Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Anja Genzlinger

Kaiserslautern 1998

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. Dezember 1998

Prüfungskommission:
Vorsitzender: Prof. Dr. J. Cullum
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Diese Dissertation wurde in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die diese Arbeit ermöglicht haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl für die Überlassung des interessanten Themas und für die fortwährende Unterstützung und Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. Eisenbrand möchte ich mich besonders für die Entscheidung zu Gunsten α,β-ungesättigter Aldehyde und Ketone als Testsubstanzen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Konstantinos Romanakis für seine Disskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Durchflußzytometrie.

Frau Gabriele Seidel und Herrn Volker Louis danke ich für die Hilfe bei der Korrektur der Rechtschreibung.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung Humanbiologie bedanke ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und das angenehme und offene Arbeitsklima. Ein besonderer Dank geht an Vera Fritzinger.

Apoptosis is a concept that may be considered as one of the most formidable in biology, whose significance is equivalent to that of the cell cycle.

L. D. Tomai and F. O. Cope

Für Volker

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretische Einführung **1**

1.1 Zelltod: Apoptose und Nekrose1 1

1.1.1 Nekrose 1

1.1.2 Apoptose 1

1.1.2.1 Morphologie der Apoptose 2

1.1.2.2 Biochemische Veränderungen während der Apoptose 3

1.1.2.3 Genetische Steuerung der Apoptose 4

1.1.2.4 DNA-Fragmentierung 5

1.2 Durchflußzytometrie 7

1.2.1 Optisches System 7

1.2.2 Durchflußsystem und Datenverarbeitung 8

1.2.3 Zellzyklus und Variationskoeffizient (CV) 9

1.2.4 Anwendung 12

1.2.5 Durchflußzytometrische Messung von Merkmalen apoptotischer Zellen 12

1.2.5.1 DNA-Gehalt 12

1.2.5.2 Protein und RNA-Gehalt 13

1.2.5.3 Lichtstreuung 13

1.2.5.4 Veränderungen der Plasmamembran 14

1.2.5.5 Analyse der Zellorganellen 15

1.2.5.6 Denaturierungssensitivität der DNA in situ 15

1.3 α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone 16

1.3.1. Allgemeine Struktur 16

1.3.2 Vorkommen und Eigenschaften 16

1.3.3 Biogenese 18

1.3.3.1 Autoxidation ungesättigter Fettsäuren 19

1.3.3.2 Enzymatische Lipidoxidation 20

1.3.4 Reaktivität 21

1.3.5 Metabolismus 22

1.3.6 Biologische Wirkung: Zytotoxizität, Mutagenität, Carcinogenität 23

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit 26

2. Material und Methoden **27**

2.1 Materialien und Geräte 27

2.2 Zellkultur 30

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (Trypanblau-Ausschlußtest) 30

2.2.2 Zytotoxizitätstest 30
2.2.3 Zellinien 30
2.2.3.1 Die Zellinie HL-60 31
2.2.3.2 Die Zellinie K562 31
2.2.3.3 Die Zellinie Molt4 31
2.2.3.4 Die Zellinie U937 31
2.2.4 Kultivierungsbedingungen 31
2.2.5 Versuchsaufbau 32
2.2.5.1 Actinomycin D 32
2.2.5.2 Versuchsdesign 33
2.2.6 Abernten 34
2.2.6.1 Aberntung der Zellkultur für die DNA-Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie 34
2.2.7.2 Aberntung der Zellkultur für die DNA-Isolation 35
2.3 Durchflußzytometrie 36
2.3.1 Präparation eines Standards 36
2.3.2 Färbung der Zellen mit DAPI/Sulforhodamin101 36
2.3.3 2-Parameter-Messung des DNA- und Proteingehaltes 37
2.3.4 Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid 38
2.3.5 Zwei-Parameter-Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid 38
2.4 Zytospinpräparation 40
2.4.1 Herstellung von Zytospinpräparaten 40
2.5 Fluoreszenzmikroskopie 41
2.5.1 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 41
2.6 DNA-Isolation 42
2.6.1 Selektive Isolation niedermolekularer DNA-Fragmente 42
2.6.2 Gelelektrophoretische Analyse der DNA 43
2.7. Statistik 44

3. Ergebnisse 45
3.1. Induktion von Apoptose durch Actinomycin D 45
3.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Actinomycin D auf die Zellinie U937, HL-60, K562 und Molt4 45
3.1.2 Analyse der Induktion von Apoptose mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 48
3.2 Apoptoseinduzierendes Potential von 2-Cyclohexen-1-on 49
3.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose 49
3.2.1.1 Durchflußzytometrische Analyse 49

3.2.1.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 51
3.2.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose 54
3.2.2.1 Durchflußzytometrische Analyse 54
3.2.2.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 55
3.2.3. Analyse der Induktion von Apoptose mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 58
3.2.4 Einfluß von 2-Cyclohexen-1-on auf den Zellzyklus 58
3.2.4.1 Phasenspezifität von 2-Cyclohexen-1-on 60
3.3 Apoptoseinduzierendes Potential α,β-ungesättigter Aldehyde 62
3.3.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal 62
3.3.1.1 Durchflußzytometrische Analyse 62
3.3.1.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 64
3.3.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal 66
3.3.2.1 Durchflußzytometrische Analyse 66
3.3.2.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 68
3.3.3 Analyse der Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 70
3.3.4 Einfluß von trans-2-Hexenal auf den Zellzyklus 70
3.3.4.1 Phasenspezifität von trans-2-Hexenal 71
3.3.5 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al 73
3.3.5.1 Durchflußzytometrische Analyse 73
3.3.5.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 75
3.3.6 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al 77
3.3.6.1 Durchflußzytometrische Analyse 77
3.3.6.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 79
3.3.7 Analyse der Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 82
3.3.8 Einfluß von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al auf den Zellzyklus 82
3.3.8.1 Phasenspezifität von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al 83
3.3.9 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal 85
3.3.9.1 Durchflußzytometrische Analyse 85
3.3.9.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 87
3.3.10 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal 91
3.3.10.1 Durchflußzytometrische Analyse 91
3.3.10.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien 92

3.3.11 Analyse der Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal

mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 96
3.3.12 Einfluß von 2-trans,6-cis-Nonadienal auf den Zellzyklus 96
3.3.12.1 Phasenspezifität von 2-trans,6-cis-Nonadienal 97
3.3.13 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal 99
3.3.13.1 Durchflußzytometrische Analyse 99
3.3.14 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal 100
3.3.14.1 Durchflußzytometrische Analyse 100
3.3.15 Analyse der Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese 102
3.3.16 Einfluß von trans-2-Octenal auf den Zellzyklus 102
3.3.16.1 Phasenspezifität von trans-2-Octenal 102
3.4 Untersuchungen mit Annexin V 104
3.5 Einfluß der Kettenlänge auf die Apoptoseinduktion bei den Zellinien U937 und HL-60 107

4. Diskussion 109
4.1 Methodik 109
4.1.1 Wahl der Zellkultursysteme 109
4.1.2 Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes 111
4.2. Kritische Aspekte bei der Analyse apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie 113
4.2.1 Benutzung unfixierter Zellen und Detergenzlösungen bei DNA-Gehaltsanalysen 113
4.2.2 Standardisierung 114
4.2.3 Prozentsatz apoptotischer Zellen 114
4.2.4 Unterscheidung zwischen spät apoptotischen und nekrotischen Zellen 115
4.3 Vergleichende Analyse der eingesetzten Methoden 116
4.3.1 2-Parameter-Durchflußzytometrie: DNA - und Proteingehalt 117
4.3.2 Morphologische Analyse 119
4.3.3 DNA-Fragmentierung 122
4.3.4 Zusammenfassung der vergleichenden Analyse 123
4.3.5 Untersuchungen mit AnnexinV 125
4.3.6 Vergleich der DNA-/Protein-Messung mit anderen durchflußzytometrischen Methoden zur Apoptosedetektion 127
4.4 Diskussion der Untersuchungen mit α,β-ungesättigten Aldehyden und Ketonen 129
4.4.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose 129
4.4.1.1 Durchflußzytometrische Analyse 131
4.4.1.2 Mikroskopische Analyse 133
4.4.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose 134

4.4.2.1 Durchflußzytometrische Analyse 135
4.4.2.2 Mikroskopische Analyse 137
4.4.3 Zellzyklusspezifität α,β-ungesättigter Aldehyde und Ketone 138
4.5 Einfluß der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen auf die Apoptoseinduktion 141

5. Zusammenfassung 144

6. Literaturverzeichnis 147

7. Anhang 164

Abkürzungverzeichnis

Abb	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches AMP
°C	Grad Celcius
ced	cell death defective
CV	coefficient of variation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsb	Doppelstrangbrüche
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EtOH	Ethanol
FCM	Flow Cytometry (Durchflußzytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vörwärtsstreulicht
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HMW	High molecular weight
ICE	Interleukin-1ß-konvertierendes Enzym
µ	mikro
M	Molarität
MMC	MitomycinC
M-Phase	Mitotische-Phase
min	Minute
ml	Milliliter
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natürliche Killerzellen

nm	Nanometer
OT	Objektträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
ssb	Einzelstrangbrüche
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
Tab	Tabelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
upm	Umdrehungen pro Minute
7-AMD	7-ActinomycinD
PI	Propidiumjodid
SCE	Schwester-Chromatid-Austausche

1 Theoretische Einführung

1.1 Zelltod: Apoptose und Nekrose

In allen Organismen ist die Kontrolle der Zellzahl das Resultat eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Zelltod. Letzterer kann grob in 3 Kategorien eingeteilt werden:

a) Nekrose, ein passiver, degenerativer Prozeß, welcher nach massiver Zellschädigung auftritt
b) Terminale Differenzierung von Geweben, wie z.B. Haut, Dünndarm und Erythrozyten
c) Apoptose oder programmierter Zelltod (PCD), ein aktiver, physiologischer Mehrschritt Mechanismus, ausgelöst durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli, welche ein inneres, festgelegtes Programm aktivieren und schließlich zum Zelltod führen (Kerr et al., 1972).

1.1.1 Nekrose

Nekrose, auch als „accidental cell death" bezeichnet, ist die Antwort von Zellen auf schwere und plötzliche Verletzungen (z.B. durch starke physikalische oder chemische Reize wie Hyperthermie, zytotoxische Konzentrationen bestimmter Substanzen). Durch den Verlust der Membranintegrität und des osmotischen Gleichgewichtes schwellen die Zellen und verschiedene Organellen, insbesondere die Mitochondrien an. Durch das Freisetzen von Zellfragmenten in das umliegende Gewebe kommt es durch proteolytische Enzyme zu entzündlichen Reaktionen (Kerr et al., 1972; Whyllie et al., 1993). Das Kernchromatin zeigt dabei unregelmäßige Kondensierung und der Kern wird langsam aufgelöst (Karyolyse).

1.1.2 Apoptose

Kerr et al. beschrieben 1972 zum ersten Mal die morphologischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes und führten den Begriff Apoptose als Gegensatz zur Mitose ein. Der Begriff Apoptose stammt aus dem griechischen und beschreibt ursprünglich das Abfallen von Blättern bei Bäumen. Eine solche Art des Zelltodes wurde zum ersten Mal für die normale Entwicklung bei Vertebraten (Glückmann et al., 1951) und Invertebraten (Saunders et al., 1966) beobachtet. Apoptose findet z.B. während der Embryogenese (Williamson R., 1970), der Zellerneuerung in normalem erwachsenen Gewebe, der Entwicklung des Immunsystems (Cohen et al., 1991; Golstein et al., 1991), der Thymozytenreifung und der Seneszenz von neutrophilen Granulozyten statt und kann durch unterschiedliche Faktoren, wie z.B. TNF, Fas-Ligand (natürlicher Faktor, der über das Fas-Antigen PCD auslöst), Antikörper

(z.B. Anti-Apo-1), UV- und γ-Strahlung, Chemikalien usw. induziert werden. Auch funktionell lösen viele Zelltypen oder Mechanismen des Immunsystems Apoptose aus, so z.B. zytotoxische T-Zellen (Rouvier et al., 1993) und natürliche Killerzellen (NK). Das extrazelluläre apoptoseauslösende Signal wird meistens durch Zytokine, Wachstumsfaktoren (z.B. NGF) oder Zell-Zell-Kontakte übermittelt.

1.1.2.1 Morphologie der Apoptose

Die morphologischen Veränderungen während der Apoptose können in 3 Phasen unterteilt werden (Arends et al.,1990).

1. Phase: Die frühesten sichtbaren Veränderungen sind der Verlust von Zell-Zell-Interaktionen und speziellen Membranstrukturen wie z.B. der Mikrovilli und Pseudopodien. Durch Dehydrierung der Zelle kommt es im weiteren Verlauf zur Kondensierung des Zytoplasmas, gefolgt von Veränderungen der Zellform und Größe. Das Chromatin kondensiert in Schollen an der Kernperipherie und der Kern nimmt häufig eine Halbmond- oder Sichelform an. Außerdem kann man die Auflösung der Nucleoli, die Verdichtung einiger zytoplasmatischer Organellen sowie eine Ausdehnung des ER beobachten. Die Mitochondrien bleiben in diesem Stadium der Apoptose morphologisch unverändert.

2. Phase: Diese kann mit der 1. Phase überlappen und zeigt hauptsächlich eine Lappung der Zelle (Membranblebbing, Zeiose) und die Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis). Diese Kernfragmente werden mit Zytoplasma und Organellen zu membranumhüllten apoptotischen Bodies gepackt und abgespalten. In vivo erfolgt dann eine schnelle Phagozytose durch benachbarte Zellen und Makrophagen, wodurch eine entzündliche Reaktion im Gewebe verhindert wird.

3. Phase: In der 3. Phase kommt es zu einer fortschreitenden Degenerierung der restlichen Kern- und Zytoplasmastrukturen, welche an Nekrose erinnert. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer sekundären Nekrose (Arends et al., 1990).

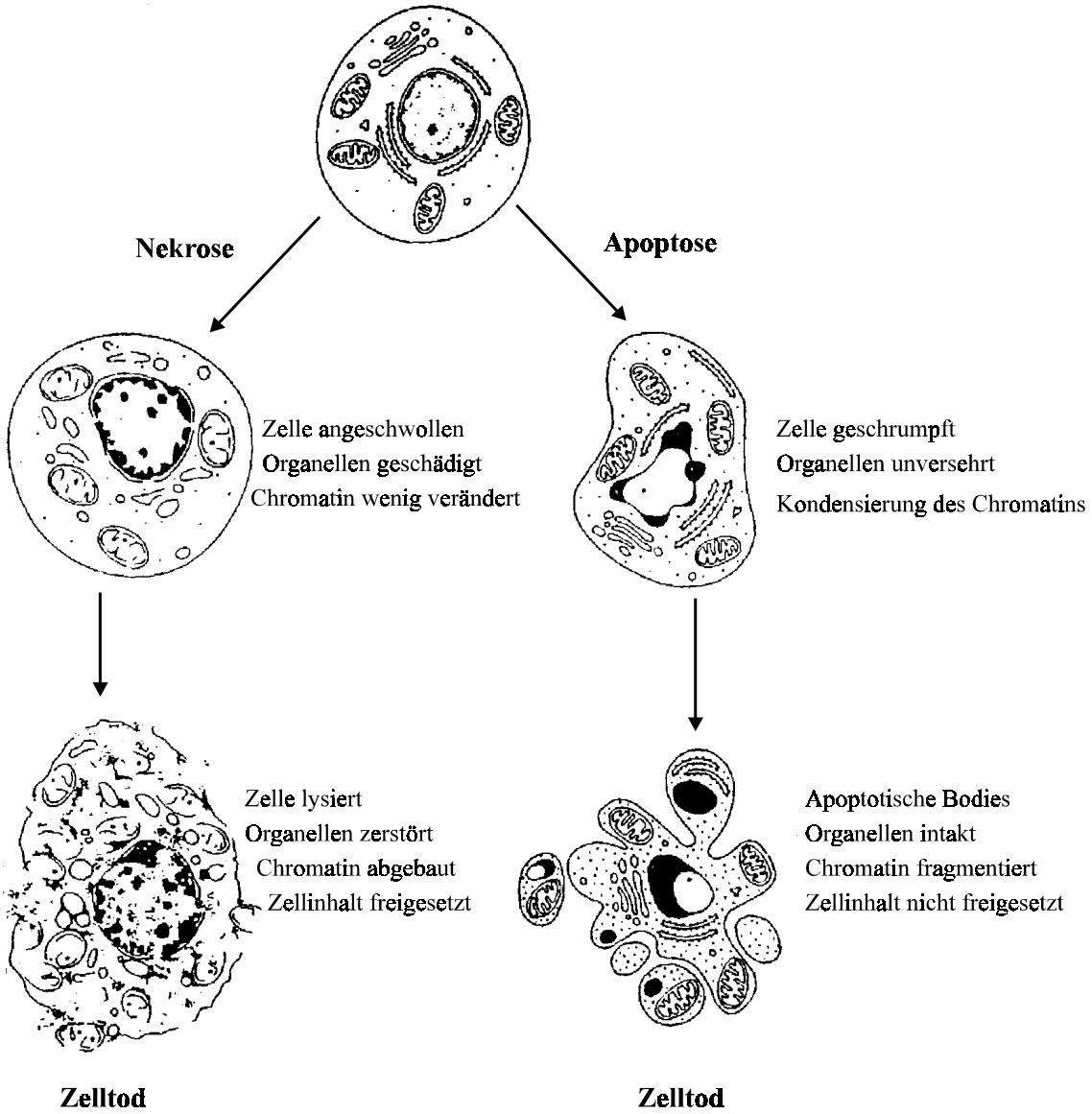


Abb.1.1: Morphologische Charakteristika der Nekrose und Apoptose (Darzynkiewicz et al.,1997).

1.1.2.2 Biochemische Veränderungen während der Apoptose

Obwohl Apoptose durch eine komplexe Vielfalt potentieller Aktivatoren ausgelöst werden kann (z.B. Cytokine, Onkogene, Mangel an Wachstumsfaktoren und DNA-schädigende Substanzen), liegt ihr anscheinend immer ein einheitlicher, hochkonservierter Mechanismus zugrunde. Die Apoptose repräsentiert eine Anzahl koordinierter biochemischer Ereignisse und beginnt normalerweise mit einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration, welcher über second messenger (z.B. Calmodulin, cAMP) zu Veränderungen bestimmter Enzymaktivitäten führt. Es kommt zur Aktivierung von Ca^{2+}- und Mg^{2+}-abhängigen Endonucleasen, die

präferentiell internucleosomal DNA schneiden (Sellins et al., 1991) und so zur DNA-Degradierung (nucleosomale/oligo-nucleosomale DNA-Fragmente) und Chromatinkondensation führen. Des weiteren findet man die Aktivierung von Ca^{2+}-abhängigen Transglutaminasen, die zytoplasmatische Proteine vernetzen und die Bildung eines Proteinscaffolds bedingen. Ebenso werden Proteasen, wie z.B. Calpain, die das Zytoskelett und integrierte Membranproteine abbauen, mobilisiert.

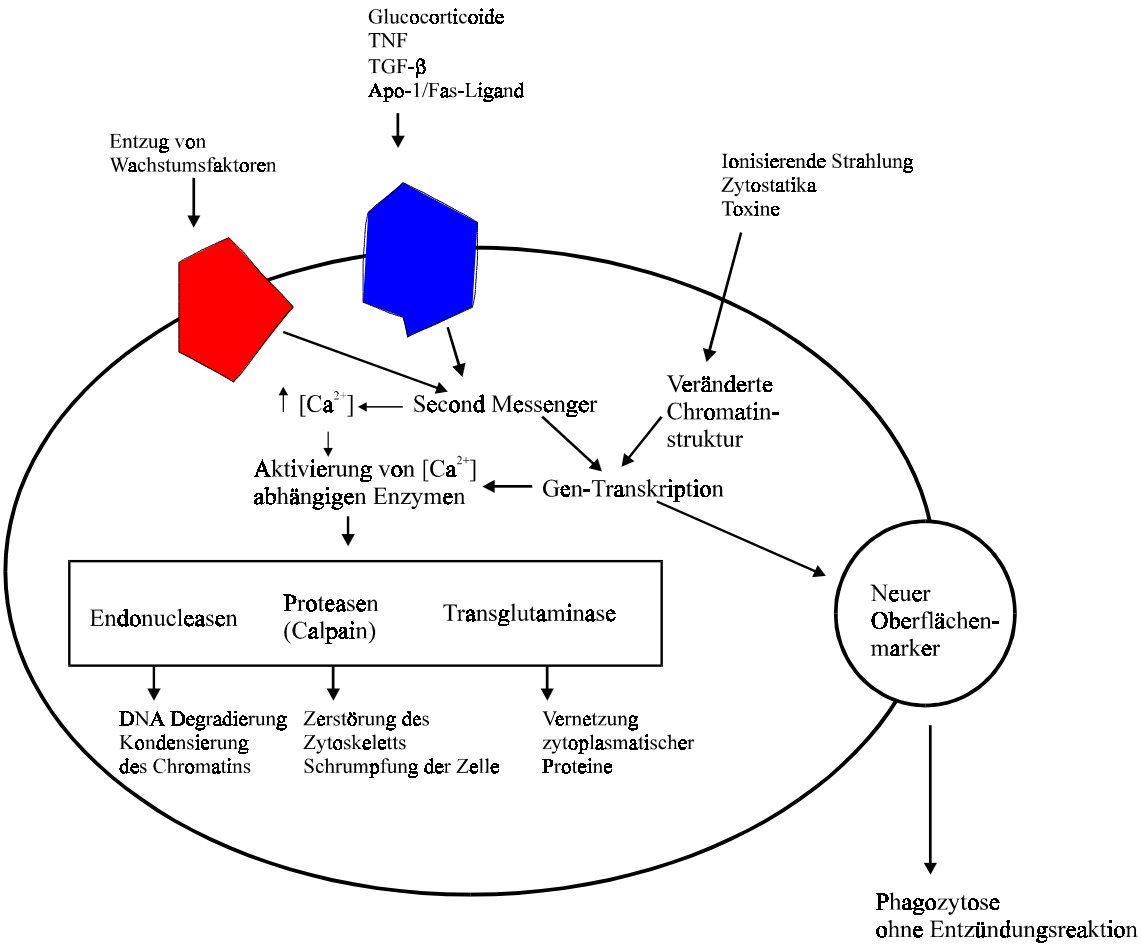


Abb.1.2: Metabolische Ereignisse während der Apoptose (aus Carson et al., 1993).

1.1.2.3 Genetische Steuerung der Apoptose

In genetischen Sudien an dem Nematoden *C.elegans* wurden drei Gene identifiziert (Ellis et al.,1986, 1991), die während der Apoptose eine Rolle spielen: *ced-3, -4 und ced-9* (cell death defective). *ced-3* und *-4* sind notwendig, um Apotose auszulösen, *ced-9* schützt sie vor Apoptose. Das *ced-3*-Gen wiederum kodiert ein Protein, das Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der Familie der Interleukin-1β-converting Enzyme (ICE, Cystein-Protease, van Engeland et

al., 1998) bei Säugern hat. Die Überexpression von *ced-3* als auch von ICE löst in Säugetierzellen Apoptose aus. *Ced-9* ist äquivalent zu dem Protoonkogen bcl-2 und wirkt als „Zelltod-Supressor-Gen". Die bcl-2 Genfamilie greift in die initiale Phase der Apoptose durch Schutz der Zellen vor dem Zelltod ein und wirkt damit gegensätzlich zur bax Genfamilie (van Engeland et al., 1998).

Weitere Kandidatengene sind TRPM-2 (Testosterone-repressed prostatic message-2) in Prostatazellen und Fas/APO-1 in T-Lymphozyten (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992). Extrazelluläre Signale werden oftmals über Rezeptoren vermittelt. Zu diesen Oberflächenstrukturen gehören unter anderem Fas (auch APO-1 oder CD95 genannt). Fas ist ein Gen, dessen Produkt einen Membranrezeptor darstellt, der Ähnlichkeiten zu dem TNF- und NGF-Rezeptor aufweist und deshalb der TNF/NGF-Rezeptor Superfamilie zugeordnet wird. In Zellen, die Fas natürlicherweise oder nach Transfektion exprimieren, kann Apoptose durch die Bindung agonistischer Antikörper (z.B. Anti-APO-1-Antikörper) an Fas oder durch den natürlichen Liganden Fas-L induziert werden (Krammer et al., 1989).

Weitere Gene werden mit Apoptose in Verbindung gebracht. So stellen Fibroblasten, die c-myc exprimieren, bei geringen Serumkonzentrationen im Medium nicht das Wachstum ein, sondern sterben apoptotisch (Evan et al., 1992). Da c-myc auch proliferative Signale übermitteln kann, hängt es von zusätzlichen Signalen ab, ob die Zelle apoptotisch stirbt oder überlebt. Andere Kandidatengene sind z.B. p53 (Tumorsupressor-Gen, kann Zellteilung anregen oder Apoptose aktivieren), c-fos ,TGF-β1 und ras (Ueda et al., 1994; Götz et al., 1995; Guillouf et al., 1995).

1.1.2.4 DNA-Fragmentierung

Das bedeutendste biochemische Merkmal für Apoptose ist das Auftreten von 180-200bp großen, internucleosomalen DNA-Fragmenten. Diese Fragmente erzeugen in einer konventionellen Gelelektrophorese eine typische DNA-Leiter (Whyllie et al., 1980). Diese internucleosomale Spaltung der DNA resultiert aus der Aktivierung einer oder mehrerer Endonucleasen, welche die DNA in den Linkersequenzen schneidet. Als Kandidaten stehen NUC-18 (Caron-Leslie et al., 1991), DNase I (Ucker et al., 1992; Peitsch et al., 1993) oder DNase II (Barry and Eastman, 1993) zur Diskussion.

Veränderungen in der DNA können optimalerweise durch Pulsfeldgelelektrophorese nachgewiesen werden. Mit dieser Technik kann die Unversehrheit der DNA bis zu einem Molekulargewicht von 2Mbp überprüft werden (Carle et al., 1986), während mit der konventionellen DNA-Gelelektrophorese nur Fragmente bis 20kbp und darunter analysiert

werden können. So konnte z.B. für Thymozyten und Lymphozyten (Walker et al., 1991; Roy et al., 1992) nach einer Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren oder Dexamethason das Auftreten von 50 und 300kbp-Fragmenten gezeigt werden. Es wird angenommen, daß die 300kbp-Fragmente durch Interaktion der Substanzen mit Topoisomerase II-Molekülen, welche an bestimmten Stellen im Chromatin lokalisiert sind, zustandekommen und „Chromatinrosetten“ darstellen (Filipski et al., 1990). Die 50kbp und 180-200kbp-Fragmente dagegen sind Produkte einer endonucleolytischen Spaltung, wobei angenommen wird, daß die 50kbp-Fragmente durch die Freisetzung von „Chromatinloops“ entstehen.

Die beobachtete DNA-Fragmentierung ist jedoch nicht ursächlich am programmierten Zelltod beteiligt, da Zellen ohne Nukleus weiterhin Apoptose ausführen können (Schulze-Osthoff et al., 1994). Untersuchungen an einer Anzahl von epithelialen und mesenchymalen Zellinien konnten zeigen, daß trotz des Auftretens morphologischer Apoptosemerkmale keine DNA-Leiter detektiert werden konnte (Oberhammer et al., 1993).

1.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (FCM von Flow Cytometry) hat in den vergangenen Jahren vor allem in der biologischen und medizinischen Forschung sowie in der Diagnostik verstärkt Eingang gefunden. Die Durchflußzytometrie stellt dabei ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Das Anwendungsspektrum reicht von Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zu funktionellen Untersuchungen, wie z.B. intrazelluläre Stoffwechselvorgänge. Diese Entwicklungen stammen im wesentlichen aus den Laboratorien von Herzenberg (Stanford, USA, Charakterisierung und Isolierung von T- und B-Lymphozyten), von Göhde und Dittrich (Münster, Zellproliferation), Kamentsky (Boston, Identifizierung von Tumorzellen und von Valet und Kachel (München, Erarbeitung multiparametrischer zellulärer Funktionsanalysen) (Schmitz und Rothe 1994).

Voraussetzungen für dieses Verfahren sind:

- eine möglichst hohe Spezifität und Selektivität der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe für die zu analysierenden Parameter
- Proportionalität zwischen den zu untersuchenden Parametern, der eingelagerten Farbstoffmenge und der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Farbstoffs (Melamed et al., 1990)
- Vorliegen einer Suspension aus einzelnen Zellen oder Partikeln

1.2.1 Optisches System

In der Regel kommen zwei Anregungsquellen zur Anwendung: die Quecksilber- oder Xenon-Hochdrucklampen und Argon-Laser. In dieser Arbeit wird zur Bestimmung des sogenannten Sub-G1-Peaks ein Durchflußzytometer Modell PasIII der Firma Partec (Münster) verwendet. Als Lichtquelle dient hierbei eine stromstabilisierte 100 Watt Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100/2L, Partec). Je nach eingesetzten Fluorochromen werden die Filter- und Spiegelsysteme geändert. Der Vorteil dieses optischen Systems liegt in der hohen Leuchtdichte, welches ein von 254nm-800nm nutzbares Spektrum liefert und somit nach geeigneter Erregerfilterung alle zur Färbung von Zellinhaltsstoffen geeignete Fluorochrome anregen kann. Der Nachteil der einfachen Quecksilberhochdrucklampen ist die kurze Lebensdauer, die geringe Strahlungsintensität im wichtigen Blaubereich und die mit

zunehmendem Alter auftretende Vergrößerung der Elektrodenabstände und das daraus resultierende Flackern des Lichtes.
Der nur für einige exemplarische Messungen apoptotischer Zellen eingesetzte Coulter EPICS XL-MCL der Firma Coulter Electronics (Krefeld) verfügte über einen luftgekühlten, Software kontrollierten 15mW Argon-Ionen-Laser, welcher bei 488nm arbeitet. Der Laserstrahl wird durch Linsen fokussiert und wird senkrecht zum Probenstrom gehalten. Die Vorteile des Lasers beruhen auf dem monochromatischen, sehr hellen und hoch polarisierten Licht.

1.2.2 Durchflußsystem und Datenverarbeitung

Das Meßprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung, d.h. die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Durch Preßluft gelangen die in Suspension vereinzelt und gefärbt vorliegenden Partikel in eine Kapillare, aus der sie in die Probenkammer geschleust werden. Ein Hüllstrom aus entgastem Wasser erzeugt in dieser Kapillare mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, mit der die Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf die Meßstelle zugeführt werden. Auf diese Weise wird jeder Partikel einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geleitet. Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers ist abhängig von der angelegten Hochspannung. Passiert ein Partikel die Meßpore, so steigt das Fluoreszenzlicht bis auf ein Maximum an und fällt anschließend auf das Gleichgewichtsniveau zurück, wobei das zugehörige Signal eine konstante Dauer hat. Die Durchflußrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert (siehe Abb.1.3).

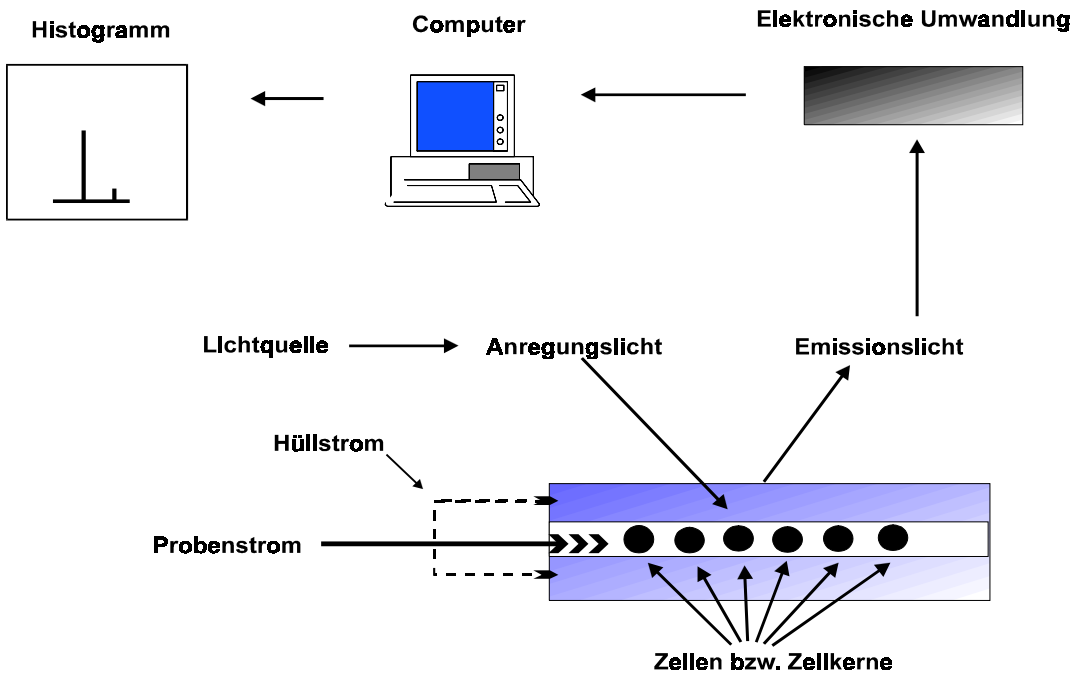


Abb.1.3: Schematische Darstellung des Meßprinzips bei der Durchflußzytometrie

1.2.3 Zellzyklus und Variationskoeffizient (CV)

Bei der DNA-Gehaltsmessung einer proliferierenden Zellpopulation ergibt sich ein dem Zellzyklus entsprechendes Verteilungsmuster. In der Zellzyklusanalyse können verschiedene Phasen erfaßt werden (siehe Abb.1.4).

- **G_0/G_1-Phase:** Zeitraum zwischen der letzten mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese einer Zelle. Die Zelle hat in diesem Intervall den einfachen diploiden DNA-Gehalt (2c)
- **Synthese-Phase:** DNA-Replikation, kontinuierlicher Anstieg bis zum Erreichen des doppelten diploiden DNA-Gehaltes (4c)
- **G_2/M-Phase:** In der G2-Phase synthetisiert die Zelle mitotisch aktive Enzyme und es laufen postreplikative Reparaturmechanismen ab. Der DNA-Gehalt verändert sich nicht mehr. Während der sich anschließenden Mitose-Phase teilt sich die Zelle in zwei diploide Tochterzellen, die daraufhin in die G_1-Phase eines neuen Zellzyklus respektive in die Ruhe-Phase G_0 eintreten.

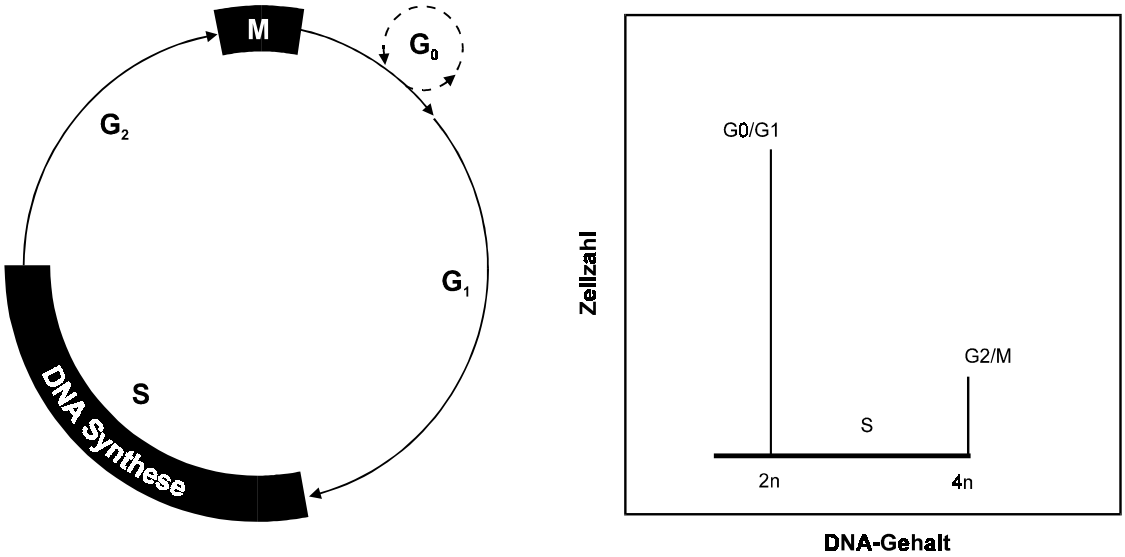


Abb.1.4: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen und des dazugehörigen 1-Parameter-Histogramms. G0/G1-Zellen haben einen einfachen dilpoiden DNA-Gehalt, welcher in der S-Phase kontinuierlich ansteigt bis zum doppelten diploiden DNA-Gehalt in der G2/M-Phase.

Apoptotische Zellen werden bei DNA-Gehaltsmessungen als sogenannter **Sub-G1-Peak** (Nicoletti et al., 1991; Darzynkiewicz et al., 1992) dargestellt (siehe Abb.1.5).

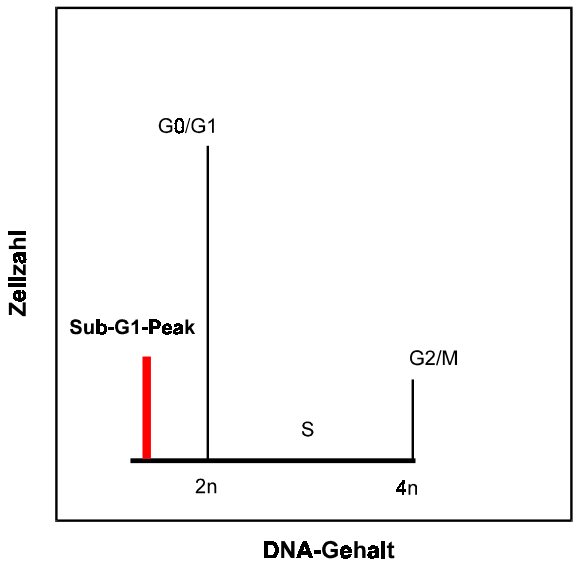


Abb.1.5: Schematische Darstellung eines 1-Parameter-Histogrammes mit Sub-G1-Peak.

Bei der gleichzeitigen Messung des Proteingehaltes ist es zudem möglich, G_0-und M-Phase-Zellen aufgrund ihres unterschiedlichen Proteinmusters von G_1-bzw. G_2-Phase-Zellen zu unterscheiden (Zucker et al., 1988).

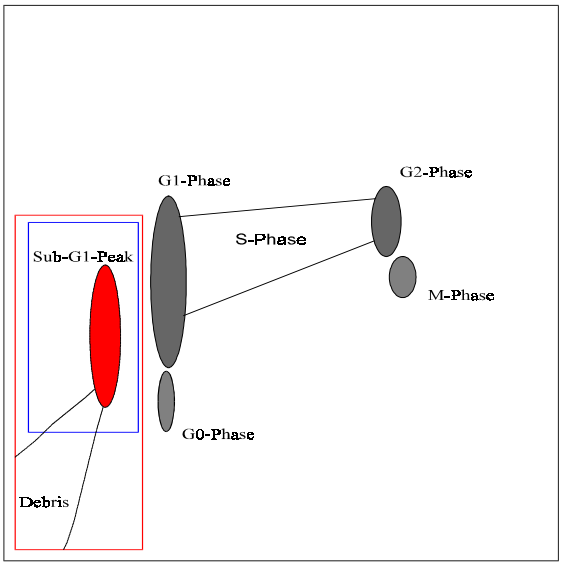


Abb.1.6: Schematische Darstellung eines 2-Parameter-Dot-Plots bei der Messung von DNA-Gehalt gegen Proteingehalt. Dieser Dot-Plot zeigt neben den einzelnen Zellzyklusphasen auch die typische Darstellung apoptotischer Zellen als „Sub-G1-Peak“ sowie Debris. Das rote Gate stellt den als Sub-G1 gesamt ausgewerteten Bereich, das blaue Gate den als Apoptose ausgewerteten Bereich dar.

Ein Maß für die Genauigkeit einer durchflußzytometrischen Einparametermessung ist der Variationskoeffizient (CV), der an der Breite des G_0/G_1 -Peaks bestimmt wird. Er definiert sich nach folgender mathematischer Formel:

$$CV = \frac{\text{Breite des Peaks bei halber Höhe}}{\text{Kanalnummer K x 2.35}} \text{ x } 100$$

Je geringer der CV-Wert ist, desto besser ist die Auflösung der Messung. Messungen mit einem CV>5.0 sollten daher von den Auswertungen ausgeschlossen werden. Je präziser die Auflösung der Peaks, um so genauer ist die Aussagekraft des Meßergebnisses.

1.2.4 Anwendung

Neben den in 1.2 erwähnten Anwendungsgebieten wird die Durchflußzytometrie als Methode der Wahl angesehen, um die verschiedenen Aspekte der Apoptose zu untersuchen (Darzynkiewicz et al., 1997). Von Vorteil ist dabei die schnelle Multiparameter-Analyse großer Populationen, wobei durch Einsatz von verschiedenen Fluorochromen die Veränderungen in der Zellmorphoplogie, der Struktur der Plasmamembran, des Stofftransportes, in der Funktion der Zellorganellen, in der DNA-Stabilität bezüglich Denaturierung sowie die endonucleolytische DNA-Degradierung untersucht werden kann.

1.2.5 Durchflußzytometrische Messung von Merkmalen apoptotischer Zellen

1.2.5.1 DNA-Gehalt

Ein charakteristisches Ereignis während des apoptotischen Zelltodes, das extensive Schneiden der DNA, kann eingesetzt werden, um Apoptose durchflußzytometrisch zu detektieren. Dabei gibt es zwei verschiedene Ansätze:

Zum einen kann man den zellulären DNA-Gehalt nach der Behandlung der Zellen mit einem Detergenz oder einer Fixierung mit Alkohol oder Aceton messen. Die Permeabilisierung durch eine solche Behandlung setzt die degradierte DNA frei, sodaß diese DNA-Fraktion während der Färbe- und Waschschritte zuerst aus dem Kern ins Zytoplasma gelangt und nach der Herstellung einer Kernsuspension ganz entfernt wird. Aus diesem Grund besitzen apoptotische Zellen einen „reduzierten“ DNA-Gehalt und stellen sich nach der Färbung der zellulären DNA als Sub-G1-Peak im Histogramm dar (Umanski et al., 1981; Nicoletti et al., 1991; Elstein et al., 1994 und 1995). Der Anteil degradierter DNA variiert innerhalb der verschiedenen Apoptosestadien, zwischen Zelltypen und oft auch zwischen den verschiedenen apoptoseinduzierenden Substanzen. Auch die Extrahierbarkeit der Fragmente variiert. Gong et al.(1994) zeigten, daß die Extrahierbarkeit durch die Behandlung der Zellen mit hochmolarem Phosphatpuffer stark erhöht werden kann. Da die Messung des DNA-Gehaltes auch über die Zellzyklusverteilung der nichtapoptotischen Zellen Aufschluß gibt, kann diese Methode genutzt werden, um eine Aussage über die Zellzyklusspezifität der Apoptose zu machen.

Zum anderen resultiert die während der Apoptose stattfindende endonucleolytische Spaltung der DNA in einer großen Anzahl freier 3’ OH-Enden. Nekrotische Zellen oder Zellen mit primären Brüchen, welche durch ionisierende Strahlung oder Brüche induzierende Substanzen

hervorgerufen wurden, zeigen sehr viel weniger Strangbrüche (Gorczyca et al., 1992). Die freien 3' OH-Enden können entweder durch eine exogene terminale Transferase oder eine DNA Polymerase mit fluoreszenzgekoppelten Nukleotiden markiert und sichtbar gemacht werden (Li et al., 1995).

1.2.5.2 Protein- und RNA-Gehalt

Darzynkiewicz et al. konnten 1992 mit der differentiellen Färbung von DNA und Protein mit DAPI und Sulforhodamin101 zeigen, daß apoptotische Zellen zusätzlich zu ihrem „erniedrigten" DNA-Gehalt auch einen deutlich erniedrigten Proteingehalt aufweisen. In früheren Studien wurde bei der Induktion von Apoptose bei HL-60-Zellen oder Thymozyten durch verschiedene Induktoren (unter anderem auch Topoisomerase I und II Inhibitoren) das parallele Auftreten einer Abnahme des DNA-Gehaltes und des Proteingehaltes ebenfalls beobachtet (Del Bino et al, 1990 und 1992). Da die Plasmamembran bei nekrotischen Zellen zerstört ist, ist auch hier der Proteingehalt reduziert. Weil aber der DNA-Gehalt zunächst nicht stark verändert wird, ist das DNA/Protein-Verhältnis von nekrotischen Zellen höher als bei lebenden oder apoptotischen Zellen und ermöglicht so eine Unterscheidung.

Die gleichzeitige Färbung von DNA und RNA-Gehalt erlaubt die Unterscheidung von G1- und G0-Phase-Zellen. So konnte für Thymozyten, die mit Prednisolon oder Camptothecin behandelt wurden, gezeigt werden, daß Apoptose selektiv in G0-Phase-Zellen ausgelöst wurde (Bruno et al.,1992). Die hierfür eingesetzten Farbstoffe Acridinorange oder Pyronin können jedoch nicht eindeutig zwischen RNA und ssDNA unterscheiden, so daß ein Anstieg an denaturierter DNA einen Verlust an RNA kompensieren kann (Darzynkiewicz et al., 1992). Bei nekrotischen Zellen ist durch die zerstörte Membran der RNA-Gehalt minimal und erlaubt so eine Trennung von lebenden oder apoptotischen Zellen.

1.2.5.3 Lichtstreuung

Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl eines Durchflußzytometers, streut sie das Laserlicht. Durch die Analyse dieses Streulichtes bekommt man Informationen über die Zellgröße und Struktur (Salzmann et al., 1990). Hierbei korreliert das Vorwärtsstreulicht mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität, Lichtbrechung und dem Vorhandensein intrazellulärer Strukturen, welche das Licht brechen können. Diese Lichtstreuung verändert sich nun während des Zelltodes und reflektiert dabei morphologische Veränderungen wie Anschwellen oder Schrumpfung von Zellen, Reißen der Zytoplasmamembran, Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung, sowie die Bildung und Abspaltung von apoptotischen Bodies.

Nekrose geht dabei mit einem initialen Anstieg der Lichtstreuung (Anschwellen der Zellen) einher. Diesem folgt ein schneller Abfall (Reißen der Plasmamembran, Freisetzung der Zellbestandteile) sowohl des Vorwärts-, als auch des Seitwärtsstreulichtes (Darzynkiewicz et al., 1997). Während der Apoptose wird dagegen der Abfall des Vorwärtsstreulichtes nicht von einem gleichzeitigen Abfall des Seitwärtsstreulichtes begleitet. In späteren Apoptosestadien ist jedoch die Intensität in beide Richtungen erniedrigt (Ormerod et al., 1995; Swat et al., 1981). Darüber hinaus sind diese Veränderungen aber nicht spezifisch für apoptotische Zellen, denn isolierte Kerne oder mechanisch zerstörte Zellen zeigen ebenso wie nekrotische Zellen eine erniedrigte Streuung des Lichtes.

1.2.5.4 Veränderungen der Plasmamembran

Ein weiteres Merkmal bei der Unterscheidung von toten und lebenden Zellen ist der Verlust der Transportfunktion über die Plasmamembran und oft auch deren strukturelle Zerstörung. Da die intakte Membran lebender Zellen geladene kationische Farbstoffe wie z.B. Trypanblau, Propidiumiodid, Ethidiumiodid und 7-AMD ausschließen, werden diese zur Bestimmung der Viabilität eingesetzt (Belloc et al., 1994; Jacobs et al., 1983; Lyons et al., 1992). Während der Apoptose zeigt die Plamamembran zu Beginn keine großen Veränderungen in Integrität und Struktur (Kerr et al., 1972; Whyllie et al., 1980). Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu Störungen der Transportfunktion bis hin zu einem kompletten Verlust der Ausschlußfähigkeit dieser geladenen Fluorochrome (Belloc et al., 1994). In dieser Phase zeigen apoptotische Zellen eine erhöhte Aufnahme gegenüber Kontrollzellen und man kann nekrotische Zellen (intensive Färbung) von apoptotischen (moderate Färbung) und lebenden Zellen (minimale Färbung) unterscheiden.

In normalen Blutzellen sind Phospholipide asymmetrisch zwischen innerer und äußerer Membranfläche verteilt. Dabei findet man Phosphatidylcholin und Sphingomyelin außen, Phosphatidylserin (PS) dagegen innen. Die Aufrechterhaltung dieser Asymmetrie ist ATP-abhängig. In Abwesenheit von ATP oder während des apoptotischen Zelltodes wird Phosphatidylserine nun auf die äußere Seite transloziert (Flip-Flop-Mechanismus). Dieses Ereignis tritt in sehr frühen Phasen der Apoptose auf, die Zellmembran selbst bleibt intakt (Fadok et al., 1992). Durch den Einsatz des fluoresceinkonjugierten Antikoagulanz Annexin V, welches präferentiell an PS bindet, können apoptotische Zellen identifiziert werden (Koopman et al., 1994).

1.2.5.5 Analyse der Zellorganellen

Obwohl die Mitochondrien morphologisch intakt zu sein scheinen, zeigt sich sehr früh während der Apoptose eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Transmembranpotentials (Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1996). Das geladene kationische grüne Fluorochrom Rhodamin 123 wird in den Mitochondrien lebender Zellen aufgrund ihres Transmembranpotentials akkumuliert (Johnson et al., 1980). Diese Fähigkeit geht während des apoptotischen Zelltodes verloren (Shimizu et al., 1996). Es wurden jedoch auch Hinweise für einen Anstieg gefunden (Metivier et al.,1998).

Auch die Lysosomen eignen sich zur durchflußzytometrischen Untersuchung von apoptotischen Zellen, da deren Protonen-Pumpe intakt bleibt (Del Bino et al., 1991). Verwendet man das metachromatische Fluorochrom Acridinorange in einer niedrigen Konzentration führt dies bei lebenden und apoptotischen Zellen zu einer roten Fluoreszenz (Traganos et al., 1994), während bei nekrotischen Zellen diese stark erniedrigt vorliegt.

1.2.5.6 Denaturierungssensitivität der DNA in situ

Die Tatsache, daß kondensiertes Chromatin, wie es in mitotischen Zellen vorliegt, eine höhere Sensitivität zur Denaturierung zeigt als nichtkondensiertes Chromatin in Interphasezellen (Darzynkiewicz et al., 1994), kann zur Detektion apoptotischer Zellen eingesetzt werden. Apoptotische Zellen haben, ähnlich mitotischen Zellen einen größeren Anteil an denaturierter DNA. Durch den Einsatz von Acridinorange kann man eine differentielle Färbung von dsDNA (grüne Fluoreszenz) und ssDNA (rote Fluoreszenz) erreichen und apoptotische Zellen durch ihre erhöhte rote Fluoreszenz von nicht apoptotischen Zellen unterscheiden. Da nekrotische Zellen auch eine Erhöhung der Rotfluoreszenz zeigen, muß man zusätzlich die Gesamtfluoreszenz zur Unterscheidung hinzuziehen.

1.3 α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone

1.3.1. Allgemeine Struktur

α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone besitzen eine Doppelbindung in Konjugation zur Aldehyd- bzw. Ketonfunktion. Abbildung 1.7 zeigt die allgemeine Struktur dieser Verbindungen.

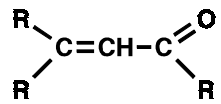


Abb.1.7: Allgemeine Struktur von α,β-ungesättigten Aldehyden und Ketonen.
(R= H, Alkyl, Allyl.....)

1.3.2 Vorkommen und Eigenschaften

In der Natur sind eine ganze Reihe von Enalen und Dienalen als Inhaltsstoffe zahlreicher Obst- und Gemüsepflanzen weit verbreitet (Schauenstein et al., 1977). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden fünf Verbindungen mit unterschiedlicher Kettenlänge bzw Anzahl der Doppelbindungen ausgewählt. Diese sind in der folgenden Tabelle mit ihrer Strukturformel und ihrem Vorkommen zusammengestellt.

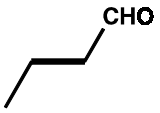
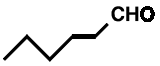
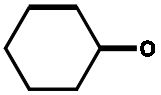
2-Alkenal/Keton	Name	Strukturformel	Geruch	Vorkommen
2-trans-Butenal	Crotonaldehyd			Apfel, Erdbeere, Kartoffel, Kohl, Tomate, Rotwein, Bier
2-trans-Hexenal	Blätteraldehyd		fruchtig-grün	grüne Blätter, Tee, Apfel, Birne, Weintraube, Banane, Orange, Himbeere
2,4-Hexadien-1-al	Sorbinaldehyd		frisch-grün, ölig	Bananen, Erdnuß
Cyclohexenon			süß, ketonartig	Tabakrauch, cyclamathaltige Erfrischungsgetränke
2-trans-Octenal			nussig-ranzig	Tomate, Tee, Orange
2,6-Nonadienal	Veilchenblätteraldehyd		gurkig	Gurke, Erbse, Kiwi, Mango, Kirsche, Wassermelone, Reis, Pfeffer, Veilchen, schwarzer Tee, Algen, Fisch, Auster, Hammelfleisch, Sojaöl

Abb.1.8:Struktur, Vorkommen und Geruch α,β-ungesättigter Aldehyde und Ketone.

Trans-2-Hexenal, auch Blätteraldehyd genannt, besitzt eine ausgeprägte fruchtig-grüne Note und wird in beträchtlichem Umfang zur Aromatisierung von Lebensmitteln verwendet (Firmenich et al., 1980). 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al (Sorbinaldehyd) ist farblos bis gelblich mit frischem-grünen zitrusartigem Geruch (Monographs 1988). 2-trans,6-cis-Nonadienal ist die Impaktkomponente des Gurkenaromas (Belitz und Grosch, 1992) und prägt allein den charakteristischen Geruch der Gurke (Schieberle et al., 1990; Kula und Sadowska 1993). Bereits in den dreißiger Jahren war sein Vorkommen im violetten Blattöl von Veilchen bekannt, woher auch die Bezeichnung Veilchenblätteraldehyd stammt (Kula und Sadowska, 1993; Bedoukian et al., 1982). Wie der Tabelle 1.4 zu entnehmen ist, konnte 2-trans,6-cis Nonadienal auch in vielen anderen Lebensmitteln nachgewiesen werden (Sakai et al., 1990; Bullard et al., 1977; Wu et al., 1986; Habu et al., 1985; Ullrich et al., 1988; Josephson et al, 1983 und 1984; Lin et al., 1990; Josephson et al., 1987; Masakazu et al., 1987). 2-trans-Octenal hat einen nussig bis ranzigen Geruch und findet sich in Soja-Bohnen (Ullrich et al., 1988), Tee (Habu et al., 1985), unbehandeltem Reis (Bullard et al., 1977) sowie in Seetang (Kajiwara et al., 1988).

Das Auftreten von 2-Cyclohexen-1-on in der Aromafraktion von süßstoffhaltigen Getränken wurde 1994 von Le Quéré et al. beschrieben. Dabei wurden in mit Süßstoffen gesüßten Orangenfruchtsaftgetränken neben Cyclohexenon noch Cyclohexanon und 2-trans,4-trans Hexadien-1-al als wahrscheinliche Artefakte von Cyclamat nachgewiesen. Ein natürliches Auftreten von 2-Cyclohexen-1-on findet man z.B. in Tabakrauch (Mauldin et al., 1976; Peterson et al., 1980), in Bittermandeln (Boehlens et al., 1976), Papaya (Barbeni et al., 1990) und der Chayotefrucht (MacLeod et al., 1990). Außerdem konnte es als Verschmutzung im Smith River in Nord Carolina und dem daraus gewonnenen Trinkwasser nachgewiesen werden (NTP, 1996).

