1997) ein antiinflammatorisches Potenzial der BA gefunden. So wird zum Beispiel von Recio et al. (1995) BA im Carrageen und Serotonin Pfotenödem Test und TPA und EPP Ohrödem Test BA als Substanz mit den meisten Auswirkungen beschrieben. Diese Effekte wurden aber von Manez et al. (1997) relativiert.

Bei der in vitro Testung der BA gegen den Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* konnten Bringmann et al. (1997) eine Antimalariaaktivität zeigen. Dies konnte zwar in vitro von Steele et al. (1999) bestätigt werden, aber die in vivo Daten dieses Autors belegen diesen Befund nicht.

Ferner wurde BA auf eine mögliche antibakterielle Kapazität getestet. Hierzu konnten Nick et al. (1995) keine Wirkung der BA feststellen.

Zusammenfassend ist über die Wirkung der BA festzustellen, dass eine anti-HIV Wirkung und eine Antitumorwirkung beschrieben wurde. Zwei Prozesse, in denen entweder eine erhöhte Apoptoserate oder eine Unterdrückung der Apoptoseauslösung auftritt.

Zu einem möglichen Wirkmechanismus der BA sind schon einige Hinweise bekannt. Der genaue Mechanismus ist aber bisher noch nicht geklärt.

Die Untersuchungen zur Spezifität der BA zwischen maligne entarteten und normalen Zellen sind bisher nur unzureichend erfolgt.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Chemikalien

Chemikalien

Acetanhydrid

Acrylamid/Bis rotiphorese[®] Gel 40

Albumin Bovine Fraktion V

Anisaldehyd

Annexin-V-Fluos

Antibiotisch-antimykotischer Zusatz

Anti p53

Aprotinin

APS (Ammoniumperoxodisulfid)

APO2.7-Antikörper

Betulinsäure (Referenzsubstanzen)

Bromphenolblau

BioRad Proteinassay

Blotting-Papier (Wathmanpapier)

CaCl₂

Caspase 3, CPP32 Antikörper

Caspase-3-Inhibitor IV

Cell Proliferation ELISA, BrdU
(colorimetric)

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

Dichlormethan

Dihydrorhodamin 123

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dispase

Dulbecco' s Modifiziertes Eagle Medium
(DMEM)

ECL-Reagenz

Eichproteine für SDS-Gelelektrophorese
combithek[®]

Entwickler

EDTA

Hersteller

Laborchemie, Apolda

ROTH, Karlsruhe

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Laborchemie, Apolda

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Gibco, Life Technologies GmbH, Eggen-
stein

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Merck, Darmstadt

Coulter-Immunotech, Marseille, Frank-
reich

Phytochem, Neu Ulm

ROTH, Karlsruhe

Fluka (BioChemika), Schweiz

BIO-RAD, München

GLW, Würzburg

Merck, Darmstadt

Calbiochem-Novabiochem, La Jolla

BACHEM, Heidelberg

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Laborchemie, Apolda

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Deisenhofen

Merck-Suchardt, München

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Gibco, Life Technologies GmbH, Eggen-
stein

Amersham pharmacia biotech

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

EAST MAN KODAK Company, USA

Fluka (BioChemika), Schweiz

EGDT	Fluka (BioChemika), Schweiz
Essigsäure 98%	Laborchemie, Apolda
Filaggrin, monoclonaler Antikörper	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Fixierer	EAST MAN KODAK Company, USA
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
Glycerol	Laborchemie, Apolda
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Calbiochem-Novabiochem, La Jolla
Hexamethyldisilazan	Merck, Darmstadt
Involucrin, NCL-INV Antikörper	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK
In Situ Cell Death Detektion Kit (Fluorescein)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotypkontrolle ms-IgG2b-FITC low F/P	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Isotypkontrolle X931	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Leupeptin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
KCl	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Kristallviolett (Gentianaviolett)	Riedel-de Haen, Seelze
M30 CytoDeath Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Melanozyten (NHEM)	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg
Melanocytes Growth Medium (MGM)	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Fluka (BioChemika), Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt
Milcheiweiß	Glücksklee
Natriumcitrat	Laborchemie, Apolda
Natriumazid	Sigma
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran 20 µm, 45 µm	Sartorius AG, Göttingen
p-Phenyldiamin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
PMSF, Phenylmethansulfonylfluorid	Merck, Darmstadt

Ponceau-Rot S-Solution	Fluka (BioChemika), Schweiz
Pyridin	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Protein Assay Kit	SIGMA Diagnostics
Rnase (60 Kunits U/mg)	SIGMA
Röntgenfilm X-ray Retina	Fotochemische Werke GmbH, Berlin
Schwefelsäure	Laborchemie, Apolda
SDS (Sodium dodecylsulfat)	Fluka (BioChemika), Schweiz
Sekundärer Antikörper medac M35001	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Serum free Medium (SFM)	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Squalan	Merck, Darmstadt
Trimethylchlorsilan	Merck, Darmstadt
Tris (Tris-Hydroxymethyl-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Fluka (BioChemika), Schweiz
Temed	Fluka (BioChemika), Schweiz
(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	
Trypsin-Inhibitor (Soybean)	Gibco, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Tween [®] 20 (pure) Polyoxyethylensorbitanmonolaureat	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

3.2. Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Geräte

Analysewaage
Absorptionsreader (MTP-Reader)

Blot-Apparatur Hoefer SemiPhor
Brutschrank

Durchflusszytometer

Dünnschichtchromatographieplatten (silica gel 60 F₂₅₄)
Dual Gel Caster, Hoefer

Elektrophoreseapparatur Hoefer

Hersteller

Typ MC5-OCE, Sartorius AG, Göttingen
Labsystems iEMS Reader, Helsinki, Finnland
Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
BB6060 Heraeus, Hanau
Serie 300 COMPACT, ReCon GmbH Stadthagen
INCO 2/108, memmert Schwabach
FACScan, Becton Dickinson, San Jose, USA
Merck, Darmstadt

Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

Elektrophorese-Spannungsgerät EPS 600	Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
FACS-Röhrchen (Polystyren Reagenzglas mit Rundboden (ohne Verschluss) 12x7,5	Falcon
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop	Olympus BH-2/RFCA, Olympus Optical Co., Japan
Teilerspiegel und Filterkombination	BH2-DMU (Teilerspiegel DM400, Anregungsfilter 20UG1, Sperrfilter 17L420)
Fluoreszenzreader Fluoroskan Ascent	Labsystems, Helsinki, Finnland
Gaschromatograph	6890GC Hewlett Packard (Waldborn) HP5 Säule (30 m×320 µm i.d., 0,25 µm flüssige Phase)
Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer	Hewlett Packard Model 5890 series II Massen selektiver Detektor 5972
¹ H-NMR	Avance DRX 500, Bruker, Rheinstetten
Laminarbox	Hs12, Heraeus Instruments, Hanau
Lichtmikroskop	Olympus CK-2 TR, Olympus CK 40, Olympus Optical Co., Japan
MS für Molmassenbestimmung	LCQ MS, Finnigan, Bremen Hewlett Packard 5989A mit API Elektrospray 59987A
pH-Messgerät	Digital pH-Meter pH525, WTW GmbH, Weilheim
Präzisionswaage	Typ 870-13, Gottl. Kern & Sohn, Albstadt
Zellschaber	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Software zum Absorptionsreader	Sero Calc Vers. 4.0
Software zum Absorptionsreader	Ascent Research Edition Vers.1.2.1.
Software zum Durchflusszytometer	PASCAL 3.22 (Systemsoftware) Lysis II Vers. 1.1 CellFit-Software Vers 2.01.2 Cellquest, Modfit
Vortex	Vortex genie 2 [Scientific Industries, USA]
Wasserbad	Thermostat B3-DC1, Haake, Karlsruhe
Zellkulturgefäße:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
-96er Mikrotiterplatten (MTP)	
-20 und 50 mm Kulturschalen	
-5, 20 und 50 ml Kulturflaschen	
Zellsieb 70 µm	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zentrifugen	Biofuge primo, Biofuge primo R, Heraeus Instruments, Hanau

3.3. Zellkultivierung

Für die Experimente wurden kontinuierliche Zelllinien [IGR-1 (Melanomzelllinie), HaCaT (immortalisierte Keratinozytenzelllinie)], normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) und normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) genutzt. Die Zellen wurden als Monolayer kultiviert und bei etwa 80 % Konfluenz für die Experimente genutzt. Vor jedem Experiment wurden die Zellen auf Kontaminationen durch Bakterien und Pilze untersucht, und der Zellkulturstamm 2-wöchentlich auf Mykoplasmenkontamination durch DNA-Färbung am Fluoreszenzmikroskop getestet, da deutliche Beeinflussungen der Ergebnisse durch diese Zellparasiten auftreten (Tsai et al., 1995, Lindl, 2000).

3.3.1. IGR1-Melanomzelllinie

Als Modell für maligne entartete Melanozyten diente der IGR1-Zellstamm. Die IGR1-Melanomzelllinie ist ein käuflicher Zellstamm, dessen Zellen aus einer Lymphknotenmetastase in der Leistengegend eines 42 Jahre alten Mannes stammen. Die Zellen sind hyperdiploid und verursachen verschieden pigmentierte Tumore von großem Umfang, mit einem Eumelaninanteil zwischen 60 und 85 % (Odh et al., 1994).

Die Melanomzelllinie IGR1 wurde in Minimal Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und antibiotisch-antimykotischem Zusatz (100 IU/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml Amphotericin B), in Serum freiem Medium (MGM) bei 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bzw. 10 % CO₂ (DMEM) kultiviert. DMEM und MGM wurden nur in den Vorversuchen genutzt. Die Zellen wurden als Monolayer kultiviert und bei etwa 80 % Konfluenz für die Experimente genutzt. Das entspricht etwa dem 3. bis 4. Tag nach der Aussaat bei einer Einsaat von 300 000 Zellen pro 5 ml Medium. Der Zellstamm wurde alle 7 Tage passagiert.

3.3.2. Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM)

Normale humane epidermale Melanozyten wurden als Modell für normal proliferierende und differenzierende Melanozyten genutzt.

Die Zellen wurden in Serum freiem Medium (MGM), 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ als Monolayer kultiviert und bei etwa 80 % Konfluenz des Zellrasens für die Experimente genutzt. Das entspricht etwa der 3. bis 4. Woche nach der Aussaat bei einer Einsaat von 300 000 Zellen pro 5 ml Medium.

Für die Experimente wurden Zellen der Firma PromoCell und eigene isolierte Zellen genutzt. Die Isolierung der nativen Melanozyten erfolgte ähnlich der Verfahrensweise zur Gewinnung der nativen Keratinozyten (Kap. 3.3.4). Im Unterschied zu diesen erwiesen sich Melanozyten wesentlich unempfindlicher gegenüber einer Trypsinierung. Aus diesem Grund wurden die Epidermisstücke 10 min mit Trypsin (0,05 %) inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dann in Melanozytenmedium (MGM) mit 2 % FKS und Zusatz von 1,5 mM Ca²⁺ für 48 h. Danach wurden die Melanozyten in normalem MGM weiter kultiviert. Die Zugabe von Calcium induziert die Differenzierung und Proliferationshem-

mung bei Keratinozyten und verhindert somit ein Überwachsen dieser zahlenmäßig häufigeren Zellen. Aus einer 20 ml Kulturflasche können nach etwa drei Wochen 3 Mio. Zellen geerntet werden. Nach Kontrolle der Kultur auf Verunreinigungen wurde auch hier die zweite Passage genutzt.

3.3.3. HaCaT-Keratinozyten

Als Modell für humane proliferierende Keratinozyten dienten HaCaT-Zellen (Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes). Die HaCaT-Zellen sind als spontantransformierte, nicht tumorigene permanente Zelllinie beschrieben (Boukamp et al. 1988). Diese Keratinozyten sind in vielen Laborien etabliert und gut über eine hohe Passagenzahl kultivierbar. Die Zelllinie ist bezüglich Signaltransduktion (Geilen et al., 1996) und Rezeptorexpression (Neuner et al. 1996) eingehend untersucht. Molekularbiologisch ist nachgewiesen, dass HaCaT auf beiden Allelen des p53-Gens mutiert ist. Diese Mutation zeigt im Vergleich zu anderen Zelllinien keine benignen bzw. malignen Eigenschaften (Lehman et al., 1993). Die Zellen entstammen der Peripherie eines malignen Melanoms von der oberen Rückenhaut eines 62 Jahre alten Mannes. Der Karyotyp der Zellen ist aneuploid (Schürer et al., 1993, Boukamp et al., 1996).

HaCaT-Keratinozyten wurden in Serum freiem Medium (SFM) unter Zusatz von Rinderhypophysenextrakt (25 µg/ml) und rEGF (0,1-0,2 ng/ml), bei 37 °C, 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Um eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden grundsätzlich nur Zellen zwischen der 25. und 35. Passage als Monolayer (80 % Konfluenz) verwendet. Das entspricht etwa dem 3. bis 4. Tag nach der Aussaat bei einer Einsaat von 300 000 Zellen pro 5 ml Medium. Der Stamm wurde wöchentlich passagiert.

3.3.4. Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)

Normale humane Keratinozyten wurden neben HaCaT-Keratinozyten für die Untersuchungen genutzt. Vorteile dieser epithelialen Zellkultur liegen im ursprünglichen Apoptose-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten. Normale epidermale Keratinozyten können nur für eine geringe Anzahl (2-3) von Subpopulationen kultiviert werden. Die Gewinnung der Primärzellkulturen erfolgte aus neonatalem Vorhautgewebe in Anlehnung an die Firmenvorschrift Gibco BRL Life Technologies. Dabei wird die Epidermis von der Dermis getrennt und die Keratinozyten aus der Epidermis herausgelöst. Dann wird das Wachstum der Keratinozyten durch spezielle Medien gefördert und das anderer Zellarten unterdrückt.

Protokoll:

1. Haut ca. 5 cm² liegt im Transportmedium (SFM×0,005 % Gentamycin) vor
2. Nach Entfernung von Fettgewebe und Geweberesten die Haut in 5×5 mm große Stücke schneiden und 12 h bei 4 °C in steriler Dispaselösung (1 U×ml⁻¹ in PBS) inkubieren
3. Kulturgefäß mit 5 ml FKS/HBSS (20 %) unter schütteln bei Raumtemperatur beschichten, überschüssige Lösung entfernen und einmal mit sterilem PBS pH 7,4 (8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g NaH₂PO₄·H₂O; 0,2 g K₂HPO₄; H₂O ad 1000 ml) spülen

4. Kulturflasche mit Kulturmedium im Brutschrank temperieren
5. Gewebsstücken unter sterilen Bedingungen aus der Dispaselösung entnehmen und mit einer Pinzette die Epidermis von der Dermis lösen (Abbildung 3)

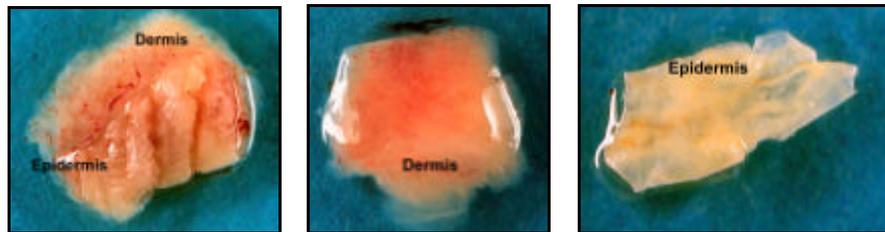


Abbildung 3: *linke Darstellung*: Haut nach 24 h Inkubation mit Dispaselösung, Epidermis und Dermis noch verbunden; *mittlere Darstellung*: von der Epidermis getrennte Dermis; *rechte Darstellung*: Epidermissegment für eine weitere Präparation geeignet

6. Epidermissegmente (Abbildung 3 rechte Darstellung) sofort in Gentamycin/PBS (0,005 %) geben und darin bis zur Weiterverarbeitung belassen
7. Nur reine Epidermisanteile entnehmen und mit Trypsin/PBS (0,025 %) unter ständigem Schütteln bei 36 °C max. 4 min inkubieren
8. Die Suspension durch ein Zellsieb 70 µm filtrieren und die Trypsinaktivität mit dem Trypsininhibitor (10 mg×ml⁻¹) stoppen
9. Zellen 5 min bei 1250 U×min⁻¹ zentrifugieren, Überstand entfernen, Pellet vorsichtig resuspendieren und in ein vorbehandeltes Kulturgefäß geben
10. Nach einem Tag erfolgt ein Wechsel des Kulturmediums, so dass abgestorbene Zellen entfernt werden

Nach 10 Tagen und zweimaligem Wechsel des Kulturmediums können etwa 10-12 Millionen Zellen aus einer 36 cm² Kulturflasche geerntet werden. Die Zellen wurden nach jeder Passage auf Mykoplasmen untersucht (siehe Kap. 3.10.3). Zellkulturansätze mit einem hohen Anteil andere Hautzellen, wie Fibroblasten und Melanozyten, oder ungenügendem bzw. anormalem Wachstum wurden verworfen. Für Versuchszwecke wurde die zweite Passage genutzt. Die Weiterentwicklung der Methode liegt neben den geringeren Dispase- und Trypsinkonzentrationen in der Beschichtung der Kulturflaschen mit FKS. Durch die Beschichtung konnte ein gutes Anwachsen der nativen Keratinozyten in der 0. Passage erst ermöglicht werden.

3.4. Isolierung der Betulinsäure

Betulinsäure wurde aus der Borke von *Platanus acerifolia* isoliert. Die zur Familie der Platanengewächse gehörende Pflanze ist eine Kreuzung aus *Platanus orientalis* und *Platanus occidentalis* und ist charakterisiert durch große 3-7 lappige Blätter, eingeschlechtliche Blüten in kugeligen hängenden Blütenständen. Die männlichen Blüten besitzen 3-8 Staubgefäße. Typisch für diesen Baum ist das ständige Abschilfern großer Borkenstücke, so dass der Stamm grünlich, gelblich und bräunlich gefleckt erscheint (Schmeil-Fitchen, 1988; Frohne u. Jensen, 1985). Die Borke wurde im Winter, da hier besonders viel dieses nach-

wachsenden Rohstoffes abgestoßen wird, gesammelt, getrocknet und mit einer Schlagmühle fein gemahlen.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Isolierung der BA haben Nachteile. Ihnen liegen zum einen (für uns) sehr exotische Pflanzen als Ausgangsmaterial zu Grunde (Robinson et al., 1970; Macías et al., 1998; Herz et al., 1972; Pisha et al., 1995). Zum anderen wurden aufwendige und umständliche Isolierungsmethoden genutzt. In den meisten Fällen geht man nach einer Extraktion mit einem polaren Lösungsmittel den Weg über eine säulenchromatographische Aufreinigung. Weiterhin wurde von einigen Autoren eine Partialsynthese aus Betulin favorisiert (Pezzuto et al., 1998). Unserer Methode (Patnr. DE 19,713,768 A 1, Draeger et al. 1998) nutzt die unterschiedliche Affinität der Begleitstoffe zu den von uns gewählten Lösungsmitteln. Dabei werden im ersten Schritt Betulinsäure und lipophile Begleitstoffe aus der feingemahlene Borke der Platane mittels Mazeration mit Dichlormethan herausgelöst. Nach Umkristallisation bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhält man einen gelblichen gallertartigen Niederschlag mit einem BA-Anteil von etwa 80 % wobei stark lipophile Stoffe, wie Wachse in Lösung bleiben. Das nun getrocknete, leuchtend gelbe Substanzgemisch wird in heißem Methanol gelöst. Nach Filtration fällt bei $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein weißer flockiger Niederschlag aus. Das Filtrat ist dunkelgelb. Nach dreimaliger Umkristallisation erhält man weiße, nadelförmige Betulinsäurekristalle mit einer Reinheit von 99,3 %. Das Filtrat ist klar. Alle Lösungsmittel können redestilliert und erneut zur Isolierung genutzt werden. Somit steht eine Methode zur einfachen, umweltfreundlichen und billigen Gewinnung der Betulinsäure zur Verfügung, die einen nachwachsenden Rohstoff nutzt.

Der Nachweis über Identität und Reinheit wurde mit Dünnschicht- und Gaschromatographie (GC), Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS), Massenspektroskopie (MS) und $^1\text{H-NMR}$ erbracht (Galgon et al., 1999).

Dünnschichtchromatographie: Die isolierte Betulinsäure und die Referenzsubstanzen zeigten gleiches Laufverhalten bei unterschiedlichen Laufmitteln (Ethylacetat, Chloroform/Ethanol 20:3, Dichlormethan/Methanol 20:1) sowie gleiche Anfärbung mit den Detektionsmitteln Anisaldehyd/Schwefelsäure = Anisaldehyd-Reagenz R des DAB 10 (0,5 ml Anisaldehyd; 10 ml Essigsäure 98 %; 85 ml Methanol R; 5 ml Schwefelsäure) und Acetanhydrid/Schwefelsäure RN des DAB 10 (9 Volumenteile Acetanhydrid R werden mit 1 Volumenteil Schwefelsäure 96 % R gemischt) (Liebermann-Burchard-Reaktion). Als stationäre Phase dienten Dünnschichtchromatographieplatten: silica gel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke: 0,2 mm) mit Fluoreszenzindikator auf Aluminiumfolie. Bei der Farbreaktion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure kommt es sofort zu einer dunkelvioletten charakteristischen Betulinsäurezone. Beim Erwärmen verschwindet diese Bande und es tritt nun eine Färbung von gelb nach violett auf. Durch dieses unspezifische Detektionsreagenz konnten keine Verunreinigungen durch Sesqui- und Diterpene, Olefine, Phenol oder Indolstrukturen nachgewiesen werden. Die Liebermann-Burchard-Reaktion weist Steroide mit einer Hydroxylgruppe an C₃ nach. Betulinsäure reagiert unter dunkelvioletter Färbung. Auch bei größeren Mengen der isolierten Betulinsäure wurden keine Verunreinigungen mit diesem Nachweisreagenz sichtbar. Es trat keine weitere Fluoreszenzauslöschung bei 254 nm auf.

Gaschromatographie: Aufgrund der Polarität der Hydroxy- und Carboxygruppe und der Molmasse des C₃₀ Grundgerüsts der BA ist eine Derivatisierung notwendig. Angelehnt an die in Rückert et al. (1992) genutzte Silylierung von Steroiden wurde 1 mg Substanz in 50 µl Pyridin gelöst und mit 40 µl Hexamethyldisilazan und 10 µl Trimethylchlorsilan im Vial versetzt, 20 min bei 75 °C temperiert und mit Hexan auf 1 ml aufgefüllt. Mit einem Temperaturprogramm (2 min 250 °C, innerhalb 5 min auf 303 °C, 1,5 min bei 303 °C, Anstieg auf 310 °C in 5 min, 3 min bei 310 °C) und dem Trägergas Helium (Fluss 2 ml×min⁻¹, pneumatische Regulation) wurde die silylierte Betulinsäure bei 303 °C am Flammenionisationsdetektor (H₂-Fluss: 40 ml×min⁻¹, synthetische Luft: 450 ml×min⁻¹) nach einer Splitinjektion (1:20) nachgewiesen. Als innerer Standard diente Squalan. Zur Bestimmung des Gehaltes in Geweben der Platane (Tabelle 2) und der Reinheit wurde eine Kalibriergerade erstellt.

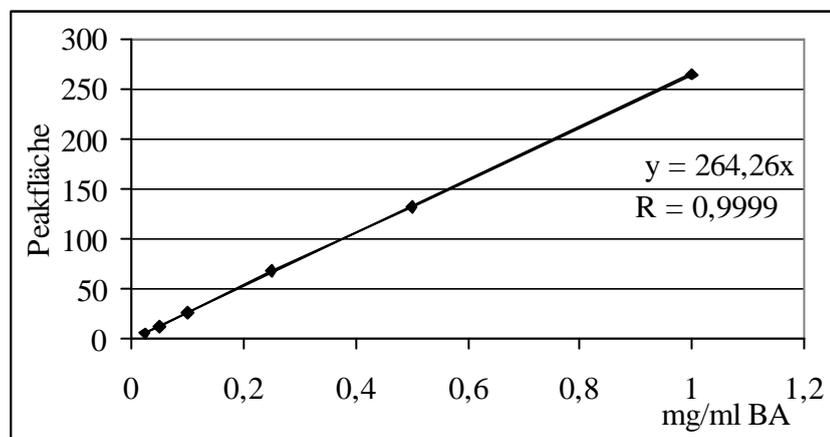


Abbildung 4: Kalibriergerade für die Gehaltsbestimmung der Betulinsäure mittels Gaschromatographie, korrigierte Peakflächen, innerer Standard: Squalan

Tabelle 2: Gaschromatographische Gehaltsbestimmung in Geweben der Platane (n = 6 ± SD) und verschiedenen Rindendrogen (n = 2, SD < 10 %), Nachweisgrenze 0,1 mg pro g Droge, (Galgon et.al., 1997, 1999)

Gewebe der Platane	mg BA pro g Trockenmasse	Rindendrogen	mg BA pro g Trockenmasse
Kork 1 mm	34,1 ± 0,67	<i>Betula pendula</i>	3,015
Kork 2-2,5 mm	32,8 ± 0,81	<i>Hamamelis virginiana</i>	0,498
Kork 4-5 mm	30,7 ± 0,71	<i>Rhamnus frangula</i>	0,128
Kernholz	0,94 ± 0,17	<i>Rhamnus purshiana</i>	0,528
Alburnum	1,91 ± 0,38	<i>Aesculus hippocastanum</i>	< 0,1

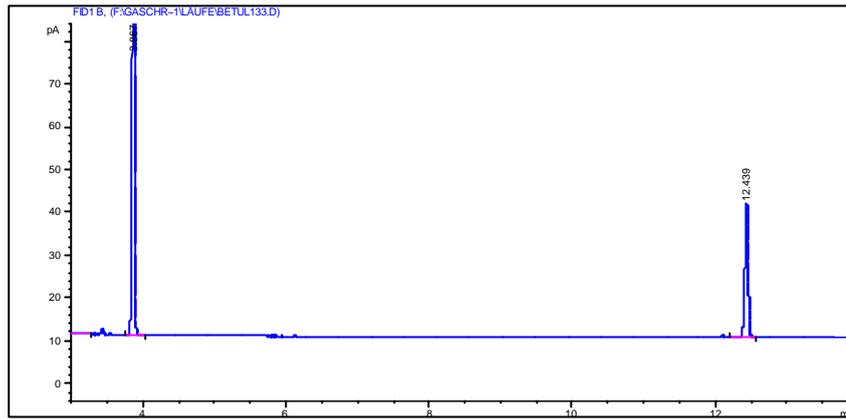


Abbildung 5: Qualitätsuntersuchung der isolierten Betulinsäure $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$, GC silylierte Probe, Peak bei 3 min = innerer Standard Squalan, Peak bei 12,439 min = Betulinsäure silyliert

Gaschromatographie/Massenspektroskopie: Die Bestimmung mit Hilfe der GC/MS brachte eine Übereinstimmung der Retentionszeiten und Zerfallsmuster mit den Referenzsubstanzen. Es konnten charakteristische Massenpeaks bei 73 (Trimethylsilylgruppe), 129, 189 m/z gefunden werden. Das Molekül ist bei diesen MS Bedingungen wahrscheinlich sehr instabil. Die MS Ionisierungsspannung betrug 50 eV.

Massenspektroskopie: Mit dem Massenspektrometer (HP5989, negativer Modus, Probenfluss: $30 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$, Kollisionsgas Sauerstoff) wurde die Molmasse der Betulinsäure, gelöst in Methanol, bestimmt und entspricht der Formel und der Referenzsubstanz. Die Molmasse der silylierten Betulinsäure, gelöst in Methanol/Wasser (9:1), wurde mit dem Massenspektrometer (LCQ MS, negativer Modus 4,5 kV, Probenfluss: $20 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$, Kollisionsgas Sauerstoff) bestimmt und ergab ein Signal bei m/z 528. Was einem Betulinsäureion plus Trimethylsilan (TMS) entspricht.

$^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie: Die Probe wurde in deuteriertem Chloroform CDCl_3 gelöst und TMS als Standard für 0 ppm zugesetzt. $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz

Die Spektren der Referenzsubstanz und der isolierten Substanz sind identisch. Aus dem Spektrum erkennt man charakteristische Signale :

δ 0,66 (d, 1H, -H an C_5), δ 0,75 (s, 3H, CH_3), δ 0,81 (s, 3H, CH_3), δ 0,95 (s, 3H, CH_3), δ 0,98 (s, 3H, CH_3), δ 1,0 (s, 3H, CH_3), δ 1,2-2,1 (m, andere aliphatische Ringprotonen), δ 1,7 (s, 3H, CH_3 an C_{30}), δ 2,28 (dt, $J = 11,3, 3 \text{ Hz}$, 1H, H an C_{13}), δ 3,05 (dt, $J = 11,5, 5 \text{ Hz}$, 1H, H an C_{19}), δ 3,19 (dd, $J = 11,5, 5 \text{ Hz}$, 1H, H an C_3), δ 4,60 und 7,72 (br s, je 1H der Metylen-Gruppe an C_{29})

Mit Hilfe der DC, GC, GC/MS, MS und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie konnte der Beweis der Identität und Gleichheit mit den Referenzsubstanzen erbracht werden. Die isolierte Betulinsäure hatte einen Reinheitsgrad von 99,4 % bei einer Ausgangskonzentration von 3,28 % in der Borke der Platane. Die biologische Wirksamkeit wurde an IGR1-Zellen überprüft. Es konnten keine Toxizitätsunterschiede gegenüber den Referenzsubstanzen festgestellt werden. Eine erhöhte Toxizität hätte z.B. auf Lösungsmittelreste oder zellschädigende Verunreinigungen schließen lassen.

3.5. Beschreibung des Inkubationsschemas mit Betulinsäure

Für alle Experimente mit Betulinsäure wurde aus einer DMSO-Stammlösung (frisch) eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt. BA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, monatlich ein Aliquot aufgetaut und bei $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die BA/DMSO-Lösung wurde mit PBS (96er MTP) oder Medium (Kulturschalen und -flaschen) so verdünnt, dass der maximale DMSO Gehalt $0,1\text{ }\%$ (96er MTP) oder $0,05\text{ }\%$ (Kulturschalen oder -flaschen) und die Betulinsäurekonzentration $0,008\text{--}20\text{ }\mu\text{g/ml}$ in den Kulturmedien betragen. Für die Versuche wurden Stammlösungen mit PBS oder Medium hergestellt, wobei wichtig ist, dass kleine Volumina der DMSO-Verdünnungsreihe schnell mit der entsprechenden Menge PBS oder Medium verdünnt werden, da es sonst zum Ausfallen der Betulinsäure kommt. Das klassische Verdünnen, wobei der Stoff mit einem Lösungsmittel angelöst und diese Lösung langsam mit einem zweiten weiterverdünnt wird, kann für die Betulinsäure nicht angewendet werden. Auch eine direkte Zugabe der BA/DMSO Lösung zum Medium führte zur Ausfällung der BA. Aus der Abbildung 6 sind deutlich die Unterschiede in der Wirkung zu erkennen. Bei der Säule (A) wurde die Stammlösung in mehreren Arbeitsschritten mit PBS auf die endgültige Konzentration verdünnt und bei (B) schnell und in einem Schritt die gesamte PBS Menge zugegeben.

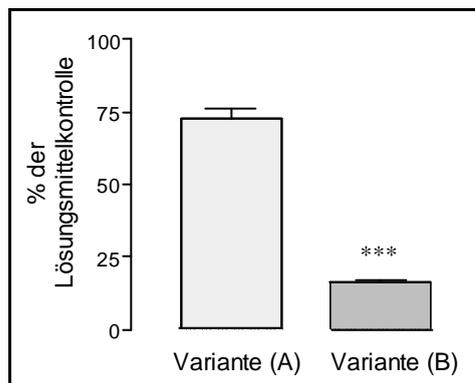


Abbildung 6: IGR1-Zellen wurde 24 h in Mikrotiterplatten mit Betulinsäure $10\text{ }\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nach dem Verdünnungsschema A bzw. B behandelt und die Zellanzahl bestimmt, Lösungsmittelkontrolle DMSO $0,1\text{ }\%$, $n = 6$, *** $P < 0,001$

3.6. Bestimmung der Zellanzahl und des Proliferationsverhaltens in Mikrotiterplatten

Die Bestimmung der Lebendzellanzahl erfolgte mittels der Vitalfärbung (Flick und Gifford, 1984; Podhaisky et al., 1997). Die Aussaat der Zellkulturen erfolgte in 96er Mikrotiterplatten. Abgelöste Zellen wurde nach Noxenexposition mit dem Medium entfernt und die lebenden, adhärenen Zellen mit Methanol für 10 min fixiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die fixierten Zellen mit Wasser gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte eine mindestens 10 minütige Inkubation mit einer $0,1\text{ }\%$ igen Kristallviolett-Lösung. Der überschüssige Farbstoff wurde durch gründliches Waschen mit Wasser entfernt. Nach dem

Trocknen der Platten wurde der Farbstoff mit 100 µl Citratpuffer (14,5 g Natriumcitrat, 250 ml Ethanol, 250 ml H₂O) eluiert und die Extinktion bei 540 nm in einem Mikrotiterplattenreader gemessen. In einem großen Messbereich kann ein linearer Verlauf beobachtet werden (Abbildung 7).

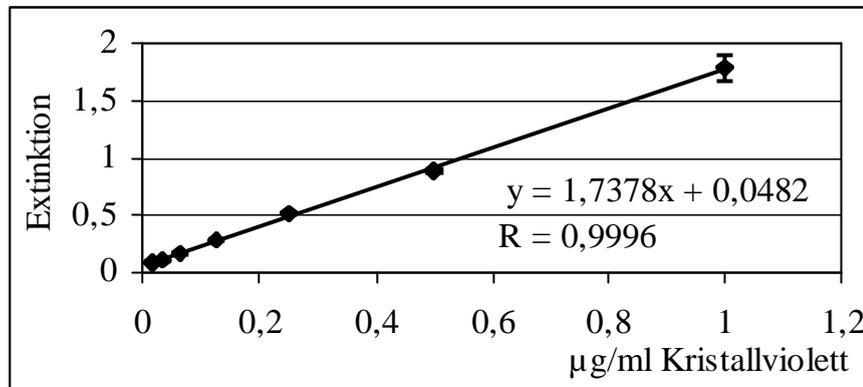


Abbildung 7: Kalibriergerade für den Vitalitätstest, Verdünnungsreihe Kristallviolett von 1-0,01 µg×ml⁻¹, n = 6

3.7. Bestimmung der DNA-Syntheseleistung in Mikrotiterplatten

Ein wesentlicher Schritt in der Zellteilung ist die Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase der Mitose. Aus diesem Grund wird die DNA-Syntheserate direkt mit dem Proliferationsverhalten der Zellpopulation in Verbindung gebracht. Der Einfluss auf die Proliferation wurde mit dem Cell-Proliferation-ELISA BrdU (colorimetric) untersucht. Dabei wird 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) statt Thymidin in die DNA eingebaut und nach Fixierung der Zellen durch einen Antikörper detektiert (Porstmann et al., 1985; Magaud et al., 1987). Der Test stellt eine gute alternative zur Bestimmung des ³H Thymidineinbaus dar (Muir et al., 1990). Die Präparation erfolgte nach dem Standardprotokoll des Kits (wissenschaftliche Begleitinformation, BrdU). Die Bestimmung der DNA-Syntheserate erfolgte in 96er MTP, 22 h nach Betulinsäureexposition.

3.8. Nachweis nekrotischer Schädigungen - Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität im Zellüberstand

Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand ist ein Nachweis nekrotischer Zellschädigungen (Dubar et al. 1993). Die Zellen wurden in 96er MTP kultiviert. 7 bzw. 24 Stunden nach Noxenexposition wurden 100 µl Zellüberstand in eine neue 96er MTP überführt und nach Vorschrift des Cytotoxicity Detection Kit Boehringer Mannheim (wissenschaftlich Begleitinformation, LDH) präpariert und bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm vermessen. Als Positivkontrolle für eine Membranschädigung diente eine Tween[®] 20-Lösung (0,02 %).

3.9. Bestimmung intrazellulärer Peroxide - DHR-Test

Bei vielen apoptotischen Prozessen sind intrazellulär ROS (reaktive Sauerstoffspezies) bei der Induktion der Apoptose und der apoptotischen Signalkaskade beteiligt, so nach UVB-Exposition (Peus et al., 1999) und bei der BA induzierten Apoptose in Gliomazellen (Wick et al., 1999). Wick führte den Nachweis mit Dichlorfluorescein. Für die Detektion von Peroxiden und H₂O₂ wurde Dihydrorhodamin 123 (DHR) genutzt. DHR wurde als sensitiver als Dichlorfluorescein von Rothe et al. (1991) eingeschätzt. Es wurde eine 5 mM Stammlösung in Dimethylformamid hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Äquivalente wurde unter Vermeidung einer längeren Lichtexposition der Zellkultur in 96er MTP zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 µM entstand. Die Messungen erfolgten am Fluoreszenzreader bei einer Anregung mit 485 nm und einer Messung der Emission bei 535 nm.

3.10. Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Apoptoseverhaltens

Der geregelte Zelltod ist mit komplexen Umgestaltungen der Zelle und einer Vielzahl an möglichen Signaltransduktionswegen verbunden. Mit dem Durchflusszytometer wurden Apoptosemarker bestimmt, um zum einen den gesicherten Nachweis der Apoptose zu führen und zum anderen die apoptotischen Ereignisse zu quantifizieren.

Von der Vielzahl der apoptosespezifischen Nachweismöglichkeiten wurden folgende Parameter bestimmt:

- Translokation des Phosphatidylserins von der inneren Seite der Zytoplasmamembran an die äußere, wobei die Zellmembran intakt bleibt (Annexin-V/PI-Test)
- Bildung des Membranproteins APO2.7 an der Mitochondrienmembran (APO2.7-Test)
- Entstehung von DNA-Fragmenten (TUNEL-Methode)

Für die Messungen wurden Zellen des Zellüberstandes und adhärenente Zellen nach Trypsinierung gepoolt und zusammen präpariert.

3.10.1. Durchflusszytometrie

3.10.1.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer arbeiten vorwiegend mit optischen Messprinzipien und dienen der analytischen Charakterisierung heterogener Zellsysteme. Informationen, die bei der einzelnen Vorbeiführung der Partikel an der Lichtquelle entstehen, ergeben sich aus der Quantifizierung des Streulichtes und der Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle. Eine Analyse besteht demnach aus der Summe vieler schnell aufeinanderfolgender Einzelmessungen. Als Lichtquelle dienen Laser, Quecksilberhochdruck- oder Xenonlampen, um die nötige hohe Intensität zur Anregung der Fluoreszenz- und Streulichtsignale zu erreichen. Fluoreszenz entsteht bei der Anregung von Fluorochromen, die zum Nachweis unterschiedlicher Zelleigenschaften dienen. Sie lassen sich unterteilen in Farbstoffe zur Sichtbarmachung von „Sonden“ (z.B. monoklonaler Antikörper APO2.7), zum direkten Nachweis von Zellbe-

standteilen (DNA mittels interkalierenden Propidiumiodides) oder zur Untersuchung funktioneller Zelleigenschaften (Enzymaktivitäten).

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie das Licht aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften. Die Lichtstreuung ist am Größten im Kleinwinkelbereich 0-10° des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreuung, Forward Angle Light Scatter [FSC]), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreuung, Side Scatter [SSC]). Aus dem FSC lassen sich Aussagen zur Größe der Zellen treffen. Das SSC ist abhängig von Granularität, Membranfaltung und äußerer Form der Zellen. Die Auswertung und Bedeutung bei der Messung apoptotischer Prozesse sind im Abschnitt 3.10.1.2 dargestellt.

3.10.1.2. *Umlagerung des Phosphatidylserins in der Zytoplasmamembran Annexin-V-FITC/Propidiumiodid*

In frühen Phasen der Apoptose treten Veränderungen in der Struktur der Zytoplasmamembran auf. Das innermembranständige Phosphatidylserin wird an der äußeren Membran präsentiert und dort durch Annexin-V-FITC am Zytometer nachgewiesen (Gorman et al., 1997; van den Eijnde et al., 1997). Zur Abgrenzung spätapoptotisch/nekrotischer von vitalen und apoptotischen Zellen wird als zweiter Parameter die Interkalation von Propidiumiodid (PI) in die DNA untersucht (Boersma et al., 1996). PI kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen und so zeigen vitale und apoptotische Zellen kein PI-Fluoreszenzsignal.