α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone weisen differenzierte Aromanoten auf, die schon in geringen Konzentrationen wahrnehmbar sind (Belitz und Grosch, 1992). Sie kommen außerdem in vielen Lebensmitteln in weiten Konzentrationsspannen vor. So konnte Crotonaldehyd in insgesamt 35 Lebensmitteln (Feron et al., 1991) nachgewiesen werden und zeigte Konzentrationen von <0.01ppm in verschiedenen Früchten, in Gemüsen Konzentrationen von 0.02-0.1ppm und in Käse, Milch, Fisch und Bier 0.04ppm. Die höchste Konzentration wurde in Rotwein mit 0.7ppm nachgewiesen (Feron et al., 1991). Für 2-trans-Hexenal konnten ebenfalls große Konzentrationsspannen detektiert werden. Je nach Apfelsorte und Herstellungsart konnte in Apfelsäften 0.21 bis 18ppm (Schreier et al., 1978;

Dürr et al., 1981) beschrieben werden. In schwarzem Tee lagen Konzentrationen von 8-25ppm (Skoboleva et al., 1979), in Bananen von 76ppm (Feron et al., 1991) vor. 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al fand sich in der Erdnuß in Konzentrationen von 0.001-0.003ppm. 2-trans,6-cis-Nonadienal konnte in Gurken abhängig von der Größe in Konzentrationen von 500-4630µg/kg und in Kirschsaft und Kirschkonfitüre abhängig von der Sorte in Konzentrationen von 0.4-2,4µg/l bzw. 0.2-0.3µg/l gefunden werden (Sekiya et al., 1977; Schieberle et al., 1990; Schmid und Grosch et al., 1986). In Erfrischungsgetränken wurde ein Cyclohexen-1-on-Gehalt von 0.1-1.4mg/l gefunden (Hahn 1996).

Zusätzlich zu ihrer Aromawirksamkeit zeigen α,β-ungesättigte Aldehyde antitumorale, bakterizide, fungizide und antivirale Eigenschaften. Schildknecht et al. zeigten schon 1961, daß 2-trans-Hexenal eine niedrige Toxizität gegen Säuger, jedoch eine stark fungizide und bakterizide Aktivität besitzt. Sie beschrieben die Produktion in Blättern der Erle, Eiche, in schwarzer Johannisbeere, Heidelbeere und in Gräsern sowie die gasförmige Ausscheidung ohne eine Verletzung der Blätter. Sein Vorkommen wurde auch beim Gingko beschrieben (Major et al., 1963; Casperson et al., 1986), dessen Resistenz gegen Pilze auf die Produktion von 2-trans-Hexenal als Antwort auf eine leichte Verletzung bei der Pilzinfektion zurückgeführt wird. Auch 2-trans,6-cis-Nonadienal wird bei der Gurke erst nach mechanischer Schädigung der Zellen freigesetzt (Schieberle et al., 1990). Barach und Rosenkovitch beschrieben 1972 die antivirale Aktivität gegen Bacteriophagen, Pflanzenviren und gegen das Influenzavirus.

Weiterhin spielen α,β-ungesättigte Aldehyde bei der Bildung von Rhodopsin (Sehvorgang: Opsin+11-cis-Retinal) eine Rolle, können als Botenstoffe (Hexenal und Octenal) und Pheromone (Hexenal, Citral) fungieren (Schauenstein et al., 1977). Sie sind am Vorgang der Biolumineszenz beteiligt und können beim oxidativen Abbau von Carotinoiden entstehen (Belitz und Grosch, 1992). Langkettige Aldehyde (C_{24}-C_{32}) finden sich außerdem in einer Vielzahl von Pflanzenwachsen.

1.3.3 Biogenese

Die wichtigsten Reaktionen, die zu flüchtigen Carbonyl-Verbindungen führen, sind der Strecker-Abbau von Aminosäuren, die Maillard-Reaktion, die enzymatische Oxidation und die Autoxidation von Lipiden (Belitz und Grosch, 1992). Die Maillard-Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Aromabildung bei Koch-, Back- und Bratprozessen, sowie bei der

Entstehung von Fehlaromen bei der Lagerung von Lebensmitteln. Bei der Strecker-Reaktion handelt es sich um eine Reaktion zwischen α-Dicarbonylverbindungen und Aminosäuren, wobei unter Transaminierung Aminoketone, Aldehyde und CO_2 entstehen. Sie läuft in Lebensmitteln bei höheren Konzentrationen an freien Aminosäuren und drastischeren Reaktionsbedingungen (höhere Temperatur, Druck; Belitz und Grosch, 1992) ab. Diese beiden Reaktionen führen ausschließlich zu kurzkettigen 2-Alkenalen (maximal 5C).
Der allgemeine Geneseweg für kurz- und langkettige Carbonylverbindungen ist zum einen die Autoxidation ungesättigter Fettsäuren, zum anderen die enzymatische Lipidoxidation.

1.3.3.1 Autoxidation ungesättigter Fettsäuren

Die Elementarschritte der Autoxidation beruhen auf einer Radikalkettenreaktion, welche durch Wachstum, Verzweigung und Abbruch gekennzeichnet ist. Diese allgemein formulierten Reaktionsschritte lassen sich auf jede ungesättigte Fettsäure übertragen. Ungesättigte Fettsäuren werden bevorzugt autoxidiert, weil bei ihnen die Abstraktion eines Wasserstoffradikals, der Primärschritt der Autoxidation, energetisch begünstigt ist. Es kann beispielsweise aus Linolsäure nach der Abstraktion eines Wasserstoffradikals sowohl das 9- als auch das 13-Hydroperoxid entstehen. Der wahrscheinlichste Mechanismus zur Erklärung der Bildung der flüchtigen Carbonylverbindungen ist die β-Spaltung der Monohydroperoxide (primäres Produkt der Autoxidation, geruchs- und geschmacklos), wobei die Bildung des intermediär entstehenden Alkoxyradikals durch Schwermetallionen oder Häm(in)-verbindungen katalysiert wird. Eine protonenkatalysierte Spaltung kann zur Bildung weiterer α,β-ungesättigter Verbindungen führen. Modellversuche haben ergeben, daß die flüchtigen Fraktionen, die bei der Autoxidation von Öl-, Linol- und Linolensäure entstehen, überwiegend Aldehyde und Ketone enthalten. Die Vielfalt der Carbonylverbindungen erweitert sich noch, wenn bei der Oxidation einer Fettsäure, die in einem Lebensmittel nur in geringen Konzentrationen vorkommt, eine Carbonylverbindung mit sehr hohem Aromapotential entsteht (Belitz und Grosch, 1992).

Ölsäure	Linolsäure	Linolensäure
Heptanal	Pentan	Propanal
Octanal	Pentanal	2tr-Butenal
Nonanal	Hexanal	2tr-Pentenal
Decanal	Heptanal	2tr-Hexenal
2tr-Decenal	2tr-Heptanal	2tr-Heptenal
2tr-Undecenal	Octanal	2tr,6c-Nonadienal
	1-Octen-3-on	
	2c-Octenal	
	2tr,4tr-Nonadienal	

Abb.1.9:Einige bei der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren entstehende flüchtige Verbindungen (c=cis, tr=trans).

1.3.3.2 Enzymatische Lipidoxidation

Durch eine enzymatisch-oxidative Spaltung ungesättigter Fettsäuren werden in pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen wichtige Aromastoffe gebildet. Die Spaltung kommt in Pflanzen verbreitet vor und wird durch das Eindringen von Sauerstoff in das Gewebe gestartet. An der oxidativen Spaltung sind zwei Enzyme beteiligt:

a. Eine Lipoxigenase, welche zunächst das Hydroperoxid bildet. Lipoxigenasen peroxidieren nur Fettsäuren, die ein 1-cis, 4-cis-Pentadiensystem enthalten: Bevorzugte Substrate sind demnach Linol- und Linolensäure für die Enzyme aus Pflanzen und Arachidonsäure für die Enzyme tierischer Herkunft. Ölsäure wird nicht umgesetzt.

b. Eine Lyase bei Pflanzen und Pilzen, welche das Hydroperoxid in den Aldehyd und die Oxosäure spaltet. Diese Reaktion ist lebensmittelchemisch besonders interessant, weil dadurch aus den Hydroperoxiden, die durch Lipoxigenase-Katalyse aus Linol- und Linolensäure entstehen, Aromastoffe gebildet werden, die für Obst, Gemüse und Pilze wichtig sind, z.B. die grün-grasig oder gurkenartig riechenden Aldehyde Hexanal, 3-cis-Hexenal, 3-cis,6-cis-Nonadienal und das pilzartige (R)-1-Octen-3-ol. (Grosch et al., 1987; Belitz und Grosch, 1992). In tierischem Gewebe erfolgt die Reduktion durch das Enzym Glutathion-Peroxidase.

An der Bildung der Aromastoffe ist neben der Lipoxigenase und der Hydroxiperoxidlyase noch eine Isomerase beteiligt, die bei ungesättigten Aldehyden die 3(Z)- in die 2(E)-Doppelbindung isomerisieren.
Der Nachweis einer enzymatisch-oxidativen Spaltung ungesättigter Fettsäuren wurde bereits für Erdbeeren (Drawert et al., 1965), Bananen und Gurken (Grosch et al., 1987) erbracht.

1.3.4 Reaktivität

2-Alkenale sind chemisch hoch reaktive Substanzen und reagieren auch bei neutralem pH und Raumtemperatur mit biochemisch wichtigen Gruppen, wie z.B. Sulphydryl-, Amino- oder Hydroxylgruppen in Proteinen und Enzymen (Eder et al., 1992) in einer Michael-Addition. Durch die in Konjugation zur Carbonylfunktion stehende Doppelbindung existieren mehrere mesomere Formen und Nukleophile reagieren entweder mit dem C-3-Atom in einer 1,4-Addition oder am C-1-Atom in einer 1,2-Addition. Unter physiologischen Bedingungen findet hauptsächlich die 1,4-Michael-Additionsreaktion statt (Esterbauer et al., 1982). Schon 1967 konnten Burkl et al. an Ehrlich-Ascites-Tumoren, Leber- und Nierenzellen sowie an Leukozyten zeigen, daß α,β-ungesättigte Aldehyde so mit den SH-Gruppen der Zell- und Gewebsproteine reagieren, daß die Carbonylgruppe reaktionsfähig bleibt. Weiterhin beschrieben sie auch die Reaktion von 2-Alkenalen mit der SH-Gruppe von Cystein und Glutathion. In der Zelle dienen als Reaktionspartner SH- oder NH_2-Gruppen von Aminosäuren oder Proteinen und auch DNA (Eder et al., 1982). Bei vergleichbaren pK-Werten und sterischer Umgebung reagieren Aminogruppen ca. 300 mal langsamer als SH-Gruppen (Friedmann et al., 1965; Esterbauer et al., 1982). Dabei ist sowohl eine Michael-Addition als auch die Bildung Schiff'scher Basen möglich. In Nachfolgereaktionen kann es dann zu einer Quervernetzung von Proteinen und Aminosäuren kommen. So konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von Collagen mit hohen Acroleinkonzentrationen zu einer Modifizierung der ε-Aminogruppe des Lysins führt (Bowes und Carter, 1968).
Die Reaktion α,β-ungesättigter Aldehyde und Ketone mit Sulfhydrylgruppen führt zur Bildung gesättigter Aldehyde, wobei die SH-Gruppe am C-3 über eine Thioetherbrücke gebunden ist. Hierbei zeigt sich Acrolein am reaktivsten mit SH-Gruppen, es reagiert nicht nur am schnellsten, es bildet auch das stabilste Addukt (Schauenstein et al., 1977). Der Vergleich der Reaktivität verschiedener α,β-ungesättigter Carbonylverbindungen gegen SH-Gruppen zeigt einen deutlichen Anstieg in der Sequenz: *längere 2-Alkenale<4-Hydroxy-2-Alkenale<<Acrolein und Säure<Ester<Keton<Aldehyd*. So reagiert Acrolein bei der nichtenzymatischen Reaktion mit Glutathion 160mal schneller als 2-trans-Butenal, welches

3mal schneller als 2-trans-Octenal reagiert. Bei der Umsetzung von α,β-ungesättigten Aldehyden mit Cystein, reagiert ein weiteres Cysteinmolekül mit dem Primäraddukt unter Bildung eines Thiazolidins (Esterbauer et al., 1976). Als mögliche Proteinreaktion von 2-Cyclohexen-1-on wird z.B. die Reduktion der Leber-Glukokonase-Aktivität beschrieben, wobei es zu einer konzentrationsabhängigen Unterdrückung der Glukokinase-Aktivität kommt (Miwa et al., 1990).

1.3.5 Metabolismus

Die Biotransformation von Fremdstoffen ist für die Entgiftung des Körpers lebenswichtig. Dabei spielt die Art der chemischen Veränderung, die vom Organismus an Fremdstoffen vorgenommen werden, eine entscheidende Rolle. Der Sinn einer solchen metabolischen Umwandlung besteht in der Erhöhung der Polarität, um damit die Ausscheidung mit dem Harn oder der Galle zu erleichtern. Gerade bei toxischen Substanzen entstehen jedoch im Zuge der Biotransformation häufig reaktionsfähige Metabolite, die als Elektrophile mit den nukleophilen Stellen von Zellbestandteilen reagieren und diese dabei schädigen. Wird eine Substanz zu einem Produkt mit höherer biologischer Aktivität verstoffwechselt, spricht man von metabolischer Aktivierung. Ist der Metabolit toxischer als die Ausgangssubstanz, wird dieser Vorgang auch als Giftung bezeichnet. Die Biotransformation kann man in die *Funktionalisierungsreaktion*, bei der eine funktionelle Gruppe in die Substanz eingeführt wird, und die *Konjugationsreaktion*, bei der ein polares Molekül aus dem Intermediärstoffwechsel angehängt wird, unterteilen. Bei der Funktionalisierungsreaktion handelt es sich um Oxidationen, Reduktionen oder Hydrolyse, welche durch Cytochrom P-450-haltige Monooxigenasen, Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen, Epoxidhydrolasen, Esterasen und Amidasen katalysiert werden. Bei der Konjugationsreaktion spielen Glutathion-S-Transferasen, Glucuronyltransferasen sowie sulfatierende, acetylierende und methylierende Enzyme eine Rolle (Eisenbrand und Metzler, 1994):

α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen können also im Körper auf vielfältige Art metabolisiert werden. Aufgrund ihrer Reaktivität kann es sowohl enzymatisch als auch nicht enzymatisch zu einer Reaktion mit dem Tripeptid Glutathion kommen. Die Geschwindigkeit der nicht enzymatischen Reaktion nimmt dabei mit steigender Kettenlänge des Alkenals ab, wohingegen die enzymatischen Umsatzraten zunehmen. Die hierbei entstehenden Glutathion-Addukte werden enzymatisch zur entsprechenden Mercaptursäure derivatisiert und über den Harn ausgeschieden (Gray und Barnsley 1971). Eine Reduktion der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Alkohol hat ebenso wie

die Oxidation durch Aldehyddehydrogenase (AlDH) zur analogen Carbonsäure eine entgiftende Wirkung (Dittberner, 1993). Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen können aus α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Epoxide oder 4-Hydroxyalkenale bilden, welche aufgrund der zusätzlichen Aktivierung am C3-Atom eine starke Cytotoxizität aufweisen (Schauenstein et al., 1977). Die Epoxide können von Epoxidhydrolasen oder Glutathion-S-Transferasen entgiftet werden oder mit der DNA unter Bildung von Ethenoaddukten reagieren (Dittberner, 1993).

1.3.6 Biologische Wirkung: Zytotoxizität, Mutagenität, Carcinogenität

Die Zytotoxizität α,β-ungesättigter Carbonylverbindungen kann auf die Deaktivierung von essentiellen SH-Gruppen von Proteinen, Enzymen und Thiolverbindungen wie z.B. Cystein, GSH, Coenzym A zurückgeführt werden, wobei es zur Inhibierung des Zellwachstums und der Zellteilung kommt. Hierbei zeigt sich, daß neben der Zytotoxizität der Substanzen in Mikroorganismen und Mäusen auch eine Hemmung der DNA-Synthese in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen stattfindet (Schauenstein et al., 1977).

Im Ames-Test mit Salmonella typhimurium TA 104 stellten Marnett et al. 1985 eine hohe Toxizität vor allem für längerkettige Enale fest. Bei der Untersuchung von Acrolein, Crotonaldehyd, Hexenal und Hexadien-1-al konnte die Toxizität durch die Zugabe von GSH reduziert werden. Da gleichzeitig die Mutagenität in Anwesenheit von GSH nicht zurückging, schlossen die Autoren, daß die Toxizität ein wichtiger Faktor zur Mutagenbestimmung dieser Verbindungen darstellt, obwohl beide Prozesse unabhängige Ereignisse sind. An humanen Endothelzellen zeigten sich trans-1-Hexenal und trans-2-Octenal nur in sehr hohen Konzentrationen toxisch (LD_{50} von >100µM bzw. 50µM), während sich 2,4-Nonadienal als sehr toxisch (LD_{50}=21µM) erwies (Kaneko et al., 1988). Bei der Untersuchung der mutagenen Aktivität verschiedener α,β-ungesättigter Carbonylverbindungen (C5-C9) an V79-Zellen konnte eine starke zytotoxische Aktivität festgestellt werden, die mit der Kettenlänge zunahm. Die Säugerzellen erwiesen sich hierbei sensitiver als Bakterienzellen, da in Bakterienzellen die Toxizität der untersuchten Verbindungen mutagene Wirkungen ausschloß (Canonero et al., 1990). Auch 2-Cyclohexen-1-on konnte an V79-Zellen als potente zytotoxische Verbindung mit einem IC_{50}-Wert von 18µM detektiert werden (Janzowski et al., 1997). Eder et al. stellten 1992 einen Zusammenhang zwischen der steigenden Toxizität, der Kettenlänge und erhöhter Lipophilie her. Ihre Untersuchungen zeigten außerdem einen speziellen Effekt zusätzlicher Doppelbindungen auf. Für 2,4-Hexadien-1-al konnte nämlich eine erniedrigte

Toxizität und erhöhte Mutagenität im Vergleich zu trans-2-Hexenal und Pentenal nachgewiesen werden.

In bakteriellen Mutagenitätstests findet sich für α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen zum Teil deutlich ein mutagenes Potential. So sind z.B Acrolein und Crotonaldehyd mutagen im Ames-Test (Lutz et al.,1982, Eder et al., 1982), während 2-Cyclohexen-1-on nur sehr gering direkte mutagene Effekte zeigt. In weiteren Untersuchungen konnten Eder et al. 1992 Crotonaldehyd und trans-2-Hexenal als mutagen darstellen, für 2-trans,6-cis Nonadienal war dies nicht der Fall. Man geht davon aus, daß 2-trans,6-cis-Nonadienal so toxisch wirkt, daß keine Erhöhung der Revertanten meßbar ist. Die abnehmende Mutagenität mit zunehmender Kettenlänge ist somit durch die erhöhte Toxizität erklärbar. Dagegen fand Schumacher 1990 auch für 2-trans,6-cis-Nonadienal eine mutagene Wirkung. Czerney et al. untersuchten 1998 die Wirkung von Crotonaldehyd auf den Plasmidvektor pZ189 und fanden 39% Punktmutationen, 46% Deletionen, 15% Insertionen und Inversionen.

α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen können mit DNA-Basen Addukte bilden. Als Zielmolekül konnte Guanosin identifiziert werden. Es konnte die Bildung von in vivo und in vitro DNA-Addukte für Crotonaldehyd und Acrolein dargestellt werden (Chung et al., 1984 und 1889; Eder et al., 1990, 1992 und 1993). Hexenal und Nonadienal Addukte wurden ebenfalls beschrieben (Schuhmacher et al., 1990; Gölzer et al.,1996). Die Bildung von DNA-Addukten gilt als Indikator für Mutagenität, Genotoxizität und vermutlich auch Carcinogenität. Ein carcinogenes Potential beschrieb Eder et al. 1993 für Crotonaldehyd und Acrolein, welche die Differenzierung bronchialer Epithelzellen bedingen und so zur Initiation von Lungenkrebs beitragen. Außerdem scheinen α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen eine wichtige Rolle bei erblichen Krankheiten, welche mit einem erhöhen Krebsrisiko einhergehen eine wichtige Rolle zu spielen. Beispiele hierfür sind das Bloom's Syndrom oder die Fanconi Amämie. Beide Krankheiten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber zellulärem Sauerstoff und eine Sauerstoffabhängigkeit von Chromosomenaberrationen, die durch reaktive Produkte der Lipidperoxidation induziert werden. Die Induktion von Lebertumoren durch Crotonaldehyd in Ratten wurde ebenfalls beschrieben (Chung et al., 1986).

Die Interaktionen reaktiver Carbonylverbindungen mit Proteinen und Enzymen führen nicht nur zur Zytotoxizität, sondern können auch indirekt zur Genotoxizität beitragen (Eder et al., 1992). So wird z.B die O^6-methylguanine DNA-Methyltransferase gehemmt (Krokan et al., 1985), die Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese wird für 4-Hydroxyalkenale

beschrieben (Whit et al., 1984). Benedetti et al. beschrieben 1979 die Verringerung der Cytochrom P-450-Aktivität in Rattenhepatozyten, die Hemmung der Glutathion-S-Transferase konnte ebenfalls detektiert werden (Chien et al., 1994; van Iersel et al., 1996 und 1997).
Des weiteren reagieren 4-Hydroxyalkenale mit Tubulin und beeinflussen dessen Polymerisation (Gabriel et al., 1985; Eder et al., 1993).
Auch die Induktion von Mikronuclei und SCE's bei humanen Lymphozyten für Crotonaldehyd (O'Brian et al., 1988; Dittberner et al., 1995) , 2-trans-Hexenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal (Dittberner et al., 1995) konnte nachgewiesen werden. In der Reihe der 2-Alkenale induzierten die kurzkettigen Verbindungen mehr SCE's als längerkettigere. Strukturelle Chromosomenaberrationen konnten für Crotonaldehyd, nicht jedoch für 2-trans-Hexenal und 2-trans,6-cis Nonadienal detektiert werden. Entgegengesetzt fand man für diese beiden eine hohe Anzahl numerischer Aberrationen.

Mit Hilfe der alkalischen Filterelution konnten Einzelstrangbrüche und DNA-Protein- bzw. DNA-DNA-Quervernetzungen an CHO-Zellen (Brambilla et al., 1986), Bronchialfibroblasten (Grafström et al., 1988), Leukämiezellen der Maus (Eder et al., 1993) sowie primären Rattenhepatozyten und Namalva-Zellen (Eisenbrand et al., 1995) nachgewiesen werden.

Li et al. beschrieben 1997 die Induktion von Apoptose und Nekrose in humanen alveolären Makrophagen durch Acrolein sowie eine Hemmung der Freisetzung von IL-1beta, TNF-α und IL-12. Die Hemmung der TNF-α-Sekretion durch Hexenal und Octenal konnte ebenfalls gezeigt werden (Girona et al., 1997). Thomas et al. wiesen 1994 die Induktion der IL-1 Freisetzung durch Octenal und 2,4-Decadienal nach.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der Zelltod ist ein Prozeß, welcher in der Beendigung der biologischen Aktivität gipfelt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod) durch α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone und deren qualitativen und quantitativen Darstellung. Zur Einführung der Methodik der Apoptosebestimmung wurde Actinomycin D eingesetzt.
Es wurden drei Untersuchungsansätze verfolgt:

- Im Vordergrund stand der parallele Einsatz dreier Untersuchungsmethoden zur Apoptosedetektion und die Analyse der Aussagekraft der einzelnen Mehtoden. Zum Einsatz kam die Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie (Messung von DNA- und Proteingehalt), die Darstellung der internukleosomalen DNA-Framente im Agarosegel und die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung einzelner Apoptosestadien.

- Desweitern wurde das Potential der Substanzen 2-Cyclohexen-1-on, trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal zur Induktion von Apoptose an vier humanen Leukämiezellinien untersucht. Diese Verbindungen sind in der Natur weit verbreitet und wurden u.a. auch durch unsere Arbeitsgruppe gut charakterisiert. Dabei sollte sowohl eine Konzentrationskinetik als auch eine Zeitkinetik aufgestellt werden. Die Untersuchung der Phasenspezifität bezüglich der Apoptoseinduktion, die hauptsächlich bei der Charakterisierung von Antitumormedikamenten eine große Rolle spielt, wurde ebenfalls durchgeführt.

- Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen auf das apoptoseinduzierende Potential. Zu diesem Zweck wurden eine weitere Substanz, das trans-2-Octenal eingesetzt. Es sollte somit ein Vergleich zwischen 3 C6-Verbindungen und einer C8- bzw. einer C9-Verbindung bezüglich der Stärke der Apoptoseinduktion aufgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2-Alkenale:

2-trans-Hexenal (Sigma-Aldrich)

2-trans, 4-trans-Hexadien-1-al (Sigma-Aldrich)

2-trans-Octenal (Sigma-Aldrich)

2-trans, 6-cis-Nonadienal (Sigma-Aldrich)

2-Alkenon:

2-Cyclohexen-1-on (Sigma-Aldrich)

Sonstige Substanzen:

Actinomycin D (Sigma-Aldrich)

Zellinien:

HL-60, K562, Molt4 und U937 (Tumorbank, DKFZ-Heidelberg)

Zellkultur:

Brutschrank (CO_2-Inkubator, Forma Scientific)

Foetales Kälberserum (Gibco)

HBSS w/o Calcium, Magnesium und Phenolrot (BioWhittaker)

Immersionsöl (Serva)

Kryo-Röhrchen (Nunc)

Kühl-Gefrierkombination (Liebherr)

Laminar-Flow (Gelaire, Flow Laboratories)

Mikroskop (Axioskop, Zeiss)

Neubauer Zählkammer

Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)-Lösung (Gibco-BRL)

pH-Meter (Schott-Geräte)

RPMI-1640 Medium (Gibco)

Sterile Einmalpipetten (Eppendorf, Sarstedt)

Trypanblau (Sigma)

Umkehrmikroskop (Olympus, Hamburg)

Vortexer (Bender+Hobein, Zürich)

Wasserbad (ITS)

Zellkulturflaschen (Nunc)

Zentrifugen (Heraeus, Hermle)

Zentrifugenröhrchen (Sarstedt)

Gelelektrophorese:

Agarose (Qualex Gold, AGS-Heidelberg)

Elektrophoresekammer

Ethidiumbromid (Sigma)

Längenstandard (λ-DNA, HindIII verdaut, Sigma; 100bp-Leiter, Pharmacia)

NP-40 (Sigma)

Proteinase K (Sigma)

RNase (Sigma)

Spannungsgeräte (Consort, Renner)

SpeedVac (Univapo 150H, Uniequip)

Zentrifugen (Heraeus)

Mikroskopie:

DAPI = 4´6-Diamidino-2-Phenylindol (Sigma)

Deckgläser (AL)

Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss)

Immersionsöl (Zeiss)

Objektträger (AL)

Sulphorhodamin101 (Sigma)

Zytozentrifuge (Cytospin, Shandon)

Durchflußzytometrie:

Annexin V-FITC (Bioproducts)

DAPI (Sigma)

Durchflußzytometer (PasIII, Münster; Coulter, Krefeld)

Hepes (Sigma)

Probenröhrchen (Sarstedt)

Propidiumjodid (Sigma)

Software (Multicycle, WinMDI)

Sulphorhodamin101 (Sigma)

Sonstige Geräte:

Transilluminator: 302nm, mit Gebläse, Filter 200x350nm (Bachofer)

Autoklav (Certoclav, Jürgens)

Anmerkung:

Die Lösungen, Puffer und Reagenzien, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Kombination mit der jeweiligen Methode angegeben.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (Trypanblau-Ausschlußtest)

Zum Aussäen der Zellen in einer definierten Dichte, mußte deren Lebendzellzahl bestimmt werden. Hierzu wurde ein Aliquot von 10µl der jeweiligen Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (Sigma) versetzt. Erwies sich die Suspension als zu dicht zum Auszählen wurde vor der Zugabe von Trypanblau noch eine 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung durchgeführt. In einer Neubauer Zählkammer konnten Trypanblau-positive, d.h. tote Zellen, von ungefärbten Zellen unterschieden werden. Es wurden 4 Eckquadrate mit 16 kleinen Quadraten an ungefärbten Zellen ausgezählt und davon der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl pro ml errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Zytotoxizitätstest

Ein Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität ist der Trypanblau-Ausschlußtest, welcher die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht (siehe auch 2.2.1.). Dazu wurde von den Testansätzen vor der Aberntung ein Aliquot von 20µl entnommen und mit derselben Menge Trypanblau vermischt. Es folgt eine 5-10 minütige Inkubation bei RT. Die Kontrolle der Zellen nach 10 min zeigte dabei keine erhöhte Rate positiver Zellen gegenüber der 5 minütigen Inkubation. Unter dem Umkehrmikroskop wurden bei zwanzigfacher Vergrößerung Trypanblau-positive und negative Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hieraus wurde der Prozentsatz an Trypanblau-negativen Zellen in bezug auf die Gesamtzahl der gezählten Zellen bestimmt:

$$\%\ \text{lebende Zellen} = \frac{\text{Trypanblau negative Zellen}}{\text{Trypanblau negative} + \text{positive Zellen}} \times 100$$

2.2.3 Zellinien

Bei den in diesen Untersuchungen eingesetzten Zellsystemen handelt es sich um in der Literatur häufig für Apoptoseuntersuchungen verwendete Zellinien. Zu Beginn wurden die vier in dieser Arbeit eingesetzten humanen Zellinien vermehrt und in Portionen von 10^8 Zellen/ml in RPMI 1640-Medium mit 10% DMSO und 20% FKS zuerst für 3 Tage bei -70°C, danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.3.1 Die Zellinie HL-60

Bei der humanen Suspensionszellinie HL-60 handelt es sich um eine von Collins et al. (1977) eingeführte promyelozytische Leukämiezellinie. Diese wurde durch Leukopherese aus peripherem Blut einer 36-jährigen Kaukasierin mit akuter promyelozytischer Leukämie gewonnen. Der überwiegende Teil besteht aus neutrophilen Promyelozyten mit deutlicher Kern/Zytoplasma-Asynchronität, wobei bis zu 10% der Zellen spontan differenzieren. HL-60 Zellen haben einen pseudodiploiden Karyotyp mit 5 Markerchromosomen.

2.2.3.2 Die Zellinie K562

Diese chronisch myeloische Leukämiezellinie wurde 1975 von Lozzio et al. eingeführt. Sie wurde aus dem Pleuraerguß einer 53-jährigen Frau mit CML in terminaler Blastenkrise gewonnen. Weitere Studien beschrieben diese Zellinie als erythroleukämische Zellinie (Anderson et al., 1979). Die Zellen dieser Zellinie haben einen triploiden Karyotyp (2n=67).

2.2.3.3 Die Zellinie Molt4

Diese Leukämiezellinie wurde 1972 aus peripherem Blut eines 19-jährigen Mannes mit akuter lymphoblastischer Leukämie etabliert. Es handelt sich hierbei um eine stabile T-Zell-Leukämie mit einem tetraploiden Karyotyp (2n=95).

2.2.3.4 Die Zellinie U937

Bei dieser Zellinie handelt es sich um eine histiozytische Lymphomzellinie, welche von Sundstrom et al. 1976 eingeführt wurde. Sie entstammt dem Pleuraerguß eines 37-jährigen Kaukasiers mit diffusem histiozytischem Lymphom. Die Zellen zeigen einen hypotriploiden Karyotyp (2n=58-69).

2.2.4 Kultivierungsbedingungen

Alle Versuche wurden unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden. Alle eingesetzten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt.

Die Zellinien wurden in der Regel für 10min bei 1000 Upm zentrifugiert um eine mechanische Schädigung der Zellen zu vermeiden.

Kultivierungsbedingungen: Stationär, 37°C, 5% CO_2, 95% Luftfeuchtigkeit

Die Zellinien HL-60, K562, Molt4 und U937 wurden als Suspension in RPMI 1640-Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin in 850ml Gewebekulturflaschen (Vorratsflaschen) kultiviert. Dazu wurde jeweils montags eine Zelldichte von $3x10^4$ Zellen/ml eingestellt. Der Mediumwechsel erfolgte mittwochs und freitags, indem 9/10 der Suspension verworfen und durch frisches Medium ersetzt wurden. Die Zellen wurden in der Regel erst nach 3 Wochen Kultivierungsdauer für die Versuche eingesetzt und nicht länger als 10 Wochen kultiviert, um Veränderungen der Linien, wie sie mit zunehmender Kulturdauer auftreten können, zu vermeiden.

2.2.5 Versuchsaufbau

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet, daß sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen aus den Vorratsflaschen wurden gepoolt und nach einer Zellzahlbestimmung aufgeteilt.
Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,5x10^5$ Zellen/ml in 250ml Kulturflaschen à 10ml ausgesät.

2.2.5.1 Actinomycin D

Actinomycin D gehört zu der Gruppe von stark giftigen, antibiotisch wirkenden Chromopeptiden, die als Stoffwechselprodukte von verschiedenen Streptomyces-Stämmen (u.a. Streptomyces chrysomallus, S. antibioticus) gebildet werden. Actinomycin D interkaliert GC-spezifisch in die DNA-Doppelhelix und hemmt in geringer Konzentration die RNA-Polymerase. Dadurch kommt es zur Wachstumshemmung proliferierender Zellen. In höheren Konzentrationen kommt es zusätzlich zur Hemmung der DNA-Replikation. Anwendung findet Actinomycin D als Zytostatikum, z.B. bei Wilms Tumoren, Rhabdomyosarkomen sowie Hoden und Uteruskarzinomen. In vitro Studien konnten die Induktion von Chromosomenaberrationen und DNA-Strangbrüchen in menschlichen Zellen detektieren. Actinomycin D ist zudem in der Lage Mauszellen (C3H 10T1/2) zu transformieren. Es erzeugt Chromosomenaberrationen, SCE's, Mutationen, DNA-Strangbrüche, aber keine Aneuploidien in Nagerzellen.
Anzai et al. setzten 1994 Actinomycin D zur Induktion von Apoptose in verschiedenen myeloiden Zellsystemen ein und konnten einen konzentrations- und zeitabhängigen Verlauf darstellen. Actinomycin D zeigte große Unterschiede in der Stärke der Apoptoseinduktion zwischen den einzelnen Zellinien (K562<<U937<HL-60<P39). Martin et al. beschrieb schon 1990 die Induktion von Apoptose durch Aktinomycin D.

2.2.5.2 Versuchsdesign

Die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgte bei 2-trans-Hexenal, 2-trans, 4-trans-Hexadien-1-al, 2-trans-Octenal sowie 2-trans,6-cis Nonadienal jeweils für eine Stunde, bei 2-Cyclohexen-1-on für 24h, bei Actinomycin D für 6h bei 37°C im Brutschrank. Die Inkubationsdauer für 2-Cyclohexen-1-on mußte gegenüber den anderen Carbonyl-verbindungen verändert werden, da diese Verbindung nach einer Stunde Inkubation keine Apoptose induzierte. Bei den in DMSO gelösten Testsubstanzen (Hexenal, Hexadienal, Octenal und Nonadienal) lag die höchste Lösungsmittelkonzentration bei 0.05%, bei in Ethanol gelösten Substanzen (Actinomycin D) bei 0.5%. Cyclohexenon wurde in destilliertem Wasser gelöst. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß diese Lösungsmittel-konzentrationen keinen Einfluß auf die Apoptoseinduktion hatten.

Die eingesetzten Konzentrationen lagen bei Cyclohexenon und Octenal zwischen 0-100µM, bei Hexadienal zwischen 0-125µM, bei Hexenal zwischen 50-150µM, bei Nonadienal zwischen 0-50µM und bei Actinomycin D zwischen 0.05-5µg/ml (siehe tabellarische Übersicht, S.34). Diese Konzentrationen wurden ebenso wie die Inkubationsdauer jeweils in Vorversuchen ermittelt. Um zytotoxische Effekte der verwendeten Substanzen auf die verschiedenen Zellsysteme auszuschließen, wurden nur solche Substratkonzentrationen eingesetzt, welche nach der Inkubation noch mindestens 80% lebende Zellen aufwiesen. Die Bestimmung toter Zellen erfolgte mit der Trypanblau-Ausschluß-Methode (siehe 2.2.1) nach Phillips (1973).

Nach der Inkubation mit Hexenal, Hexadienal, Octenal und Nonadienal wurden die Zellen mit HBSS-Lösung gewaschen und anschließend im frischen Medium weiterkultiviert. Das Abernten erfolgte dann bei Erstellung der Konzentrationskinetik 4h nach erneutem Aussäen der Zellen. Zur simultanen Durchführung einer Zeitkinetik wurde ab dem Zeitpunkt Null nach dem erneuten Aussäen bis 4h danach stündlich abgeerntet. Zusätzlich erfolgte eine Aberntung 24h nach erneutem Aussäen (bei der Zellinie Molt4 auch 48h und 72h). Für Cyclohexenon und Actinomycin D erfolgte kein Auswaschen der Substanz. Nach der Inkubation wurden die Testansätze direkt abgeerntet. Für die Erstellung einer Zeitkinetik wurde bei Cyclohexenon nach 2h, 4h, 8h, 12h zusätzlich abgeerntet. Aktinomycin D wurde zum Testen der Methodik (Anzai et al., 1994) eingesetzt. Hier entfiel die Zeitkinetik.

Die Testansätze wurden für jede Substanz dreimal an aufeinanderfolgenden „Passagen“ durchgeführt.

Zur Übersicht ist das Versuchsdesign nochmals tabellarisch dargestellt:

	Actinomycin D	Cyclohexenon	Hexenal	Hexadienal	Octenal	Nonadienal
Eingesetzte Konzentrationen:	0.05-0.1-0.5-1-5µg/ml	10-25-50-75-100µM	50-75-100-125-150µM	10-25-50-75-100-125µM	10-25-50-75-100µM	10-20-30-40-50µM
Konzentrations-kinetik:	6h-Inkubation	24h-Inkubation	1h-Inkubation/ 4h-Post-inkubation	1h-Inkubation/ 4h-Post-inkubation	1h-Inkubation/ 4h-Post-inkubation	1h-Inkubation/ 4h-Post-inkubation
Zeitkinetik:		2h-4h-8h-12h-24h	1h-2h-3h-4h-24h Postinkubation bei der Zellinie Molt4 erfolgte zusätzlich eine 48h und 72h Postinkubation	1h-2h-3h-4h-24h Postinkubation bei der Zellinie Molt4 erfolgte zusätzlich eine 48h und 72h Postinkubation	1h-2h-3h-4h-24h Postinkubation	1h-2h-3h-4h-24h Postinkubation

2.2.6 Abernten

Vor der Durchführung der durchflußzytometrischen Messungen, der morphologischen Charakterisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie der DNA-Isolation mußten die Zellen der verschiedenen Testansätze fixiert werden. Für die durchflußzytometrischen Messungen von Annexin V konnten die Zellen der Testansätze unfixiert verwendet werden.

2.2.6.1 Aberntung der Zellkultur für die DNA-Durchflußzytometrie und Fluoreszenz-mikroskopie

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Ethanol (EtOH, 99.8% p.a.)
- Vortexer

Durchführung:

- Zellsuspension 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 5ml 70% eiskalten EtOH auf dem Vortexer resuspendieren und 24h bei -20°C fixieren

Die so fixierte Zellsuspension kann dann mehrere Monate bei +4 bis -20°C aufbewahrt und sowohl für die DNA-Durchflußzytometrie als auch für die mikroskopische Auswertung eingesetzt werden.

2.2.7.2 Aberntung der Zellkultur für die DNA-Isolation

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Ethanol (EtOH, 99.8% p.a.)
- Vortexer
- HBSS w/o Calcium, Magnesium und Phenolrot (BioWhittaker)

Durchführung:

Zellsuspension 10min bei 1000Upm abzentrifugieren

- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 1ml HBSS-Lösung auf dem Vortexer resuspendieren
- 10ml 70% eiskaltes EtOH zugeben
- 24-72h bei -20°C fixieren

Danach konnte die Zellsuspension für die DNA-Isolation verwendet werden.

2.3 Durchflußzytometrie

2.3.1 Präparation eines Standards

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Herstellung eines externen Standards Lymphozyten aus weiblichem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dieser Standard wurde zur Qualitätskontrolle der Färbung, Überprüfung der Linearität der Messung im Histogramm sowie der Calibrierung des Gerätes zu Beginn jeder durchflußzytometrischen Messung eingesetzt.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- EtOH
- Ficoll Histopaque 1077 (Sigma)
- PBS
- Vortexer
- Zentrifugenröhrchen

Durchführung:

- In einem 50ml Zentrifugenröhrchen 10ml Ficoll vorlegen und langsam mit ca. 20ml Vollblut überschichten
- 30min bei 2000Upm abzentrifugieren
- Bande mit mononucleären Zellen in 5ml PBS überführen
- 10min bei 1500Upm abzentrifugieren
- Pellet in 5ml PBS resuspendieren und 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Pellet unter ständigem Resuspendieren auf dem Vortexer mit 5ml eiskaltem EtOH fixieren
- Aufbewahrung bei +4°C bis -20°C für mehrere Monate

2.3.2 Färbung der Zellen mit DAPI/Sulforhodamin101

Bei der in dieser Arbeit angewandten Zwei-Parameter-Messung wird der DNA-Gehalt und der Proteingehalt der in Suspension vorliegenden Zellen bzw. Zellkerne gemessen. Der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) wurde von Stöhr et al. (1977) und Otto et al. (1994), Sulforhodamin101 von Freeman et al. (1975) und Stöhr et al. (1977) in die Durchflußzytometrie zur DNA-Gehalts- bzw. Proteingehaltsbestimmung eingeführt. Die simultane Fluoreszenzmessung von DNA und Proteinen ist mit den Farbstoffen DAPI und Sulforhodamin101 möglich, da sich die Emissionswellenlängen der beiden Farbstoffe deutlich

voneinander unterscheiden. Das Emissionsoptimum von DAPI liegt bei 485nm, von Sulforhodamin 101 bei 620nm.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- HR-A/Detergenzlösung (Partec, Münster)
- fixierte Zellsuspension
- HR-B/Färbelösung (Partec, Münster)

Durchführung:

- Ein Aliquot von 0.5ml der fixierten Zellsuspension entnehmen
- 10min bei 1000Upm abzentrifugieren, Überstand vollständig verwerfen
- Zellpellet in 0.5ml HR-A aufnehmen und gut resuspendieren, Inkubation 10min bei RT
- Zugabe von 3ml HR-B-Färbelösung, 30min bei RT färben
- Messung

2.3.3 2-Parameter-Messung des DNA- und Proteingehaltes

Die DNA-Durchflußzytometrie wurde an einem PAS III-Gerät der Firma Partec (Münster) durchgeführt. Nach einem „warm up“ von mindestens einer Stunde wurde ein konstanter Partikelfluß 100-200 Zellen pro Sekunde durch die Meßkammer geschleust. Dabei wurde der Zellstrom regelmäßig im Okular kontrolliert. Für jede Messung wurden 5-10000 Kerne ausgewertet. Die Daten der jeweiligen Messungen wurden gespeichert und die Histogramme für die Beurteilung der Messung ausgedruckt.

Im Anschluß an die durchflußzytometrische Messung wurden die gespeicherten Daten transformiert und mittels des Multi-Cycle-Computerprogramms von Rabinowitsch (1990; Phoenix Flow Systems, San Diego, Kalifornien) sowie des WinMDI-Computerprogramms (J. Trotter, Version 2.3, 1996) ausgewertet. Das Multi-Cycle-Programm basiert auf dem Prinzip der Kurvenanpassung, welche das DNA-Histogramm als Summe dreier analytischer Funktionen darstellt, die die G_0/G_1-, S- und G_2/M-Phasenverteilung beschreiben. Bei WinMDI wurden Regionen/Gates definiert (siehe Abb.1.6) und der Prozentsatz an Ereignissen in diesen berechnet.

2.3.4 Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid

Annexin V bindet an Phosphatidylserine, welches in frühen Apoptosestadien von der Innenseite der Plasmamembran an die Außenseite verlagert wird. Durch gleichzeitige Färbung der Zellen mit PI kann man intakte Zellen (FITC-/PI-), früh apoptotische Zellen (FITC+/PI-), spät apoptotisch bis nekrotische Zellen (FITC+/PI+) und eindeutig nekrotische Zellen (FITC-/PI+) voneinander unterscheiden. Mit diesem Annexin V Assay ist es also möglich frühe Apoptosestadien, bevor der Verlust der Membranintegrität auftritt, zu detektieren. Diese Färbung wurde nur bei einigen exemplarischen Testansätzen durchgeführt, um aufgetretene Diskrepanzen zwischen den angewandten Untersuchungsmethoden zu verifizieren.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Annexin V-FITC (Bioproducts)
- Binding-Puffer (10mM Hepes/NaOH, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$)
- Propidiumiodid-Stammlösung (20µg/ml)

Durchführung:

- Testansatz 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Pellet in 1ml PBS resuspendieren, 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Pellet in Binding-Puffer resuspendieren, Zellzahl auf 2-5x10^5Zellen pro ml einstellen
- 195µl dieser Suspension in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und mit 5µl Annexin V-FITC mischen, 10min im Dunkeln färben
- Suspension 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Pellet in 1ml Binding-Puffer resuspendieren und erneut 10min bei 1000Upm abzentrifugieren
- Pellet in 380µl Binding-Puffer resuspendieren und mit 20µl Propidiumiodid-Stammlösung mischen
- Messung

2.3.5 Zwei-Parameter-Messung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid

Diese Untersuchung wurde bei den Zellinien K562 und Molt4 durchgeführt. Eingesetzt wurden die zuvor detektierten kritischen Konzentrationsbereiche, bei denen Diskrepanzen auftraten (0,5µM ActinomycinD, 50µM 2-Cyclohexen-1-on, 125µM trans-2-Hexenal, 100µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, 75µM trans-2-Octenal und 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal). Die Messungen wurden an einem Coulter EPICS XL-MCL-Durchflußzytometer (Coulter Electronics, Krefeld) durchgeführt. Die Zellen streuen dabei das Laserlicht und emittieren

Fluoreszenzlicht eingesetzter Fluorochrome. Hierbei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) proportional zur Zellgröße der gemessenen Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC), welches im 90° Winkel zur Achse des Laserstrahls läuft, ist proportional zur Granularität der Zelle. Hiermit ist z.B die Unterscheidung zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich. Das Fluoreszenzlicht der eingesetzten Fluorochrome emittiert in alle Richtungen zur Achse des Laserstrahls. In dieser Arbeit wurde zum einen das Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht, zum anderen Annexin V gegen Propidiumjodid (PI) als 2-Parameter-Dot Plot dargestellt. Für jede Messung wurden 5000 Zellen ausgewertet. Die Daten der jeweiligen Messung wurden gespeichert und die Dot Plots ausgedruckt.

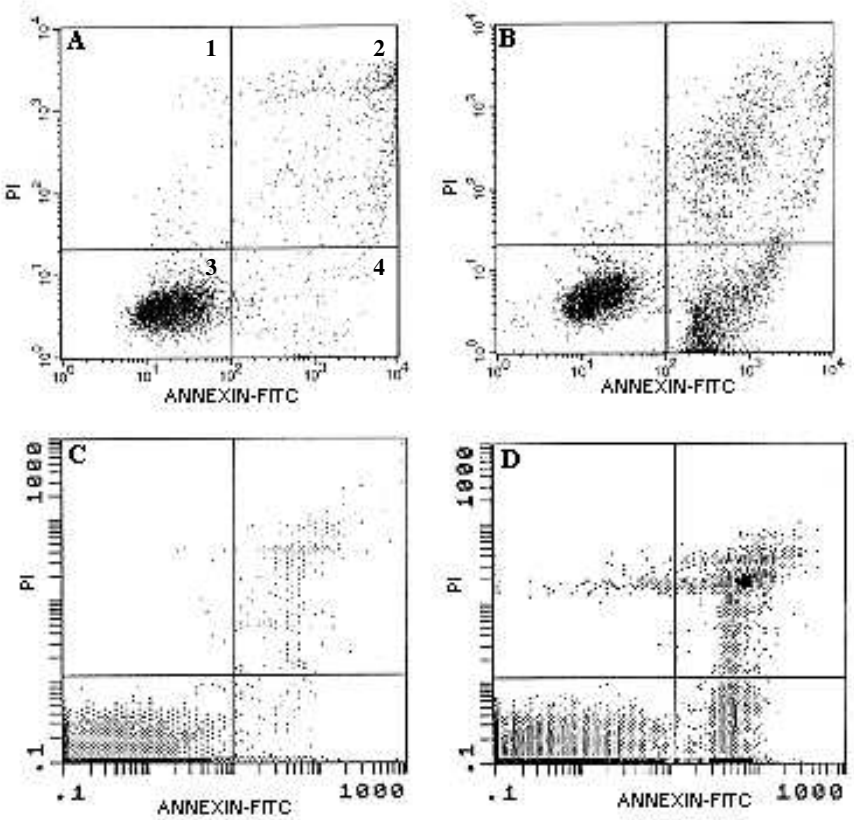


Abb.2.1: Exemplarische Log Fluoreszenz Dot Plots von Annexin V-FITC und PI gefärbten U937-Zellen sowie Mausthymozyten. **A**.Unbehandelte U937-Zellen, **B**. U937-Zellen, 3h mit rhTNF-alpha zur Induktion von Apoptose behandelt, **C**. Unbehandelte, frische Maus-thymozyten, **D**. Kultivierte Mausthymozyten (3h). In A ist die Reihenfolge der Quadranten angegeben. In Quadrant 1 findet man nekrotische (PI+/FITC-), in Quadrant 2 nekrotische und spät apoptotische (PI+/FITC+), in Quadrant 3 intakte (PI-/FITC-) und in Quadrant 4 apoptotische Zellen (PI-/FITC+).

2.4 Zytospinpräparation

2.4.1 Herstellung von Zytospinpräparaten

Zur Beurteilung der einzelnen Apoptosestadien mußten die fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie auf Objektträger aufgebracht werden. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe einer Zytozentrifuge auf Objektträger zentrifugiert. Die Zellen befanden sich anschließend in einem gut auswertbaren, kleinen runden Bereich in der Mitte des Objektträgers.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon)
- Filter, Trichter, Objektträgerhalter (Shandon)
- HR-A/Detergenzlösung (Partec, Münster)
- Objektträger (in 99% EtOH gereinigt)

Durchführung:

- Objektträger beschriften und zusammen mit einem Filter und einem Trichter in einen Objektträgerhalter einspannen
- 50µl der Suspension mit 100µl HR-A mischen, 10min bei RT inkubieren
- 100µl dieser Mischung auftragen
- 4min bei 1200Upm aufzentrifugieren
- OT entnehmen und 10min auf der Heizplatte (55°C) trocknen lassen
- OT bis zur Färbung bei 4°C aufbewahren

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Für die mikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien wurden die Zytospinpräparate der Testansätze (2.4.1) mit DAPI/Sulforhodamin101-Färbelösung eingebettet und an einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, München) ausgewertet. Es wurde die gleiche Färbung gewählt wie für die DNA-Durchflußzytometrie, um eine gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu gewährleisten. Das Mikroskop ist mit 3 Single Band Pass Filtern (Chroma Technology) für blaue, grüne und rote Fluoreszenzanregung und mit einem Doppel Band Pass Filter für gleichzeitige Anregung von grüner und roter Fluoreszenz ausgestattet. Von jedem Testansatz wurden mit Ausnahme der Testreihe Actinomycin D und 2-trans-Octenal 500 Zellen ausgewertet und Mittelwerte in % berechnet. Dabei wurden normale Zellen, Zellen mit stark kondensiertem Kern, Zellen mit fragmentiertem Kern sowie apoptotische Bodies in die Auswertung mit einbezogen. Alle 4 eingesetzten Zellinien zeigen im normalen Zustand nur einen kleinen Zytoplasmasaum. Apoptotische Zellen mit stark kondensiertem Kern zeigen zum einen einen deutlich größeren Zytoplasmasaum mit durch die Kondensierung stärker fluoreszierenden Kern. Zum anderen kann das Chromatin in Schollen an der Kernperipherie kondensieren und der Kern eine Halbmondform annehmen. Von Zellen mit fragmentiertem Kern spricht man, wenn dieser aus mindestens 4 Fragmenten besteht und auch hier eine stärkere Kondensierung aufweisst (Abb.2.2).

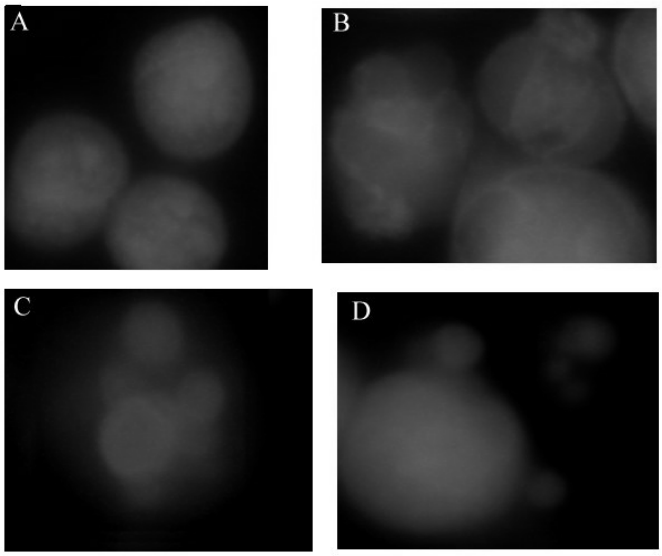


Abb.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellinie U937, inkubiert mit 40µM Hexenal, **A**. Kontrollzellen, **B**. Zellen mit stark kondensiertem Kern, **C.** Zelle mit fragmentiertem Kern und **D**. apoptotische Bodies. Die Zellkerne sind blau, das Zytoplasma rot gefärbt**.**

2.6 DNA-Isolation

2.6.1 Selektive Isolation niedermolekularer DNA-Fragmente

Während des apoptotischen Zelltodes wird ein Teil der zellulären DNA endonucleolytisch in oligonucleosomale Fragmente gespalten. Bei der Analyse dieser DNA durch Agarose-Gelelektrophorese zeigt sich eine sogenannte „DNA-Leiter“ aus 180bp-Fragmenten. Die Isolation wurde nach einem Protokoll von Gong et al. (1994) durchgeführt.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Phosphat-Citrat-Puffer (192 Teile 0.2M Na_2HPO_4 und 8 Teile 1M Citronensäure, pH7.8)
- Vacuumtrockner (SpeedVac)
- 0.25% Nonidet NP-40
- RNase (1mg/ml)
- Proteinase K (1mg/ml)

Durchführung:

- Fixierte Zellsuspension (2.2.7.2.) 10min bei 800g abzentrifugieren
- Ethanol vollständig entfernen
- Zellpellet in 40µl Phosphat-Citrat-Puffer pro 10^6 Zellen resuspendieren und in ein 1.5ml Eppendorf-Zentrifugenröhrchen überführen
- 30min bei RT inkubieren
- 5min bei 1000g abzentrifugieren
- Überstand in ein neues Röhrchen überführen und 15min in einem Vakuumtrockner (SpeedVac) aufkonzentrieren
- Zugabe von 3µl 0.25% Nonidet NP-40 und 3µl RNase (1mg/ml)
- 30min bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- Zugabe von 3µl Proteinase K (1mg/ml)
- 30min bei 37°C im Wasserbad inkubieren

Die so isolierte DNA kann dann direkt durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.6.2 Gelelektrophoretische Analyse der DNA

Die analytische und präparative Flachbett-Agarose-Gelelektrophorese stellt eine schnelle und einfache Methode zur elektrophoretischen Trennung und Reinigung der DNA dar (Maniatis et al. 1982). Die negativ geladene DNA wandert dabei in Abhängigkeit von Molekülgröße, Konformation, Agarosekonzentration und angelegter Spannung des elektrischen Feldes zur Anode. Lineare, doppelsträngige DNA wandert invers proportional dem natürlichen Logarithmus ihres Molekulargewichts; die DNA wird dabei nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt.

Bei der Analyse der in 2.6.1 isolierten DNA durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Ethidiumbromidfärbung zeigt sich bei Auftreten von Apoptose eine sogenannte DNA-Leiter aus oligonucleosomalen Fragmenten. Währenddessen ist bei Nekrose ein „Schmier“ zu sehen. Aus intakten Zellen sind keine niedermolekularen DNA-Fragmente zu isolieren.

Verwendete Materialien und Reagenzien:

- Qualex Gold Agarose
- Marker (λ-Hind III, 100bp -Leiter)
- 1xTAE-Puffer (0.04M Tris-Acetat; 0.01M EDTA)
- 2xLoading-Puffer (MBI-Fermentas)
- Elektrophoresekammer
- Spannungsgerät
- Ethidiumbromidfärbelösung (2µg/ml)

Durchführung:

- Gelzusammensetzung: 0.8% Agarose in 1xTAE-Puffer
- 2µl Ladepuffer mit 9µl DNA-Lösung aus 2.6.1. mischen
- Proben auf das Gel laden
- das Gel läuft 6-8 Stunden bei 25V
- 10min in Ethidiumbromidfärbelösung färben
- Auswertung am Transilluminator

2.7. Statistik

Zur quantitativen Auswertung der Apoptoseinduktion in den einzelnen Testansätzen wurde der t-Test angewendet. Der t-Test dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten (Bronstein und Semendjajew, 1989). Vorausgesetzt wird, daß der Stichprobenumfang entsprechend groß ist (n1>20). Die Signifikanzgrenzen (Irrtumswahrscheinlichkeit in %) wurden folgendermaßen festgelegt:
Wenn t gleich oder größer als der zugehörige Tabellenwert war, wurde der Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von

5% (p 0.05)	als schwach signifikant
1% (p 0.01)	als signifikant
0.1% (p 0.001)	als hoch signifikant

bezeichnet.

3. Ergebnisse

In diesen Untersuchungen wurde die Apoptosedetektion mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie (Messung des DNA-/Proteingehaltes), Darstellung internukleosomaler DNA-Fragmente im Agarosegel und fluoreszenzmikroskopischer Bestimmung einzelner Apoptosestadien durchgeführt. Dabei wurde die Aussagekraft der einzelnen Methoden analysiert. Zur Einführung der Apoptosebestimmung mit den Methoden der Durchflußzytometrie und der Agarose-Gelelektrophorese wurde Actinomycin D eingesetzt.

Im weiteren Verlauf wurden die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationsbereiche der α,β-ungesättigten Aldehyde und Ketone durch die Ermittlung zytotoxischer Substanzkonzentrationen eingegrenzt. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte nach dem in 2.2.1 beschriebenen Trypanblau-Ausschlußtest (Phillips, 1973). Die für die Untersuchungen zur Induktion von Apoptose eingesetzten Substanzkonzentrationen beeinflußten die Viabilität der Zellen nicht.

Bei der nachfolgenden Zusammenstellung der Ergebnisse wurden sowohl der gesamte Sub-G1-Bereich, welcher neben apoptotischen Zellen Mikrokerne, apoptotische Bodies und Debris beinhaltet, als auch ein mit „Apoptose“ bezeichneter eingegrenzter Bereich quantitativ ausgewertet und als Säulendiagramm dargestellt. Der Apoptose-Bereich schließt Mikrokerne, apoptotische Bodies und Debris aus (siehe Abb.1.6).

3.1. Induktion von Apoptose durch Actinomycin D

3.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Actinomycin D auf die Zellinien U937, HL-60, K562 und Molt4

Zur Einführung der Methodik wurden die in der Literatur als wirksam beschriebenen Konzentrationen von 0.05µg/ml bis 5µg/ml Actinomycin D zur Induktion von Apoptose verwendet. Hierbei wurde das Auftreten von apoptotischen Zellpopulationen mit Hilfe der durchflußzytometrischen DNA/Protein-Messung untersucht. In dieser Versuchsreihe zeigte sich bei den Zellinien U937, HL-60 und Molt4 ein konzentrationsabhängiges Auftreten eines Sub-G1-Peaks apoptotischer Zellen nach der Inkubation mit Actinomycin D. Die Zellinie K562 wies keinen Sub-G1-Peak auf (Abb.3.1).

Bei der Zellinie U937 war bereits ab der niedrigsten Konzentration von 0.05µg/ml der Unterschied zur Kontrolle schwach signifikant; bei den Zellinien HL-60 und Molt4 war eine Signifikanz erst ab 0.5µg/ml zu sehen, obwohl der Sub-G1-Peak schon ab 0.1µg/ml detektiert

werden konnte. Die Stärke der Apoptoseinduktion variierte innerhalb der getesteten Zellinien, wobei die Linien U937 und HL-60 den gleichen konzentrationsabhängigen Verlauf zeigten, der Anteil apoptotischer Zellen bei HL-60 jedoch um ca. 20% höher lag. Bei der Zellinie Molt4 fiel die Apoptoseinduktion sehr viel geringer aus (siehe Abb.3.2 und 3.3).

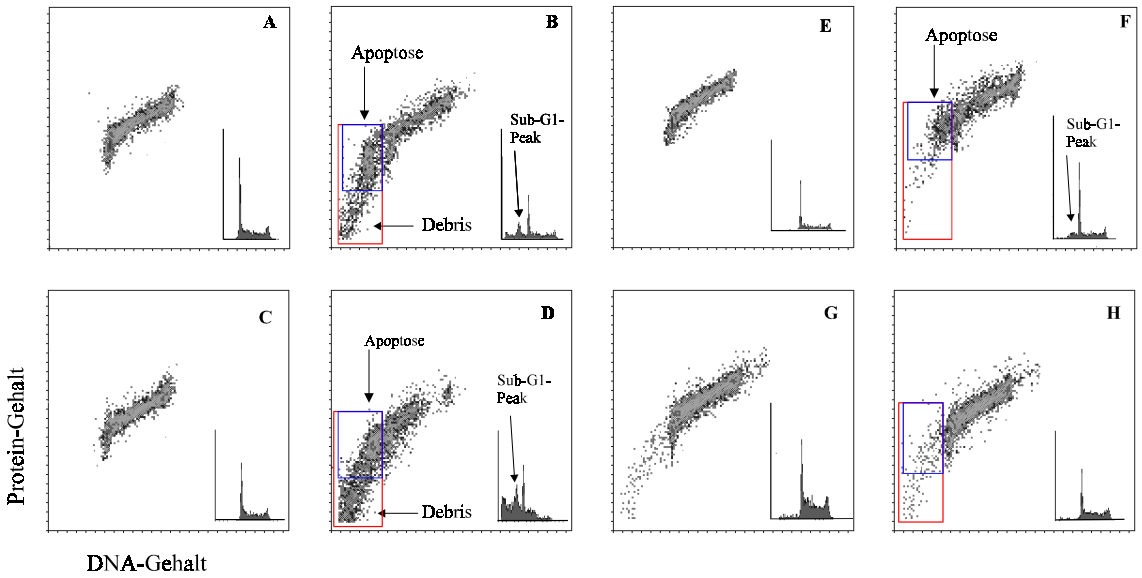


Abb.3.1: Histogramme der 1-und 2-Parameter-Messung der Inkubation mit Actinomycin D. A. Kontrolle der Zellinie U937, B. 0.5µg/ml Actinomycin D, C. Kontrolle der Zellinie HL-60, D. 0.5µg/ml Actinomycin D, E. Kontrolle der Zellinie Molt4, F. 0.5µg/ml Actinomycin D, G. Kontrolle der Zellinie K562, H. 0.5µg/ml Actinomycin D. Das rote Gate bezeichnet den gesamten Sub-G1-Bereich, das blaue Gate den Apoptose-Bereich.

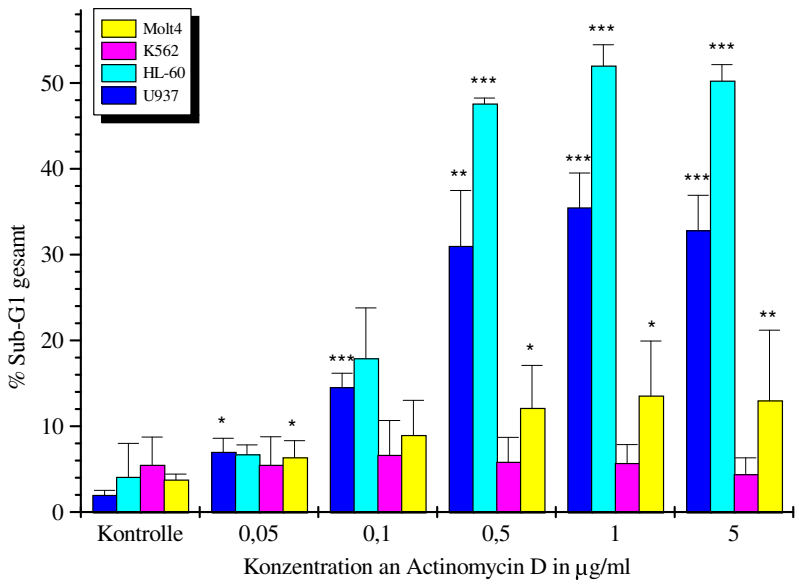


Abb.3.2: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch Actinomycin D.* = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

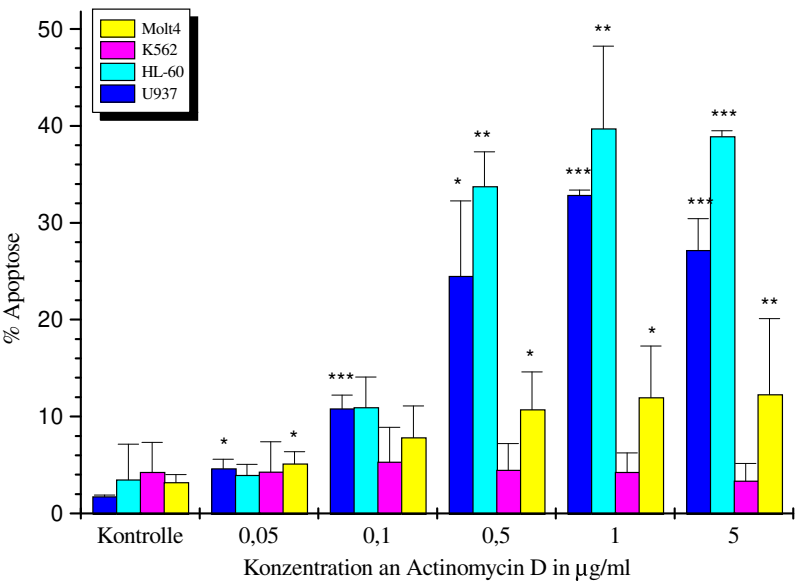


Abb.3.3: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch Actinomycin D. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.2 Analyse der Induktion von Apoptose mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die während des apoptotischen Zelltodes auftretende endonucleolytische Spaltung der DNA in oligonucleosomale Fragmente wurde bei allen 4 Zellinien nach der Inkubation mit 0.5µg/ml Actinomycin D untersucht. Die Zellinien U937 und HL-60 zeigten wie in Abb.3.4 dargestellt eine DNA-Leiter solcher DNA-Fragmente, während bei den Zellinien K562 und Molt4 keine typische DNA-Leiter gefunden wurde.

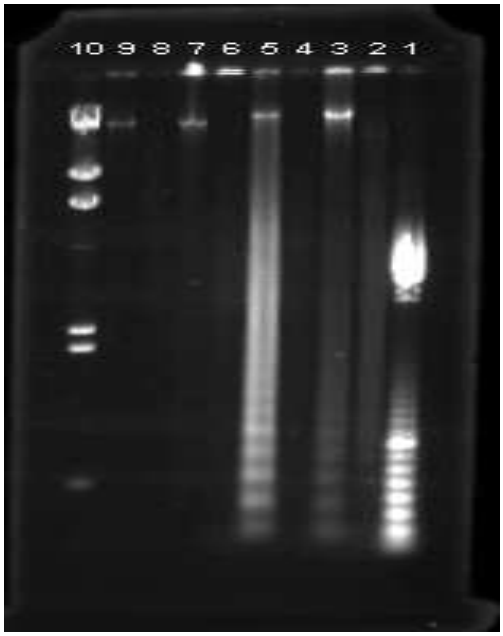


Abb.3.4: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 0.5µg/ml Actinomycin D für 6h**. Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-Actinomycin D, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-Actinomycin D, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-Actinomycin D, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-Actinomycin D, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.2 Apoptoseinduzierendes Potential von 2-Cyclohexen-1-on

3.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose

3.2.1.1 Durchflußzytometrische Analyse

Bei der Analyse des apoptoseinduzierenden Potentials von 2-Cyclohexen-1-on konnte für die Zellinien U937, HL-60 und K562 eine apoptotische Zellpopulation detektiert werden. Bei der Zellinie Molt4 war durchflußzytometrisch keine Apoptose zu finden.

Die apoptotische Zellpopulation trat jedoch nur bei der Zellinie K562 als Sub-G1-Peak auf. Bei den Zellinien U937 und HL-60 stellte sie sich als „Wolke“ oberhalb der S-Phase dar (siehe Abb.3.5, A und B), so daß sowohl der „Sub-G1-Bereich“ als auch der „Apoptose“-Bereich auf diese Population ausgedehnt wurde (Abb.3.5, A und B, rotes und blaues Gate). Dieser Bereich wurde zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert.

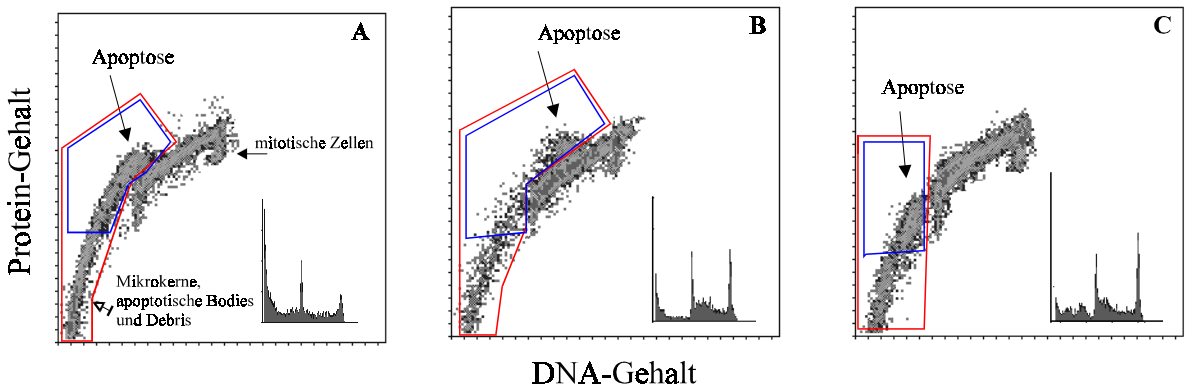


Abb.3.5: Histogramme der 1- und 2-Parameter-Messung der Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on für 24h. A. Zellinie U937 inkubiert mit 50µM, B. Zellinie HL-60 inkubiert mit 75µM und C. Zellinie K562 inkubiert mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on. Das rote Gate bezeichnet den gesamten Sub-G1-Bereich, das blaue Gate den Apoptose-Bereich.

Die quantitative Auswertung ergab ab 50µM eine signifikante Erhöhung bei den Linien U937 und K562 sowie ab 75µM bei der Linie HL-60 (siehe Abb.3.6 und 3.7). Die U937-Zellen zeigten nach einem Maximum (75µM) bei 100µM einen leichten Abfall, während die Größe der apoptotischen Zellpopulation bei den HL-60-Zellen sich nicht weiter veränderte. Bei der Zellinie K562 konnte ein Rückgang auf Kontrollniveau festgestellt werden. Die Stärke der Apoptoseinduktion variierte bei diesen drei Zellinien nicht. Die statistische Auswertung der Zellinie Molt4 ergab ab einer Konzentration von 50µM signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Abgrenzung eines Sub-G1-Peaks war jedoch nicht möglich.

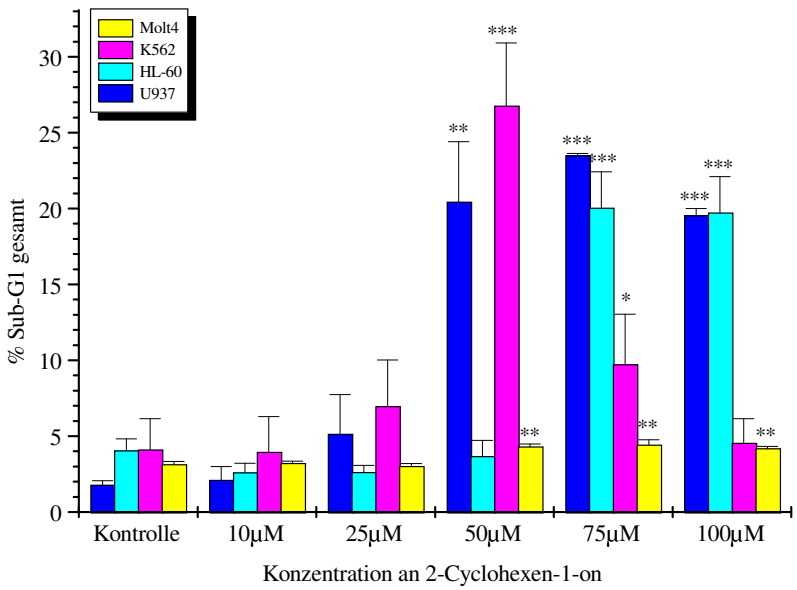


Abb.3.6: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

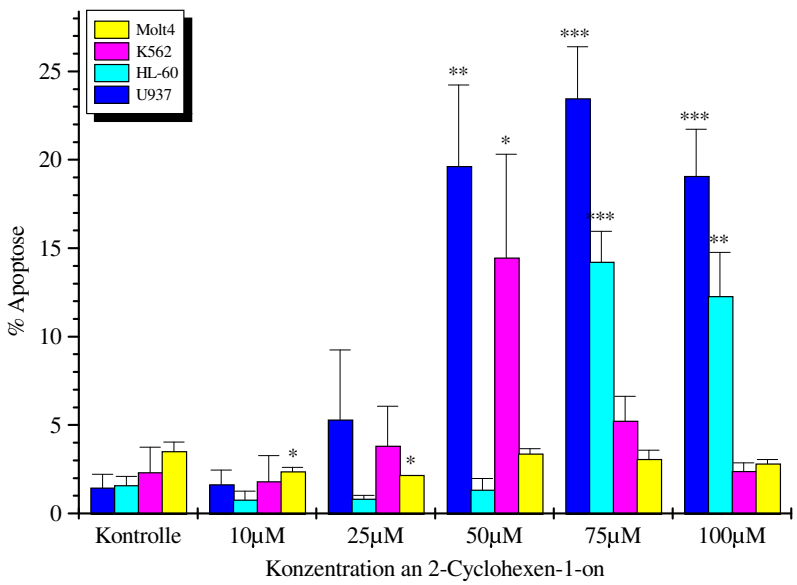


Abb.3.7: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.1.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologischen Veränderungen während des apoptotischen Zelltodes wurden fluoreszenzmikroskopisch an jeweils 500 Zellen ausgewertet. In den nachfolgenden Abbildungen ist die Aufteilung in Zellen mit stark kondensiertem Kern, Zellen mit fragmentiertem Kern, apoptotische Bodies und Debris dargestellt. Insgesamt traten bei der mikroskopischen Auswertung hohe Schwankungen zwischen den durchgeführten Versuchen auf.

Bei der Zellinie U937 setzte sich die durchflußzytometrisch detektierte Population apoptotischer Zellen aus Vertretern aller drei Stadien zusammen. Zellen mit stark kondensiertem Kern (d.h. frühe Apoptosestadien) wiesen einen leichten, nicht signifikanten Anstieg ab 50µM auf. Debris war kaum vorhanden. Die Zellen mit fragmentiertem Kern zeigten ein Maximum bei 75µM, danach erfolgte ein Abfall (Abb.3.8, U937). Der Anteil apoptotischer Bodies wies einen ähnlichen Verlauf (Maximum bei 50µM) auf. Im Gegensatz dazu bestand die apoptotische Population bei der Zellinie HL-60 fast ausschließlich aus Zellen mit fragmentiertem Kern (Abb.3.8, HL-60), die einen deutlichen, hoch signifikanten Anstieg ab 75µM ergaben.

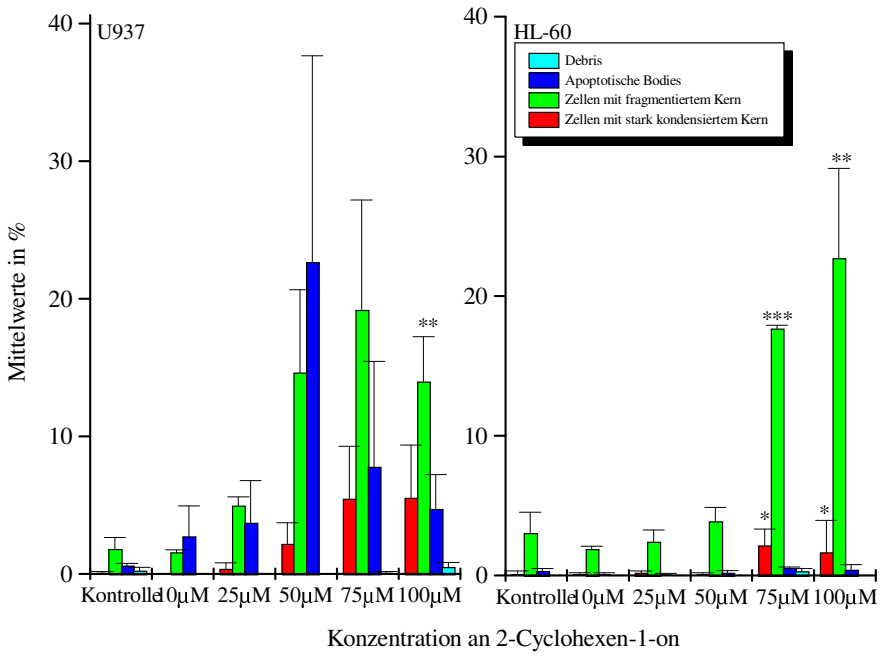


Abb.3.8: Mikroskopische Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinie U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Diskrepanzen fanden sich für die Zellinien K562 und Molt4. Die bei K562-Zellen durchflußzytometrisch detektierte apoptotische Zellpopulation konnte mikroskopisch nicht bestätigt werden (Abb.3.9, K562). Bei der Zellinie Molt4, die keinen Sub-G1-Peak zeigte, war im Mikroskop jedoch eine deutliche Population an Zellen mit stark kondensiertem Kern zu finden (Abb.3.9, Molt4), die ab 75µM signifikant anstieg.

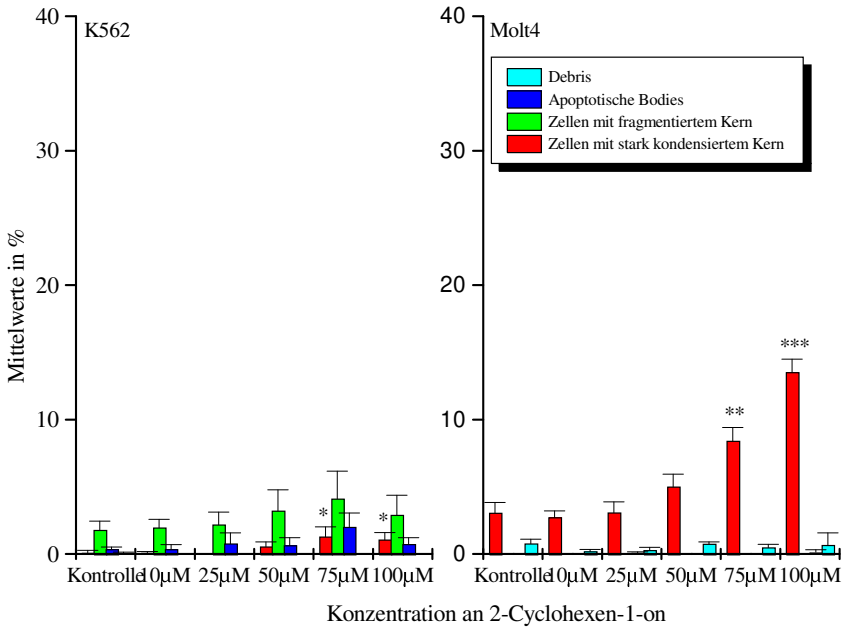


Abb.3.9: Mikroskopische Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Die Zusammenfassung der einzelnen Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies zur Summe aller apoptotischer Zellen ergab für die Zellinien U937 und HL-60 im Vergleich zu der durchflußzytometrischen Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereiches keinen Unterschied (Abb.3.10). Für die Zellinie K562 war bei 50µM jedoch ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Auswertungen zu verzeichnen. Ebenso trat bei der Inkubation der Zellinie Molt4 mit 75µM und 100µM ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Auswertungsmethoden auf (Abb.3.11).

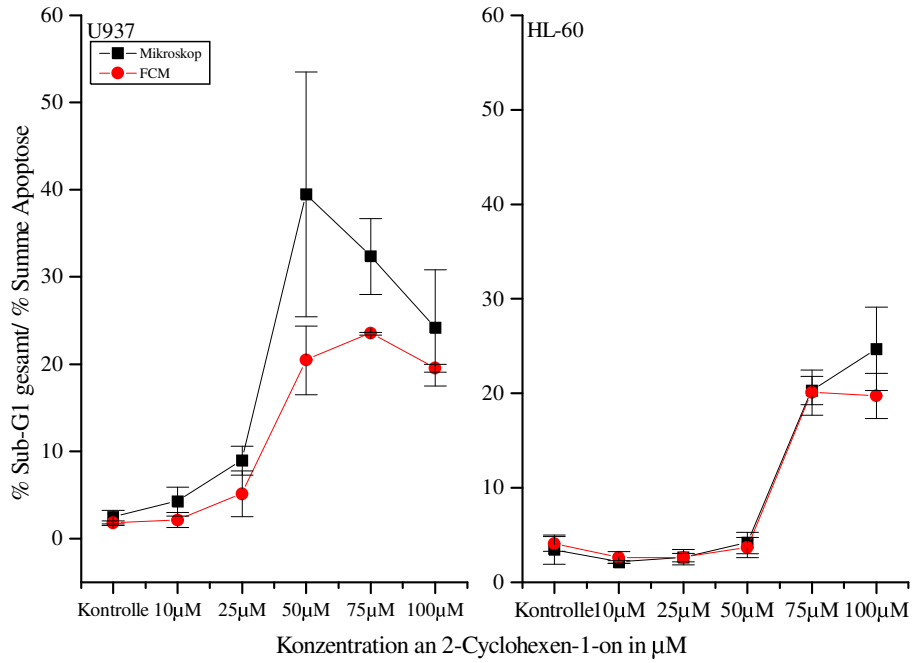


Abb.3.10: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. * = schwach signifikante,** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Mikroskopie.

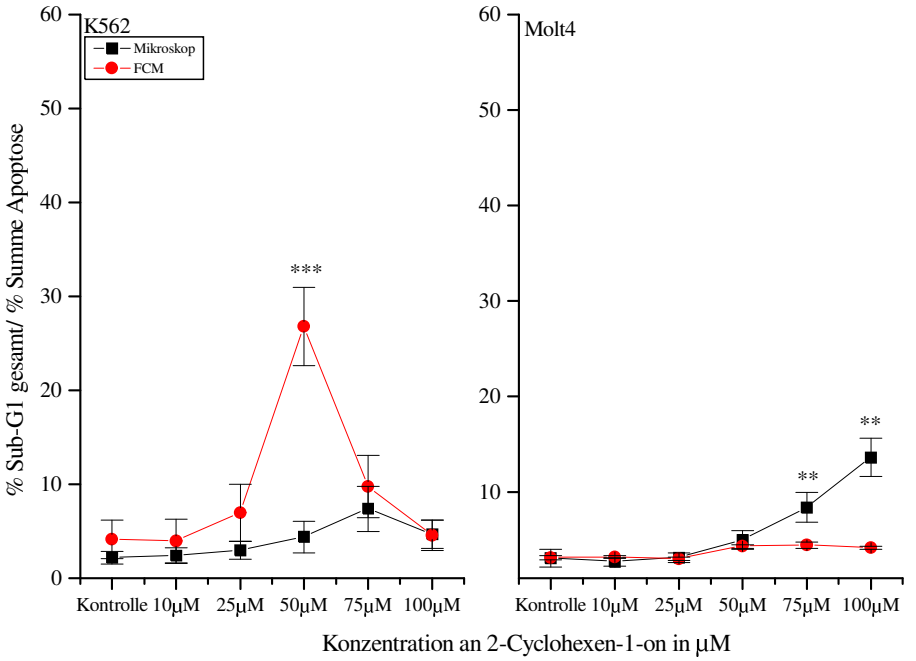


Abb.3.11: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. * = schwach signifikante,** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Mikroskopie.

3.2.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose

3.2.2.1 Durchflußzytometrische Analyse

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde für die Zellinien U937, K562 und Molt4 eine Konzentration von 50µM und für die Zellinie HL-60 eine Konzentration von 75µM eingesetzt.

Die quantitative Auswertung ergab bei der Zellinie U937 ab einer Inkubationsdauer von 8h eine signifikante Erhöhung, bei der Zellinie K562 ab 12h eine schwach signifikante Erhöhung, welche bei einer 24h-Inkubation signifikant wurde. Die Zellinie HL-60 zeigte erst bei einer 24stündigen Inkubation einen dann jedoch hoch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Bei der Zellinie Molt4 konnte auch hier keine apoptotische Zellpopulation detektiert werden (Abb.3.12 und 3.13).

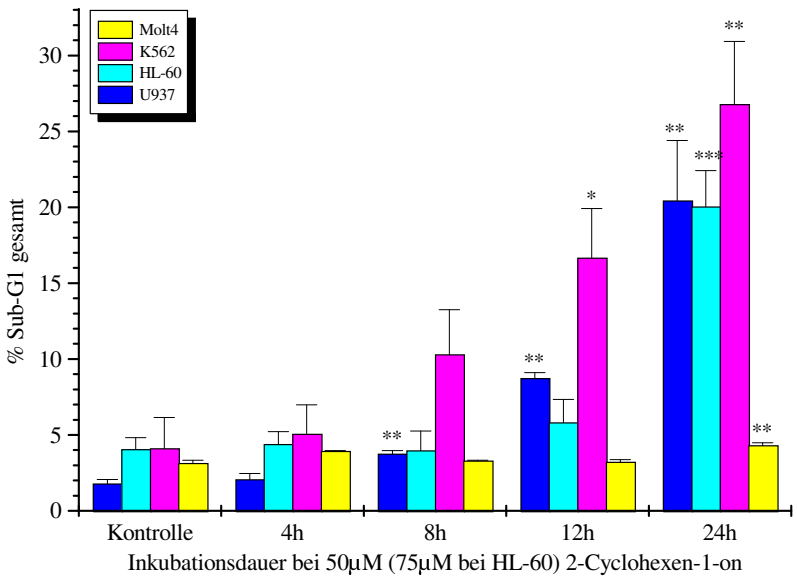


Abb.3.12: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

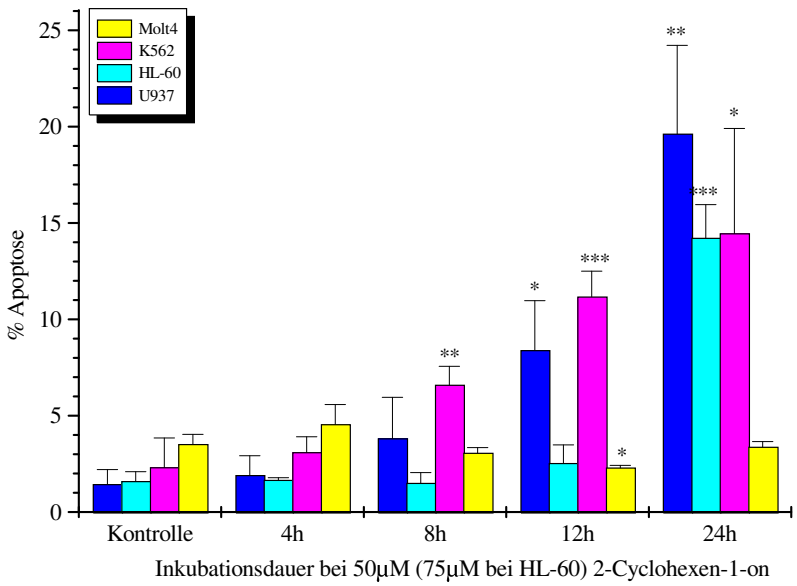


Abb.3.13: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.2.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, daß sich die durchflußzytometrisch detektierte apoptotische Population der Zellinie U937 hauptsächlich aus Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies, die einen zeitabhängigen, jedoch nicht signifikanten Anstieg ab 4h aufwiesen, zusammensetzte (siehe Abb.3.14, U937). Die Zellen mit stark kondensiertem Kern zeigten ebenfalls einen Anstieg, der bei 12h signifikant wurde. Es traten bei der Zellinie U937 sehr starke Schwankungen der mikroskopischen Auswertung zwischen den 3 verschiedenen Versuchen auf. Die apoptotische Population der Zellinie HL-60 bestand fast ausschließlich aus Zellen mit fragmentierten Kernen. Diese zeigten einen leichten, schwach signifikanten Anstieg ab 4h und stiegen dann bei der 24h-Inkubation hoch signifikant an (Abb.3.14, HL-60). Für die Zellinien K562 und Molt4 konnte mikroskopisch kein signifikanter Anstieg der ausgewerteten Apoptosestadien detektiert werden (Abb.3.15).

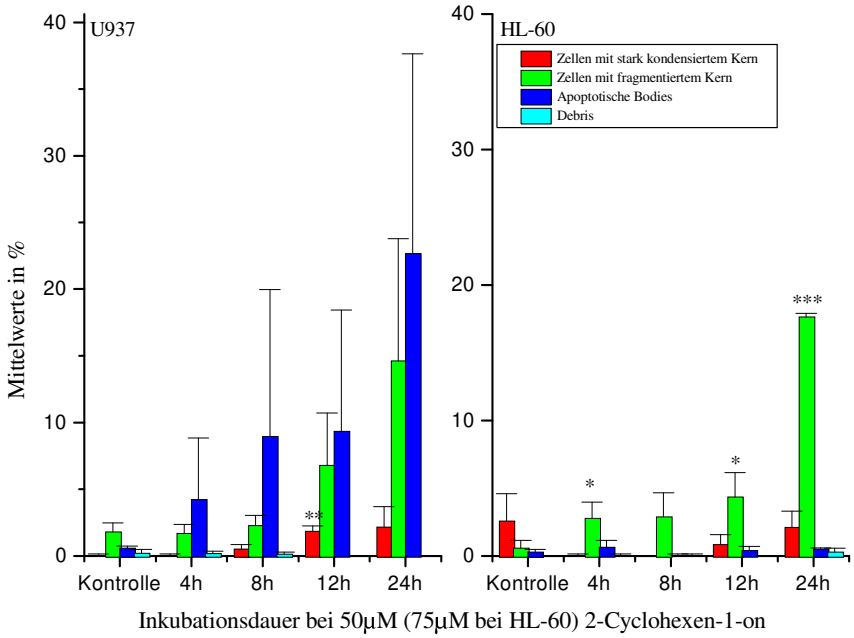


Abb.3.14: Mikroskopische Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

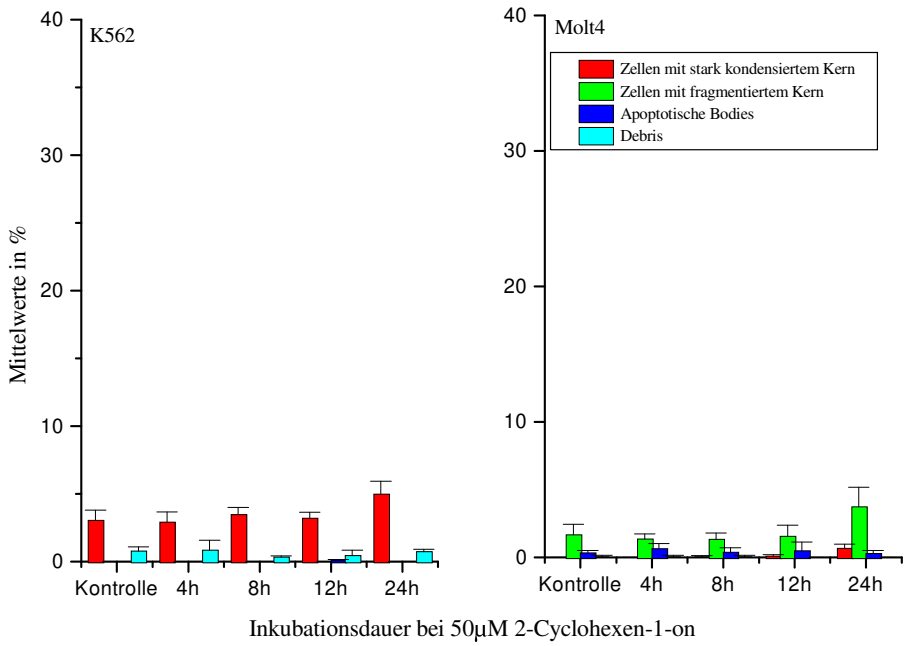


Abb.3.15: Mikroskopische Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Die bei der Konzentrationskinetik aufgetretenen Diskrepanzen zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie für die Zellinien K562 und Molt4 fanden sich bei der Zeitkinetik nur für die Zellinie K562 wieder. Auch hier konnte die durchflußzytometrisch detektierte apoptotische Population mikroskopisch nicht bestätigt werden. Der Unterschied zwischen den beiden Auswertungsmethoden war schwach signifikant bei einer Inkubationsdauer von 4h, signifikant bei 8h und hoch signifikant bei 12h und 24h (siehe Abb.3.16).

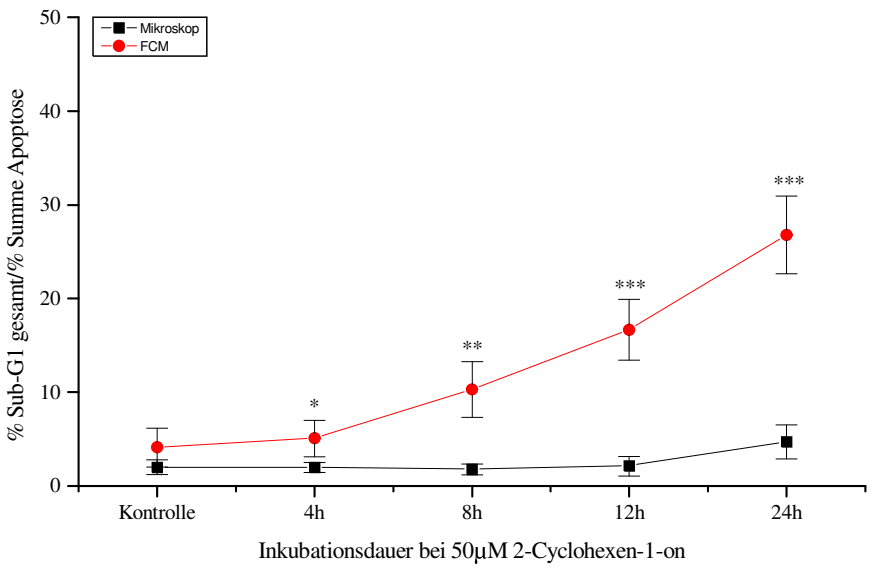


Abb.3.16: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei der Zellinie K562. * = schwach signifikante,** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Mikroskopie.

3.2.3. Analyse der Induktion von Apoptose mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Isolation zur Darstellung oligonucleosomaler DNA-Fragmente wurde bei den Zellinien U937, K562 und Molt4 nach einer Inkubation mit 50µM, bei der Zellinie HL-60 nach Inkubation mit 75µM durchgeführt. Die Abb. 3.17 zeigt für die Linien U937, HL-60 und K562 das Auftreten dieses Apoptosemarkers. Bei der Zellinie Molt4 war keine typische DNA-Leiter zu erkennen.

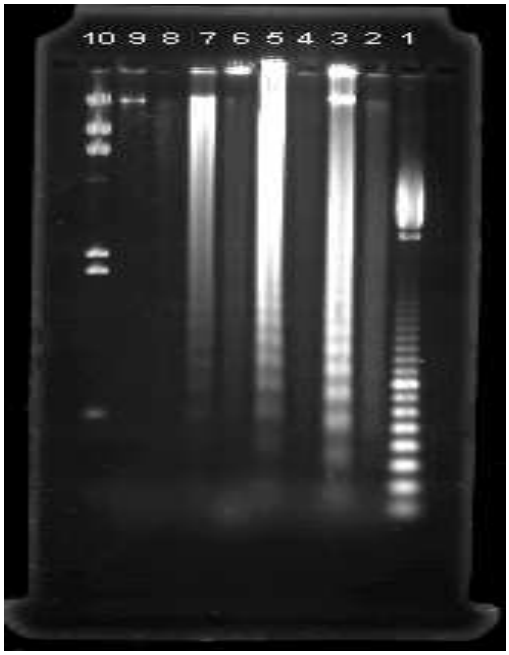


Abb.3.17: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 50µM bzw. 75µM 2-Cyclohexen-1-on für 24h. **Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-2-Cyclohexen-1-on, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-2-Cyclohexen-1-on, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-2-Cyclohexen-1-on, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-2-Cyclohexen-1-on, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.2.4 Einfluß von 2-Cyclohexen-1-on auf den Zellzyklus

Neben dem Auftreten von Apoptose bei drei Zellinien, konnte bei der durchflußzytometrischen Messung ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mitotischen Zellpopulation festgestellt werden. Diese liegt im 2-Parameter-Dot-Plot unterhalb der G2-Population (siehe Abb.1.6). Hierbei zeigten alle vier Zellinien einen dosisabhängigen Anstieg mit jedoch deutlichen Unterschieden in der Stärke der Reaktion. Für die Zellinie U937 war außerdem bei 100µM kein weiterer Anstieg der mitotischen Zellpopulation mehr zu verzeichnen. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung graphisch dargestellt.

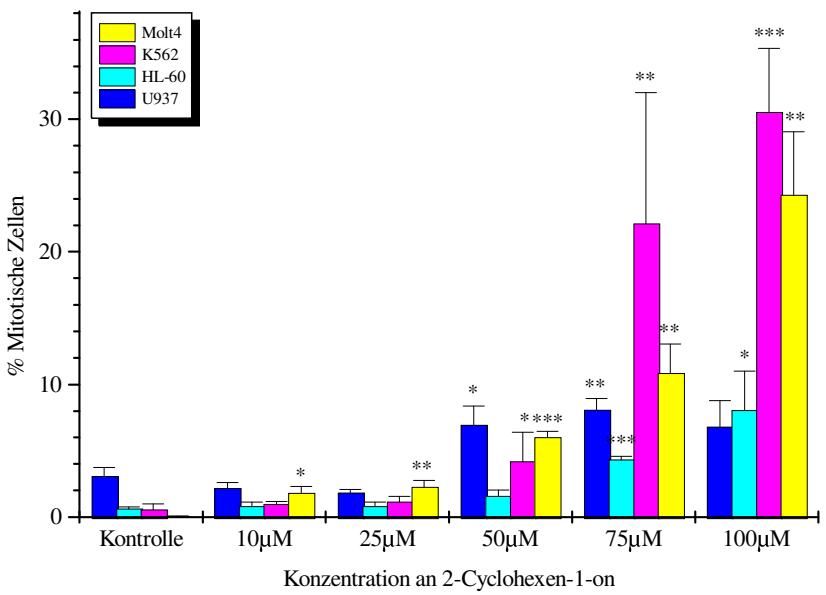


Abb.3.18: Durchflußzytometrische Auswertung der mitotischen Zellpopulation der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Die mikroskopische Auswertung zeigte ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg der mitotischen Zellpopulation bei allen vier Zellinien (siehe Tab.3.1).

	U937	**HL-60**	**K562**	**Molt4**
Kontrolle	3,80±1,44	2,12±0,27	3,00±1,03	2,44±0,76
10µM	3,53±0,85	1,47±1,20	2,77±0,94	2,67±0,95
25µM	3,54±0,91	2,25±0,24	2,68±0,30	2,93±0,57
50µM	10,94±2,28	2,99±0,46	7,48±5,12	6,70±1,14
75µM	10,98±4,06	4,41±1,60	34,68±14,67	11,70±3,49
100µM	7,98±2,60	10,57±4,39	48,88±9,38	21,19±2,72

Tab.3.1: Mikroskopische Auswertung des Anteils mitotischer Zellen der mit 2-Cyclohexen-1-on behandelten Zellkulturen der Zellinien U937, HL-60, K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen in% ± Standardabweichung angegeben.

3.2.4.1 Phasenspezifität von 2-Cyclohexen-1-on

Zur Bestimmung der Phasenspezifität der eingesetzten Substanz wurde eine Zellzyklusanalyse der DNA-Messung (1-Parameter) durchgeführt. Dabei kann der Anteil der G0/G1-Zellen, der S-Phase-Zellen sowie der G2/M-Zellen in Prozent bestimmt werden. Anhand der 2-Parameter-Dot-Plots konnte man sehen, daß die apoptotischen Zellen der Zellinien U937 und HL-60 aus der S-Phase kamen und somit eine „Wolke“ oberhalb der S-Phase darstellten (Abb.3.5). Dies läßt sich mit dem Anstieg der S-Phase (Abb.3.18, A und B, grüne Linie) in Zusammenhang bringen. Gleichzeitig erfolgte ein Abfall der G0/G1-Phase. Der in 3.2.4 dargestellte dosisabhängige Anstieg der mitotischen Zellpopulation korreliert mit dem Anstieg der G2/M-Phase (Abb.3.18, A und B, rote Linie). Für die Zellinie K562 zeigte sich ein deutlicher dosisabhängiger Abfall der G0/G1- und der S-Phase sowie ein gleichzeitiger Anstieg der G2/M-Phase (Abb.3.18, C). Bei einer Konzentration von 75µM konnte ein fast kompletter G2/M-Arrest beobachtet werden. Die Zellinie Molt4 zeigte einen starken dosisabhängigen Abfall der G0/G1-Phase mit gleichzeitigem leichten Anstieg der S- und G2/M-Phase.

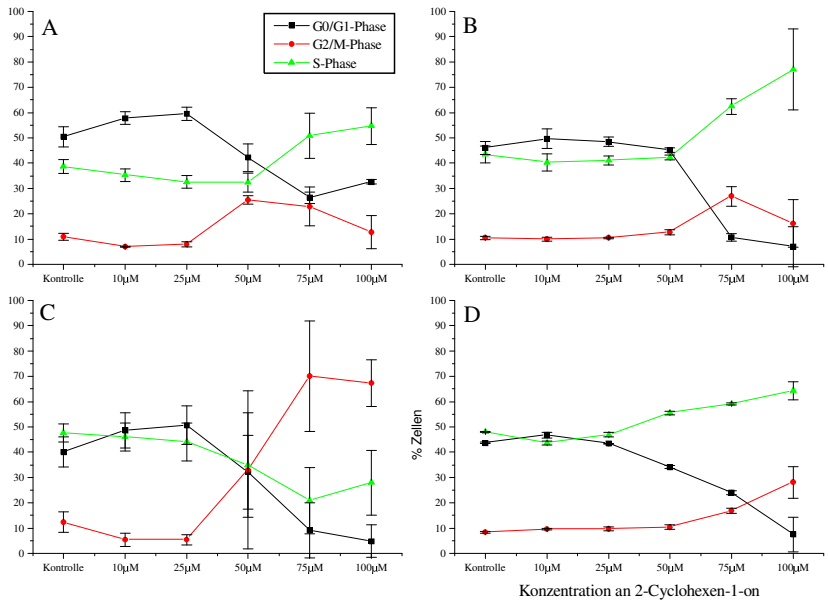


Abb.3.18: Zellzyklusanalyse der Konzentrationskinetik von 2-Cyclohexen-1-on. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

Bei der Untersuchung der Zeitkinetik zeigte sich bei den Zellinie U937, HL-60 und K562 ein deutlicher zeitabhängiger Anstieg der G2/M-Phase (Abb3.19, rote Linie) mit parallelem Abfall der G0/G1-Phase (Abb.3.19, schwarze Linie). Dieser Abfall der G0/G1-Phase war auch bei den Molt4-Zellen zu beobachten, ohne daß man eine Veränderung der G2/M-Phase sah. Die Zellinien HL-60 und Molt4 zeigten zudem bei 24h einen deutlichen Anstieg der S-Phase, was zumindest bei der Zellinie HL-60 mit dem Auftreten apoptotischer Zellen einherging. Bei den Zellinien U937 und K562 ging die S-Phase zeitabhängig zurück.

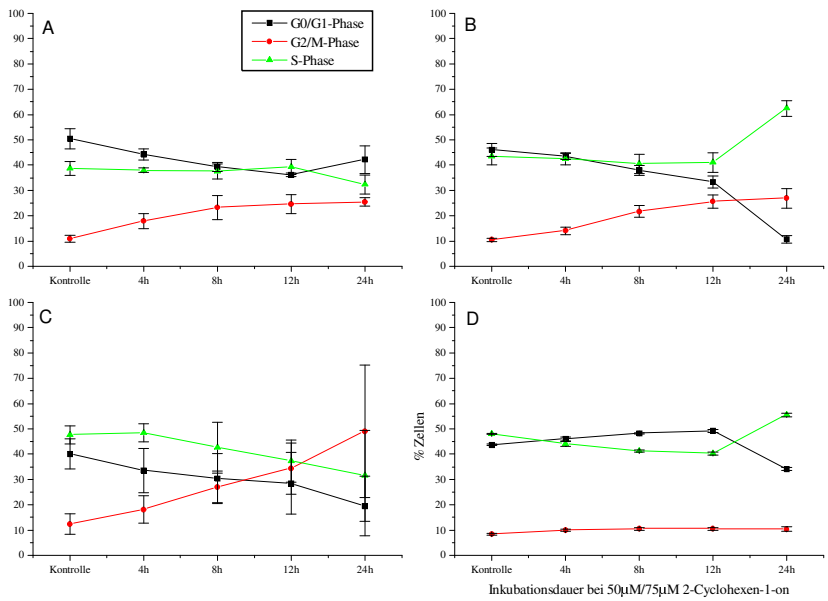


Abb.3.19: Zellzyklusanalyse der Zeitkinetik von 2-Cyclohexen-1-on. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

3.3 Apoptoseinduzierendes Potential α,β-ungesättigter Aldehyde

Bei der Untersuchung des apoptoseinduzierenden Potentials α,β-ungesättigter Aldehyde wurde die Inkubationsdauer gegenüber 2-Cyclohexen-1-on (24h direkte Inkubation) geändert. Bei keiner der eingesetzten Zellinien konnte unter diesen Bedingungen Apoptose induziert werden. In Vorversuchen stellte sich eine 1h-Inkubation mit darauf folgender Postinkubation von 4h als optimal für die Erstellung einer Konzentrationskinetik heraus.

3.3.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal

3.3.1.1 Durchflußzytometrische Analyse

Die Analyse des apoptoseinduzierenden Potentials von trans-2-Hexenal zeigte das Auftreten einer apoptotischen Zellpopulation für die Zellinien U937 und HL-60. Hier traten neben einem deutlichen Sub-G1-Peak apoptotische Zellen oberhalb der G0/G1-Phase und der S-Phase auf. Hier wurde der „Sub-G1-Bereich“ um diese Population erweitert (Abb.3.20,B, schwarzes Gate). Dieser Bereich wurde zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert.

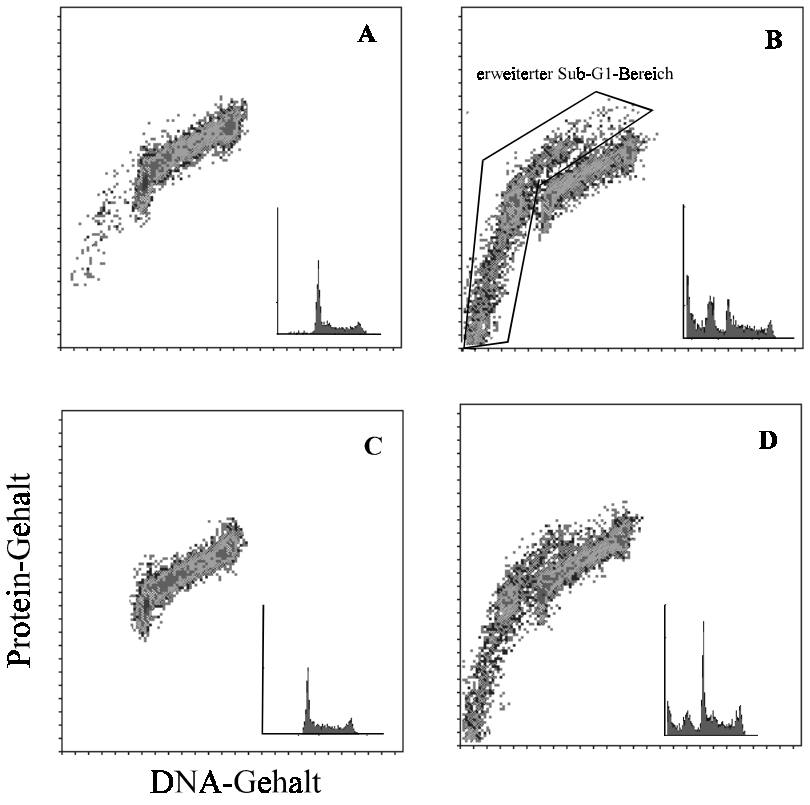


Abb.3.20: 1- und 2-Parameter-Messung der Inkubation mit trans-2-Hexenal für 1h mit einer 4h-Postinkubation. A. Kontrolle der Zellinie U937, B. Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal, C. Kontrolle der Zellinie HL-60, D. Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal. Das in B. eingezeichnete Gate zeigt den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung ergab für die Zellinie U937 eine leichte Erhöhung zur Kontrolle ab 75µM, welche ab 100µM schwach signifikant und ab 125µM schließlich hoch signifikant wurde. Bei der Zellinie HL-60 trat erst ab 100µM ein deutlicher, dann jedoch hoch signifikanter Sub-G1-Peak auf. Beide Zellinien zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg dieser Population. Die Stärke der Apoptoseinduktion varriierte innerhalb dieser beiden Linien, wobei der Anteil apoptotischer Zellen der Linie U937 um ca. 20% höher lag (siehe Abb.3.21 und 3.22). Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten in dem eingesetzten Konzentrationsbereich keinen Sub-G1-Peak.