Protokoll:

Antikörper: Annexin-V-FITC

Markierungslösung: 10 µl Annexin-V-FITC, 10 µl PI 5 % 500 µl Annexininkubationspuffer (10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl₂ mit NaOH auf pH 7,4 einstellen)

Die relativ hohe Calciumkonzentration ist nötig, da die Bindung des Annexin-V an Phosphatidylserin Ca²⁺-abhängig ist.

1. Zellen liegen als Zellsuspension (0,5 Millionen Zellen pro Milliliter) in PBS vor.
2. Suspension in ein FACS-Röhrchen überführen und 5 min bei 300 g zentrifugieren
3. Überstand dekantieren, ca. 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
4. 100 µl Markierungslösung hinzugeben und 15 min dunkel bei RT inkubieren
5. Nach Zugabe von 400 µl Annexininkubationspuffer Zellen am Durchflusszytometer vermessen

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm WinMDI. Der Dotplot wurde in vier Quadranten aufgeteilt und den einzelnen Zellfraktionen (vitale, apoptotische und spätapoptotisch/nekrotische Zellen) zugeordnet (Abbildung 8).

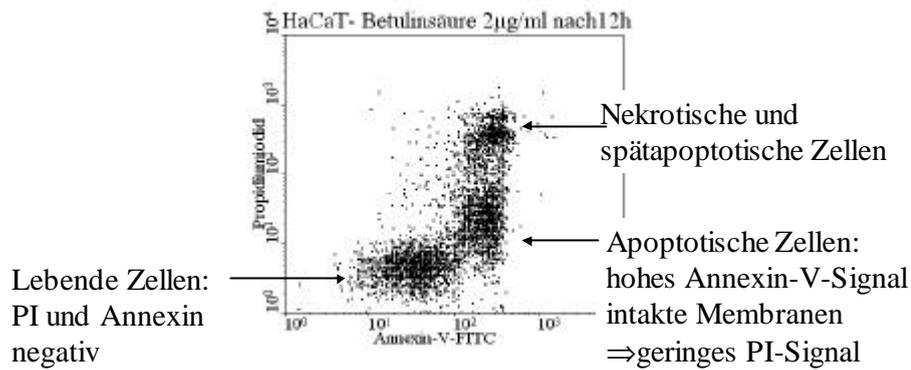


Abbildung 8: Darstellung des Messergebnisses einer Phosphatidyldetektion im Außenbereich der Zellmembran von HaCaT-Zellen mit gleichzeitiger Propidiumiodidfärbung als Dotplot (durchflusszytometrische Zweiparametermessung)

Zur Auswertung wurden nur ganze Zellen (Einteilung nach FFC/SSC) verwendet um folgende Fehlinterpretationen zu vermeiden. Einzelne Experimente bzw. Messungen werden so vergleichbar und können reproduziert werden.

- apoptotische Partikel ohne Zellkern, Zelltrümmer ohne Zellkern mit defekter Membran täuschen Annexin-V-positive und PI-negative Zellen vor
- kleine Partikel liegen im Bereich der vitalen Zellen

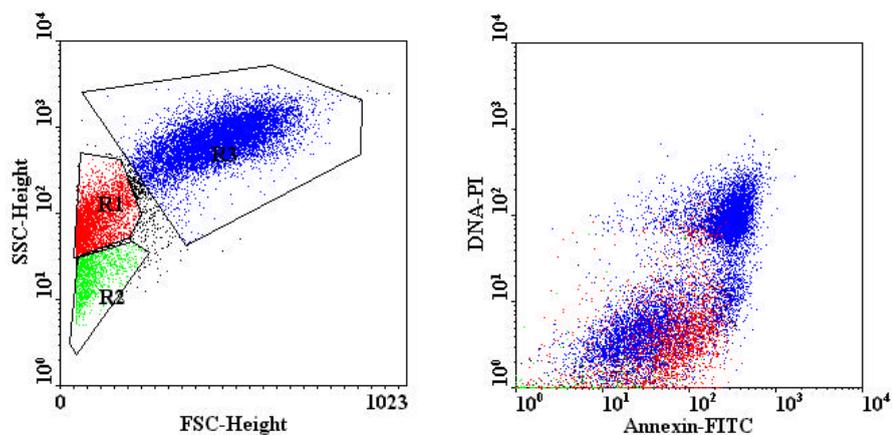


Abbildung 9: linke Darstellung: Dotplot FSC/SSC, rechte Darstellung: Annexin-V/PI, HaCaT-Zellen in SFM 16 h mit $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Betulinsäure behandelt

Die Abbildung 9 zeigt ein FSC/SSC Diagramm, aus dem Größenverteilungen und Strukturierungen einzelner Zellpopulationen beurteilt werden können und einen Dotplot, ohne Herausgaten kleiner Zelltrümmer und apoptotischer Partikel. In der Darstellung ist weiterhin gezeigt, dass sich die Kompartimente der Region R1 (rot) im Bereich der apoptotischen und der vitalen Zellen befinden. Auf Grund der Größe und Strukturierung sind aber eher spätapoptotische Partikel mit relativ hoher Granulierung anzunehmen. Die Region R2 (grün) stellt kleine Zellfragmente dar, die nicht mehr apoptotischen oder nekrotischen Prozessen zuzuordnen sind und sich aber im Quadranten der vitalen Zellen befinden.

Anhand der Abbildung 10 soll die Einwirkung der Regionen R1 und R2 auf das Auswertungsergebnis deutlich gemacht werden. Ohne Abgrenzung einzelner Regionen sind die vitalen Zellen die größte Population. Mit dem gesetzten Gate, das nur die Zellen der Region 3 beinhaltet, zeigte sich aber, dass die meisten Zellen spätapoptotische und nekrotische Eigenschaften besitzen (Abbildung 10).

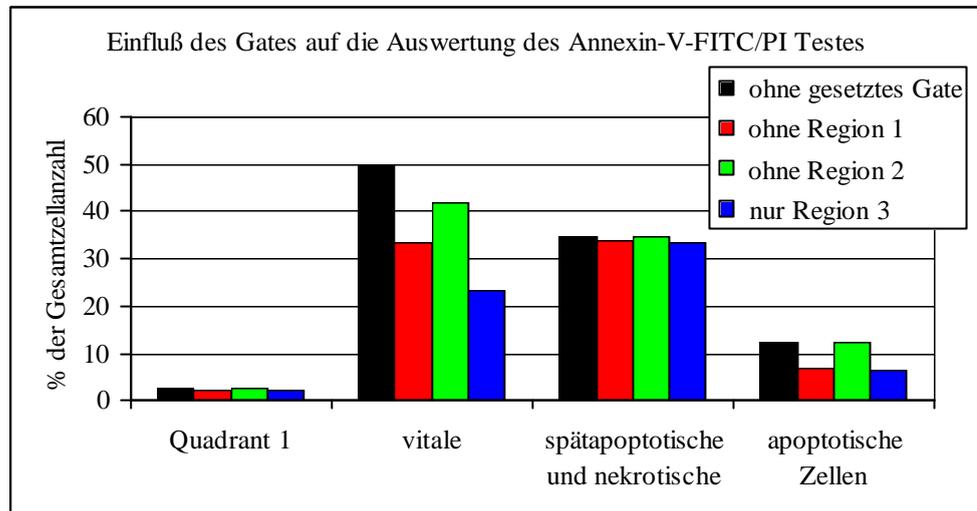


Abbildung 10: Einfluss der Regionen auf den Annexin-V/PI-Test, Auswertung des Versuches Abbildung 9, HaCaT-Zellen in MEM 16 h mit BA $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ behandelt, (n = 1) Die Regionen beziehen sich auf den Dot-plot FFC/SSC in der Abbildung 9 linke Darstellung.

Da die Anzahl der gemessenen Ereignisse in den Regionen R1 und R2 von der zu untersuchenden Noxe abhängig ist, aber auch starken präparativen Einflüssen unterliegt und es sich nicht um ganze Zellen handelt, wurde nur die Fraktion R3 (blau, ganze Zellen) für alle Auswertungen hinzugezogen. Somit können auch die Aussagen unterschiedlicher Präparationen, Apoptose- und Differenzierungsmarker verglichen und beurteilt werden.

3.10.1.3. Nachweis des mitochondrialen Membranproteins - APO2.7

Der Nachweis des Antikörpers gegen APO2.7 stellt eine Nachweismethode für apoptotische Zellen dar (Zang et al., 1996) und kann zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose genutzt werden (Koester et al., 1998). Der Klon 2.7A6A3 erkennt ein mitochondriales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, das sogenannte Apo2.7 oder 7A6-Antigen, dessen Funktion bisher noch nicht geklärt ist. Die Bindung des Antikörpers korreliert mit dem Auftreten der DNA-Leiter in der Gelelektrophorese (Koester et al., 1997) und Caspase-3 Aktivierung (Büssing et al., 1999).

Da es sich bei dem APO2.7-Antigen um ein intrazelluläres Protein handelt, wurden die Zellen zur Detektion früher Apoptosephasen vor der Markierung mit dem Antikörper permeabilisiert.

Protokoll:

primärer Antikörper: APO2.7 Nr. 2087
Isotypkontrolle X931

sekundärer Antikörper: medac M35001

1. Zellen, nach Standardprozedur geerntet, liegen als Zellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 Millionen Zellen pro ml PBS vor
2. Suspension in einem FACS-Röhrchen 5 min bei 300 g zentrifugieren
3. Überstand dekantieren, ca. 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
4. Mit 1 ml PBT (0,1 % Tween[®] 20 in PBS mit 1 % BSA) 5 min inkubieren (Permeabilisierung der Zellmembran)
5. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
6. 10 µl des primären Antikörpers (APO2.7 bzw. X931) zugeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
7. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers 2 ml PBB (PBS mit 1 % BSA) hinzufügen
8. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
9. Mit 10 µl des sekundären Antikörpers M35001 20 min im Dunkeln inkubieren
10. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers mit 2 ml PBB waschen
11. Pellet mit 0,5 ml PBS resuspendieren und am Durchflusszytometer vermessen

Zur Auswertung wurde der Bereich der APO2.7-positiven Zellen markiert und der Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellanzahl prozentual dargestellt. Zur Auswertung diente das Programm WinMDI.

3.10.1.4. Caspaseaktivität am Zytokeratin 18 - M30

Der Antikörper M30 bindet an ein Caspase-geschnittenes, Formalin-resistentes Epitop des Zytokeratin 18 (CK 18), das nicht am nativen CK 18 detektierbar ist (Leers et al., 1998). Der Nachweis des CK 18 Schnittproduktes ist ein frühes Ereignis der Apoptose (Caulin et al., 1997). Die Messungen wurden für den Nachweis der Caspaseaktivität an HaCaT-Zellen genutzt.

Protokoll:

primärer Antikörper: Clone M30 anti Caspase cleavage product of CK 18

sekundärer Antikörper: anti-mouse-Ig-fluorescein

Es wurde der M30 CythoDeath Kit (Boeringer Mannheim) für die Messungen genutzt.

1. Zellen liegen in PBS als Suspension mit einer Konzentration von 0,5 Mio. pro ml¹ vor
2. Suspension in einem FACS-Röhrchen 5 min bei 300 g zentrifugieren
3. Überstand dekantieren, ca. 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
4. 1 ml Methanol (-20 °C) unter sanftem Vortexen eintropfen und Zellen 30 min bei 4 °C fixieren

5. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren restliches Methanol durch Abtropfen auf Filterpapier entfernen
6. Zum Permeabilisieren der Zellmembran sofort 2 ml PBT hinzufügen, Pellet aufklopfen und 30 min inkubieren
7. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
8. 10 µl M30 antibody stock solution zugeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
9. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers 2 ml PBB hinzufügen und 5 min inkubieren
10. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
11. Mit 10 µl des sekundären Antikörpers 30 min im Dunkeln inkubieren
12. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers mit 2 ml PBB waschen
13. Pellet mit 0,5 ml PBS resuspendieren und am Durchflusszytometer vermessen

Zur Auswertung wurde der Bereich der M30 positiven Zellen markiert und der Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellanzahl prozentual dargestellt. Zur Auswertung diente das Programm WinMDI.

3.10.1.5. Gatekeeper des Genoms - p53

Ein wesentlicher Gatekeeper des Genoms ist das Protein p53, das Kontrollfunktion im Zellzyklus besitzt. Der Einfluss des p53 in der BA-induzierten Apoptose wurde am Durchflusszytometer bestimmt (Filippini et al., 1999). Es wurde eine Zweiparametermessung des FITC markierten p53 (Fluoreszenz 1) und PI markierter DNA (Fluoreszenz 2-Area) ausgewählt, die eine genaue Bestimmung des p53-Gehaltes in den Zellzyklusphasen ermöglichte.

Protokoll:

Antikörper: anti p53 FITC low F/P

Isotypenkontrolle: ms-IgG2b-FITC low F/P

1. Zellen liegen als Zellsuspension (Konzentration 0,5 Millionen Zellen pro ml) vor
2. Suspension in ein FACS-Röhrchen überführen und 5 min bei 300 g zentrifugieren
3. Überstand dekantieren, ca. 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
4. 1 ml Ethanol (-20 °C) unter sanftem Vortexen eintropfen und Zellen 5 min bei 4 °C fixieren
5. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren restliches Ethanol durch abtropfen auf Filterpapier entfernen
6. Zum Permeabilisieren der Zellmembran sofort 2 ml PBT hinzufügen, Pellet aufklopfen und 10 min inkubieren
7. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
8. 15 µl DAKO F7054 bzw. X0959 zugeben und 30 bis 45 min im Dunkeln inkubieren
9. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers 2 ml PBB hinzufügen und 5 min inkubieren
10. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen

11. 300 μl RNase Lösung (1 $\text{mg}\times\text{ml}^{-1}$ RNase in PBS) hinzufügen und 10 min inkubieren
12. 300 μl PI-Lösung 5 % hinzufügen und nach 10 min bei 4 °C am Durchflusszytometer vermessen

Die Auswertung der Durchflusszytometrieanalyse erfolgte mit Hilfe des Programmes WinMDI. Die einzelnen Zellzyklusphasen wurden separat ausgewertet und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit denen der Kontrolle und des Isotyps verglichen. Mit dem Isotyp wurde die Bindung des p53-Antikörpers nachgewiesen und der Einfluss von Unspezifitäten erfasst.

3.10.1.6. DNA-Fragmentierung - TUNEL-Methode

Ein wesentliches Ereignis der Apoptose ist die Entstehung des DNA-Fragmentierungsmusters. Die DNA-Schnittprodukte wurden mit der TUNEL-Methode nachgewiesen. Beim TUNEL-Assay (Terminale deoxynukleotidyl-Transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) werden DNA-Strangbrüche in der Zelle in situ nachgewiesen. (Gavrielli et al., 1992). Für die Messungen in dieser Arbeit wurde der In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Boehringer Mannheim) verwendet und nach den Instruktionen des Kits verfahren (wissenschaftliche Begleitinformation, TUNEL).

3.10.2. Westernblot

Für die routinemäßige Proteinanalyse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt. Bei diesem Verfahren wird eine innere Matrix aus einem stark vernetzten Polyacrylamid-Gel aufgebaut, durch welche die Proteine wandern. Die Porengröße wird durch unterschiedliche Konzentrationen an Monomeren bestimmt. Die Proteine befinden sich in einem Medium, welches Natriumdodecylsulfat (SDS) und das Reduktionsmittel Mercaptoethanol enthält. Das Detergens lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an, wodurch diese entfaltet und Assoziationen mit anderen Proteinen und/oder Lipiden gelöst werden. Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken, um Polypeptide in die Untereinheiten aufzuspalten. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Western-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und können dort mit Antikörpern detektiert werden.

Die kultivierten und entsprechend der Fragestellung behandelten Zellen wurden zweimal mit PBS 4 °C gewaschen und restliches PBS sorgfältig entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit 1 ml Lysispuffer (in H₂O: Tris pH 7,5 20 mM; NaCl 250 mM; Triton X-100 1 %; EDTA pH 7,5 10 mM; EGDT pH 7,5 2 mM; Zinkacetat 1 mM; Orthovanadat 1 mM; PMSF 1 mM; Protease Inhibitor Cocktail 30 μl ; Leupeptin 1 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$; Aprotinin 1 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) pro 75 cm² im Kühlschrank für ca. 60 min. Nach dem Abschaben der Zellen und des Lysates mit einem Schaber und Überführen in 1,5 ml-Tubes wurde 30 min bei 10.000 $\text{U}\times\text{min}^{-1}$ und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Tube überführt. Dieses Lysat wurde bei -20 °C gelagert. Um von allen Proben die gleiche Proteinmenge aufzutragen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dazu wurden 795 μl dest. H₂O, 200 μl BioRad Proteinassay und 5 μl Probe vorsichtig gemischt und nach 15 min 200 μl dieser Lösung bei 620 nm vermessen. 800 μl dest. H₂O + 200 μl

BioRad Proteinassay dienten als Referenz (Eichkurve 1-20 µg Protein). Das Lysat wurde mit 2× SDS Probenpuffer (20 % Glycin, 5 % β-Mercaptoethanol, 4 % SDS, 180 mM Tris) versetzt bei 95 °C denaturiert und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

Wenn die Proteinkonzentrationen im Lysat (max. 25 µl können aufgetragen werden) zu gering waren, folgte eine Natriumdesoxycholatfällung, bei der 1 ml Lysat, 10 µl 10 %ige Natriumdesoxycholatlösung und 3 µl 85 %ige Phosphorsäure 20 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 13.000 U×min⁻¹ zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in entsprechender Menge SDS-Probenpuffer gelöst und mit 5 µl NaOH auf einen basischen pH-Wert eingestellt. Entsprechend der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele zwischen 7,5 und 15 % Acrylamid genutzt, z.B. Trenngel 12 % [4,5 ml H₂O; 2,5 ml Trenngelpuffer (125 mM Tris pH 8,8; 0,2 % SDS), 3 ml Acrylamid/Bis (38 %), 5 µl Temed; 75 µl 10 % APS].

Die Proteine wurden im Sammelgel 5 % [2,5 ml H₂O, 1,0 ml Sammelgelpuffer (375 mM Tris pH 6,5, 0,2 % SDS), 0,5 ml Acrylamid/Bis (38 %), 5 µl Temed, 36 µl 10 % APS] mit 60 mV und im Trenngel mit 120 mV getrennt (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris pH 8,5, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Anschließend wurden die Proteine mit 150 mA 1 h auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Westernblotpuffer: 20 mM Tris pH 8,5; 150 mM Glycin; 0,02 % SDS; 20 % Methanol). Die Membran wurde kurz mit 2 % Ponceau-Rot gefärbt, Banden des Proteinmarkers (20-500 kDa) mit Kugelschreiber markiert. Die Färbung wurde mit 1×TBS (0,01 M Tris pH 7,4; 0,154 M NaCl; H₂O ad 1000 ml) ausgewaschen und die Membran mit Blockingpuffer (Milcheiweiß 0,5 % in 1×TBS) über Nacht geblockt.

Der primäre Antikörper (Konzentration siehe Tabelle 3) in Blockingpuffer wurde 3 h, der sekundäre 1-2 h bei RT inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1×TBS (0,154 M NaCl, 0,01 M Tris) entfernt.

Tabelle 3: Inkubations- und Konzentrationsschema der primären und sekundären Antikörper

Primäre Antikörper	Konzentration	% Acrylamid im Trenngel	Inkubationsdauer
Involucrin	1:500	7,5	5 h bei RT
p53	1:1000	10	4 h bei RT
Caspase 3, CPP32	1:500	15	15 h bei 4 °C
Sekundärer Antikörper			
Anti mouse HRP	1:1000		2 h bei RT

Je 1 ml ECL-Lösung 1 und 2 wurden gut gemischt, auf der Membran gleichmäßig verteilt, 1-2 min inkubiert und die Chemilumineszenz mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette detektiert. Die Dokumentation des entwickelten Filmes erfolgte mit Hilfe eines Flachbett-scanners.

3.10.3. Fluoreszenzmikroskopie

Mit der Mikroskopie können Strukturen, Zellen und einzelne Zellbestandteile betrachtet werden. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Chromophore, die für Zellstrukturen spezifisch oder an Antikörper gekoppelt sind, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht durch einen Filter betrachtet. Dadurch können vor einem dunklen Hintergrund winzige Mengen eines Fluoreszenzfarbstoffes nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Detektion der Chromatinkondensation und dem in situ Nachweis eventueller Mykoplasmenkontaminationen genutzt. Die DNA wurde hierzu mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt (Freshney, 1990). Nach Anregung mit UV-Licht erscheint der Zellkern in einem bläulich-weißen Licht (Abbildung 11). Mykoplasmen-DNA wird als leuchtende kleine Punkte rund um die Zellen sichtbar (Abbildung 12). Die DNA der Mitochondrien wird nicht angefärbt.



Abbildung 11: Mykoplasmen freie Primärkultur: NHEK 1. Passage am 4. Kulturtag. Falschfarbendarstellung der Zellkerne, DNA-Färbung mit Hoechst 33258

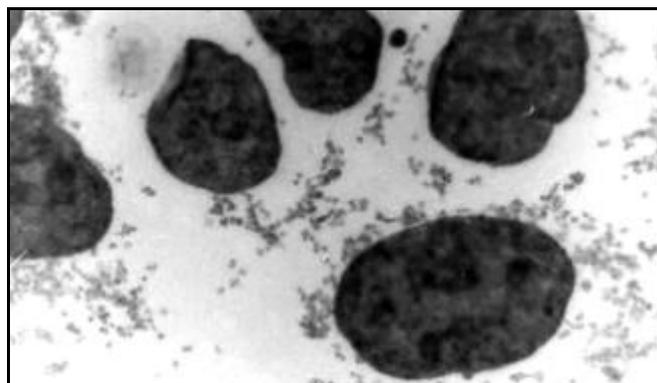


Abbildung 12: Mykoplasmen kontaminierte Kultur NHEK 1. Passage am 4. Kulturtag, Mykoplasmen werden als dunkle Punkte um den Zellkern sichtbar, Falschfarbendarstellung der Zellkerne, DNA-Färbung mit Hoechst 33258

Protokoll

1. Zellen auf Deckgläschen kultiviert und je nach Fragestellung behandelt
2. Medium entfernen und zweimal mit PBS waschen
3. mit Methanol/Eisessig (1:3) 10 min fixieren und an der Luft trocknen
4. Färbung mit Hoechst 33258 ($0,1 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$), 10 min
5. Zweimal waschen mit entionisiertem, sterilisiertem Wasser
6. Einbettung mit Antifading (25 mg p-Phenyldiamin, 5 ml PBS, 20 ml Glycerin)
7. Inkubation bei 4 °C, mindestens 2 h
8. Auswertung am Fluoreszenzmikroskop, Anregung Quecksilberdampf Lampe, Filterkombination: BH2-DMU
9. Fotografische Dokumentation mit einem 400er Diafilm.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde vor allem für die routinemäßige Untersuchung der Zellen auf Mykoplasmen und zur schnellen Beurteilung der apoptotischen Ereignisse in einer Zellkultur genutzt. Da eine quantitative Aussage subjektive Einflüsse besitzt, wurden die Ergebnisse der Mikroskopie nur in der Zusammenfassung als Beispiele präsentiert. Aufgrund der Vergrößerungen die beim Entwickeln und Bearbeiten der Fotografien in Bildbearbeitungsprogrammen auftreten, werden keine genauen Vergrößerungen zu den Abbildungen angegeben.

3.11. Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten

Für den Nachweis der Induktion einer terminalen Differenzierung der Keratinozyten wurden die Proteine Involucrin und Filaggrin bestimmt. Diese Interfilamentproteine spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Barrierefunktion der Haut. So wird durch Involucrin und andere Proteine eine 12 nm dünne, aber zähe, quervernetzte Lage an der der Zytoplasmamembran zugewandten Seite ausgebildet. Involucrin ist ein früher Differenzierungsmarker, seine Expressierung beginnt im Stratum spinosum (Steinert und Marenkov, 1997), aber es existiert nicht im Stratum basale.

Hauptbestandteil des Keratohyalins im Stratum granulosum ist das Protein Filaggrin, welches an der Verdichtung und Vernetzung von Keratinen beteiligt ist. Filaggrin ist ein später Differenzierungsmarker. Die Lage dieser beiden Proteine ist in der Abbildung 13 dargestellt. Die kompakte Membran enthält die Hüllproteine Cystatin A, Elafin, Involucrin, Lorricrin und weitere prolinreiche Proteine. In diese vernetzte Schicht sind Keratinfilamente eingebunden, die im Zellinneren durch Filaggrin aneinander geknüpft werden (Steinert und Marenkov, 1995).

Involucrin und Filaggrin werden auch bei der Differenzierung von Keratinozyten in Zellkulturen gebildet und sind deshalb als Differenzierungsmarker geeignet (Yaffe et al., 1993).

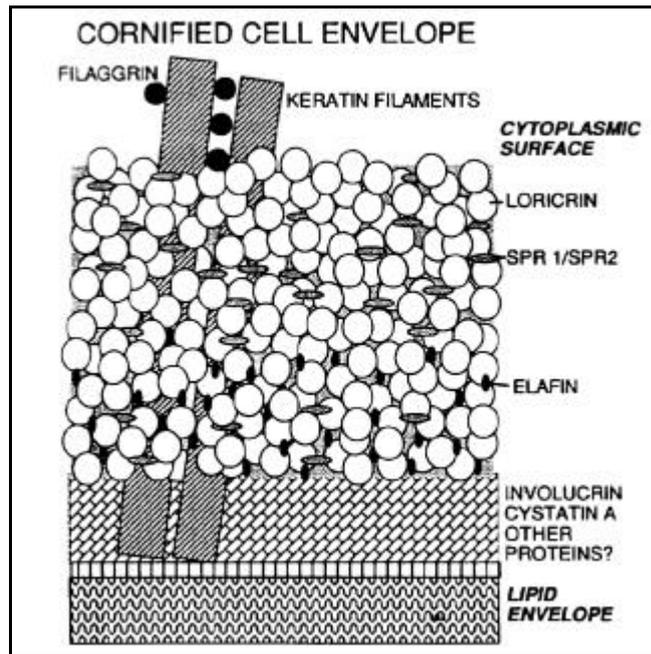


Abbildung 13: Struktur der äußeren zwei Lagen der cornified cell envelope, Lage der Differenzierungsmarker Filaggrin und Involucrin (nach Steinert und Marenkov, 1995)

3.11.1. Filaggrin

Für eine Bestimmung des Differenzierungsverhaltens wurde der Nachweis des Filaggrins am Durchflusszytometer genutzt (Nakatani et al., 1992). Die Keratinozytenzellkulturen wurden bei 70 % Konfluenz für die Untersuchungen verwendet, da in einem konfluenten, längere Zeit kultivierten Keratinozytenzellrasen schon eine Filaggrinexpression stattfindet. Um zu überprüfen, ob mit dieser Methode ein Anstieg des Filaggrinnachweises möglich ist, wurde als Positivkontrolle die terminale Differenzierung in normalen Keratinozyten durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration des Kulturmediums genutzt (Henning et al., 1980; Ratnam et al., 1996). Um den Nachweis der Filaggrinexpression in der Zelle führen zu können, wurden die Zellen mit Methanol fixiert und permeabilisiert.

Protokoll:

primäre Antikörper: anti-Filaggrin clone 576

Isotypenkontrolle: DAKOX931 (msIgG1)

sekundärer Antikörper: medacM35001

1. Zellen liegen als Zellsuspension von 0,5 Millionen Zellen pro ml PBS vor
2. Suspension in ein FACS-Röhrchen überführen und 5 min bei 300 g zentrifugieren
3. Überstand dekantieren, ca. 100 µl belassen und Pellet aufklopfen
4. 1 ml Methanol (4 °C) unter sanftem Vortexen eintropfen, Zellen 5 min bei 4 °C fixieren
5. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren restliches Methanol durch Abtropfen auf Filterpapier entfernen

6. Zum Permeabilisieren der Zellmembran sofort 2 ml PBT hinzufügen, Pellet aufklopfen und 10 min inkubieren
 7. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
 8. 10 µl anti Filaggrin bzw. X931 zugeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
 9. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers 2 ml PBB hinzufügen und 5 min inkubieren
 10. 5 min bei 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und Pellet aufklopfen
 11. Mit 10 µl des sekundären Antikörpers M35001 20 min im Dunkeln inkubieren
 12. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers mit 2 ml PBB waschen
 13. Pellet mit 0,5 ml PBS resuspendieren und am Durchflusszytometer vermessen
- Für die Auswertung wurden Filaggrin positive Zellen markiert und mit dem Programm WinMDI ausgewertet. Als Positivkontrolle für eine Differenzierung der Keratinozyten wurden die Zellen 48 h mit 2,5 mM Ca²⁺ behandelt.

3.11.2. Involucrin

Der Nachweis der Involucrinexpression in der frühen Phase der Differenzierung wurde am Durchflusszytometer und mit der Westernblotmethode geführt.

Involucrin eignet sich für eine Bestimmung am Durchflusszytometer (Erp van et al., 1994), die Präparation erfolgte wie unter Kap 3.11.1 Filaggrin beschrieben. Zur Auswertung wurde die Verschiebung des Medians der Fluoreszenzintensität herangezogen. Der Median entspricht der Verteilungsklasse, bei der 50 % der Werteverteilung darüber und 50 % darunter liegen. Er wird von „Ausreißern“ am wenigsten beeinflusst und gibt daher eine recht gute Abschätzung des Signalwertes wieder. Er ist aber gegenüber kleinen Veränderungen etwas unempfindlicher. Da Involucrin ein früher Differenzierungsmarker ist, aber auch in älteren, konfluenten Zellkulturen exprimiert wird, wurden die Zellen bei 70 % Konfluenz für die Versuche genutzt.

Involucrin, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (wissenschaftliche Begleitinformation, Involucrin), wurde weiterhin mit dem Westernblot (Kap. 3.10.2) bestimmt (Hanley et al., 1998). Die Zellen wurden hierzu bei 40-50 % Konfluenz für die Experimente genutzt und für einen Zeitraum von 1-72 h mit 8 µg×ml⁻¹ BA behandelt. Eine Erhöhung des Calciumgehaltes im Kulturmedium auf 2,5 mM diente als Positivkontrolle für eine Induktion der Differenzierung.

Protokoll:

primäre Antikörper: anti -Involucrin NCL-INV

Isotypenkontrolle: DAKOX931 (msIgG1)

sekundärer Antikörper: medac M35001

Für die Untersuchungen mit der Westernblotmethode wurde eine Zeitreihe 1-72 h aufgenommen. Als Positivkontrolle diente 2,5 mM Ca²⁺, 72 h inkubiert. Alle Zellen wurden zum selben Zeitpunkt geerntet.

3.12. Zellzyklusphasenanalyse

In den einzelnen Abschnitten des Zellzyklus besitzt die Zelle unterschiedliche DNA-Mengen. Auf diese Weise kann die Zelle der G₀/G₁-, S- oder G₂/M-Phase zugeordnet werden. Das Testprinzip beruht auf einer stöchiometrischen Interkalation des Propidiumiods in die DNA. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer. Die Ergebnisse stellen die Verteilung der Zellen einer Kulturschale auf G₀/G₁-, S- oder G₂/M-Phase in Prozent anhand des von den Einzelzellen gelieferten Signals dar. Es wurden in der Regel Dreifachbestimmungen für einen Messpunkt in einem Behandlungsschema durchgeführt. Die Zellen wurden nach den folgenden Protokollen präpariert.

Method 1 für Zellen, die durch Trypsinierung von den Kulturschalen abgelöst wurden wobei ein Teil für andere Präparationen verwendet wurde.

1. 10⁶ Zellen liegen in 1 ml PBS vor
2. 5 min bei 300 g zentrifugieren Überstand dekantieren
3. Zellen mit 1 ml Methanol (-20 °C) unter vorsichtigem Eintropfen fixieren
4. Nach mindestens 30 min bei 4 °C, 5 min mit 300 g zentrifugieren, Überstand entfernen und mit 1 ml mit 0,1 % Tween[®] 20, 1 % BSA in PBS 15 min inkubieren
5. 5 min mit 300 g zentrifugieren, Überstand dekantieren und 350 µl RNase Lösung hinzugeben, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
6. 400 µl PI-Lösung 10 % hinzugeben und 10 min bei 4 °C inkubieren
7. Bis zum Messen vor Licht geschützt aufbewahren

Method 2 für Zellen, die direkt für eine Zellzyklusanalyse verwendet wurden.

1. Medium aus den Kulturgefäßen (2 mm Schale) entfernen und Zellen mit PBS waschen
2. Mit 2 ml Zitronensäure/Tween[®] 20-Lösung (2,1 g Zitronensäure, 0,5 g Tween[®] ad 100 ml Wasser) 10 min inkubieren
3. 5 min zentrifugieren mit 300 g, Überstand dekantieren, Pellet aufklopfen
4. 2 ml Ethanol (-20 °C) vorsichtig eintropfen
5. Mindestens 24 h bei 4 °C aufbewahren
6. 5 min zentrifugieren mit 300 g, Überstand dekantieren, Pellet aufklopfen
7. 10 min Inkubation mit 1 ml Tween[®] 20 0,5 % in PBS
8. 5 min zentrifugieren mit 300 g, Überstand dekantieren, Pellet aufklopfen
9. 10 min Inkubation mit 0,3 ml RNase-Lösung (1 mg×ml⁻¹) bei Raumtemperatur
10. 10 min inkubieren mit 0,3 ml PI-Lösung (125 µg×ml⁻¹) bei Raumtemperatur
11. Vermessung der Proben am Durchflusszytometer

Die zweite Methode zeichnet sich durch sehr schmale Peaks aus.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ModFit. Der Auswertemodus der S-Phase wurde entsprechend der Peakform ausgewählt.

3.13. Ergebnisdarstellung und statistische Auswertungen

Die in den Tabellen und Grafiken gezeigten Resultate ergeben sich aus unterschiedlichen Anzahlen von Einzelexperimenten, die bei der jeweiligen Darstellung angegeben ist.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Lebendzellanzahlbestimmung, zum Proliferationsverhalten und zur Freisetzung der Lactatdehydrogenase wurden prozentual auf die unbehandelte Lösungsmittelkontrolle (100 % Wert) bezogen.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellpopulationen der Einzelexperimente zusammengefasst. Die Messreihen der Einzelexperimente mit $n > 10$ wurden einem Ausreißertest nach Dixon unterworfen. Die in dieser Arbeit gezeigten grafischen Darstellungen beinhalten Mittelwerte und deren Standardabweichungen, berechnet aus der Ergebniszusammenfassung der unabhängigen Einzelexperimente.

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Messreihen wurde der zweiseitige t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben bei Varianzhomogenität nach F-Test und Normalverteilung oder der parameterfreie Test nach Mann-Whitney genutzt. Bei Messreihen, in denen sich die einzelnen Messpunkte in einem Parameter änderten (Zeit, Konzentration), wurde der Test nach Dunnett angewendet. Die Methode nach Dunnett ist ein Many-to-one-Vergleich, d.h. es werden alle Gruppen gegen eine Kontrollgruppe getestet (Dunnett, 1955; Dunnett et al, 1992). Bei einer Wahrscheinlichkeit mit $P < 0,05$ wird das Prüfergebnis als signifikant gewertet. In den Grafiken werden $P < 0,05$ mit *, $P < 0,01$ mit ** und $P < 0,001$ mit *** kenntlich gemacht.

Zur statistischen Berechnung wurden die Programme EXCEL, SigmaStat und GrafPad Prism genutzt.

4. ERGEBNISSE: WIRKUNG DER BETULINSÄURE AUF HUMANE HAUTZELLKULTUREN

4.1. Vorbemerkungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Proliferationsstudien und Untersuchungen zum geregelten Zelltod, der Apoptose, unter Einfluss des Naturstoffes Betulinsäure (BA) gezeigt. Für die Untersuchungen der Wirkung der BA auf Hautzellkulturen wurden Melanozyten und die zahlenmäßig häufigste Zellart der Haut, die Keratinozyten verwendet. Als Modell für maligne Melanozyten wurde die Melanomzelllinie IGR1 und als Modell für das Verhalten nicht entarteter Melanozyten wurden normale humane epidermale Melanozyten genutzt. Um die Wirkung der BA auf Keratinozyten zu charakterisieren, wurden die Experimente mit der permanenten Zelllinie HaCaT als Modell für den proliferierenden Keratinozyten und mit normalen humanen epidermalen Keratinozyten als Modell für Keratinozyten mit ursprünglichem Apoptose- und Differenzierungsverhalten durchgeführt. Es wird postuliert, dass sich toxische Effekte in einer Proliferationsänderung und damit in einer Änderung der Zellanzahl relativ zu einer Lösungsmittelkontrolle niederschlagen. Zunächst wurde ermittelt, ob es in einem bestimmten Zeitraum zu einer dosisabhängigen Abnahme der Lebendzellanzahl kommt. Um die Verminderung der Proliferation zu beschreiben, wurden die DNA-Syntheserate und die Zellzyklusverteilung ermittelt. Das Absterben von Zellen kann als weiterer Grund für einen Rückgang proliferierender, lebensfähiger Zellen gewertet werden. Zur Beschreibung des durch BA-induzierten Zelltodes wurden Charakteristika der Nekrose und Apoptose bestimmt. Als eine apoptotische Reaktion der Keratinozyten wurde weiterhin das Differenzierungsverhalten untersucht. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die Effekte der Betulinsäure auf Hautzellkulturen in einem Konzentrationsbereich von 0-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA untersucht wurden, in welchem in IGR1-Zellen und in anderen Melanomzelllinien eine Apoptose ausgelöst wurde (Pisha et al., 1995, Selzer et al., 2000).

4.2. Vorversuche zur Wirkung der Betulinsäure auf humane Zellkulturen

4.2.1. Einfluss der Zellkulturmedien auf die Wirkung der Betulinsäure

Das Hauptziel der Vorversuche war es, den Einfluss der einzelnen Zellkulturbedingungen auf die Wirkung der BA zu untersuchen, und auf dieser Basis die Bedingungen für die Apoptose- und Toxizitätsuntersuchungen festzulegen. Auf der Suche nach optimalen Bedingungen für die einzelnen Zellarten stellt sich die Frage, inwieweit man für die einzelnen Zellarten Spezialmedien verwenden sollte, mit denen ein Optimum im Proliferations- und Apoptoseverhalten, morphologischen Aussehen usw. erreicht werden könnte oder man Einheitsmedien gebrauchen sollte, um die Kulturbedingungen vergleichbar zu machen.

Weiterhin sollen die erzielten Ergebnisse im Hinblick auf eine Übertragung auf den Gesamtorganismus realistische Ergebnisse liefern.

In dieser Arbeit geht es neben der generellen Toxizitätsuntersuchung zur BA auch um Vergleiche zwischen Melanozyten und Keratinozyten bezüglich des Apoptoseverhaltens. Es gibt kein Universalzellkulturmedium, in dem alle Zellen gleich gut wachsen oder alle am Organismus gefundenen Fakten nachvollzogen werden können. In den Vorversuchen wurden die Toxizitäten in den einzelnen Kulturmedien getestet, bestehende Unterschiede quantifiziert und ein Medium für die einzelnen Kulturen festgelegt. Für diese Untersuchungen wurden die beiden serumhaltigen Medien MEM und DMEM sowie das serumfreie Medium MGM für die Testung an Melanozyten genutzt. Für die Keratinozyten wurden DMEM sowie das serumfreie Keratinozytenmedium SFM verwendet. Die Vorexperimente wurden mit den permanenten Zelllinien HaCaT und IGR1 durchgeführt. Nach 48 h wurde für die Betulinsäurekonzentrationen von $0,08-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA an der IGR1-Zellkultur eine Zellanzahlbestimmung durchgeführt. Wie aus der Abbildung 14 zu entnehmen ist, gab es zwischen den Medien MEM und MGM geringe Unterschiede. Deutlich wird aber, dass BA in DMEM Medium eine geringere Toxizität aufweist. So konnte beispielsweise bei $2,5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA in DMEM kein toxischer Effekt beobachtet werden, wohingegen die Zellanzahl in der MEM Zellkultur 35 % und die der MGM Zellen 57 % der Lösungsmittelkontrolle betrug.