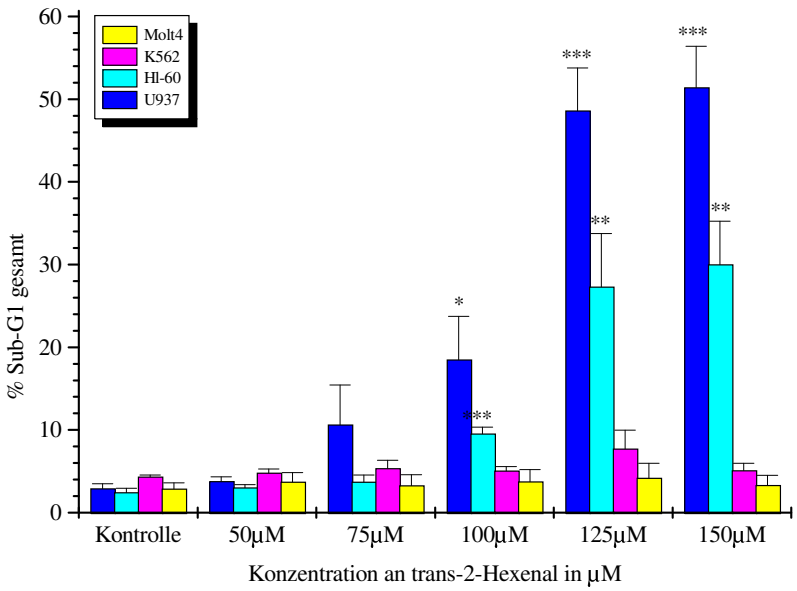


Abb.3.21: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

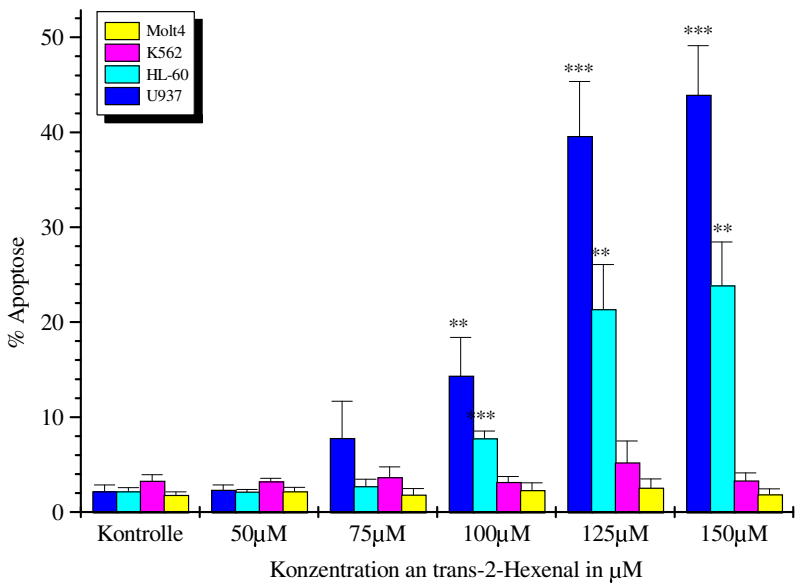


Abb.3.22: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.1.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulation ergab für die Zellinien U937 und HL-60 eine Zusammensetzung aus Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg dieser Apoptosestadien ab 75µM bei der Zellinie U937 und ab 100µM bei der Zellinie HL-60. Die apoptotischen Bodies zeigten eine leichte Plateaubildung bei 150µM. Bei der Zellinie U937 war der Anstieg der Zellen mit fragmentiertem Kern ab 75µM schwach signifikant, ab 125µM hoch signifikant. Die apoptotischen Bodies zeigten einen schwach signifikanten Anstieg ab 100µM. Bei der Zellinie HL-60 war der Anstieg der Zellen mit fragmentiertem Kern schwach signifikant bei 125µM und signifikant bei 150µM. Apoptotische Bodies zeigten bei 125µM einen hoch signifikanten Anstieg. Frühe apoptotische Zellen (Zellen mit stark kondensierterem Kern) und Debris waren nur in geringem Ausmaß vorhanden (siehe Abb.3.23). Trotzdem konnte zum Teil ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Bei den Zellinien K562 und Molt4 war auch fluoreszenzmikroskopisch kein deutlicher Anstieg apoptotischen Zellen zu finden (siehe Abb.3.24).

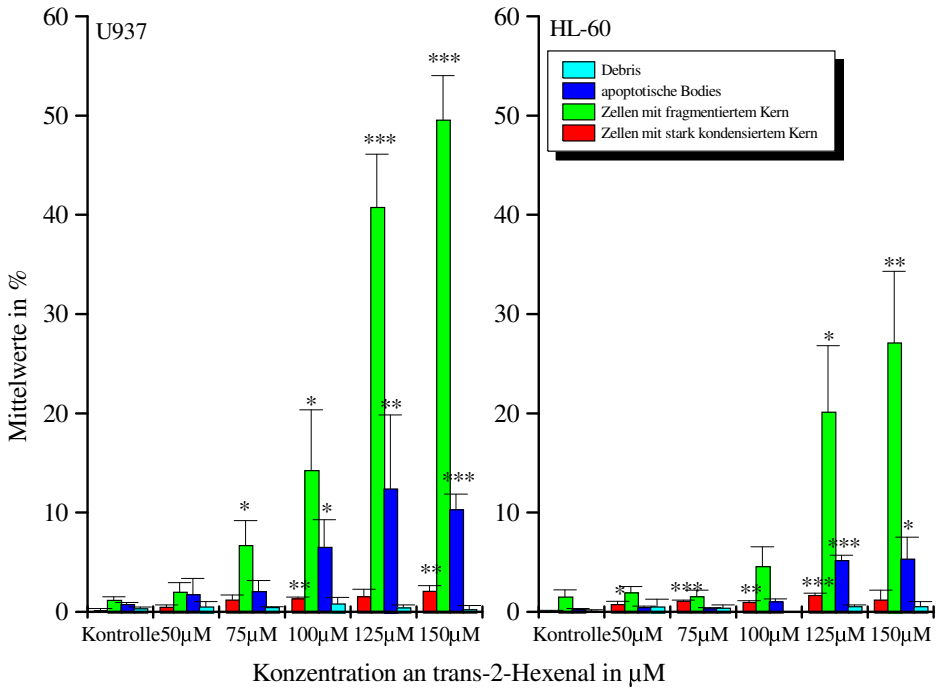


Abb.3.23: Mikroskopische Auswertung der durch trans-2-Hexenal induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

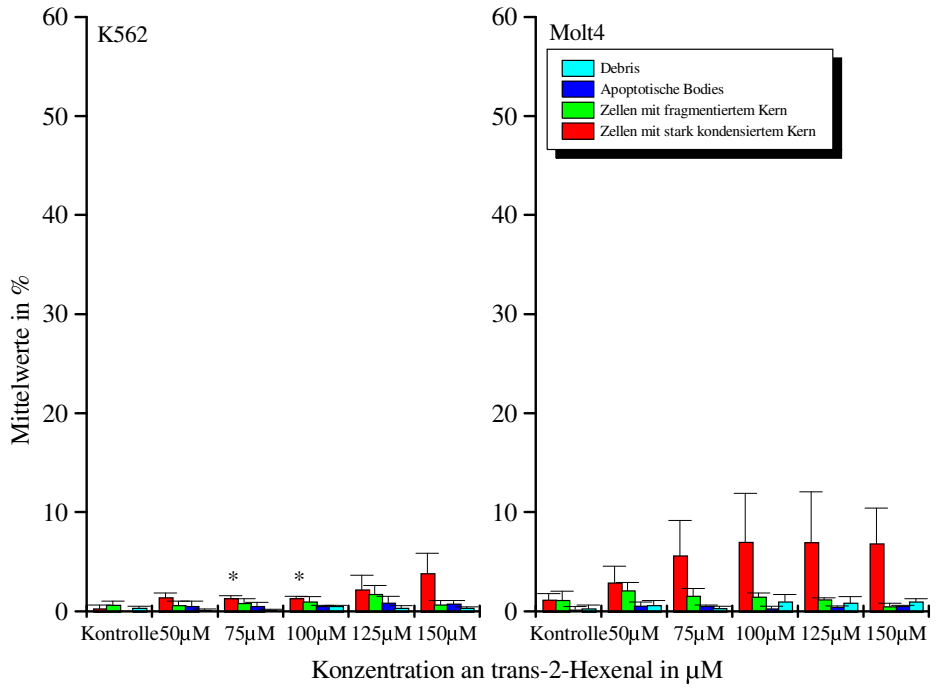


Abb.3.24: Mikroskopische Auswertung der durch trans-2-Hexenal induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Der Summenvergleich aller detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies mit der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches ergab für alle vier Zellinien keinen signifikanten Unterschied in der quantitativen Auswertung.

3.3.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal

3.3.2.1 Durchflußzytometrische Analyse

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde für alle Zellinien eine Konzentration von 125µM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1h. Danach schloß sich für U937, HL-60 und K562 eine Postinkubation nach Auswaschen des trans-2-Hexenals von bis zu 24h an. Bei der Zellinie Molt4 wurde die Postinkubationsdauer auf 72h erhöht. In Vorversuchen wurde die optimale Zelldichte ermittelt und dann überprüft, ob sich die Zellen im Versuchsverlauf im exponentiellen Wachstum befanden. Aufgrund dessen wurde im weiteren auf das Mitführen einer zeitlichen Kontrolle verzichtet und nur eine Nullkontrolle untersucht.

Die quantitative Auswertung ergab bei der Zellinie U937 einen signifikanten bis hoch signifikanten zeitabhängigen Anstieg der apoptotischen Population ab einer 2h-Postinkubation. Nach der 24h-Postinkubation zeigte sich ein leichter Abfall dieser Population. Für die Zellinie HL-60 ließ sich ein paralleler, in seiner Intensität jedoch niedrigerer Verlauf feststellen (siehe Abb.3.25 und 3.26). Entgegen der Konzentrationskinetik wurde hier für die Zellinie K562 eine deutliche, jedoch nicht signifikante Erhöhung bei der 24h-Postinkubation detektiert. Für die Zellinie Molt4 war auch nach 24h kein Sub-G1-Peak zu erkennen. Bei einer weiteren Verlängerung der Postinkubationsdauer bis 72h konnte nach 48h eine hoch signifikante Erhöhung des Sub-G1-Bereiches detektiert werden, welche auch nach 72h noch signifikant war. Bei Betrachtung des Apoptose-Bereiches, welcher apoptotische Bodies, Mikrokerne und Debris ausgeschließt, ist jedoch diese Erhöhung bei 72h nicht mehr zu sehen (Abb.3.26).

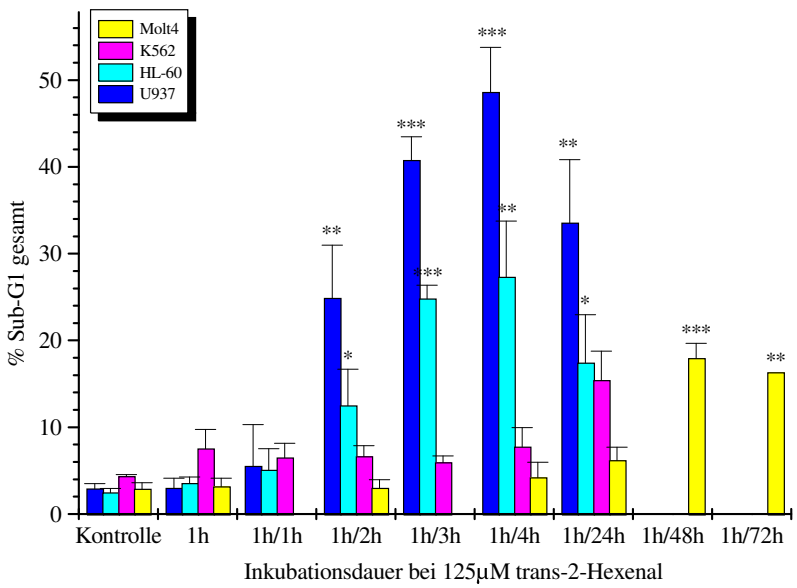


Abb.3.25: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

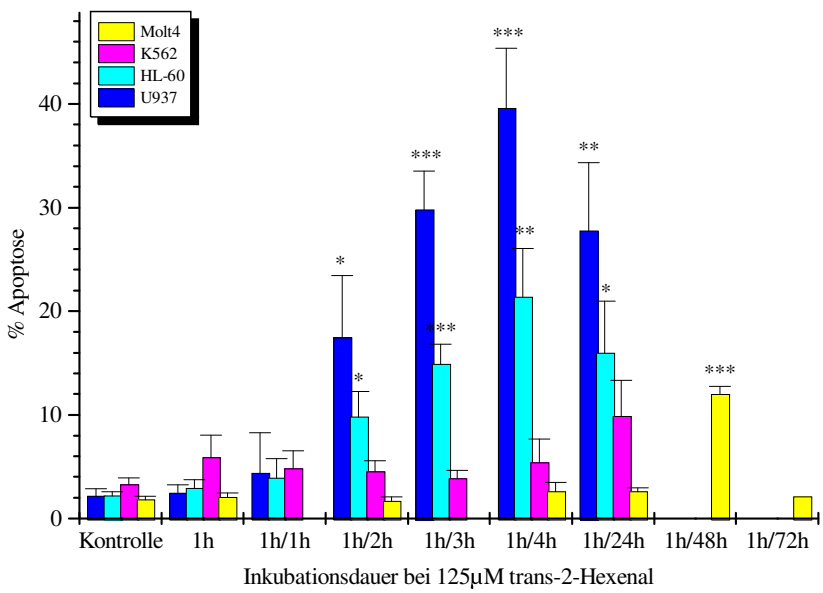


Abb.3.26: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.2.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, daß sich die durchflußzytometrisch detektierte apoptotische Population der Zellinie U937 aus Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies zusammensetzte, die einen zeitabhängigen Anstieg aufwiesen. Die Zellen mit fragmentiertem Kern stiegen ab einer 2h-Postinkubation deutlich, der Anstieg wurde aber erst nach der 3h-Postinkubation hoch signifikant. Die apoptotischen Bodies zeigten dagegen schon ab der 2h-Postinkubation einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Des weiteren war bei der 24h-Postinkubation ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des Debrisanteils zu verzeichnen. Gleichzeitig erfolgte ein deutlicher Abfall der detektierten Apoptosestadien (Abb.3.27, U937).

Die apoptotische Zellpopulation der Zellinie HL-60 bestand ebenfalls zum Großteil aus Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg dieser beiden Apoptosestadien ab der 2h-Postinkubation mit anschließendem Abfall bei der 24h-Postinkubation. Der Abfall der Zellen mit fragmentiertem Kern bei der 24h-Postinkubation fiel im Gegensatz zu der Zellinie U937 nicht so deutlich aus (Abb.3.27, HL-60). Ein Anstieg des Debrisanteil wurde nicht detektiert.

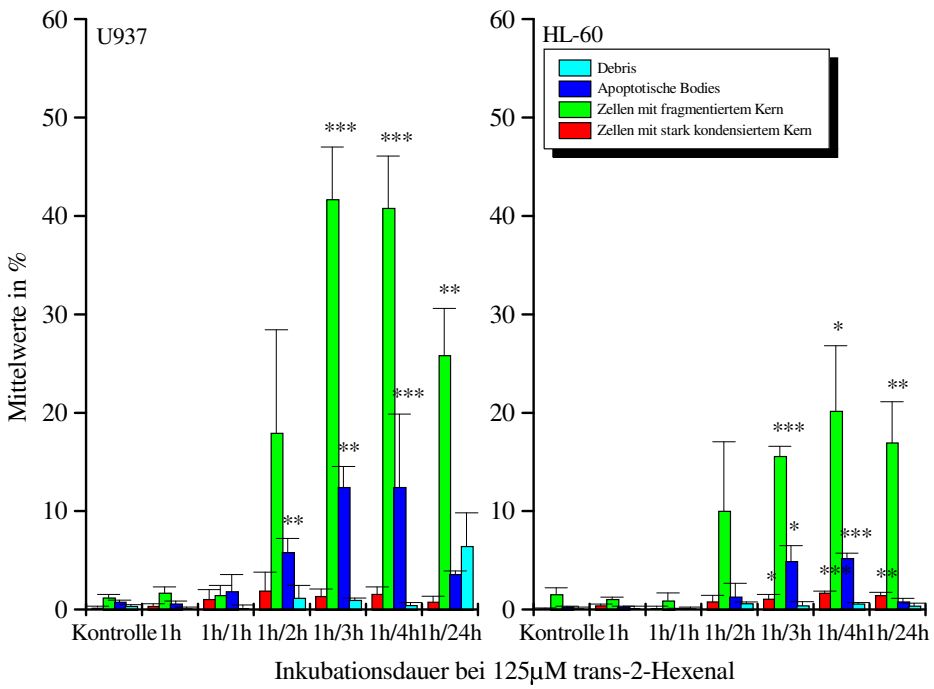


Abb.3.27: Mikroskopische Auswertung der durch trans-2-Hexenal induzierten Apoptose bei der Zellinie U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben.
* = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Die mikroskopische Auswertung der Zellinie K562 konnte für keine der ausgewerteten Stadien eine signifikante Erhöhung feststellen (Abb.3.28, K562). In der Summe ergab sich für die 24h-Postinkubation jedoch eine schwache Signifikanz.

Die mikroskopische Auswertung der Zellinie Molt4 zeigte die Zusammensetzung der ab 48h-Postinkubation detektierten Erhöhung des Sub-G1-Bereiches aus Zellen mit stark kondensiertem und fragmentiertem Kern. Der Anteil an Zellen mit stark kondensiertem Kern stieg ab der 2h-Postinkubation bis zur 24h-Postinkubation deutlich, aber nicht signifikant an. Danach erfolgte ein Abfall. Gleichzeitig konnte dann ein leichter Anstieg an Zellen mit fragmentiertem Kern und Debris beobachtet werden. Es traten jedoch große Schwankungen zwischen den verschiedenen Untersuchungen auf (siehe Abb.3.28, Molt4). In der Summe der apoptotischen Stadien zeigte sich nur bei der 72h-Postinkubation eine schwache Signifikanz.

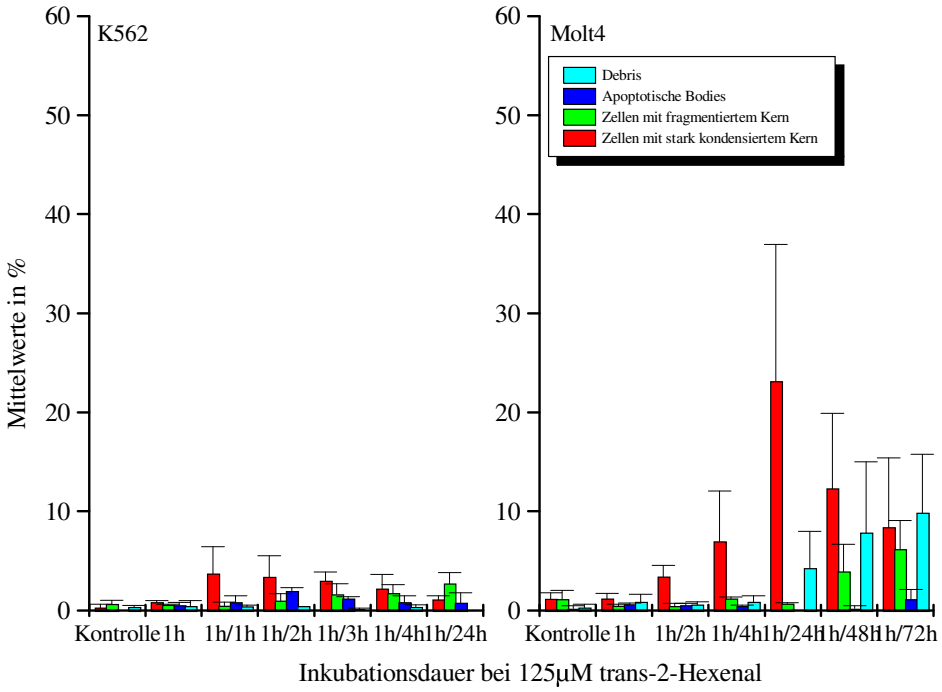


Abb.3.28: Mikroskopische Auswertung der durch trans-2-Hexenal induzierten Apoptose bei dern Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Der Vergleich zwischen der Summe aller mikroskopisch detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies und der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches ergab keinen signifikanten Unterschied.

3.3.3 Analyse der Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Isolation zur Darstellung oligonucleosomaler DNA-Fragmente wurde bei allen Zellinien nach einer Inkubation mit 125µM durchgeführt. Die Postinkubationsdauer betrug bei den Zellinien U937 und Hl-60 4h, bei der Zellinie K562 24h und bei der Zellinie Molt4 48h. Die Abb.3.29 zeigt für die Linien U937 und HL-60 das Auftreten dieses Apoptosemarkers. Bei den Zellinien K562 und Molt4 konnte keine typische DNA-Leiter festgestellt werden.

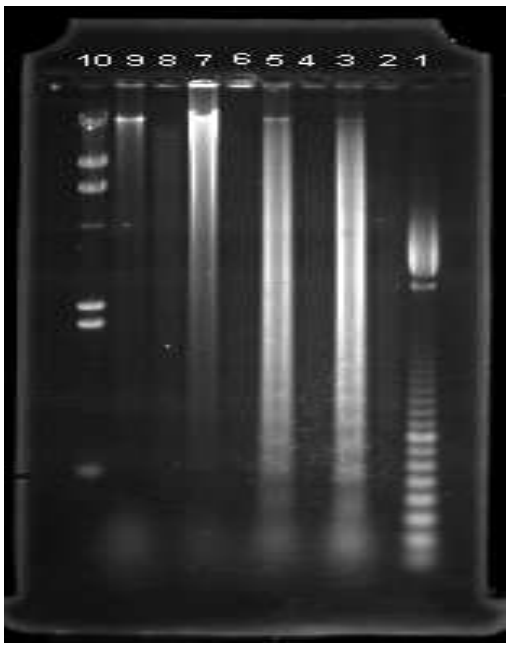


Abb.3.29: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal für 1h mit 4h- bzw. 24h- und 48h-Postinkubation.. **Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-trans-2-Hexenal, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-trans-2-Hexenal, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-trans-2-Hexenal, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-trans-2-Hexenal, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.3.4 Einfluß von trans-2-Hexenal auf den Zellzyklus

Der bei 2-Cyclohexen-1-on detektierte konzentrationsabhängige Anstieg der mitotischen Zellpopulation sollte auch für trans-2-Hexenal untersucht werden. Es zeigte sich hierbei durchflußzytometrisch keine deutliche Abgrenzung der mitotischen Zellpopulation zu den Zellen der G2-Phase. In der mikroskopischen Auswertung konnte jedoch für die Zellinie U937 ein hoch signifikanter, für die Zellinie HL-60 ein signifikanter und für die Zellinie K562 ein schwach signifikanter Anstieg bei 50µM festgestellt werden. Mit ansteigender Dosis sank die mitotische Zellpopulation bei diesen Zellinien unter den Kontrollwert (schwach signifikant, siehe Abb.3.30). Die Zellinie Molt4 zeigte ebenfalls ab 50µM eine deutliche Erhöhung der

mitotischen Zellpopulation. Diese wurde aber erst ab 75µM schwach signifikant. Danach erfolgte analog den anderen drei Zellinien ein dosisabhängiger Abfall unter den Kontrollwert (Abb.3.30).

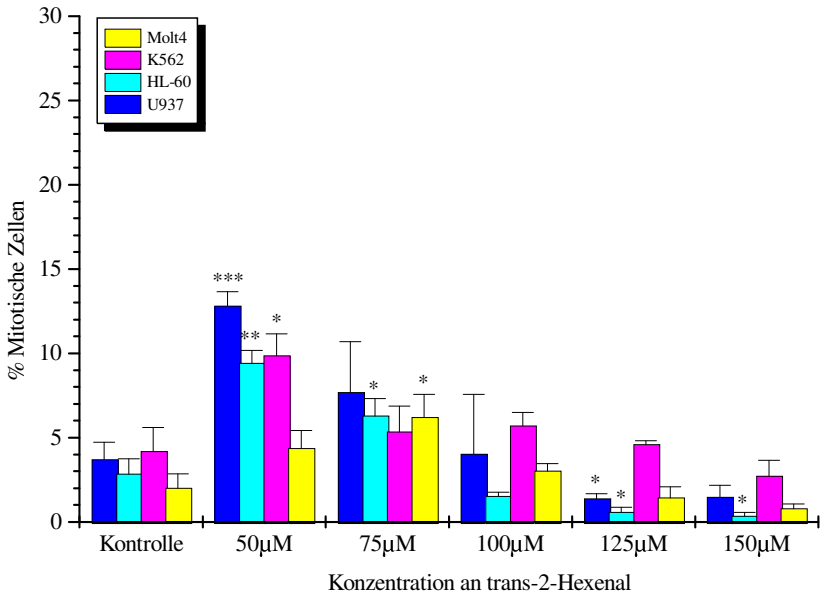


Abb.3.30: Mikroskopische Auswertung der mitotischen Zellpopulation der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Hexenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.4.1 Phasenspezifität von trans-2-Hexenal

Die Zellzyklusanalyse der DNA-Messung (1-Parameter) zeigte bei allen Zellinien einen Anstieg der G2/M-Phase bei 50µM (U937, HL-60 und K562) bzw. 75µM (Molt4). Mit ansteigender Konzentration ging dieser wieder zurück. Gleichzeitig mit dem G2/M-Anstieg erfolgte ein Abfall der G0/G1-Phase (siehe Abb.3.31). Die in der Durchflußzytometrie detektierten apoptotischen Zellen oberhalb der S-Phase zeigten sich in einem deutlichen Anstieg der S-Phase (Abb.3.31, A und B, grüne Linie). Die apoptotischen Zellen oberhalb der G0/G1-Phase traten erst ab 100µM auf und zeigten sich nur bei der Zellinie HL-60 in einer erkennbaren Erhöhung der G0/G1-Phase (Abb.3.31., B, schwarze Linie).

Die Analyse der Zeitkinetik bei 125µM bezüglich des Zellzyklus ließ bei einer 24h-Postinkubation der Zellinien U937, Hl-60 und Molt4 einen deutlichen Abfall der S-Phase mit gleichzeitigem Anstieg der G0/G1-Phase erkennen. Die Zellinie K562 zeigte keine zeitabhängigen Auswirkungen auf den Zellzyklus (siehe Abb.3.32).

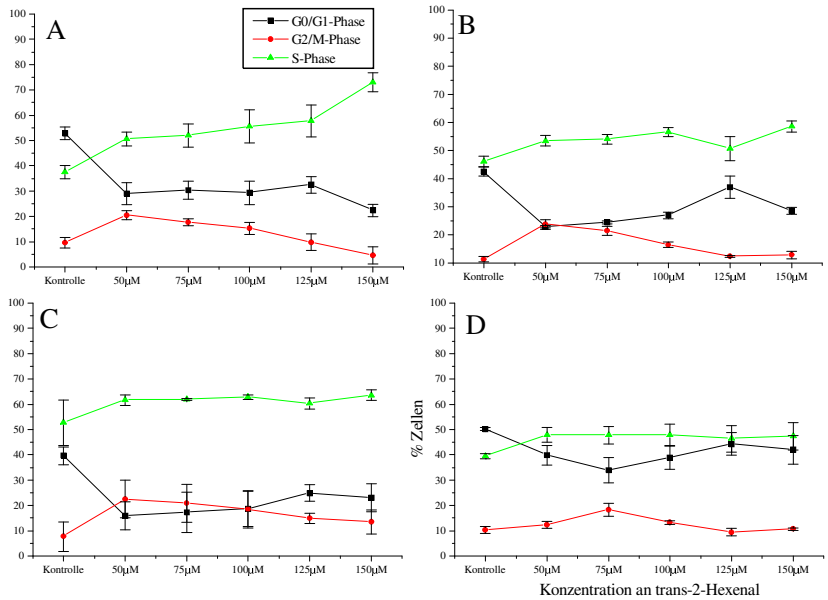


Abb.3.31: Zellzyklusanalyse der Konzentrationskinetik von trans-2-Hexenal. A.Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

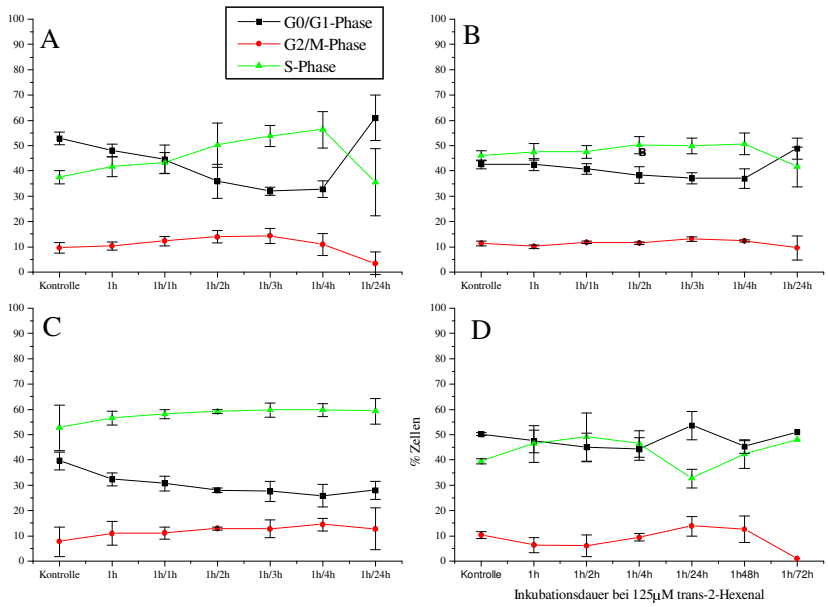


Abb.3.32: Zellzyklusanalyse der Zeitkinetik von trans-2-Hexenal. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

3.3.5 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al

3.3.5.1 Durchflußzytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al zeigte sich im Auftreten von deutlichen Sub-G1-Peaks für die Zellinien U937 und HL-60. Die Zellinie U937 ließ einen klassischen Sub-G1-Peak erkennen, während bei der Zellinie HL-60 ab einer Konzentration von 100µM zusätzlich apoptotische Zellen oberhalb der G0/G1- und S-Phase zu sehen waren. Der Sub-G1-Bereich wurde für diese Zellinie wiederum um diese Population erweitert (Abb.3.33, D, schwarzes Gate). Dieser Bereich wurde zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert. Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten bezüglich der Apoptoseinduktion keine sichtbare Reaktion im ausgewählten Konzentrationsbereich.

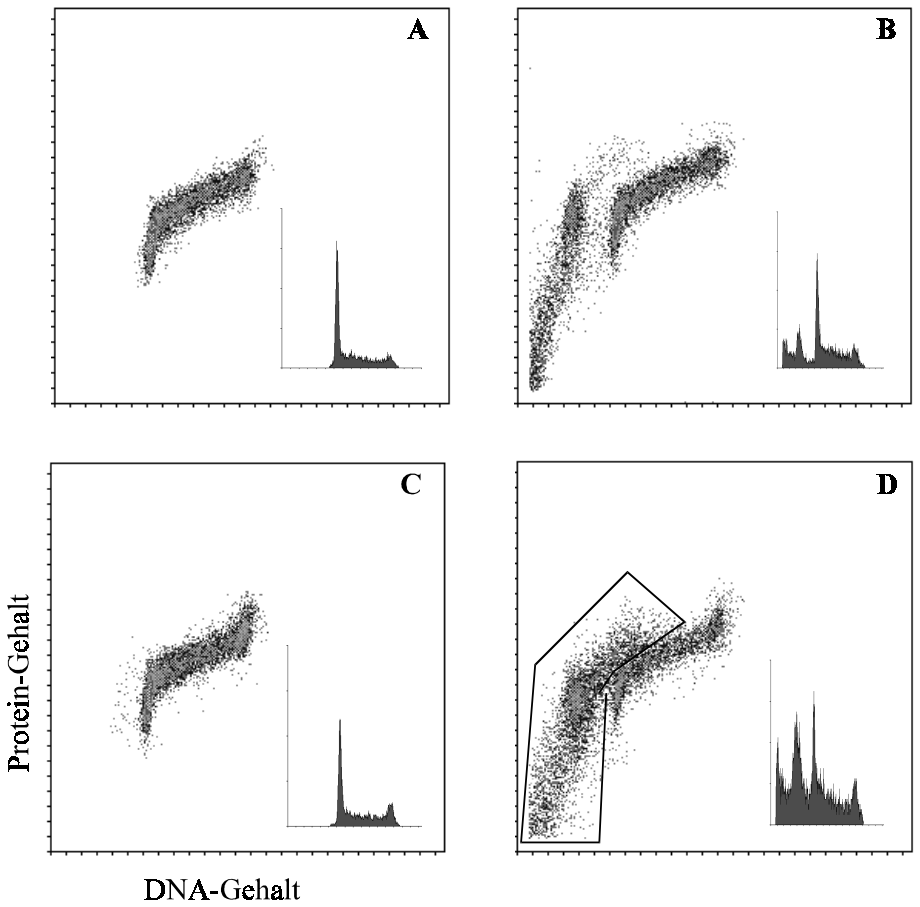


Abb.3.33: 1-und 2-Parameter-Messung der Inkubation mit 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al für 1h mit einer 4h-Postinkubation. A. Kontrolle der Zellinie U937, B. Inkubation mit 125µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, C. Kontrolle der Zellinie HL-60, D. Inkubation mit 125µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. Das in D eingezeichnete Gate zeigt den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung der apoptotischen Populationen ergab für die Zellinie U937 eine leichte dosisabhängige Erhöhung ab 50µM, welche ab 75µM signifikant wurde. Höhere Konzentrationen ergaben keinen weiteren Anstieg (siehe Abb.3.34). Bei der Zellinie HL-60 war erst ab 75µM ein leichter Anstieg zu sehen, welcher ab 100µM schwach signifikant und ab 125µM hoch signifikant wurde. Die HL-60-Zellen zeigten im Gegensatz zu den U937-Zellen einen dosisabhängigen Anstieg bis zur höchsten Konzentration von 125µM. Die Stärke der Apoptoseinduktion variierte auch bei 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. Der Anteil apoptotischer Zellen lag bei der Zellinie HL-60 um ca. 15% höher als bei der Zellinie U937. Die Zellinie K562 ließ quantitativ eine schwach signifikante Erhöhung sowohl des Sub-G1-Bereiches als auch des Apoptose-Bereiches bei 100µM erkennen (Abb.3.34 und 3.35). Für die Zellinie Molt4 fand sich ebenfalls eine schwach signifikante Erhöhung bei 75µM und eine signifikante bzw. hoch signifikante (siehe Abb.3.34 und Abb.3.35) Erhöhung bei 100µM. Bei beiden Zellinien konnte aber kein sichtbarer Sub-G1-Peak detektiert werden.

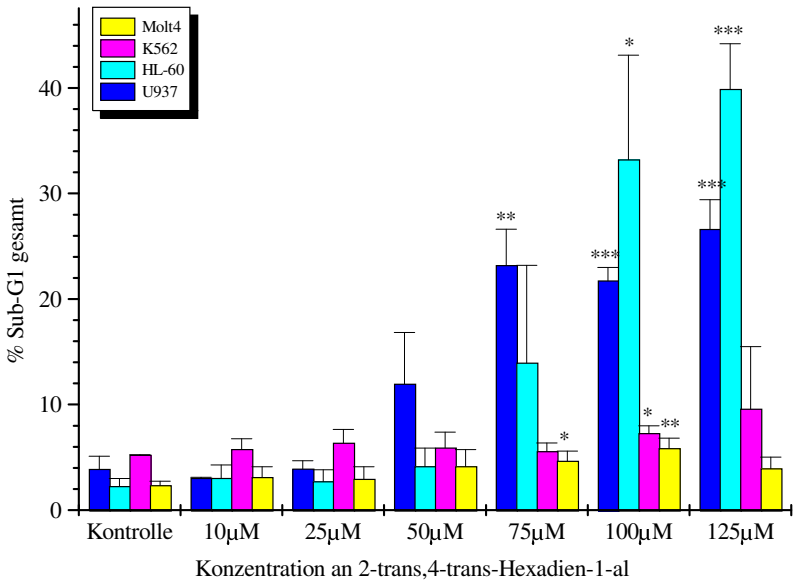


Abb.3.34: Durchflußzytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

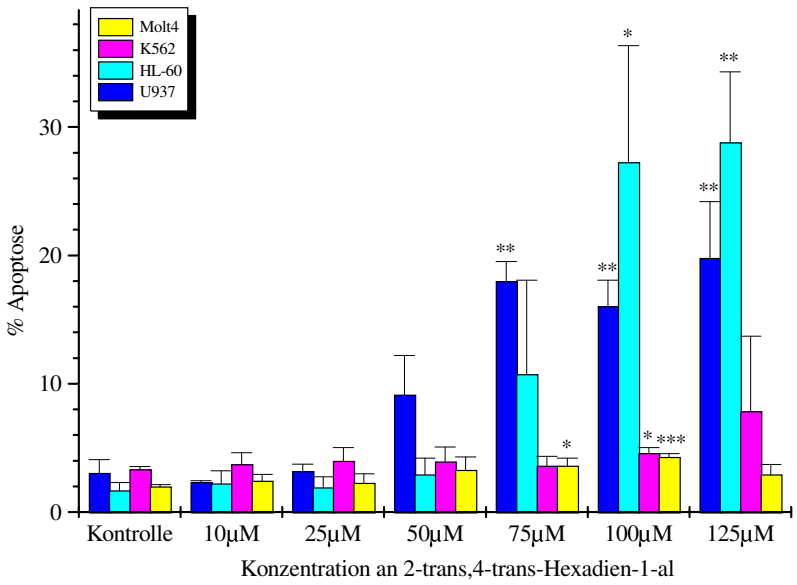


Abb.3.35: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.5.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulation ergab für die Zellinien U937 und HL-60 eine Zusammensetzung aus Zellen aller erfaßten Apoptosestadien. Bei der Zellinie U937 waren in etwa gleichviel Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotische Bodies vorhanden, Zellen mit stark kondensiertem Kern waren am wenigsten vertreten (siehe Abb.3.36, U937). Alle 3 Apoptosestadien zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg ab 50µM, wobei sich für die Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotische Bodies erst ab 75µM eine schwache Signifikanz ergab. Bei der Zellinie HL-60 bestand der Haupteil aus Zellen mit fragmentiertem Kern. Zellen mit stark kondensiertem Kern und apoptotischen Bodies waren in deutlich geringerem Maße vorhanden (siehe Abb.3.36, HL-60). Alle 3 Apoptosestadien zeigten ab 75µM einen konzentrationsabhängigen Anstieg, der aufgrund großer Schwankungen nur teilweise signifikant war.

Bei den Zellinien K562 und Molt4 zeigten sich schwach signifikante (K562) bzw. signifikante Erhöhungen (Molt4) im Bereich der Zellen mit stark kondensiertem Kern (Abb.3.37).

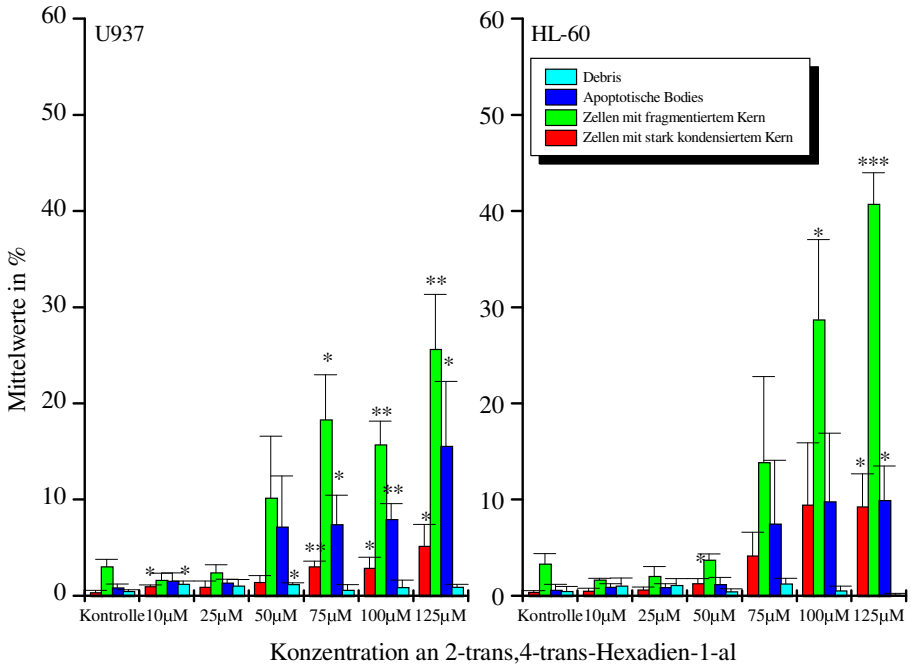


Abb.3.36: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

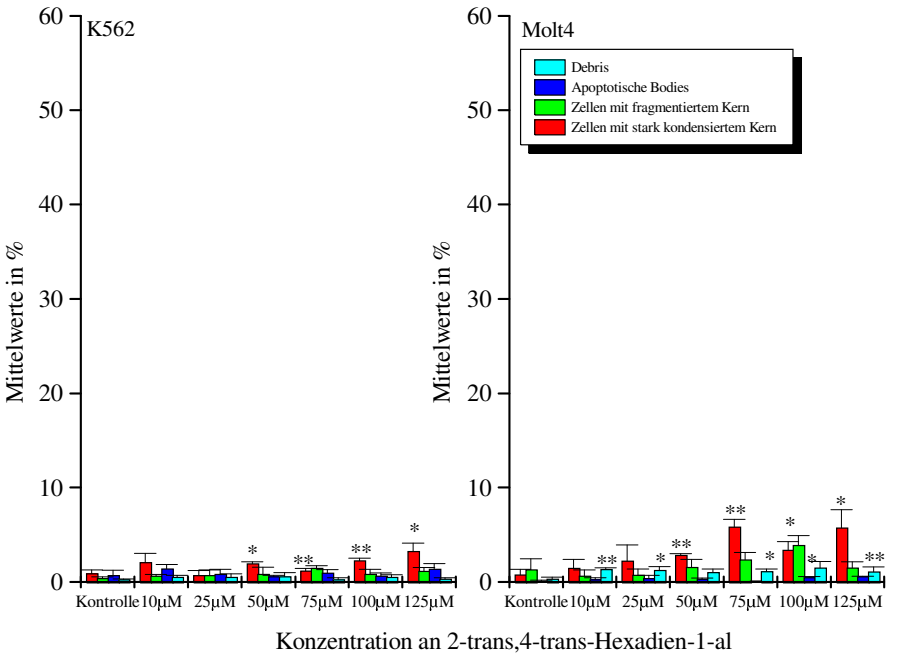


Abb.3.37: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Der Summenvergleich aller detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies mit der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches ergab keinen signifikanten Unterschied in der quantitativen Auswertung.

3.3.6 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al

3.3.6.1 Durchflußzytometrische Analyse

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde für alle Zellinien eine Konzentration von 100µM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1h mit einer Postinkubationdauer von bis zu 24h bei U937, HL-60 und K562. Bei der Zellinie Molt4 wurde die Postinkubation auf bis zu 72h erhöht. Die Zellinien U937, HL-60 und Molt4 zeigten dabei einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg der apoptotischen Population. Bei der Zellinie U937 konnten bei der 24h-Postinkubation zusätzlich auch apoptotische Zellen oberhalb der G0/G1- und der S-Phase detektiert werden. Keine Reaktion war bei der Zellinie K562 zu erkennen.

Die quantitative Analyse ergab für die Zellinie U937 einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Population bei einer 3h-Postinkubation, welcher ab einer 4h-Postinkubation hoch signifikant wurde. Die Zellinie HL-60 zeigte bis zu der 4h-Postinkubation einen parallelen Verlauf (siehe Abb.3.38). Die 24h-Postinkubation ergab im Gegensatz zu den U937-Zellen jedoch keine weitere Erhöhung. Die Zellinie Molt4 ließ bei der 24h-Postinkubation einen „undeutlichen“ Sub-G1-Peak erkennen, welcher sehr nahe am G0/G1-Peak lag. Aus diesem Grund wurde die Postinkubationsdauer auf 48h bzw. 72h erhöht. Bei diesen Postinkubationszeiten war dann schließlich eine deutliche Trennung des Sub-G1-Peaks von den G0/G1-Phase-Zellen zu sehen. Die quantitative Analyse ergab jedoch schon direkt nach der Substanzinkubation eine schwach signifikante Erhöhung des Sub-G1-Bereiches, welche jedoch erst ab einer 24h-Postinkubation deutlich wurde. Nach der 48h-Postinkubation kam es zu keinem weiteren Anstieg der apoptotischen Population.

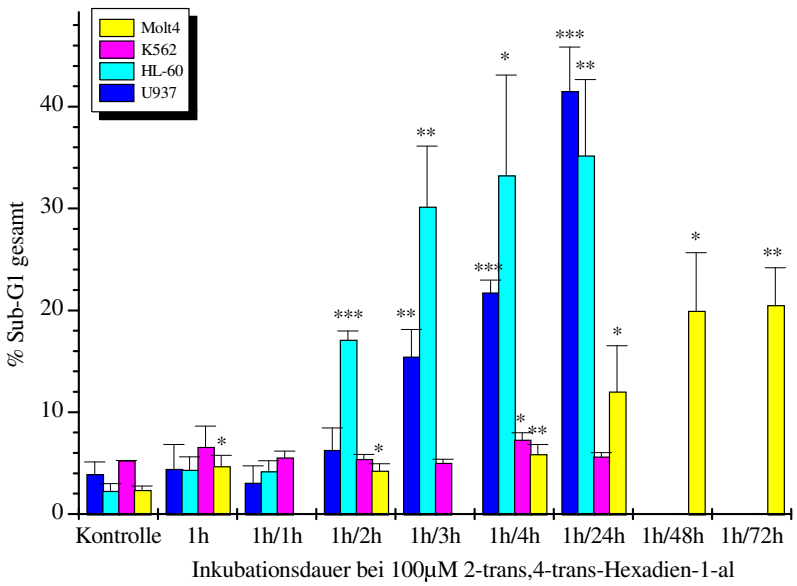


Abb.3.38: Durchflußzytometrische Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

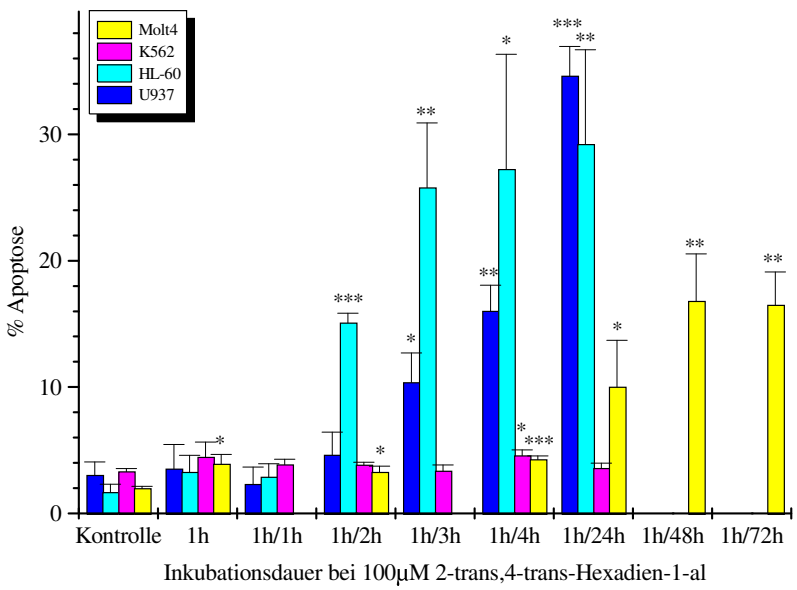


Abb.3.39: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.6.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, daß sich die durchflußzytometrisch detektierten apoptotischen Populationen der Zellinien U937 und HL-60 aus Zellen aller ausgewerteten Apoptosestadien zusammensetzten. Hierbei nahmen die Zellen mit fragmentiertem Kern den größten Anteil ein. Es konnte ein zeitabhängiger Anstieg ab einer 3h-Postinkubation bei der Zellinie U937 und ab einer 2h-Postinkubation bei der Zellinie HL-60 beobachtet werden. Bei der Zellinie U937 zeigte sich zusätzlich noch bei der 24h-Postinkubation ein leichter Anstieg des Debrisanteils. Außerdem ging der Anteil an Zellen mit stark kondensiertem Kern bei der Zellinie HL-60 bei der 24h-Postinkubation zurück (siehe Abb.3.40, HL-60). Die apoptotische Zellpopulation der Zellinie Molt4 setzte sich aus ungefähr gleich großen Anteilen von Zellen mit stark kondensiertem und fragmentiertem Kern zusammen. Bei den apoptotischen Bodies konnte keine Erhöhung detektiert werden. Es war jedoch ein Maximum an apoptotischen Zellen bei der 24h-Postinkubation zu verzeichnen. Danach erfolgte ein deutlicher Abfall (Abb.3.41, Molt4). Für die Zellinie K562 konnte keine eindeutige Erhöhung apoptotischer Zellen detektiert werden (Abb.3.41, K562).

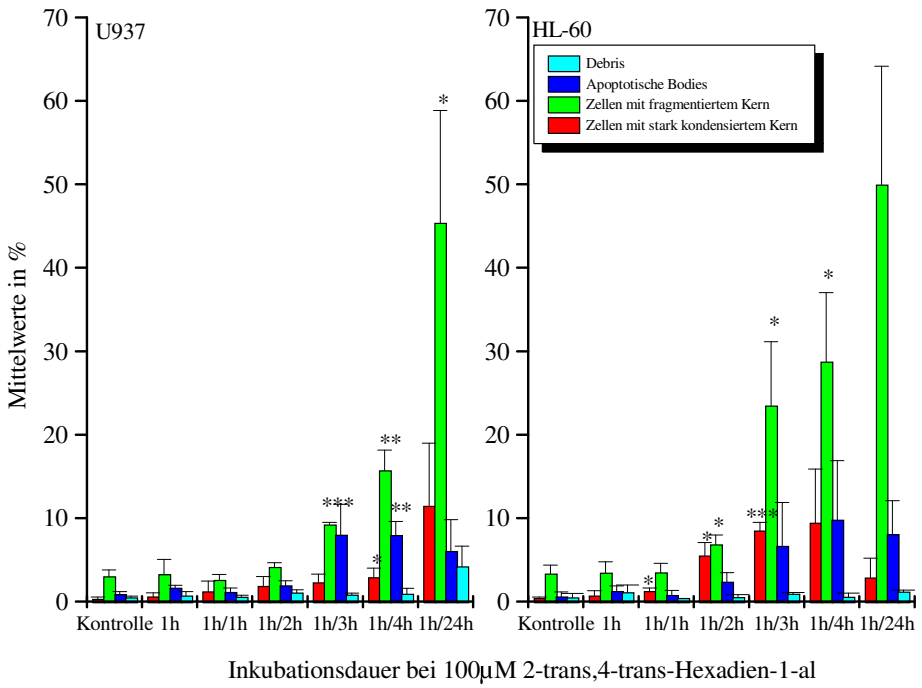


Abb.3.40: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

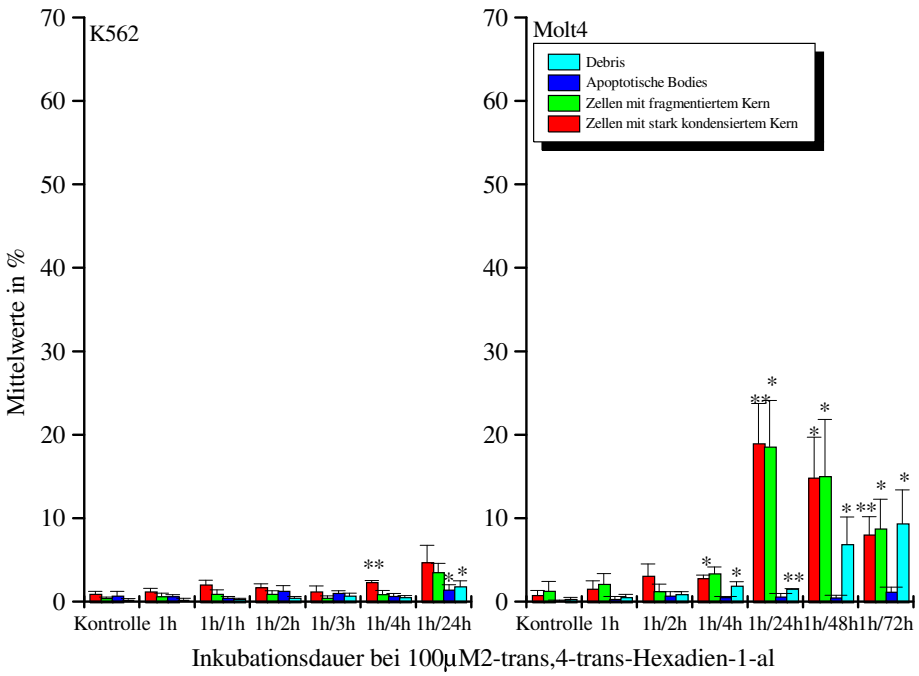


Abb.3.41: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Im Summenvergleich aller mikroskopisch detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies mit der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches konnte für die Zellinien U937, HL-60 und K562 kein Unterschied beobachtet werden (Abb.3.42 und Abb.3.43,K562). Nur bei der Zellinie Molt4 zeigte sich ein schwach signifikanter Unterschied bei der 24h-Postinkubation (siehe Abb.3.43, Molt4).

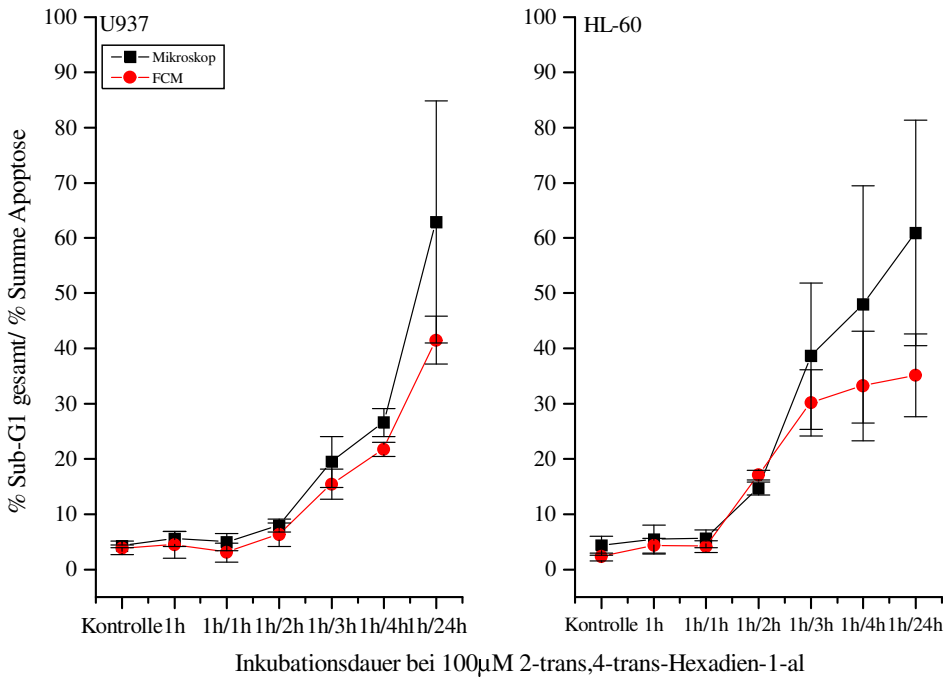


Abb.3.42: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Mikroskopie.

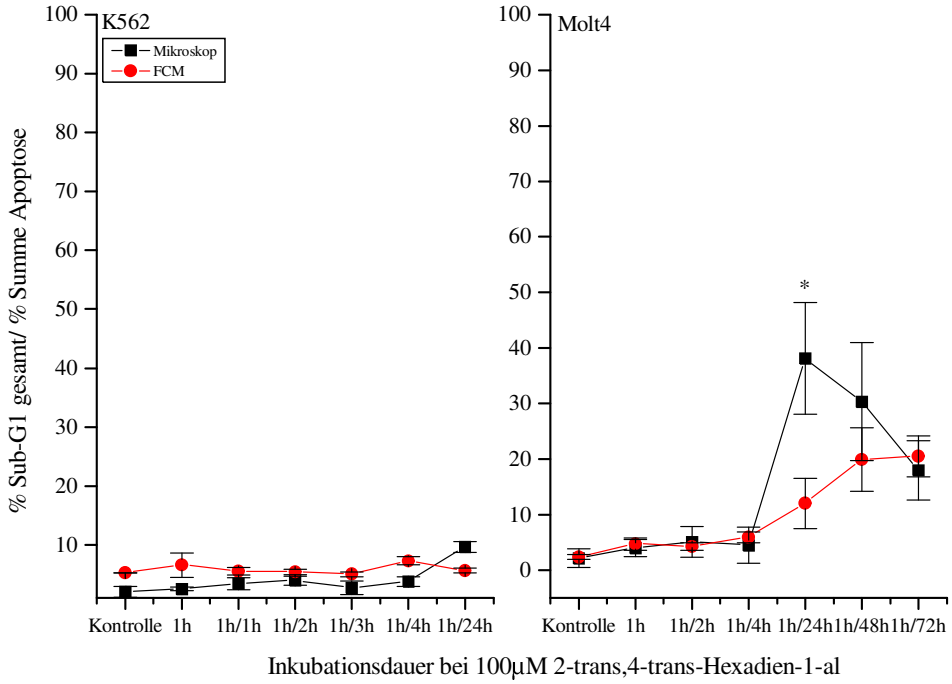


Abb.3.43: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Mikroskopie

3.3.7 Analyse der Induktion von Apoptose durch 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Isolation wurde bei allen Zellinien nach einer Inkubation mit 100µM 2-trans,4-trans-Hexadienal durchgeführt. Die Postinkubationsdauer betrug 4h bei den Zellinien U937, HL-60 und K562 sowie 48h bei Molt4. Die Abb.3.44 zeigt für U937 und HL-60 das Auftreten einer DNA-Leiter. Bei den Zellinien K562 und Molt4 waren keine typischen DNA-Leitern zu erkennen.

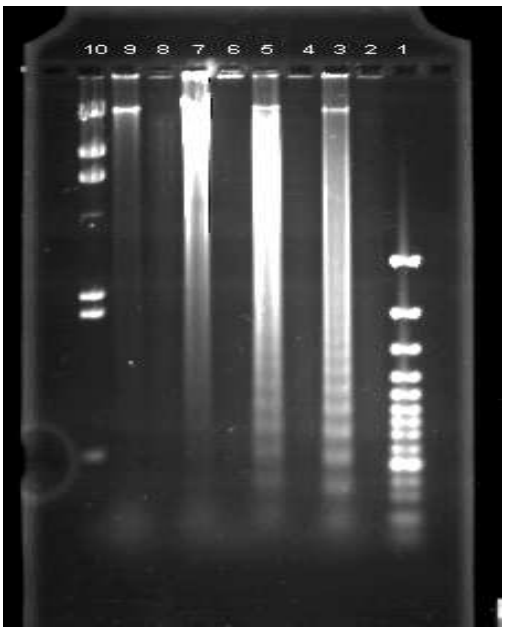


Abb.3.44: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 100µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al für 1h mit 4h- bzw. 48h-Postinkubation. **Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.3.8 Einfluß von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al auf den Zellzyklus

Auch für 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al sollte untersucht werden, ob die mitotische Zellpopulation zunimmt. Durchflußzytometrisch konnte jedoch wie schon zuvor bei trans-2-Hexenal keine Abgrenzung von mitotischen Zellen detektiert werden. Im Gegensatz zu trans-2-Hexenal konnte hier auch mikroskopisch kein Anstieg der mitotischen Zellpopulation festgestellt werden.

3.3.8.1 Phasenspezifität von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al

Die Zellzyklusanalyse der DNA-Messung (1-Parameter) zeigte bei den Zellinien U937, HL-60 und K562 einen leichten dosisabhängigen Abfall der G0/G1-Phase mit gleichzeitigem Anstieg der S-Phase. Für die Zellinie Molt4 konnte kein eindeutiger Dosiseffekt bezüglich des Zellzyklus detektiert werden (Abb.3.45, D).

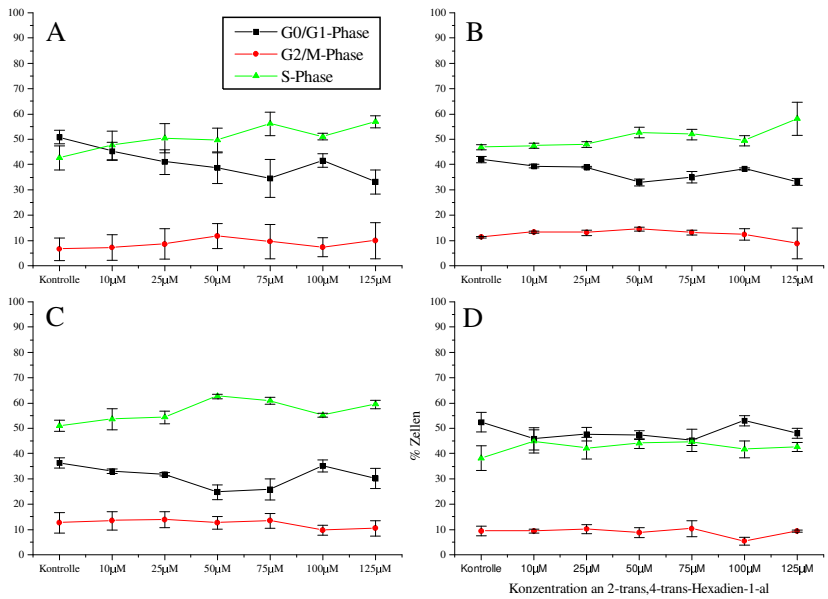


Abb.3.45: Zellzyklusanalyse der Konzentrationskinetik von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

Deutlicher trat die Wirkung von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al auf den Zellzyklus bei der Analyse der Zeitkinetik zutage (siehe Abb.3.46). Man konnte bei allen 4 Zellinien einen leichten Anstieg der G2/M-Phasezellen bei der 24h-Postinkubation sowie den gleichzeitigen Abfall des S-Phase Anteils detektieren. Die Zellinie U937 zeigte dabei große Schwankungen, wodurch diese Wirkung nur undeutlich zu sehen war. Für die Zellinie Molt4 ging dieser Effekt bei längerer Postinkubation wieder zurück.

Der G0/G1-Phase Anteil fiel bei den Zellinien U937 und HL-60 zeitabhängig ab, für die Zellinie K562 ergab sich keine Reaktion. Für die Zellinie Molt4 stieg der G0/G1-Phase-Anteil bis zur 24h-Postinkubation an und fiel danach wieder ab (Abb.3.46, schwarze Linie).

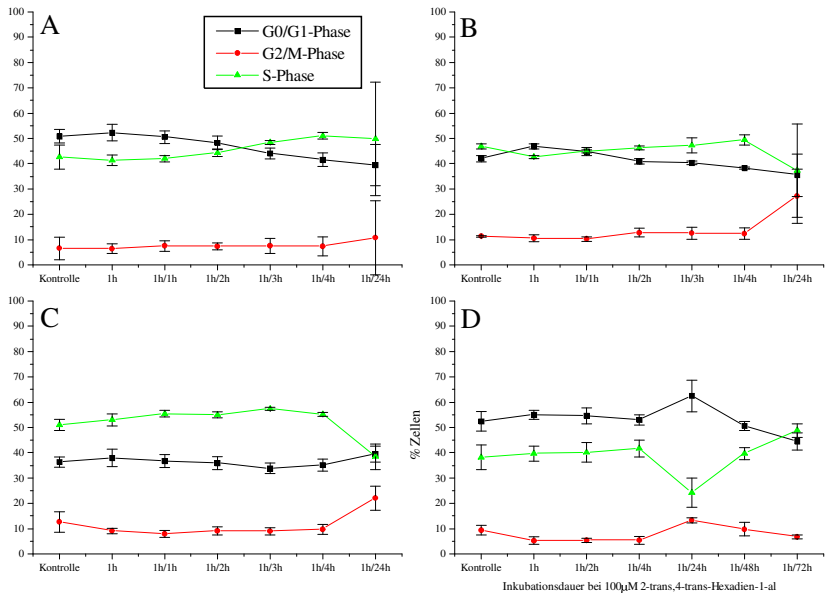


Abb.3.46: Zellzyklusanalyse der Zeitkinetik von 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

3.3.9 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal

3.3.9.1 Durchflußzytometrische Analyse

Für 2-trans,6-cis-Nonadienal konnten nur Konzentrationen bis 50µM eingesetzt werden, weil die Substanz eine vergleichsweise stärkere Zytotoxizität zeigte. Die Analyse des apoptoseinduzierenden Potentials von 2-trans,6-cis-Nonadienal ergab das dosisabhängige Auftreten einer apoptotischen Zellpopulation für die Zellinien U937 und HL-60. Wie schon zuvor bei trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al traten auch hier apoptotische Zellen oberhalb der G0/G1- und S-Phase auf. Aus diesem Grund wurde der Sub-G1-Bereich um diese Population erweitert (Abb.3.47, B und D, schwarzes Gate). Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten im ausgewählten Konzentrationsbereich keine Reaktion.

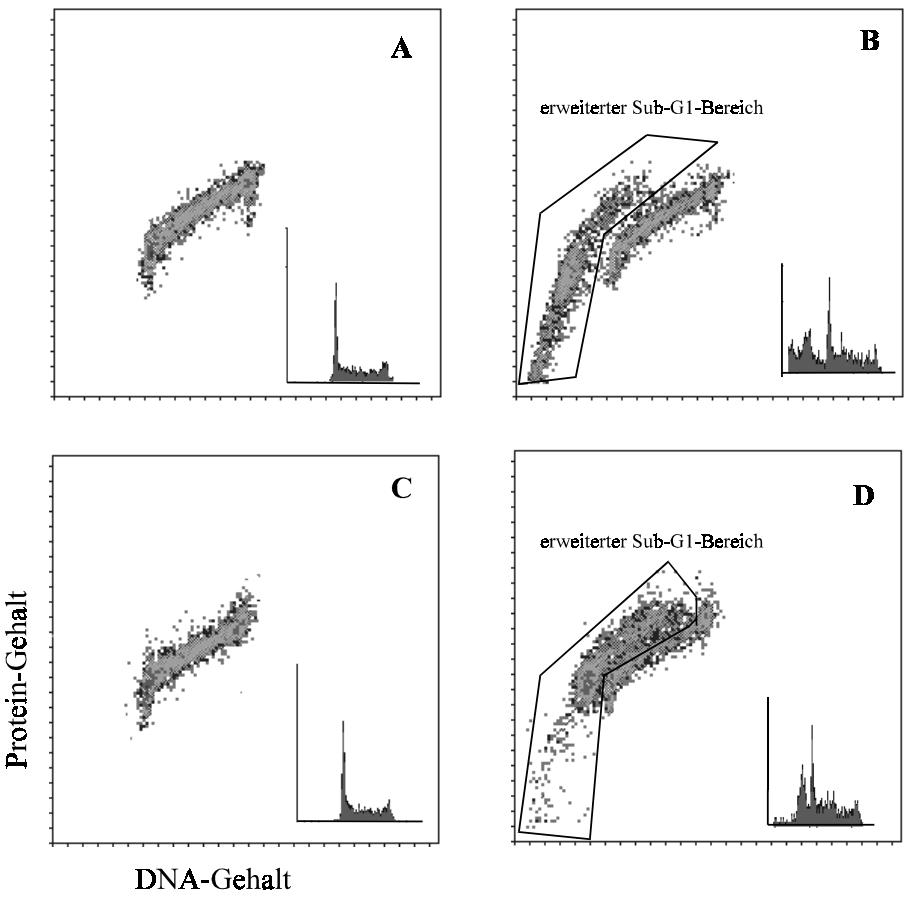


Abb.3.47: 1-und 2-Parameter-Messung der Inkubation mit 2-trans,6-cis-Nonadienal für 1h mit einer 4h-Postinkubation. A. Kontrolle der Zellinie U937, B. Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal, C. Kontrolle der Zellinie HL-60, D. Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal. Die in B. und D. eingezeichneten Gates zeigen den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung der apoptotischen Population ergab für die Zellinie U937 schon ab 10µM eine signifikante Erhöhung, welche kontinuierlich anstieg und ab 40µM hoch signifikant wurde. Bei der Zellinie HL-60 trat die Erhöhung erst ab 20µM auf. Es erfolgte dann auch hier ein kontinuierlicher Anstieg, welcher ab 40µM hoch signifikant wurde. Die Stärke der Apoptoseinduktion variierte bei 2-trans,6-cis-Nonadienal zwischen den beiden Zellinien nicht (siehe Abb.3.48 und 3.49).

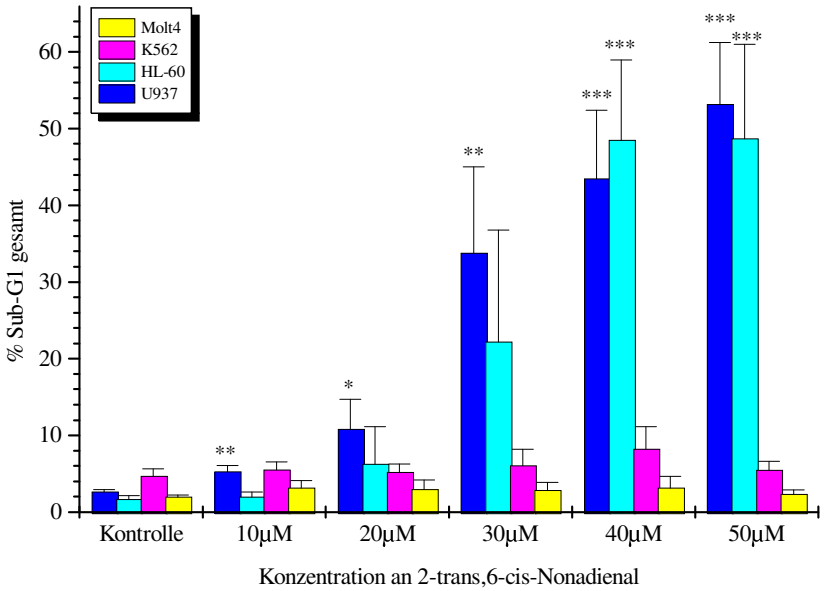


Abb.3.48: Durchflußzytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal.* = schwach signifikante,** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

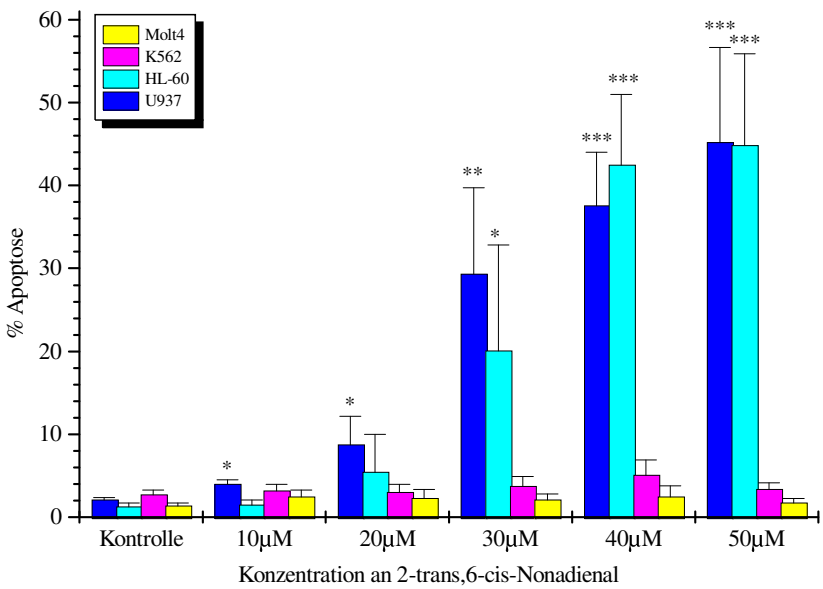


Abb.3.49: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.9.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulation ergab für die Zellinie U937 in der Hauptsache eine Zusammensetzung aus Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies. Der konzentrationsabhängige Anstieg der Zellen mit fragmentiertem Kern war schon ab 10µM schwach signifikant und wurde ab 20µM signifikant bzw. ab 40µM hoch signifikant. Der Anteil apoptotischer Bodies stieg ebenfalls dosisabhängig und zeigte ab 30µM Signifikanz. Bei 50µM war aufgrund der hohen Schwankungen innerhalb der Auswertung der verschiedenen Versuche keine Signifikanz mehr zu beobachten. Der Anteil an Zellen mit stark kondensiertem Kern zeigte ebenfalls schon ab 10µM einen dosisabhängigen, hoch signifikanten Anstieg. Der ermittelte Wert lag jedoch deutlich unterhalb der beiden anderen Fraktionen (siehe Abb.3.50, U937). Die apoptotische Zellpopulation der Zellinie HL-60 bestand fast ausschließlich aus Zellen mit fragmentiertem Kern, die ab 20µM konzentrationsabhängig anstieg (Abb.3.50, HL-60). Ab 30µM wurde der Anstieg schwach signifikant, ab 40µM dann hoch signifikant. Auch bei dieser Zellinie zeigte der Anteil an Zellen mit stark kondensiertem Kern einen ab 10µM signifikanten und die apoptotischen Bodies einen ab 40µM schwach signifikanten Anstieg. Die ermittelten Werte lagen aber auch hier deutlich unterhalb der Fraktion an Zellen mit fragmentiertem Kern (siehe

Abb.3.50, HL-60).

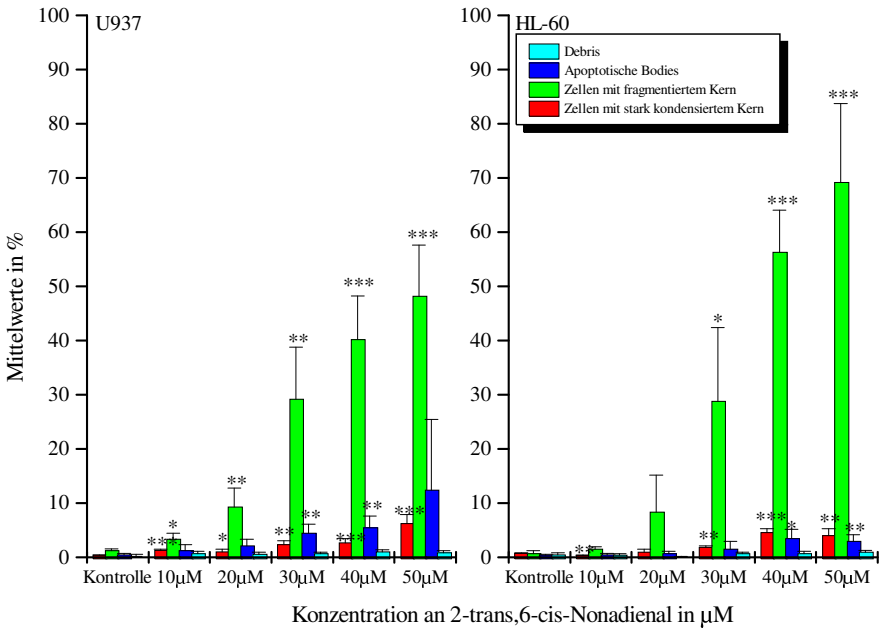


Abb.3.50: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Für die Zellinie K562 konnte auch fluoreszenzmikroskopisch keine Apoptose detektiert werden (siehe Abb.3.51, K562).

Für die Zellinie Molt4 zeigte sich in der mikroskopischen Auswertung ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Zellpopulation mit stark kondensiertem Kern bis 30µM. Danach erfolgte ein leichter Abfall. Die Erhöhung war signifikant ab 20µM. Trotz des Rückgangs waren die Werte bei 40µM und 50µM in Bezug zur Kontrolle noch immer schwach signifikant bzw. signifikant erhöht (siehe Abb.3.51, Molt4).

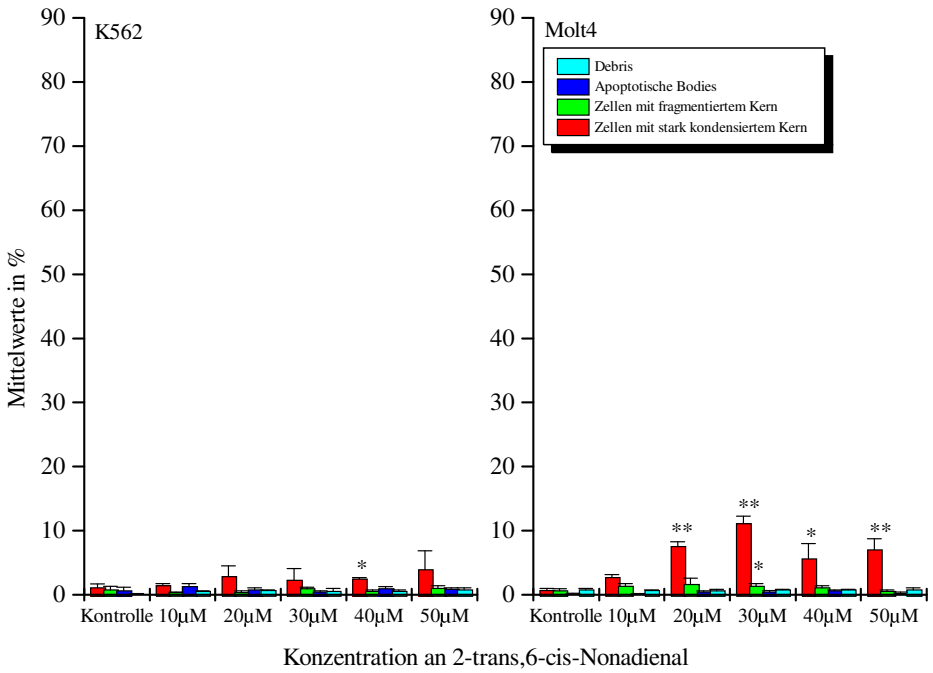


Abb3.51: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Der Summenvergleich aller detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies mit der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches ergab für die Zellinien U937, HL-60 und K562 keinen signifikanten Unterschied (Abb.3.52 und Abb.3.53, K562). Bei der Zellinie Molt4 traten jedoch hoch signifikante Unterschiede ab 20µM und schwach signifikante Unterschiede bei 40µM sowie signifikante Unterschiede bei 50µM zwischen der Durchflußzytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie auf (siehe Abb.3.53).

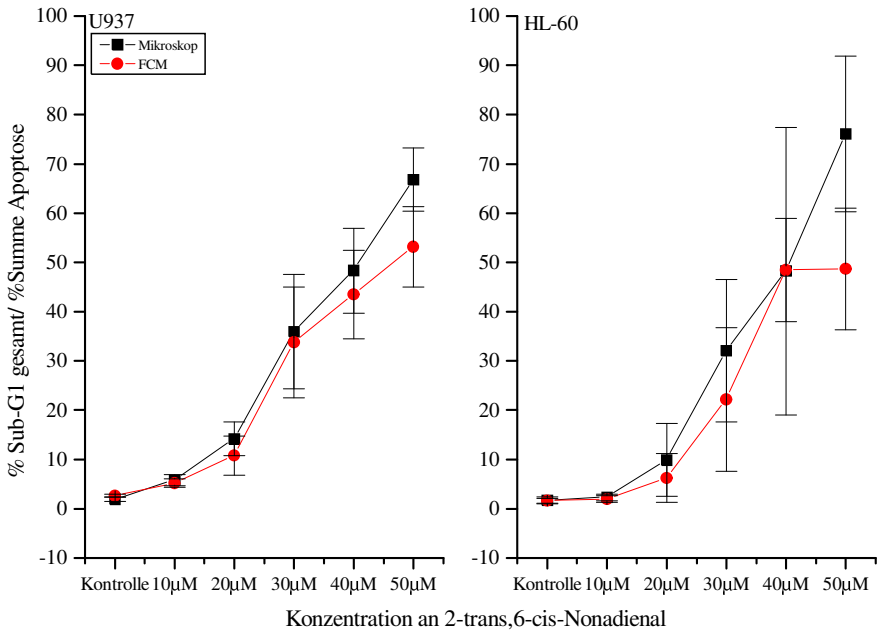


Abb.3.52: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

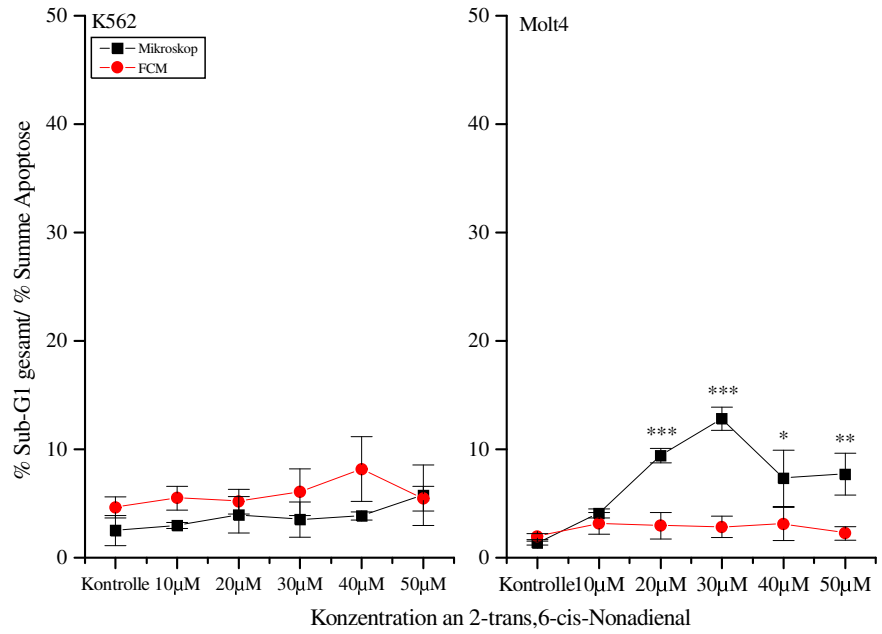


Abb.3.53: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.3.10 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal

3.3.10.1 Durchflußzytometrische Analyse

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde für alle vier Zellinien eine Konzentration von 40µM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1h mit einer Postinkubation von bis zu 24h.

Die Zellinien U937 und HL-60 ließen einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg der apoptotischen Population ab einer 1h-Postinkubation mit einer leichten Plateaubildung nach 24h erkennen. Die quantitative Analyse ergab für die Zellinie U937 einen schwach signifikanten Anstieg der apoptotischen Population nach einer 1h-Postinkubation, welcher ab einer 2h-Postinkubation hoch signifikant wurde (Abb.3.54). Die Zellinie HL-60 zeigte den gleichen Verlauf, Signifikanz trat aber erst bei der 2h-Postinkubation auf. Die quantitative Analyse des Sub-G1-Bereiches ergab bei der Zellinie K562 zusätzlich einen schwach signifikanten Anstieg nach 24h, welcher jedoch bei Betrachtung des Apoptose-Bereichs entfiel (Abb.3.55). Auch konnte im Mittel bei der Zellinie Molt4 ein Anstieg der apoptotischen Population detektiert werden. Die großen Schwankungen ließen aber keine Signifikanz zu.

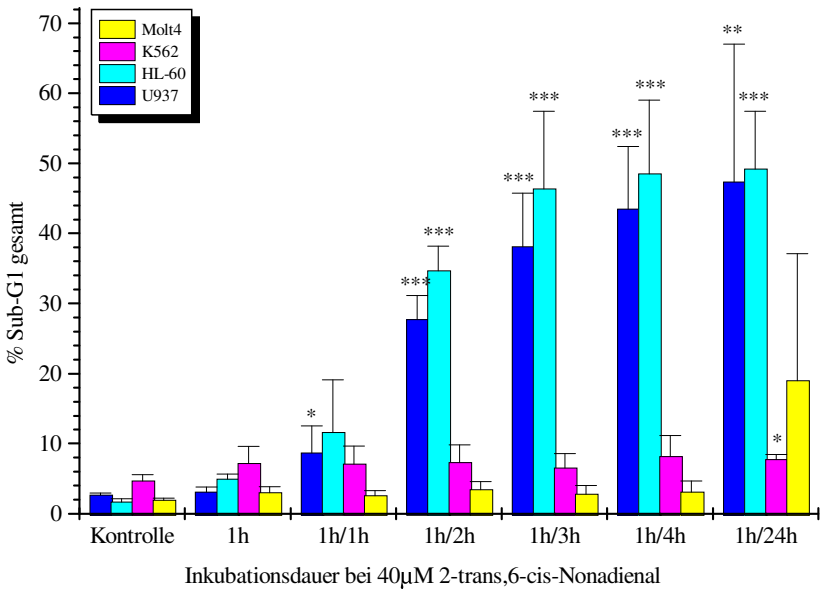


Abb.3.54: Durchflußzytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

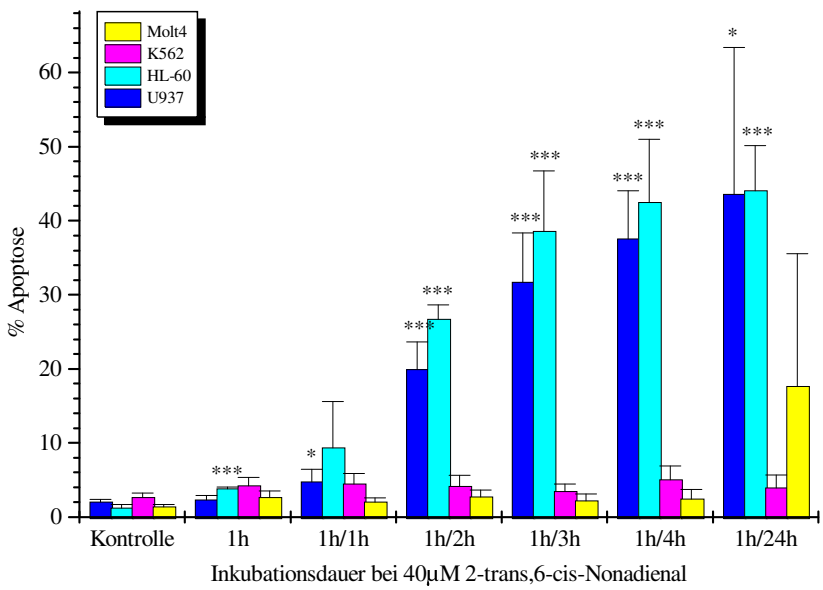


Abb.3.55: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal.* = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.10.2 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte für die Zellinien U937 und HL-60 einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg an Zellen mit fragmentiertem Kern, welche den Hauptbestandteil der durchflußzytometrisch detektierten apoptotischen Zellpopulation ausmachten. Für die Zellinie U937 war der Anstieg ab der 1h-Postinkubation signifikant und ab der 2h-Postinkubation hoch signifikant. Die Zellinie HL-60 zeigte ab der 2h-Postinkubation einen hoch signifikanten Anstieg. Bei beiden Zellinien konnte man eine leichte Plateaubildung bei der 24h-Postinkubation beobachten. Für die Zellen mit stark kondensiertem Kern sowie die apoptotischen Bodies konnte ein Maximum bei der 2h-Postinkubation detektiert werden (siehe Abb.3.56).

Für die Zellinie K562 konnte auch mikroskopisch keine Apoptose detektiert werden (Abb.3.57, K562). Der durchflußzytometrisch detektierte, jedoch nicht signifikante Anstieg der apoptotischen Zellpopulation der Zellinie Molt4 konnte mikroskopisch sehr viel deutlicher dargestellt werden. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der Zellen mit stark kondensiertem Kern, welcher schon direkt nach der 1h-Inkubation schwach signifikant und

nach der 24h-Postinkubation hoch signifikant wurde. Zusätzlich ergab sich ein hoch signifikanter Anstieg der Zellen mit fragmentiertem Kern nach 24h (Abb.3.57, Molt4).

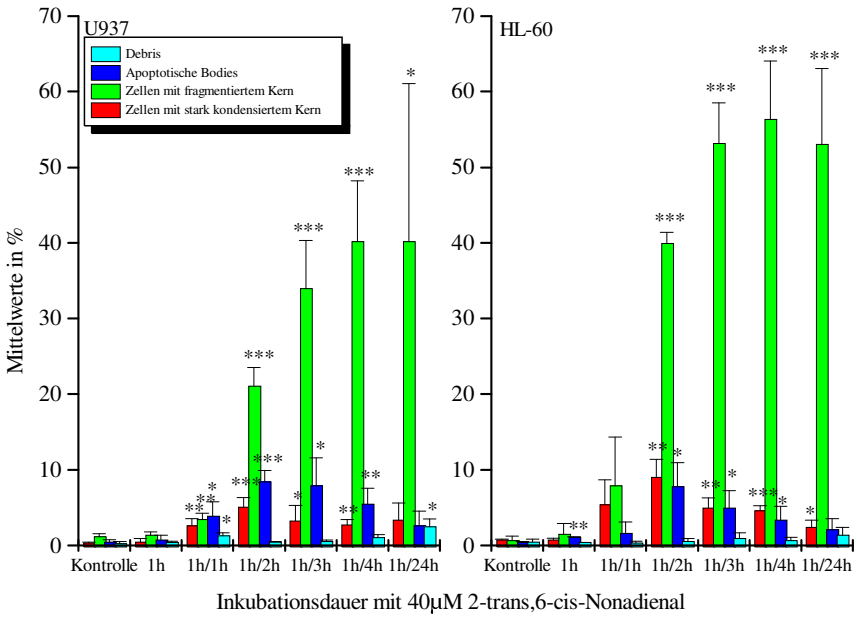


Abb.3.56: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

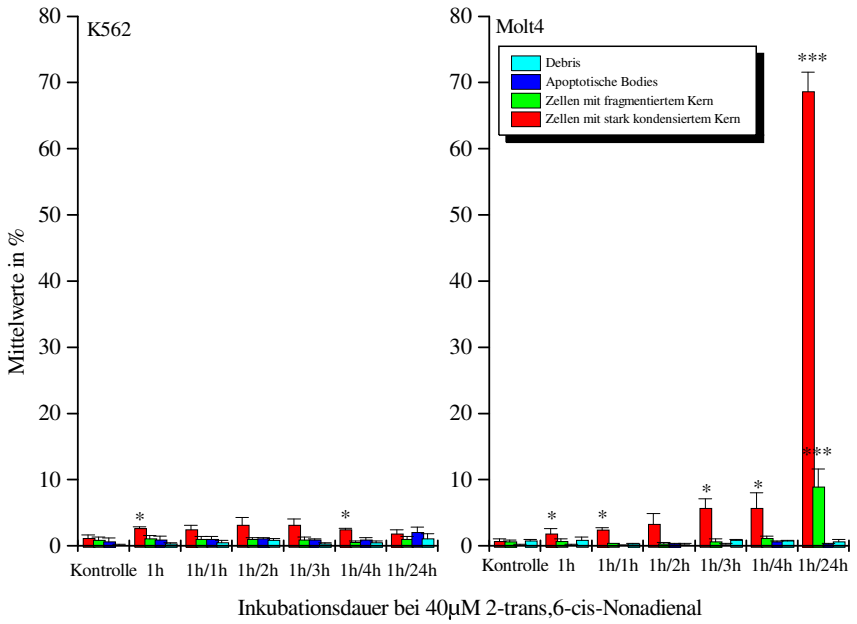


Abb.3.57: Mikroskopische Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. Es sind Mittelwerte aus 3 Untersuchungen ± Standardabweichung angegeben. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

Der Summenvergleich aller detektierten Apoptosestadien inklusive apoptotischer Bodies mit der durchflußzytometrischen Bestimmung des gesamten Sub-G1-Bereiches ergab für die Zellinien U937, HL-60 und K562 keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb.3.58 und Abb.3.59, K562). Bei der Zellinie Molt4 traten auch bei der Zeitkinetik ab einer 3h-Postinkubationsdauer schwach signifikante und signifikante Unterschiede zwischen der Durchflußzytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie auf (siehe Abb.3.59, Molt4).

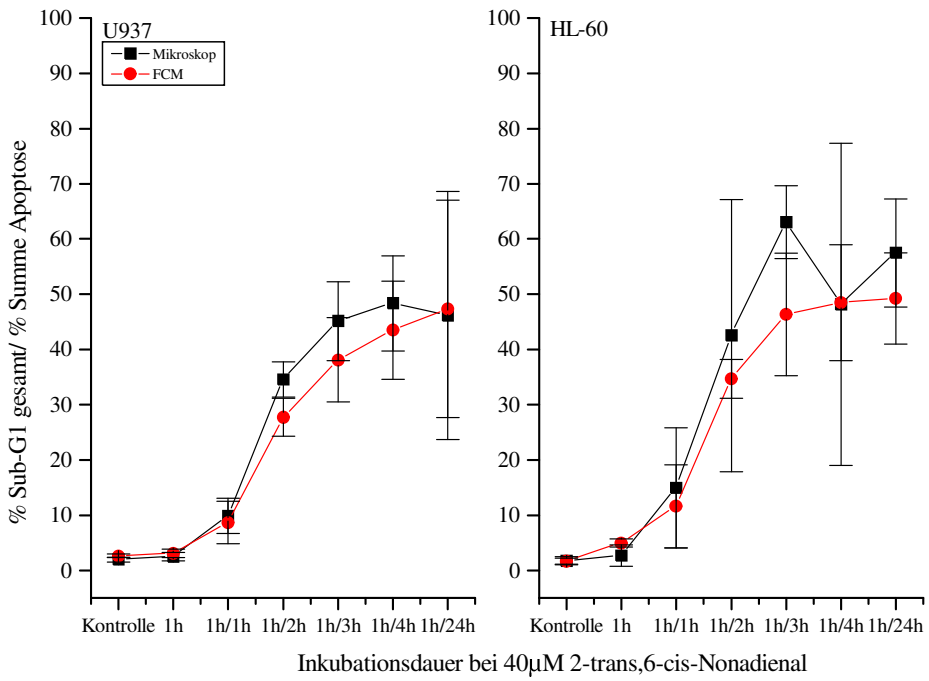


Abb.3.58: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

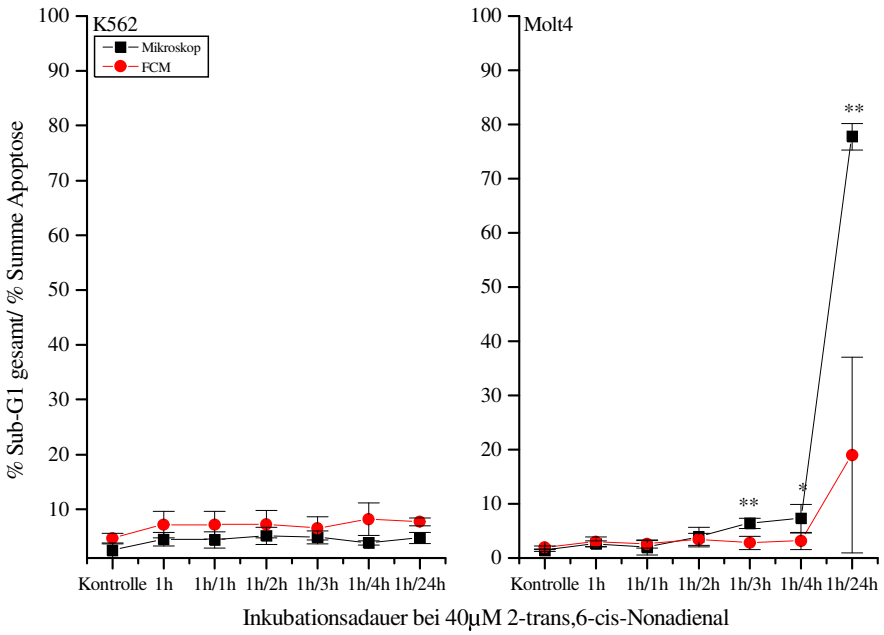


Abb.3.59: Vergleich der durchflußzytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten Apoptose bei den Zellinien K562 und Molt4. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.3.11 Analyse der Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Isolation wurde bei allen Zellinien nach einer Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal für 1h durchgeführt. Die Postinkubationsdauer betrug 4h. Die Abb.3.60 zeigt für die Zellinien U937 und HL-60 das Auftreten einer DNA-Leiter. Bei den Zellinien K562 und Molt4 waren keine typischen DNA-Leitern zu erkennen.

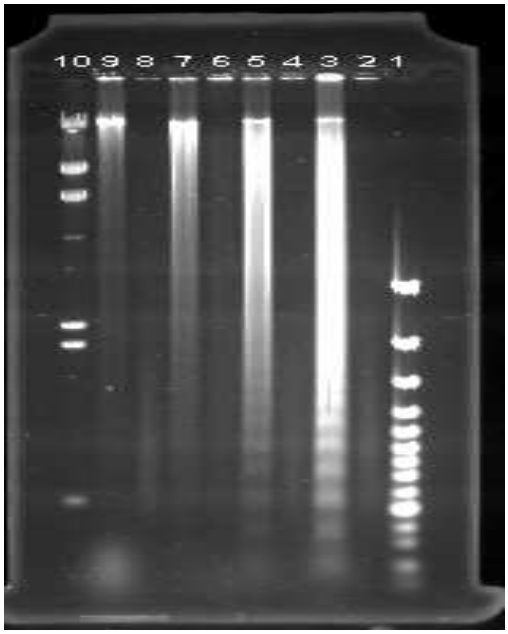


Abb.3.60: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal für 1h und 4h-Postinkubation. **Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-2-trans,6-cis-Nonadienal, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-2-trans,6-cis-Nonadienal, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-2-trans,6-cis-Nonadienal, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-2-trans,6-cis-Nonadienal, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.3.12 Einfluß von 2-trans,6-cis-Nonadienal auf den Zellzyklus

Für 2-trans,6-cis Nonadienal konnte durchflußzytometrisch keine Wirkung auf die mitotische Zellpopulation detektiert werden. Mikroskopisch ergab sich jedoch ab 10µM für alle Zellinien ein deutlicher Anstieg der mitotischen Zellen. Die Zellinie Molt4 zeigte erst ab 20µM eine Signifikanz. Ab 30µM (bzw. 40µM bei K562) erfolgte dann ein Abfall. Dieser lag bei U937, HL-60 und Molt4 sogar signifikant unterhalb des Kontrollwertes (siehe Abb.3.61).

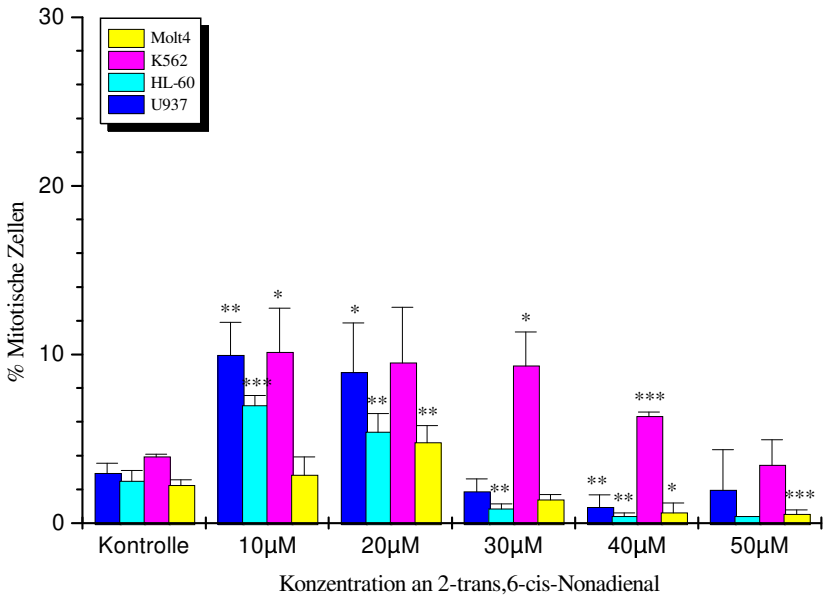


Abb.3.61: Mikroskopische Auswertung der mitotischen Zellpopulation der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle

3.3.12.1 Phasenspezifität von 2-trans,6-cis-Nonadienal

Die Zellzyklusanalyse der DNA-Messung ergab bei allen 4 Zellinien einen dosisabhängigen Anstieg der G0/G1-Phase bis 20 bzw. 30µM bei gleichzeitigem Anstieg der S-und G2/M-Phase (siehe Abb.3.62). Danach veränderte sich die S-Phase nicht weiter. Die G2/M-Phase sank wieder ab, bei der G0/G1-Phase war ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Deutlicher trat die Wirkung bei der Analyse der Zeitkinetik zutage (siehe Abb.3.63). Man konnte einen starken Abfall der S-Phase bei der 24h-Postinkubation bei den Zellinien U937 und HL-60 detektieren. Gleichzeitig stieg die G0/G1-Phase. Eindeutige Effekte konnten bei den Zellinien K562 und Molt4 nicht beobachtet werden.

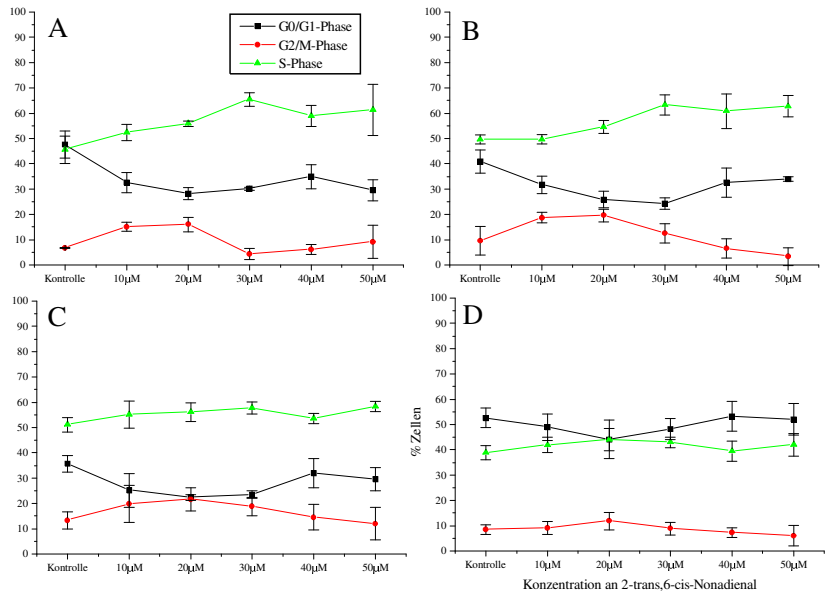


Abb.3.62: Zellzyklusanalyse der Konzentrationskinetik von 2-trans,6-cis-Nonadienal. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

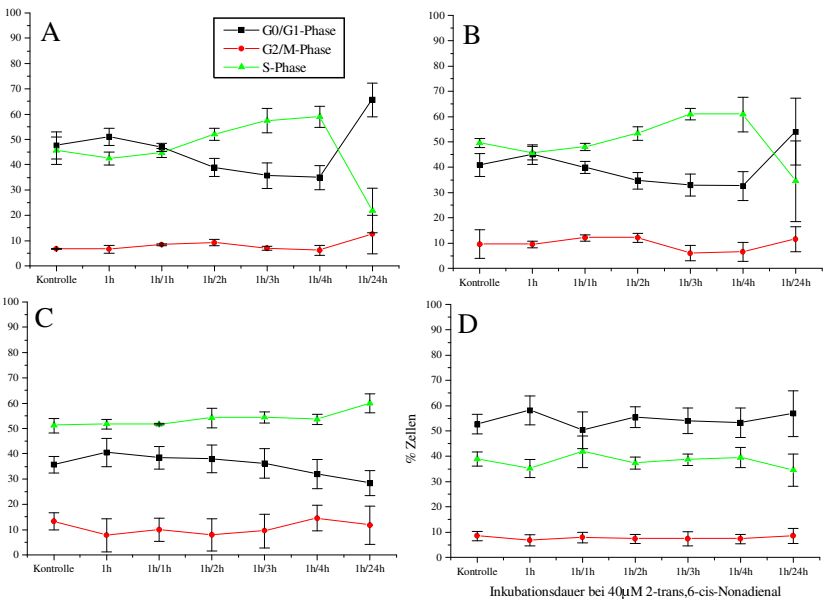


Abb.3.63: Zellzyklusanalyse der Zeitkinetik von 2-trans,6-cis-Nonadienal. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

3.3.13 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal

Zur Bestimmung des Einflusses der Kettenlänge auf die Wirkung der getesteten Substanzen wurde zusätzlich trans-2-Octenal untersucht. Hierbei wurde allerdings keine mikroskopische Auswertung durchgeführt.

3.3.13.1 Durchflußzytometrische Analyse

Die Analyse des apoptoseinduzierenden Potentials von trans-2-Octenal ergab das Auftreten einer apoptotischen Zellpopulation für die Zellinien U937 und HL-60. Auch hier traten wieder apoptotische Zellen oberhalb der G0/G1-Phase und der S-Phase auf, um die der Sub-G1-Bereich erweitert wurde. Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten im eingesetzten Konzentrationsbereich keinen Sub-G1-Peak. Die quantitative Auswertung ergab für die Zellinie U937 ab 25µM einen dosisabhängigen Anstieg der apoptotischen Population, welche ab 50µM signifikant wurde. Bei der Zellinie HL-60 wurde ebenfalls ab 25µM ein Sub-G1-Peak sichtbar, welcher dosisabhängig anstieg (Abb.3.64 und 3.65). Die Stärke der Apoptoseinduktion war bei beiden Zellinien ungefähr gleich.

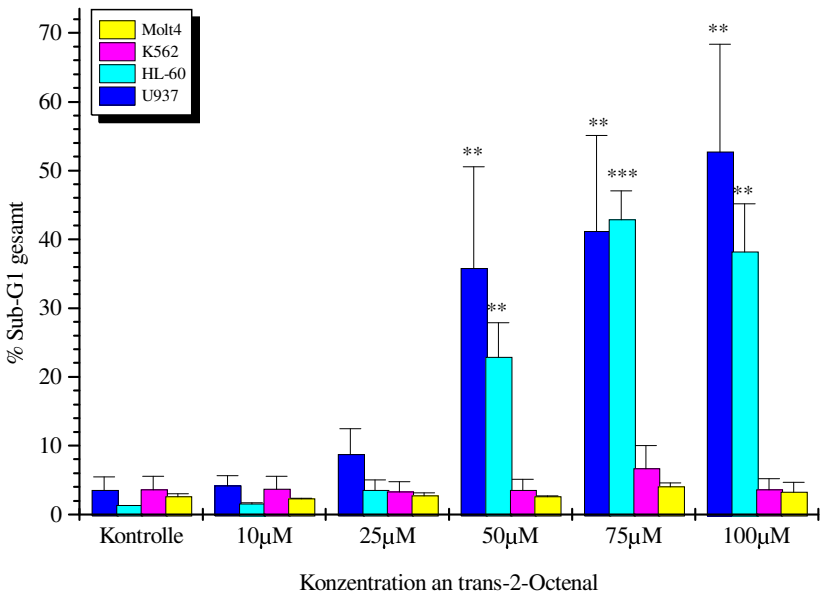


Abb.3.64: Durchflußzytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal. * = schwach signifikante,** = signifikante, *** = hochsignifikante Differenz zur Kontrolle.

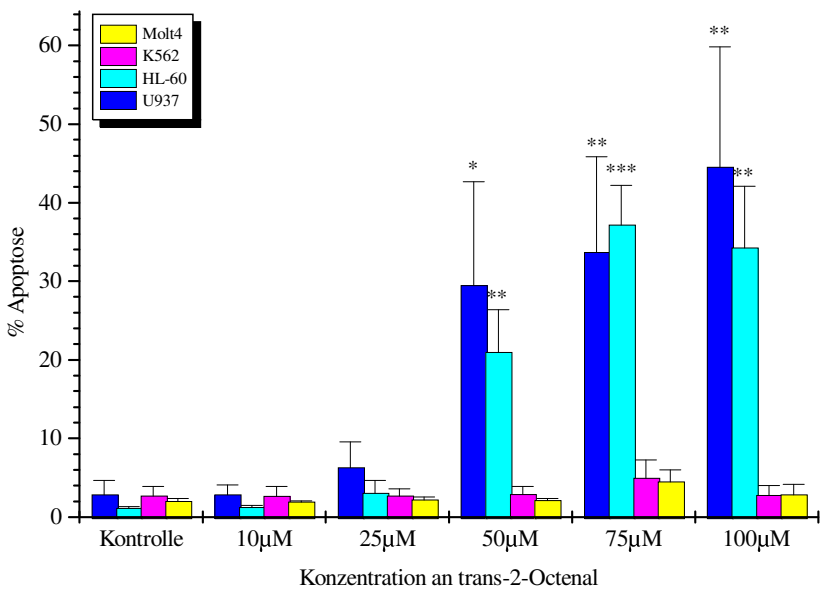


Abb.3.65: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der konzentrationsabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.14 Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal

3.3.14.1 Durchflußzytometrische Analyse

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde für alle Zellinien eine Konzentration von 75µM eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1h mit einer Postinkubationsdauer von bis zu 24h.

Die quantitative Auswertung ergab für die Zellinien U937 und HL-60 ab einer 1h-Postinkubation einen deutlichen zeitabhängigen Anstieg der apoptotischen Zellpopulation, welcher bei den HL-60-Zellen schon signifikant war (Abb.3.66 und 3.67). Die 24h-Postinkubation zeigte dabei keinen weiteren Anstieg gegenüber der 4h-Postinkubation. Für die Zellinien K562 und Molt4 konnte erst nach 24h ein Anstieg des Sub-G1-Bereiches detektiert werden. Dieser war jedoch nur für K562 signifikant. Bei der Zellinie Molt4 traten größere Schwankungen auf, welche eine Signifikanz verhinderten.

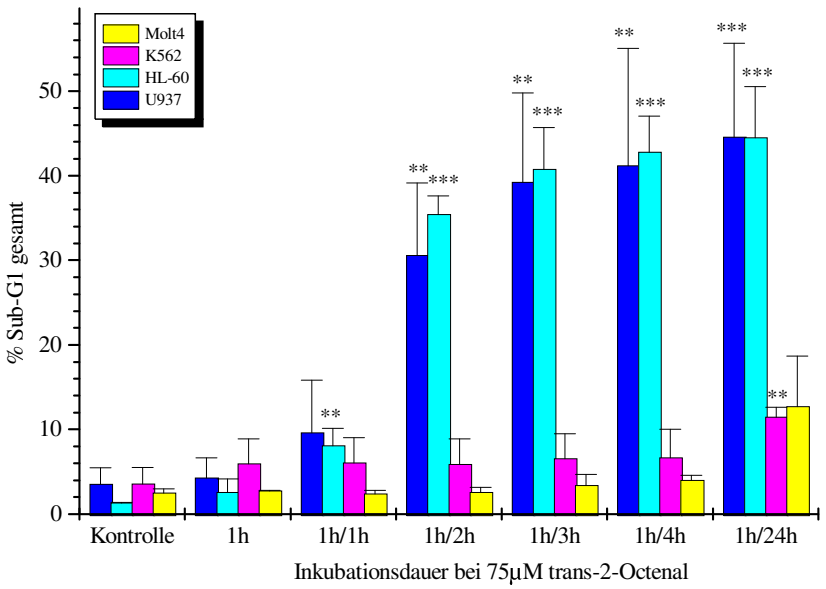


Abb.3.66: Durchflußzytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

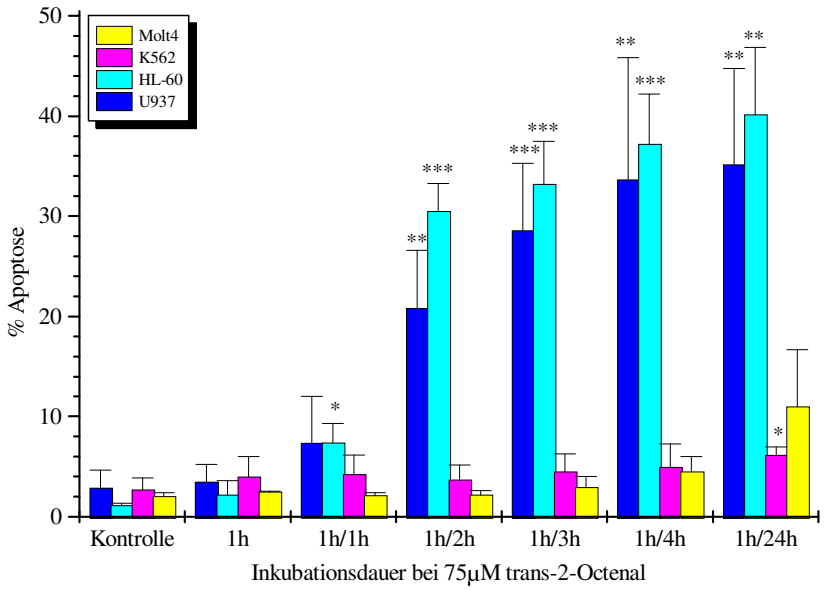


Abb.3.67: Durchflußzytometrische Auswertung des Apoptose-Bereichs der zeitabhängigen Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.15 Analyse der Induktion von Apoptose durch trans-2-Octenal mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Isolation wurde bei einer Konzentration von 75µM durchgeführt. Die Post-inkubationsdauer betrug 4h für die Zellinien U937 und HL-60, für die Zellinien K562 und Molt4 24h. Die Abb.3.68 zeigt für U937 und HL-60 eine DNA-Leiter, für K562 und Molt4 waren keine typischen DNA-Leitern zu erkennen.