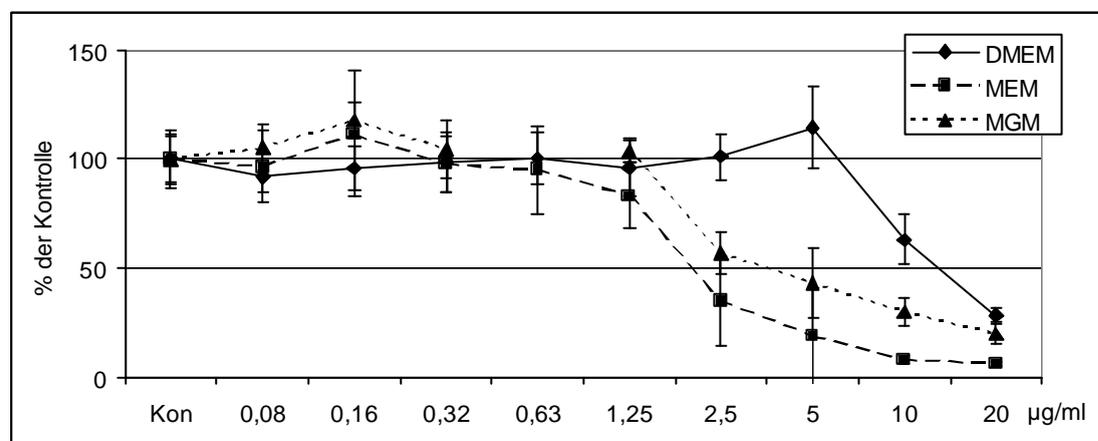


Abbildung 14: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in den Medien DMEM, MEM und MGM, 48 h nach Zugabe von $0,08-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 12

Mit dem Annexin-V/PI-Test und der Untersuchung des mitochondrialen Markers APO2.7 wurde untersucht, ob die Medien einen unterschiedlichen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Melanomzelllinie besitzen. Da zwischen MGM und MEM nur geringe Unterschiede auftraten, wurden nur MEM und DMEM für diese Untersuchungen genutzt. Für diese beide Medien ist die genaue Zusammensetzung bekannt.

Aus der Abbildung 15 und der Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass in der MEM IGR1-Kultur durch BA vermehrt apoptotische Prozesse auftraten als in DMEM kultivierten Zellen. So erhöhte sich im Annexin-V/PI-Test nach 48 h und $5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA der Anteil der

spätapoptotischen und nekrotischen Zellen auf 56 % der Gesamtzellanzahl (MEM) versus 6 % (DMEM). Im APO2.7-Test lag der Anteil der apoptotischen Zellen bei 69 % der Gesamtzellanzahl (MEM) gegenüber 16 % (DMEM).

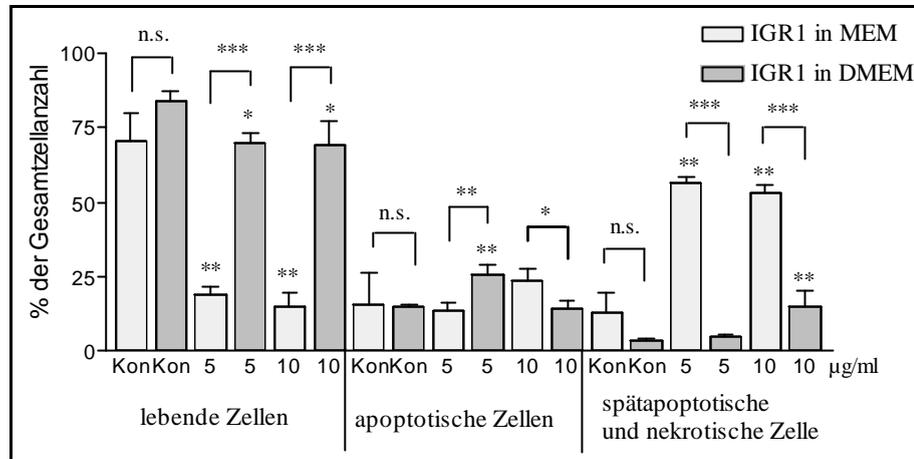


Abbildung 15: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in DMEM oder MEM 48 h mit 5 und 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, n.s. nicht signifikant, Dunnett-Test gegenüber Kontrolle, t-Test Vergleich MEM/DMEM, Mann-Whitney-Test bei positivem F-Test

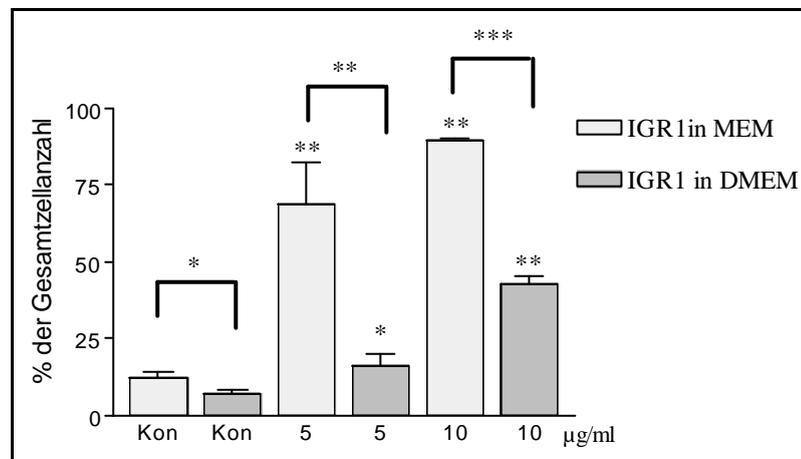


Abbildung 16: APO2.7-Test, prozentuale Darstellung der APO2.7-positiven Zellen, IGR1-Zellen in DMEM und MEM, 48 h nach Zugabe von 5 und 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3 * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test gegenüber Kontrolle, t-Test Vergleich MEM/DMEM

Für die Keratinozytenzellkultur HaCaT wurde die Toxizitätsstudie nach 48 h mit den Medien DMEM und SFM durchgeführt. Nach 48 h kam es zu einer Abnahme der Zellanzahl in der SFM-Kultur ab 0,31 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA und in den DMEM gewachsenen Zellen erst ab 5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (Abbildung 17). Auffallend ist aber, dass die ED₅₀-Werte der beiden Kulturen trotzdem gleich sind.

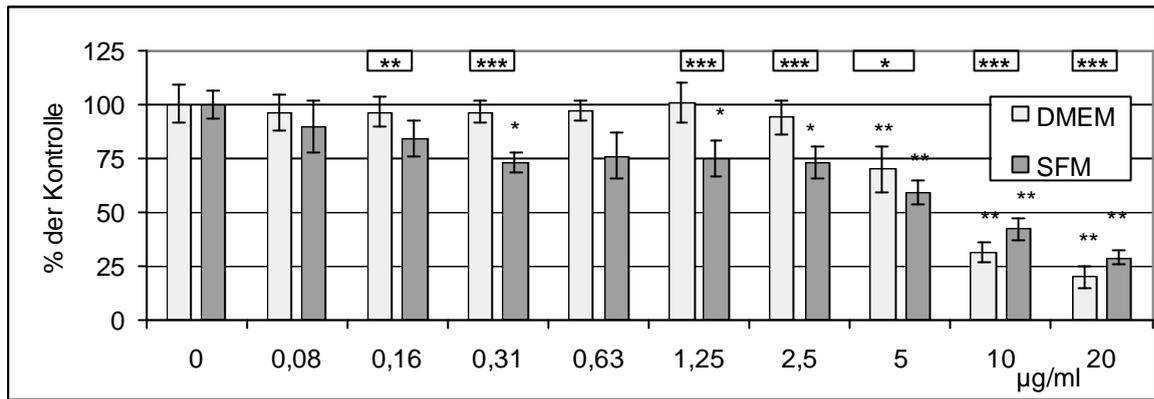


Abbildung 17: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, HaCaT-Keratinocyten 48 h nach Inkubation mit 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, 0 = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 12, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle oberhalb der einzelnen Balken (Dunnett-Test) und im Vergleich der jeweiligen Wertepaare untereinander (t-Test) über die Balken gelegt.

Die oben genannten Einflüsse der Kulturmedien werfen die Frage nach den Ursachen für diese starken Unterschiede auf. Häufig sind Bindungen von Arzneistoffen an Serumalbumin für solche Effekte verantwortlich. Deshalb wurde der Einfluss des fetalen Kälberserums (FKS) untersucht. Die Zellen wurde hierfür 48 h mit 5 und 10 % FKS in MEM und den BA-Konzentrationen von 0,8-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ inkubiert. Wie aus der Abbildung 18 zu entnehmen ist, zeigten Zellen mit einem FKS-Gehalt von 10 % eine signifikante Erhöhung der vitalen Zellen.

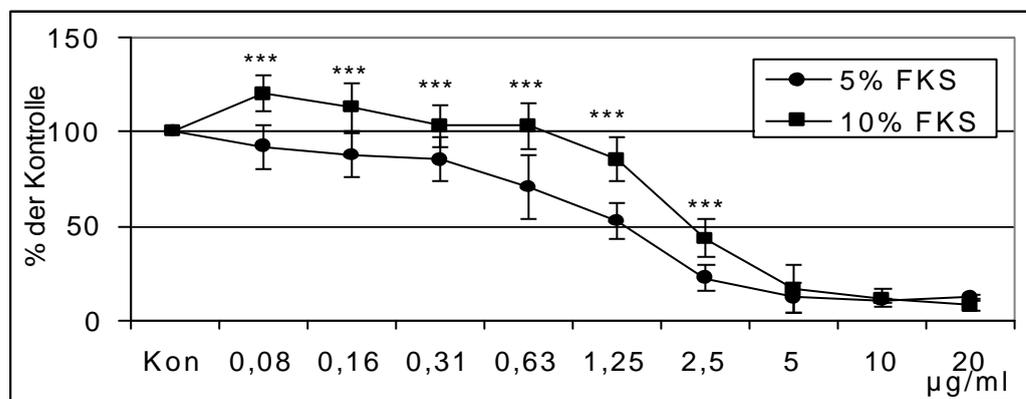


Abbildung 18: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in MEM, 5 und 10 % FKS, 48 h mit 0,8-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 12, *** P < 0,001, t-Test die Unterschiede zwischen den FKS Konzentrationen 5 % und 10 % sind jeweils über der 10 % FKS-Kurve dargestellt

Weiterhin erfolgten Bestimmungen zur pH-Wertabhängigkeit der BA-Wirkung aufgrund eines Befundes von Noda et al. (1997), dass ein niedriger pH-Wert zu einer Erhöhung der Toxizität der BA führt. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgt in Zellkulturen durch eine Begasung mit CO₂ in Abhängigkeit vom NaHCO₃ Gehalt der Kulturmedien. Durch unterschiedliche CO₂-Konzentrationen im Brutschrank können die pH-Werte des Mediums variiert werden. Durch Veränderung des pH-Wertes wurde nun versucht, die Toxizität der

BA in MEM zu beeinflussen. Die Zellen wurden dazu 12 h, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Lösungsmittelkontrollen gering zu halten, mit 2,5-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 dargestellt. Es konnten keine Unterschiede in der Zellanzahl festgestellt werden. Die Einstellung des pH-Wertes mit 0,1 % NaOH erbrachte ebenfalls keine Effekte.

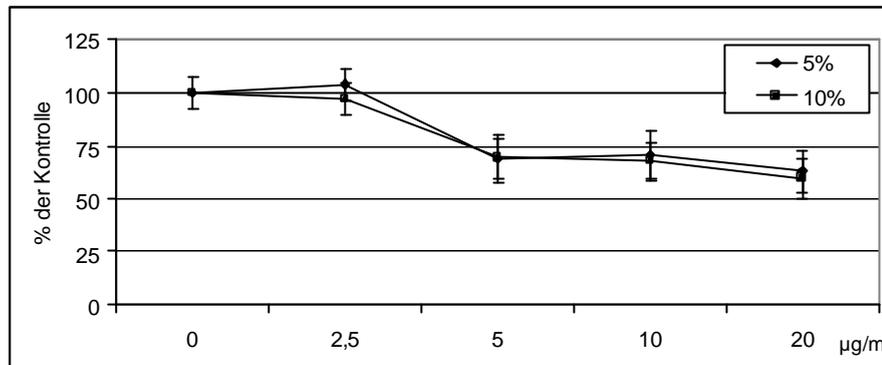
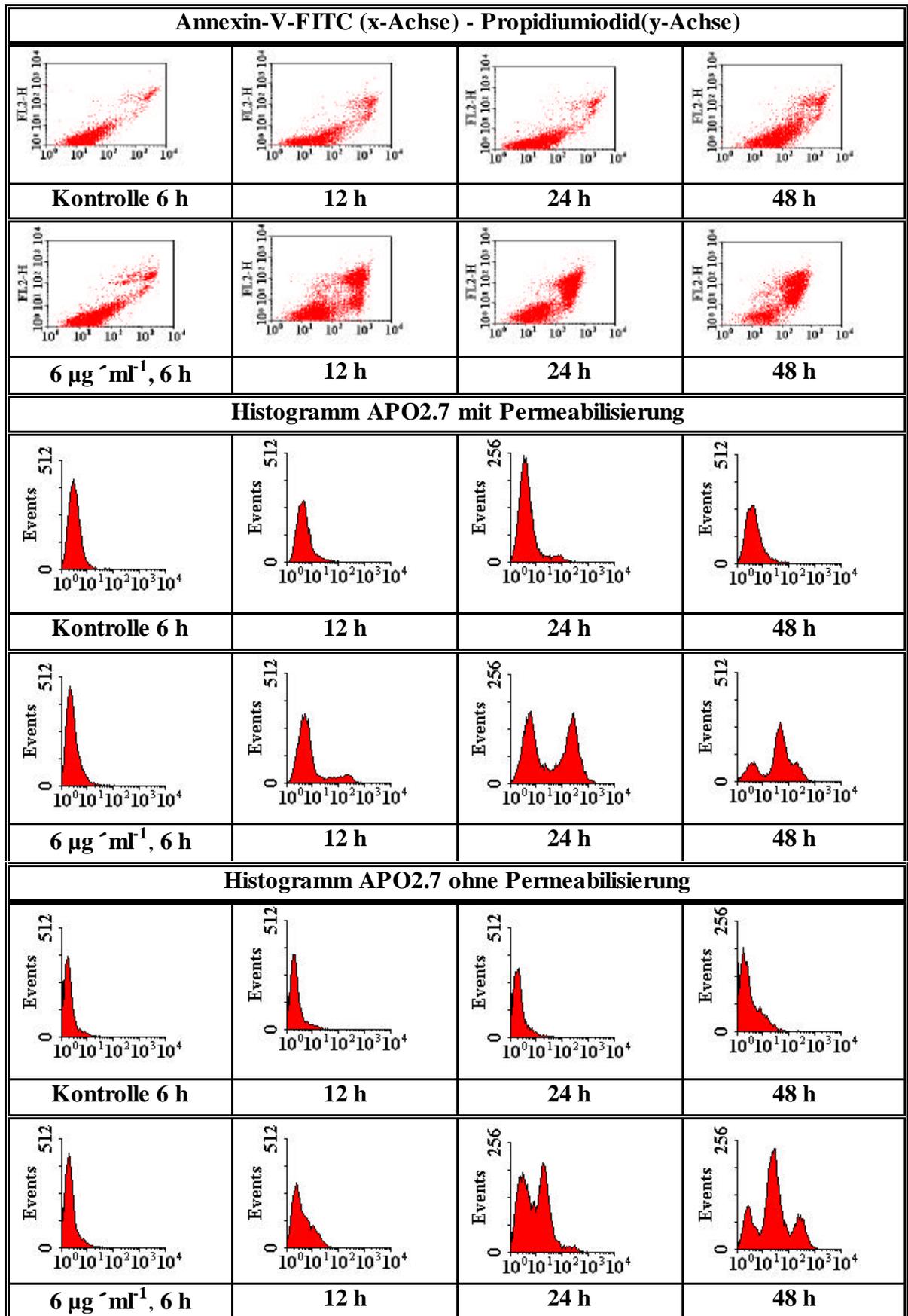


Abbildung 19: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest IGR1-Zellen nach 12 h Begasung mit 5 und 10 % CO₂, 12 h Betulinsäureinkubation mit 2,5-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, n = 12, 0 = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, t-Test

4.2.2. Untersuchungen zum Zeitpunkt der Apoptoseauslösung und Einfluss der Permeabilisierung im APO2.7-Test

Ein weiteres Ziel der Voruntersuchungen war es, den Zeitraum für den Nachweis der einzelnen apoptotischen Ereignisse zu finden. Aus diesem Grunde wurden die IGR1-Zellen mit 6 μg BA 6, 12, 24 und 48 h behandelt und die Phosphatidylserinumlagerung und Membranintegrität mit dem Annexin-V/PI-Test bestimmt, sowie gleichzeitig der mitochondriale Einfluss mit dem Antikörper APO2.7 erfasst. Weiterhin wurde versucht, die von Koester et al. (1997) beschriebene Verwendung des Antikörpers APO2.7 zur Unterscheidung apoptotischer und spätapoptotischer Prozesse auf BA-induzierte Apoptose anzuwenden. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit und ohne Permeabilisierung mit Tween[®] 20 präpariert. Die Ergebnisse sind als Dot Plot (Annexin-V/PI) oder als Histogramm (APO2.7-Fluoreszenzintensität/Anzahl der Ereignisse) in der Tabelle 4 dargestellt. Erste apoptotische Ereignisse lassen sich demnach ab 12 h detektieren. Eine Permeabilisierung der Zellen mit Tween[®] 20 brachte den Vorteil einer besseren Abgrenzung der APO2.7-positiven Zellen von den APO2.7-negativen Populationen. Es traten bei permeabilisierten und nichtpermeabilisierten Zellen keine Unterschiede im Verhältnis dieser beiden Zellpopulationen auf, so dass eine Präparation ohne Permeabilisierung keine zusätzlichen Aussagen erbrachte.

Tabelle 4: Zeitreihe 6-48 h mit $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BA, Annexin-V/PI-Test; APO2.7 mit und ohne Permeabilisierung, IGR1 in MEM



Ein weiterer Marker für apoptotische Prozesse ist die DNA-Fragmentierung. Mit dem Durchflusszytometer wurde für den Zeitraum 16-51 h untersucht, wann eine DNA-Fragmentierung nach BA-Zugabe auftritt. Aus der Abbildung 20 ist die Entstehung des Apoptosepeaks (Ap) vor dem Peak der G₀/G₁ Phase nach 16 h zu erkennen.

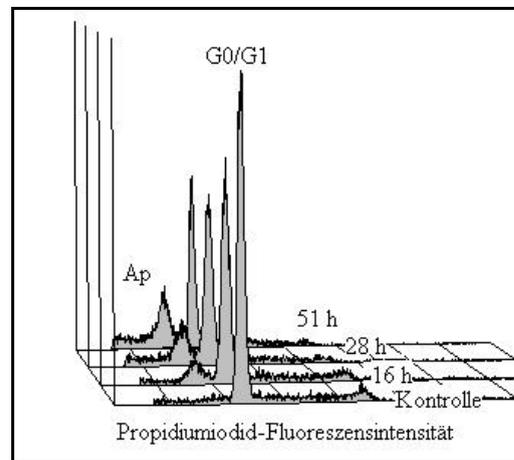


Abbildung 20: Entstehung des Apoptosepeaks (Ap) vor dem G₀/G₁-Peak bei der Zellzyklusuntersuchung von IGR1-Zellen in MEM 16, 28, 51 h nach Inkubation mit 5 µg×ml⁻¹ BA, Lösungsmittelkontrolle = 0,05 % DMSO

4.2.3. Bestimmung intrazellulärer Peroxide

Neben den Voruntersuchungen zur Apoptose wurde eine mögliche intrazelluläre Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht (Abbildung 21). Die Zellen wurden hierzu 15 und 24 h mit 0,08-20 µg×ml⁻¹ BA behandelt. Die Inkubation des Dihydrorhodamins 123 erfolgte 15 h (15 h BA) bzw. 8 h (24 h BA). Es konnte keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Radikal-DHR-Reaktionsproduktes festgestellt werden, so dass die anderen Zellsysteme nicht auf diesen Mechanismus untersucht wurden.

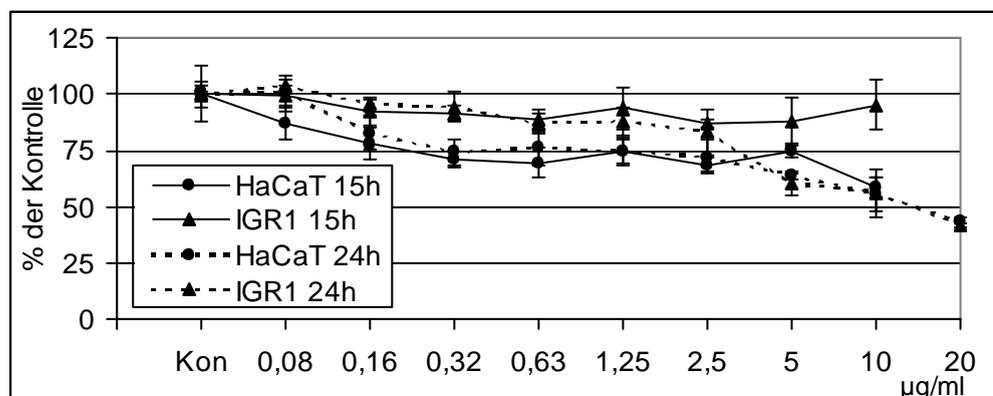


Abbildung 21: Bestimmung der intrazellulären Radikale mit dem Dihydrorhodamin 123-Test, IGR1-Zellen in MEM und HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 und 24 h mit 0,08-20 µg×ml⁻¹ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, 15 h Wert 15 h mit DHR inkubiert, 24 h Wert 8 h mit DHR inkubiert.

4.2.4. Diskussion

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen deutlich eine Abhängigkeit der Betulinsäurewirkung von den verwendeten Kulturmedien sowohl in der IGR1 als auch in der HaCaT-Zellkultur. Mit den Vorexperimenten konnte die IGR1-Zelllinie als Positivkontrolle für die Wirkung der Betulinsäure etabliert werden.

In der Literatur sind sowohl MEM (Kim et al., 1998) als auch DMEM (Selzer et al., 2000) und weitere Medien mit Zusatz von 10 % FKS in Verbindung mit BA beschrieben. Die Kultivierung in MEM wurde für die Untersuchungen an der IGR1-Zelllinie ausgewählt, da ED₅₀-Werte erreicht wurden, wie sie von Pisha et al. (1995) beschrieben sind und die Ergebnisse somit nachvollzogen werden konnten (Zellkulturmedien sind in diesem Artikel nicht angegeben). Für die normalen humanen Melanozyten wurde das MGM-Medium ausgewählt, da nur in diesem Medium ein gutes Wachstum der normalen Zellen erreicht wurde. Für die Keratinozyten wurde das serumfreie Keratinozytenmedium SFM genutzt, da in diesem Medium eine gute Dosis-Wirkungs-Korrelation zu erkennen war.

Die in den Vorversuchen gezeigten Medienabhängigkeiten konnten nicht restlos geklärt werden. Entweder besteht eine Abhängigkeit zu einem Bestandteil des komplexen Mediums oder die Wachstumsbedingungen unterscheiden sich derart, dass in einem Medium mit besseren Wachstumsbedingungen weniger Apoptose durch BA ausgelöst wird. Das Aufzeigen der Medienabhängigkeiten sollte aber dazu dienen, die einzelnen ED₅₀-Werte zu relativieren, und die Aussagekraft im Hinblick auf eine Anwendung am Organismus realistisch einschätzen zu können.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen wurde das Zeitintervall für die Untersuchungen der Apoptose zwischen 12 und 72 h festgelegt.

Eine von Wick et al. (1999) beschriebene Formatierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Gliomzellen konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten DHR Methode in HaCaT-Keratinozyten und IGR1-Zellen nicht gefunden werden. In diesem Test war kein Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle zu erkennen. Ursachen könnten im unterschiedlichen Verhalten der Zellarten auf eine BA-induzierte Apoptose oder im unterschiedlichen Detektionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe zu suchen sein, obwohl Rothe et al. (1991) DHR eine höhere Sensitivität als Dichlorfluorescein bei der Detektion von ROS zuschreibt.

4.3. Untersuchungen zur Spezifität der Betulinsäure - Vergleich von Melanomzelllinie und normalen humanen Melanozyten

4.3.1. Untersuchungen zur Betulinsäure ausgelösten Apoptose beim malignen Melanom anhand der Melanomzelllinie IGR1

4.3.1.1. Toxizitätsuntersuchungen

Die Untersuchungen der antiproliferativen Effekte der Betulinsäure erfolgten an 96er Mikrotiterplatten (MTP) mit Hilfe einer Zellanzahlbestimmung nach 24, 48, 72, 96 h für einen Konzentrationsbereich von $0,08-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ gegenüber der Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO. Nach 24 h war ein signifikanter Rückgang der vitalen Zellen ab $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA und nach 96 h ab $0,31 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA zu beobachten (Abbildung 22). Die jeweilige ED₅₀-Werte betragen: 8,2 (24 h), 3,5 (48 h), 2,3 (72 h) und $1,2 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nach 96 h.

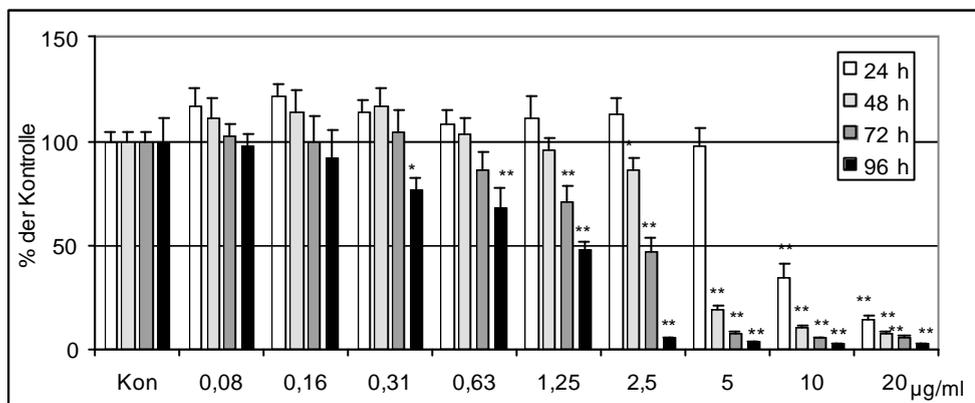


Abbildung 22: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in MEM 24, 48, 72, 96 h nach Zugabe von $0,8-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die Bestimmung von Veränderungen in der DNA-Syntheseleistung ist eine weitere Möglichkeit, toxische Effekte der BA zu erfassen. Nach 20 h wurde dazu die BrdU-Einbaurrate bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 23 aufgezeigt. Die IGR1-Zellen zeigten einen deutlichen Abfall der Proliferation nach einer Behandlung mit $5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.

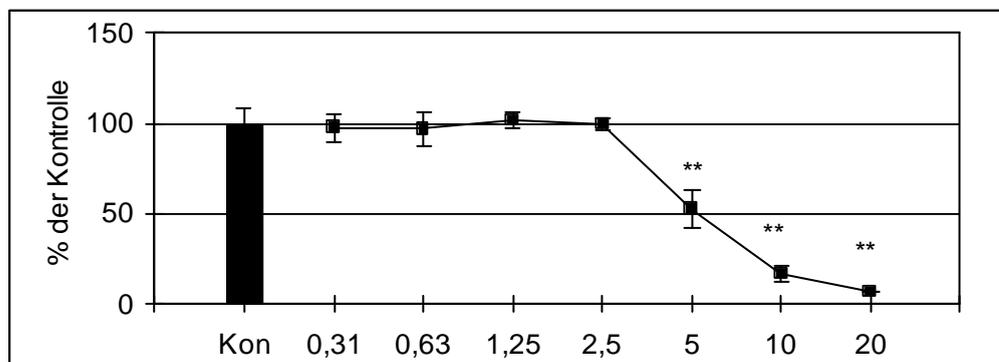


Abbildung 23: Bestimmung der DNA-Synthese (BrdU-Einbau) IGR1-Zellen in MEM 20 h nach Zugabe von $0,31-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Zur Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der IGR1-Zellen nach Betulinsäurezugabe wurde eine Zellzyklusuntersuchung durchgeführt (Abbildung 24). Im Zeitraum von 16-91 h kam es nach 28 und 51 h zu einer leichten Abnahme der in G_0/G_1 befindlichen Zellen verbunden mit einer Zunahme der Zellen in der S-Phase.

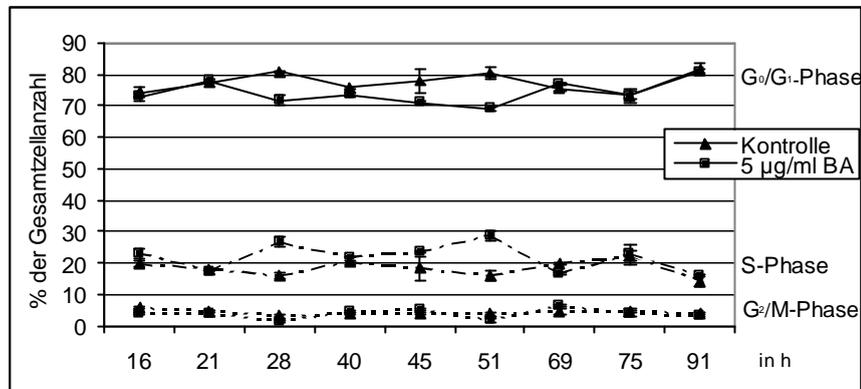


Abbildung 24: Zellzyklusuntersuchungen am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM, 16-91 h nach Zugabe von $5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2

Weil im Bereich 21-28 h und 45-51 h leichte Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle beobachtbar waren, wurden nach 22 und 53 h Messungen für die Konzentrationen 2, 4, 8, $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA und n = 3 durchgeführt. In der Abbildung 25 sind Histogramme der einzelnen Konzentrationen dargestellt. Deutlich wird, dass nach 22 h ab $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und nach 53 h ab $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA ein deutlicher Anstieg der Anzahl apoptotischer Kerne erfolgte. Die Messungen nach 53 h ergaben so hohe Apoptoseraten, dass die Proben mit 8 und $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nicht mehr in die Auswertung des Zellzyklus mit einbezogen wurden.

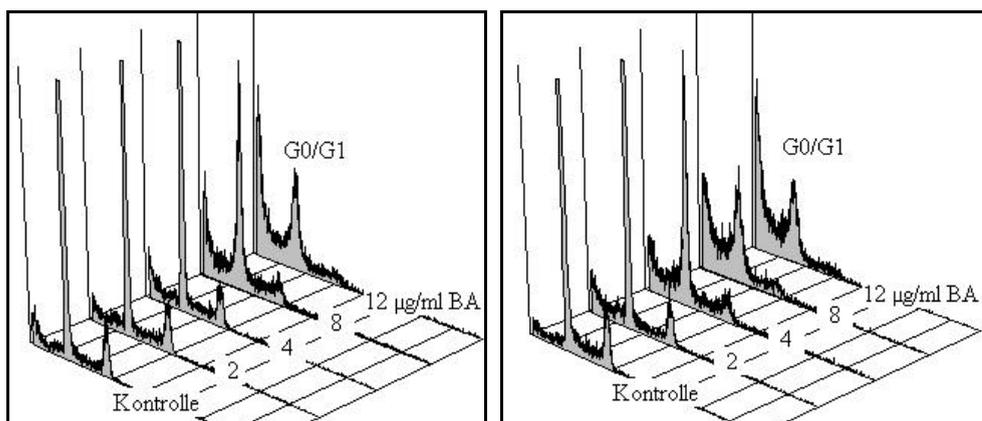


Abbildung 25: Histogramm der Zellzyklusuntersuchungen am Durchflusszytometer IGR1-Zellen in MEM nach Zugabe von 2, 4, 8, $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO linke Abbildung: 22 h Inkubation mit BA; rechte Abbildung: 53 h Inkubation mit BA

Die Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchungen sind in der Abbildung 26 für den Zeitpunkt 22 h dargestellt. Die Abnahme in der G_0/G_1 -Phase und Zunahme in der S-Phase konnten bestätigt werden. Sie sind nicht auf eine Arretierung der Zellen oder Proliferationsstimmu-

lierung zurückzuführen, sondern auf apoptotische Prozesse, die durch Zunahme des Apoptose-Peaks deutlich wurden. In der Abbildung 27 ist die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus nach 53 h (2 und 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA) dargestellt. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Zellen in der G_0/G_1 -Phase und ein Rückgang der Zellen in der S- und G_2/M -Phase nach Inkubation mit 2 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA gemessen werden. 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA führten zu einem leichten Anstieg der Zellen in der S-Phase.

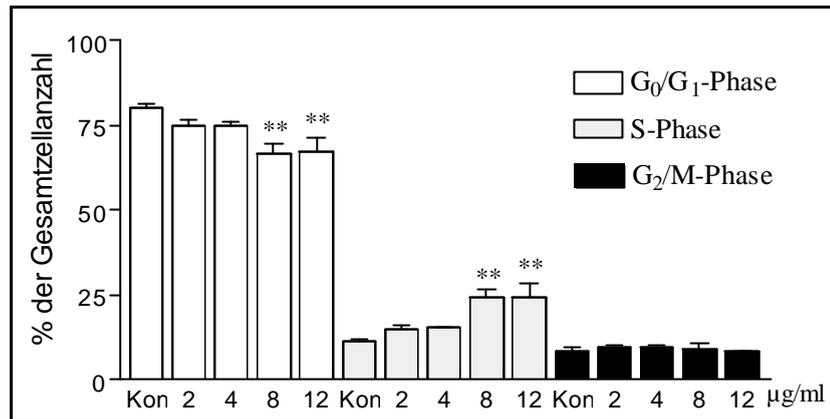


Abbildung 26: Zellzyklusuntersuchung, IGR1-Zellen in MEM 22 h nach Zugabe von 2, 4, 8, 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test

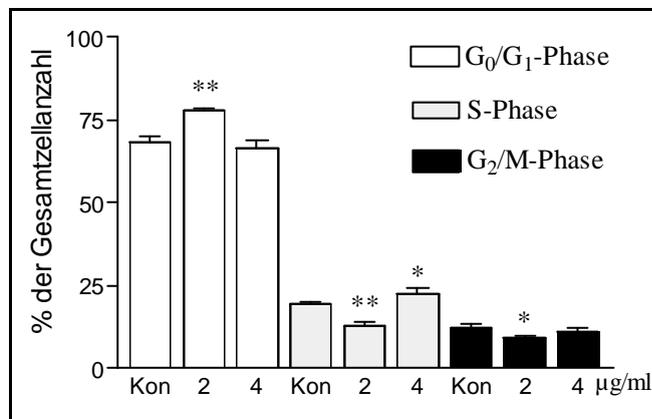


Abbildung 27: Zellzyklusuntersuchung, IGR1-Zellen in MEM 53 h nach Zugabe von 2 und 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test

4.3.1.2. Untersuchungen zum Apoptoseverhalten

Zur Erfassung nekrotischer Ereignisse wurde die LDH-Aktivität im Zellüberstand bestimmt. 7 und 24 h nach Zugabe von 0,321-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA kam es gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) zu einem Anstieg der LDH-Aktivität bei den Konzentrationen 10 und 20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (Abbildung 28). Gegenüber der 0,02 % Tween[®] 20 Positivkontrolle (573 %) fiel der Anstieg (7 h, 20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ = 213 %) geringer aus.

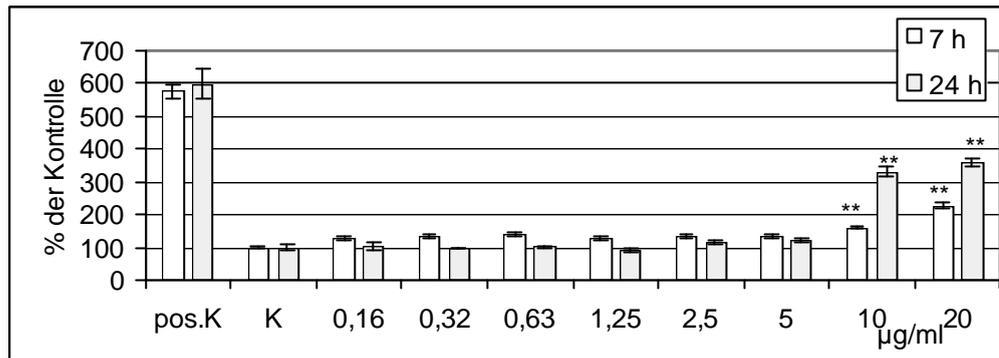


Abbildung 28: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, IGR1-Zellen in MEM, 7 und 24 h nach Betulinsäurezugabe $0,16-20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, K= Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,05 %, pos. K=positive Kontrolle Tween[®] 20 0,02 %, n = 6, * P < 0,05, **P < 0,01, Dunnett-Test

Eine Möglichkeit die Abnahme der Lebendzellanzahl zu untersuchen, liegt in der Beschreibung apoptotischer Prozesse. Die Zellen wurden hierzu 15 h mit 4, 8, 12 und $16 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt und die Phosphatidylserinumlagerung in der äußeren Zellmembran und deren Integrität mit dem Annexin-V/PI-Test bestimmt. Die Ergebnisse, in der Abbildung 29 dargestellt, zeigen eine deutliche spätapoptotische und nekrotische Reaktion ab $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.

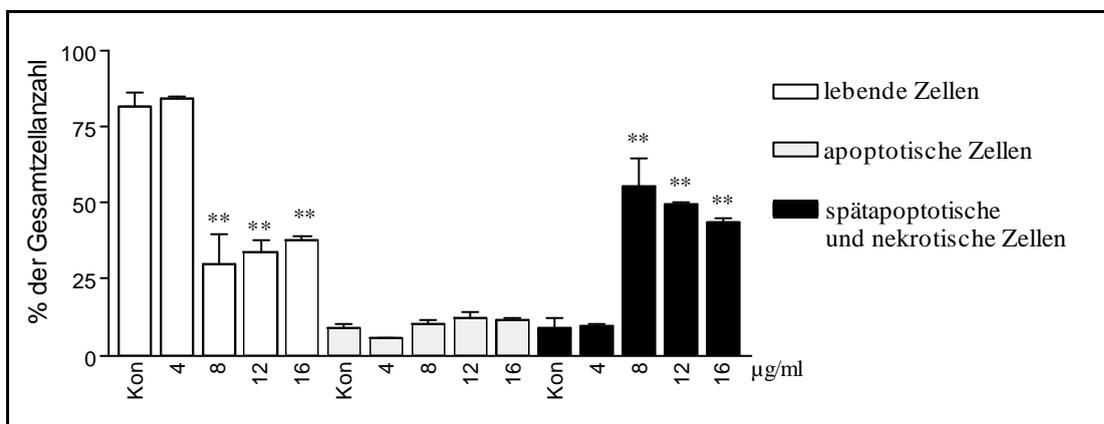


Abbildung 29: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in MEM, 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und $16 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Nach 24 h zeigte sich für eine Konzentration von $6 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (Abbildung 30) zu eine Abnahme der lebenden Zellen auf 21 % der Kontrolle, eine Zunahme der apoptotischen Zellen um 125 % und der spätapoptotischen und nekrotischen Zellen um 212 %. Die Messungen für den Wirkzeitraum von 48 h sind in der Abbildung 15 für 5 und $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA dargestellt. Es zeigte sich ein starker Anstieg der nekrotischen und spätapoptotischen Zellen bei den mit BA-behandelten IGR1-Zellen.