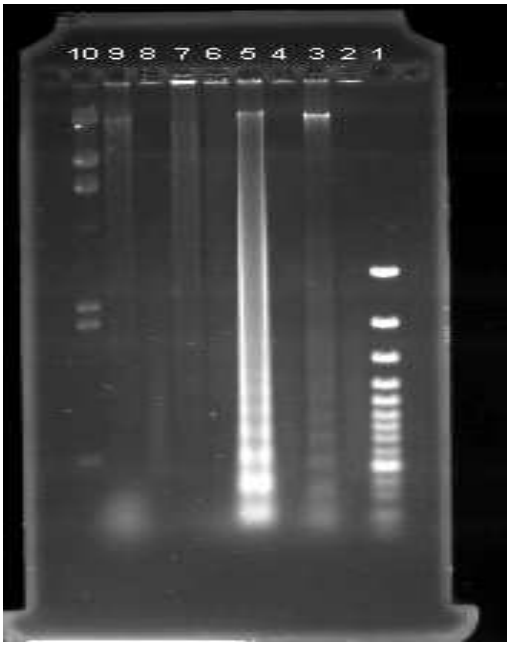


Abb.3.68: Bildung von DNA-Leitern bei U937-, HL-60-, K562- und Molt4-Zellen nach der Inkubation mit 40µM trans-2-Octenal für 1h und 4h-Postinkubation**. Spur 1**: 100bp-Leiter, **Spur 2**: U937-Kontrolle, **Spur 3**: U937-trans-2-Octenal, **Spur 4**: HL-60-Kontrolle, **Spur 5**: HL-60-trans-2-Octenal, **Spur 6**: K562-Kontrolle, **Spur 7**: K562-trans-2-Octenal, **Spur 8**: Molt4-Kontrolle, **Spur 9**: Molt4-trans-2-Octenal, **Spur 10**: λ-Hind III-Marker.

3.3.16 Einfluß von trans-2-Octenal auf den Zellzyklus

3.3.16.1 Phasenspezifität von trans-2-Octenal

Die Zellzyklusanalyse der DNA-Messung zeigte für die Zellinien U937, HL-60 und K562 einen annähernd gleichen Verlauf. Es erfolgte ein Abfall der G0/G1-Phase bis 50µM, ein Anstieg bis 75µM gefolgt von einem erneuten Abfall. Die S-Phase verlief dabei genau entgegengesetzt. Die G2/M-Phase stieg bis 25µM, danach erfolgte ein stetiger Abfall. Die Zellinie Molt4 zeigte einen ähnlichen Verlauf. Es erfolgte ein Abfall der G0/G1-Phase bis 25µM, ein Anstieg bis 75µM gefolgt von einem erneuten Abfall. Die S-und G2/M-Phase verliefen entgegengesetzt (siehe Abb.3.69). Die Analyse der Zeitkinetik ließ bei den Zellinien

U937, HL-60 und K562 einen G2/M-Anstieg nach der 24h-Postinkubation erkennen. Bei den U937 und HL-60 Zellen erfolgte parallel ein Abfall der S- und G0/G1-Phase, während bei den K562 Zellen nur die G0/G1-Phase abfiel (Abb.3.70). Bei der Zellinie Molt 4 konnte kein eindeutiger Effekt detektiert werden.

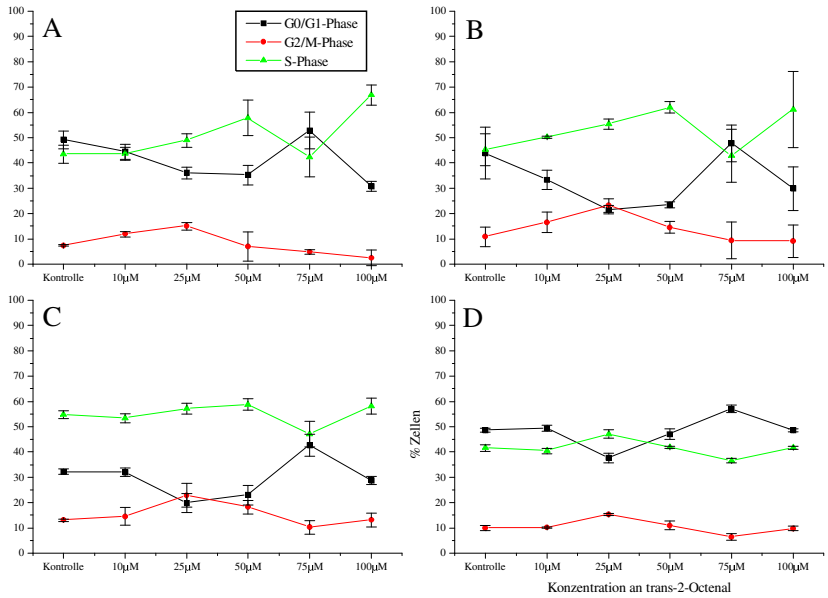


Abb.3.69: Zellzyklusanalyse der Konzentrationskinetik von trans-2-Octenal. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.

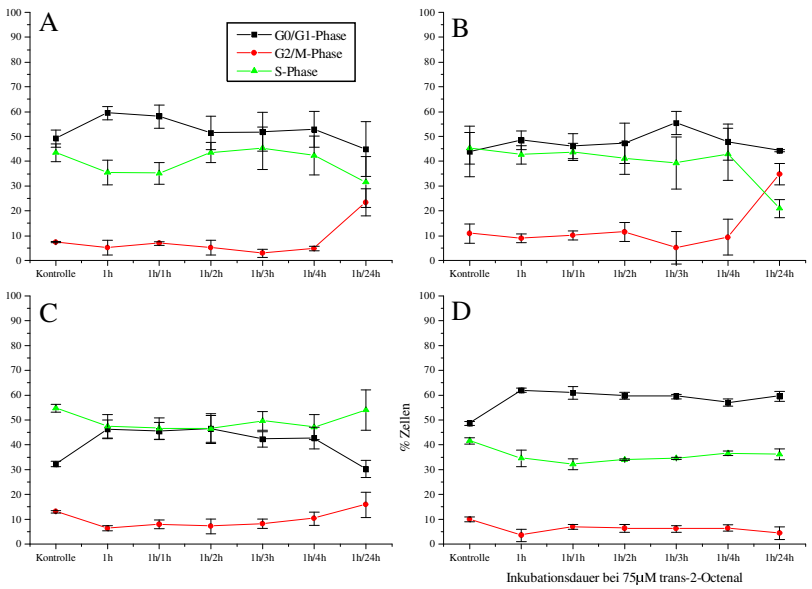


Abb.3.70: Zellzyklusanalyse der Zeitkinetik von trans-2-Octenal. A. Zellinie U937, B. Zellinie HL-60, C. Zellinie K562 und D. Zellinie Molt4.
D.

3.4 Untersuchungen mit Annexin V

Um die bei den Zellinien K562 und Molt4 detektierten Diskrepanzen zwischen Durchflußzytometrie und Fluoreszenzmikroskopie genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich im kritischen Konzentrations- und Inkubationsbereich eine Färbung mit Annexin V-FITC durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Detektion von frühen Apoptosestadien (Quadrant 4 im Dot Plot), welche mit der in dieser Arbeit eingesetzten Methode der Durchflußzytometrie, wenn überhaupt nur sehr schwer nachweisbar sind. Die nachfolgenden Abbildungen 3.71 und 3.72 zeigen die Ergebnisse der AnnexinV-2-Parameter-Messungen in Dot Plots. Bei beiden Zellinien konnten nur in sehr geringem Maße früh apoptotische Zellen mit dieser Methode detektiert werden. Es traten neben intakten Zellen zum Großteil spät apoptotische und nekrotische Zellen auf.

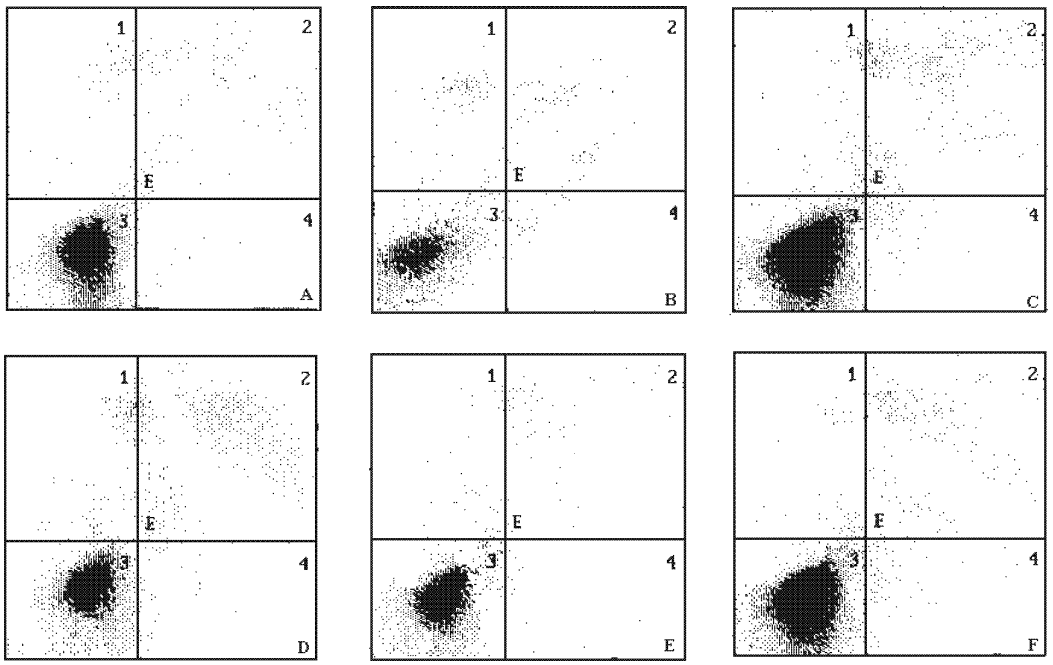


Abb.3.71: 2-Parameter Dot-Plots (Annexin-V-FITC/PI) der Zellinie K562. A. Inkubation mit 0,5µg/ml Actinomycin D für 6h, B. Inkubation mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on, 24h-Inkubation, C: Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal, D. Inkubation mit 100µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, E. Inkubation mit 75µM trans-2-Octenal, F. Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal. Die Inkubationsdauer betrug bei C-F 1h mit einer 24h-Postinkubation nach dem Auswaschen der Substanzen. In Quadrant 1 findet man nekrotische (PI+/FITC-), in Quadrant 2 nekrotische und spät apoptotische (PI+/FITC+), in Quadrant 3 intakte (PI-/FITC-) und in Quadrant 4 apoptotische Zellen (PI-/FITC+).

Ein Vergleich der früh und spät apoptotischen Zellen mit den Mittelwerten aus der durchflußzytometrischen Bestimmung des Sub-G1-Bereiches und der Fluoreszenz-mikroskopie lieferte für die Zellinie K562 keine zusätzliche Information. Der bei der Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on detektierte Sub-G1-Peak konnte auch mit der Färbung von Annexin-V nicht bestätigt werden (siehe Abb.3.73). Bei der Zellinie Molt4 zeigte derselbe Vergleich bei allen überprüften Substanzen eine deutliche Übereinstimmung mit der mikroskopischen Auswertung. Währenddessen war eine ausschließliche Betrachtung der früh apoptotischen Zellen eher mit dem Sub-G1-Bereich zu vergleichen (siehe Abb.3.74).

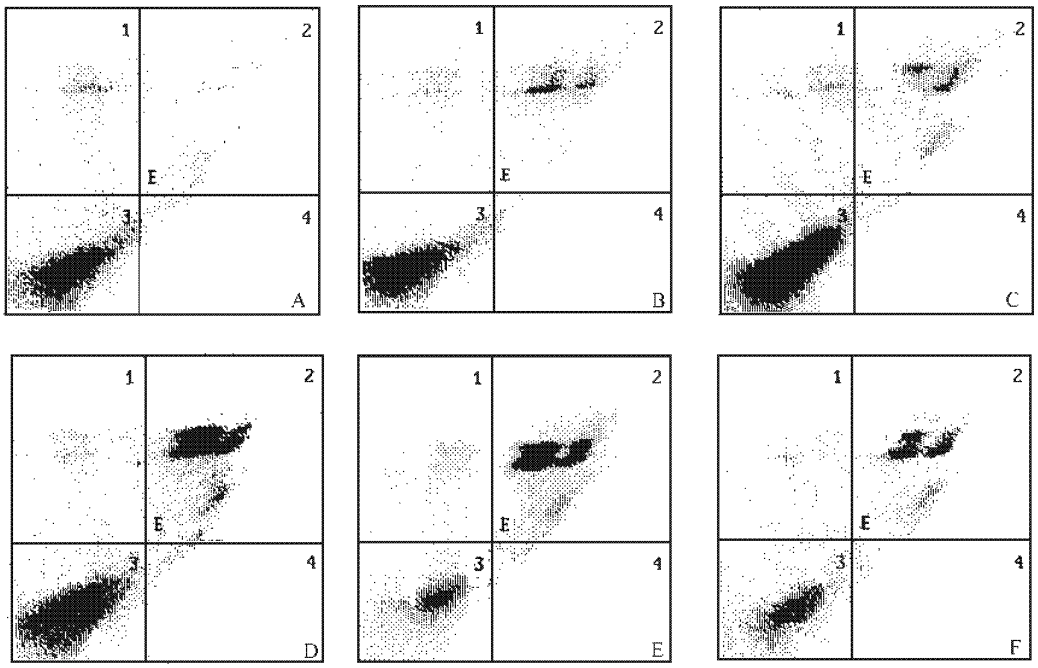


Abb.3.72: 2-Parameter Dot-Plots (Annexin-V-FITC/PI) der Zellinie Molt4. A. Inkubation mit 0,5µg/ml Actinomycin D für 6h, B. Inkubation mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on, 24h-Inkubation, C: Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal, D. Inkubation mit 100µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, E. Inkubation mit 75µM trans-2-Octenal, F. Inkubation mit 40µM 2-trans,6-cis-Nonadienal. Die Inkubationsdauer betrug bei C-F 1h mit einer 24h-Postinkubation nach dem Auswaschen der Substanzen. In Quadrant 1 findet man nekrotische (PI+/FITC-), in Quadrant 2 nekrotische und spät apoptotische (PI+/FITC+), in Quadrant 3 intakte (PI-/FITC-) und in Quadrant 4 apoptotische Zellen (PI-/FITC+).

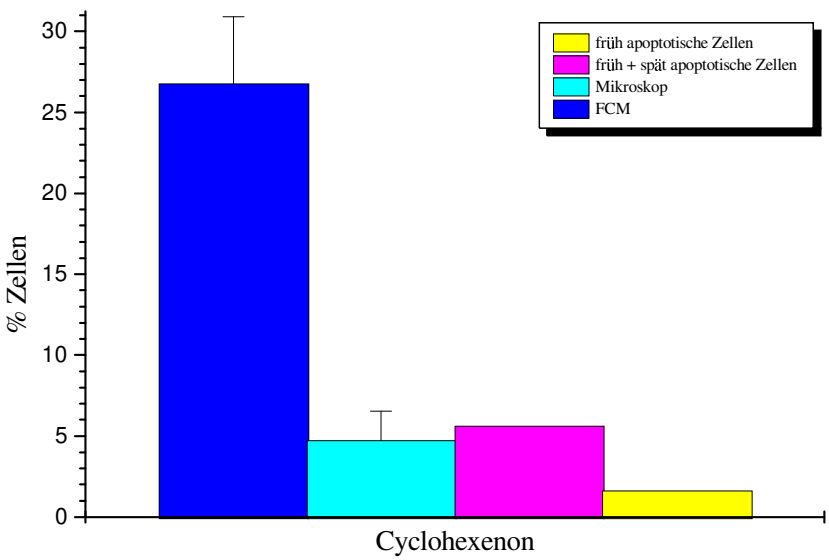


Abb.3.73: Vergleich von Sub-G1, mikroskopisch detektierte Apoptosestadien, sowie Annexin-V positive apoptotische Zellen der mit 2-Cyclohexen-1-on inkubierten Zellinie K562.

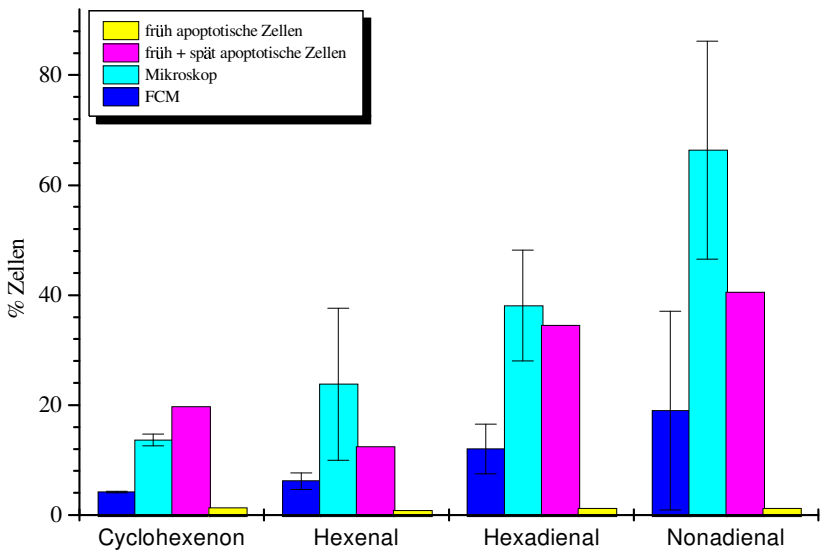


Abb.3.74: Vergleich von Sub-G1, mikroskopisch detektierten Apoptosestadien, sowie Annexin-V positiven apoptotischen Zellen der mit 2-Cyclohexen-1-on, trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal inkubierten Zellinie Molt4.

3.5 Einfluß der Kettenlänge auf die Apoptoseinduktion bei den Zellinien U937 und HL-60

Um eine Aussage über den Einfluß der Kettenlänge auf die Stärke der Apoptoseinduktion treffen zu können, wurde die Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereichs für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal bei den Zellinien U937 und HL-60 bei einer Konzentration von 50µM und einer 4h-Postinkubationsdauer verglichen (Abb.3.75, A-D). Als Kontrollwert diente der Mittelwert aller Versuche.

Bei diesem Vergleich konnte man einen deutlichen substanzabhängigen Anstieg der Apoptoseinduktion feststellen. Für die Zellinie U937 trat bei trans-2-Hexenal noch kein apoptotischer Sub-G1-Peak auf. Ein hoch signifikanter Unterschied konnte zwischen trans-2-Hexenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal detektiert werden, nicht jedoch zwischen trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al oder trans-2-Octenal trotz deutlichem Anstieg (Abb.3.76). Keine Signifikanz bestand auch zwischen 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und trans-2-Octenal, sowie zwischen trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal. Der Unterschied zwischen 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal hingegen war signifikant.

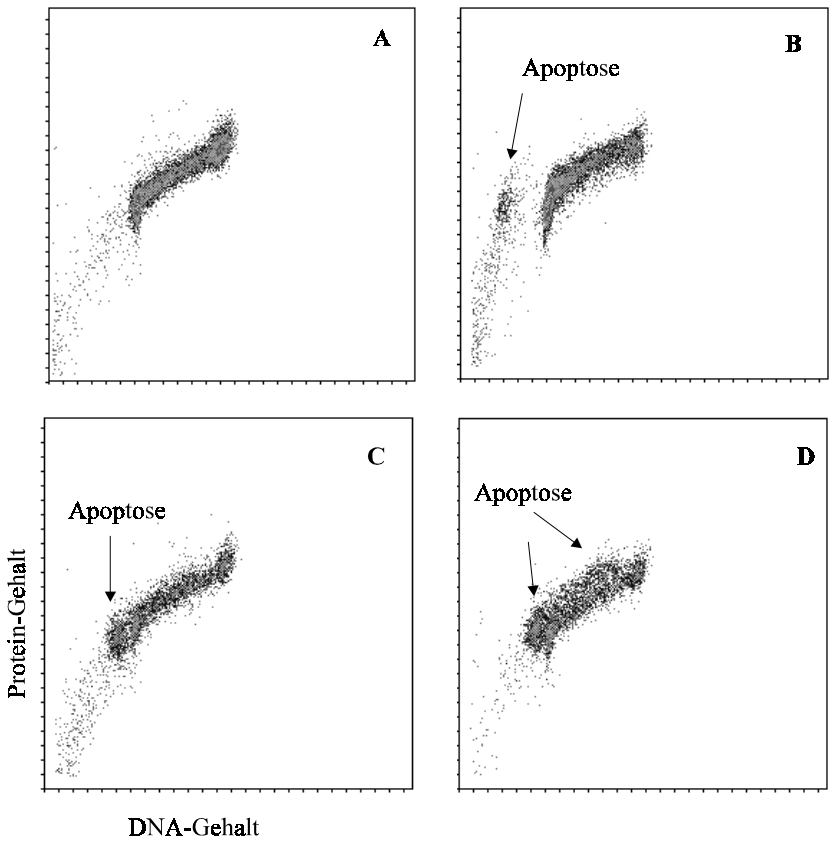


Abb.3.75: 2-Parameter-Messungen der Zellinie HL-60 nach Inkubation mit A. trans-2-Hexenal, B. 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, C. trans-2-Octenal und D. 2-trans,6-cis-Nonadienal. Die eingesetzte Konzentration betrug jeweils 50µM bei einer Inkubationsdauer von 1h mit einer 4h-Postinkubation.

Die Zellinie HL-60 zeigte im Gegensatz dazu einen signifikanten Unterschied zwischen trans-2-Hexenal und trans-2-Octenal, sowie 2-trans,6-cis-Nonadienal. Keine Signifikanz bestand zwischen trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. Signifikant war auch der Unterschied zwischen 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und trans-2-Octenal, sowie 2-trans,6-cis-Nonadienal. Schwache Signifikanz bestand zwischen trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal (Abb.3.76).

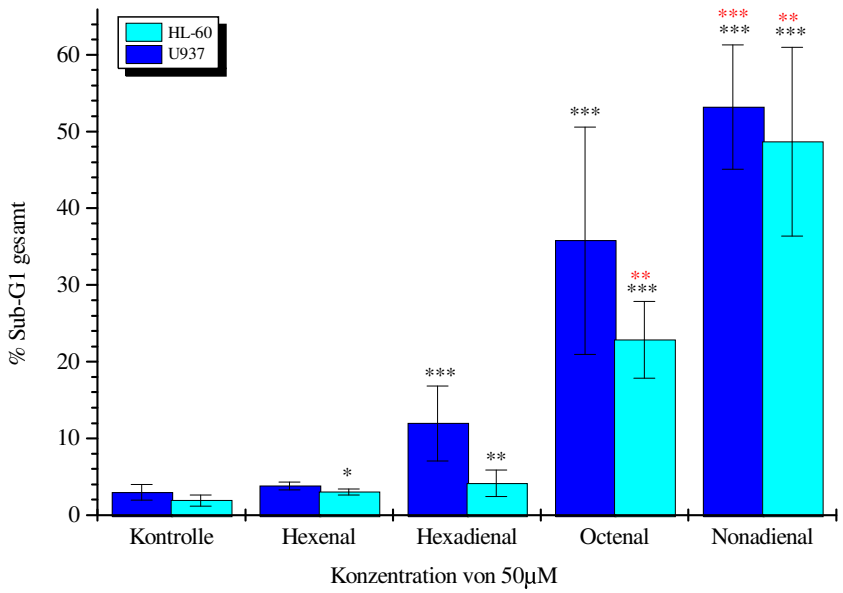


Abb.3.76: Vergleichende Darstellung des durchflußzytometrisch detektierten Sub-G1-Bereiches für die Zellinien U937 und HL-60 bei einer Konzentration von 50µM. * = schwach signifikante, ** = signifikante,*** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle (rot = Bezug zu trans-2-Hexenal).

4. Diskussion

Trotz der großen Zahl unterschiedlicher Methoden zur Analyse des Zelltodes, insbesondere der Apoptose, ist die Bestimmung der Art des Zelltodes und die Quantifizierung nicht immer einfach und eindeutig. Zellen, die apoptotisch sterben, zeigen sehr spezifische morphologische und biochemische Veränderungen, die es ermöglichen, sie von lebenden oder nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Aber diese spezifischen Merkmale apoptotischer Zellen können in Abhängigkeit vom Zell- oder Gewebetyp, von der Natur der apoptoseinduzierenden Substanz und von dem Stadium der Apoptose variieren. Somit kann man in manchen Fällen atypische Apoptosen finden, bei denen ein oder mehrere charakteristische Merkmale fehlen. Die Verwendung von Methoden, welche genau diese Merkmale untersuchen, führt dann zu falsch-negativen Ergebnissen bei der Identifizierung von apoptotischen Zellen. Apoptose ist ein vorübergehendes Ereignis, von variabler Dauer und endet üblicherweise in einer totalen Zellzerstörung. Aus diesem Grund kann man, egal mit welcher Untersuchungsmethode, immer nur einen kleinen Ausschnitt untersuchen. Somit ist es auch beinahe unmöglich, die genaue Rate apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen.

Die Durchflußzytometrie hat sich dabei aufgrund der sehr schnellen, genauen und objektiven Analyse einer großen Population einzelner Zellen zu einer der am häufigsten eingesetzten Methoden entwickelt. Der größte Vorteil liegt dabei in der Möglichkeit verschiedene Parameter gleichzeitig zu untersuchen, wobei durch den Einsatz von verschiedenen Fluorochromen, die Veränderungen in der Zellmorphoplogie, der Struktur der Plasmamembran, des Stofftransportes, in der Funktion der Zellorganellen, in der DNA-Stabilität bezüglich Denaturierung sowie die endonucleolytische DNA-Degradierung analysiert werden können.

4.1 Methodik

4.1.1 Wahl der Zellkultursysteme

Zur Durchführung dieser Untersuchungen mußte neben der Wahl der Methodik und der zu untersuchenden Substanzen auch ein geeignetes Zellsystem gefunden werden. Viele in der Literatur beschriebenen Apoptoseuntersuchungen wurden an isolierten Thymozyten des Menschen, der Maus oder der Ratte durchgeführt (Nicoletti et al., 1991; Arends et al., 1990; Schmied et al., 1994; Telford et al., 1994). Aber auch die verschiedensten Leukämiezellinien (Del Bino et al., 1990 und 1991; Darzynkiewicz et al., 1992; Gorczyca et al., 1993;

Huschtscha et al., 1994; Terui et al., 1995; Endresen et al., 1995) und Zellinien solider Tumoren kamen zum Einsatz (Steck et al., 1995). Auch menschliche periphere Blutlymphozyten wurden für Apoptoseuntersuchungen eingesetzt (Belloc et al., 1994). Da ein humanes System für diese Untersuchungen verwendet werden sollte , standen zu Beginn der vorliegenden Arbeit verschiedene humane Suspensionskulturen oder periphere Blutlymphozyten zur Auswahl. Die Apoptoseinduktion wurde zuerst an den Zellinien L1210, RPMI 1789, EBV-transformierten Lymphozyten, HL-60, U937 und Molt4 mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Apoptoseinduktoren (Camptothecin, Cycloheximid, 3-Deazaadenosin und Actinomycin D) getestet. Dabei konnten nur mit den Zellinien HL-60, U937 und Molt4 mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (diese Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht dargestellt). Die Verwendung von kultivierten, nicht transformierten, peripheren Blutlymphozyten wurde wegen des hohen Bedarfs an Vollblut für die Versuche und der Tatsache, daß diese Zellen bereits ohne Substanzeinwirkung schon zwischen 10-20% Spontanapoptose zeigten (Genzlinger et al., 1997), verworfen. Des weiteren unterliegen periphere Blutlymphozyten größeren inter- und intraindividuellen Schwankungen, welche durch Umwelteinflüsse wie Eß- und Trinkgewohnheiten, Medikamente, Krankheiten etc. bedingt werden. Aufgrund dieser Tatsachen fiel die Wahl auf die humanen myeloischen Zellinien HL-60, U937 und K562 sowie auf die lymphatische Zellinie Molt4. Es wurden mehrere Zellinien eingesetzt, um interindividuelle Schwankungen und Empfindlichkeiten (Del Bino et al., 1990; Anzai et al., 1994), die bei Verwendung einer einzigen Zellinie zu falsch-negativen Ergebnissen führen könnten, zu vermeiden. Für die promyelozytische Zellinie HL-60 war zudem bekannt, daß sie nach Behandlung mit einer Vielzahl von Antitumormedikamenten, Bestrahlung oder Hyperthermie (Kaufmann et al., 1989; DelBino et al., 1990, 1991 und 1992) sehr schnell die Apoptose durchläuft. Die ersten Anzeichen für Apoptose (DNA-Strangbrüche) erschienen 90-120min nach der Exposition der Zellen (DelBino et al., 1992; Gorczyca et al., 1992). Morphologische Veränderungen (Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung) wurden nach 2-3h sichtbar (Gong et al., 1993). Diese Zellinie repräsentiert ein klassisches Apoptosemodell, das durch viele Arbeiten gut charakterisiert wurde (Hara et al., 1996).

Der große Vorteil in der Verwendung von Suspensionskulturen gegenüber Monolayerkulturen lag in der schnellen Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Zellen (Verdopplungsdauer zwischen 22-30h) und im einfachen Handling. Außerdem könnte es bei Monolayerkulturen zu einem selektiven Verlust apoptotischer Zellen während der Trypsinierung und Aberntung

kommen (Darzynkiewicz et al., 1998). Nachteile der Suspensionskulturen sind zum Beispiel Veränderungen der Zellkultur bei langer Kultivierungsdauer sowie häufigem Einfrieren und Auftauen der Zellen. Ferguson et al. berichteten 1993, daß die Veränderung von Zellen durch Kultivierung zu unterschiedlichen Reaktionen führen kann. Eine zu hohe Zelldichte (Zellzahl $>10^6$ Zellen/ml) kann zu veränderter Sensibilität von Zellen gegenüber Apoptoseinduktoren führen. Bei der Zellinie HL-60 kam es in einem solchen Fall zu einer Verlangsamung des Zellzyklus und zu dem Verlust der Apoptoseinduktion durch Camptothecin (Halicka et al., 1997). Das Auslösen von Differenzierung bei der Zellinie HL-60 z.B. durch Lösungsmittel wie DMSO führte ebenfalls zu veränderten Antworten (Darzynkiewicz et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, daß differenzierte Zellen am Ende ihrer Lebens natürlicherweise apoptotisch sterben (Counis et al.,1989; Gunji et al., 1992). Versuche mit Differenzierung auslösenden Substanzen zeigten aber, daß die Apoptose sehr viel geringer ausfiel, wenn die Differenzierung vor der Induktion von Apoptose stattfand (Xu et al., 1993; Solary et al., 1993; DelBino et al., 1994). Dagegen konnte die Inkubation von Zellen mit einer Differenzierung auslösenden Substanz nach Apoptoseinduktion, die Apoptose der Zelle um 100-200% erhöhen (Bhatia et al., 1995). Die gleichzeitige Inkubation mit einer Differenzierung und einer Apoptose auslösenden Substanz veränderte die Zellantwort, d.h. die Stärke der Apoptoseinduktion nicht (Darzynkiewicz et al., 1995).

Das Auftreten von genetischen Instabilitäten in Zellkulturen, die schon mehrere Passagen kultiviert wurden, ist allgemein bekannt. Auch wurden divergierende Ergebnisse bei zu früher Verwendung der Zellkultur nach dem Auftauen beobachtet (persönliche Ergebnisse, nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden die Zellinien nur zwischen der 3. und 10. Woche nach dem Auftauen für die Apoptoseinduktion eingesetzt.

4.1.2 Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes

Die optimale Methode zur Identifizierung bestimmter Formen des Zelltodes ist abhängig von dem gewählten Zellsystem, der Natur der induzierenden Substanz, der Art des Zelltodes, der gewünschten Information (z.B. Abhängigkeit der Apoptose von bestimmten Zellzyklusphasen oder DNA-Ploidie) und technischen Restriktionen (Art des Durchflußzytometers, Transport und Aufbewahrung von Proben etc.). Die Methoden, welche die Unversehrtheit der Plasmamembran überprüfen, wie z.B. der Trypanblau-Ausschlußtest, können bei der Identifizierung apoptotischer Zellen versagen, wenn es sich um sehr frühe Phasen der Apoptose handelt. Mit diese Methoden werden sowohl nekrotische Zellen und mechanisch geschädigte Zellen als auch Zellen, die schon ein späteres Apoptosestadium erreicht haben,

identifiziert (Darzynkiewicz et al., 1997). Der Trypanblau-Ausschlußtest wurde in dieser Arbeit deshalb auch nur zur Bestimmung der Lebendzellzahl und zum Ausschluß zytotoxischer Konzentrationsbereiche eingesetzt. Untersuchungen der Kinetik der Anfärbbarkeit von Zellen mit diesem Farbstoff erlaubten aber an humanen und Mausthymozyten eine Unterscheidung nekrotischer und apoptotischer Zellen (Lyons et al.,1992; Schmid et al., 1994).

Die zweifelsfreie Detektion von apoptotischen Zellen ist schwierig. Die spezifischste Nachweismethode basiert auf der Analyse der DNA-Strangbrüche. Die Zahl der Strangbrüche in apoptotischen Zellen ist so hoch, daß die Intensität der Strangbruchmarkierung einen sehr spezifischen Marker für diese Zellen darstellt (Gorczyca et al., 1992). Es kann jedoch bei atypischen Apoptosen, bei denen die internucleosomale DNA-Degradierung fehlt, zu Schwierigkeiten kommen. Chapman et al. beschrieben aber 1995, daß apoptotische Zellen (z.B Molt4-Zellen inkubiert mit Etoposid) auch in Abwesenheit von internucleosomalen DNA-Fragmenten mit dieser Methode durch die Detektion von 50kbp-Fragmenten identifiziert werden konnten. In diesem Zusammenhang wurden aber auch falsch-positiven Ergebnissen beobachtet. Collins et al. (1992) beschrieb das Auftreten von internukleosomalen Fragmenten in nekrotischen Zellen. Der Einsatz von mehreren durchflußzytometrischen Assays erlaubt eine sichere Bestimmung apoptotischer Zellen als ein Assay allein. So kann man die Messung der Unversehrtheit der Plasmamembran mit der Analyse der Membranpermeabilität, des mitochondrialen Transmembranpotentials, der Sensitivität gegenüber Denaturierung oder des Auftretens von DNA-Strangbrüchen kombinieren.

Da die Kosten und Einfachheit eine große Rolle bei der Wahl der Methode spielen, erwies sich die Diskriminierung apoptotischer Zellen anhand von DNA-Gehaltsanalysen als die einfachste, billigste und schnellste Methode. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes wird in vielen Labors routinemäßig für eine Vielzahl anderer Fragestellungen durchgeführt. Zusätzlich können mit dieser Methode zellzyklusspezifische Effekte am DNA-Histogramm abgelesen werden (Hotz et al., 1994). Die hiermit gewonnenen Ergebnisse können dann mit weiteren Methoden bestätigt werden.

Wie schon erwähnt, bietet die Durchflußzytometrie eine schnelle, quantitative und objektive Analyse lebender Zellen und kann zur Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen eingesetzt werden. Da jedoch die Apoptose ursprünglich aufgrund der Analyse der Zellmorphologie definiert wurde (Kerr et al., 1972) und diese Veränderungen unverwechselbar sind, sollte die Inspektion von Zellen unter dem Mikroskop immer zur

Identifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen herangezogen werden (Darzynkiewicz et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde die in unserem Labor routinemäßig eingesetzte simultane Messung von DNA- und Protein-Gehalt zur Bestimmung apoptotischer Zellen angewandt. Mit dieser Methode gelang es mehreren Autoren, die S-und G_2-phasenspezifische Apoptose in lymphatischen (L1210 und Molt4) und myeloischen (HL-60 und KG1) Leukämiezellinien sowie den apoptoseassoziierten Verlust an Protein darzustellen (DelBino et al., 1990,1991; Gorczyca et al., 1993; Gong et al., 1993). Die hiermit erhaltenen Ergebnisse wurden mit der morphologischen Auswertung einzelner Apoptosestadien und der Bestimmung der DNA-Leiter oligonukleosomaler Fragmente im Agarose-Gel verglichen.

4.2. Kritische Aspekte bei der Analyse apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie

4.2.1 Benutzung unfixierter Zellen und Detergenzlösungen bei DNA-Gehaltsanalysen

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode basiert neben der Bestimmung des Proteingehaltes auf der Messung des DNA-Gehaltes apoptotischer Zellen. Partikel mit einem erniedrigten DNA-Gehalt werden als apoptotische Zellen bezeichnet (Elstein et al., 1994 und 1995; Nicoletti et al., 1991). Dies gilt für Zellen, welche mit Fixativen wie Alkohol oder Aceton fixiert wurden. Eine Detergenz- oder Hypotoniebehandlung vor der Fixierung führt zur Lyse von Zellen. Da der Kern apoptotischer Zellen fragmentiert und mehrere Chromatinfragmente in einer Zelle vorhanden sein können, korrespondiert der Prozentsatz an Signalen die einen erniedrigten DNA-Gehalt zeigen (% Sub-G1-Peak), dann nicht mit dem apoptotischen Index. Weiterhin kann die Lyse von mitotischen Zellen oder Zellen mit Mikrokernen einzelne Chromosomen oder Mikrokerne freisetzen, welche dann aufgrund ihres DNA-Gehaltes im Sub-G1-Bereich als apoptotische Zellen identifiziert werden (Darzynkiewicz et al., 1997).

Der Einsatz der HR-A-Lösung nach der Fixierung der Zellen in 70% EtOH in dieser Arbeit führte zur Extraktion von DNA-Fragmenten und somit zur Detektion eines Sub-G1-Peaks, nicht jedoch zu einem übermäßigen Zerfall apoptotischer Zellen in Fragmente. Dies war wahrscheinlich auf die Vernetzung zytoplasmatischer Proteine in apoptotischen Zellen durch Transglutaminaseaktivität zurückzuführen. Diese starke Vernetzung verhindert die vollständige Entfernung des Zytoplasmas und somit auch den Zerfall. Für die mikroskopische Auswertung wurden die fixierten Zellen in EtOH ebenfalls mit HR-A-Lösung inkubiert, um Verklumpungen bei der Zentrifugation auf Objektträger zu vermeiden. Eine Kontrolle von

unbehandelten und behandelten Zellen ergab keine Erhöhung der Fragmente. Dies zeigte sich auch ganz deutlich in einem Vergleich des durchflußzytometrisch detektierten Apoptose-Bereiches der Zellinien U937 und HL-60 mit der mikroskopischen Auswertung, die den Anteil an apoptotischen Bodies und Fragmenten beinhaltete. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei einem durch HR-A-Lösung verursachten übermäßigen Zerfall apoptotischer Zellen, müßte der durchflußzytometrisch gemessene Apoptose-Bereich zu geringeren Werten führen als die mikroskopischen Auswertung. Eine Ausnahme bildete dabei die Zellinie K562 bei der Inkubation mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on. Die Auswertung des Sub-G1-Bereiches ergab im Mittel einen Prozentsatz von 27%. Nach der Abgrenzung des Apoptose-Bereiches entfielen auf den Bereich, welcher Debris, Mikrokerne, apoptotische Bodies und Fragmente enthält ca. 13%. Im Mikroskop konnten jedoch nur 5% apoptotische Zellen detektiert werden, wobei so gut wie keine Fragmente auftraten. Hier schienen durch die Behandlung mit HR-A-Lösung Chromatinfragmente apoptotischer Zellen freigesetzt worden zu sein.

4.2.2 Standardisierung

Zur Standardisierung bei der Detektion apoptotischer Zellen anhand ihres DNA-Gehaltes sollten nach Darzynkiewicz (1997) nur Partikel mit erniedrigtem DNA-Gehalt, welcher oberhalb 10% des DNA-Gehaltes intakter G1-Zellen liegt, in die Auswertung mit eingehen. Dies hat zur Folge, daß man quantitativ einige apoptotische Zellen verliert. Das Ergebnis entspricht der wirklichen Situation jedoch eher, als die Gesamtheit aus apoptotischen Zellen, Debris, einzelnen Chromosomen, Chromosomenklumpen und kontaminierenden Bakterien. Da in der vorliegenden Arbeit auch der Proteingehalt in die Analyse apoptotischer Zellen einging, mußten auch hier bestimmte Grenzen festgelegt werden. Aus diesem Grund wurde zum einen der gesamte Sub-G1-Bereich, zum anderen ein Apoptose-Bereich definiert. Bei letzterem wurden nur Zellen ausgewertet, deren Proteingehalt nicht unterhalb des Proteingehaltes normaler, nichtapoptotischer Zellen derselben Kultur lag (siehe Abb.1.6).

4.2.3 Prozentsatz apoptotischer Zellen

Wie die Mitose ist die Apoptose nur von kurzer Dauer. Die Zeitspanne, in der apoptotische Zellen ihre charakteristischen Merkmale zeigen, die es erlauben sie zu identifizieren, hängt von der Detektionsmethode, dem Zelltyp und dem Induktor ab. Verlangsamt eine eingesetzte Substanz den apoptotischen Prozeß z.B. durch Beeinflussung der Endonucleolyse oder der Proteolyse, kann dies auch die Zeitspanne, in der man apoptotische Zellen identifizieren kann,

verändern. Somit erfaßt man je nach Art der Detektionsmethode und dem Detektionszeitpunkt nicht wirklich alle Zellen, welche apoptotisch sterben. Es handelt sich also sowohl bei der Durchflußzytometrie als auch bei der morphologischen Auswertung um Richtwerte. Leider gibt es keine Methode, um Zellen, die apoptotisch werden, zu einem bestimmten Zeitpunkt anzureichern (Darzynkiewicz et al., 1997).

4.2.4 Unterscheidung zwischen spät apoptotischen und nekrotischen Zellen

Zellen, die in der Apoptose schon sehr weit fortgeschritten sind, ähneln nekrotischen Zellen so stark, daß man auch von „apoptotischer Nekrose“ spricht (Majno et al., 1995), um diese späten Stadien zu definieren. Zu diesem Zeitpunkt können viele Methoden zur Detektion von Apoptose nicht mehr zwischen den beiden Zelltodarten unterscheiden. Da diese spät apoptotischen Zellen z.B. ihre Fähigkeit verlieren, geladene, kationische Farbstoffe wie Propidiumjodid oder 7-AMD auszuschließen, können diese Methoden zur Unterscheidung nicht mehr eingesetzt werden (Jacobs et al., 1983; Schmid et al.,1992). Spät apoptotische Zellen färben sich aufgrund ihrer geschädigten Plasmamembran mit Propidiumjodid ähnlich stark wie nekrotische Zellen (Koopman et al., 1994). Phosphatidylserin kann sowohl in nekrotischen als auch in apoptotischen Zellen durch die geschädigte Plasmamembran mit Annexin V gefärbt werden, so daß sich auch diese Methode nicht zur Unterscheidung eignet. Dagegen kann die starke DNA-Degradierung im Agarosegel oder die Analyse des zellulären DNA-Gehaltes auch zu einem solch späten Zeitpunkt zur Unterscheidung nekrotischer und spät apoptotischer Zellen herangezogen werden.

4.3 Vergleichende Analyse der eingesetzten Methoden

Nur bei den Zellinien U937 und HL-60 konnte die induzierte Apoptose sowohl quantitativ (durchflußzytometrisch und morphologisch) als auch qualitativ (DNA-Leiter) eindeutig bestimmt werden. (Tab.4.1).

	U937			HL-60		
	Mikroskop	FCM	DNA-Leiter	Mikroskop	FCM	DNA-Leiter
Actinomycin D	*	+	+	*	+	+
2-Cyclohexen-1-on	+	+	+	+	+	+
trans-2-Hexenal	+	+	+	+	+	+
2-trans,4-trans-Hexadien-1-al	+	+	+	+	+	+
trans-2-Octenal	*	+	+	*	+	+
2-trans,6-cis-Nonadienal	+	+	+	+	+	+

Tab.4.1: Qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellinien U937 und HL-60
* = nicht ausgewertet, + = Apoptose konnte detektiert werden, - = Apoptose konnte nicht detektiert werden

Diskrepanzen fanden sich bei den Zellinien K562 und Molt4. Bei der Zellinie K562 konnte zum einen die bei 2-Cyclohexen-1-on mittels Durchflußzytometrie und Agarose-Gelelektrophorese detektierte Apoptose mikroskopisch nicht bestätigt werden. Zum anderen wurde bei trans-2-Hexenal und trans-2-Octenal trotz Sub-G1-Peak in der Durchflußzytometrie keine typische DNA-Leiter detektiert (Tab.4.2). Bei der Zellinie Molt4 konnte für keine der untersuchten Verbindungen eine DNA-Leiter detektiert werden. Bei 2-Cyclohexen-1-on konnte die Apoptose nur mikroskopisch bestimmt werden (siehe Tab.4.2).

	K562			Molt4		
	Mikroskop	FCM	DNA-Leiter	Mikroskop	FCM	DNA-Leiter
Actinomycin D	*	-	-	*	+	-
2-Cyclohexen-1-on	-	+	+	+	-	-
trans-2-Hexenal	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
2-trans,4-trans-Hexadien-1-al	-	-	-	+	+	-
trans-2-Octenal	*	+	-	*	-	-
2-trans,6-cis-Nonadienal	-	-	-	++	(+)	-

Tab.4.2: Qualitative Zusammenfassung der Ergebnisse für die Zellinien K562 und Molt4.
* = nicht ausgewertet, + = Apoptose konnte detektiert werden, - = Apoptose konnte nicht detektiert werden, (+) = nicht signifikanter Anstieg des apoptotischen Bereiches.

4.3.1 2-Parameter-Durchflußzytometrie: DNA- und Proteingehalt

Die intensive DNA-Fragmentierung während der Apoptose ist die Basis für die in dieser Arbeit eingesetzte Messung von DNA-Gehalt, wobei die niedermolekularen DNA-Fragmente vor der Färbung extrahiert bzw. entfernt werden.
Die Fixierung der Zellen in Alkohol, hielt die degradierte DNA nicht vollständig im apoptotischen Zellkern bzw. der apoptotischen Zelle. Durch die anschließende Behandlung mit HR-A-Lösung und Färbung, blieb ein apoptotischer Zellkern, der einen reduzierten DNA-Gehalt enthielt, übrig. Diese Zellkerne wurden als sogenannter „Sub-G1-Peak“ im hypodiploiden Bereich des 1-Parameter-Histogramms dargestellt (Nicoletti et al., 1991; Umansky et al., 1981; Elstein et al., 1994; Endersen et al., 1995). Eine Fixierung mit Formaldehyd verhindert dagegen die Extraktion der degradierten DNA in apoptotischen Zellen (Hotz et al., 1994). Sind die Zellen aber in der Apoptose schon weiter fortgeschritten und ihre DNA liegt stark degradiert vor, kann diese auch nach Formaldehydfixierung extrahiert werden. Der Grad der Degradierung variiert je nach eingesetzter Zellinie, Stadium der Apoptose und Induktor.
Die zur Einführung der durchflußzytometrischen Methodik durchgeführten Versuche mit Actinomycin D zeigten die deutliche Darstellung der Apoptose als Sub-G1-Paek im 1-Parameter Histogramm und im 2-Parameter Dot Plot. Dosisabhängige Apoptose fand sich wie in der Literatur beschrieben bei den Zellinien U937, HL-60 und Molt4 (Anzai et al., 1994). Die 2-Parameter-Messung ermöglichte zudem eine gute Quantifizierung und Unterteilung in einen Sub-G1-Bereich und einen Apoptose-Bereich (siehe auch Abb.1.6).

Werden Zellen der S- oder G2/M-Phase betroffen und die Fragmentierung, wie auch die Extraktion der Fragmente durch die Wasch- und Färbeschritte, ist nicht maximal, so sind die apoptotischen Zellen in einem „Sub-S-Peak“ oder „Sub-G2/M-Peak“ anzutreffen (Chapman et al., 1995; eigene Ergebnisse, siehe Abb.4.1 und Abb.4.2), welche aber in der 1-Parameter-Messung des DNA-Gehaltes nur als Akkumulation von Zellen im Zellzyklus detektiert werden konnten. Dies war z.B bei der Zellinie U937 nach Inkubation mit trans-2-Hexenal und 2-Cyclohexen-1-on der Fall. Betrachte man sich die nachfolgenden Histogramme (Abb.4.1, A-C) der Zellinie U937, so konnte man bei der Inkubation mit trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al neben einem Debrisanteil einen deutlichen Sub-G1-Peak detektieren. Das Histogramm der Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on zeigte dagegen nur eine Population im Debrisbereich. In der Literatur wird als Nachteil der Bestimmung des Sub-G1-Peaks die niedrige Spezifität bei der Detektion von Apoptose genannt. Diese Autoren benutzten daher zur Extraktion der niedermolekularen DNA-Fragmente einen hochmolaren Phosphat/Citrat-

Puffer (Gong et al., 1994), der diese Fragmente in einem solchen Maße aus der Zelle auswäscht, daß in dem dann detektierten Sub-G1-Peak neben apoptotischen, auch mechanisch geschädigte Zellen, hypodiploide Zellen, differenzierte oder pyknotische Zellen mit veränderter Anfärbbarkeit (Elstein et al., 1994) zu finden waren. Damit wurde jedoch gewährleistet, daß sich keine apoptotischen Zellen mehr im Zellzyklus versteckten. Der Nachteil, daß sich neben apoptotischen Zellen auch Debris im Sub-G1-Peak befanden, konnte durch Einsatz eines zweiten Parameters, wie z.B. der Detektion von DNA-Strangbrüchen rückgängig gemacht werden (siehe 4.2).

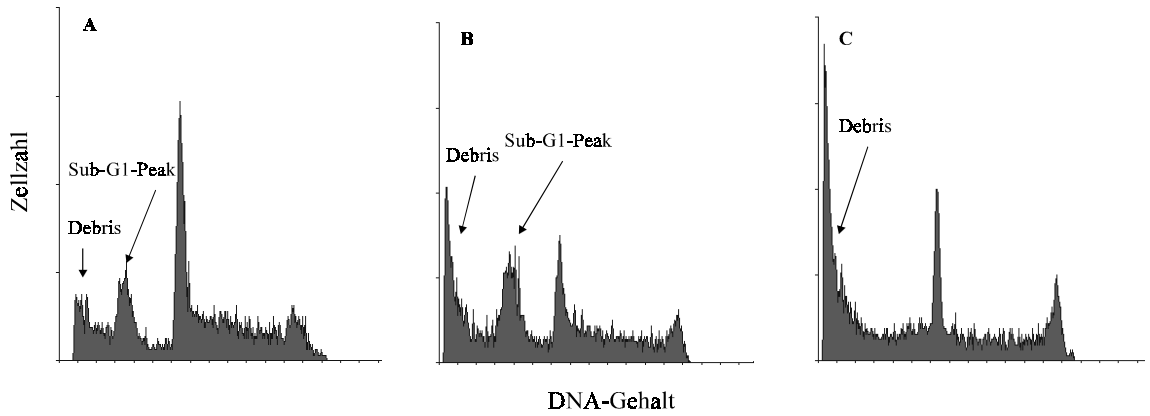


Abb.4.1: 1-Parameter-Histogramme der DNA-Messung der Zellinie U937. A. Inkubation mit 125µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, B. Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal und C: Inkubation mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on. Die Inkubationsdauer betrug 1h mit einer 4h-Postinkubation bei A. und B, sowie 24h bei C

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen nach HR-A-Behandlung zeigten aber deutlich die Auftrennung des hypodiploiden Bereichs im Histogramm in Sub-G1-Peak und einen Debris-Peak (siehe Abb.4.1). Dieser Debris-Peak enthält neben Zellschrott (z.B. mechanisch geschädigte Zellen) auch apoptotische Bodies und Mikrokerne. Der Nachteil der geringen Spezifität der 1-Parameter-Messung konnte durch Zuhilfenahme einer zusätzlichen Proteinfärbung außer Kraft gesetzt werden. Der 2-Parameter Dot-Plot zeigte nämlich, daß sich apoptotische Zellen, die aus der S- oder G2/M-Phase stammen, durch einen erhöhten Proteingehalt deutlich von Zellen im normalen Zellzyklus abtrennen ließen (siehe Abb.4.2, B und C). Somit konnte man bei der Inkubation der Zellen mit trans-2-Hexenal und 2-Cyclohexen-1-on zusätzliche, „versteckte“ apoptotische Zellen erkennen, welche eindeutig bestimmten Zellzyklusphasen zuzuordnen waren.

Die mit trans-2-Hexenal behandelte Zellkultur wies zusätzliche apoptotische Zellen aus der S- und G2/M-Phase auf, während mit 2-Cyclohexenon mittels Sub-G1-Peak nicht detektierte Apoptose aus der frühen S-Phase zu sehen war (Abb.4.2).

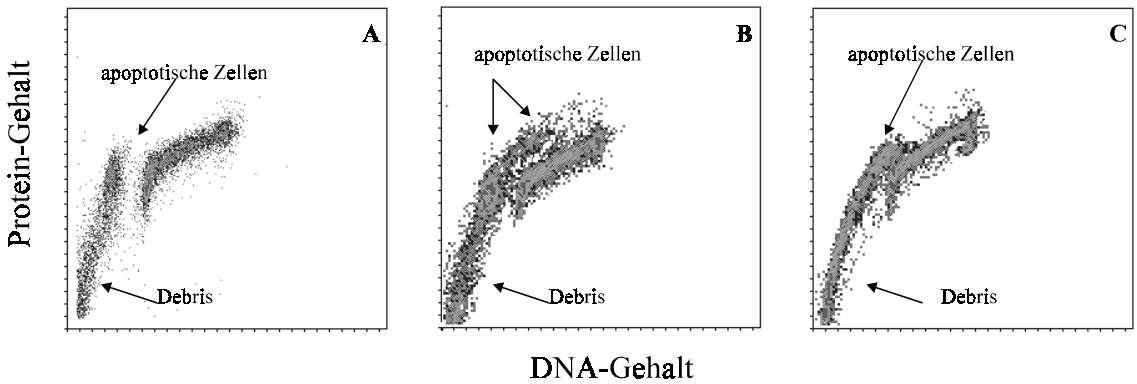


Abb.4.2: 2-Parameter-Dot-Plots der DNA-/Protein-Messung der Zellinie U937. A. Inkubation mit 125µM 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, B. Inkubation mit 125µM trans-2-Hexenal und C: Inkubation mit 50µM 2-Cyclohexen-1-on. Die Inkubationsdauer betrug 1h mit einer 4h-Postinkubation bei A. und B. sowie 24h bei C.

Der erhöhte Proteingehalt apoptotischer Zellen kann durch die Aktivierung einer Transglutaminase erklärt werden, die in apoptotischen Zellen zytoplasmatische Proteine vernetzt (Piacentini et al., 1995). Diese Vernetzung ist so stark, daß das Zytoplasma apoptotischer Zellen mit der HR-A-Lösung gar nicht oder nur unvollständig entfernt werden kann. Weiterhin konnte man mit der DNA-/Proteinmessung den Debris abtrennen. Debris besitzt nämlich einen Proteingehalt, der unterhalb des Gehaltes von normalen G0/G1-Zellen liegt.

Es war also möglich, bei den Zellinien U937 und HL-60 bei allen untersuchten Carbonylverbindungen durchflußzytometrisch Apoptose zu detektieren. Bei der Zellinien K562 gelang dies nur in zwei Fällen, bei der Zellinie Molt4 nur in einem Fall eindeutig. Zudem erlaubte die eingesetzte 2-Parameter-Messung von DNA- und Proteingehalt die Detektion von Apoptose, die nicht als Sub-G1-Peak auftrat sowie deren zellzyklusspezifische Zuordnung.

4.3.2 Morphologische Analyse

Die ersten Beschreibungen des apoptotischen Zelltodes beruhten auf der Betrachtung der charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen (Kerr et al., 1972). Und

obwohl die verschiedensten Merkmale als Marker für apoptotische Zellen in der Durchflußzytometrie zum Einsatz kommen, sollte die Art des Zelltodes immer mittels Licht- oder Elektronenmikroskopie analysiert werden (Darzynkiewicz et al., 1997). Die Präparation der fixierten Zellen auf Objektträger mit Hilfe einer Zytozentrifuge und eine anschließende Färbung mit DAPI/Sulforhodamin101 hat sich für diese Zwecke als optimal herausgestellt. Die Zellen wurden dabei flach ausgebreitet, so daß ihre Morphologie einfach zu bestimmen war. Durch die Färbung wurden die apoptotischen Merkmale gut hervorgehoben. Dies steht im Gegensatz zu der Aussage von Darzynkiewicz et al. (1998), daß die Zellen unfixiert auf Objektträger zentrifugiert werden sollten um eine optimale Morphologie zu erhalten. Es wurden dabei charakteristische Merkmale der Apoptose, wie Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung und die Abspaltung von apoptotischen Bodies analysiert. Die Lappung der Zellen wurde nicht berücksichtigt. Diese war zwar häufig zu beobachten, die Stärke und Ausprägung variierte jedoch so stark, daß sich dieser Parameter als zu subjektiv herausstellte. Alle 4 eingesetzten Zellinien zeigten im normalen Zustand nur einen kleinen Zytoplasmasaum. Apoptotische Zellen mit stark kondensiertem Kern zeigten zum einen einen deutlich größeren Zytoplasmasaum mit durch die Kondensierung stärker blau fluoreszierendem Kern. Zum anderen kann das Chromatin in Schollen an der Kernperipherie kondensieren und der Kern eine Halbmondform annehmen. Auch hier findet man eine stärkere Fluoreszenz. Von Zellen mit fragmentiertem Kern sprach man, wenn dieser aus mindestens 4 Fragmenten bestand und auch hier eine stärkere Kondensierung aufwies. Etwas schwieriger ist die Einordnung apoptotischer Bodies, die nach Darzynkiewicz et al. 1998 nicht in die Quantifizierung mit einbezogen werden sollten, da aus einer apoptotischen Zelle mehrere apoptotische Bodies entstehen. Durch die Zentrifugation lagen sie außerdem sehr verstreut vor und waren häufig neben normalen Zellen zu finden, so daß sie mit Mikrokernen verwechselt werden konnten. Aufgrund ihres Zytoplasmasaums und der stärkeren Chromatinkondensierung waren sie aber im allgemeinen gut von Mikrokernen oder auch Chromosomen zu unterscheiden. In meinen Untersuchungen wurden sie wegen des Vergleiches des gesamten Sub-G1-Peaks mit der mikroskopischen Auswertung trotzdem mit einbezogen.

Die hohen Standardabweichungen zwischen den mikroskopischen Auswertungen z.B. der durch 2-Cyclohexen-1-on induzierten Apoptose bei der Zellinie U937 standen im Gegensatz zu der durchflußzytometrischen Analyse. Diese zeigte weniger auffällige Abweichungen. Diese Unterschiede spiegelten wohl die Möglichkeit der mikroskopischen Auswertung, zwischen verschiedenen Stadien der Apoptose zu unterscheiden, wieder. Denn obwohl die

Versuche immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, bestand die Möglichkeit von Abweichungen. Diese könnten zeitlicher oder präparativer Natur gewesen sein. Da die Apoptose einen empfindlichen Prozeß darstellt, der von kurzer und variabler Dauer sein kann, ist es somit möglich, daß auch kleine zeitliche Abweichungen dazu führten, daß man die Apoptose sozusagen durch ein „anderes Fenster" sah, d.h. die Apoptose befand sich in einem anderen Stadium. Die Unterschiede könnten aber auch durch Sensitivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zellpassagen hervorgerufen worden sein.

Mehrere Autoren beschrieben Beispiele von Zelltod, bei denen die Muster an morphologischen und/oder biochemischen Veränderungen weder der Apoptose noch der Nekrose glichen, wobei in der Mehrzahl der Fälle das Fehlen oligonucleosomaler Fragmente beschrieben wurde (Akagi et al., 1995; Catchpoole et al., 1993; Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992; Fukuda et al., 1993; Ormerod et al., 1993; Zamai et al., 1996). So können z.B. durch den Apoptoseinduktor ausgelöste sekundäre Effekte Zellstruktur und Funktion verändern. Der Arrest in einer Zellzyklusphase führt zu Wachstumsstörungen, welche sich stark auf die Biochemie und Morphologie der Zelle auswirken können (Gong et al., 1995). Das Fehlen der typischen morphologischen Apoptosemarker bei der Zellinie K562 nach Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on könnte auch ein solches Beispiel darstellen. Riordan et al. stellten 1998 bei der Inkubation von Ph+ K562-Zellen mit Etoposid zwar zytoplasmatische Vakuolisierung, jedoch keine Chromatinkondensierung oder -fragmentierung fest. Sie erklärten dies mit der Expression des bcr/abl-Oncoprotein, welches durch Deregulierung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität antagonistisch zur Induktion von Apoptose durch DNA-schädigende Substanzen wirkt. Untersuchungen an UVB bestrahlten Keratinozyten zeigten kleine und große Knospenbildung sowie DNA-nicks, aber weder Chromatinkondensierung noch Karyorrhexis oder eine DNA-Leiter oligonucleosomaler Fragmente (Gniadecki et al., 1998). Weiterhin konnte bei Spermatogonien, die mit γ-Strahlung behandelt wurden, zwar eine Kondensierung des Chromatins, aber keine Randständigkeit oder Kernfragmentierung gefunden werden (Hasegawa et al., 1997). Asher et al. beschrieb 1995 eine atypische Apoptose in EBV-transformierten Lymphozyten, die mit ^{3}H-markiertem Thymidin behandelt wurden. Die Untersuchungen zeigten DNA-Degradierung ohne das Auftreten einer DNA-Leiter, ohne randständiges Chromatin und Lappung der Zellen.

Im Gegensatz zu der Zellinie K562 konnte bei der Zellinie Molt4 z.B. die durchflußzytometrisch nicht detektierte Apoptose bei 2-Cyclohexen-1-on mikroskopisch

deutlich durch eine Population an Zellen mit stark kondensiertem Kern sichtbar gemacht werden.

Die mikroskopische Analyse der Apoptose gilt trotz der zahlreichen Möglichkeiten zur Apoptosedetektion immer noch als eine der sichersten Untersuchungsmethoden und sollte immer parallel mit anderen Methoden eingesetzt werden. Dies ist besonders bei quantitativen Analysen zu beachten (Darzynkiewicz et al., 1998). Die unverwechselbaren morphologischen Veränderungen ermöglichten es auch bei diesen Untersuchungen zuvor nicht detektierte Apoptose sichtbar zu machen. Darüber hinaus erhielt man Informationen über die unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Apoptosestadien bei verschiedenen Zellinien.

4.3.3 DNA-Fragmentierung

Das bedeutendste morphologische Merkmal der Apoptose ist die Kondensierung und Anlagerung des Chromatins an der Kernperipherie (Whyllie et al., 1992). Das bedeutendste biochemische Merkmal für Apoptose ist das Auftreten von oligonucleosomalen DNA-Fragmenten im Agarosegel. Die Detektion dieser DNA-Leiter oligonucleosomaler Fragmente (nach Gong et al., 1994) wurde zusätzlich zur durchflußzytometrischen und morphologischen Analyse zur rein qualitativen Bestimmung von Apoptose eingesetzt. Gong et al. (1994) konnten zeigen, daß man ab 8% apoptotischer Zellen in einer Kultur von 1-2x10^6 Zellen eine gut sichtbare DNA-Leiter erhält. Dabei kamen bei der Erstellung der Konzentrationskinetik und der Zeitkinetik ermittelte optimale Konzentrationen und Inkubationszeiten zum Einsatz.
Für die Zellinien U937 und HL-60 konnte mit dieser Methode das Auftreten einer DNA-Leiter oligonucleosomaler DNA-Fragmente im Gel bei allen eingesetzten Verbindungen detektiert werden und lieferte eine gute Übereinstimmung mit den restlichen Auswertungen. Für die Zellinie Molt4 konnte in keinem der untersuchten Fälle mit dieser Methode Apoptose detektiert werden. Für die Zellinie K562 trat nur bei 2-Cyclohexen-1-on eine undeutliche DNA-Leiter auf.
Viele Beispiele wurden beschrieben, in denen die Induktion von Apoptose zwar morphologisch eindeutig war, das Auftreten von oligonucleosomalen DNA-Fragmenten aber nicht detektiert werden konnte (Cohen et al., 1992; Brown et al., 1993; Gavrieli et al., 1992; Barres et al., 1992; Oberhammer et al., 1993; Tomei et al., 1993). So zeigten z.B. Oberhammer et al. 1993 an der Prostatakarzinomzellinie DU-145 das Auftreten von Apoptose anhand der Morphologie, konnten jedoch keine DNA-Leiter nachweisen. Neuere Untersuchungen ließen aber auch erkennen, daß DNA-Fragmentierung in zwei Phasen auftritt,

die durch die Größe ihrer Fragmente charakterisiert werden (Walker et al., 1997). Der Einsatz der Pulsfeld-Gelelektrophorese zeigte das primäre Auftreten von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 300-50kbp (HMW-Fragmente) und erst anschließend das Erscheinen kleinerer Fragmente (Walker et al., 1991; Dusenbury et al., 1991; Oberhammer 1993). Diese Ergebnisse machten deutlich, daß nur die Fragmentierung der DNA in HMW-Fragmente essentiell für Apoptose ist und die Fragmentierung in oligonucleosomale Fragmente zwar auftreten kann, aber nicht obligat ist. Sah man noch vor einigen Jahren in der oligonucleosomalen DNA-Fragmentierung eines der bedeutensten Merkmale der Apoptose, so wandelte dieses sich von einem frühen, wichtigen Ereignis zu einem späten, verzichtbaren Ereignis (Walker et al., 1997). Weitere Analysen der DNA-Fragmentierung verschiedener Zelltypen zeigten eine große Variabilität im Ausmaß der Degradierung (Walker et al., 1995). So konnte dargestellt werden, daß die meisten Lymphozyten und einige Leberzellen ihre DNA stark degradieren und DNA-Leitern produzieren, während andere Zellen, wie z.B. K562, vorrangig 50-300kbp Fragmente, und DU-145 nur noch größere Fragmente erzeugen. Beere et al.(1995) und Zamai et al. (1996) beschrieben die Zellinie Molt4 als Zellsystem, das zwar die typischen morphologischen Apoptosemuster zeigte, jedoch keine DNA-Leiter bildete. Kuribayashi et al. beschrieb 1996 die lymphozytären Zellinien HL-60, U937, Ml-1 und THP-1, als Zellinien, die internucleosomale DNA-Fragmentierung durchliefen und K562 und Molt4 als Zellinien, die diese Fragmentierung nicht erzeugten und verglich diese bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Nucleasen. Zieht man all diese Tatsachen in Betracht, wird verständlich, warum bei den Untersuchungen für die Zellinien K562 und Molt4 keine DNA-Leiter oligonucleosomaler Fragmente detektiert werden konnte. Für den Nachweis von großen DNA-Fragmente wäre die Puls-Feld-Gelelektrophorese die geeignete Methode gewesen. Das Fehlen oligonucleosomaler Fragmente bei der Zellinie Molt4 erklärt auch die Diskrepanz zwischen der Durchflußzytometrie und der morphologischen Apoptosebestimmung, da die Fragmentierung die Basis für die Detektion des hypodiploiden Sub-G1-Peaks darstellt.

4.3.4 Zusammenfassung der vergleichenden Analyse

Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich der einzelnen Methoden, konnte je nach eingesetztem Zellsystem eine komplette Übereinstimmung zwischen den einzelnen Untersuchungsmethoden festgestellt werden.

Die bei den Zellinien K562 und Molt4 aufgetretenen Diskrepanzen sind zumindest für das Fehlen einer DNA-Leiter im Agarose-Gel schon erklärt worden (siehe 4.3.3). Auch das Fehlen von anderen Apoptosemarkern wie z.B. Chromatinkondensierung, Fragmentierung, etc. im

Mikroskop oder dem Sub-G1-Peak im FCM wurde schon erwähnt. Für diese Zellinien wurde schon von verschiedenen Autoren ein atypischer Verlauf der Apoptose beschrieben. Sie zeigten entweder nur vereinzelt Charakteristiken der Apoptose oder hatten Merkmale von Apoptose und Nekrose (Cohen et al., 1992; Collins et al., 1992). In solchen Fällen ist es möglich, daß der apoptoseauslösende Faktor verschiedene metabolische Wege der apoptotischen Kaskade blockiert. Als Ergebnis einer solchen Blockade ist die Apoptose dann unvollständig. Es könnte aber auch sein, daß die verwendeten Zellen nicht alle Schritte durchführen können, da ihnen ein oder mehrere Faktoren fehlen. So sterben die Zellen von T-Zell-Leukämien wie Molt4 oder CEM nach Inkubation mit einer Reihe von Verbindungen in einer Art und Weise, die nicht an Apoptose erinnert (Akagi et al., 1993). Diesen Zellen fehlt z.B. eine Mg^{2+}-abhängige Endonuclease und erst ihre Fusion mit Zellen, die dieses Enzym besitzen, gibt ihnen die Möglichkeit, eine typische Apoptose zu durchlaufen (Matsubara et al., 1994). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß Molt4 Zellen nach Behandlung mit dem Kinase-Hemmstoff H7 oder 5-Deazacyclotetrahydrofolat apoptotisch sterben (Smith et al., 1992; Traganos et al., 1986).

Das Tatsache, daß mit der Durchflußzytometrie bei der Zellinie Molt4 keine oder nur in sehr geringem Ausmaß Apoptose detektiert wurde, beruht wohl darauf, daß mit der hier eingesetzten Methode nur relativ späte Apoptosestadien, bei denen eine eindeutige Fragmentierung des Chromatins vorhanden ist, detektiert werden können. Zellen, bei denen als apoptotische Veränderung z.B. nur eine Chromatinkondensierung ohne Fragmentierung auftritt, erfaßt man somit nicht. Die morphologische Auswertung konnte aber im Fall der Zellinie Molt4 diese nicht erfassten apoptotischen Zellen detektieren.

Faßt man die Befunde, daß K562 und Molt4 nur größere DNA-Fragmente aufweisen und Molt4 darüber hinaus in vielen Fällen keine apoptotischen Bodies bildet, zusammen, muß man zu dem Schluß kommen, daß sowohl die hier eingesetzte durchflußzytometrische Messung des Sub-G1-Peaks, als auch die Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion einer DNA-Leiter nicht die geeignete Apoptosedetektionsmethode für beide Zellinien darstellt. Zusätzlich ist die Zellinie K562 im allgemeinen durch die Expression des Bcr/Abl-Oncogens relativ resistent gegenüber Apoptoseinduktion und somit keine sehr geeignete Zellinie für solche Screening-Untersuchungen.

Die eingesetzten Methoden beruhen zum einen auf dem Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen und nachfolgender Fragmentierung des Chromatins, zum anderen auf der mikroskopischen Analyse morphologischer Veränderungen. Zur besseren Absicherung der

Ergebnisse sollte man mehr als eine Untersuchungsmethode einsetzen und darauf achten, daß man unterschiedliche Parameter untersucht. So postulierte Darzynkiewicz et al. (1997) den Einsatz der Messung der Membranintegrität zusammen mit der Messung der Permeabilität, des mitochondrialen Transmembranpotentials, der Denaturierungssensitivität, der Lichtstreuung oder der DNA-Fragmentierung zur sichereren Bestimmung von Apoptose. Diese Methoden waren aufgrund technischer Restriktionen mit dem eingesetzten PasIII-Durchflußzytometer aber nicht anwendbar. Aus diesem Grund wurden nur exemplarisch einige Untersuchungen an den Zellinien K562 und Molt4 mit AnnexinV an einem Coulter-Durchflußzytometer durchgeführt.

4.3.5 Untersuchungen mit AnnexinV

Lebende Zellen zeigen eine asymmetrische Verteilung der verschiedenen Phospholipide zwischen der Innen- und der Außenseite der Plasmamembran (Bretscher et al., 1972). Dies gilt sowohl für Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, die primär auf der Außenseite, als auch für Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (PS), die auf der Innenseite lokalisiert sind. Diese Asymmetrie wurde zuerst für Erythrozyten und Blutplättchen (Op de Kamp, 1979; Schroit et al., 1991), später dann auch für kernhaltige Zellen nachgewiesen (Deveaux, 1993; Zachowski, 1993). Zusätzlich zu diesem Potential, PS durch Flippaseaktivität asymmetrisch auf der Innenseite zu halten, können die Zellen PS auch auf die Außenseite translozieren (Bevers et al., 1982 und 1983; Connor et al., 1994). Fadok et al. (1992,1993) konnten zeigen, daß Lymphozyten während der Apoptose PS auf die Membranaußenseite bringrn. Dieser Vorgang spielt eine große Rolle bei der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen. Die PS-Exposition auf der Außenseite findet schon sehr früh während der Apoptose statt und läßt sich bis zum Schluß, wenn die Zelle in apoptotische Bodies zerfällt, nachweisen (van Engeland et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Antikoagulanz AnnexinV in Anwesenheit von Calcium präferentiell an PS bindet (Tait et al., 1989; Andree et al., 1990). Die Kopplung von AnnexinV mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und die gleichzeitige Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erlaubt die mikroskopische und durchflußzytometrische Detektion früher apoptotischer Zellen sowie die Diskriminierung lebender (PI-/FITC-), früh apoptotischer (PI-/FITC+) und nekrotischer (PI+/FITC+ und PI+/FITC-) Zellen. Spät apoptotische Zellen überlappen mit nekrotischen (PI+/FITC+) Zellen (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995; Darzynkiewicz et al., 1997; van Engeland et al., 1998).

Der Einsatz der AnnexinV-Färbung brachte in meinen Untersuchungen für die Zellinie K562 keine zusätzliche Information. Es zeigten sich insgesamt nur sehr wenige AnnexinV positive Zellen, wobei der Großteil auch positiv für PI war und daher zu den spät apoptotischen bis nekrotischen Zellen zählte, die nicht eindeutig getrennt werden können. Ein quantitativer Vergleich ergab in der Summe ein der mikroskopischen Auswertung vergleichbaren Wert und lieferte keine weitere Erklärung für den nach Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on deutlich auftretenden Sub-G1-Peak in der Durchflußzytometrie. Koopman et al. (1994) beschrieb eine Korrelation zwischen AnnexinV-Bindung und apoptotischer Morphologie und DNA-Fragmentierung. Zellen mit euchromatischem Kern oder randständigem Chromatin waren nur bei einer der untersuchten Zellen mit AnnexinV markiert. Dies korrelierte mit der Tatsache, daß keine Zellen mit veränderter Chromatinstruktur im Mikroskop zu sehen waren. Die Untersuchungen der Zellinie Molt4 zeigten deutliche spät apoptotische bis nekrotische Zellpopulationen, früh apoptotische Zellen waren auch hier kaum detektierbar. Der Vergleich der Summe aus früh und spät apoptotischen Zellen mit der DNA-/Proteinmessung und der Mikroskopie, so entsprach dieser Wert der morphologischen Auswertung. Eine ausschließliche Betrachtung der früh apoptotischen Zellen zeigt Übereinstimmung mit der durchflußzytometrischen Analyse für die Verbindungen 2-Cyclohexen-1-on, trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal. Für den trans-2-Octenal-Versuch, der nicht mikroskopisch ausgewertet wurde, brachte diese Untersuchung dagegen eindeutig zusätzliche Information, da hier spät apoptotische bis nekrotische Zellen detektiert wurden. Die Diskrepanzen zwischen der Detektion des Sub-G1-Peaks und der morphologischen Analyse konnten also in diesem Fall auch nicht mit AnnexinV verifiziert werden. Das Fehlen von früh apoptotischen Zellen in diesem Apoptose-Assay steht etwas im Gegensatz zu der Tatsache, daß PS Exposition einen universellen Mechanismus während der Apoptose darstellt und in den meisten, wenn nicht allen Zellentypen, nach Inkubation mit fast allen Apoptoseinduktoren (Martin et al., 1995) auftritt. Ein direkter Vergleich der Detektion von Strangbrüchen mit dem AnnexinV-Assay zeigte, daß die PS-Exposition vor der Detektion von Strangbrüchen zu beobachten ist (O'Brian et al., 1997). Der Verlust der Membranasymmetrie ist ein sehr frühes Ereignis, das nach der Aktivierung der Caspasen-Kaskade, aber wahrscheinlich vor der Kernkondensierung und dem Zusammenbruch des intrazellulären Zytoskeletts und der Kernmatrix, auftritt (van Engeland et al.,1998). Unter diesen Gesichtspunkten ist es erstaunlich, daß trotz des Auftretens von größeren Populationen an Zellen mit kondensierten Kernen bei der Zellinie Molt4 keine frühen Apoptosestadien mit

AnnexinV detektiert werden können. Zur Absicherung der Ergebnisse bei den Zellinien K562 und Molt4 erwies sich diese Methode als ungeeignet.

4.3.6 Vergleich der DNA-/Proteinmessung mit anderen durchflußzytometrischen Methoden zur Apoptosedetektion

Als derzeit beste Methode zur Detektion von Apoptose gilt das TUNEL- oder Nick Translation-Verfahren (Darzynkiewicz et al., 1997). Bei dieser Methode werden die vielen, durch Fragmentierung entstandenen, freien 3'OH-Enden über die Anhängung fluoreszenzmarkierter Nukleotide detektiert. Ein einfaches One-Step-Verfahren verwendet direkt markierte Sonden (Li et al., 1995). Nekrotische Zellen oder Zellen mit primären Brüchen (induziert durch γ-Strahlung, DNA-schädigende Substanzen wie Bleomycin oder MMC) zeigten sehr viel weniger Strangbrüche als apoptotische Zellen (Hotz et al., 1994). Die zusätzliche Detektion des DNA-Gehaltes erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Zellzykluspositionen apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen (Gorczyca et al., 1993).
Die untenstehenden Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen einen direkten Vergleich dieser beiden, auf Fragmentierung der DNA basierenden Methoden bei der Detektion zellzyklusspezifischer Apoptose. Man kann deutlich erkennen, daß mit der DNA/Proteinfärbung die Zellzyklusspezifität der Apoptoseinduktion im gleichen Maße detektierbar ist wie mit der Fluoreszenzmarkierung der Strangbrüche. Dies ist aber nur der Fall, wenn die eingesetzte Zellinie und der Induktor DNA in oligonucleosomale Fragmente zerlegt. Hier liegt dann auch der Vorteil der Detektion von Strangbrüchen. Nimmt man z.B. die Zellinie Molt4, welche ihre DNA während der Apoptose nur in 50kbp-Fragmente und nicht in 180bp-Fragmente degradiert (Chapman et al., 1995), so zeigt diese trotzdem eine positive Markierung der Strangbrüche, aber keinen Sub-G1-Peak. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Abtrennung apoptotischer Zellen vom Zellzyklus. Dies wurde durch den Einsatz von Phosphatpuffer erreicht und erlaubte somit auch eine leichtere Quantifizierung (Abb.4.4).

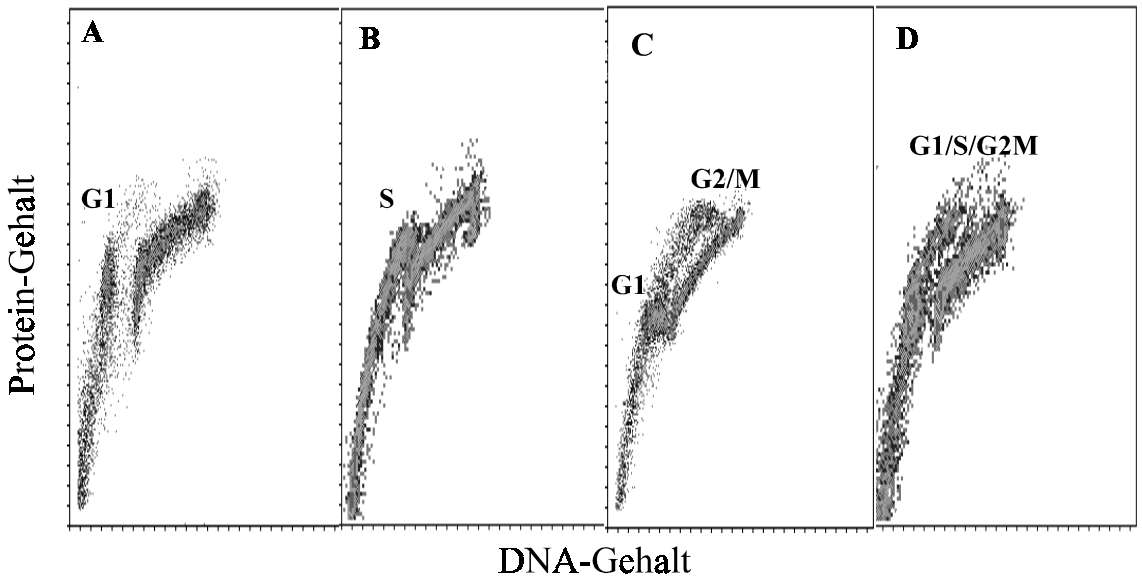


Abb.4.3: Vergleichende Darstellung der Detektion zellzyklusspezifischer Apoptose durch DNA-/Protein-Messung. **A.** Zellinie U937 inkubiert mit 125µM Hexadienal (1h plus 4h-Postinkubation) - G1-Phase-spezifisch, **B.** Zellinie U937 inkubiert mit 50µM Cyclohexenon (24h) - S-Phase-spezifisch, **C.** Zellinie Molt4 inkubiert mit 125µM Hexenal (1h plus 24h-Postinkubation) - G1- und G2/M-Phasen-spezifisch, **D.** Zellinie U937 inkubiert mit 125µM Hexenal (1h plus 4h-Postinkubation) - keine Spezifität.

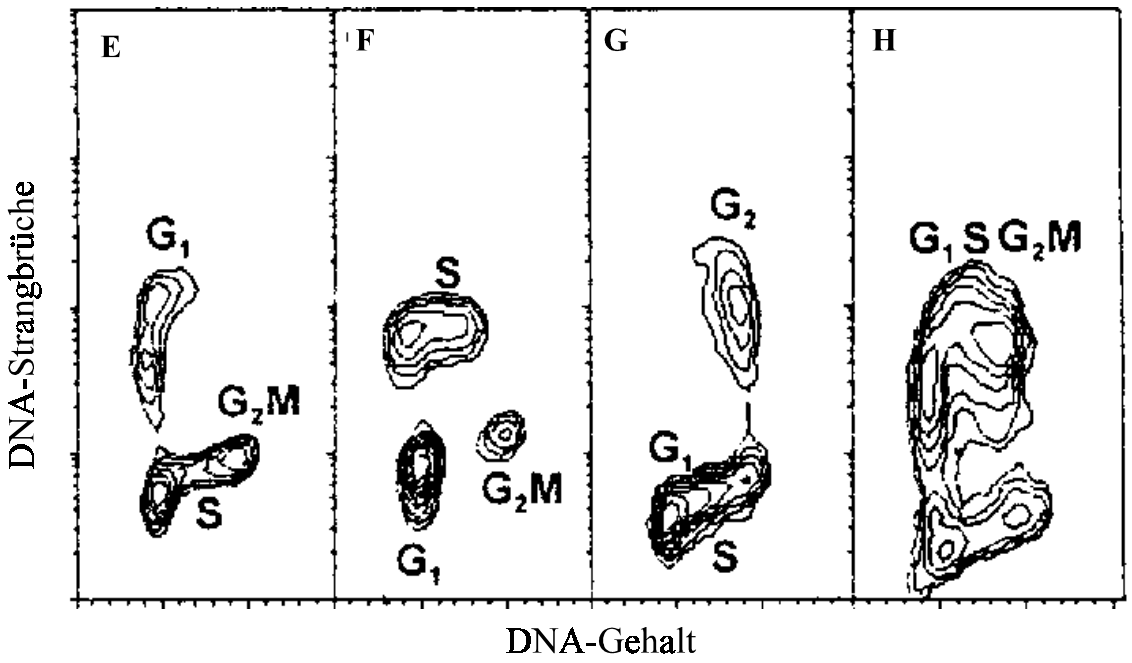


Abb.4.4: Vergleichende Darstellung der Detektion zellzyklusspezifischer Apoptose durch Fluoreszenz-markierung von DNA-Strangbrüchen (aus Halicka et al., 1997) an der Zellinie HL-60. **E.** UV-Strahlung - G1-Phase-spezifisch, **F.** Camptothecin - S-Phase-spezifisch, **G.** γ-Strahlung - G2/M-Phasen-spezifisch, **H.** Fostriecin - keine Spezifität.

Die Detektion apoptotischer Zellen über eine DNA-Proteinmessung ist somit eine einfache, sehr schnelle und kostengünstige Methode und liefert unter gewissen Voraussetzungen der

Strangbruchdetektion vergleichbare Ergebnisse. Es ist die Methode der Wahl, um ein Routinescreening für Apoptose in Kultursystemen durchzuführen. Ist Apoptose nicht mit internucleosomaler Fragmentierung verbunden, sollten jedoch andere Methoden eingesetzt werden. Geeignet ist neben der Detektion von Strangbrüchen z.B. auch die Detektion der erhöhten Denaturierungssensitivität, die noch vor dem Auftreten von Strangbrüchen erkennbar ist (Hotz et al., 1994). Leider sind nekrotische Zellen auch sehr sensitiv gegenüber einer solchen Denaturierung.

4.4 Diskussion der Untersuchungen mit α,β-ungesättigten Aldehyden und Ketonen

4.4.1 Konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose

In dieser Arbeit wurde die Induktion von Apoptose durch 3 bzw. 4 α,β-ungesättigte Aldehyde sowie ein zyklisches Keton untersucht. Zur Identifizierung der Apoptose wurde vorrangig die durchflußzytometrische Messung des DNA- und Proteingehaltes eingesetzt. Da der Mechanismus der Apoptoseinduktion je nach Zellsystem und Induktor variiert (Hara et al., 1996), wurden die Wirkungen der Substanzen an vier verschiedenen Zellinien (U937, HL-60, K562 und Molt4) untersucht.

Die in der Literatur beschriebene Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese durch die zu untersuchende Substanzklasse (White et al., 1984) sowie die Hemmung der Zellteilung und des Zellwachstums und die vielfach beobachtete Zytotoxizität, lenkten das Interesse auf das apoptoseinduzierende Potential dieser Verbindungen. Martin et al. beschrieben 1990 die Induktion von Apoptose durch die Hemmung von RNA- oder Proteinsynthese. Die durchflußzytometrischen Messungen an isolierten Lymhozyten nach Zusatz von Crotonaldehyd, trans-2-Hexenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal von Dittberner 1993 waren in diesem Zusammenhang ebenfalls von Interesse. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen eine deutliche Verbreiterung des G0/G1-Peaks, eine Erhöhung des Debrisbereichs sowie teilweise zweigipflige G0/G1-Peaks. Ein weiterer Hinweis auf das apoptoseinduzierende Potential von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen ergab sich aus der drastischen GSH-Depletion durch diese Verbindungen. Orrenius et al. beschrieben 1983, daß die Reduktion des GSH-Spiegels zu einem Anstieg der Disulfidbildung in Zellen führte. Davon betroffen war auch die mitochondriale Ca^{2+}-Translokase, welche das Konzentrationsgefälle zwischen Mitochondrien und Zytosol aufrecht erhält. Die Hemmung dieses Enzyms äußerte sich im Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels, welcher Apoptose in Thymozyten (McConkey et al., 1988)

und Hepatozyten (Jones et al., 1989) induzierte. Mühlematter und Cerutti beschrieben außerdem 1988, daß ein erhöhter Calciumspiegel zur Aktivierung von Endonucleasen führte, welche Einzelstrangbrüche induzieren. Die Induktion von Einzelstrangbrüchen in verschiedenen Zellsystemen durch α,β-ungesättigte Aldehyde wurde beschrieben (Grafström et al., 1988; Eder et al., 1993; Eisenbrand et al., 1995). Untersuchungen an C3H/10T1/2 Zellen, die ihre DNA während der Apoptose nicht zu Leitern degradieren, weisen auf Modifikationen in den Linker-Regionen des Chromatins hin, bevor es zu Doppelstrangbrüchen kommt (Tomei et al., 1993). Es soll sich hier um eine Akkumulation von Einzelstrangbrüchen in diesen Regionen handeln, die vor dem Erscheinen von Doppelstrangbrüchen auftritt (Peitsch et al., 1993; Tomei et al., 1993). Chen et al. beschrieb 1997 bei neuronaler Apoptose ebenfalls das Auftreten von Einzelstrangbrüchen (ssb) vor Doppelstrangbrüchen (dsb) und folgerte, daß durch die Akkumulation von nicht reparierten ssb's Apoptose induziert werden kann. Neueste Studien an leukämischen Zellinien (Yamadori et al., 1998; McKenna et al., 1998) und Neuronen (Maeda et al., 1998) zeigen Einzelstrangbrüche in frühen Apoptosestadien, vor dem Auftreten der typischen oligonukleosomalen Fragmentierung der DNA und späten morphologischen Veränderungen. Walker et al. (1997) konnte eine Ansammlung von ssb's in HMW-duplex-DNA-Fragmenten > 50kb finden. Ebenfalls eine Rolle bei der Induktion von Apoptose durch α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen könnte die Hemmung der Tubulinpolymerisation spielen. Martin et al. konnten schon 1990 zeigen, daß terminal differenzierte HL-60-Zellen, die apoptotisch sterben, ein zerstörtes Mikrotubulusnetzwerk aufweisen. Apoptotische Zellen zeigen sehr früh den Verlust von Membranstrukturen wie z.B. Pseudopodien und Mikrovilli (Kerr et al., 1994; Majno et al., 1995; Wyllie et al., 1992a und 1992b). Des weiteren kommt es zum Zusammenbruch der Kernmatrix (Lamindegradierung) und des Zytoskeletts (Tinnemans et al., 1995; van Engeland et al., 1997). Auch die Reorganisation des zellulären Tubulins zu sichtbaren Tubulinstrukturen (Pittman et al., 1994; Ireland et al., 1995; van Engeland et al., 1997) und der Verlust von Mikrotubuli (Darzynkiewicz et al., 1997) wurde beschrieben. Von der Induktion von Apoptose durch Spindelgifte wie Colchizin und Nocodazol in Mausthymozyten und CGC-Zellen wird ebenfalls berichtet (Bumbasirevic et al., 1995; Bonfoco et al., 1995). Ankarcrona et al. zeigten 1996, daß bei Glutamat-induzierter Apoptose in Neuronen die Lamindegradierung und Auflösung des Mikrotubulinetzwerkes (Degradierung von β-Tubulin) der Chromatinfragmentierung vorangeht. Auch die Hemmung der Tubulinpolymerisation und die nachfolgende Apoptoseinduktion in einer T-Zell-Leukämie durch 3-Bromoacetylamino-benzoylharnstoff wurde beschrieben (Jiang et al., 1998). Auch der

Weg der terminalen Differenzierung könnte eine Rolle bei der Induktion von Apoptose durch diese Substanzklasse spielen. Eder et al. beschrieb 1993 die Differenzierung von humanen bronchialen Epithelzellen durch α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen.

Zur Erstellung einer Konzentrationskinetik wurden die Zellinien für 1h mit Konzentrationen der Aldehyde zwischen 0µM und 150µM inkubiert. Danach erfolgte eine 4h-Postinkubation. Da durch das zyklische Keton in dieser Inkubationsspanne keine Apoptose induziert werden konnte, wurde die Inkubationsdauer nach verschiedenen Vorversuchen auf 24h erhöht. Hier erfolgte dann keine Postinkubation mehr.

4.4.1.1 Durchflußzytometrische Analyse

Trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal bewirkten in den getesteten Konzentrationsbereichen nur bei den Zellinien U937 und HL-60 eine Apoptoseinduktion. Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten keine Induktion von Apoptose. Dabei trat nach 2-trans-Hexenal-Behandlung eine sichtbare Erhöhung des Sub-G1-Bereiches ab 75µM auf, welche ab 100µM signifikant wurde. Für 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al konnte ein Anstieg ab 50µM beobachtet werden, für trans-2-Octenal trat dieser schon ab 25µM zutage. Für 2-trans,6-cis-Nonadienal wurde bei der Zellinie U937 schon ab 10µM ein Anstieg detektiert. Allerdings traten teilweise hohe Standardabweichungen auf, die wahrscheinlich auf Sensitivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Zellen verschiedener „Passagen“ zurückzuführen sind. Die eingesetzten Konzentrationsbereiche unterschieden sich aufgrund der mit der Kohlenstoffkette zunehmenden Zytotoxizität der Verbindungen. So konnte für trans-2-Hexenal bis 150µM, für 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al bis 125µM, für trans-2-Octenal nur noch bis 100µM und für 2-trans,6-cis-Nonadienal sogar nur bis 50µM eingesetzt werden. Für trans-2-Hexenal zeigte die Zellinie U937 die stärkere Apoptoseinduktion, bei 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al waren dagegen die HL-60 Zellen sensibler. Für trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal war die Stärke der Reaktion bei beiden Zellinien ähnlich.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich die dosisabhängige Induktion von Apoptose durch α,β-ungesättigte Aldehyde bei zwei der vier getesteten Zellinien. Solche divergierenden Effekte zwischen verschiedenen Zellsystemen decken sich mit Ergebnissen von DelBino et al. (1990), der unterschiedliche Effekte zwischen den Zellinien Molt4 und HL-60 feststellen konnte. Ebenfalls für die Zellinie Molt4 konnte gezeigt werden, daß sie nicht gleich nach der Inkubation Apoptose durchläuft (DelBino et al., 1990), wahrscheinlich, weil die Aktivität der

apoptoseassoziierten Endonuclease erst mit Verzögerung induziert wird (Akagi et al., 1993; Matsubara et al., 1994). In Untersuchungen zur Zellzyklusspezifität von Apoptose konnte gezeigt werden, daß die Schwellenwertkonzentration zum Auslösen von Apoptose in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist (Halicka et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, daß HL-60 kein wt p53 exprimieren, durchlaufen sie schon bei relativ niedrigen Konzentrationen Apoptose. U937-Zellen zeigten unter denselben Bedingungen ebenfalls eine hohe Neigung zur Apoptose (Hara et al., 1996; Halicka et al., 1997).
Die Zellinien Molt4 und K562 fragmentieren außerdem ihre DNA in den allermeisten Fällen nicht in oligonucleosomale Fragmente (Chapman et al., 1995; Walker et al., 1995). Die Zelle beinhaltet also immer noch hochmolekulare DNA als Hauptfraktion, welche nicht extrahiert werden kann. Somit ist es auch nicht möglich, apoptotische Zellen als Sub-G1-Peak zu messen, da lebende und apoptotische Zellen überlappen (Cotter et al., 1990; Zamai et al., 1996). Diese Überlappung könnte sich in einer Erhöhung des CV-Wertes niederschlagen. Dies konnte jedoch bei meinen Untersuchungen zur Konzentrationskinetik für K562 und Molt4 nicht nachgewiesen werden.

Wie schon erwähnt, mußte die Inkubationsdauer für das zyklische Keton 2-Cyclohexen-1-on erhöht werden. Dadurch konnte jedoch zusätzlich zu den Zellinien U937 und H-60 auch bei der Zellinie K562 Apoptose induziert werden. Es trat wiederum ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoseinduktion auf. Die Stärke der Reaktion war vergleichbar mit der Reaktion auf 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al. Trans-2-Hexenal, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal induzierten ungefähr doppelt soviel Apoptose. Nach einem Apoptosemaximum bei 75µM für die Zellinien U937 und HL-60 sowie bei 50µM bei K562 folgte ein leichter, bei K562 ein fast kompletter Abfall. Die Zellinie Molt4 zeigte keine Apoptose. Auch diese Ergebnisse korrelierten gut mit der Tatsache, daß 2-Cyclohexen-1-on zwar eine potente zytotoxische Verbindung (IC_{50}=18µM) darstellt und konzentrationsabhängig DNA-Schäden im Comet-Assay induzierte, jedoch sehr viel geringer wirkte als 2-trans-Hexenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal (Janzowski et al., 1997). Auch zeigte 2-Cyclohexen-1-on eine geringere Reaktivität gegenüber SH-Gruppen als Aldehyde (Schauenstein et al., 1977).

Diese dosisabhängige Induktion von Apoptose durch α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone korrelierte gut mit Untersuchungen von Li et al. (1997), der das durch Acrolein induzierte Auftreten von Apoptose in menschlichen Makrophagen der Lunge beschrieb. Auch bewirkte Acrolein einen dosisabhängigen Anstieg der DNA-schädigenden Wirkung, wobei ab 20µM

Einzelstrangbrüche auftraten (Grafstrom et al., 1988; Schumacher et al., 1990). Diese Einzelstrangbrüche sind das Ergebnis zelleigener Ausschneidereparatur. Das Ausmaß der durch trans-2-Hexenal erzeugten DNA-Schädigung in Namalva-Zellen ging mit zunehmender Inkubationsdauer in substanzfreiem Medium zurück. Nach 4h waren praktisch alle Schäden repariert. Bei dieser Reparatur können natürlich auch Fehler auftreten, welche dann im weiteren Zellzyklus dazu führen, daß die Zelle apoptotisch stirbt. In mit Camptothecin behandelten HL-60 Zellen konnten ebenfalls Einzelstrangbrüche auf der Ebene der Kernmatrix detektiert werden, die nach der Entfernung der Substanz aber schnell wieder repariert wurden. Die Fragmentierung erschien erst 4h nach der Reparatur (Bortner et al., 1995). Die Autoren folgerten daraus, daß diese Einzelstrangbrüche keine direkte Rolle bei der Apoptose spielen. Sie könnten aber eventuell als Signal zum Auslösen des apoptotischen Zelltodes dienen.

Untersuchungen mit Hydroxynonenal ergaben ebenfalls eine dosisabhängige Apoptoseinduktion in Makrophagen der Lunge von Mäusen, wobei eine unterschiedliche Sensitivität verschiedener Mausstämme bezüglich der Apoptoseinduktion detektiert werden konnte (Li et al., 1996). Apoptoseinduktion durch Hydroxynonenal wurde weiterhin in Lungengewebe von Spraque Dawley Ratten (Compton et al., 1998), der Zellinie PC12 sowie in Rattenneuronen (Kruman et al., 1997) und der Zellinie Rat1A (Yildiz et al., 1997) nachgewiesen.

4.4.1.2 Mikroskopische Analyse

Zum direkten Vergleich wurde die im Durchflußzytometer analysierte Zellsuspension auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die eingesetzte Färbemethode entsprach der DNA-/Proteinfärbung für die Durchflußzytometrie. Für trans-2-Octenal, das hauptsächlich zur Analyse des Einflusses der Kettenlänge auf die Apoptoseinduktion eingesetzt wurde, wurde keine mikroskopische Analyse durchgeführt.

Für trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al zeigte sich eine sehr gute quantitative Korrelation zwischen der morphologischen und der durchflußzytometrischen Apoptose-erfassung. Bei trans-2-Hexenal wurden allerdings nur sehr wenig frühapoptotische Stadien (Chromatinkondensation) detektiert werden. Der größte Teil der apoptotischen Population setzte sich aus fragmentierten Zellen und apoptotischen Bodies zusammen. Bei 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al traten mehr Zellen mit kondensiertem Kern auf, der Hauptanteil lag aber auch bei den fragmentierten Zellen und apoptotischen Bodies. Die Zusammensetzung der apoptotischen Zellpopulation bei 2-trans,6-cis-Nonadienal war für die Zellinien U937 und

HL-60 mit den Ergebnissen bei trans-2-Hexenal vergleichbar. Bei HL-60 fanden sich aber nur sehr wenig apoptotische Bodies. Bei der Zellinie Molt4 trat in diesem Fall im Gegensatz zur Durchflußzytometrie eine deutliche apoptotische Population, bestehend aus Zellen mit stark kondensiertem Kern, auf.

Dies war auch bei der Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on der Fall. Diese Unterschiede zur FCM lassen sich möglicherweise mit der bereits erwähnten „Nicht-Extrahierbarkeit“ hochmolekularer DNA, bei nicht vorhandener oder noch nicht sehr stark fortgeschrittener DNA-Degradierung erklären (Cotter et al., 1990). Verschiedene Zelltypen zeigen zudem eine unterschiedlich starke Neigung apoptotische Bodies zu formen (Chapman et al., 1995). Die Zellinie HL-60 bildet sehr schnell apoptotische Bodies, die Zellinie Molt4 dagegen so gut wie gar keine (Catchpoole et al., 1993). Unterschiede konnte man auch bei der Analyse der apoptotischen Population der Zellinie K562 mit 2-Cyclohexen-1-on feststellen. Der deutliche apoptotische Sub-G1-Peak bei 50µM ließ sich mikroskopisch nicht bestätigen. Für die Zellinien U937 und HL-60 konnten bei 2-Cyclohexen-1-on ebenfalls Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotische Bodies bzw. nur fragmentierte Zellen gefunden werden.

Bei der oben beschriebenen Auswertung der Zellinie K562 war keinerlei Chromatinkondensierung, Fragmentierung oder das Auftreten apoptotischer Bodies zu sehen. Auffällig war jedoch das Vorhandensein einer größeren Anzahl an Zellen, die nur etwa ein Drittel der Größe normaler Zellen aufwiesen, ohne jedoch in ihrer Struktur verändert zu sein (Ergebnisse nicht dargestellt). Hierbei könnte es sich um apoptotische Zellen mit atypischen Merkmalen handeln.

4.4.2 Zeitabhängige Induktion von Apoptose

Zur Erstellung einer Zeitkinetik wurde bei trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal nach der 1h-Inkubation eine Postinkubation in frischem Medium bis 24h (bis 72h bei Molt4) durchgeführt. Bis zur 4h-Postinkubation wurde stündlich abgeerntet. 2-Cyclohexen-1-on wurde nach 4h/8h/12h und 24h abgeerntet, da es innerhalb der bei den Aldehyden eingesetzten Inkubationsdauer keine Apoptose induzierte.

4.4.2.1 Durchflußzytometrische Analyse

Trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexa-dien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal bewirkten auch zeitabhängig nur bei den Zellinien U937 und HL-60 eine deutliche Apoptoseinduktion. Bei trans-2-Hexenal trat ab einer 2h-Postinkubation eine

sichtbare Erhöhung des Sub-G1-Bereiches auf, welche ihr Maximum bei der 4h-Postinkubation zeigte und danach abfiel. Bei 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al konnte ein Anstieg bei der Zellinie HL-60 schon ab einer 2h-Postinkubation, bei der Zellinie U937 erst ab einer 3h-Postinkubation beobachtet werden. Das Maximum fand sich bei der 24h-Postinkubation. Die Untersuchungen mit trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal zeigten diesen Anstieg schon 1h nach der Inkubation. Auch bei der Zeitkinetik traten Unterschiede in der Stärke der Apoptoseinduktion zwischen den verschiedenen Zellinien zutage, welche denen der Konzentrationskinetik entsprachen. Für die Zellinie K562 ließ sich für die Verbindungen 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal auch mit längerer Inkubationsdauer keine Apoptose detektieren. Bei der Inkubation mit trans-2-Hexenal und trans-2-Octenal ließ sich nach der 24h-Postinkubation ein leichter, nicht signifikanter bzw. signifikanter Anstieg des Sub-G1-Bereiches detektieren. Dieser blieb auch nach Ausschluß des Debrisbereiches erhalten. Es handelte sich also tatsächlich um eine kleine apoptotische Population. Für die Zellinie Molt4 konnte für die Verbindungen trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal nach der 24h-Postinkubation ein deutlicher Anstieg an Apoptose beobachtet werden. Die großen Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche verhinderten jedoch, daß der Unterschied signifikant wurde. Anders war dies bei trans-2-Hexenal. Hier konnte man einen hoch signifikanten Anstieg der apoptotischen Population 48h nach der Inkubation beobachten. Auch 72h nach der Inkubation zeigte der Sub-G1-Bereich noch eine signifikante Erhöhung. Die Betrachtung des Apoptose-Bereichs deutete aber auf einen starken Rückgang der apoptotischen Zellpopulation hin. Der Hauptteil des Sub-G1-Bereiches bestand somit aus Debris, zerfallenen Zellen oder apoptotischen Bodies. Bei der Inkubation mit 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al zeigte sich ein schwach signifikanter Anstieg sogar schon direkt nach der Inkubation. Deutlich sichtbar wurde dieser jedoch erst 24h nach der Inkubation und blieb bis 72h nach der Inkubation signifikant. Die Analyse des Apoptose-Bereiches zeigte dabei nur wenig Debris.

Diese Ergebnisse zeigten eine deutliche zeitabhängige Induktion von Apoptose durch α,β-ungesättigte Aldehyde bei den Zellinien U937 und HL-60 sowie Hinweise auf Apoptoseinduktion bei den Zellinien K562 und Molt4 nach längeren Inkubationszeiten. Diese Unterschiede waren aber nur teilweise signifikant. Es könnte sich hierbei um eine sogenannte *verzögerte Apoptose* handeln. Während man *frühe Apoptose* im allgemeinen zwischen 3-8h nach der Induktion feststellen kann, kann Apoptose auch nach einer erheblichen Pause (8-24h nach Induktion) auftreten. Wenn Zellen z.B. mit niedrigen Konzentrationen einer Substanz über längere Zeit, oder einer hohen Konzentration für kurze Zeit mit nachfolgender

Kultivierung in frischem Medium, inkubiert werden, kommt es zu Arretierungen im Zellzyklus (Halicka et al., 1997). Danach setzen diese Zellen entweder ihren Zellzyklus fort und teilen sich oder sie können mit Verzögerung sterben. Der Zelltod ist dann nicht nur das Ergebnis der primären Schäden durch die Substanz, sondern kann auch durch die Ansammlung von sekundären Veränderungen hervorgerufen werden. Ein Beispiel für solche sekundären Veränderungen sind Wachstumsstörungen. Während der Hemmung der DNA-Replikation, laufen die RNA- und Proteinsynthese normal weiter, aber viele Gene, die durch die Substanzeinwirkung geschädigt wurden, werden transkriptionsinaktiv. Die Zellen sterben, wenn diese Genprodukte für ihr Überleben essentiell sind. Verzögerte Apoptose wurde auch bei verschiedenen Zelltypen gefunden, besonders bei Zellen epithelialen Ursprungs nach Inkubation mit zytotoxischen Substanzkonzentrationen (Halicka et al., 1997). Dagegen belegen die Ergebnisse der Zellinien U937 und HL-60, daß sie zu den sogenannten, für Apoptose „prädisponierte“ Zellen, gehören. Zu dieser Gruppe zählen viele haematopoetische Zellinien (Whyllie et al., 1992; Gong et al., 1993; Halicka et al., 1997). Bei diesen beiden Zellinien konnte man die apoptotische Population je nach induzierendem Aldehyd bereits1h-3h nach der Inkubation detektieren. Es handelte sich somit um *frühe Apoptose*.

Die Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on zeigte für die Zellinien U937 und K562 einen signifikanten Anstieg des Sub-G1-Bereiches nach 8h, der später noch zunahm. Für die Zellinie HL-60 konnte Apoptose nach 12h detektiert werden, signifikant war der Anstieg aber erst nach 24h. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich weniger um eine mit Verzögerung auftretende Apoptose, als vielmehr um eine in der S-Phase versteckte, zu einem früherem Zeitpunkt nicht detektierbare Apoptose. Dieser Gesichtspunkt wird unter 4.4.3 noch näher erläutert.

4.4.2.2 Mikroskopische Analyse

Auch für die Zeitkinetik wurde zum direkten Vergleich eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Auch hier wurde trans-2-Octenal von der Analyse ausgeschlossen. Es fand sich für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, 2-trans,6-cis-Nonadienal und 2-Cyclohexen-1-on eine sehr gute quantitative Korrelation zwischen der mikroskopischen und der durchflußzytometrischen Analyse.

Bei trans-2-Hexenal traten für die Zellinien U937 und HL-60 hauptsächlich Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotische Bodies auf. Bei der 24h-Postinkubation der Zellinie U937 stieg außerdem der Debrisanteil sehr deutlich. was für das Auftreten von Nekrose und Zerfall spricht. Für die Zellinie K562 war keine Vermehrung der einzelnen untersuchten

Apoptosestadien zu vermerken, in der Summe ergab sich aber ein schwach signifikanter Anstieg 24h nach der Inkubation. Dies korrelierte mit dem leichten, nicht signifikanten Anstieg in der Durchflußzytometrie. In der Zellinie Molt4 traten hauptsächlich Zellen mit kondensiertem und fragmentiertem Kern auf, wobei erstere überwogen. Die Auswertung zeigte ein Maximum an kondensierten Zellen 24h nach der Inkubation. Danach erfolgte ein Rückgang dieser Population. Gleichzeitig konnte man ab der 24h-Postinkubation eine leichte Zunahme an Zellen mit fragmentiertem Kern und eine etwas stärkere Zunahme des Debrisanteils beobachten. Der durchflußzytometrisch detektierte Rückgang des Apoptose-Bereiches könnte in dieser Verschiebung zu sehen sein.

Bei der Inkubation mit 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al traten für die Zellinien U937 und HL-60 alle 3 untersuchten Apoptosestadien auf, bei den K562 Zellen waren keine apoptotischen Zellen zu detektieren. Für die Zellinie Molt4 ergab die mikroskopische Auswertung ein Maximum 24h nach der Inkubation mit gleichgroßen Anteilen an Zellen mit kondensiertem und fragmentiertem Kern. Danach erfolgte ein Rückgang mit gleichzeitigem Anstieg des Debris. Dieses Maximum lag schwach signifikant höher als in der Durchflußzytometrie. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß ein Teil der Zellen mit kondensiertem Kern mit lebenden Zellen überlappen und deshalb durchflußzytometrisch nicht abtrennbar sind.

Die Untersuchungen mit 2-trans,6-cis-Nonadienal zeigten für die Zellinien U937 und HL-60 fast ausschließlich Zellen mit fragmentiertem Kern, für die Zellinie K562 waren keine apoptotischen Zellen zu detektieren. Für die Zellinie Molt4 ergab sich ein sehr deutlicher Anstieg der Zellen mit kondensiertem Kern 24h nach der Inkubation. Dieses Ergebnis zeigte einen schwach signifikanten Unterschied zur Durchflußzytometrie, bei der nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg zu erkennen war. Auch hier schien ein großer Teil der kondensierten Zellen durchflußzytometrisch aufgrund zu geringer DNA-Gehaltsunterschiede, nicht zu detektieren sein. Dafür könnte die Verdopplung des CV-Wertes (von durchschnittlich 1,9 auf 3,6) gegenüber der Kontrolle ein Indiz sein.

Bei der Inkubation mit 2-Cyclohexen-1-on zeigte sich für die Zellinie U937 schon ab 4h ein nicht signifikanter Anstieg der Zellen mit fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies. Zellen mit stark kondensiertem Kern stiegen ab 8h signifikant an. Für die Zellinie HL-60 ergab sich nach 4h ein schwach signifikanter Anstieg an fragmentierten Zellen, der nach 24h hoch signifikant wurde. Das Fehlen von apoptotischen Zellen bei der Zellinie Molt4 entsprach dem durchflußzytometrischen Ergebnis. Der bei K562 detektierte Sub-G1-Peak konnte mikroskopisch nicht bestätigt werden. Da die mikroskopische Bestimmung von Apoptose noch immer als die sicherste Methode angesehen wird, stellt sich hier die Frage ob wirklich

Apoptose detektiert wurde. Das positive Ergebnis der Durchflußzytometrie zusammen mit der Detektion einer DNA-Leiter lassen wohl auf eine Apoptose mit atypischen Merkmalen schließen (siehe auch 4.4.1.2).