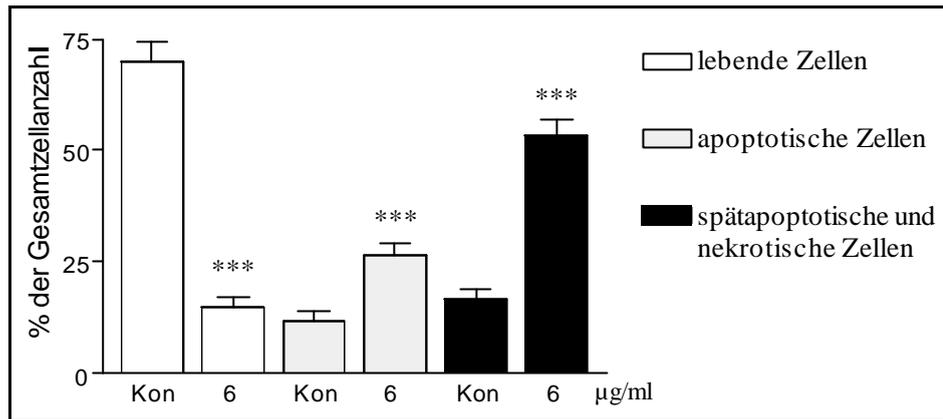


Abbildung 30: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in MEM mit $6 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA für 24 h behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, $n = 3$, *** $P < 0,001$, Dunnett-Test

Der Einfluss auf die Mitochondrien wurde mit dem APO2.7-Antikörper verifiziert. Nach 15 h kam es, wie im Annexin-V/PI-Test, zu einem Anstieg um 570 % der APO2.7-positiven Zellen ab $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (Abbildung 31). Nach 48 h Inkubation mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA zeigten 89 % der IGR1-Zellen eine deutliche apoptotische Reaktion (Abbildung 16).

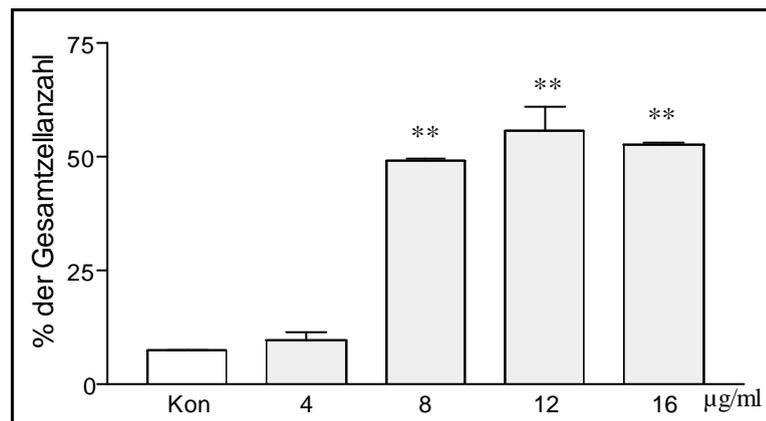


Abbildung 31: APO2.7-positive Zellen, IGR1-Zellen in MEM, 15 h nach Zugabe von $4, 8, 12, 16 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, $n = 3$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test

Die Untersuchung der apoptotischen DNA-Fragmentierung wurde durch die TUNEL-Methode am Durchflusszytometer für die Betulinsäurekonzentration von $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nach 24 und 48 h bestimmt. Wie aus der Abbildung 32 ersichtlich, konnte nach 48 h Inkubation ein signifikanter Anstieg ($P < 0,01$, Dunnett-Test) der TUNEL-positiven Zellen beobachtet war.

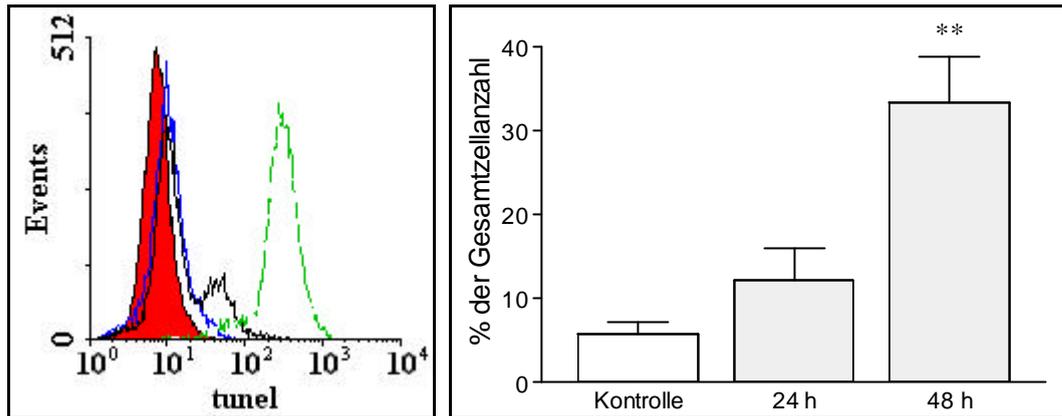


Abbildung 32: Messung der DNA-Fragmentierung mit der TUNEL-Methode am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM nach 24 und 48 h, *linke Darstellung*: Histogramm Fluoreszenzintensität DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Zellen 24 h (blau) und 48 h (schwarz) mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Positivkontrolle: DNase 10 min $1 \text{mg}\times\text{ml}^{-1}$ (grün), *rechte Darstellung* TUNEL-positive IGR1-Zellen in MEM kultiviert, Kontrolle 0,05 % DMSO, Zellen 24 und 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, $n = 3$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test

Neben den Apoptoseuntersuchungen wurden Veränderungen im p53-Gehalt der Zellen bestimmt. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer für die Konzentrationen 2, 4, $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nach 8 h (Abbildung 33) und 24 h (Abbildung 34). Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde eine Zweiparametermessung gewählt, die es erlaubt, den einzelnen Zellzyklusphasen den p53-Gehalt zuzuordnen. Es konnte keine Akkumulation des p53-Proteins gemessen werden.

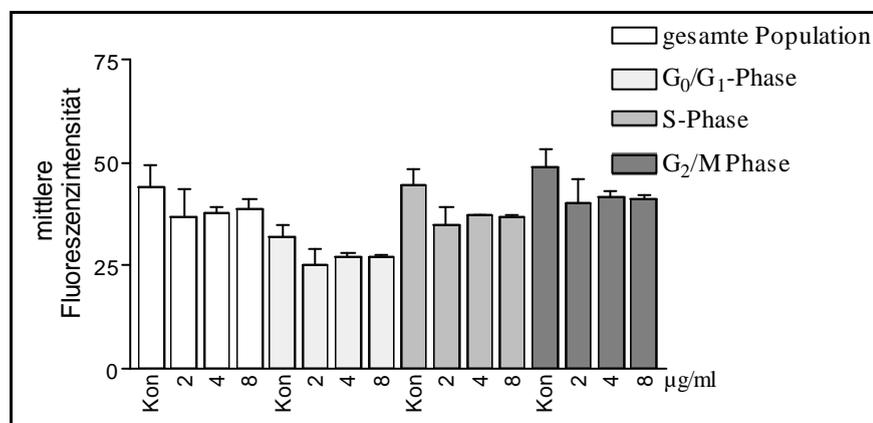


Abbildung 33: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM, 8 h mit 2, 4 und $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA inkubiert, p53-Gehalt für die einzelnen Zellzyklusphasen ausgewertet, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, $n = 3$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test

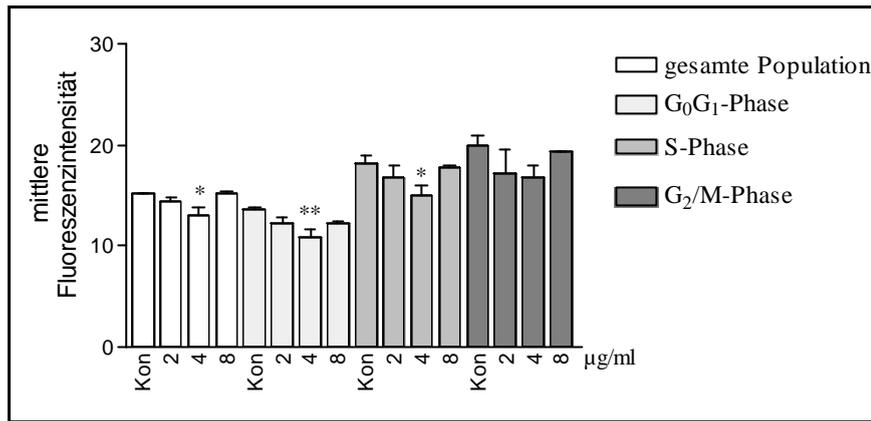


Abbildung 34: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM 24 h mit 2, 4, 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA inkubiert, p53-Gehalt für die einzelnen Zellzyklusphasen ausgewertet, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01

Eine Untersuchung des BA-Einflusses auf die Expressierung des p53-Proteins mit der Westernblotmethode für 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA und einem Inkubationszeitraum von 4 bis 71 h (Abbildung 35) zeigte keine Akkumulation des p53-Proteins. Es wurden 80 μg Protein aufgetragen. Durch eine Färbung der Membran mit 2 % Ponceau-Rot wurde die Auftragung gleicher Proteinmengen überprüft.

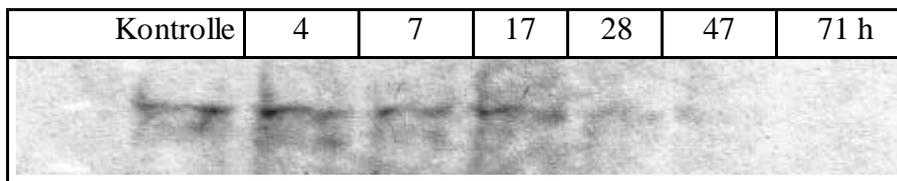


Abbildung 35: Westernblot, IGR1-Zellen in MEM 4, 7, 17, 28, 47 und 71 h nach Zugabe von 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge: 80 μg , Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO

4.3.1.3. Resistenzentwicklung

Neben den Toxizitätsuntersuchungen spielt bei der Einschätzung von neuen Chemotherapeutika eine mögliche Resistenzentwicklung eine wesentliche Rolle. Ein resistenter Tumorzellstamm bringt weiterhin Vorteile bei der Untersuchung von Mechanismen der Apoptoseregulation und Auslösung, da dieser Zellstamm Eigenschaften besitzt, die eine BA-induzierte Apoptose unterdrücken.

Aus diesem Grund wurden IGR1-Zellen über mehrere Monate mit 2 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, um die Zellen langsam an BA zu gewöhnen. Ein weiterer Versuch war die nach hohen BA Dosen (10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) überlebenden Zellen zu kultivieren und somit eine Auslese zu betreiben. Von beiden Ansätzen wurden in regelmäßigen Abständen Toxizitätsstudien und Apoptoseuntersuchungen durchgeführt. Es konnten keine Resistenzen festgestellt werden. Die über einen längeren Zeitraum behandelten Zellen zeigten aber schlechteres Wachstum und Änderungen im morphologischen Aussehen.

4.3.2. Untersuchungen zur Wirkung der Betulinsäure auf normale humane epidermale Melanozyten (NHEM)

4.3.2.1. Toxizitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung antiproliferativer Effekte der Betulinsäure auf normale humane Melanozyten (NHEM) wurde eine Zellanzahlbestimmung in 96er MTP nach 24 und 48 h für den Konzentrationsbereich $0,08\text{-}20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 36 dargestellt. Nach 24 h war ein signifikanter Rückgang der Zellanzahl ab $0,16\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA erkennbar, wobei der ED_{50} -Wert 2,1 betrug. Nach 48 h konnte keine weitere Änderung des Kurvenverlaufes beobachtet werden. Bei einer Dosis von $2,2\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Betulinsäure war auch hier die Zellanzahl auf die Hälfte gesunken.

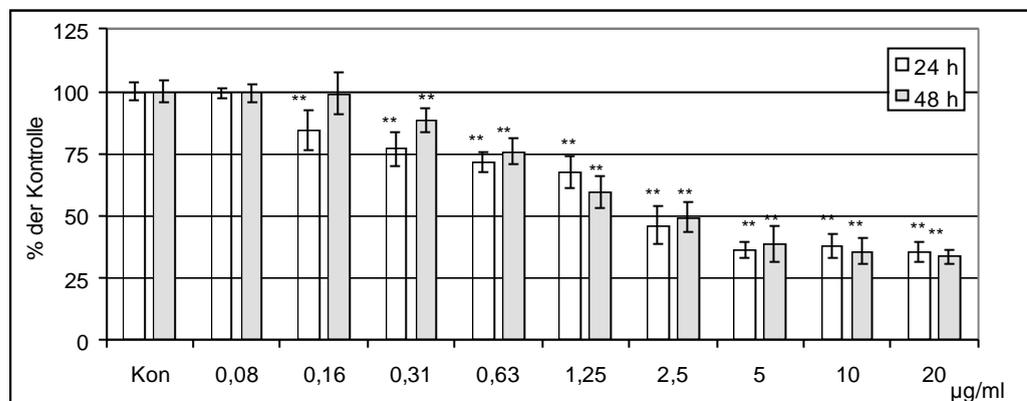


Abbildung 36: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, normale humane Melanozyten in MGM 24 und 48 h nach Betulinsäurezugabe $0,08\text{-}20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die Untersuchungen zur DNA-Syntheseleistung zeigten einen geringen Einbau des BrdU sowohl in der Lösungsmittelkontrolle als auch in den mit BA-behandelten NHEM. In diesen nur sehr langsam proliferierenden Zellen konnte nur eine Abnahme des BrdU-Einbaus ab $20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA beobachtet werden.

4.3.2.2. Apoptoseuntersuchungen an normalen humanen Melanozyten

Zum Nachweis nekrotischer Prozesse wurde nach 7 h die LDH-Aktivität im Zellüberstand gemessen. Dabei kam es gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %), wie in der Abbildung 37 gezeigt, zu einem Anstieg der Aktivität ab $0,625\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Um 250 % erhöhte sich der LDH-Spiegel bei $20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA und um 300 % bei der Positivkontrolle Tween[®] 20 (0,02 %). Um diese starke nekrotische Wirkung zu relativieren, wurde nach Lysierung der Zellen eine Bestimmung der LDH-Aktivität durchgeführt. Diese sensitive Form der Zellanzahlbestimmung (Göhring, 1999) zeigt nach 7 h nur bei $20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ eine Abnahme der Zellanzahl auf 80 % der Kontrolle sowie bei der Positivkontrolle auf 42 %.

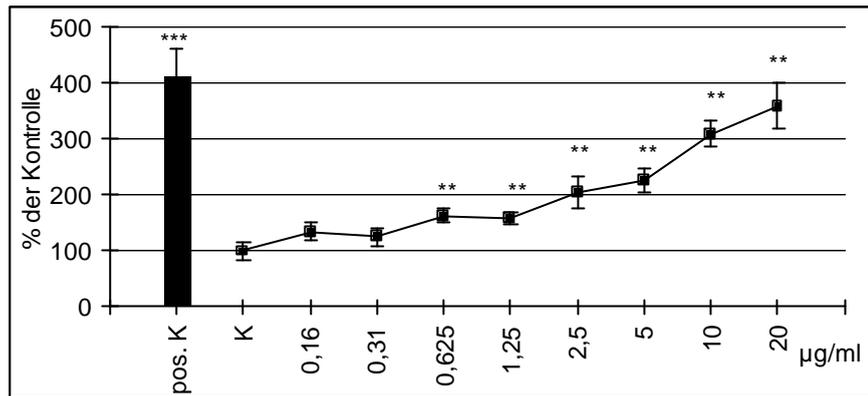


Abbildung 37: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, normale Melanozyten in MGM, 7 h nach Behandlung mit 0,16-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, pos. K = Positivkontrolle Tween[®] 20 0,02 %, K = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Zur Charakterisierung des Apoptoseverhaltens normaler humaner Melanozyten wurde die Phosphatidylserinumlagerung in der Zellmembran durch den Annexin-V/PI-Test bestimmt. Die Zellen wurden 24 h mit 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Durch Nutzung des Durchflusszytometers konnten die Populationen vitaler, apoptotischer und spätapoptotisch/nekrotischer Zellen unterschieden werden. Die Anteile der einzelnen Zellpopulationen der Kontrolle bzw. der behandelten Zellen an der Gesamtzellanzahl sind in der Abbildung 38 dargestellt. Die behandelten Melanozyten zeigten eine signifikante Abnahme der Anzahl lebender Zellen um 34 % und eine Zunahme der apoptotischen Zellen um 392 %.

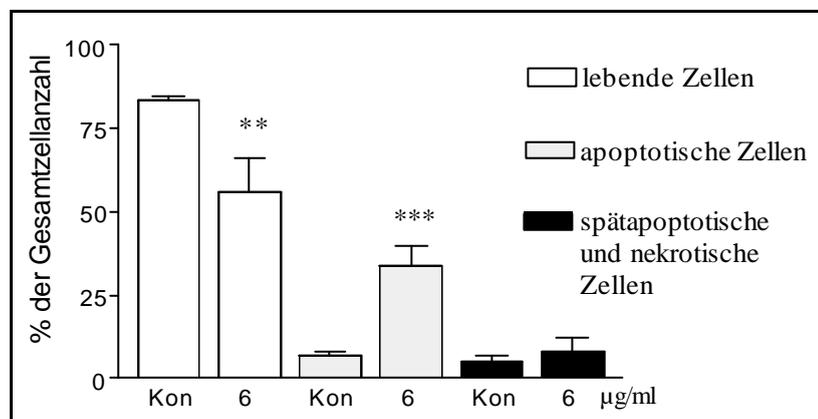


Abbildung 38: Annexin-V-FITC/PI-Test normale Melanozyten in MGM 24 h mit 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, *** P < 0,001, t-Test

Einen weiteren Versuch zur Charakterisierung der durch Betulinsäure vermittelten Apoptose zeigen die Abbildung 39 (Annexin-V/PI-Methode) und Abbildung 40 (TUNEL-Methode). Die Zellen wurden 24 und 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Um den Einfluss der Caspasen zu verdeutlichen wurde hier außerdem mit dem Caspaseninhibitor Z-VAD-FMK in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ 2 h vorinkubiert. Diese zusätzliche Inkubation der Zellen mit Z-VAD-FMK führte gegenüber den BA-behandelten Zellen nicht zu signifikanten Unterschieden im Annexin-V/PI-Test. Die normalen Melanozyten zeigten in

diesem Testsystem nach 24 h eine deutliche Abnahme der Anzahl vitaler Zellen auf 34 % und nach 48 h auf 20% der Gesamtzellanzahl (Abbildung 39). Nach 48 h kam es zu einem signifikanten Anstieg der spätapoptotischen und nekrotischen Zellen versus Kontrolle und versus 24 h. Demgegenüber war der Anteil apoptotischer Zellen nach 24 h am größten (33 %).

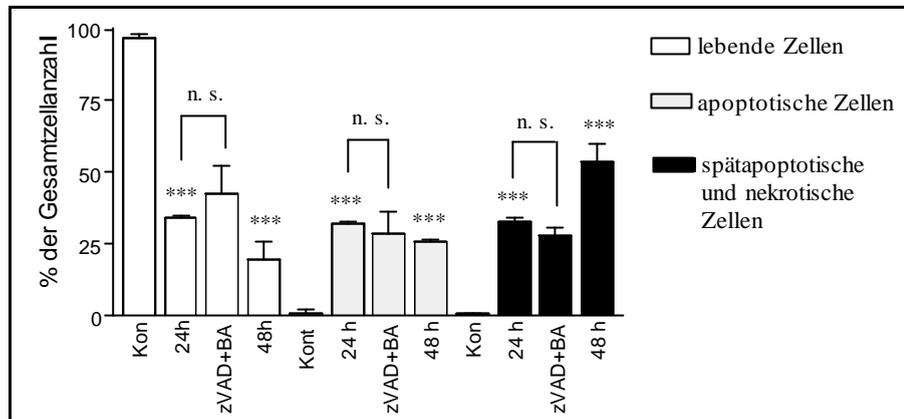


Abbildung 39: Annexin-V/PI normale Melanozyten in MGM 24 und 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, zVAD+BA = Zellen 24 h mit Z-VAD-FMK $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, n = 3, *** P < 0,001, n. s. = nicht signifikant, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle: Dunnett-Test, Vergleich zweier Wertepaare (24 h ohne versus mit Z-VAD-FMK): t-Test

Von den eben beschriebenen Zellen wurde weiterhin die DNA-Fragmentierung mit Hilfe der TUNEL-Methode untersucht. In der linken Darstellung der Abbildung 40 ist ein Histogramm nach 48 h gezeigt, in dem deutlich die Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten BA-behandelter Zellen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erkennbar ist. Als Positivkontrolle dienten mit DNase ($1 \text{ mg}\times\text{ml}^{-1}$, 10 min) behandelte Zellen.

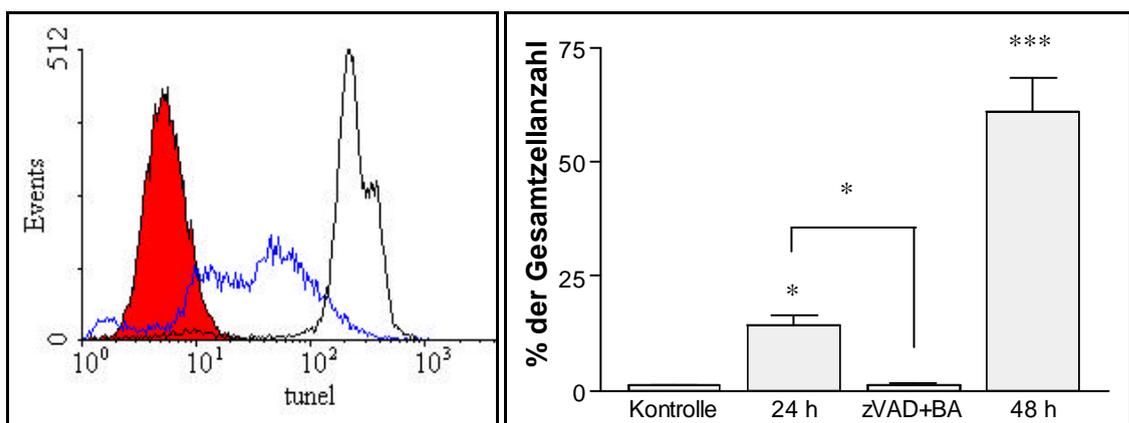


Abbildung 40: linke Darstellung: DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode durchflusszytometrische Messung, normale Melanozyten in MGM 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Positivkontrolle: DNase $1 \text{ mg}\times\text{ml}^{-1}$, 10 min (schwarz), rechte Darstellung: DNA-Fragmentierung, TUNEL-positive normale Melanozyten in MGM, Kontrolle: 0,05 % DMSO, 24 h und 48 h: Zellen 24 und 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt, zVAD+BA: Zellen 24 h mit Z-VAD-FMK $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt, n = 3, * P < 0,05, *** P < 0,001, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle: Dunnett-Test, Vergleich zweier Wertepaare (24 h ohne versus mit Z-VAD-FMK): t-Test

In den Experimenten war deutlich eine Zunahme der Strangbruch-positiven Zellen auf 15 % nach 24 h und auf 61 % nach 48 h zu beobachten. Eine zusätzliche Inkubation mit dem Caspaseninhibitor mit Z-VAD-FMK führte zu einer Verringerung der DNA-Fragmentierung nach 24 h ($P < 0,05$). Für die Untersuchungen des mitochondrialen Apoptosemarkers APO2.7 wurden die Zellen 15 h mit 4 und $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Die Messungen ergaben einen Anstieg der APO2.7-positiven Zellen um 150 % ($4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) und eine weitere Erhöhung um 400 % ($8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$).

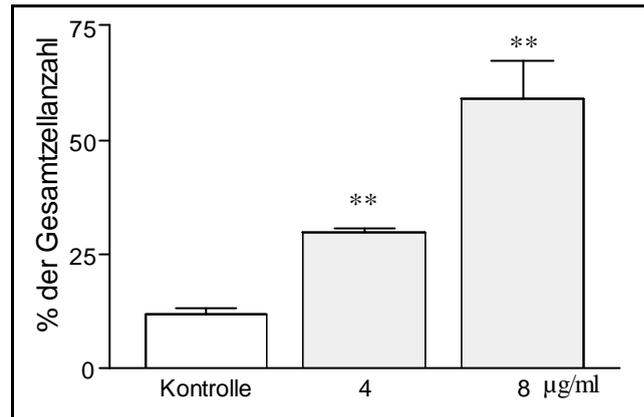


Abbildung 41: APO2.7-positive Zellen, normale Melanozyten in MGM, 24 h nach Zugabe von 4 und $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, $n = 3$, $**P < 0,01$, Dunnett-Test

4.3.3. Zusammenfassung

In den aufgezeigten Ergebnissen konnten sowohl in der Melanomzelllinie IGR1 als auch in der Zellkultur der normalen humanen Melanozyten toxische Effekte der Betulinsäure nachgewiesen werden. Die ED_{50} -Werte der beiden Zellkulturen unterschieden sich nach 48 h Inkubation nicht (IGR1 = $3,5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, NHEM = $2,2 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA).

Die Untersuchungen zu apoptotischen und nekrotischen Prozessen zeigten aber Unterschiede im Verhalten beider Zellarten vor allem in der Zeitspanne und dem Ausmaß nekrotischer Ereignisse. So kam es bei den NHEM gegenüber den IGR1 zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität ab einer BA-Konzentration von $0,63 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, der bei 10 und $20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA fast das Ausmaß der Positivkontrolle erreichte. Die IGR1-Zellen zeigten erst ab $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ eine nekrotische Antwort auf BA, die auch bei $20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nur ein Drittel der Tween[®] 20-Kontrolle erreichte.

Die morphologischen Veränderungen der Melanozyten sind in der Abbildung 42 dargestellt. Nach Gabe der Betulinsäure nahmen IGR1 und NHEM-Zellen ein kugelförmiges Äußeres an. Es kam zum Abschnüren kleiner Partikel (P) aus den Dendriten (D). Im weiteren Verlauf des Prozesses lösten sich die Zellen vom Untergrund ab. Das typische "boiling" der Zellen konnte nur an wenigen anhaftenden Zellen beobachtet werden und fand vermutlich zum überwiegenden Teil im Zellüberstand statt, da hier fast ausschließlich

spätapoptotische und nekrotische Zellen im Annexin-V/PI- und APO2.7-Test nachweisbar waren. Die einzelnen Stadien sind in der Abbildung 43 aufgezeigt.

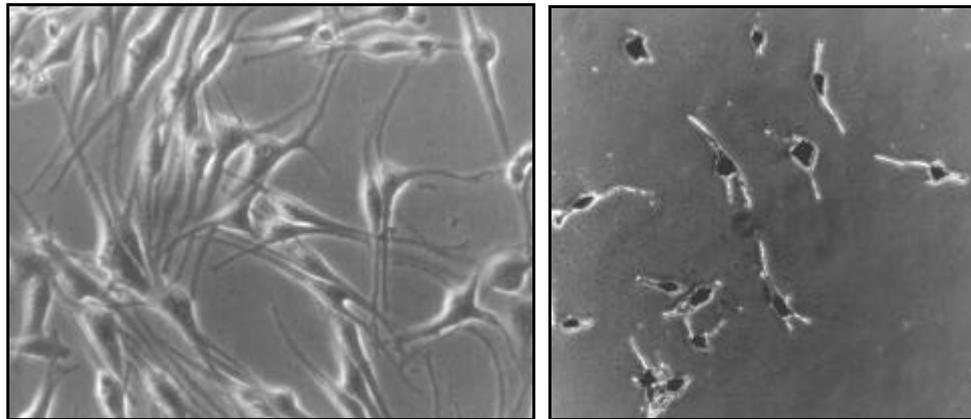


Abbildung 42: normale Melanozyten in MGM, *linkes Foto*: Kontrolle mit 0,05 % DMSO, *rechtes Foto*: behandelte Zellen 24 h nach Zugabe von $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA

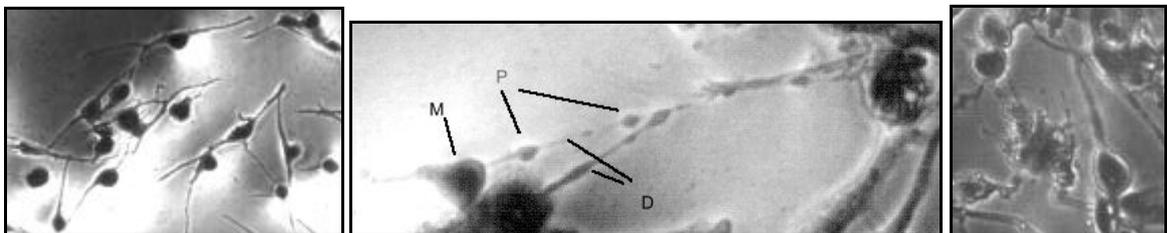


Abbildung 43: Apoptosestadien der Melanozyten (M) am Beispiel der NHEM in MGM mit $10 \mu\text{g}$ BA 12 h inkubiert, *linkes Foto*: Zellen nehmen ein kugelförmiges Aussehen an, *mittleres Foto*: einzelne Partikel (P) werden aus den Dendriten (D) abgeschnürt, *rechtes Foto*: "blebbing" der Zellen einzelne Vesikel werden aus dem gesamten Zelllumen abgegeben

Für die IGR1-Melanomzelllinie konnten gleiche morphologische Veränderungen festgestellt werden. So nehmen diese Zellen ebenfalls ein kugelförmiges Äußeres nach 12 stündiger Behandlung mit $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA an und lösen sich ab (Abbildung 44). Am Boden des Kulturgefäßes bleiben nach 24 h nur einige Zellen und Zellfragmente zurück (Abbildung 45).

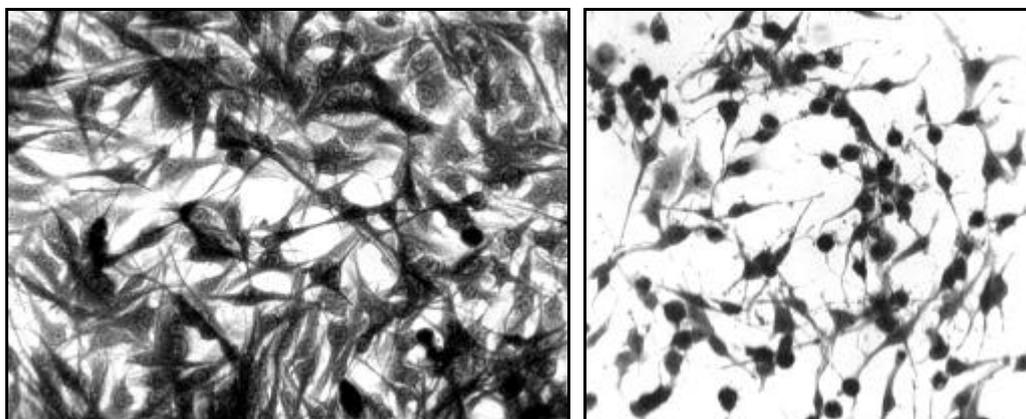


Abbildung 44: *linkes Foto*: morphologisches Bild IGR1-Zellen in DMEM mit 0,05 % DMSO (Kontrolle), *rechtes Foto*: IGR1-Zellen 12 h nach Gabe von $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA

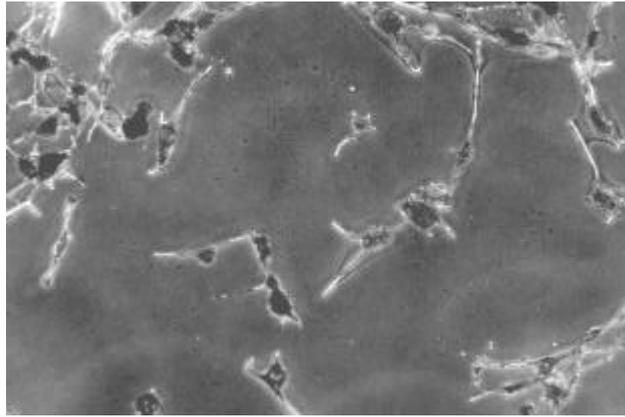


Abbildung 45: IGR1-Zellen in MEM 24 h nach Zugabe von $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA

Neben den nekrotischen Ereignissen wurde mit den Experimenten nachgewiesen, dass sowohl in der IGR1-Zelllinie als auch in NHEM durch BA Apoptose ausgelöst wird. Im Annexin-V/PI-Test zeigte sich, dass der Verlauf der Apoptose bei normalen Zellen anscheinend langsamer verläuft. So waren nach 24 h und Zugabe von $6 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA bei NHEM der größte Teil der geschädigten Zellen noch in der apoptotischen Phase, wohingegen sich die der IGR1-Zellen zu diesem Zeitpunkt schon zum überwiegenden Teil in der spätapoptotischen Phase befanden. Auch nach 48 h und Behandlung der Zellen mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA sind noch 25 % der NHEM in der apoptotischen Phase. Der Anteil der vitalen Zellen nahm aber sowohl bei den IGR1-Zellen als auch bei den NHEM auf ca. 20 % der Gesamtzellanzahl ab. Mit dem Antikörper APO2.7 wurden weiterhin Apoptoseuntersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Beide Zellen zeigten einen starken Anstieg der APO2.7-positiven Zellen (IGR1: 15 h, $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA = 56 %, NHEK: 24 h, $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA = 59 %). Ein weiteres Ereignis der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA. Diese wurde durch Färbung der Kerne mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 46, Abbildung 47) und mit der TUNEL-Methode am Durchflusszytometer untersucht. Mit beiden Methoden konnte eine Fragmentierung der DNA nachgewiesen werden.

Der Einfluss der Caspasen auf die Betulinsäure ausgelöste Apoptose wurde an NHEM untersucht. Durch Hemmung von Caspasen mit dem Inhibitor Z-VAD-FMK konnte die Fragmentierung der DNA unterdrückt werden. Gleichzeitig konnte aber im Annexin-V/PI-Test eine Abnahme der lebenden und Zunahme apoptotischer Zellen durch BA nicht aufgehoben werden. So konnte zwar nachgewiesen werden, dass Downstream-Caspasen (z.B. Caspase 3) eine Rolle spielen, deren Hemmung aber keine Erhöhung der Lebensfähigkeit der Zellen erbrachte.

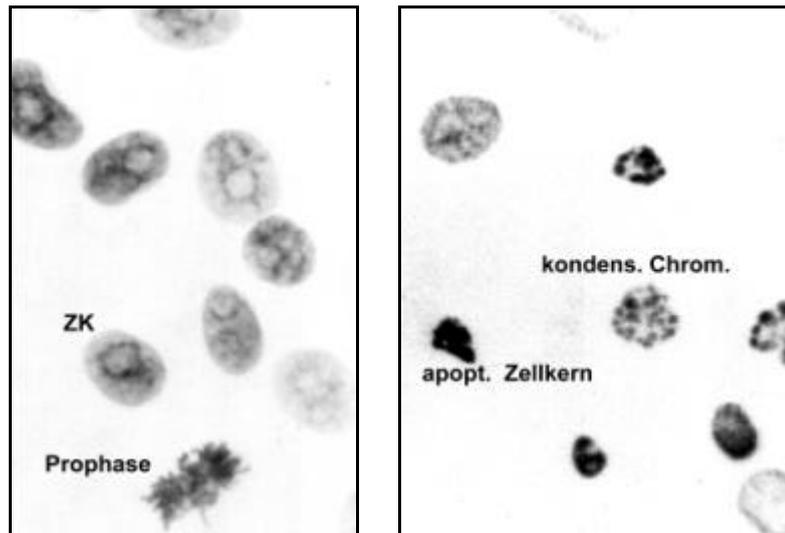


Abbildung 46: NHEM in MGM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, invertierte Darstellung, *linkes Foto*: Kontrolle DMSO 0,05 %, 48 h, *rechtes Foto*: NHEM Zellen 48 h nach Inkubation mit $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, apoptot., kondens. Chrom. = kondensiertes Chromatin

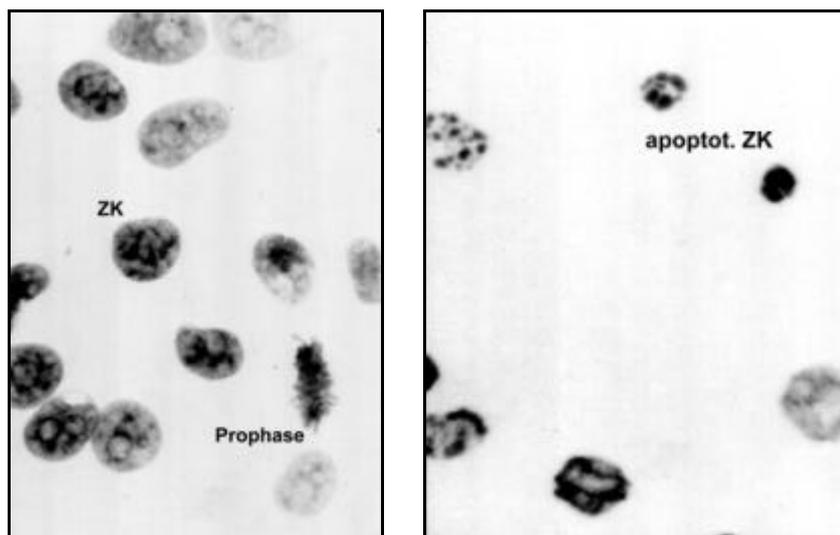


Abbildung 47: IGR1-Zellen in MEM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, invertierte Darstellung, *linkes Foto*: Kontrolle DMSO 0,05 %, 48 h, *rechtes Foto*: IGR1-Zellen 48 h nach Inkubation mit $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern

Die Untersuchungen des in apoptotische Prozesse involvierten Proteins p53 erfolgte an IGR1-Zellen. Es konnte hier keine Akkumulation des Proteins nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist über die Wirkung der BA auf Melanozyten zu sagen, dass sowohl in der Melanomzelllinie als auch in normalen Melanozyten eine Apoptose ausgelöst wurde. Die BA-Konzentrationen, durch die diese Prozesse ausgelöst werden konnten, unterschieden sich nicht, wohl aber die zeitliche ABfolge bis zur Ausprägung spätapoptotischer Prozesse.

4.4. Untersuchungen zur Spezifität der Betulinsäure - Vergleich von Melanozyten und Keratinozyten

4.4.1. Wirkung der Betulinsäure auf die Keratinozytenzelllinie HaCaT

4.4.1.1. Untersuchungen zum Proliferationsverhalten

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der HaCaT-Keratinozyten nach einem Inkubationszeitraum von 24, 48, 72 und 96 h wurden für die Betulinsäurekonzentrationen von 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ durchgeführt. Hierzu konnte die Zellanzahlbestimmung in 96er MTP genutzt werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 48 dargestellt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO. Nach 24-72 h kam es zu einer Abnahme der Zellanzahl ab einer Konzentration von 0,31 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ bei einer $\text{ED}_{50} = 7$ (24 h), 6,2 (48 h), 5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ (72 h). Nach 96 h waren Einflüsse auf die Zellanzahl ab einer Konzentration von 0,16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA zu erkennen. Die Konzentration, bei der die Zellanzahl 50 % der Kontrolle betrug, lag nach 96 h bei 2 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$.

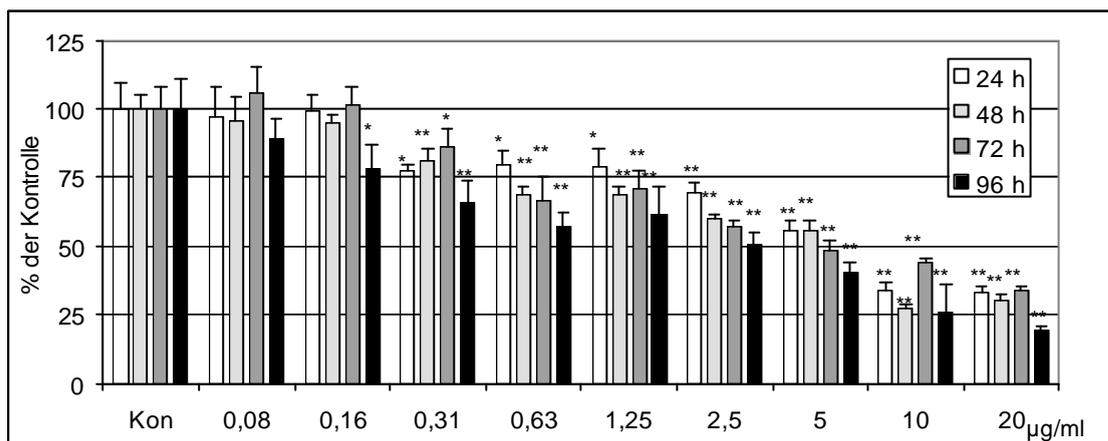


Abbildung 48: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, HaCaT-Keratinozyten in SFM 24, 48, 72 und 96 h nach Inkubation mit 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Zur Erfassung des Betulinsäureeinflusses (0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) auf die DNA-Syntheseleistung wurde der Einbau des Thymidinanalogons BrdU in die DNA nach 20 h Inkubation mit BA bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchung finden sich in der folgenden Abbildung 49. Die Zellen zeigten einen signifikanten Abfall der DNA-Syntheserate ab 0,31 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.

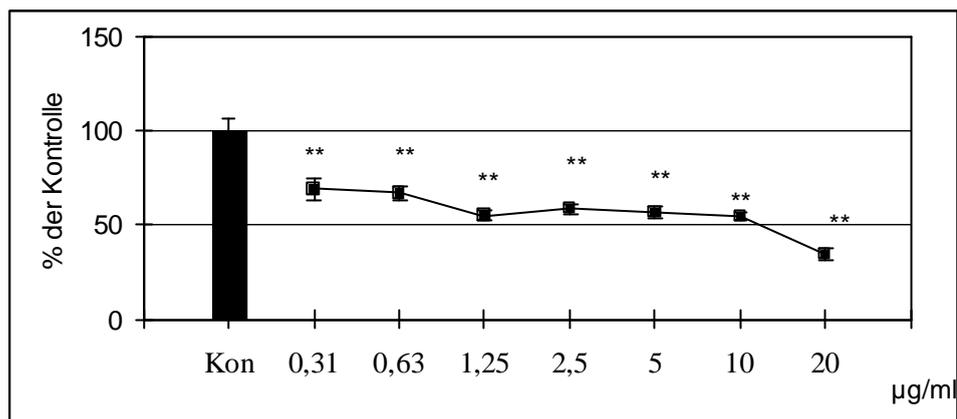


Abbildung 49: Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU Einbau), HaCaT-Keratinocyten in SFM 20 h nach Behandlung mit 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Um den Einfluss der BA auf die Proliferation der HaCaT-Zellen zu charakterisieren wurden weiterhin Zellzyklusuntersuchungen durchgeführt. Eine Behandlung der Zellen mit 1,5, 3, 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA führte zu keiner Änderung im Zellzyklus nach 20 und 44 h. Eine Inkubation der Zellen mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA induzierte nach 16, 20 und 24 h ebenfalls keine Änderungen im Zellzyklus.

4.4.1.2. Apoptoseverhalten

Die LDH-Aktivität im Zellüberstand als ein Maß für nekrotische Prozesse wurde nach 7 und 24 h für die Betulinsäurekonzentrationen 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ bestimmt. Wie aus der grafischen Darstellung (Abbildung 50) zu entnehmen, ist ein Anstieg der LDH-Aktivität ab 10 (7 h) bzw. 2,5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (24 h) nachweisbar. Die Positivkontrolle (Tween[®] 20, 0,02 %) reagierte mit einer deutlichen Zunahme.

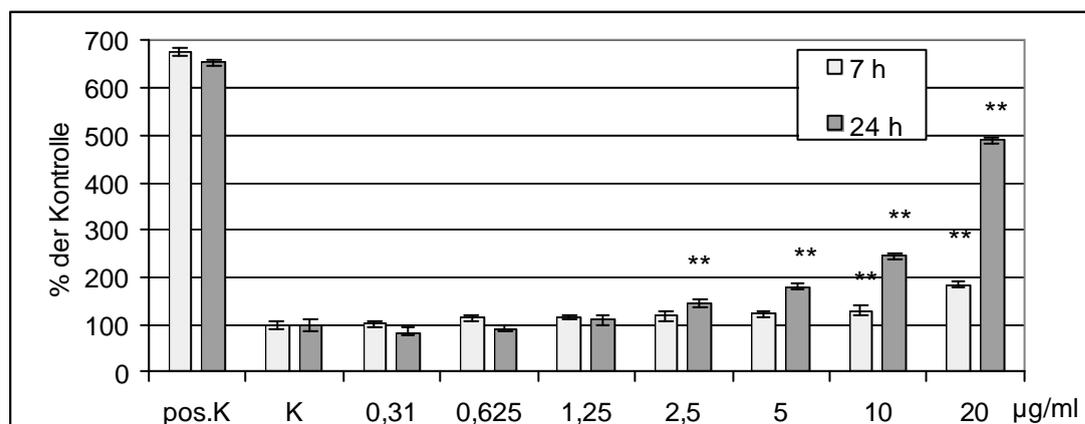


Abbildung 50: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, HaCaT-Keratinocyten in SFM 7 h nach Behandlung mit 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, pos. K = Positivkontrolle Tween[®] 20 0,02 %, K = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ergebnisse der Apoptoseuntersuchungen für den Inkubationszeitraum von 15 h stammen von HaCaT-Zellen der jeweils gleichen 35 cm²-Kulturflaschen. Diese Experimente dienen dem Vergleich der Methoden APO2.7 (Abbildung 51), M30 (Abbildung 52), TUNEL (Abbildung 53) und Annexin-V/PI (Abbildung 54) hinsichtlich der Betulinsäurewirkung (Galgon et al., 2000a, b).

Die Untersuchungen wurden nach 15 h Inkubation für die Konzentrationen 4, 8, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA durchgeführt.

Die Messungen des mitochondrialen Apoptosemarkers am Durchflusszytometer ergaben einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen ab einer Konzentration von 8 µg×ml⁻¹ BA (P < 0,01). In der Abbildung 51 ist die APO2.7-positive Zellpopulation, erkennbar an der höheren Fluoreszenzintensität, beispielhaft in einem Histogramm für die Konzentration 16 µg×ml⁻¹ dargestellt, und die Population der apoptotischen Zellen für die einzelnen Konzentrationen quantifiziert.

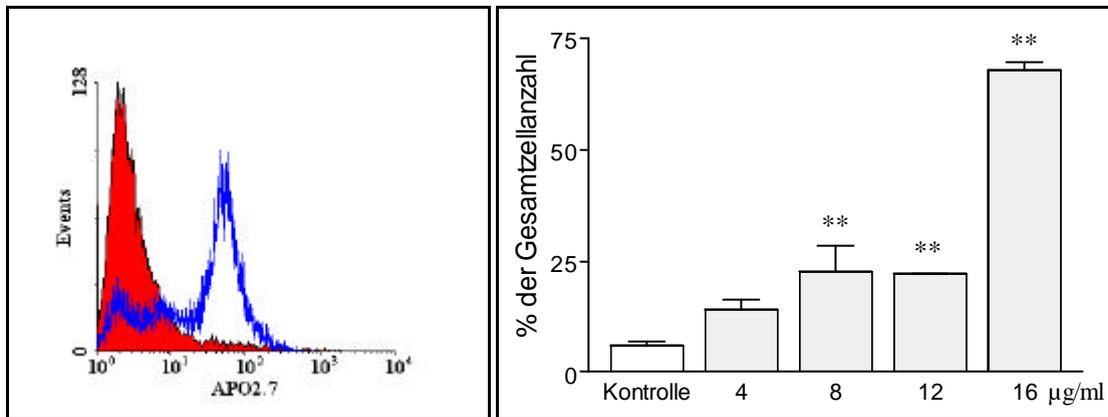


Abbildung 51: *linke Darstellung*: Histogramm Fluoreszenzintensität APO2.7, HaCaT-Keratinocyten in SFM, 15 h mit 16 µg×ml⁻¹ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), *rechte Abbildung*: APO2.7-positive Zellen, HaCaT-Keratinocyten 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, ** P < 0,01, n = 2, Dunnett-Test

Der Einfluss der Caspasen wurde am Substrat CK 18 untersucht. Dieses in der Zelle vorkommende Zytokeratin wird durch Caspasen geschnitten. Am Durchflusszytometer wird diese spezifische Schnittstelle mit dem Antikörper M30 detektiert. Nach 15 h wurde für die Konzentrationen von 4, 8, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA ein Anstieg der M30-positiven Zellen ermittelt. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 52 aufgezeigt. Aus dem Histogramm (linke Abbildung) ist ein deutlicher Anstieg der M30-positiven Zellen für die Betulinsäurekonzentration 16 µg×ml⁻¹ nach 15 h und zusätzlich für einen Inkubationszeitraum von 24 h dargestellt.

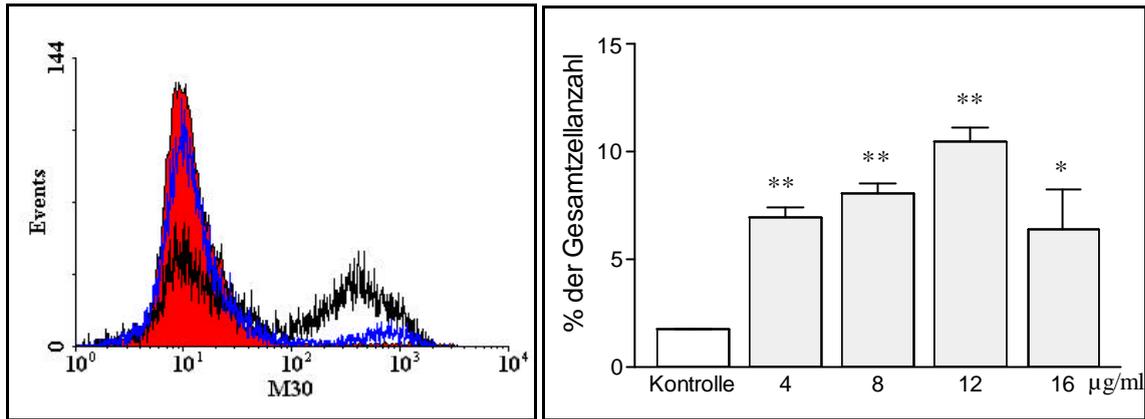


Abbildung 52: linke Darstellung: Histogramm M30, HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 h mit 16 µg×ml⁻¹ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 24 h, 16 µg×ml⁻¹ BA-behandelt (schwarz), rechte Darstellung: M30-positive HaCaT-Keratinocyten 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die Bestimmung der DNA-Fragmentierung wurde ebenfalls 15 h nach einer Inkubation mit 4, 8, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA durchgeführt. Nur bei 16 µg×ml⁻¹ kam es zu einer Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen, deren Anteil dabei um 700 % stieg.

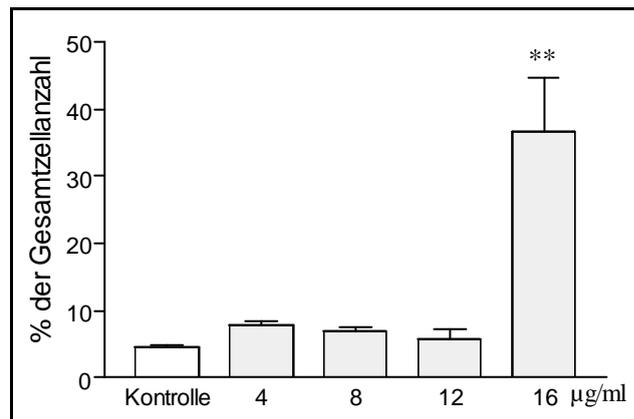


Abbildung 53: DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12, 16 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, Dunnett-Test

Nach 15 h und mit den bereits erwähnten Betulinsäurekonzentrationen wurde außerdem der Annexin-V/PI-Test durchgeführt. Wie aus der Abbildung 54 zu entnehmen, kam es ab einer Konzentration von 4 µg×ml⁻¹ zu einer Abnahme der vitalen und einer deutlichen Zunahme der spätapoptotisch/nekrotisch geschädigten Zellen. Nach einer Inkubation mit 16 µg×ml⁻¹ BA nahmen die lebenden Zellen um 82 % ab und die spätapoptotisch/nekrotischen Zellen um 292 % zu.

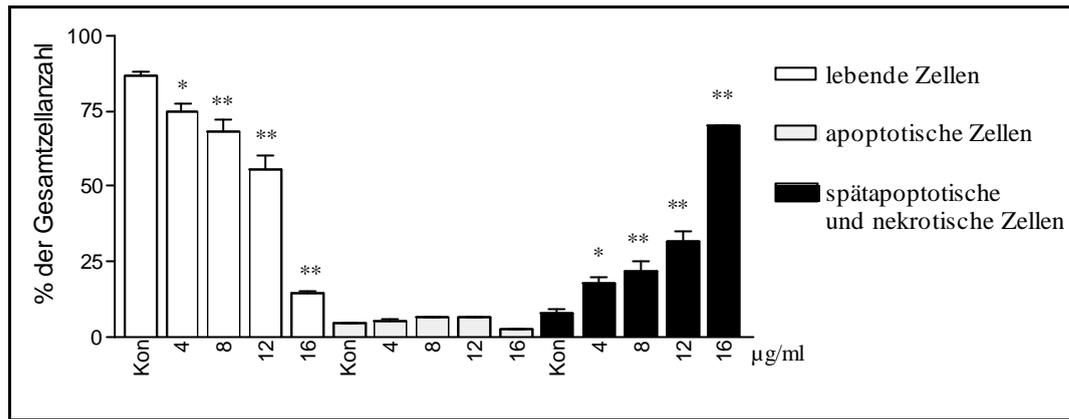


Abbildung 54: Annexin-V/PI-Test HaCaT-Keratinocyten in SFM, 15 h mit 4, 8, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die nach einem Zeitraum von 15 h gemessenen Parameter APO2.7-Anstieg, Caspaseaktivität, DNA-Strangbrüche und Phosphatidylserinumlagerung/Membranintegrität zeigten alle eine Änderung in den mit BA-behandelten Zellen. Die hohe Zunahme der apoptotischen Zellen nach einer Inkubation mit 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und dem gegenüber der geringere wenn auch signifikante Anstieg bei den BA-Konzentrationen von 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, konnte in allen Tests deutlich nachgewiesen werden. Ausgenommen hiervon ist lediglich der Nachweis der Caspaseschnittstellen. Dieser Test führte zu diesem Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg der M30-positiven Zellen. Der starke Anstieg der apoptotischen Zellen bei einer Konzentration von 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA wurde aber nicht beobachtet. Beim Annexin-V/PI-Test konnte nicht eindeutig zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Ein Einfluss der BA konnte aber hier schon ab 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde das Apoptoseverhalten der HaCaT-Zellen mit dem Annexin-V/PI-Test für die Inkubationszeiträume 24, 48 und 72 h untersucht. Nach Zugabe von 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nach 24 h zeigten alle Konzentrationen einen offensichtlichen Einfluss auf die Zellen. Aus der Abbildung 55 ist zu entnehmen, dass eine Abnahme der lebenden Zellen, wie schon nach 15 h, ab 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA auftrat. Die Reaktion auf die Zugabe von 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ fällt aber gegenüber dem 15-stündigem Zeitintervall deutlich höher aus. Der Anteil spätapoptotischer und nekrotischer Zellen stieg um 570 % versus Kontrolle.

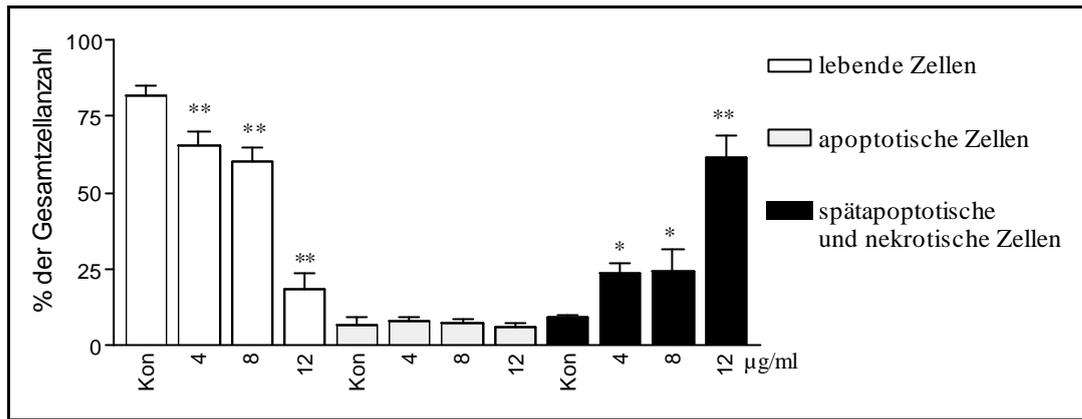


Abbildung 55: Annexin-V/PI-Test, HaCaT-Keratinocyten in SFM, 24 h mit 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Nach 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA wurde die Phosphatidylserinumlagerung und die APO2.7-Bindung bestimmt. In beiden Testsystemen konnte ein Abfall der lebenden Zellen ab 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA beobachtet werden (P<0,01). Im APO2.7-Test konnten dagegen apoptotische Zellen ab 2 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nachgewiesen werden (P<0,05) (Daten nicht gezeigt).

Die Daten einer 72-stündigen Inkubation mit 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA sind in der Abbildung 56 für die Untersuchung der Phosphatidylserinumlagerung und in der Abbildung 57 für den Nachweis des mitochondrialen Apoptoseproteins durch den Antikörper APO2.7 dargestellt. Mit dem Annexin-V/PI-Test zeigte sich eine Abnahme der lebenden Zellen ab 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Eine signifikante Zunahme der APO2.7-positiven Zellen konnte in diesem Test schon ab 2 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA gefunden werden. Ein weiterer Anstieg der apoptotischen Zellen gegenüber 15 und 24 h konnte bei allen Konzentrationen nachgewiesen werden.

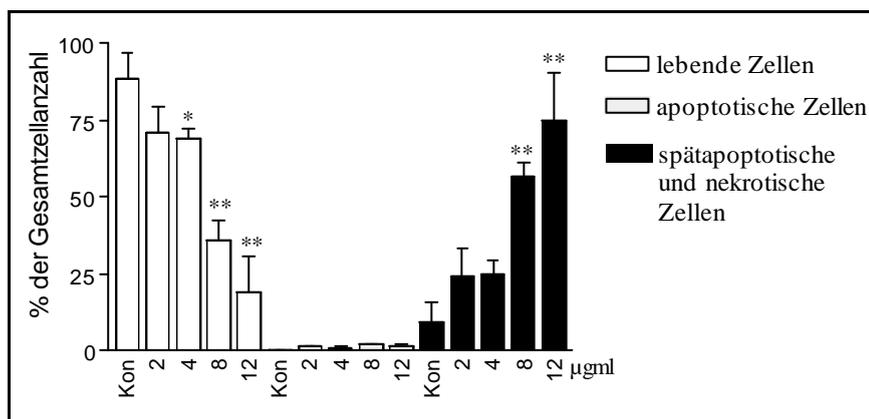


Abbildung 56: Annexin-V/PI-Test, HaCaT-Keratinocyten in SFM 72 h mit 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

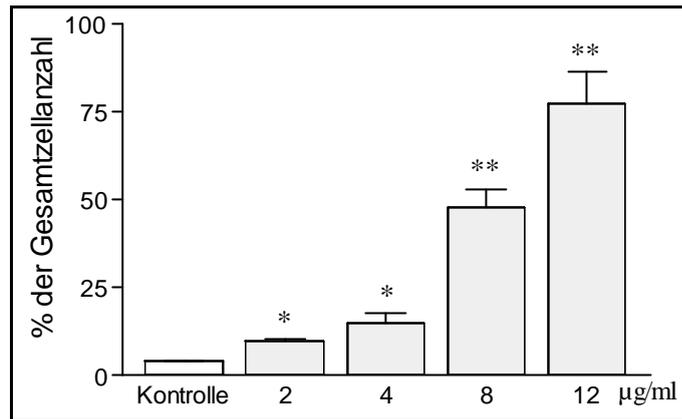


Abbildung 57: APO2.7-positive Zellen, HaCaT-Keratinozyten in SFM 72 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle = 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die Untersuchungen des in apoptotischen Prozessen involvierten Proteins p53 erfolgten am Durchflusszytometer. In der Abbildung 58 ist beispielhaft eine Messung des p53-Gehaltes als Dot Plot dargestellt. Zur Erfassung der p53-Menge der einzelnen Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der in der y-Achse dargestellten Fluoreszenzintensität des FITC markierten p53-Antikörpers bestimmt. In der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität der PI markierten DNA dargestellt. Nach 20 h kam es zu einer deutlichen Verringerung der MFI bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.

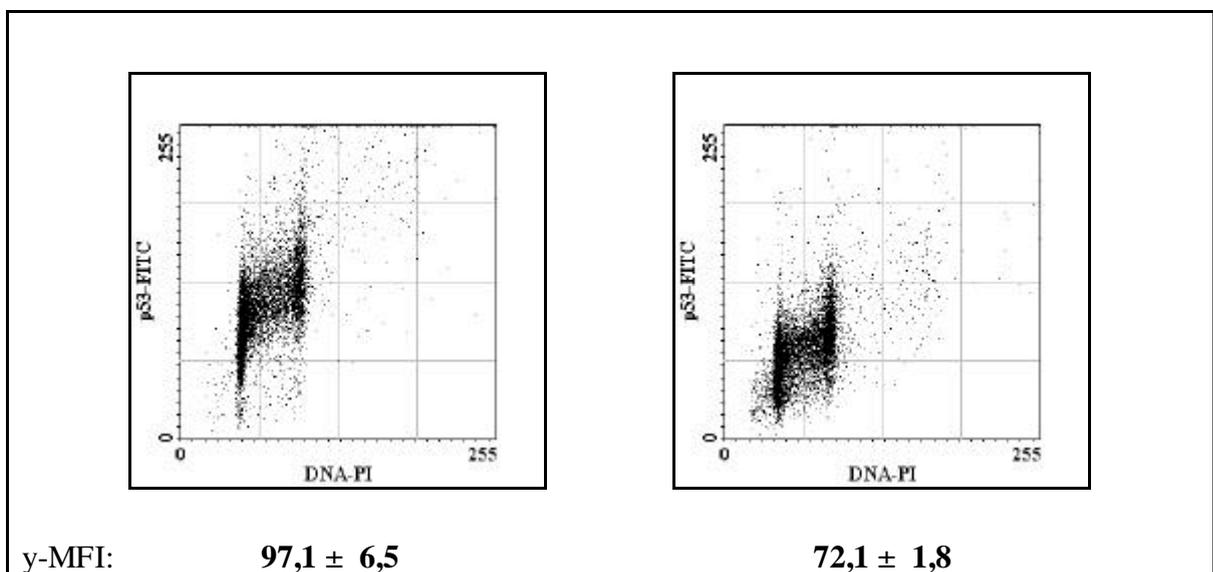


Abbildung 58: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, HaCaT-Keratinozyten in SFM, *linke Darstellung*: Kontrolle 0,05 % DMSO, y-MFI [mittlere Fluoreszenzintensität (y)]: 97,1 ± 6,5, n = 3, *rechte Darstellung*: behandelte Zellen 20 h nach Zugabe von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, y-MFI: 72,1 ± 1,8; n = 3, t-Test

Nach 20 h Inkubation mit den Betulinsäurekonzentrationen 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ kam es, wie aus der Abbildung 59 zu entnehmen, zu keiner Änderung des p53-Gehaltes in den Zellen der verschiedenen Zellzyklusphasen.

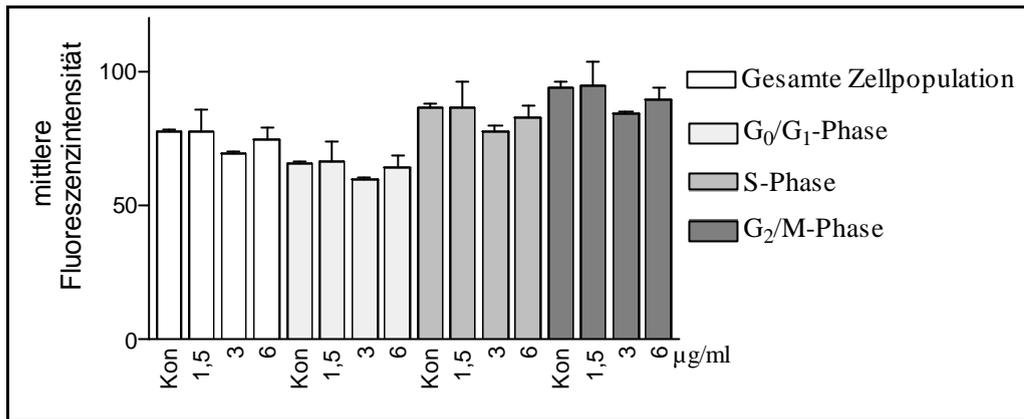


Abbildung 59: durchflusszytometrische Bestimmung von p53, HaCaT-Keratinocyten in SFM 20 h mit 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, Dunnett-Test

Nach 40 h wurde ein Rückgang des p53-Gehaltes bei der Konzentration 1,5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ deutlich. Der Effekt lag bei 12 %.

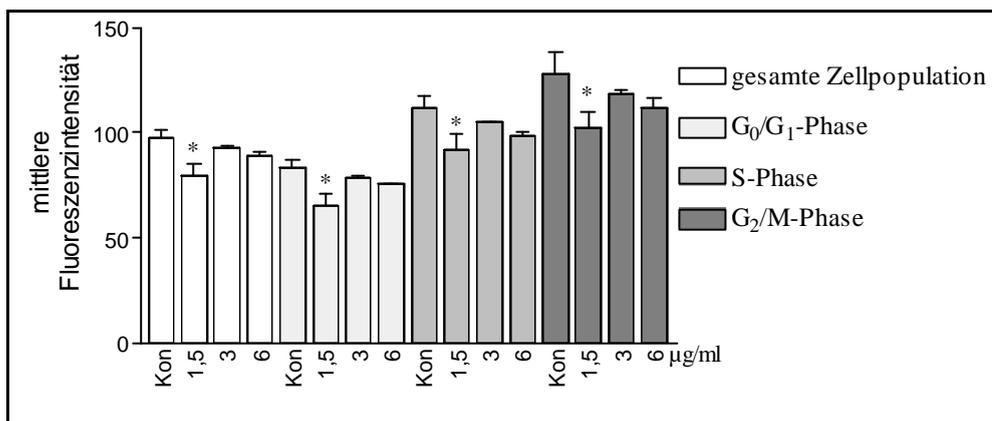


Abbildung 60: durchflusszytometrische Bestimmung von p53, HaCaT-Keratinocyten in SFM 40 h mit 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, * P < 0,05, n = 2, Dunnett-Test

Eine Untersuchung des BA-Einflusses auf p53 mit Westernblot-Methoden zeigte deutlich eine Überexprimierung des p53-Proteins in HaCaT-Keratinocyten gegenüber den normalen Keratinocyten. In der Abbildung 61 ist ein Westernblot dargestellt, in dem die mit p53-Antikörpern markierten HaCaT-Banden denen der NHEK gegenübergestellt sind. Die Auftragemenge bei HaCaT-Keratinocyten lag bei 50 μg und bei normalen Keratinocyten bei 100 μg Protein. Bei den HaCaT-Zellen kam es zum zusätzlichen Auftreten vieler unspezifischer Banden.



Abbildung 61: Westernblot p53, *linke Banden:* HaCaT-Keratinocyten in SFM, fünfter Kulturtag, Inkubation mit 0,01% DMSO für 24 h, Proteinmenge 50 µg; *rechte Banden:* normale Keratinocyten, fünfter Kulturtag, nach Inkubation mit 0,01% DMSO für 24 h Proteinmenge 100 µg

4.4.1.3. Untersuchung des Differenzierungsverhaltens

Eine Form der Apoptose in Keratinocyten ist die terminale Differenzierung. Zur Ermittlung, ob BA einen geregelter Zelltod in Richtung Keratinocyten-differenzierung in HaCaT-Zellen induzieren kann, wurden die Differenzierungsmarker Involucrin (24 h) und Filaggrin (48 h) am Durchflusszytometer bestimmt. Für die Messungen wurden 3 Tage alte Kulturen mit einer 40-50 %igen Konfluenz genutzt. 24 h nach Zugabe von 4 und 8 µg×ml⁻¹ BA bzw. 2,5 mM Ca²⁺ als Positivkontrolle konnte kein Anstieg der Involucrinmenge (Tabelle 5) beobachtet werden. 48 h nach diesem Inkubationsschema wurde eine Filaggrinbestimmung durchgeführt. Nach Zugabe von 8 µg×ml⁻¹ BA kam es zwar zu einer signifikanten (P<0,05), aber unwesentlichen Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (Tabelle 6).

Tabelle 5: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Involucrinbestimmung an HaCaT-Keratinocyten in SFM nach 24 h Inkubation mit 2,5 mM Ca²⁺, 4, 8 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO (x ± SD, n = 3)

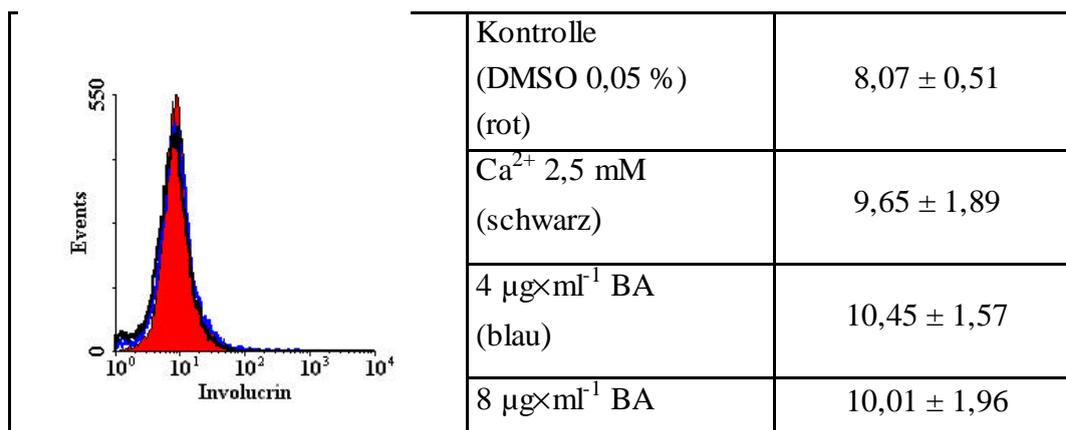
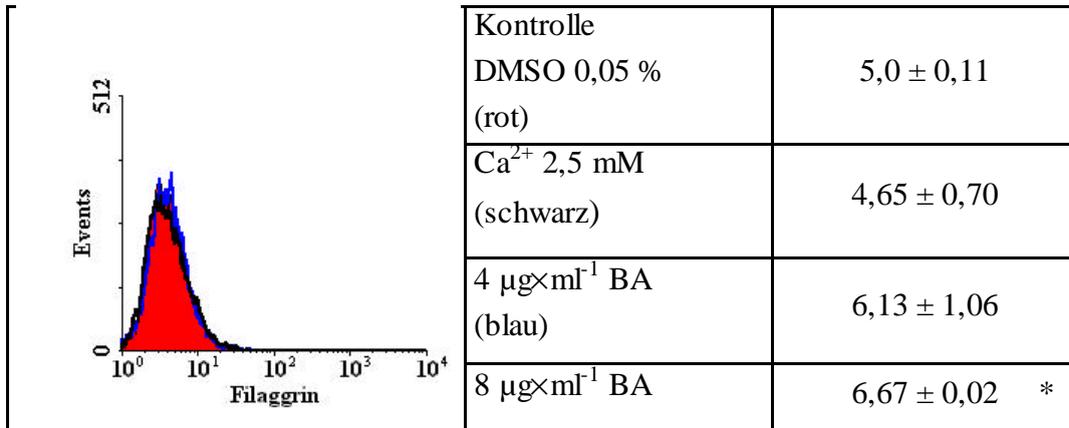


Tabelle 6: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Filaggrinbestimmung an HaCaT-Keratinocyten in SFM nach 48 h Inkubation mit 2,5 mM Ca²⁺, 4, 8 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO (x ± SD, n=3, * P < 0,05Dunnett-Test)



4.4.2. Untersuchungen zur Betulinsäure induzierten Apoptose und Differenzierung an normalen humanen epidermalen Keratinocyten (NHEK)

4.4.2.1. Untersuchungen zum Proliferationsverhalten

Nach 20, 40 und 64 h wurden die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten nativer humaner Keratinocyten nach Einwirkung von 0,31-20 µg×ml⁻¹ BA durchgeführt. Hierzu wurde die Zellanzahl in 96er MTP bei 80 % Konfluenz der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 62 dargestellt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO in PBS. Nach 20 h kam es nur bei einer Konzentration von 20 µg×ml⁻¹ BA zu einer Abnahme der Zellanzahl. Eine Verringerung der Anzahl vitaler Zellen war nach 40 h ab 0,63 µg×ml⁻¹ bei einer ED₅₀ = 15 µg×ml⁻¹ und nach 64 h ab 0,31 µg×ml⁻¹ bei einer ED₅₀ = 8,5 µg×ml⁻¹ erkennbar.

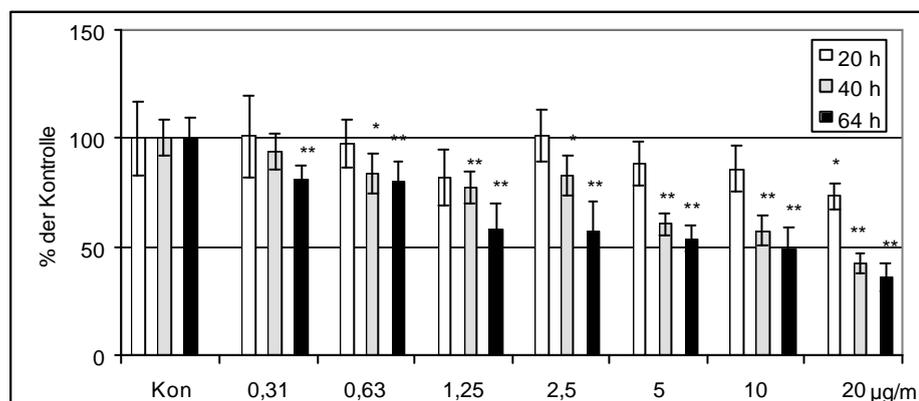


Abbildung 62: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, normale Keratinocyten in SFM, 20, 40 und 64 h nach Betulinsäurezugabe von 0,31-20 µg×ml⁻¹, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Zur Erfassung des BA-Einflusses auf das Proliferationsverhalten der NHEK wurde 20 h nach Zugabe von $0,31\text{-}20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA die BrdU-Einbaurate bestimmt (Abbildung 63). Die NHEK zeigten einen deutlichen Abfall der Zellen, welche die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen, ab $0,31\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA. Bei $1,25\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA betrug die Proliferationsrate die Hälfte der Kontrolle (0,1 % DMSO). Dieser starke Einfluss war zu diesem Zeitpunkt im Vitalitätstest noch nicht detektierbar und machte sich dort erst nach 40 h bemerkbar.

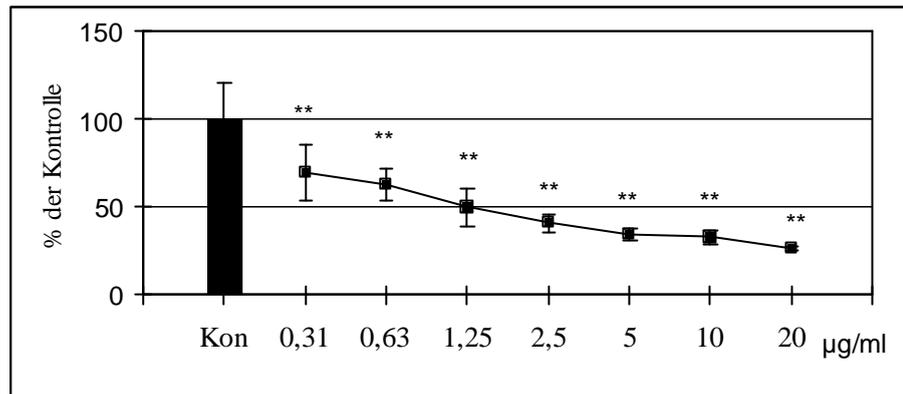


Abbildung 63: Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU Einbau), normale Keratinozyten in SFM 20 h nach Behandlung mit $0,31\text{-}20\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test

4.4.2.2. Zellzyklusuntersuchungen

Zur Charakterisierung des Zellwachstums und des Apoptoseverhaltens nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen BA-Konzentrationen wurden Zellzyklusuntersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Normale Keratinozyten wurden mit Konzentrationen von 2, 4, 8 und $12\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt und nach 8, 16, 21, 48 und 72 h Veränderungen im Zellzyklus erfasst. Die Zugabe erfolgte am 5. Tag nach der Aussaat in einer Wachstumsphase mit vielen Zellen in der S-Phase (25-30 %). Nach 8 h konnten keine Veränderungen im Zellzyklus beobachtet werden. Nach 16 und 21 h waren deutliche Veränderungen nachweisbar. Es kam, wie in der Abbildung 64 dargestellt, nach 16 h bei allen BA-Konzentrationen zu einer Abnahme der in der G_0/G_1 -Phase befindlichen Zellen um 70 % ($12\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA). Dabei wurde gleichzeitig eine Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen in der G_2/M -Phase um 260 % ($12\ \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA) beobachtet. In der S-Phase wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Die Betrachtung der Zellzyklusphasen nach 21 h (Abbildung 65) zeigte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Zellanzahl in der G_0/G_1 -Phase und eine Zunahme in der G_2/M -Phase. Die Änderungen in der G_0/G_1 -Phase betragen zu diesem Zeitpunkt etwa 70 % und in der G_2/M -Phase 200 %. Es kam zu keinen Veränderungen in der S-Phase.

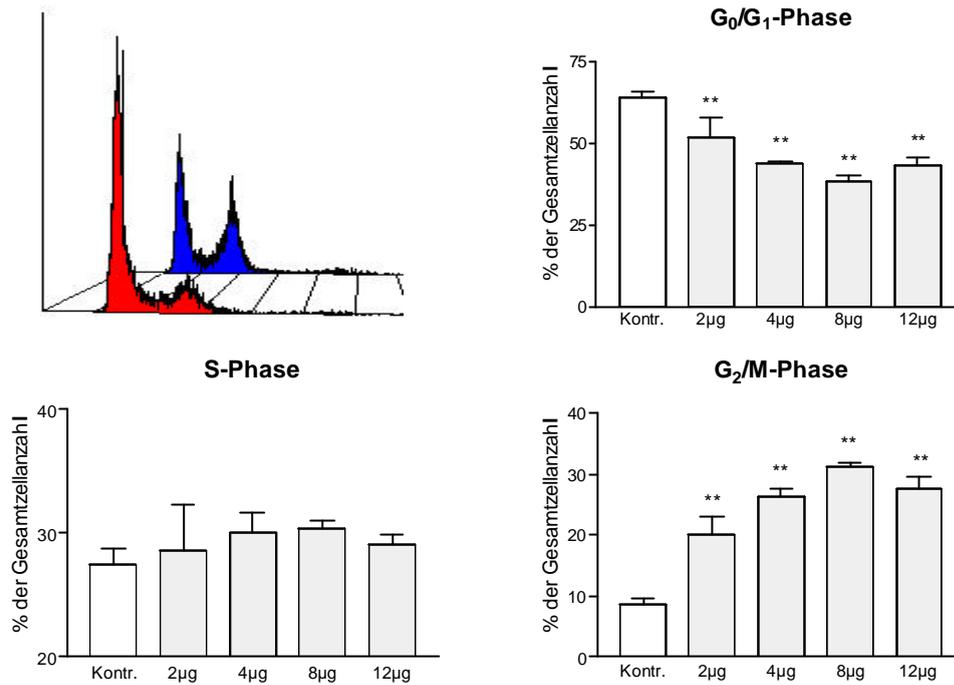


Abbildung 64: Zellzyklusuntersuchung nach 16 h, NHEK in SFM, *Histogramm*: Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 µg×ml⁻¹ BA (blau), *Diagramme*: Verteilung der Zellzyklusphasen 16 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test

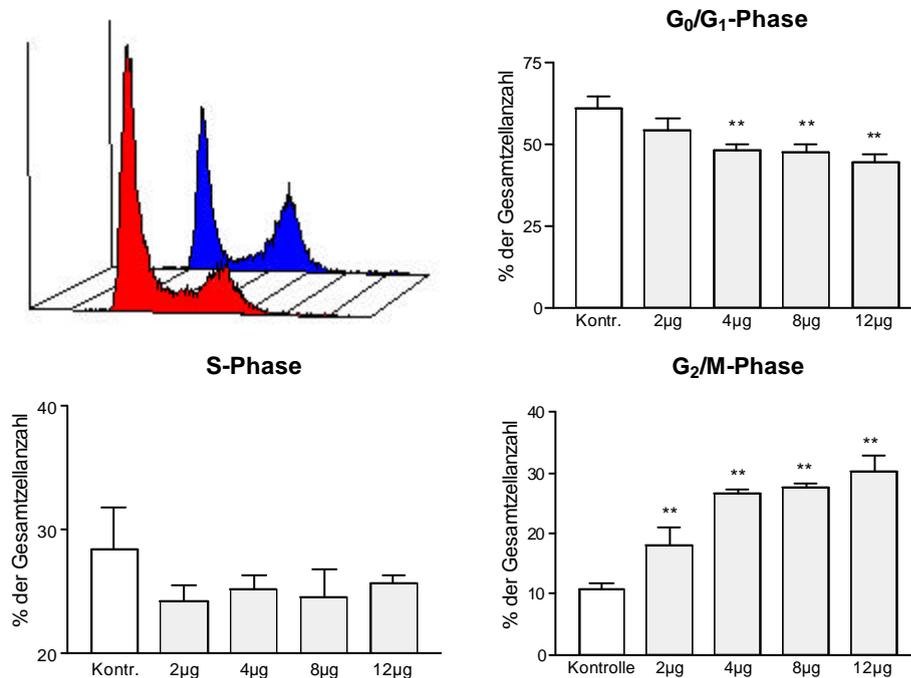


Abbildung 65: Zellzyklusuntersuchung nach 21 h, NHEK in SFM, *Histogramm*: Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 µg×ml⁻¹ BA (blau), *Diagramme*: Verteilung der Zellzyklusphasen 21 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test

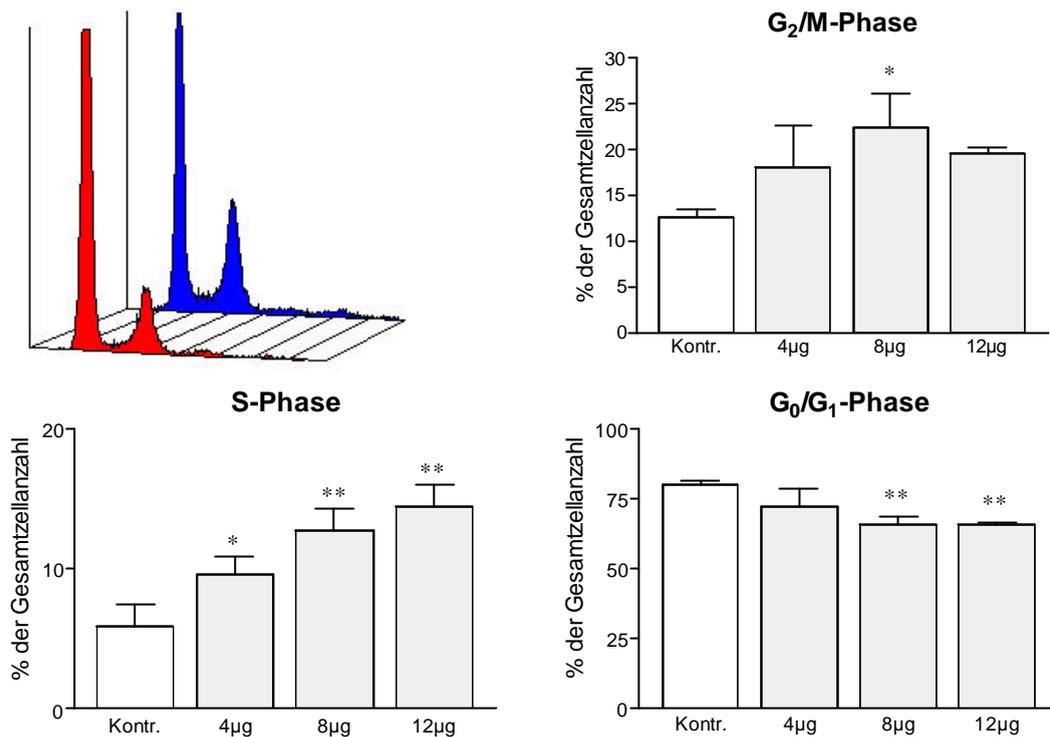


Abbildung 66: Zellyklusuntersuchung nach 24 h NHEK in SFM, *Histogramm*: Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 µg×ml⁻¹ BA (blau), *Diagramme*: Verteilung der Zellzyklusphasen 21 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 µg×ml⁻¹ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test

Erfolgte die Zugabe der Betulinsäure in einem Stadium, in dem sich wenige Zellen in der S-Phase befanden (5-7 %), so gab es nach einer Inkubation mit BA neben einer Abnahme der Zellanzahl in der G₀/G₁-Phase (um 20 %) und Zunahme in der G₂/M-Phase (um 56 %) einen deutlichen Anstieg in der S-Phase (um 150 %) (Abbildung 66). Für dieses Experiment wurden die Zellen 10 Tage bis zur Konfluenz kultiviert und der Zellzyklus nach 24 h für 4, 8 und 12 µg×ml⁻¹ Betulinsäure untersucht.

Untersuchungen des Zellzyklus nach 48 und 72 h zeigten, dass es nicht zu einem vollständigen Block der Zellen in einer der Phasen kommt. Die NHEK reagierten nur mit einer Abnahme der Zellen der G₀/G₁-Phase und einem Anstieg in der S-Phase. Die G₂/M-Phase änderte sich nicht mehr.

4.4.2.3. Apoptoseverhalten

Die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand als ein Maß für nekrotische Prozesse wurde nach 7 und 24 h Inkubation mit 0,16-20 µg×ml⁻¹ BA bestimmt. Die Aktivitäten der LDH schwankten nach 7 h leicht um den als 100 % gesetzten Wert der Lösungsmittelkontrolle. Es kam nur zu einem leichten Anstieg der LDH-Aktivität bei 20 µg×ml⁻¹ BA. Das als Positivkontrolle für nekrotische Prozesse mitgeführte Tween[®] 20 (0,02 %) führte demgegenüber zu einer deutlichen Erhöhung auf 400 % der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Nach 24 h kam es zu einem signifikanten Anstieg (P<0,01) der LDH-Aktivität im Zellüberstand ab einer BA-Konzentration von 5 µg×ml⁻¹.

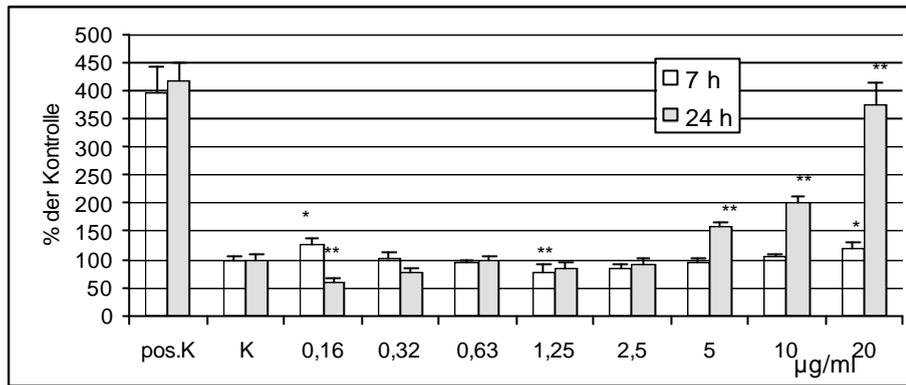


Abbildung 67: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, NHEK in SFM, 7 und 24 h nach Betulin-säurezugabe von 0,16-20 µg×ml⁻¹, K = Kontrolle DMSO 0,05 %, pos. K = Positivekontrolle Tween[®] 20 0,02%, n = 6, * P<0,05, **P<0,01, Dunnett-Test

Zur Untersuchung apoptotischer Prozesse wurde die Phosphatidylserinlagerung mittels Annexin-V-FITC am Durchflusszytometer nach 24 und 72 h bestimmt. Die Zellen wurden 24 h mit 4, 12 und 16 µg×ml⁻¹ Betulin-säure behandelt und zeigten einen Rückgang des Anteils vitaler Zellen bei einer Konzentration von 16 µg×ml⁻¹. Zu einem Anstieg der nekrotischen und spätapoptotischen Zellen kam es ab einer Konzentration von 4 µg×ml⁻¹ BA (Abbildung 68). Diese Effekte liegen in einem minimalen Bereich von 5 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

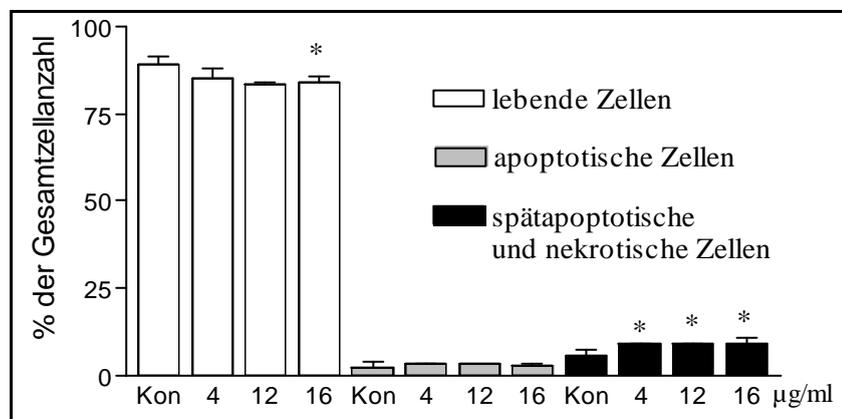


Abbildung 68: Annexin-V/PI-Test, normale Keratinozyten 24 h mit 4, 12 und 16 µg×ml⁻¹ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P<0,05, Dunnett-Test

Eine Betrachtung dieser Fragestellung nach 72 h (Abbildung 69) zeigte ebenfalls einen geringen Einfluss der BA (2,5, 5, 10 µg×ml⁻¹) auf die Verschiebung der Zellanzahl innerhalb der einzelnen Zellpopulationen. Der Anteil der vitalen Zellen nahm ab 2,5 µg×ml⁻¹ BA um 15 % ab und der Anteil der nekrotischen und spätapoptotischen Zellen um ca. 5 % zu. Eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration auf 1,2 mM führte zu keiner Änderung des Apoptose-verhaltens und zu keiner Erhöhung der Toxizität der Betulin-säure.

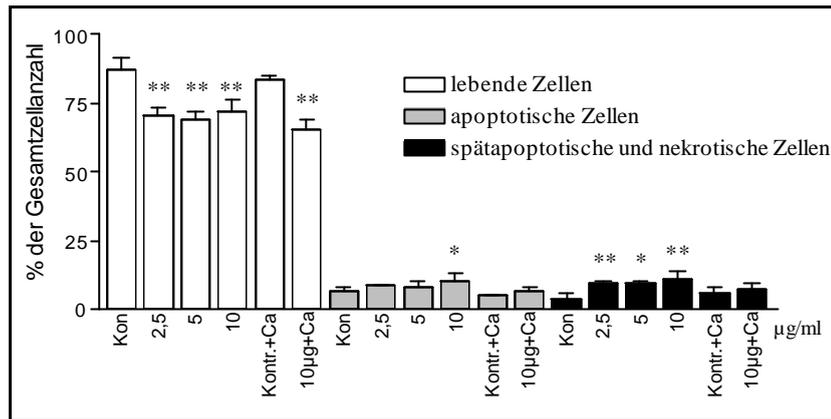


Abbildung 69: Annexin-V/PI-Test, normale Keratinozyten in SFM 72 h mit 2,5, 5, 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, Ca^{2+} = 1,2 mM, n = 3, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test, t-Test

Die Untersuchung des mitochondrialen Apoptosemarkers APO2.7 am Durchflusszytometer ergab 15 h nach Zugabe von 4, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA einen signifikanten Anstieg der APO2.7-positiven Zellen ab einer Konzentration von 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Zur Auswertung wurde ein Bereich APO2.7-positiver Zellen im Histogramm markiert und der Anstieg in diesem Gebiet in Prozent der Gesamtzellanzahl in der Abbildung 70 dargestellt.

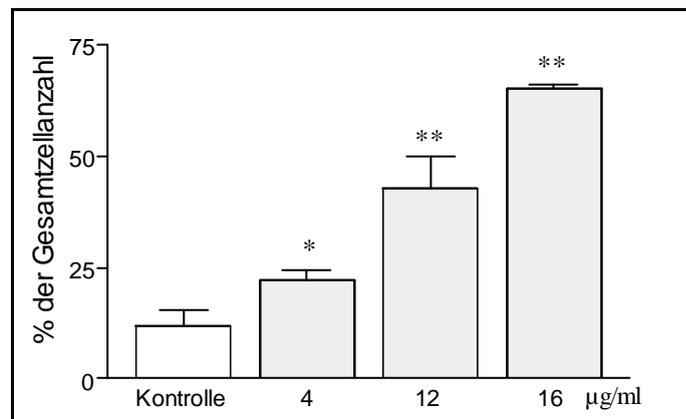


Abbildung 70: APO2.7-positive Zellen, normale Keratinozyten in SFM kultiviert 15 h nach Zugabe von 4, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test

Die Bestimmung der für die Apoptose typischen DNA-Fragmentierung wurde mit Hilfe der TUNEL-Methode für die BA-Konzentration 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ nach 24 und 48 h am Durchflusszytometer durchgeführt. In der Abbildung 71 ist ein Histogramm dargestellt. Deutlich ist hier nach 48 h eine TUNEL-positive Population der BA-behandelten Zellen (blau) zu erkennen. Als Positivkontrolle (schwarz) diente eine mit 1 mg/ml DNase behandelte Lösungsmittelkontrolle (0,05 % DMSO) (rot). Der Anteil der TUNEL-positiven Zellen an der Gesamtzellanzahl ist in Abbildung 71 (rechte Darstellung) veranschaulicht und betrug nach 24 h 40 % und nach 48 h 51 %.

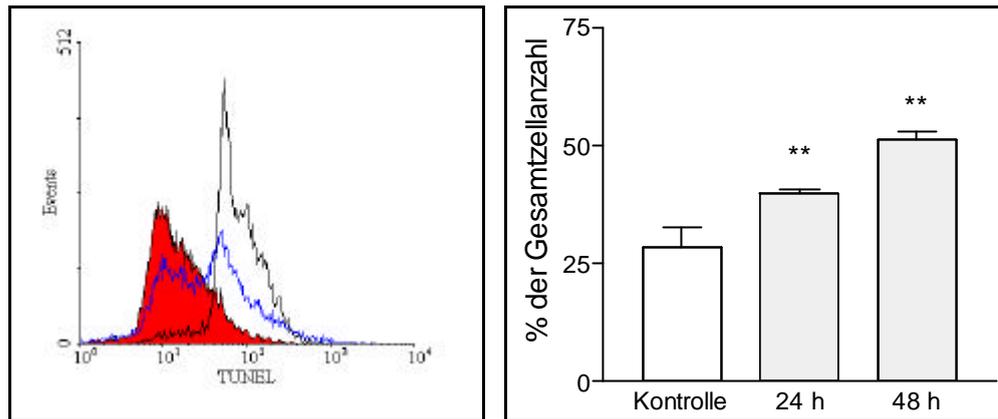


Abbildung 71: linke Darstellung: Histogramm DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, normale Keratinozyten in SFM 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Positivkontrolle (schwarz): DNase 10 min $1 \text{ mg}\times\text{ml}^{-1}$, rechte Darstellung: TUNEL-positive Zellen normale Keratinozyten 24 und 48 h mit $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P<0,01, Dunnett-Test

Die Untersuchungen zur Regulierung der Apoptose durch das Protein p53 erfolgten an NHEK mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Westernblotmethode. Zur Analyse am Durchflusszytometer erwiesen sich NHEK als ungeeignet, da das wenig exprimierte Protein nur schwer nachweisbar war, d.h. die Unterschiede zur Isotypkontrolle waren gering. Nach 20 h und $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA konnte kein Anstieg des p53-Gehaltes in den Zellen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis des Proteins p53 mit der Westernblotmethode erfolgt nach 4, 7 und 14 h für eine Konzentration von $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (Abbildung 72), weiterhin für die BA-Konzentrationen 1, 2, 4, 8 und $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nach 9,5 (Abbildung 73) und 56 h (Abbildung 74). Es wurden 100 µg Protein aufgetragen. Durch eine Färbung der Membran mit 2 % Ponceau-Rot wurde die Auftragung gleicher Proteinmengen überprüft. In keiner der Bestimmungen konnte eine Akkumulation des p53-Proteins detektiert werden.



Abbildung 72: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot, 4, 7 und 17 h nach $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-Zugabe, Proteinmenge 100 µg, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO

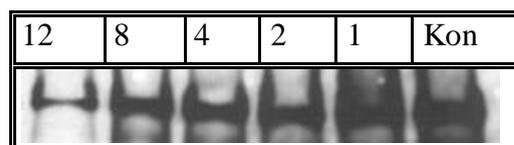


Abbildung 73: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot nach 9,5 h für 1, 2, 4, 8 und $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge 100 µg, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO

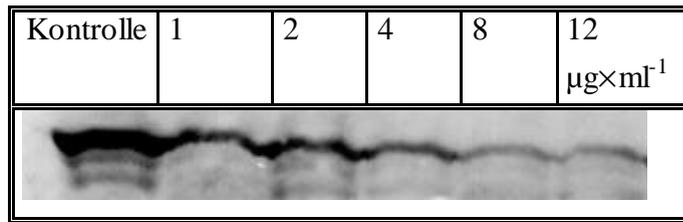


Abbildung 74: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot nach 56 h für 1, 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge 100 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO

4.4.2.4. Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten

Zur Untersuchungen der Differenzierung normaler humaner Keratinozyten wurde als früher Differenzierungsmarker Involucrin und als später Marker der Filaggringehalt der Zellen ermittelt. Für den Nachweis des Involucrins mit der Westernblot-Methode wurden 3-4 Tage alte, 40-50 % konfluente Kulturen verwendet. Der Westernblot (Abbildung 75) zeigte deutlich eine Zunahme der Schwärzung des Röntgenfilms ab einem Zeitpunkt von 12 h. Die Zellen wurden hierfür mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA für 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h behandelt. Nach einer Proteinbestimmung wurde 4 μg Protein aufgetragen. Durch eine Färbung der Membran mit 2 % Ponceau-Rot wurde die Auftragung gleicher Proteinmengen überprüft.

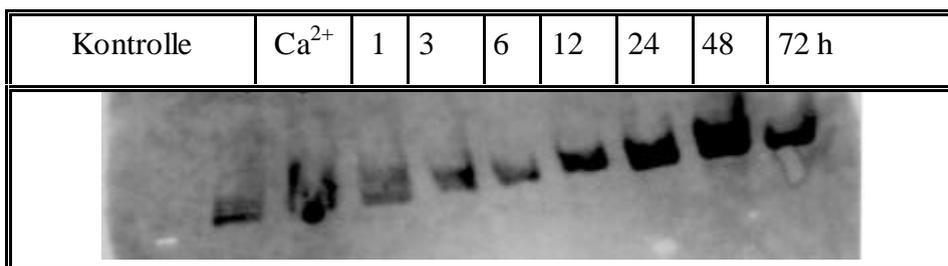


Abbildung 75: Involucrin-Bestimmung, Westernblot: normale Keratinozyten in SFM bei 40-50 % Konfluenz, mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h behandelt. Kontrolle 0,05 % DMSO, Positivkontrolle: Ca^{2+} 2,5 mM 24 h, Zellen wurden zum gleichen Zeitpunkt mit Lysispuffer abgelöst. aufgetragene Proteinmenge 4 μg

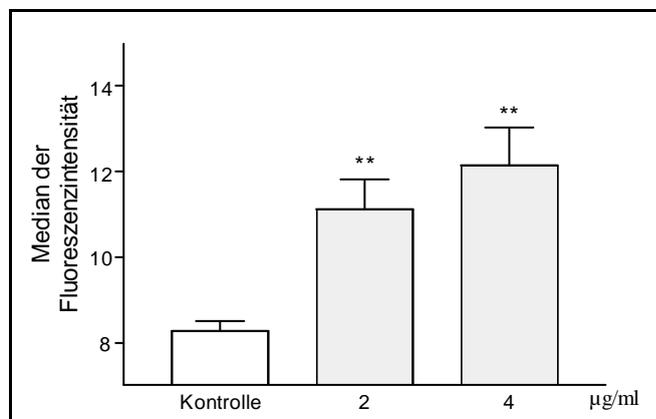


Abbildung 76: Involucrin-Bestimmung am Durchflusszytometer, normale Keratinozyten in SFM bei 70% Konfluenz 18 h mit 2 und 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test

Die Bestimmung der Involucrin-Expression erfolgte weiterhin am Durchflusszytometer nach 18, 24 und 48 h mit 70 % konfluenten Zellen. Zur Auswertung wurde der Median der Fluoreszenzintensität herangezogen. 18 h nach Behandlung der NHEK mit $2 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA wurde der Median der Fluoreszenzintensität um 35 % erhöht. Eine Zugabe der doppelten Menge Betulinsäure führte zu einem Anstieg des Medians der Fluoreszenzintensität um 48 % (Abbildung 76). Für die Konzentrationen 4, 8 und $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Betulinsäure nach 24 h war eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten der behandelten Zellen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erkennbar. In der Abbildung 77 (linke Darstellung) ist ein Histogramm der Involucrin-Messung dargestellt. Die mit BA-behandelten Zellen ($8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) (blau) zeigten eine deutliche Verschiebung der Population gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (0,05 % DMSO) (rot) in Bereiche höherer Fluoreszenzintensitäten. Zur Quantifizierung dieses Ereignisses wurde eine Dreifachbestimmung mit den genannten Konzentrationen nach 24 h durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 77 (rechte Darstellung) aufgezeigt. Ab $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ kam es zu einer Verschiebung des Medians der Fluoreszenzintensität um 150 %. Nach 48 h Behandlung mit 4, 8, $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ Betulinsäure betrug die Verschiebung 200 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Auf Grund der zunehmenden Konfluenz ist auch zu diesem Zeitpunkt in der Kontrolle eine deutliche Erhöhung der Involucrin-positiven Zellen zu beobachten.

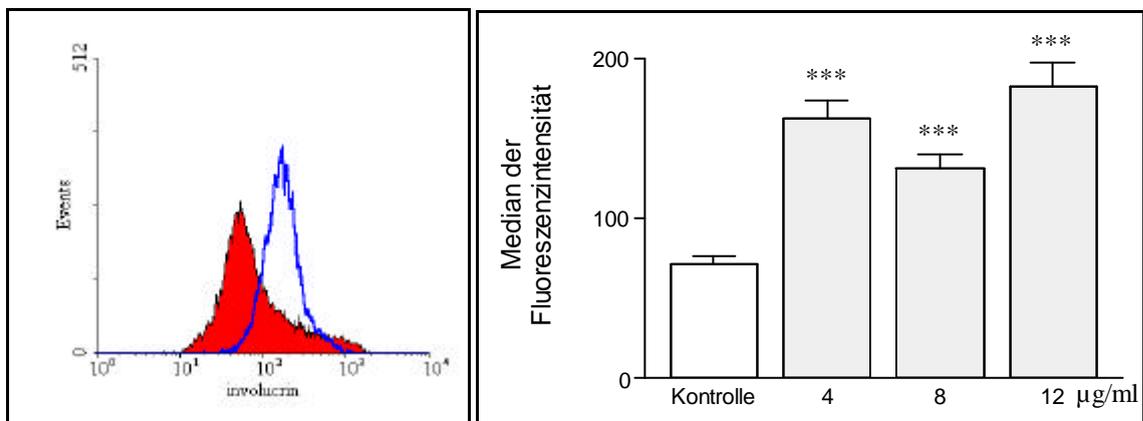


Abbildung 77: linke Darstellung: Histogramm Involucrin-Bestimmung nach 24 h, Kontrolle (rot) DMSO 0,05 %, blau $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, rechte Darstellung: Involucrin-positive normale Keratinozyten bei 70 % Konfluenz 24 h mit 4, 8 und $12 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, $n = 3$, *** $P < 0,001$, Dunnett-Test

Als später Differenzierungsmarker wurde Filaggrin, Hauptbestandteil der Keratohyalin granula, am Durchflusszytometer bestimmt. Als Positivkontrolle für die Induktion der Differenzierung wurde eine Erhöhung der Calciumkonzentration des Kulturmediums von 0,09 auf $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$ gewählt und mit einer Betulinsäurekonzentration von $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ verglichen. Die Abbildung 78 stellt ein Histogramm der Filaggrinbestimmung nach 44 h dar. Sowohl die mit Betulinsäure behandelten Zellen, als auch die unter erhöhtem Ca^{2+} kultivierten Keratinozyten zeigten eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten, die etwa im gleichen Fluoreszenzbereich lag. Eine Verifizierung des Versuches mit $n = 3$

(Abbildung 78) erbrachte eine signifikante Erhöhung der Filaggrin positiven Zellen von 21 % der Gesamtzellanzahl auf 78 % bei Zugabe von Betulinsäure und auf 72 % bei einer Behandlung mit 2,5 mM Ca^{2+} . Eine gemeinsame Inkubation der Zellen mit Ca^{2+} und BA erbrachte keine weitere Zunahme Filaggrin positiver Zellen.

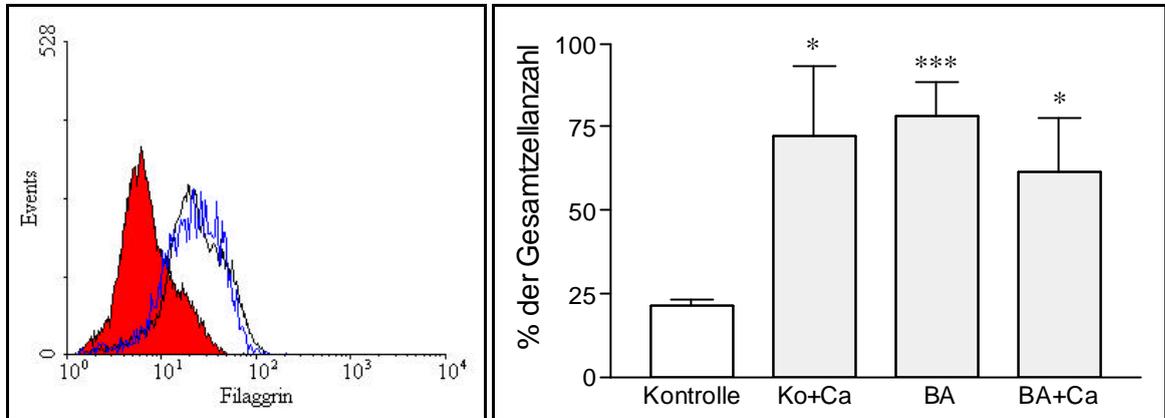


Abbildung 78: linke Darstellung: Histogramm Filaggrin-Bestimmung nach 44 h, native Keratinozyten in SFM, Kontrolle (rot): 0,05 % DMSO, Positivkontrolle (schwarz): 2,5 mM Ca^{2+} , BA 8 $\mu\text{g/ml}$ (blau)
rechte Darstellung: Filaggrin Bestimmung, normale Keratinozyten, Kontrolle 0,05 % DMSO, Kon+Ca = Positivkontrolle 0,05 % DMSO + 2,5 mM Ca^{2+} ; BA: 8 $\mu\text{g/ml}$, BA + Ca 2,5 mM Ca^{2+} + 8 $\mu\text{g/ml}$ BA, n = 3, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, t-Test

Zur Betrachtung der Filaggrin-Exprimierung zu einem früheren Zeitpunkt wurden die Zellen mit 4, 8 und 12 $\mu\text{g/ml}$ BA für 24 h behandelt. Die Erhöhung des Medians der Fluoreszenzintensitäten betrug 75 % nach Behandlung mit 8 $\mu\text{g/ml}$ BA (Abbildung 79).

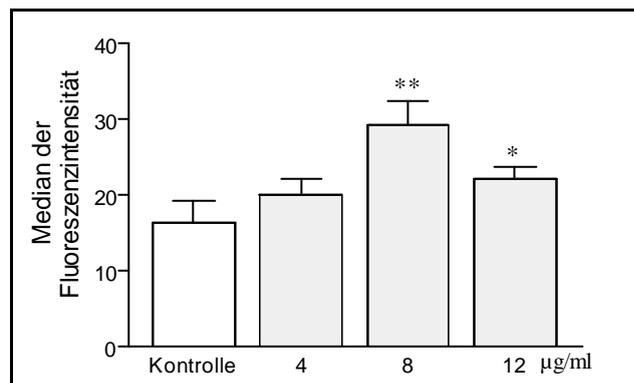


Abbildung 79: Filaggrin-Bestimmung, normale Keratinozyten in SFM 24 h nach Zugabe von 4, 8 und 12 $\mu\text{g/ml}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Dunnett-Test

4.4.3. Zusammenfassung

Toxische Effekte und Auslösung der Apoptose durch BA konnten auch an Keratinozyten nachgewiesen werden. Als Modell für den proliferierenden Keratinozyten diente die permanente Zelllinie HaCaT. Durch Untersuchungen ihres Proliferations- und Apoptoseverhaltens konnte bewiesen werden, dass BA in dieser Zelllinie toxische Effekte auslöst.

Als weiteres Modell für Keratinozyten mit unverändertem Apoptose- und Differenzierungsverhalten dienten normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK). An diesen Zellen wurden ebenfalls toxische Effekte und eine Auslösung der Apoptose durch BA beobachtet. Außerdem konnte eine Induktion der Differenzierung durch BA nachgewiesen werden.

Dabei waren im Verhalten der HaCaT-Zellen und der normalen humanen Keratinozyten auf BA-Einwirkungen Unterschiede im Proliferationsverhalten nachweisbar. Diese Unterschiede waren vor allen Dingen in den Untersuchungen des Zellzyklus detektierbar und weniger in der Zellanzahlbestimmung in 96er MTP (HaCaT: 72 h $ED_{50} = 5 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$; NHEK: 60 h $ED_{50} = 8,5$). Bei den normalen Keratinozyten war eine starke Abnahme der Zellanzahl in der G_0/G_1 -Phase und eine Zunahme in der G_2/M -Phase zu beobachten, wohingegen bei HaCaT-Zellen keine Veränderungen in den prozentualen Zellanteilen in den einzelnen Zellzyklusphasen gemessen werden konnten.

Aus den Apoptoseuntersuchungen ergaben sich folgende Unterschiede. Die normalen Zellen reagierten nicht im Annexin-V/PI-Test. Es kam weder zu einer Phosphatidylserinumlagerung noch zu einem Verlust der Membranintegrität. Selbst 72 h nach Zugabe von $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA kam es nur zu einer Zunahme der spätapoptotischen und nekrotischen Zellen um 5 Prozentpunkte auf 10 % der Gesamtzellanzahl, wohingegen HaCaT-Zellen schon früher und deutlicher reagierten. Nach 72 h Inkubation mit $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA kam es zu einem Anstieg der spätapoptotischen und nekrotischen Zellen auf 56 % der Gesamtzellanzahl.

Der Nachweis der Apoptose mit dem APO2.7-Antikörper nach 15 h zeigte bei beiden Zellarten einen signifikanten Anstieg der APO2.7-positiven Zellen (NHEK ab $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, $P < 0,05$, HaCaT ab $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, $P < 0,01$).

Die Fragmentierung der DNA wurde am Durchflusszytometer mit der TUNEL-Methode bestimmt. In beiden Zellkulturen konnte eine Fragmentierung der DNA nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnten die typischen apoptotischen Kerne mit kondensiertem Chromatin beobachtet werden (HaCaT: Abbildung 80, NHEK: Abbildung 81).

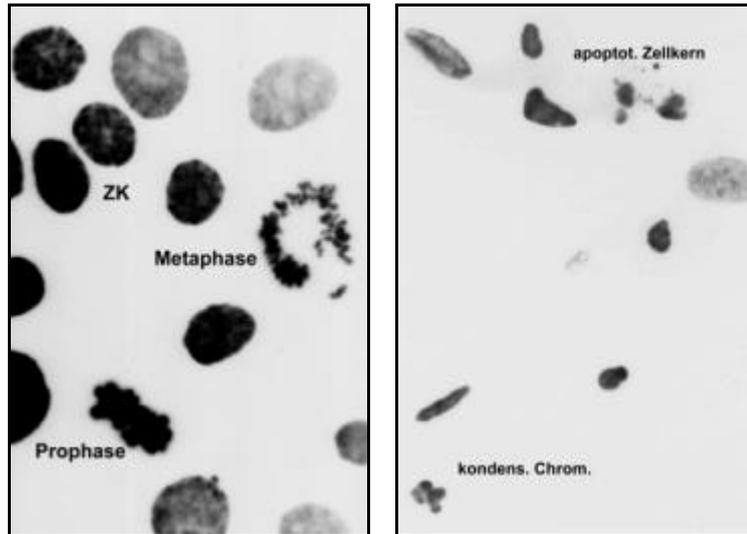


Abbildung 80: HaCaT-Keratinocyten in SFM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, Invertierte Darstellung, *linkes Foto*: Kontrolle DMSO 0,05 %, *rechtes Foto*: HaCaT-Zellen 48 h nach Inkubation mit $8 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, Apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern, kondens. Chrom. = kondensiertes Chromatin

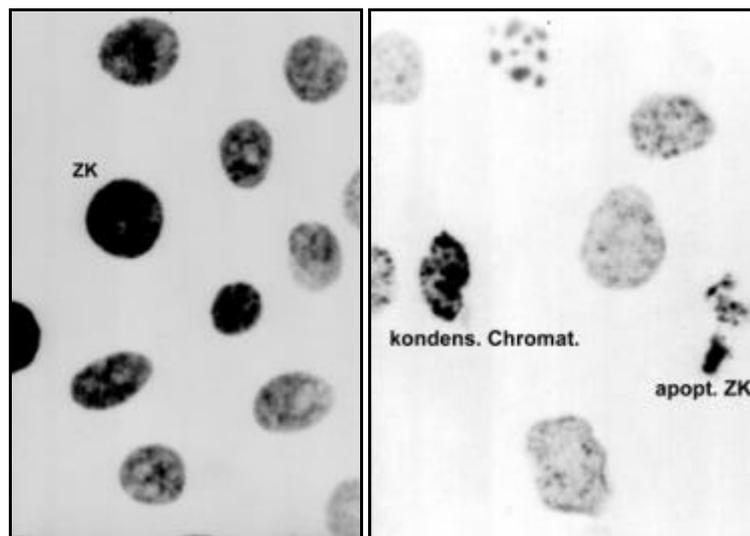


Abbildung 81: NHEK in SFM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, Invertierte Darstellung, *linkes Foto*: Kontrolle DMSO 0,05 % *rechtes Foto*: NHEK Zellen 48 h nach Inkubation mit $8 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, Apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern, kondens. Chromat. = kondensiertes Chromatin

Eine Form der Keratinocytenapoptose ist die Auslösung der Differenzierung und Umwandlung des Keratinocyten im Stratum basale zum Corneocyten des Stratum corneum. Neben dem negativen Annexin-V/PI-Test machten die mikroskopischen Betrachtungen der morphologischen Änderungen der Zelle Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten sinnvoll. In den folgenden Fotos sind die Unterschiede zwischen HaCaT-Keratinocyten und normalen Keratinocyten aufgezeigt.

Die HaCaT-Zellen lösen sich nach BA-Zugabe ab. Wie in der Abbildung 82 zu erkennen haftete nach 24 h und $4 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA nur ein geringer Teil der Zellen am Boden des Kultur-

gefäßes, im Zellüberstand ist eine starke Zunahme apoptotischer Zellen nachzuweisen. Anders reagiert dagegen die NHEK. Die konfluenten Zellen verloren ihre Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 83), Einlagerungen in der Zelle wurden sichtbar und die Konturen des Kerns verschwanden (Abbildung 84). Das für eine Apoptose typische Abschnüren apoptotischer Partikel konnte nicht beobachtet werden. Aus dem Erscheinungsbild der Kontrolle als ein fast homogener konfluenter Zellrasen wurde eine inhomogene Zellfläche, in der Abgrenzungen einzelner Zellen kaum noch zu erkennen waren (Abbildung 84).

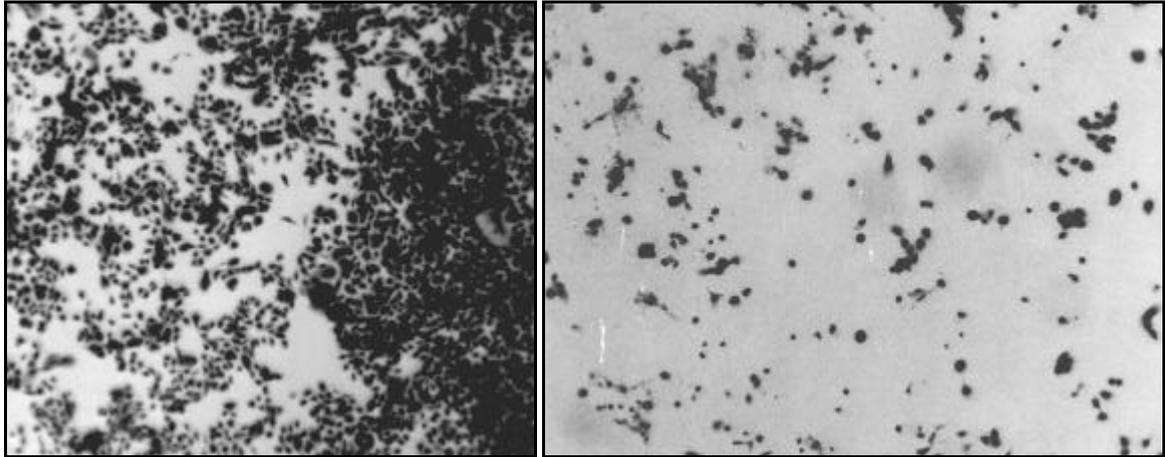


Abbildung 82: *linkes Foto*: HaCaT-Keratinocyten in SFM Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, *rechtes Foto*: HaCaT-Keratinocyten 24 h mit $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, deutliche Zellanzahlabnahme gegenüber der Kontrolle erkennbar

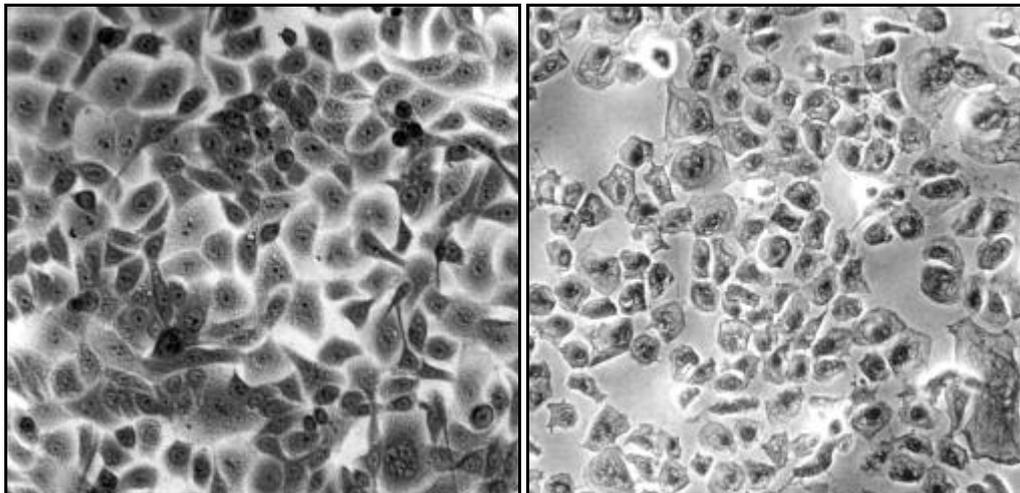


Abbildung 83: *linkes Foto* Kontrolle normale Keratinocyten in SFM, Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,05 %, *rechtes Foto*: normale NHEK 36 h mit $20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt

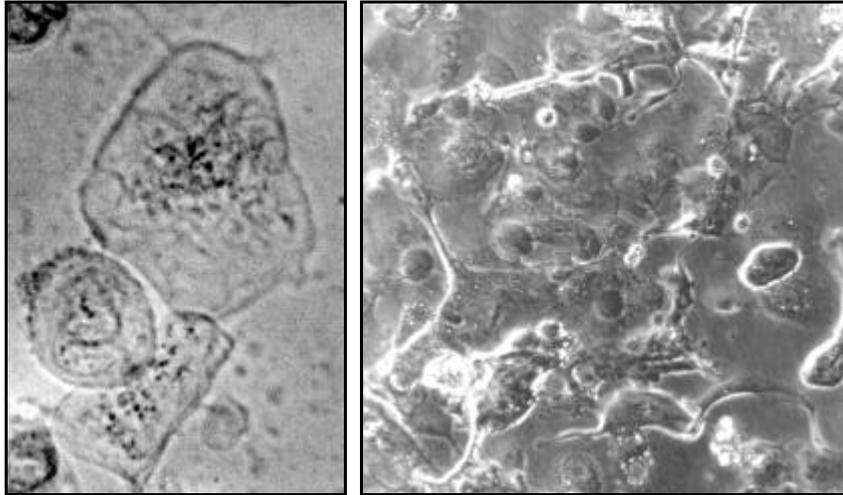


Abbildung 84: *linkes Foto*: NHEK- Zellen in SFM, 36 h mit $16 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Einlagerungen sind zu erkennen aber nicht mehr die Struktur des Zellkerns, *rechtes Foto*: NHEK in SFM, 72 h mit $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, einzelne Zellen sind kaum noch unterscheidbar.

Der Nachweis, dass bei diesen morphologischen Veränderungen der NHEK eine Differenzierung stattfand, wurde durch Bestimmung der beiden Proteine Involucrin und Filaggrin geführt. Eine Erhöhung der Involucrinmenge konnte dabei sowohl am Durchflusszytometer (18 h, $2 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) als auch durch Westernblot (12 h, $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$) ermittelt werden. Der späte Differenzierungsmarker Filaggrin wurde flowzytometrisch nach 44 h bestimmt. Als Positivkontrolle diente $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$. Es konnte eine signifikante Erhöhung ($P < 0,001$) der Filaggrin-positiven Zellen nach Zugabe von $8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nachgewiesen werden.

An HaCaT-Zellen wurde ebenfalls untersucht, ob durch BA eine Induktion der Involucrin- und Filaggrinbildung erfolgte. Es konnten nach 24 und 48 h keine Veränderungen in der Expressierung dieser Proteine gefunden werden.

Eine Auslösung der Apoptose durch BA und eine Veränderung im Proliferationsverhalten konnte sowohl in der HaCaT-Zelllinie als auch in NHEK-Zellen beobachtet werden. Eine Induktion der Differenzierung und die damit einhergehende Bildung von Filaggrin und Involucrin wurde aber nur bei normalen humanen Keratinozyten festgestellt.

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit sind Forschungsergebnisse zum Naturstoff Betulinsäure von der Isolierung bis zur Untersuchung an biologischen Systemen dargestellt. Die im Kap 3.4 beschriebene Isolierungsmethode war Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Die Methode zeichnet sich durch eine preiswerte und umweltfreundliche Herstellungsweise aus, mit der die notwendige Betulinsäuremenge bereitgestellt werden konnte. Durch verschiedene analytische Methoden konnte die Identität und Reinheit der isolierten BA bewiesen werden. Vorteile dieser Isolierungsmethode, die auf einer Extraktion mit Dichlormethan und Umkristallisation in Methanol beruht, liegen in der leichten Zugänglichkeit der Platanenborke, in den einfachen und selektiven Extraktions- und Umkristallisationsschritten und in der Möglichkeit der Rückgewinnung der verwendeten Lösungsmittel. Mit den entwickelten GC- und TLC-Methoden zur Identitäts- und Reinheitsbestimmung konnten weiterhin verschiedene Rindendrogen auf Betulinsäure untersucht werden und die Platanenborke als der wichtigste BA-Lieferant identifiziert werden (Galgon, 1997). Die quantitative GC-Methode kann weiterhin für Untersuchungen von BA-Serumspiegeln und Konzentrationen des Naturstoffes in Geweben herangezogen werden.

Im Folgenden soll nun das Potenzial der Betulinsäure zur Behandlung des malignen Melanoms diskutiert werden. Hierzu dienen die Ergebnisse der Untersuchungen an Melanomzellen, normalen Melanozyten und Keratinozyten. Die im Kapitel 4 dargestellten und zusammengefassten Resultate zeigen eindeutig eine toxische Wirkung der BA auf die verwendeten epidermalen Zellsysteme im untersuchten Konzentrationsbereich von 0-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.

Durch den Einfluss der BA trat sowohl in Melanozyten- als auch in Keratinozyten-Zellkulturen eine starke Hemmung der Proliferation auf. Die Experimente zur Bestimmung der Zellanzahl in 96er MTP belegen für alle Zellsysteme eine halbmaximale effektive Dosis im Bereich 2-8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA nach 60-72 h, wobei in diesem Test die normalen Zellen am geringsten reagierten. Verglichen mit Konzentrationsangaben in der Literatur ist das der Bereich, in dem nicht nur in Melanomzellen und Melanozyten eine toxische Wirkung erreicht wurde, sondern auch in neuroektodermalen Tumorzellkulturen, wie z.B. Medulloblastom und Neuroblastom (Pisha et al., 1995, Schmidt et al., 1997, Fulda et al., 1997, 1999 a, b, Rieber et al., 1998, Kim et al., 1998, Wick et al., 1999, Selzer et al., 2000). Untersuchungen zur toxischen Wirkung der BA auf Keratinozyten-Zellkulturen sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Konzentrationen unter 20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA liegen in dem Konzentrationsbereich, dem von Pisha et al. (1995) eine Spezifität der BA auf Melanomzellen zugeschrieben wird. Höhere BA-Mengen lassen sich auch nur sehr schwer im Medium lösen, so dass diese Konzentration auch eine obere Grenze darstellt.

In die Betrachtung, ob die Unterschiede der ED₅₀-Werte der einzelnen Zellkulturen relevant und signifikant sind, müssen weiterhin Abhängigkeiten der Wirkung der BA von den Zellkulturmedien, dem pH-Wert und der Konfluenz der Zellen mit einbezogen werden.

In verschiedenen Zellkulturmedien zeigten die Zellen ein unterschiedliches Ansprechen auf BA. So konnte im Kap 4.2.1 anhand der Melanomzelllinie IGR1 gezeigt werden, dass in den Medien MEM und DMEM unterschiedliche ED₅₀-Werte auftraten, die entweder auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen der Zellen oder auf einen Bestandteil der komplexen Medien zurückzuführen ist.

Die Wirkung der BA ändert sich, wie von Noda et al. (1997) beschrieben, pH-Wert-abhängig. Bei niedrigem pH-Wert des Kulturmediums wurde hier eine erhöhte Toxizität beobachtet, was vermutlich auf eine Erhöhung der Lipophilie der BA zurückzuführen ist, die eine bessere Penetration durch die Zytoplasmamembran erlauben würde. Diese Ergebnisse konnten durch Modulationen des pH-Wertes mit Hilfe des CO₂-Gehaltes der Luft und Zugabe von NaOH nicht bestätigt werden. Weiterhin wurden Unterschiede in der Toxizität der BA in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellkulturen beobachtet (auch mündliche Bestätigung durch Selzer). Aus diesen Gründen muss man mit den Autoren in Pisha et al. (1995) übereinstimmen und das Maß für eine Spezifität der BA bei einer ED₅₀ unter 20 µg×ml⁻¹ legen. Die ermittelten ED₅₀-Werte der Zellanzahlbestimmungen sind nicht als unterschiedlich zu bewerten.

Die Untersuchungen von Selzer et al. (2000) zeigten dagegen eine weniger starke Abnahme der Zellanzahl der NHEM gegenüber den verwendeten Melanomzelllinien. Diese Ergebnisse konnten nicht bestätigt werden.

In den weiteren Versuchen sollte der Grund des Proliferationsrückganges geklärt werden. Einer Verringerung der Zellanzahl gegenüber der Lösungsmittelkontrolle können Änderungen im Zellzyklus, nekrotische oder apoptotische Prozesse zu Grunde liegen.

Änderungen im Proliferationsverhalten der Zellen können mit der sehr empfindlichen quantitativen Bestimmung des BrdU-Einbaus in die DNA der Zellen erfasst werden, der während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet. Alle Zellen zeigten 20 h nach Zugabe der BA ein sensitives Ansprechen in diesem Testsystem. Dabei reagierten vor allem Keratinozyten sensibel im Proliferationsverhalten auf eine Inkubation mit BA ab einer Konzentration von 0,03 µg×ml⁻¹. Dieser Befund bedeutet, dass sich entweder weniger Zellen in der S-Phase befinden oder aber dieser Abschnitt der Zellteilung langsamer durchlaufen wird.

Eine Untersuchung des Zellzyklus der behandelten Zellen zeigte deutliche Unterschiede zwischen dem Verhalten der NHEK gegenüber den permanenten Zelllinien. Mit BA behandelte Zellen der maligne entarteten Zelllinie IGR1 reagierten nur mit leichten Veränderungen im Zellzyklus. Die permanente Keratinozytenzelllinie HaCaT zeigte keine Änderungen nach Inkubation mit BA im Zellzyklusverhalten der behandelten Zellen. In den mit BA-behandelten Zellkulturgefäßen konnte bei NHEK aber eine deutliche Abnahme der Anzahl der Zellen in der G₀/G₁- und ein Anstieg der Zellanzahl in der G₂/M- Phase gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Diese deutlichen Verschiebungen der einzelnen Zellpopulationen, die nur bei den normalen Keratinozyten aufgezeigt werden konnten,

machen deutlich, dass hier neben toxischen Effekten noch weitere regulatorische Mechanismen stattfinden. Ob die Zellen nur aus der G₀/G₁-Phase in die Apoptose gingen und dadurch das Verhältnis zugunsten der G₂/M-Population verschoben wurde, konnte nicht festgestellt werden. Ein langsames Durchlaufen der S-Phase und Arretierung der Zellen am S-G₂/M-Checkpoint des Zellzyklus und Übergang an dieser Stelle in eine Apoptose kann gleichsam angenommen werden. Ein vollständiger Arrest der Zellen in einer Zellzyklusphase, wie er beispielsweise durch Einwirkung von Gammastrahlen (Bache et al., 1997) induziert werden kann, fand nicht statt.

Weitere Veränderungen im DNA-Gehalt der Zellen konnten ebenfalls bei den Zellzyklusmessungen am Durchflusszytometer detektiert werden. So kam es nach 16 h und 6 µg×ml⁻¹ BA zum Auftreten des sogenannten Apoptosepeaks (Ap) vor dem G₀/G₁-Peak als ein Zeichen für das Vorliegen apoptotischer Prozesse.

Die Änderungen im Proliferationsverhalten, die mit einer starken Verringerung der Zellanzahl einhergingen, konnten mit den Untersuchungen zum Zellzyklus und BrdU-Einbau nicht vollständig geklärt werden. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod durchgeführt. Zur Bestimmung nekrotischer Schädigungen der Zellen wurde die LDH-Aktivität im Zellüberstand der einzelnen Zellpopulationen ermittelt und mit der Lösungsmittelkontrolle und einer Positivkontrolle verglichen. Die Lactatdehydrogenasefreisetzung in den Zellüberstand wird mit nekrotischen Prozessen, die mit einer Zerstörung der Zellmembran und Freisetzung des Zytosols einhergehen, in Verbindung gebracht. Die Zellen zeigten nach 7 h einen Anstieg der LDH-Aktivität ab 10 (IGR1) und 20 µg×ml⁻¹ BA (Keratinozyten). Nach 24 h konnte eine erhöhte LDH-Aktivität ab 5 µg×ml⁻¹ BA in Keratinozytenzelllinien gemessen werden. Nach 7 h wurde maximal ein Drittel der Freisetzung der Positivkontrolle erreicht, die gleichzeitig den Maximalwert der LDH-Aktivität darstellt. Es kann geschlussfolgert werden, dass nekrotische Prozesse in IGR1, HaCaT und NHEK eine untergeordnete Rolle spielten. Ausschlaggebend für diese Beurteilung ist der 7 h-Wert. Von einigen Autoren wird die LDH-Aktivität schon nach 0-20 min bestimmt (Seeger et al., 1986). Toxische Stoffe, die eine Nekrose hervorrufen, wirken schnell über eine Zerstörung der Zellmembran, so dass angenommen werden muss, dass nach 7 h Stunden bei membranschädigenden Stoffen eine deutliche Reaktion hervorgerufen werden würde, was nach Betulinsäurezugabe im Bereich 0-20 µg×ml⁻¹ nicht der Fall war.

Eine Ausnahme bildeten die normalen Melanozyten. Hier kam es nach 7 h zu einem signifikanten Anstieg (P < 0,01) der LDH-Aktivität ab 0,625 µg×ml⁻¹ BA. Dabei erhöhte sich die LDH-Aktivität auf 350 % (20 µg×ml⁻¹ BA) versus 400 % der Tween[®] 20 Positivkontrolle. Diese erhöhte Sensitivität schlägt sich aber nicht in einer verstärkten Abnahme der Lebendzellanzahl gegenüber den IGR1-Melanomzellen nieder, so dass hier angenommen werden kann, dass nicht nur nekrotische Prozesse bei der Wirkung der Betulinsäure eine Rolle spielen müssen. Ursachen dieser starken Reaktion könnten in der schnellen Zerstörung der Dendriten durch Abschnürung membranumschlossener Partikel liegen, die dann

ihre Membranintegrität verlieren. Eine Untersuchung der LDH-Freisetzung durch BA ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Neben den Untersuchungen zum Proliferationsverhalten und zu nekrotischen Einflüssen der BA war das Hauptziel, die Auslösung der Apoptose an Melanomzellen zu bestätigen, und die Spezifität der BA an Kulturen von normale Melanozyten und Keratinozyten zu untersuchen. Für den Nachweis des programmierten Zelltodes wurden durchflusszytometrische Methoden und die Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes wurde untersucht, ob eine Chromatinkondensation und Zerstörung der Zellkerne stattfand. Das Verfahren wurde nicht zur quantitativen Bestimmung apoptotischer Veränderungen am Zellkern genutzt. Es konnten in allen Zellen die typischen apoptotischen Kerne nach 48 h gefunden werden.

Folgende Apoptoseparameter wurden durchflußzytometrisch bestimmt:

- Phosphatidylserinumlagerung und Membranintegrität mit dem Annexin-V/PI-Test
- der Nachweis eines, bei apoptotische Prozessen an den Mitochondrien exprimierten Proteins, mit dem Antikörper APO2.7
- der Nachweis von DNA-Strangbrüchen mit der TUNEL-Methode

Diese Parameter wurden in allen Zellsystemen bestimmt und können somit untereinander verglichen werden. Bei einer simultanen Bestimmung apoptotischer Zellen mit allen drei Methoden an HaCaT-Zellen zeigte der Annexin-Test das empfindlichste Ansprechen auf BA (Galgon et al., 2000 b). Mit Hilfe dieses Tests konnten apoptotische und spätapoptotisch-nekrotische Ereignisse erfasst werden. APO2.7 als sensitiver Nachweis von apoptotischen Zellen diente zur Quantifizierung der apoptotischen Ereignisse. Die TUNEL-Methode wurde hauptsächlich zur Bestätigung einer BA-induzierten Apoptose genutzt.

Der Nachweis des geregelten Zelltodes durch Annexin-V/PI zeigte nicht in allen Zellsystemen die gleiche Sensitivität. Unterschiede traten zum einen zwischen NHEM, die nach 24 h zum größten Teil vitale und apoptotische Zellen aufwiesen, und IGR1-Zellen auf, die zu diesem Zeitpunkt vor allem eine spätapoptotische und nekrotische Reaktion zeigten. Ursachen für diese Unterschiede sind nicht bekannt. Es kann vermutet werden, dass die apoptotischen Prozesse in den normalen Melanozyten langsamer ablaufen. Der starke Anstieg der LDH-Aktivität konnte im Annexin-V/PI nicht durch vermehrte spätapoptotische und nekrotische Zellen nachgewiesen werden. Nach 24 h waren kaum PI-positive Zellen (spätapoptotische und nekrotische Zellen) detektierbar. Hierin könnte eine Bestätigung der Theorie liegen, dass für den starken Anstieg der LDH-Aktivität weniger eine nekrotische Schädigung des kompakten Zellkörpers verantwortlich ist, sondern eher in einer schnellen Zerstörung der Dendriten die Ursache zu suchen ist. Die deutlichen Reaktionen der NHEM und IGR1-Zellen im Annexin-V/PI-Test stehen im starken Widerspruch zu Seelzer et al. (2000). Hier wurde ein nichtsignifikanter Anstieg bei NHEM und ein leichter Anstieg der apoptotischen Zellen nach 24 h und $10 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA am Fluoreszenzmikroskop gemessen. Ob die Ursache darin zu suchen ist, dass nur adhärente Zellen verwendet wurden, konnte aus der Methodenbeschreibung des Artikels nicht entnommen werden.

Eine völlig andere Reaktion der apoptotischen Zellen wiesen aber normale Keratinozyten auf, die zu einem sehr geringen Maß mit einer Phosphatidylserinumlagerung und Verlust der Membranintegrität reagierten. Selbst nach 72 h und Inkubation mit $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA kam es bei den NHEK nur zu einer Abnahme der vitalen Zellen um 15 Prozent, wobei zu diesem Zeitpunkt die Zellanzahl auf 50 Prozent gesunken war und schon nach 15 h deutliche apoptotische Reaktionen mit dem APO2.7-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Eine Hemmung der Phosphatidylserinumlagerung bei apoptotischen Prozessen ist unter anderem für UV-bedingte Apoptoseprozesse in verschiedenen Zellkulturen beschrieben worden (Bratton et al., 1997). Die Ursache dafür liegt in einer Hemmung des Phosphatidylserin-Flip-Flops. Der Phosphatidylserin-Transport ist abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration und für die Translokation des Phosphatidylserins in die äußere Membran verantwortlich. Die Untersuchungen der BA-induzierten Apoptose mit dem Annexin-V/PI-Test wurden in einem Kulturmedium mit einem sehr niedrigen Calciumgehalt (0,09 mM) durchgeführt. Gegen eine Ca^{2+} -Abhängigkeit spricht aber, dass durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration des Zellkulturmediums auf 1,2 mM keine Erhöhung der Annexin-V-positiven Zellen beobachtet wurde. Das zweite Argument gegen die Involvement einer niedrigen extrazellulären Ca-Konzentration ist die Tatsache, dass in HaCaT-Zellen mit gleichem Ca^{2+} -Gehalt im Medium nach Behandlung mit identischen BAKonzentrationen eine deutliche Population Annexin-V-positiver Zellen entsteht. Weiterhin gelang der Nachweis von Phosphatidylserin mit dem Annexin-V/PI-Test in normalen Keratinozyten durch Permeabilisierung der Membran mit 0,2 % Tween[®] 20, so dass grundsätzlich von einer Zerstörung dieses Phospholipids durch BA nicht ausgegangen werden kann.

Mit dem APO2.7-Test am Durchflusszytometer konnten die Unterschiede, die im Annexin-V/PI-Test auftraten, nicht aufgezeigt werden. Alle Zellen reagierten deutlich auf diesen Antikörper. Nach 48 h Inkubation mit $5 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA zeigten alle Zellen einen signifikanten Anstieg ($P < 0,01$) der APO2.7-positiven Zellen. Mit diesem Test konnte sensitiv eine Apoptose in allen Hautzellkulturen nachgewiesen werden.

Der Nachweis der DNA-Fragmentierung als ein endgültiger Schritt der Apoptose erfolgte am Durchflusszytometer mit Hilfe der TUNEL-Methode. Bei allen Zellen konnte eine Fragmentierung nach 48 h nachgewiesen werden. Mit dieser Methode wurde bestätigt, dass apoptotische Mechanismen beim BA-induzierten Zelltod eine Rolle spielen.

Eine DNA-Fragmentierung im Agarosegel (Auftreten der DNA-Leiter) konnte nicht beobachtet werden. Diesen Nachweis der Apoptose konnte Selzer et al. (2000) bei BA an Melanomen ebenfalls nicht führen. Es ist nicht bekannt, ob die Ursache nur in technischen Probleme zu suchen ist, da auch Apoptosen mit DNA-Leiter-negativen und TUNEL-positiven Ereignissen beschrieben und diskutiert wurden (Gniadecki et al., 1998). Von Schmidt et al. (1997) wurde an Neuroblastomzellen eine DNA-Leiter (Gelelektrophorese) nachgewiesen. Eine Entstehung von apoptotischen DNA-Fragmenten durch BA dürfte demnach als gesichert gelten und der Nachweis der TUNEL-positiven Zellen deshalb auf eine BA-induzierte Fragmentierung der DNA zurückzuführen sein.

Eine Abnahme der DNA-Menge in den Kernen der IGR1-Zellen konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse durch das Auftreten des Ap-Peaks gezeigt werden. An Melanomzellen wurde dieser Sub-G₀/G₁-Peak bereits durch Pisha et al. (1995) und an neuroektodermalen Zellen durch Fulda et al. (1997) aufgezeigt.

Um den Signalweg der BA-induzierten Apoptose aufzuklären gibt es viele Ansätze. Es wurde untersucht, ob die von Fulda et al. (1998 a, b) und Wick et al. (1999) gezeigte Involvierung der Caspasen in Glioma-Zellen und isolierten Mitochondrien auch in normalen Melanozyten eine Rolle spielt. Durch Hemmung der Caspasen (1, 3, 4, 7) mit dem Proteaseninhibitor Z-VAD-FMK wurde versucht, die durch BA-ausgelöste Apoptose in NHEM aufzuheben (McColl et al., 1998, Fearnhead et al., 1995). Neben dem Rückgang der durch Caspasen vermittelten DNA-Fragmentierung konnte aber auch gezeigt werden, dass durch diesen Inhibitor im Annexin-V/PI-Test die Apoptose nicht aufgehoben werden konnte und dementsprechend keine Zunahme der vitalen Zellen erreicht wurde. Mit den durch Fulda et al. (1998 b) veröffentlichten Daten (Hemmung der Caspase 3 unterbindet eine DNA-Fragmentierung, aber nicht den Verlust des Membranpotenzials wie bei Doxorubicin) kann für die BA ein Apoptosemechanismus angenommen werden, der stark mit den Mitochondrien verbunden ist, was auch das gute Ansprechen des Antikörpers APO2.7 begründet. Weiterhin kann postuliert werden, dass an den Mitochondrien irreparable Schädigungen verursacht werden, da trotz einer Inhibierung der Downstream Caspase 3 sich die Überlebensrate der NHEM nicht erhöhte. Hierzu gehört auch die Cytochrom C-Freisetzung durch BA (Fulda et al., 1998 a).

Die Induktion der Apoptose durch BA erfolgte also an einem Punkt des Apoptoseweges, an dem die Entscheidung gegen eine Apoptose in der Zelle nicht mehr getroffen werden kann. Für den Wirkungsmechanismus der BA ergeben sich daraus zwei Aussagen. Zum einen führt BA nicht in erster Linie zu DNA-Strangbrüchen, da diese erst später und hemmbar durch Caspasen vermittelt geschehen. Zum anderen steht ein Caspase 3 abhängiger Apoptoseweg im Anschluss an einen BA-induzierten Signalweg, wie z.B. auch bei der durch Fas/FasL (Nagata, et al., 1995) oder Granzym B (Quan et al., 1996) vermittelten Signalkaskade.

Der Nachweis der Caspaseaktivität in Keratinozyten wurde mit dem Antikörper M30 geführt. Der Antikörper bindet an eine Schnittstelle im Zytokeratin 18, die durch Caspasen entsteht. An HaCaT-Keratinozyten konnte ein Anstieg der M30-positiven Zellen und damit Caspaseaktivität nachgewiesen werden.

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung des Signalweges war, die Abhängigkeit der Apoptose der Zellen vom Protein p53 zu untersuchen. Die Frage stellt sich aus zwei Gründen. Zum einen ist eine Chemotherapie der malignen Melanome abhängig vom p53-Status (Li et al., 1998) und zum anderen wird diese Fragestellung speziell für die BA kontrovers diskutiert (Rieber et al., 1998). Die Experimente wurden am Durchflusszytometer durchgeführt oder

der p53-Gehalt mit dem Westernblot bestimmt. Alle Untersuchungen zu einer möglichen Akkumulation des p53 zeigten deutlich, dass es nach BA-Gabe zu einer Abnahme dieses Proteins in der Zelle kommt. Der von Rieber et al. (1998) geführte Beweis, dass ein Anstieg des p53-Gehaltes nach 66 h und $1 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA in Melanomen erfolgte, konnte nicht nachvollzogen werden. Der größte Anstieg wurde von den Autoren in einer stark metastasierenden Zelllinie beschrieben. In Zellen mit einem geringen Metastasierungspotenzial wurde eine Verschiebung des Verhältnisses p53/p21 ermittelt (starker p53-Abfall und p21-Abfall unter die Nachweisgrenze führten zu einer Erhöhung des Verhältnisses zwischen p53 und p21). Der große Nachteil dieser gefundenen Daten in der stark metastasierenden Zelllinie liegt in der geringen Variationsbreite der gezeigten Daten (eine Zeit, eine Konzentration). Ein Artefakt ist demnach nicht auszuschließen. Für die Induktion der Apoptose wurde außerdem ein zu später Zeitpunkt gewählt. Eine Akkumulation des p53 ist ein früher und regulativer Schritt der Apoptoseinduktion und nicht nach 66 h zu erwarten (Liebermann et al., 1995).

In der metastasierenden Zelllinie IGR1 konnte keine Erhöhung des p53-Gehaltes festgestellt werden. Eine Untersuchung zum p53 und BA an Melanomen wurde ebenfalls von Selzer geführt. Eine Induktion der p53-Expression konnte hier ebenfalls nicht gezeigt werden. Fulda et al. (1997) beschrieben an neuroektodermalen Tumoren eine p53 unabhängige Induktion der Apoptose durch BA.

Weiterhin spricht gegen eine Involvierung des p53-Proteins in den durch BA-ausgelösten Apoptosemechanismen, dass in der permanenten Keratinozytenzellkultur HaCaT mit einer Überexprimierung des p53-Proteins und in normalen humanen Keratinozyten mit einem normalen p53-Status gleichermaßen eine Apoptose hervorgerufen wurde und ähnliche ED₅₀-Werte in den Zellanzahlbestimmungen ermittelt wurden. Eine Regulationsbeteiligung des p53 während der Zellteilung führt zum G₀/G₁-Block, der nicht auftrat. Das p53-Protein ist hier vor allem am G₀/G₁-Checkpoint nach DNA-Schäden aktiv. Da p53 aber auch an Checkpoints in der S- und G₂/M-Phase beteiligt ist (Levine, 1997), können die Zellzyklusuntersuchungen nicht zur Erklärung der p53-Beteiligung an der BA-induzierten Apoptose hinzugezogen werden.

Bei den Untersuchungen zum Zelltod fiel eine andere Reaktion der normalen Keratinozyten auf. Neben der geringen Anzahl Annexin-V-positiver Zellen konnte auch bei der mikroskopischen Betrachtung (Lichtmikroskop) der NHEK eine andere Reaktion im Vergleich zu den IGR1-Melanomzellen beobachtet werden. Die Zellen lösten sich nicht vom Boden ab, es gab kein "boiling" der Zellen verbunden mit einem Abschnüren kleiner Partikel und der Zerstörung der Zellstruktur. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob durch BA eine Induzierung der terminalen Differenzierung in den Keratinozyten erfolgte. Während der Umwandlung des proliferierenden Keratinozyten des Stratum basale der Haut zum Corneozyten des Stratum corneum werden eine Reihe Zytokeratine und Proteasen gebildet (vergl. Kap.2.2.1). Zwei dieser Proteine, Involucrin und Filaggrin, wurden für den Differenzierungsnachweis ausgewählt. Involucrin, ein früher Differenzierungsmarker,

wurde am Durchflusszytometer und mit Westernblotmethoden untersucht. Für diesen Parameter konnte gezeigt werden, dass durch BA eine Hochregulierung dieses Proteins erfolgt. Schon durch eine BA-Menge von $2 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ konnte eine Induzierung der Involucrin-expression erreicht werden.

Mit dem Nachweis des Filaggrins konnte die Aussage bestätigt werden, dass durch BA eine Induktion der Differenzierung zum Corneozyten erfolgte. Um die Ergebnisse dieser Methode zu bestätigen, wurde die Differenzierung der Keratinozyten mit einer Positivkontrolle ($2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$) eingeleitet (Boyce et al., 1983). Das Ausmaß der Fluoreszenzverschiebung war identisch. Eine Erhöhung der Filaggrinmenge durch eine Kombination von Calcium und BA erfolgte dagegen nicht. Der Nachweis einer Induktion der terminalen Differenzierung in den NHEK unterstreicht die Messungen zur Zellanzahlbestimmung und insbesondere die Messungen zur Apoptose. Nach Gandarillas et al. (1999) sind Differenzierung und Apoptose in Keratinozyten gleichartige Prozesse, wobei aber nicht jede Apoptose in NHEK mit einer Differenzierung einhergeht. So gehen nach einer UV-Bestrahlung sogenannte Sunburn-Zellen keine Differenzierung ein.

In Betrachtung der Änderungen des Proliferationsverhaltens, morphologischer Veränderungen im mikroskopischen Bild und den Untersuchungen zur Apoptose stellt sich folgendes dar: HaCaT, IGR1 und NHEK reagieren toxisch auf BA. In diesen Zellen wird eine Apoptose induziert, die sich am Durchflusszytometer mit einer Zunahme von Annexin-V-, APO2.7- und TUNEL-positiven Zellen zeigte und mit einem starken Rückgang der Lebendzellanzahl einherging. NHEK reagierten insgesamt langsamer auf BA, aber gegenüber allen anderen Zellen mit einem starken Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand. NHEK sprachen ebenfalls auf BA mit einem Rückgang der Zellanzahl, apoptotischen Reaktionen und morphologischen Veränderungen an. Die NHEK reagierten positiv im APO2.7- und TUNEL-Test, aber nicht wie die anderen Zellarten im Annexin-V/PI-Test. In den normalen Keratinozyten wird durch BA eine terminale Differenzierung ausgelöst, die anhand der Differenzierungsmarker Involucrin und Filaggrin nachgewiesen wurde. Der Rückgang der Proliferation in den mit BA-behandelten Zellkulturen ist somit auf eine Auslösung der Apoptose zurückzuführen.

Damit kann für die Wirkung der BA auf die Epidermis menschlicher Haut folgendes Bild postuliert werden. Nach einer topischen Anwendung der BA und dem Erreichen des nötigen Wirkstoffspiegels in der Haut, würde in den maligne entarteten Melanozyten durch Betulinsäure eine Apoptose ausgelöst werden und somit das Tumorwachstum unterbunden werden. Weiterhin besteht nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass dieses Melanom eine Resistenz gegen BA entwickelt. Der Einsatz bei Chemotherapie-resistenten Melanomen erscheint möglich. Neben dem Rückgang der Anzahl maligne entarteter Zellen würden aber gleichzeitig normale Melanozyten absterben, so dass der UV-Schutz durch die Melanozyten in diesem Areal nicht mehr gewährleistet werden würde und das somit das Krebsrisiko erneut stiege. Durch BA wird auch in den proliferierenden Keratinozyten eine

terminale Differenzierung und Apoptose ausgelöst. Somit geht der Pool der teilungsfähigen Keratinozyten zurück verbunden mit einer gestörten Regeneration der Epidermis

In der Einleitung wurde beschrieben, welche komplexen apoptotischen Prozesse in der Haut ablaufen, so dass die Wirkung eines Apoptose auslösenden Stoffes auf die Epidermis, ihren strukturellen Aufbau wesentlich beeinflussen kann. BA könnte somit nicht großflächig und vorbeugend gegen entartete Melanozyten eingesetzt werden. Die unspezifische Wirkung der BA auf die untersuchten Epidermiszellkulturen muss weiterhin bei einer klinischen Testung der Betulinsäure gegen andere Erkrankungen beachtet werden. In der Entwicklung und Planung sind derzeit ein Einsatz gegen HIV und Leukämie, aber auch in Kombination mit einer Bestrahlung gegen das Melanom zu nennen. Vor allem langwierige systemische Behandlungen dürften ohne modulatorische Veränderungen am Grundgerüst der BA nicht möglich sein, weil es sonst zu einer Zerstörung der Melanozyten und Verlust der Funktionsfähigkeit der Epidermis kommt.

Der Einsatz der Betulinsäure dürfte damit bis auf weiteres auf den experimentellen Laboreinsatz beschränkt bleiben. BA könnte hier als eine gute Positivkontrolle für eine Induktion der Apoptose und Auslösung der terminalen Differenzierung etabliert werden. Für den Labormaßstab kann die Induktion der Differenzierung in Keratinozyten für die Herstellung von Hautmodellen dienen, die z.B. bei Penetrationsversuchen Anwendung finden.

Als Ausblicke für weitere Arbeiten stehen Modifikationen an der BA im Vordergrund, um die Spezifität der BA auf das Melanom zu erhöhen. Vorarbeiten sind hier schon von Kim et al. (1998) getätigt worden. Es ist nun wichtig, in diese Überlegungen die Wirkung auf Keratinozyten mit einzubeziehen. Inwieweit die Induktion der Differenzierung für therapeutische Zwecke genutzt werden kann, ist zur Zeit noch nicht abzusehen. Denkbar wäre hier ein Einsatz in der Therapie der Psoriasis, um die erhöhte Proliferation und ungenügende Differenzierung der Keratinozyten zu modifizieren.

Die Induktion der Apoptose in normalen Melanozyten könnte für eine kosmetische Behandlung der sogenannten Altersflecken genutzt werden. Die Gefahr einer Atrophie und das Auftreten von Vernarbungen beschränken diesen Einsatz aber stark. Wenn eine therapeutische Nutzung der BA in Erwägung gezogen wird, muss nun eine tierexperimentelle Studie zur Wirkung der BA folgen. Gleichzeitig ist BA in ein Vehikel mit guten Libera-tions- und Penetrationseigenschaften einzuarbeiten, um eine Grundlage für eine topische Anwendung zu schaffen. Schwierigkeiten dürfte hier die Eigenschaft der BA machen, bei Kontakt mit geringen Wassermengen auszukristallisieren. Eine systemische Anwendung ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit zunächst auszuschließen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bache M, Taubert H, Würfl P, Fröde D, Dietzel M, Schmidt H, Meye A, Rath FW, Dralle H, Wohlrab W and Dunst J (1997) Radiation induced G2/M block in two human sarcoma cell lines with different p53 gen status. *Int J Oncol* 11, 993-997
2. Boersma WMA, Nooter K, Oostrum RG and Stoter G (1996) Quantification of Apoptotic Cells With Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Annexin V in Chinese Hamster Ovary Cell Cultures Treated With Cisplatin. *Cytometry* 24, 123-130
3. Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hülsen A, Fasching C, Cremer T and Fusenig NE (1997) Sustained Nontumorigenic Phenotype Correlates With a Largely Stable Chromosome Content During Long-Term Culture of the Human Keratinocyte Line HaCaT. *Genes, Chromosomes & Cancer* 19, 201-214
4. Boyce ST, Ham RG (1983) Calcium Regulated Differentiation of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Chemically Defined Clonal Culture and Serum Free Serial Culture. *J Invest Dermatol* 81, 33s-39s
5. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalised aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771
6. Bratton DL, Fadock VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium mediated non-specific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165
7. Bringmann G, Saeb W, Assi LA, Francois G, Sankara Narayanan AS, Peters K, Peters EM (1997) Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med* 63, 255-7
8. Büssing A, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfuller U, Schitzel M (1999) Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosom-inhibiting mistle lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* 37, 133-139
9. Caulin C, Salvesen GS and Oshima G (1997) Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganisation of intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis. *J Cell Biol* 138, 1379-1394
10. Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D (1994) Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol.* 153, 507-516
11. Cook JA, Mitchell JB (1989) Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179, 1-7
12. Cotman CW and Anderson AJ (1995) A potential Role for apoptosis in Neurodegeneration and Alzheimer`s disease. *Molecular Neurobiology* 10, 19-45

13. Courjault F, Leroy D, Coquery L, Toutain H (1993) Platinum complex-induced dysfunction of cultured renal proximal tubule cells. A comparative study of carboplatin and transplatin with cisplatin. *Arch Toxicol* 67, 338-46
14. DAB 10
15. Danks AM, Hammond DN, Wainer BH, Buskirk van RG, Isaacson RL (1992) Cellular alterations produced by the experimental increase in intracellular calcium and the nature of protective effects from pretreatment with nimodipine. *Mol Brain Res* 16, 168-72
16. Dasgupta, Tapas K, Pezzuto JM (1996) Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting malignant melanoma growth and a method of monitoring this. WO 9629068 A2
17. Draeger B, Neubert R, Galgon T, Wohlrab W (1998) Process for the Extraction of betulinic acid from the bark of *Platanus acerifolia* using middle-polar extraction solvents. *Chemical Abstracts* 20, 768 Quelle für Offenlegungsnummer: DE 19,713,768
18. Dubar V, Gosset P, Aerts C, Voisin C, Wallaert B, Tonnel AB (1993) In vitro acute effects of tobacco smoke on tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 19, 345-59
19. Dunnett CW (1955) A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Jour Amer Stat Assoc* 50, 1096-1121
20. Dunnett CW, Tamhane AC (1992) A Step-Up Multiple Test Procedure. *J Am Stat Assoc* 87, 162-170
21. Dunstan C, Liu B, Welch CJ, Perera P, Bohlin L (1998) Alphitol, a phenolic substance from *Alphitonia zizyphoides* which inhibits prostaglandin biosynthesis in vitro. *Phytochemistry* 48, 495-7
22. Eckert RL, Crish JF and Robinson NA (1997) The Epidermal Keratinocyte as a Model for the Study of Gene Regulation and Cell Differentiation. *Physiological Rev* 77, 397-424
23. Eijnde van den SM, Luijsterburg AJM, Boshart L, De Zeeuw CI, Dierendonck van JH, Reutelingsperger CPM and Vermeij-Keers C (1997) In Situ Detection of Apoptosis During Embryogenesis With Annexin V: From Whole Mount to Ultrastructure. *Cytometry* 29, 313-320
24. Erp van PEJ, Jong de GJ, Boezeman JBM, Schalkwijk J (1994) The growth and differentiation of human keratinocytes in vitro: a combined immunohistochemical and flow cytometric study. *Arch Dermatol Res* 286, 115-122
25. Evers M, Poujade C, Soler F, Ribeill Y, James C, Lelievre Y, Gueguen JC, Reisdorf D, Morize I, Pauwels R, De Clercq E, Henin Y, Bousseau A, Mayaux JF, Le Pecq JB, Dereu N (1996) Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J Med Chem* 39, 1056-68
26. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM (1992) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or

- the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149, 4029-35
27. Fearnhead HO, Dinsdale D, Cohen GM (1995) An interleukin-1 beta-converting enzyme-like protease is a common mediator of apoptosis in thymocytes. *FEBS-Lett* 375, 283-8
 28. Filippini G, Balmelli T, Eppenberger H and Soldati G (1999) Flow Cytometric Detection of p53 After Incubation of a Pre-B Cell Line With Antitumor Agents. *Cytometry* 35, 267-273
 29. Fischer DE (1994) Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold. *Cell* 78, 539-542
 30. Flick DA and Gifford GE (1984) Comparison of In Vitro Cell Cytotoxic Assays for Tumor Nekrosis Faktor. *J Immunol Meth* 68, 167-175
 31. Fitzpatrick TB, Breatnach AS (1963) Das epidermale Melanin-Einheits-System. *Dermatol. Monatsschr.* 147, 481-489
 32. Freshney RI (1990) Tierische Zellkulturen W. de Gruyter, Berlin
 33. Frohne D, Jensen U (1985) Systematik des Pflanzenreiches. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
 34. Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Chen IS, Lee KH (1994) Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* 57, 243-7
 35. Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM (1997) Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 57, 4956-64
 36. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (1998 a) Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 58, 4453-60
 37. Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM (1998 b) Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 273, 33942-8
 38. Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM (1999 a) Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 82, 435-41
 39. Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM (1999 b) Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr* 211, 319-2
 40. Funk JO, Kind P (1997) Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Hautarzt* 48, 157-165
 41. Galgon T (1997) Isolierung der Betulinsäure - Qualitative und Quantitative Analysemethoden, Diplomarbeit, Math.-Nat.-Tech. Fak., Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

42. Galgon T, Höke D, Dräger B (1999) Identification and Quantification of Betulinic Acid. *Phytochem Anal* 10, 187-190
43. Galgon T and Riemschneider S, Wohlrab W (2000 a) Betulinic Acid Induced Apoptosis in HaCaT Keratinocytes, *Biochemica* 3, 22
44. Galgon T and Riemschneider S, Podhaisky HP, Wohlrab W (2000 b) Betulinic Acid Induced Apoptosis in HaCaT Keratinocytes: Comparison of Different Flow Cytometric Methods. *European Cytokine Network*, in press
45. Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM (1999) Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal Keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol* 8, 71-79
46. Gavrielli Y, Sheran Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501
47. Geilen CC, Bektas M, Wieder Th, Orfanos CE (1996) The vitamin D-3 analogue calcipotriol, induced spingomyelin hydrolysis in human keratinocytes *FEBS Lett* 378, 88-92
48. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ (1997) Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with profound deficiency of apoptosis execution mechanism. *Cancer Lett* 115, 185-193
49. Gniadecki R, Gajkowska B, Bartosik J, Hansen M and Wulf HC (1998) Variable Expression of Apoptotic Phenotype in Keratinocytes Treated with Ultraviolet Radiation, Ceramide or Suspended in Semisolid Methylcellulose. *Acta Derm Venerol* 78, 248-257
50. Göhring J (1999) Untersuchungen zur Proliferationsbeeinflussung von HaCat-Keratinocyten durch UV-Licht und zur Möglichkeit einer UV-Protektion mit bestimmten Flavonoiden. *Dissertationsschrift, Math.-Nat.-Tech.-Fak, Martin Luther Universität Halle Wittenberg*
51. Gorman MA, Samali A, McGowan AJ, Cotter TG (1997) Use of Flow Cytometric Techniques in Studying Mechanism of Apoptosis in Leukemic Cells. *Cytometry* 29, 97-105
52. Hakke AR, Palokowska RR (1993) Cell Death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol* 105, 333-338
53. Hanley K, Jiang Y, He SS, Friedmann M, Elias PM, Bikle DD, Williams ML, Feingold KR (1998) Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPAR α . *J Invest Dermatol* 110, 368-375
54. Hashimoto F, Kashiwada Y, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH (1997) Anti-AIDS agents--XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 5, 2133-43
55. Hauschild A, Tronnier M, Möller M, Achtelik W, Wolff HH, Christoffers E (1998) Aktuelle operative und medikamentöse Therapie des Melanoms. *hautnah dermatologie* 4, 212-222

56. Hennings H, Michael D, Cheng C (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245-254
57. Herz W, Santhanam PS and Wahlberg I, (1972) 3-EPI-BETULINIC acid a new Triterpenoid from *picramnia pentandra*. *Pytochemistry*, 11, 3061-3063
58. Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88, 347-354
59. Jeong HJ, Chai HB, Park SY, Kim DS (1999) Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 1201-4
60. Johnson TM, Dolan OM, Hamilton TA, Lu MC, Swanson NA, Lowe L (1998) Clinical and histologic trends of melanoma. *J Am Acad dermatol* 78, 539-542
61. Kashiwada Y, Wang HK, Nagao T, Kitanaka S, Yasuda I, Fujioka T, Yamagishi T, Cosentino LM, Kozuka M, Okabe H, Ikeshiro Y, Hu CQ, Yeh E, Lee KH (1998) Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J Nat Prod* 61, 1090-5
62. Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen CH, Garrett PE, Lee KH (1996) Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem* 39, 1016-7
63. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57
64. Kim DS, Chen Z, van Tuyen Nguyen, Pezzuto JM (1997) A concise Semi-Synthetic Approach to Betulinic acid from Betulin. *Synthetic communications* 27, 1607-1612
65. Kim DS, Pezzuto JM, Pisha E (1998) Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 1707-12
66. Koester StK, Roth P, Mikulka WR, Schlossman StF, Zang Ch and Bolton WE (1997) Monitoring Early Cellular Responses in Apoptosis Is Aided by the Mitochondrial Membrane Protein-Specific Monoclonal Antibody APO2.7. *Cytometry* 29, 302-312
67. Koester StK, Schlossman StF, Zang Ch, Decker SJ, Bolton WE (1998) APO2.7 defines a shared apoptotic-necrotic pathway in a breast tumor hypoxia model. *Cytometry* 33, 324-332
68. Koh HK (1991) Cutaneous Melanoma. *N Engl J Med* 325, 171-182
69. Kolber MA, Quinones RR, Henkart PA (1989) Target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes redirected by antibody-coated polystyrene beads. *J Immunol* 143, 1461-6
70. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, Oers van MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-20
71. Leers MPG, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaeckers FCS, Björklund B, Nap M, Jörnval H and Schutte B (1998) Immunocytochemical detection and localisation of a cytokeratin 18 epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 187, 567-72

72. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM (1993) p53 mutation in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14, 833-839
73. Levine JA (1997) p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88, 323-331
74. Li G, Tang L, Zhou X, Tron V and Ho V (1998) Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Research* 8, 17-23
75. Liebermann DA, Hoffman B, Steinmann RA (1995) Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53 dependent and independent pathways. *Oncogene* 11, 199-210
76. Linder G, Botchkarev VA, Botchkarev NV, Ling G, Veen van der C, Paus R (1997) Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151, 1601-1607
77. Lindl Toni (2000) *Zell- und Gewebekultur Spektrum*, Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, 4. Auflage
78. Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Shimotohno K (1999) Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivatives on HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull Tokyo*. 47, 141-5
79. Maciás FA, Simonet AM, GalindoJCG, Pancheco PC and Sánchez JA (1998) Bioactive polar Triterpenoids from *Melilotus Messanensis*. *Phytochemistry* 3, 709-717
80. Magaud JP, Sargent I, Mason DY (1988) Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 106, 95-100
81. Manez S, Recio MC, Giner RM, Rios JL (1997) Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol* 334, 103-5
82. Martin A, Clynes M (1991) Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests *In-Vitro Cell Dev Biol* 27, 183-4
83. Mayaux JF, Bousseau A, Pauwels R, Huet T, Henin Y, Dereu N, Evers M, Soler F, Poujade C, De Clercq E (1994) Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad Sc USA* 26, 3564-8
84. McCall C, Cohen JJ (1991) Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J Invest Dermatol* 97, 111-114
85. McColl KS, He H, Zhong H, Whitacre CM, Berger MA, Distelhorst CW (1998) Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol* 139, 229-38
86. Mooney EE, Peris JMR, O'Neill A, Sweeney EC (1995) Apoptotic and Mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma. *J Clin Pathol* 48, 242-244
87. Mukherjee PK, Saha K, Das J, Pal M, Saha BP (1997) Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. [letter] *Planta Med* 63, 367-9

88. Muir D, Varon S and Manthorpe M (1990) An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bromodeoxyuridine Incorporation Using Fixed Microcultures. *Analytical Biochemistry* 185, 377-382
89. Mutschler E (1991) *Lehrbuch der Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 6. Auflage
90. Nagata S and Goldstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456
91. Nakatani S, Okada N, Okumura H and Yoshikawa K (1992) A two-color flowcytometric study of cell kinetics and differentiation of human keratinocytes in culture. *Arch Dermatol Res* 284, 349-352
92. Nasemann T, Jänner M, Schnitte B (1982) *Histopathologie der Hautkrankheiten*. Springer Verlag Berlin/Heidelberg
93. Neuner P, Pourmoijb M, Klosner G, Treutinger F, Knobler (1996) Increased release of the tumor necrosis factor receptor p75 by immortalised human keratinocytes results from an activated shedding mechanism and is not related to augmented steady state levels of p75 mRNA. *Arch Dermatol Res* 288, 691-696
94. Nick A, Wright AD, Rali T and Sticher O (1995) Antibacterial Triterpenoids from *Dillenia Papuana* and their structure-activity relationships. *Phytochemistry* 40, 1691-1695
95. Noda Y, Kaiya T, Kohda K, Kawazoe Y (1997) Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chem Pharm Bull Tokyo* 45, 1665-70
96. Odh G, Hindemith A, Caratam R, Paulson J, Rosengren E and Rorsman H (1994) Melanins in IGR1 Melanoma Cells. *Pigment Cell Res* 7, 419-427
97. Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM (1995) *Nekrobiologie der Haut*. *Hautarzt* 46, 285-303
98. Peus D, Vasa RV, Beyerle A, Mevers A, Krautmacher C and Pittelkow MR (1999) UVB Activates ERK1/2 and p38 Signaling Pathway via Reactive Oxygen Species in Cultured Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 112, 151-156
99. Peus D, Vasa RV, Beyerle A, Mevers A, Pott M, Beyerle A, Squillace K and Pittelkow MR (1998) H₂O₂ Is an Important Mediator of UVB-Induced EGF-Receptor Phosphorylation in Cultured Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 110, 966-971
100. Pezzuto, John M, Kim SH, Darrick LPI Methods of manufacturing betulinic acid Patent: US 5804575 A19980908
101. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nat Med* 1, 1046-51
102. Podhaisky HP, Abate A, Polte T, Oberle S, Schröder H (1997) Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress – possible synergism with vitamin E. *FEBS Letters* 417, 349-351

103. Porstmann T, Ternynck T and Avrameas S (1985) Quantification of 5-Bromo-2-Deoxyuridine Incorporation into DNA: an Enzyme Immunoassay for the Assessment of the Lymphoid Cell Proliferative Response. *J Immunol Methods* 85, 169-179
104. Quan LT, Muneesh T, O'Rourke K, Dixit V, Snipas SJ, Poirier GG, Ray c, Pickup DJ and Salvesen GS (1996) Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Biochemistry* 93, 1972-1976
105. Ratnam AV, Bikle DD, Su MJ, Pillai S (1996) Squamous Carcinoma Cell Lines Fail to Respond to 1.25-Dihydrovitamin D Despite Normal Levels of the Vitamin D Receptor. *J Invest Dermatol* 106, 522-525
106. Recio MC, Giner RM, Manez S, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, Rios JL (1995) Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med* 61, 9-12
107. Rieber M, Strasberg Rieber M (1998) Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma. *DNA Cell Biol* 17, 399-406
108. Rieber M, Strasberg Rieber M (1998 Dec) S. Fulda et al., Betulinic acid triggers CD95 (Apo1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 57, 4956-4964 [letter, comment]
109. Robinson FP, JR and Martel H (1970) Betulinic acid from *Arbutus Menziesii*. *Phytochemistry* 9, 907-909
110. Rothe G, Emmendörffer A, Oser A, Roesler J and Valet G (1991) Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 138, 133-135
111. Rückert, Neugebauer, Willems (1992) *Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Lehrbuch zu spektroskopischen und elektrochemischen Analysenmethoden*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
112. Schmeil Fitschen (1988) *Flora von Deutschland. Quelle und Meyer Verlag Heidelberg/Wiesbaden*, 88. Auflage
113. Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling Indeck L, Pezzuto JM (1997) Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer* 33, 2007-10
114. Schmitz, Rothe (1994) *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. F. K. Schaltauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany
115. Schürer N, Köhne A, Sliep V, Barlag K, Goerz G, (1993) Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* 2, 179-185
116. Seeger W, Suttorp N, Hellwig A and Bhakdi S (1986) Noncytosolic terminal complement complexes may serve as calcium gates to elicit leucotrien B4 generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 137, 1286-1293
117. Selzer E, Pimentel E, Wachek V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B and Kodym R (2000) Effects of Betulinic Acid Alone and in Combination with Irradiation in Human Melanoma Cells. *J Invest Dermatol* 5, 935-940

118. Sheth K, Joland S, Wiedhopf R and Cole JR (1972) Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *J Pharm Sci* 61, 1819
119. Siddiqui BS, Farhat, Begum S and Siddiqui S (1997) Isolation and Structural Elucidation of Acylated Pentacyclic Triterpenoids from the Leaves of *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusata*. *Planta Med* 63, 47-50
120. Steele JC, Warhurst DC, Kirby GC, Simmonds MS (1999 Mar) In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res* 13, 115-9
121. Steinert PM and Marenkow LN (1995) The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Interfilaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodipeptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope. *J Biol Chem* 270, 17702-17711
122. Steinert PM and Marenkow LN (1997) Direct Evidence That Involucrin Is a Major Early Isopeptide Cross-linked Component of the Keratinocyte Cornified Cell Envelope. *J Biol Chem* 272, 2021-2030
123. Soler F, Poujade C, Evers M, Carry JC, Henin Y, Bousseau A, Huet T, Pauwels R, De-Clercq E, Mayaux JF, Le Pecq JB, Dereu N (1996 Mar) Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Med Chem* 39, 1069-83
124. Teraki Y, Shiohara T (1999) Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol* 9, 413-426
125. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Möller P, Falk W Debatin KM and Krammer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305
126. Trumbull ER, Blanche E, Eckert DJ, Wiedhopf RM, and Cole JR (1976) Tumor inhibitory agent from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J Pharm Sci* 65, 1407-1408
127. Tsai S, Wear JD, Shin JWK and Lo SC (1995) Mycoplasmas and oncogenesis : Persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci* 92, 10197-10201
128. Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA (1998) Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med* 64, 97-109
129. Volkenandt M, Schmidt M, Konz B, Gummer M, Hein R, Plewig G, Hölzel D (1999) Klinisch-epidemiologische Daten von Patienten mit malignen Melanomen aus dem Bereich des Tumorzentrums München von 1977-1997. *Hautarzt* 50, 470-478
130. Walker PR, Koklileva L, Leblanc J and Sikorska M (1993) Detektion of initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Bio Techniques* 15, 1032-1040
131. Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M (1999) Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 1306-12
132. Wissenschaftliche Begleitinformation zum Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Boehringer Mannheim 1995

133. Wissenschaftliche Begleitinformation zum Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Boehringer Mannheim 1994
134. Wissenschaftliche Begleitinformation zur Keratinozytengewinnung aus neonatalem Vorhautgewebe der Firma Gibco BRL Life Technologies
135. Wissenschaftliche Begleitinformation zum Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein Boehringer Mannheim 1997
136. Wokadek H, (1992) Die Haut. In: Niedner R, Ziegenmeyer J (Hrsg.) Dermatika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
137. Wyllie AH (1980) Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonucleases activation. Nature 284, 555-556
138. Yaffe BM, Murthy S and Eckert RL (1993) Evidence that Involucrin Is a Covalently Linked Constituent of Highly Purified Cultured Keratinocyte Cornified Envelopes. J Invest Dermatol 100, 3-9
139. Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, Takeuchi M, Nakagawa S (1991) Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. Oncology. 48, 72-6
140. Zellner J, Ziffer D (1925) "Plantanolensäure" aus der Rinde von *Platanus orientalis* L. Monatshefte für Chemie 46, 323-25
141. Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF (1996) A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. J Immunol 157, 3980-3987

7. VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Präsentation von Bereichen der Genexpression wichtiger Proteine in der Epidermis während der terminalen Keratinozytendifferenzierung (nach Eckert et al.,1997) TG = Transglutaminase, K = Keratin. In der TG1 Gruppe werden K1 und K10 später exprimiert als die anderen Marker	7
Abbildung 2: Stereochemische Darstellung der Betulinsäure	9
Abbildung 3: <i>linke Darstellung</i> : Haut nach 24 h Inkubation mit Dispase-Lösung, Epidermis und Dermis noch verbunden; <i>mittlere Darstellung</i> : von der Epidermis getrennte Dermis; <i>rechte Darstellung</i> : Epidermisssegment für eine weitere Präparation geeignet	17
Abbildung 4: Kalibriergerade für die Gehaltsbestimmung der Betulinsäure mittels Gaschromatographie, korrigierte Peakflächen, innerer Standard: Squalan.....	19
Abbildung 5: Qualitätsuntersuchung der isolierten Betulinsäure $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$, GC silylierte Probe, Peak bei 3 min = innerer Standard Squalan, Peak bei 12,439 min = Betulinsäure silyliert.....	20
Abbildung 6: IGR1-Zellen wurde 24 h in Mikotiterplatten mit Betulinsäure $10 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ nach dem Verdünnungsschema A bzw. B behandelt und die Zellanzahl bestimmt, Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, *** P < 0,001	21
Abbildung 7: Kalibriergerade für den Vitalitätstest, Verdünnungsreihe Kristallviolett von $1-0,01 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, n = 6	22
Abbildung 8: Darstellung des Messergebnisses einer Phosphatidyliddetektion im Außenbereich der Zellmembran von HaCaT-Zellen mit gleichzeitiger Propidiumiodidfärbung als Dotplot (durchflusszytometrische Zweiparametermessung)	25
Abbildung 9: <i>linke Darstellung</i> : Dotplot FSC/SSC, <i>rechte Darstellung</i> : Annexin-V/PI, HaCaT-Zellen in SFM 16 h mit $8 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Betulinsäure behandelt.....	25
Abbildung 10: Einfluss der Regionen auf den Annexin-V/PI-Test, Auswertung des Versuches Abbildung 9, HaCaT-Zellen in MEM 16 h mit BA $8 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ behandelt,(n = 1) Die Regionen beziehen sich auf den Dotplot FFC/SSC in der Abbildung 9 linke Darstellung.	26
Abbildung 11: Mykoplasmen freie Primärkultur: NHEK 1. Passage am 4. Kulturtag. Falschfarbendarstellung der Zellkerne, DNA-Färbung mit Hoechst 33258	31
Abbildung 12: Mykoplasmen kontaminierte Kultur NHEK 1. Passage am 4. Kulturtag, Mykoplasmen werden als dunkle Punkte um den Zellkern sichtbar, Falschfarbendarstellung der Zellkerne, DNA-Färbung mit Hoechst 33258	31
Abbildung 13: Struktur der äußeren zwei Lagen der cornified cell envelope, Lage der Differenzierungsmarker Filaggrin und Involucrin (nach Steinert und Marenkov, 1995)	33
Abbildung 14: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in den Medien DMEM, MEM und MGM, 48 h nach Zugabe von $0,08-20 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 12	38
Abbildung 15: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in DMEM oder MEM 48 h mit 5 und $10 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, n.s. nicht signifikant, Dunnett-Test gegenüber Kontrolle, t-Test Vergleich MEM/DMEM, Mann-Withney-Test bei positivem F-Test	39

Abbildung 16: APO2.7-Test, prozentuale Darstellung der APO2.7-positiven Zellen, IGR1-Zellen in DMEM und MEM, 48 h nach Zugabe von 5 und 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3 * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test gegenüber Kontrolle, t-Test Vergleich MEM/DMEM.....	39
Abbildung 17: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, HaCaT-Keratinocyten 48 h nach Inkubation mit 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, 0 = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 12, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle oberhalb der einzelnen Balken (Dunnett-Test) und im Vergleich der jeweiligen Wertepaare untereinander (t-Test) über die Balken gelegt.....	40
Abbildung 18: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in MEM, 5 und 10 % FKS, 48 h mit 0,8-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 12, *** P < 0,001, t-Test die Unterschiede zwischen den FKS Konzentrationen 5 % und 10 % sind jeweils über der 10 % FKS-Kurve dargestellt....	40
Abbildung 19: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest IGR1-Zellen nach 12 h Begasung mit 5 und 10 % CO ₂ , 12 h Betulinsäureinkubation mit 2,5-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, n = 12, 0 = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, t-Test	41
Abbildung 20: Entstehung des Apoptosepeaks (Ap) vor dem G ₀ /G ₁ -Peak bei der Zellzyklusuntersuchung von IGR1-Zellen in MEM 16, 28, 51 h nach Inkubation mit 5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Lösungsmittelkontrolle = 0,05 % DMSO.....	43
Abbildung 21: Bestimmung der intrazellulären Radikale mit dem Dihydrorhodamin 123-Test, IGR1-Zellen in MEM und HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 und 24 h mit 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, 15 h Wert 15 h mit DHR inkubiert, 24 h Wert 8 h mit DHR inkubiert.	43
Abbildung 22: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, IGR1-Zellen in MEM 24, 48, 72, 96 h nach Zugabe von 0,8-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	45
Abbildung 23: Bestimmung der DNA-Synthese (BrdU-Einbau) IGR1-Zellen in MEM 20 h nach Zugabe von 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	45
Abbildung 24: Zellzyklusuntersuchungen am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM, 16-91 h nach Zugabe von 5 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2	46
Abbildung 25: Histogramm der Zellzyklusuntersuchungen am Durchflusszytometer IGR1-Zellen in MEM nach Zugabe von 2, 4, 8, 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO <i>linke Abbildung</i> : 22 h Inkubation mit BA; <i>rechte Abbildung</i> : 53 h Inkubation mit BA.....	46
Abbildung 26: Zellzyklusuntersuchung, IGR1-Zellen in MEM 22 h nach Zugabe von 2, 4, 8, 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	47
Abbildung 27: Zellzyklusuntersuchung, IGR1-Zellen in MEM 53 h nach Zugabe von 2 und 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	47
Abbildung 28: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, IGR1-Zellen in MEM, 7 und 24 h nach Betulinsäurezugabe 0,16-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, K = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,05 %, pos. K = positive Kontrolle Tween [®] 20 0,02 %, n = 6, * P < 0,05, **P < 0,01, Dunnett-Test	48
Abbildung 29: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in MEM, 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	48

Abbildung 30: Annexin-V/PI-Test, IGR1-Zellen in MEM mit 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA für 24 h behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, *** P < 0,001, Dunnett-Test.....	49
Abbildung 31: APO2.7-positive Zellen, IGR1-Zellen in MEM, 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12, 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	49
Abbildung 32: Messung der DNA-Fragmentierung mit der TUNEL-Methode am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM nach 24 und 48 h, <i>linke Darstellung</i> : Histogramm Fluoreszenzintensität DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Zellen 24 h (blau) und 48 h (schwarz) mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt. Positivkontrolle: DNase 10 min 1 $\text{mg}\times\text{ml}^{-1}$ (grün), <i>rechte Darstellung</i> TUNEL-positive IGR1-Zellen in MEM kultiviert, Kontrolle 0,05 % DMSO, Zellen 24 und 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	50
Abbildung 33: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM, 8 h mit 2, 4 und 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA inkubiert, p53-Gehalt für die einzelnen Zellzyklusphasen ausgewertet, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	50
Abbildung 34: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, IGR1-Zellen in MEM 24 h mit 2, 4, 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA inkubiert, p53-Gehalt für die einzelnen Zellzyklusphasen ausgewertet, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01.....	51
Abbildung 35: Westernblot, IGR1-Zellen in MEM 4, 7, 17, 28, 47 und 71 h nach Zugabe von 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge: 80 μg , Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO	51
Abbildung 36: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, normale humane Melanozyten in MGM 24 und 48 h nach Betulinsäurezugabe 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	52
Abbildung 37: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, normale Melanozyten in MGM, 7 h nach Behandlung mit 0,16-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, pos. K = Positivkontrolle Tween [®] 20 0,02 %, K = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	53
Abbildung 38: Annexin-V-FITC/PI-Test normale Melanozyten in MGM 24 h mit 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, *** P < 0,001, t-Test.....	53
Abbildung 39: Annexin-V/PI normale Melanozyten in MGM 24 und 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, zVAD+BA = Zellen 24 h mit Z-VAD-FMK 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, n = 3, *** P < 0,001, n. s. = nicht signifikant, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle: Dunnett-Test, Vergleich zweier Wertepaare (24 h ohne versus mit Z-VAD-FMK): t-Test.....	54
Abbildung 40: <i>linke Darstellung</i> : DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode durchflusszytometrische Messung, normale Melanozyten in MGM 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Positivkontrolle: DNase 1 $\text{mg}\times\text{ml}^{-1}$, 10 min (schwarz), <i>rechte Darstellung</i> : DNA-Fragmentierung, TUNEL-positive normale Melanozyten in MGM, Kontrolle: 0,05 % DMSO, 24 h und 48 h: Zellen 24 und 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt, zVAD+BA: Zellen 24 h mit Z-VAD-FMK 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ und 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt, n = 3, * P < 0,05, *** P < 0,001, 24 und 48 h im Vergleich zur Kontrolle: Dunnett-Test, Vergleich zweier Wertepaare (24 h ohne versus mit Z-VAD-FMK): t-Test.....	54

Abbildung 41: APO2.7-positive Zellen, normale Melanozyten in MGM, 24 h nach Zugabe von 4 und 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, **P < 0,01, Dunnett-Test.	55
Abbildung 42: normale Melanozyten in MGM, <i>linkes Foto</i> : Kontrolle mit 0,05 % DMSO, <i>rechtes Foto</i> : behandelte Zellen 24 h nach Zugabe von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.....	56
Abbildung 43: Apoptosestadien der Melanozyten (M) am Beispiel der NHEM in MGM mit 10 μg BA 12 h inkubiert, <i>linkes Foto</i> : Zellen nehmen ein kugelförmiges Aussehen an, <i>mittleres Foto</i> : einzelne Partikel (P) werden aus den Dendriten (D) abgeschnürt, <i>rechtes Foto</i> : "blebbing" der Zellen einzelne Vesikel werden aus dem gesamten Zelllumen abgegeben	56
Abbildung 44: <i>linkes Foto</i> : morphologisches Bild IGR1-Zellen in DMEM mit 0,05 % DMSO (Kontrolle), <i>rechtes Foto</i> : IGR1-Zellen 12 h nach Gabe von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA.	56
Abbildung 45: IGR1-Zellen in MEM 24 h nach Zugabe von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA	57
Abbildung 46: NHEM in MGM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, invertierte Darstellung, <i>linkes Foto</i> : Kontrolle DMSO 0,05 %, 48 h, <i>rechtes Foto</i> : NHEM Zellen 48 h nach Inkubation mit 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, apoptot., kondens. Chrom. = kondensiertes Chromatin.....	58
Abbildung 47: IGR1-Zellen in MEM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, invertierte Darstellung, <i>linkes Foto</i> : Kontrolle DMSO 0,05 %, 48 h, <i>rechtes Foto</i> : IGR1-Zellen 48 h nach Inkubation mit 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern.....	58
Abbildung 48: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, HaCaT-Keratinocyten in SFM 24, 48, 72 und 96 h nach Inkubation mit 0,08-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	59
Abbildung 49: Bestimmung derDNA-Syntheserate (BrdU Einbau), HaCaT-Keratinocyten in SFM 20 h nach Behandlung mit 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test	60
Abbildung 50: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, HaCaT-Keratinocyten in SFM 7 h nach Behandlung mit 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, pos. K = Positivkontrolle Tween® 20 0,02 %, K = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P<0,01, Dunnett-Test	60
Abbildung 51: <i>linke Darstellung</i> : Histogramm Fluoreszenzintensität APO2.7, HaCaT-Keratinocyten in SFM, 15 h mit 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), <i>rechte Abbildung</i> : APO2.7-positive Zellen, HaCaT-Keratinocyten 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, ** P < 0,01, n = 2, Dunnett-Test	61
Abbildung 52: <i>linke Darstellung</i> : Histogramm M30, HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 h mit 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 24 h, 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-behandelt (schwarz), <i>rechte Darstellung</i> : M30-positive HaCaT-Keratinocyten 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	62
Abbildung 53: DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, HaCaT-Keratinocyten in SFM 15 h nach Zugabe von 4, 8, 12, 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, Dunnett-Test	62
Abbildung 54: Annexin-V/PI-Test HaCaT-Keratinocyten in SFM, 15 h mit 4, 8, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test	63
Abbildung 55: Annexin-V/PI-Test, HaCaT-Keratinocyten in SFM, 24 h mit 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test	64

Abbildung 56: Annexin-V/PI-Test, HaCaT-Keratinocyten in SFM 72 h mit 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test	64
Abbildung 57: APO2.7-positive Zellen, HaCaT-Keratinocyten in SFM 72 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle = 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test	65
Abbildung 58: p53-Bestimmung am Durchflusszytometer, HaCaT-Keratinocyten in SFM, <i>linke Darstellung</i> : Kontrolle 0,05 % DMSO, y-MFI [mittlere Fluoreszenzintensität (y)]: $97,1 \pm 6,5$, n = 3, <i>rechte Darstellung</i> : behandelte Zellen 20 h nach Zugabe von 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, y-MFI: $72,1 \pm 1,8$; n = 3, t-Test.....	65
Abbildung 59: durchflusszytometrische Bestimmung von p53, HaCaT-Keratinocyten in SFM 20 h mit 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 2, Dunnett-Test.....	66
Abbildung 60: durchflusszytometrische Bestimmung von p53, HaCaT-Keratinocyten in SFM 40 h mit 1,5, 3 und 6 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, * P < 0,05, n = 2, Dunnett-Test.....	66
Abbildung 61: Westernblot p53, <i>linke Banden</i> : HaCaT-Keratinocyten in SFM, fünfter Kulturtag, Inkubation mit 0,01% DMSO für 24 h, Proteinmenge 50 μg ; <i>rechte Banden</i> : normale Keratinocyten, fünfter Kulturtag, nach Inkubation mit 0,01% DMSO für 24 h Proteinmenge 100 μg	67
Abbildung 62: Zellanzahlbestimmung/Vitalitätstest, normale Keratinocyten in SFM, 20, 40 und 64 h nach Betulinsäurezugabe von 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Kon = Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 %, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	68
Abbildung 63: Bestimmung der DNA-Syntheserate (BrdU Einbau), normale Keratinocyten in SFM 20 h nach Behandlung mit 0,31-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,1 % DMSO, n = 6, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	69
Abbildung 64: Zellzyklusuntersuchung nach 16 h, NHEK in SFM, <i>Histogramm</i> : Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (blau), <i>Diagramme</i> : Verteilung der Zellzyklusphasen 16 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test	70
Abbildung 65: Zellzyklusuntersuchung nach 21 h, NHEK in SFM, <i>Histogramm</i> : Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (blau), <i>Diagramme</i> : Verteilung der Zellzyklusphasen 21 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test	70
Abbildung 66: Zellzyklusuntersuchung nach 24 h NHEK in SFM, <i>Histogramm</i> : Fläche der Propidiumiodid-fluoreszenz/Zellanzahl, Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA (blau), <i>Diagramme</i> : Verteilung der Zellzyklusphasen 21 h nach Zugabe von 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, Dunnett-Test	71
Abbildung 67: Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, NHEK in SFM, 7 und 24 h nach Betulinsäurezugabe von 0,16-20 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, K = Kontrolle DMSO 0,05 %, pos. K = Positivekontrolle Tween [®] 20 0,02%, n = 6, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test	72
Abbildung 68: Annexin-V/PI-Test, normale Keratinocyten 24 h mit 4, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, Dunnett-Test.....	72

Abbildung 69: Annexin-V/PI-Test, normale Keratinozyten in SFM 72 h mit 2,5, 5, 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, $\text{Ca}^{2+} = 1,2 \text{ mM}$, n = 3, * P<0,05, **P<0,01, Dunnett-Test, t-Test.....	73
Abbildung 70: APO2.7-positive Zellen, normale Keratinozyten in SFM kultiviert 15 h nach Zugabe von 4, 12 und 16 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P<0,05, **P<0,01, Dunnett-Test	73
Abbildung 71: <i>linke Darstellung</i> : Histogramm DNA-Fragmentierung, TUNEL-Methode, normale Keratinozyten in SFM 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt (blau), Kontrolle 0,05 % DMSO (rot), Positivkontrolle (schwarz): DNase 10 min 1 $\text{mg}\times\text{ml}^{-1}$, <i>rechte Darstellung</i> : TUNEL-positive Zellen normale Keratinozyten 24 und 48 h mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P<0,01, Dunnett-Test	74
Abbildung 72: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot, 4, 7 und 17 h nach 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA-Zugabe, Proteinmenge 100 μg , Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO..	74
Abbildung 73: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot nach 9,5 h für 1, 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge 100 μg , Kon = Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO	74
Abbildung 74: p53-Bestimmung NHEK in SFM, Westernblot nach 56 h für 1, 2, 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Proteinmenge 100 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO.	75
Abbildung 75: Involucrin-Bestimmung, Westernblot: normale Keratinozyten in SFM bei 40-50 % Konfluenz, mit 10 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h behandelt. Kontrolle 0,05 % DMSO, Positivkontrolle: $\text{Ca}^{2+} 2,5 \text{ mM}$ 24 h, Zellen wurden zum gleichen Zeitpunkt mit Lysispuffer abgelöst. aufgetragene Proteinmenge 4 μg	75
Abbildung 76: Involucrin-Bestimmung am Durchflusszytometer, normale Keratinozyten in SFM bei 70% Konfluenz 18 h mit 2 und 4 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ** P < 0,01, Dunnett-Test	75
Abbildung 77: <i>linke Darstellung</i> : Histogramm Involucrin-Bestimmung nach 24 h, Kontrolle (rot) DMSO 0,05 %, blau 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, <i>rechte Darstellung</i> : Involucrin-positive normale Keratinozyten bei 70 % Konfluenz 24 h mit 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ behandelt, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, ***P < 0,001, Dunnett-Test.....	76
Abbildung 78: <i>linke Darstellung</i> : Histogramm Filaggrin-Bestimmung nach 44 h, native Keratinozyten in SFM, Kontrolle (rot): 0,05 % DMSO, Positivkontrolle (schwarz): 2,5 mM Ca^{2+} , BA 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ (blau) <i>rechte Darstellung</i> : Filaggrin Bestimmung, normale Keratinozyten, Kontrolle 0,05 % DMSO, Kon+Ca = Positivkontrolle 0,05 % DMSO + 2,5 mM Ca^{2+} ; BA: 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$, BA + Ca 2,5 mM Ca^{2+} + 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, n = 3, * P < 0,05, *** P < 0,001, t-Test.....	77
Abbildung 79: Filaggrin-Bestimmung, normale Keratinozyten in SFM 24 h nach Zugabe von 4, 8 und 12 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO, n = 3, * P < 0,05, ** P < 0,01, Dunnett-Test.....	77
Abbildung 80: HaCaT-Keratinozyten in SFM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, Invertierte Darstellung, <i>linkes Foto</i> : Kontrolle DMSO 0,05 %, <i>rechtes Foto</i> : HaCaT-Zellen 48 h nach Inkubation mit 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, Apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern, kondens. Chrom. = kondensiertes Chromatin.....	79
Abbildung 81: NHEK in SFM, Färbung der DNA mit Höchst 33258 am Fluoreszenzmikroskop, Invertierte Darstellung, <i>linkes Foto</i> : Kontrolle DMSO 0,05 %, <i>rechtes Foto</i> : NHEK Zellen 48 h nach Inkubation mit 8 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, ZK = Zellkern, Apoptot. ZK = apoptotischer Zellkern, kondens. Chromat. = kondensiertes Chromatin	79

Abbildung 82: <i>linkes Foto</i> : HaCaT-Keratinocyten in SFM Lösungsmittelkontrolle 0,05 % DMSO, <i>rechtes Foto</i> : HaCaT-Keratinocyten 24 h mit $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, deutliche Zellanzahlabnahme gegenüber der Kontrolle erkennbar.....	80
Abbildung 83: <i>linkes Foto</i> Kontrolle normale Keratinocyten in SFM, Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,05 %, <i>rechtes Foto</i> : normale NHEK 36 h mit $20 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt.....	80
Abbildung 84: <i>linkes Foto</i> : NHEK- Zellen in SFM, 36 h mit $16 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, Einlagerungen sind zu erkennen aber nicht mehr die Struktur des Zellkerns, <i>rechtes Foto</i> : NHEK in SFM, 72 h mit $4 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA behandelt, einzelne Zellen sind kaum noch unterscheidbar.....	81

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Mit apoptotischen Veränderungen assoziierte Hauterkrankungen (Paus et al., 1995, Teraki et al., 1999)	5
Tabelle 2: Gaschromatographische Gehaltsbestimmung in Geweben der Platane ($n = 6 \pm$ SD) und verschiedenen Rindendrogen ($n = 2$, SD < 10 %), Nachweisgrenze 0,1 mg pro g Droge, (Galgon et.al., 1997, 1999).....	19
Tabelle 3: Inkubations- und Konzentrationsschema der primären und sekundären Antikörper	30
Tabelle 4: Zeitreihe 6-48 h mit $6 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Annexin-V/PI-Test; APO2.7 mit und ohne Permeabilisierung, IGR1 in MEM.....	42
Tabelle 5: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Involucrinbestimmung an HaCaT-Keratinocyten in SFM nach 24 h Inkubation mit $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$, $4, 8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO ($x \pm$ SD, $n = 3$)	67
Tabelle 6: Mittlere Fluoreszenzintensitäten der Filaggrinbestimmung an HaCaT-Keratinocyten in SFM nach 48 h Inkubation mit $2,5 \text{ mM Ca}^{2+}$, $4, 8 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ BA, Kontrolle 0,05 % DMSO ($x \pm$ SD, $n = 3$, * P < 0,05Dunnnett-Test).....	68

Die vorgestellte Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie und am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wohlrab für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Schaffung der guten Arbeitsbedingungen sowie für die kritische begleitende Diskussion bedanken. Ich möchte weiterhin für die gute Integration in die Arbeitsgruppe, für Diskussionen und nochmals für die finanzielle Unterstützung nach Auslaufen des Stipendiums bedanken.

Frau Professor Dr. Dräger möchte ich herzlich danken. Sie ermöglichte mir das Stipendium und begleitete mich beim Thema Betulinsäure von der Diplomarbeit bis hin zur Promotion.

Bei Herrn Dipl.-Phys. Klapperstück möchte ich mich für die gute Einarbeitung in die Durchflusszytometrie bedanken. Mit seiner kritischen Diskussionsbereitschaft hat er sehr zur genauen Bewertung der Ergebnisse beigetragen.

Ein großes Dankeschön an meine wichtigsten Lektorinnen (meine Freundin Frau Dipl.-Chem. Ina Wirth und meine nette Kollegin Frau Dipl.-Pharm. Anja Nickel).

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen zwei Arbeitsgruppen für die gute und ausgesprochen freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Danke also an Ines, Grit, Dirk, Ron, Yvonne, Frau Ködel, Olaf, Anja, Peter, Stephan, Herrn Klapperstück, Christoph, Herrn Dr. Huschka, Ramona, Doreen und an die zwei "ohne Sie geht gar nichts" Frau Hölsken und Frau Schramm. Ich möchte mich hier nicht nur für die unzähligen Zellkulturen und Messungen bedanken, sondern auch für die gute Laune und die Übersicht in der Planung der Arbeit der Doktoranden.

Meinen Eltern danke ich mit dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Galgon, Tino
Geburtstag/Geburtsort: 07. Juni 1972 in Staßfurt
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 - 1989 Zehnklassige Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule
in Staßfurt
1989 - 1991 Erweiterte Oberschule in Staßfurt

Zivildienst:

1991 - 1992 Seniorenbetreuung in einer karitativen Einrichtung
in Staßfurt

Studium:

1992 - 1996 Studium der Pharmazie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1996 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1996 bis März 1997 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität,
Thema: Isolierung von Betulinsäure - Qualitative und quan-
titative Analysenmethoden
April 1997 bis Sep. 1997 Praktische Ausbildung Nord-Apotheke Staßfurt
Feb. 1998 Erteilung der Approbation als Apotheker

Promotion:

Okt. 1997-Juli 2000 Promotion an der Universitätsklinik und Poliklinik für Der-
matologie und Venerologie und am Institut für Pharmazeuti-
sche Biologie der Martin-Luther-Universität gefördert durch
ein Graduiertenstipendium des Landes Sachsen-Anhalt

derzeitige Tätigkeit:

Produktmanager im Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Tino Galgon

Halle, den