Diese Ergebnisse verdeutlichten, daß ein Großteil der induzierten Apoptose durchflußzytometrisch detektiert werden konnte, die mikroskopische Analyse aber immer noch zusätzliche Informationen lieferte. Die morphologische Analyse konnte durchflußzytometrisch nicht detektierbare Apoptose sichtbar machen und Informationen über die Verteilung verschiedener Apoptosestadien liefern.

4.4.3 Zellzyklusspezifität α,β-ungesättigter Aldehyde und Ketone

Die 2-Parameter-Analyse des DNA- und Proteingehaltes erlaubte die Identifizierung apoptotischer Zellen in Bezug auf die betroffenen Zellzyklusphasen. Die Bestimmung betroffener Zellzyklusphasen spielt hauptsächlich bei der Charakterisierung von Antitumormedikamenten eine Rolle und wurde an einer ganzen Reihe routinemäßig eingesetzter Zytostatika untersucht. G1-Phasenspezifität wird beschrieben für niedrige 5-Azazytidinkonzentrationen (2-6µM) (Murakami et al., 1995) und Hyperthermie, S-Phasenspezifität für 5-Azazytidin (> 10µM), Camptothecin (Traganos et al., 1996; DelBino et al., 1990), Teniposid, Amsacrin (DelBino et al., 1991), Mitoxantrone, Cytarabin und Hydroxyharnstoff (Gorczyca et al., 1993), G2/M-Phasenspezifität für γ-Strahlung (Gorczyca et al., 1993), TNF (Darzynkiewicz et al., 1984) und H7 (Serine/Threonin Kinase Inhibitor). Keine Spezifität zeigen Fostriecin, Cisplatin, Cycloheximid und Genistein (Gorczyca et al., 1993; Gong et al., 1993). Solche zellzyklusspezifischen Unterschiede zwischen verschiedenen Verbindungen spiegeln die Schwere der Schädigung sowie die Fähigkeit der Zelle zur Reparatur wider (Halicka et al., 1997). Klassische Studien zur Zellzyklusspezifität von Substanzen sind an synchronisierten Zellkulturen durchgeführt worden. Obwohl sie die Phasenspezifität von Zellen gegenüber den verschiedensten Verbindungen zeigen, kann man mit diesen Untersuchungen weder die Art des Zelltodes, noch den genauen Zeitpunkt (Interphase-Zelltod oder mitotischer Zelltod) bestimmen. Außerdem hemmen die zu solchen Synchronisierungsuntersuchungen eingesetzten Verbindungen (Hydroxyharnstoff, Aphidicolin, Thymidin) die DNA-Polymerase, was zu schweren Wachstumsstörungen und unkontrollierter Cyclinexpression führt (Gong et al., 1995). Dies kann somit durch sekundäre Veränderungen oder auch Schäden die eigentliche Zellantwort auf die zu testende Verbindung verändern.

In den Untersuchungen zur Konzentrationskinetik an der Zellinie HL-60 zeigen trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal keine Phasenspezifität bezüglich ihrer Apoptoseinduktion. Alle Zellzyklusphasen sind betroffen. Für die Untersuchungen an der Zellinie U937 gilt, mit einer Ausnahme, dasselbe. 2-trans,4-trans-Hexadienal zeigte hier G1-Phasenspezifität. Die Untersuchungen mit 2-Cyclohexen-1-on ergaben S-Phasenspezifität bei den Zellinien U937 und HL-60 sowie G1-Phasenspezifität für K562. Bei der Betrachtung der Zeitkinetik, insbesondere der 24h-Postinkubation (bzw. 48h- und 72h-Postinkubation bei Molt4) konnte man noch zusätzliche Informationen über die Phasenspezifität von U937, K562 und Molt4 bezüglich der Apoptoseinduktion erhalten. Die bei 2-trans,4-trans-Hexadienal beobachtete G1-Phasenspezifität bei U937 weitete sich auf alle Zellzyklusphasen aus. Für die Zellinie K562 ließ sich bei Inkubation mit trans-2-Hexenal, 2-trans,6-cis-Nonadienal und trans-2-Octenal G1-Phasenspezifität feststellen, für die Zellinie Molt4 G1- und teilweise G2-Phasenspezifität.

Etwas anders stellte sich die Wirkung der Verbindungen auf die Zellkinetik dar. Hier zeigten alle Zellinien bei trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-Cyclohexen-1-on eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, bei 2-trans,6-cis-Nonadienal war eine Akkumulation in der G1-Phase zu sehen. Zusätzlich war bei 2-Cyclohexen-1-on eine noch engere Eingrenzung auf die M-Phase möglich. Bei der Zellinie K562 trat erstaunlicherweise nach der Induktion von Apoptose ein fast kompletter mitotischer Arrest auf.

Setzt man den initialen DNA-Schaden in Relation zu den betroffenen Zellzyklusphasen, unterscheidet Halicka et al. (1997) 3 Klassen von Apoptose. In der sogenannten *Homo-Phase-Apoptose* durchlaufen die Zellen noch in derselben Phase, in der sie betroffen wurden Apoptose. In der *Homo-Zyklus-Apoptose* durchlaufen die Zellen vor oder während der ersten Mitose Apoptose (diese beiden werden auch unter Interphase-Zelltod zusammengefaßt). Schließlich durchlaufen Zellen in der *post-mitotischen Apoptose* im nächsten Zellzyklus Apoptose. Obwohl der Zelltod nach der Mitose in vielem an Apoptose erinnert, fehlen jedoch häufig klassische Merkmale (Shinohara et al., 1993). Dies steht im Zusammenhang mit sekundären Veränderungen im Metabolismus, die vor dem eigentlichen Zelltod auftreten (Kung et al., 1990). Aus diesem Grund kann man zwischen „unmittelbarer“ Apoptose, die alle klassischen Merkmale zeigt, in vielen Fällen keine Aktivierung neuer Gene benötigt und nicht durch sekundäre Veränderungen modifiziert wird (Darzynkiewicz et al., 1995), und „verzögerter“ Apoptose unterscheiden, welche atypische zelluläre Veränderungen erkennen

läßt. Diese Unterteilung kann man noch zusätzlich in Beziehung zu den eingesetzten Substanzkonzentrationen setzten. Man unterscheidet sub-zytostatische, zytostatische, apoptotische und nekrotische Konzentrationen. Zum Auslösen von Apoptose beschrieb Halicka et al. (1997) Schwellenwertdosen für die verschiedensten Verbindungen.

Die Hauptwege der Umsetzung α,β-ungesättigter Carbonylverbindungen mit zellulären Nukleophilen verlaufen in Richtung Detoxifizierung. Dies wird noch durch Biotransformation zum Alkohol und entsprechender Carbonsäure verstärkt. Nur ein kleiner Dosisanteil steht also in entsprechend ausgestatteten Zellen zum Auslösen von DNA-Schäden zur Verfügung. Sind diese desaktivierenden Prozesse erschöpft, steigt das Ausmaß an DNA-Schädigung stark an. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorliegen von Schwellenwertdosen sein, die überschritten werden müssen, um nach Absättigung der Nukleophilen und der enzymatischen Desaktivierung Schäden zu setzen. Es könnte sich aber auch um konkurrierende Ereignisse handeln (Schuhmacher et al., 1990).

Im Falle der mit α,β-ungesättigten Aldehyden inkubierten Zellinien U937 und HL-60 handelte es sich wohl um eine unmittelbare bzw. frühe Apoptose, da die ersten Anzeichen je nach Verbindung schon eine Stunde bis drei Stunden nach der Inkubation auftraten. Da mit einer Ausnahme keine Zellzyklusspezifität zu verzeichnen war, konnte man hier nur von *Homo-Zyklus-Apoptose* sprechen. Die für 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al detektierte G1-Phasenspezifität bei kurzer Postinkubation konnte als *Homo-Phase-Apoptose* gedeutet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Zellinien K562 und Molt4 der zytostatische Effekt von einer verzögerten Apoptose gefolgt, da hier apoptotische Zellen erst 24h bzw. 48h oder 72h nach der Inkubation auftraten. Hier handelte es sich ohne Zweifel um *post-mitotische Apoptose*, wobei wie in der Literatur beschrieben, hauptsächlich G1-Phase-Zellen betroffen waren (Halicka et al., 1997).

Etwas schwieriger sind die Ergebnisse mit 2-Cyclohexen-1-on zu deuten. Hier trat eine sichtbare Apoptose erst bei relativ hohen Dosen von 50µM/75µM nach 8h bei K562 und 12h bei U937 und HL-60 auf. Diese Dosen lagen mehr als doppelt so hoch wie der an V79-Zellen ermittelte IC_{50}-Wert (Janzowski et al., 1997). Betrachtete man nur das zeitliche Auftreten, muß man hier von einer verzögerten Apoptose sprechen, welche von einigen Autoren mit dem mitotischen Zelltod bzw. der post-mitotischen Apoptose gleichgesetzt wird (Darzynkiewicz et al., 1995; Halicka et al., 1997). Im Gegensatz zu meinem Versuchsansatz beschrieben diese Autoren das Auftreten von verzögerter Apoptose im Zusammenhang mit relativ niedrigen apoptoseinduzieren Substanzkonzentrationen, Puls-Behandlung mit höheren Konzentrationen oder Bestrahlung und sehr viel geringerer Selektivität gegenüber Zellzyklusphasen als frühe

Apoptose. Aufgrund der deutlichen S-Phasenspezifität bei den Zellinien U937 und HL-60 konnte man aber zusätzlich von einer Homo-Phase-Apoptose sprechen. Dies und die Tatsache, daß beide Zellinien als sogenannte „prädisponierte“ Zellinien gelten, ließ Zweifel an einer verzögerten Apoptose aufkommen. Die apoptotischen Zellen könnten aufgrund ungenügender Extraktion der fragmentierten DNA oder zu starker Proteinentfernung nicht detektierbar sein. Sie wären sozusagen im normalen Zellzyklus versteckt. Dieses Problem konnte durch die Ansicht der morphologischen Analyse abgeklärt werden. Es zeigten sich dort für die Zellinie U937 schon nach 4h apoptotische Zellen, deren Anstieg aufgrund hoher Standardabweichungen nicht signifikant war. Die HL-60 Zellen zeigten ebenfalls schon nach 4h apoptotische Zellen (siehe 4.4.2.2). Zog man diese Ergebnisse in Betracht, konnte man die durch 2-Cyclohexen-1-on induzierte Apoptose bei den Zellinien U937 und HL-60 doch als frühe Apoptose bezeichnen. Die G1-Phasenspezifität der Zellinie K562 ließ sich im Gegensatz dazu mit verzögerter, post-mitotischer Apoptose in Einklang bringen.

4.5 Einfluß der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen auf die Apoptoseinduktion

2-Alkenale verursachen aufgrund ihrer hohen Reaktivität eine Reihe zytotoxischer Effekte. So hemmt z.B. 4-OH-Nonenal die DNA-Polymerase in Rattenleber (Wawra et al., 1986) und die Tubulinbildung (Gabriel et al., 1977) und verringert die Fähigkeit der Calciumaufnahme in Lebermikrosomem (Benedetti et al., 1984). Vor allem die längerkettigen Alkenale bewirken schon in geringen Konzentrationen eine starke Reduzierung der Vitalität (Schuhmacher et al., 1990). Eine deutlich verminderte Vitalität sowie eine drastische Abnahme des GSH-Spiegels durch Acrolein und verschiedene 4-OH-Alkenale wird ebenfalls beschrieben (Krokan et al., 1985; Benedetti et al., 1980). Die Toxizität der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen nimmt mit steigender Kettenlänge und Lipophilie, welche eine bessere Penetration durch die Membran gewährleistet, zu. Die Mutagenität, bedingt durch die Michael-Reaktivität, nimmt dagegen mit steigender Kettenlänge ab (Eder et al., 1992). Keine Korrelation besteht zwischen Reaktivität und Zytotoxizität. Acrolein z.B. eine der reaktivsten Verbindungen dieser Gruppe, bedingt nur eine geringe Abnahme der Vitalität, während Citral und Decadienal, die nur schwache Michael-Reaktivität besitzen, ausgeprägte Membranschäden verursachen (Schuhmacher et al., 1990). Um eine Aussage über den Einfluß der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen auf die Apoptoseinduktion oder auch den apoptotischen Index machen zu können, wurde die quantitative Auswertung des gesamten Sub-G1-Bereiches der

Zellinien U937 und HL-60 für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal bei 50µM betrachtet. Man konnte deutlich einen substanzabhängigen Anstieg der Apoptose mit steigender Kettenlänge detektieren, wobei es leichte Unterschiede zwischen den beiden Zellinien gibt. Trotz des Anstiegs wurde nicht immer eine signifikante Differenz erreicht, was an den Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen lag. Kein signifikanter Unterschied ließ sich z.B. auch zwischen trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1al detektieren, obwohl eine rein quantitative Erhöhung bei der Zellinie U937 zu sehen war. Die Konjugation der Doppelbindungen bei 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al führt zu erhöhter Polarität und damit zu einer erniedrigten Lipophilie. Man könnte somit annehmen, das 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al eine erniedrigte oder zumindest nicht erhöhte Toxizität im Vergleich zu Hexenal zeigt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, daß 2,4-Hexadien-1-al eine erniedrigte Toxizität im Vergleich zu trans-2-Hexenal zeigt (Eder et al., 1992). Die Zellinie HL-60 zeigte die Abhängigkeit der Stärke der Apoptoseinduktion von der Kettenlänge am deutlichsten. Hier fanden sich signifikante Unterschiede zwischen trans-2-Hexenal und trans-2-Octenal, zwischen trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal, sowie zwischen 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und trans-2-Octenal. Die dritte in dieser Arbeit eingesetzte C_6-Verbindung zeigte wohl aufgrund ihrer zyklischen Struktur eine sehr viel geringere Reaktivität. Erst bei einer 24h-Inkubation erreichte man 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al vergleichbare Werte.

Der Effekt der Kettenlänge ließ sich auch bei der Betrachtung von apoptoseauslösenden Konzentrationen erkennen. Nimmt man die Zellinie U937, so wurde mit trans-2-Hexenal Apoptose ab 75µM, mit 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al ab 50µM, mit trans-2-Octenal ab 25µM und schließlich mit 2-trans,6-cis-Nonadienal schon ab 10µM sichtbar.

Für eine weitere Aussage über den Einfluß von Doppelbindungen müßten weitere Untersuchungen mit trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal vergleichbaren, α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Induktion von Apoptose durch vier α,β-ungesättigte Aldehyde und ein zyklisches Keton untersucht. Die Apoptoseinduktion wurde mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie (DNA-/Proteinmessung), Fluoreszenzmikroskopie und DNA-Isolation bestimmt. Es wurden dazu Konzentrationskinetiken (0 bis 150µM) und Zeitkinetiken (1h-Inkubation mit anschließender Postinkubation bis 24h bzw.72h bei Molt4; 0h bis 24h bei 2-Cyclohexen-1-on) an den humanen Zellinien U937, HL-60, K562 und Molt4 aufgestellt.

Bei den Zellinien U937 und HL-60 konnte die induzierte Apoptose sowohl quantitativ (durchflußzytometrisch und morphologisch) als auch qualitativ (DNA-Leiter) eindeutig bestimmt werden. Für alle Verbindungen wurde eine dosis- und zeitabhängige Induktion von Apoptose detektiert. Darüberhinaus lieferte die morphologische Analyse Informationen über die Verteilung der einzelnen Apoptosestadien.
Die Zellinien K562 und Molt4 zeigten keine so deutliche Übereinstimmung zwischen den 3 Detektionsmethoden. Für die Zellinie K562 ergab sich in den eingesetzten Konzentrationsbereichen nur bei 2-Cyclohexen-1-on durchflußzytometrisch eine dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion, die sich zwar mit der Analyse der DNA-Leiter, nicht aber mit der morphologischen Auswertung bestätigen ließ. Für trans-2-Hexenal und trans-2-Octenal konnte nur zeitabhängig ein Anstieg mittels FCM detektiert werden, der nur für trans-2-Octenal signifikant war. Bei beiden ergab sich keine DNA-Leiter. Die morphologische Analyse für trans-2-Hexenal ließ einen ebenfalls nicht signifikanten Anstieg erkennen. Für trans-2-Octenal wurde keine morphologische Analyse durchgeführt. Die Zellinie Molt4 zeigte nur zeitabhängig für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al und 2-trans,6-cis-Nonadienal eine Apoptoseinduktion, die ausschließlich für 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al signifikant war. Die Analyse der DNA-Leiter war auch hier in allen Fällen negativ. Die morphologische Analyse konnte für 2-Cyclohexen-1-on zusätzliche, im FCM nicht detektierte Apoptose zeigen.

Der Vergleich der 1-Parameter-Messung des DNA-Gehaltes mit der 2-Parameter-Messung des DNA- und Proteingehaltes der Zellinie U937 bei trans-2-Hexenal- und 2-Cyclohexen-1-on-Behandlung ergab zusätzliche, bei der 1-Parameter-Messung „versteckte“ apoptotische Zellen. Diese waren eindeutig bestimmten Zellzyklusphasen zuzuordnen. Ein weiterer Vergleich der DNA-/Proteinmessung mit der als spezifischste Methode geltenden Markierung der

Strangbrüche mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden wurde durchgeführt. Dazu wurden Beispiele aus der Literatur eingesetzt. Dieser Vergleich zeigte, daß bei einem geeigneten Zellsystem die zellzyklusspezifische Apoptosebestimmung vergleichbar war. Von Vorteil für die DNA-/Proteinmessung war dabei die einfache und kostengünstige Durchführung.
Der zur Überprüfung der Diskrepanzen zwischen den Detektionsmethoden bei den Zellinien K562 und Molt4 eingesetzte Annexin V-Assay bot in beiden Fällen keine weitere Information. Die eingesetzten Methoden konnten also bei den Zellinien U937 und HL-60 in guter Übereinstimmung Apoptose detektieren, die Zellinien K562 und Molt4 zeigten sich aufgrund fehlender Fragmentierung der DNA in 180bp-Fragmente und der relativen Apoptoseresistenz von K562 für dieses Screening als ungeeignet. Für diese Zellinien müßten weitere Methoden, die nicht auf der Fragmentierung der DNA beruhen, eingesetzt werden.

Aufgrund der Tatsache, daß die Apoptoseinduktion bei den Zellinien K562 und Molt4 erst nach längerer Inkubationsdauer auftrat, wurde diese als *verzögerte Apoptose* interpretiert. Im Vergleich dazu handelte es sich bei den Zellinien U937 und HL-60 um *frühe Apoptose*. Setzt man die Apoptoseinduktion mit der Phasenspezifität der Verbindungen in Beziehung, so kann man für die Zellinien U937 und HL-60 nach Inkubation mit den untersuchten Aldehyden von *Homo-Zyklus-Apoptose*, mit 2-Cyclohexen-1-on von *Homo-Phase-Apoptose* sprechen, obwohl letztere durchflußzytometrisch erst nach 12h in Erscheinung trat. Für die Zellinien K562 und Molt4 handelte es sich bei allen Verbindungen um *post-mitotische-Apoptose*. Die Aldehyde zeigten bezüglich ihrer Apoptoseinduktion bei U937 und HL-60 keine Phasenspezifität, es waren alle Zellzyklusphasen betroffen. Bei K562 zeigten sie G1-Phasenspezifität, bei Molt4 G1- und teilweise G2-Phasenspezifität. 2-Cyclohexen-1-on ergab S-Phasenspezifität bei U937 und HL-60 sowie G1-Phasenspezifität bei K562. Außerden trat im Zeitverlauf für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-Cyclohexen-1-on ein G2/M-Arrest auf, 2-trans,6-cis-Nonadienal erzeugte einen G1-Arrest.

Der Einfluß der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen auf das apoptoseinduzierende Potential wurde an den Zellinien U937 und HL-60 für trans-2-Hexenal, 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al, trans-2-Octenal und 2-trans,6-cis-Nonadienal untersucht. Dabei ergab sich ein substanzabhängiger Anstieg der Apoptoseinduktion mit steigender Kettenlänge, der aber nicht in allen Fällen signifikant war. Der Einfluß der Doppelbindungen konnte nur im direkten Vergleich von trans-2-Hexenal und 2-trans,4-trans-Hexadien-1-al betrachtet werden. Hier trat kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verbindungen auf, was wahrscheinlich

auf die Konjugation der Doppelbindungen und die damit verbundene erhöhte Polarität und gleichzeitig erniedrigte Lipophilie zurückzuführen war.

6. Literaturverzeichnis

Akagi Y, Ito K, Sawada S. Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: A study of dose-effect relationship and their modification. *International Journal of Radiat Biology* 1995, 64:47-56.

Anderson. *International Journal of Cancer* 1979; 23:143-147.

Andree HA, Reutlingsberger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid layer. *Journal of biological Chemistry* 1990, 265:4923-4928.

Ankarcrona M, Zhivotovsky B, Holmstrom T, Diana A, Erikson JE, Orrenius S, Nicotera P. Lamin and beta-tubulin fragmentation precede chromatin degradation in glutamate-induced neuronal apoptosis. *Neuroreport* 1996; 7:2659-2664.

Anzai N, Kawabata H, Hirama T, Matutani H, Ohmori M, Yoshida Y, Okuma M. Marked apoptosis of human myelomonocytic leukemia cell line P39: significance of cellular differentiation. *Leukemia* 1994; 3:446-453.

Arends MJ, Morris G, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology* 1990; 136:593-608.

Asher E, Payne CM, Bernstein C. Evaluation of cell death in EBV-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy. II. Induction of non-classic apoptosis („para-apoptosis“) by tritiated thymidine. *Leukemia and Lymphoma* 1995, 19:107-119.

Bachrach U, Rosenkovitch E. Effect of oxidized spermine and other aldehydes on the infectivity of vaccina virus. *Applied Microbiology* 1972; 23:232-235.

Barbeni M, Guarda P, Villa M, Cabella P, Pivetti F, Ciaccio F. Identification ans sensory analysis of volatile constituents of babaco fruit (Carica pentagona Heilborn). *Flavor Fragrance Journal* 1990; 5:27-32.

Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD and Raff MC . Cee death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; 70:31-46.

Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300:440-450.

Beere HM, Chresta CM, Alejoherberg A, Skladanowski A, Dive C, Larson AK and Hickman JA (1995): Investigation of the mechanism of higher order chromatin fragmentation observed in drug induced apoptosis. *Molecular Pharmacology* 47:986-996.

Belitz HD, Grosch W. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 1992; 4. überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Lalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lascombe F. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994; 17:59-65.

Benedetti A, Casini AF, Ferrali M, Comporti M. Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochemical Journal* 1979; 180:303-312.

Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HV, Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *European Journal of Biochemistry* 1982, 122:429-436.

Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica Biophysica Acta* 1983, 736:57-66.

Boelens H. Molecular structure and olfactive properties. *Struct. Act. Relat. Chemoreception.* Proc. Symp., Meeting date 1976; 127-209.

Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L, Nicotera P. Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Experimental Cell Research* 1995; 218:189-200.

Bortner C, Oldenburg N, Cidlowski J. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1995; 5:21-40.

Bowes JH, Cater CW. *Biochim Biophys Acta* 1968; 168: 341ff.

Brambilla G, Sciaba L, Faggin P, Maura A, Marinari UM, Ferro M, Esterbauer H. Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutation Research* 1986; 171(2-3):169-176.

Bronstein IN, Semendjajew KA. Taschenbuch der Mathematik 1989; Verlag Harri Deutsch, Thun.

Brown DG, Sun XM and Cohen GM. Dexamthasone induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 3037-3039.

Bruno S, Lassota P, Giaretti W, Darzykiewicz Z. Apoptosis of rat thymocytes triggered by prednosolone, camptothecin, or teniposis is selective to G0 cells and is prevented by inhibitor of protease. *Oncology Research* 1992; 4:29-35.

Bullard RW, Holguin G. Volatile components of unprocessed rice (Oryza sativa L.). *J. Agric. Food Chem.* 1977; 25:99-103.

Bumbaširevic V, ŠKaro-Milic A, Mircic A, Djuricic B. Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in normal murine thymocytes in vitro. *Scanning Microskopy* 1995; 9:509-518.

Burkl W, Kramer I, Schauenstein E. Über die Bindung α,β-ungesättigter Aldehyde in Zellen und Geweben. *Z. Naturforschg.* 1967; 22b:763-767.

Canonero R, Martelli A, Marinari UM, Brambilla G. Mutation induction in Chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals produced by lipid peroxydation. *Mutation Research* 1990; 244:153-156.

Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 1986; 232:65-68.

Caron-Leslie LM, Schwartzman RA, Gaido ML, Compton MM, Cidlowski JA. Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lympoid cells undergoing apoptosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1991; 40:661-671.

Carson SA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993; 341:1251-1254.

Casperson G, Banasiak L, Lyr H, Sunkel M. Wirkung von 2-Ethyl-2-en-1-al und verwandter Verbindungen auf Wachstum und Ultrastruktur von Pilzen. *J. Basic Microbiol.* 1986; 26:259-269.

Catchpoole DR, Stewart BW. Etoposide-induced cytotoxicity in two human T-cell leukemic lines: Delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death. *Cancer Research* 1993; 53:4287-4296.

Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Beere M, Heer S, Whetton AD, Hickman JA, Dive C. Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells. *Cytometry* 1995; 20:245-256.

Chen J, Jin K, Chen M, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg DA, Simon RP. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *Journal of Neurochemistry* 1997; 69:232-245.

Chien CI, Kirollos KS, Linderman RJ, Dauterman WC. Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: inhibition of rat liver glutathione S-transferase isozymes and chemical reaction with reduced glutathione. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204(2):175-180.

Chung FL, Tanaka T, Hecht SS. Induction of liver tumors in F344 rats by crotonaldehyde. *Cancer Research* 1986; 46:1285-1289.

Chung FL, Young R, Hecht SS. Detection of cyclic 1,N^2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde. *Carcinogenesis* 1989; 10:1291-1297.

Chung F-L, Young R, Hecht SS. Formation of Cyclin 1,N^2-Propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Research* 1984; 44:990-995.

Cohen GM, Sun X-L, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragementation. *Biochem. J.* 1992; 286:331-334.

Cohen JJ. Programmed cell death in immune system. *Advances in Immunology* 1991; 50:55-85.

Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR . Internucleosomal cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *International Journal of Radiat Biology* 1992; 61: 451-453.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 1977; 270:347-349.

Compton CN, Franko Ap, Murray MT, Diebel LN, Dulchavsky SA. Signaling of apoptotic lung injury by lipid hydroperoxides. *Journal of Trauma* 1998, 44:783-788.

Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992; 11:105-119.

Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age and clearance by mononuclear cells. *Journal of biological chemistry* 1994, 269:2399-2404.

Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentation of both tumour and normal cells. *Anticancer Research* 1990; 10(5A):1153-1159.

Counis MF, Chaudun E, Allinquat B, Muel AS, Sanwal M, Skidmore C, Courtis Y. The lens: A model for chromatin degradation studies in terminally differentiating cells. *International Journal of Biochemistry* 1989; 21:235-242.

Czerny C, Eder E, Runger TM. Genotoxicity and mutagenicity of the alpha, beta-unsaturated carbonyl compound crotonaldehyde (butenal) on a plasmid shuttle vector. *Mutation Research* 1998; 407(2):125-134.

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, Murakami T. Critical Aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Human Cell* 1998, 11:3-12.

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:795-808.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology. Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27:1-20.

Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell EA, Old LJ. Cell cycle specific effects of tumor necrosis Factor. *Cancer Research* 1984; 44:83-90.

Darzynkiewicz Z. Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure. *Methods in Cell Biology* 1994; 41:527-542.

Darzynkiewicz Z. Apoptosis in antitumor strategies: modulation of cell cycle or differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 1995; 58:151-159.

Del Bino G, Bruno S, Yi PN, Darzynkiewicz Z. Apoptotic cell death triggered by camtothecin or teniposide. The cell cycle specificity and effects of ionizing radiation. *Cell Proliferation* 1992; 25:537-548.

Del Bino G, Skierska JS, Darzynkiewicz Z. The concentration-dependent diversity of effects of DNA topoisomerrase I and II inhibitors on the cell cycle of HL-60 cells. *Experimental Cell Research* 1991; 195:485-491.

Del Bino G, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Research* 1990; 50:5746-5750.

Deveaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry 1991, 30:1163-1173.*

Dittberner U, Eisenbrand G, Zankl H. Genotoxic effects of α,β-unsaturated aldehydes 2-trans-butenal, 2-trans-hexenal and 2-trans,6-cis-nonadienal. *Mutation Research* 1995; 335:259-265.

Dittberner U. Mutagenitätsuntersuchungen aromawirksamer α,β-ungesättigter Aldehyde. *Dissertation* 1993, Universität Kaiserslautern.

Drawert F, Heimann W, Emberger R, Tressel R. Enzymatische Bildung von Hexen-2-al-1 und Hexenal-1 bei der Aufarbeitung von Äpfeln. *Zeitschrift für Naturforschung* 1965; 20b:497-498.

Dürr P, Schobinger U, Zellweger M. Das Aroma von Apfelmaische bei deren Verflüssigung durch Pektinase und Zellulase. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 1981; 14:268-272.

Dusenbury CE, Davis MA, Lawrence TS and Maybaum J. Induction of megabase DNA fragments by 5-fluorodeoxyuridine in human colorectal (HT29) cells. *Molecular Pharmacology* 1991; 39: 285-289.

Eder E, Deininger C, Neudecker T, Deininger D. Mutagenicity of β-alkyl substituted acrolein congeners in the Salmonella typhimurium strain TA100 and genotoxicity testing in the SOS chromotest. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1992; 19:338-345.

Eder E, Henschler D, Neudecker T. Mutagenic properties of allylic and α,β-unsaturated compounds: consideration of alkylating mechanisms. *Xenobiotica* 1982; 12:831-848.

Eder E, Hoffman C, Bastian H, Deininger C, Scheckenbach S. Molecular mechanisms of DNA damage initiated by α,β-unsaturated carbonyl compounds as criteria for genotoxicity and mutagenicity. *Environmental Health Perspectives* 1990;88:99-106.

Eder E, Scheckenbach S, Deininger C, Hoffman C. The possible role of α,β-unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicology Letters* 1993; 67:87-103.

Eisenbrand G, Metzler M. Toxikologie für Chemiker. Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Georg Thieme Verlag 1994; Stuttgart New York.

Eisenbrand G, Schuhmacher J, Golzer P. The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem* Res *Toxicol* 1995; 8(1):40-46.

Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell* 1986; 44:817-829.

Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Genetics* 1991; 129:79-94.

Elstein KH, Thomas DJ, Zucker RM. Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis. *Cytometry* 1995; 21:170-176.

Elstein KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Experimental Cell Research* 1994; 211:322-331.

Endresen PC, Prytz PS, Aarbakke J. A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity staining F-actin and DNA. *Cytometry* 1995; 20:162-171.

Esterbauer H, Ertl A, Scholz N. The raction of cysteine with α,β-unsaturated aldehydes. *Tetrahedron* 1976; 32:285-289.

Esterbauer H. Aldehydic products of lipid peroxidation. In: *Free radicals lipid peroxidation and cancer* 1982; McBrien DCH, Slater TF (eds), Academic Press, London, 100-128.

Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69:119-128.

Fadok VA, Laszlo DJ, Noble PW, Weinstein I, Riches DW, Henson PM. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylseine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *Journal of Immunology* 1993, 151:4274-4285.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 1992; 148:2207-2216.

Ferguson LR, Morcombe P, Triggs CN. The size of cytokinesis-blocked MN in human peripheral blood lymphocytes as a measure of aneuploidy by a set compounds in the EEC trial. *Mutation Research* 1993; 287:101-112.

Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ. Aldehydes: Occurence, carcinogenic potential, nechanism of action and risk assesment. *Mutation Research* 1991; 259:363-385

Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, Walker PR. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO Journal* 1990; 9:1319-1327.

Firmenisch SA. Alpha, Beta-ungesättigte Aldehyde und ihre Verwendung als aromamodifizierte Bestandteile. *Offenlegungsschrift* 1980; DE 2937287, Deutsches Patentamt.

Ford RA, Letizia C, Api AM. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cemistry and Toxicology* 1988; 26:273-415.

Freeman DA and Crissman H. Evaluation of six fluorescent protein stains for use in flow microfluorometry. *Stain Technology* 1975; 50:279-284.

Friedman M, Gavins JF, Wall JS. *J Am Chem Soc* 1965; 87: 3672ff.

Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF. Demonstration of extensive cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or necrosis. *American Journal of Pathology* 1993; 142:935-946.

Gabriel L, Miglietta A, Dianzani MA. 4-hydroxy-alkenals interaction with purified microtubular protein. *Chem.-Biol. Interactions* 1985; 56:201-212.

Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson A . Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 1992; 119:493-501.

Genzlinger A, Romanakis K, Janzowski C, Zankl H. Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on bei 4 humanen Leukämietellinien sowie normalen Blutlymphozyten. *10. Heidelberger Zytometrie Symposium* 1997, ISSN 0949-5547, S.75.

Girona J, La Ville AE, Herras M, Olive S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF-alpha secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(4):658-667.

Glücksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1951; 225:59-86.

Gniadecki R, Gajkowska B, Bartosik J, Hansen M, Wulf HC. Varialbe expression of apoptotic phenotype in keratinocytes treated with ultraviolet radiation, ceramide, or suspended semisolid methylcellulose. *Acta Derm Venereol* 1998, 78:248.257.

Golstein P, Young JD-E. Cell death mechanism and the immune system. *Immunology Reviews* 1991; 121:29-65.

Golzer P, Janzowski C, Pool-Zobel BL, Eisenbrand C. (E)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclis 1,N2-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(7):1207-1213.

Gong J, Li X, Darzykiewicz Z. Different patterns of apoptosis Auf HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *Jounral of Cellular Physiology* 1993; 157:263-270.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 1994; 218:314-319.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, A and D3 in Molt-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. *Cell Growth and Differentiation* 1995; 6:1485-1493.

Gorcyzca W, Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Research* 1993b; 53:3186-3192.

Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 1993a; 7:659-670.

Gorczyca W, Bruno S, Darzykiewicz RT, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl I transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal of Oncology* 1992; 1:639-648.

Gorczyca W, Gong J, Darzykiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* 1993c; 53:1945-1951.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research* 1993; 207:202-205.

Götz C, Montenarh M. p53 and its implication in apoptosis (review). *International Journal of Oncology* 1995; 6:1129-1135.

Grafstrom RC, Dypbukt JM, Willey JC, Sundqvist K, Edman C, Atzori L, Harris CC. Pathobiological effects of acrolein in cultured human bronchial epithelial cells. *Cancer Research* 1988; 48(/): 1717-1721.

Gray JM, Barnsley EA. The metabolism of crotyl phosphate, crotyl alcohol and crotonaldehyde. *Xenobiotica* 1971; 1:55-67.

Grosch W. Enzymatische Bildung von Aromastoffen aus Lipiden. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 1987; 41:40-46.

Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann DA. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 1995; 10:2263-2270.

Gunji H, Hass R, Kufe D. Internucleosomal DNA fragmentation during phorbol ester-induced monocytic differentiation and G0/G1 arrest. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 89:954-960.

Habu T, Flath RA, Mon TR, Morton JF. Volatile components of rooibos tea (Aspalathus linearis). *J. Agric. Food Chem.* 1985; 33:249-254.

Hahn H. Über das Vorkommen von 2-Cyclohexen-1-on in süßstoffhaltigen Erfrischungsgetränken. *Lebensmittelchemie* 1996; 50:52-54

Halicka HD, Seiter K, Feldman EJ, Traganos F, Mittelman A, Ahmed T, Darzykiewicz Z. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis* 1997; 2:25-39.

Hara S, Halicka HD, Bruno S, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. *Experimental Cell Research* 1996; 223:372-384.

Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML. Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiation Research* 1997, 147:457-467.

Hotz MA, Gong J, Traganos F, Daryznkiewicz Z. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry* 1994; 15:237-244.

Huschtscha LI, Jeitner TM, Andersson CE, Bartier WA, Tattersall MHN. Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Experimental Cell Research* 1994; 212:161-165.

Ireland CM, Pittman SM. Tubulin alterations in taxol-induced apptosis parallel those observed with other drugs. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1491-1499.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66:233-243.

Jacobs DB, Pipho C. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure antibody-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *Journal of Immunological Methods* 1983; 62:101-108.

Janzowski C, Glaab V, Eisenbrand G. Cytotoxic and genotoxic effects of 2-Cyclohexen-1-one in V79 cells and in Salmonella typhimurium. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1997; 38 (abstracts only).

Jiang JD, Wang Y, Roboz J, Strauchen J, Holland JF, Bekesi JG. Inhibition of microtubule assembly in tumor cells by 3-bromoacetylamino benzoylurea, a new cancericidal compound. *Cancer Research* 1998; 58:2126-2133.

Johnson LV, Walsh MI, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980;77:990-994.

Jones DP, McConkey DJ, Nicotera P und Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264:6389-6403.

Josephson DB, Lindsay RC, Stuiber DA. Identification of compounds characterizing the aroma of fresh white fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983; 31:326-330.

Josephson DB, Lindsay RC, Stuiber DA. Variations in the occurence of enzymatically derived volatile aroma compounds in salt-water and fresh-water fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1984; 32:1344-1347.

Josephson DB, Lindsay RC. Retro-aldol degradations of unsaturated aldehydes role in the formation of C4 Heptenal from 2-trans,6-cis-Nonadienal in fish oyster and other flavors. *Journal of the American oil Chemistry Society* 1987; 64:132-138.

Kajiwara T, Hatanaka A, Kawai T, Ishihara M, Tsuneya T. Study of flavour compounds of essential oil extracts from edible japanese kelps. *Journal of Food Science*1988; 53:960-963.

Kaneko T, Kaji K, Matsuo M. Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem.-Biol. Interaction* 1988; 67:295-304.

Kaufmann SH. Induction of entdonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etopside, camtothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Research* 1989; 49:5870-5878.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-2026.

Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84:1415-1420.

Krammer PH, Kirchner H, Schimpl A. Lymphokines. *Immunology Today* 1989; 10:21-22.

Krokan H, Grafstrom RC, Sundqvist K, Esterbauer H, Harris CC. Cytotoxicity, thiol depletion and inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by various aldehydes in cultured human bronchial fibroblats. *Carcinogenesis* 1985; 6(12):1755-1759.

Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience* 1997, 17:5089-5100.

Kula J, Sadowska H. Unsaturated aliphatic C9-aldehydes as natural flavorants. *Perfumer and Flavorist* 1993; 18:23-25.

Kung Al, Zetterberg A, Sherwood SW, Schimke RT. Cytotoxic effects of cell cycle phase specific agents: Result of cell cycle perturbation. *Cancer Research* 1990, 50:7307-7317.

Kuribayashi N, Sakagami H, Iida M and Takeda M. Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leucemic cell lines. *Anticancer Research* 1996; 16:1225-1230.

Kuykendall JR, Bogdanffy MS. Effeciency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutation Research* 1992; 283:131-136.

Le Quere JL, Leschaeve I, Demaizieres D, Issanchou S, Delache R. Chemical and sensory effects of intensive sweeteners on the flavor of diet orange soft drinks. In: *Trends in Flavor Research* 1994; Maarse H, van der Heij DG (eds), Elsevier S 387.

Li L, Hamilton RF, Kirichenko A, Holian A. 4-hydroxynonenal-induced cell death in murine alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacology* 1996, 139:135-143.

Li L, Hamilton RF, Taylor DE, Holian A. Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;145(2):331-339.

Li X, Traganos F, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides: detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry* 1995; 20-172-180.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45:321-334.

Lutz D, Eder E, Neudecker T, Henschler D. Structure-mutagenicity relationship in α,β-unstaturated carbonylic compounds and their corresponding allylic alcohols. *Mutation Research* 1982; 93:305-315.

Lyons AB, Samuel K, Sanderson A, Maddy AH. Simultaneous analysis of immunophenotype an apoptosis of murine Thymocytes by single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:809-821.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 1995; 146:3-15.

Major RT, Marchini P, Boulton AJ. Observation on the production of the α-hexenal by leaves of certain plants. *Journal of Biological Chemistry* 1963; 238:1813-1816.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1982.

Martin SJ, Cotter TG. Disruption of microtubules induces an endogeneous suicide pathway in human leukemia HL-60 cells. *Cell Tissue Kinetics* 1990:23:545-559.

Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* 1990; 145(6):1859-1867.

Martin SJ, Reutlingsberger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of experimental Medicine* 1995, 182:1545-1556.

Masakazu I, Tamoyuki T. Study of flavor compounds of essential oil extracts from edible japanese kelps. *Journal of food science* 1988; 53:960-962.

Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Okuda A, Bessho R, Lin YW, Adachi S, Akiyama Y. Variable susceptibility to apopotosis by calcium ionophore in hybridomas between HL-60 promyelocytic and CEM T-lymphocytic leukemia cell lines: Relationship to constitutive Mg^{2+}-dependent endonuclease. *Experimental Cell Research* 1994, 213:412-417.

Mauldin RK. The characterization of cigaret smoke from Cytrel smoking products and ist comparison to smoke from flue-cured tobacco. II. Semi-volatile phase analysis. *Beitr. Tabakforschung* 1976; 8:422-29.

McConkeyDJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H und Orrenius S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+}-mediated endonuclease activation. *Science* 1988; 242:256-259.

McKenna SL, Hoy T, Holmes JA, Whittaker JA, Jackson H, Padua RA. Flow cytometric apoptosis assays indicate different types of endonuclease activity in haematopoietic cells and suggest a cautionary approach to their quantitative use. *Cytometry* 1998; 31:130-136.

McLeod G. Volatile components of chayote. *Phytochemistry* 1990; 29:1197-1200.

Melamed M, Lindmo T, Mendelsohn M (eds). Flow Cytometry and Sorting, Second edition. Wiley-Liss, New York 1990.

Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, Kroemer G. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/FAS/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunology Letters* 1998; 61:157-163.

Miwa I, Murata T, Mitsuyama S, Okuda J. Participation of glucokinase inactivation in inhibition of glucose-induced insulin secretion by 2-cyclohexan-1-one. *Diabetes* 1990; 39:1170-1176.

Muehlematter D, Larsson R, Cerutti P. Active oxygen induced DN strand breakage and poly ADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 1988; 9:239-245.

Murakami T, Li X, Gong J, Bhatia U, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Induction of apoptosis by 5-azacytinine: Drug concentration dependent differences in cell cycle specifity. *Cancer Research* 1995; 55:3093-3098.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1991; 139:271-279.

NTP Nomination History and Review. NCI Summary of Data for Chemical Selection, CAS Number: 930-68-7, 1996.

O'Brian IEW, Reutlingsberger CPM, Holdaway KM. The use of Annexin-V and TUNEL to monitor the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 1997, 29:28-33.

O'Brien PJ, Kaul H, McGirr L, Drolet D, Silva JM. Molecular mechanisms for the involvement of the aldehydic metabolites of lipid peroxides in cytotoxicity and carcinogenesis. In: *The Pharmacological Effects in Lipids III.* 1988; Kabara JJ (ed.). The American Oil Chemistry Society, Lauridicin Inc., Galena IL, 226-280.

Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal* 1993; 12:3679-3684.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Hlas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstingl H, Krammer PH. Purfication and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *The Jounral of Biological Chemistry* 1992; 267:10709-10715.

Op den Kamp JA. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 1979, 48:47-71.

Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Harrap KR. Cisplatin induced apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without a concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Experimental Cell Research* 1994; 211:231-237.

Ormerod MG, Paul F, Cheetham M, Sun X-M. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. *Cytometry* 1995; 21:300-304.

Orrenius S, Ormstad K, Thor H, Jewell SA. Turnover and functions of gluathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Fed Proc* 1983; 42:3177-3188.

Otto FJ. High-resolution analysis of nuclear DNA emloying the fluorochrome DAPI. *Methods in Cell Biology* 1994; 41:211-217.

Peitsch MC, Muller C, Tschopp J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Research* 1993: 21:4206-4209.

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogeneous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO Journal* 1993; 12:371-377.

Petit PX, Lecoeur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon M-L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 1995; 130:157-167.

Pettersson B, Curvall M, Enzell CR. Effects of tobacco smoke compounds on the noradrenaline induced oxidative metabolism in isolated brown fat cells. *Toxicology* 1980; 18:1-15.

Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue culture* 1973; Kruse PE et al., Academic Press, New York, 406-408.

Piacentini M, fesus I, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Meline G. The expression of „tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related to with the programmed cell death (apoptosis). *European Jurnal of Cell Biology* 1995, 54:246-254

Riordan FA, Bravery CA, Mengubas K, Ray N, Borthwick NJ, Akbar AN, Hart SM, Hoffbrand AV, Mehta AB, Wickremasinghe RG. Herbimycin A accelerates the induction of apoptosis following etoposide treatment or gamma-irradiation of bcr/abl-positive leukaemia cells. *Oncogene* 1998, 16:1533-1542.

Rouvier E, Luciani M-F, Golstein P. Fas involvement in Ca^{2+}-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1993; 177:195-200.

Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, Leblanc J, Chaly N. The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exoerimental Cell Research* 1992; 200:416-424.

Sakai SY, Sumitani H. Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling. *Journal of Agricultural and Food Chemistyr* 1990; 38:213-217.

Salzman GC, Singham SB, Johnston RG, Bohren CF. Light scattering and cytometry. In: *Flow Cytometry and sorting*, Melamed MR, Lindmo T, Mendelson ML (eds). Wiley-Liss, New York, 1990, pp81-107.

Saunders JW. Death in embryonic systems. *Science* 1966; 154:604-612.

Schauenstein E, Esterbauer H. Aldehydes in biological systems. *Pion limited* 1977.

Schieberle P, Ofner S, Grosch W. Evaluation of potent odorants in cucumbers (Cucumis sativus) and muskmelone (Cucumis melo) by aroma extract dilution analysis. *Journal of Food Science* 1990; 55:193-195.

Schildknecht H, Rauch G. *Zeitschrift für Naturforschung* 1961; 16b:301-422.

Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:204-208.

Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1994; 15:12-20.

Schmid W, Grosch W. Quantitative Analyse flüchtiger Aromastoffe mit hohen Aromawerten in Sauerkirschen (Prunus cerasus L.), Süßkirschen (Prunus avium L.) und Kirschkonfitüren. *Lebensm Unters Forsch* 1986; 183:29-44.

Schmitz und Rothe. Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. Schattauer, Stuttgart, New York 1994.

Schreier P, Drawert F, Steiger G, Mick W. Effect of enzyme treatment of apple pilp with a commercial pectinase and cellulase on the volatiles of the juice. *Journal of food science* 1978; 43:1797-1800.

Schroit AJ, Zwaal RF. Transbilayer movememt of phospholipids in red cells and platelet membranes. *Biochimica Biophysica Acta* 1991, 1071:313-329.

Schulze-Osthoff K, Walzak H, Dröge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 1994; 127:15-20.

Sekiya J, Kajiwara T, Hatanaka A. Trans-2,cis-6-nonadienal and trans-2-nonenal in cucumber fruits. *Biochemistry* 1977; 16:1043-1044.

Sellins KS, Cohen JJ. Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins. *Journal of Immunology* 1991; 147:795-803.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimo Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial transmembrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996; 13:21-30.

Shinohara K, Nakano H. Interphase death and reproductive death in X-irradiated Molt-4 cells. *Radiation Research* 1993, 197-205.

Skobeleva NI, Bezzubov AA, Petrova TA, Bokuchava MA. Aroma-forming substances in black tea. *Biochemistry and Microbiology* 1979; 15:682-687.

Smith GK, Duch DS, Dev IK, Kaufmann SH. Metabolic effects and kill of human T-cell leukaemia cells by 5-deazacyclotetrahydrofolar, a specific inhibitor of glycineamide ribonucleotide transformylase. *Cancer Research* 1992; 52:4895-4903.

Solary E, Bertrand R, Kohn KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase inhibitors. *Blood* 1993; 81:1353-1368.

Steck KD, McDonnell TJ, El-Naggar AK. Flow cytometric analysis of apoptosis and BCL-2 in human solid neoplasms. *Cytometry* 1995; 20:154-161.

Stöhr M, Eipel H, Goerttler K, Vogt-Schaden M. Extended application of flow microfluorometry by means of dual laser excitation. *Histichemistry* 1977; 51:305-313.

Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature $CD4^{+}8^{+}$ thymocytes by flow cytometry. *Journal of immunological Methods* 1981; 137:79-87.

Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocorti family. *Journal of biological Chemistry* 1989, 264:7944-7949.

Telford WG, King LE, Fraker PJ. Rapid quantitation of apoptosis in pure heterogeneous cell populations using flow cytometry. *Jounral of Immunological Methods* 1994; 172:1-16.

Terui Y, Furukawa Y, Kikuchi J, Saito M. Apoptosis during HL-60 differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *Journal of Cellular Physiology* 1995; 164:74-84.

Tinnemans MM, Lenders MH, ten Velde GP, Ramaekers FC, Schutte B. Alterations in cytiskeletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *European Journal of Cell Biology* 1995; 68:35-46.

Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Research* 1994; 35(3):417-427.

Tomei LD, Shapiro JP and Cope FO. Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 853-857.

Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with Acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. *Methods in Cell Biology* 1994; 41:185-195.

Traganos F, Knuttihotz J, Hotz M, Gorczyca W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z. The protein kinase C inhibitor H7 blocks normal lymphocyte stimulation and induces apoptosis of both normal lymphocytes and leukaemia Molt4 cells. *International Journal of Oncology* 1986; 261:10359-10365.

Traganos F, Seiter K, Feldman E, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. Induction of apoptosis by camptothecin und topotecan. *Ann NY Acad Sci* 1996; 803:101-110.

Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA, Meyers J. Genome gigestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Molecular Cell Biology* 1992; 12:3060-3069.

Ueda N, Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med* 1994; 124:169-177.

Ullrich F, Grosch W. Flavour deterioration of soya-bean oil: Identification of intense odour compounds formed during flavour reversion. *Fat Sci. Technol.* 1988; 9:332-336.

Umansky SR, Korol BR, Nelipovic PA. In vivo DNA degradation in the thymocytes of gamma-irradiated or hydrocortison-treated rats. *Biochimica and Biophysica acta* 1981, 655:281-290.

van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutlingsberger CP, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Experimental Cell Research* 1997; 235:421-430.

Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatedylserine exposure. *Cytometry* 1998; 31:1-9.

van Iersel ML, Ploemen JP, Lo Bello M, Federici G, van Bladeren PJ. Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact* 1997; 108(1-2):67-78.

van Iersel ML, Ploemen JP, Struik I, van Amersfoort C, Keyzer AE, Schefferlie JG, van Bladeren PJ. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha, beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethycrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chem Biol Interact* 1996; 102(2):117-132.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods* 1995; 184:39-51.

Walker PR, Pandey S and Sikorska M . Degradation of chromatin in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*1995; 2:97-104.

Walker PR, Sikorska M. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 1997; 75:287-299.

Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF and Sikorska M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Research* 1991; 51:1078-1085.

Wawra E, Zollner H, Schaur RJ, Tillian HM, Schauenstein E. The inhibitory effect of 4-hydroxy-nonenal on DNA-polymerases alpha and beta from rat liver and rapidly dividing Yoshida ascites hepatoma. *Cell Biochem Function* 1986; 4:31-36.

White JS, Rees KR. The mechanism of action of 4-hydroxynonenal in cell injury. *Chem Biol Interact* 1984; 52(2):233-241.

Whyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. Seminars in *Immunology* 1992a; 4:389-397.

Whyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992b; 45:95-103.

Whyllie AH. Apoptosis. *British Journal of Cancer* 1993; 67:205-208.

Whyllie AH. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980; 68:251-307.

Williamson R. Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *Journal of Molecular Biology* 1970; 51:157-168.

Wu CM, Liou SE. Effect of tissue disruption on volatile constituents of bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986; 34:770-773.

Xu HM, Tepper CG, Jones JB, Fernandez CE, Studinski G. 1,25-dihydrovitamin D_3 protects HL-60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of bcl-2 gene. *Experimental Cell Research* 1993; 29: 367-374.

Yamadori I, Yoshino T, Kondo E, Cao L, Akagi T, Matsuo Y, Minowada J. Comparison of two methods of staining apoptotic cells of leukemia cell lines. Terminal deoxynucleotidyl transferase and DNA polymerase i reaction. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1998; 46:85-90.

Yildiz D, Ercal N, Frank RL, Matthews RH. Effectc of 4-hydroxynonenal and N-acetyl-L-cystein on Myc-induced apoptosis. *Toxicological Letters* 1996, 89:215-221.

Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochmical Journal* 1993, 294:1-14.

Zamai L, Falcieri E, Merhefka G, Vitale M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 1996; 23:303-311.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183:1533-1544.

Zucker RM, Elstein KH, Easterling RE, Massaro EJ. Flow cytometric discrimination of mitotic nuclei by right-angle light scatter. *Cytometry* 1988; 9:226-231.

Veröffentlichungen

Posterbeiträge:

Romanakis K, **Genzlinger A**, Gadhia P, Zankl H. Flow cytometric measurements of spontaneous apoptotic cells in fresh tumor samples. 2. Regensburger Workshop in Life Sciences, 23.-25. September 1994 / 7. Heidelberger Zytometrie Symposium, 20.-22. Oktober 1994.

Genzlinger A, Eisenbrand G, Romanakis K, Zankl H. Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch 2-trans,6-cis-Nonadienal bei 5 verschiedenen Zellinien. Symposium „Forschungsschwerpunkt Biotechnologie“ an der Universität Kaiserslautern, 3.Dezember 1996.

Niederberger E, Marko D, **Genzlinger A**, Zankl H, Tang W, Eisenbrand G. Inhibition of Topoisomerase I+II by Flavones from the chinese plant *Scutellaria Baicalensis*. The eight Conference on DNA topoisomerases in therapy, 15.-17. Oktober 1997 in Amsterdam, Abstractbook, S.27.

Genzlinger A, Romanakis K, Janzowski C, Zankl H. Induktion von Apoptose durch 2-Cyclohexen-1-on bei 4 humanen Leukämiezellinien sowie humanen Blutlymphozyten. 10. Heidelberger Zytometrie Symposium, 23.-25. Oktober 1997, ISSN 0949-5347, S.75.

Genzlinger A, Zimmermann I, Janzowski C, Zankl H. Determination of apoptosis and mutagenic effects of 2-Cyclohexen-1-on in human leukemic cell lines and peripheral blood lymphocytes. Symposium of the DFG-Senate Commission on Food Safety, Carcinogenic/Anticarcinogenic Factors in Food: Novel Concepts, 4.-7. Oktober 1998. Ed.: Gerhard Eisenbrand, Weinheim; New York, NY: VCH, im Druck.

Niederberger E, Meiers S, **Genzlinger A**, Zankl H, Tang W,Eisenbrand G and Marko D. Flavones and Inhibition of Tumor Cell Growth: New Aspects on the Mechanism of Action. Symposium of the DFG-Senate Commission on Food Safety,Carcinogenic/ Anticarcinogenic Factors in Food: Novel Concepts, 4.-7. Oktober 1998. Ed.: Gerhard Eisenbrand, Weinheim; New York, NY: VCH, im Druck.

Lebenslauf

Name:	Anja Eva Genzlinger
Geburtsdatum:	02. August 1967
Geburtsort:	Mannheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Bildungsgang:

1974-1978	Schiller-Grundschule in Ludwigshafen-Mundenheim
1978-1987	Staatl. Geschwister-Scholl-Gymnasium in Ludwigshafen
1987-1988	Studium der Chemie an der TH Darmstadt
1988-1994	Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
Oktober 1990	Vordiplom
1992-1994	Diplomarbeit in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern
	Titel der Diplomarbeit: Vergleichende Untersuchungen an humanen Mammatumoren mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Interphasezytogenetik
Januar 1994	Abschluß des Studiums als Diplom-Biologin
Seit Februar 1994	Promotion in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern