

**Universitätsklinikum Eppendorf  
Institut für medizinische Biochemie  
und Molekularbiologie**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
von Harriet Bordon**

*„Wirkung von Inositolphosphatkinase-Inhibitoren auf  
den Inositolphosphatstoffwechsel und das Wachstum  
von chinese-hamster-ovary-cells (CHO)“*

Betreuer: Prof. Dr. G.W. Mayr  
Institut für medizinische Biochemie  
und Molekularbiologie

Hamburg 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 01.07.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagner

Referent: Prof. Dr. G.W. Mayr

Koreferent: Prof. Dr. G.W. Mayr

mündliche Prüfung am: 30.07.2002

## **Abkürzungen:**

AWK	Anwachskontrolle
C	Catechin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaM	Calmodulin
CaM-Kinase-II	Calmodulin-Kinase-II
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ellagsäure
EC	Epigallocatechin
ECG	Epicatechin-3-gallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
Gossy	Gossypol
HCl	Salzsäure
HI60	human leukocyte cells
Hyp	Hypericin
K <sup>+</sup>	Kalium
Laktat-DH-X	Laktat-Dehydrogenase-X
InsP	Inositolphosphat
InsP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphate (Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> , Ins(1,3,4)P <sub>3</sub> , Ins(2,4,5)P <sub>3</sub> , Ins(1,5,6)P <sub>3</sub> )
InsP <sub>4</sub>	Inositoltetraakisphosphate (Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub> , Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub> , Ins(2,4,5,6)P <sub>4</sub> , Ins(3,4,5,6)P <sub>4</sub> )
InsP <sub>5</sub>	Inositolpentakisphosphate (Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub> , Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub> , Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub> , Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub> )

InsP <sub>6</sub>	Inositolhexakisphosphat
InsP-5-P`ase	Inositolphosphat-5-Phosphatase
IP3K	Inositol(1,4,5)trisphosphat-3-Kinase
MDD-HPLC	Metall Dye Detection-High Performance Liquid Chromatography
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P <sub>i</sub>	freies, ionisiertes Phosphat
PKC	Phosphokinase-C
PP-InsP <sub>4</sub>	D/L-Bis(1,4)Diphosphoinositol- Tetrakisphosphat
PP-InsP <sub>5</sub>	D/L-1-Diphosphoinositol-Pentakisphosphat
PtdIns	Phosphatidylinositol
S-Phase	Synthese-Phase
TEA	Triäthanolamin

# Inhaltsverzeichnis:

## 1. Einleitung: Seite 1 - 17

### *1. Einführung in die Thematik*

<b>Seite 1</b>	<b>1.1.</b> Synthese und Stoffwechsel von Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>
<b>Seite 2</b>	<b>1.2.</b> Die D-myo-Inositol(1,4,5)triphosphat-3-kinase (IP3K) ist das Schlüsselenzym im Inositolphosphatstoffwechsel
<b>Seite 5</b>	<b>1.3.</b> Die im grünen Tee enthaltenen Polyphenole und ihre Wirkung auf das Wachstum der CHO-Zellen
<b>Seite 6</b>	<b>1.4.</b> Epigallocatechingallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC) und Epicatechingallat (ECG)
<b>Seite 8</b>	<b>1.5.</b> Gossypol
<b>Seite 10</b>	<b>1.6.</b> Die verschiedenen Inositolphosphate und ihre Wirkungsweise auf zellulärer Ebene
<b>Seite 11</b>	<b>1.6.1.</b> Inositol(1,4,5)P <sub>3</sub>
<b>Seite 12</b>	<b>1.6.2.</b> Inositol(1,3,4)P <sub>3</sub>
	<b>1.6.3.</b> Inositol(2,4,5)P <sub>3</sub>
	<b>1.6.4.</b> Inositol(1,3,4,5)P <sub>4</sub>
<b>Seite 13</b>	<b>1.6.5.</b> Inositol(1,3,4,6)P <sub>4</sub>
	<b>1.6.6.</b> Inositol(1,4,5,6)P <sub>4</sub>
<b>Seite 14</b>	<b>1.6.7.</b> Inositol(3,4,5,6)P <sub>4</sub>
	<b>1.6.8.</b> Inositol(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>
	<b>1.6.9.</b> Inositol-P <sub>6</sub>
<b>Seite 16</b>	<b>1.6.10.</b> Inositolpyrophosphat (PP-InsP <sub>5</sub> +bisPP-InsP <sub>4</sub> )

## **2. Material und Methoden: Seite 18 - 33**

### **2.1. Materialien**

<b>Seite 18</b>	<b>2.1.1.</b> Chemikalien (die der MDD-HPLC aufnimmt)
<b>Seite 19</b>	<b>2.1.2.</b> Zelllinie
	<b>2.1.3.</b> Lösungen und Puffer für Zellkultur
<b>Seite 20</b>	<b>2.1.4.</b> Hemmstoffe
	<b>2.1.5.</b> Weitere Materialien

### **2.2. Geräte**

<b>Seite 21</b>	<b>2.2.1.</b> High-performance-liquid-chromatography mit Metall Indikator Detektion (MDD-HPLC)
<b>Seite 24</b>	<b>2.2.2.</b> Coulter-Counter

### **2.3. Allgemeine Arbeitsmethoden**

<b>Seite 24</b>	<b>2.3.1.</b> Sterilisation
	<b>2.3.2.</b> Aseptische Arbeitstechnik
<b>Seite 25</b>	<b>2.3.3.</b> Stammerhaltung und Subkultivierung von CHO
	<b>2.3.4.</b> Wachstumsversuche mit 2% FCS-Zusatz im DMEM
<b>Seite 25</b>	<b>2.3.5.</b> Wachstumsversuche in Mikrowell-Platten mit verschiedenen Hemmstoffen und unterschiedlichen Konzentrationen
<b>Seite 27</b>	<b>2.3.6.</b> Quantitative Analyse des Inositolphosphatspektrums in CHO-Zellen nach Gossypolbehandlung mittels MDD- HPLC
<b>Seite 29</b>	<b>2.3.7.</b> HPLC-Analytik mit der Micro-MDD-Methode
<b>Seite 30</b>	<b>2.3.8.</b> Zell-Vitalitätstest
	<b>2.3.9.</b> Mykoplasmentest

### **3. Ergebnisse: Seite 34 - 64**

<b>Seite 34</b>	<b>3.1.</b> Wachstumsverhalten von CHO-Zellen
<b>Seite 35</b>	<b>3.2.</b> Wachstumsversuche mit Hemmstoffzusatz in Mikrowells
<b>Seite 36</b>	<b>3.3.</b> Die Einflüsse von Epicatechin-3-gallat auf das Zellwachstum von CHO-Zellen
<b>Seite 37</b>	<b>3.4.</b> Die Einflüsse von Epigallocatechin auf das Zellwachstum von CHO-Zellen
<b>Seite 38</b>	<b>3.5.</b> Die Einflüsse von Epigallocatechin-3-gallat auf das Zellwachstum von CHO-Zellen
<b>Seite 39</b>	<b>3.6.</b> Wachstumsversuche mit Hypericin
<b>Seite 40</b>	<b>3.7.</b> Wachstumsversuche mit Gossypol
<b>Seite 42</b>	<b>3.8.</b> Verteilungsmuster der Inositolphosphatisomere am Beispiel eines einzelnen Wachstumsversuches (Nr.12)
<b>Seite 45</b>	<b>3.9.</b> Ergebnisse und Auswertungen aller Wachstumsversuche mit Gossypol Zusatz
<b>Seite 57</b>	<b>3.10.</b> Darstellung der Inositolphosphat-Chromatogramme am Beispiel eines Wachstumsversuches
<b>Seite 59</b>	<b>3.11.</b> Auswertungen der Viability-Tests

### **4. Diskussion: Seite 65 - 80**

<b>Seite 65</b>	<b>4.1.</b> Optimierung der Wachstumsbedingungen und des Versuchsaufbaus
<b>Seite 66</b>	<b>4.1.1.</b> Wachstumshemmung durch IP3K-Hemmstoffe
<b>Seite 67</b>	<b>4.2.</b> Das InsP-Massenspektrum in CHO-Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen

<b>Seite 69</b>	<b>4.3.</b> Das InsP-Massenspektrum in CHO-Zellen unter dem Einfluss von 2 $\mu$ M Gossypol
<b>Seite 73</b>	<b>4.4.</b> Gesteigerte Synthese von InsP <sub>6</sub> und 5PP-IP <sub>5</sub> unter Gossypolwirkung
	<b>4.5.</b> Gossypol und seine Wirkungsweise auf die Zellreplikation
<b>Seite 74</b>	<b>4.6.</b> Allgemeines zum Wirkstoff Gossypol
<b>Seite 76</b>	<b>4.7.</b> Vergleich zwischen normalen und gehemmten Wachstum der CHO-Zellen
	<b>4.8.</b> Die Wirkung von Gossypol auf die IP3K bei CHO-Zellen
<b>Seite 77</b>	<b>4.9.</b> Andere Substanzen die zu einer Steigerung des InsP-Haushaltes in Zellen führen
<b>Seite 78</b>	<b>4.10.</b> InsP <sub>6</sub> -Synthese
<b>Seite 79</b>	<b>4.11.</b> Wirkung von exogen zugeführten InsP <sub>6</sub> auf das Zellwachstum
	<b>4.12.</b> Wirkungsweise von Gossypol auf CHO-Zellen

**5. Zusammenfassung: Seite 81 - 82**

**6. Literaturangaben: Seite 83 – 90**

**7. Anhang: Lebenslauf**



# 1. Einleitung

## **1. Einführung in die Thematik:**

Die unterschiedlichen interzellulären Kommunikationsmöglichkeiten wie die Sekretion von chemischen Botenstoffen, das Vorhandensein intrazellulärer und membranständiger Rezeptoren, sowie die „gap junctions“ ermöglichen jeder Zellpopulation die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen, wie Wachstum, Zellteilung und Ausdifferenzierung. Gesteuert werden diese Funktionen durch ein komplexes Zusammenspiel von stimulierenden und hemmenden Signalen innerhalb der Zelle (homöostatische Signale) und außerhalb der Zelle (trophische und leistungssteuernde Signale, Überlebens- und Wachstumssignale), die es der Zelle ermöglichen eine stringente und präzise Kontrolle über die Replikation und Apoptoseinduktion zu erlangen. Entsteht in dem geregelten Informationsfluss ein Defekt, kommt es unter Anderem zur Neoplasieentstehung und damit zum ungehemmten Zellwachstum. Höher phosphorylierte Inositolphosphate, wie  $\text{InsP}_4$ ,  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  haben offensichtlich eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum, wobei einige Inositolphosphate auch inhibitorisch wirken. Polyphenole aus dem grünen Tee und der Wirkstoff Gossypol, beides potente Inhibitoren der Inositol(1,4,5) $\text{P}_3$ -3-Kinase (IP3K), können so indirekt in kultivierten Zellen die Synthese von  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  unterbinden. Durch die Hemmung der IP3K wird das Schlüsselenzym des Inositolphosphatstoffwechsels blockiert. IP3K ist ubiquitär in allen tierischen Geweben enthalten (Irvine et al., 1986) und katalysiert die Bildung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ist das Substrat, von dem in tierischen Zellen offensichtlich alle weiteren, höher phosphorylierten Inositolphosphate ausgehen. Diese Eigenschaften geben diesem Enzym eine Schlüsselposition im Inositolphosphatstoffwechsel. In dieser Studie wird nun deren potentielle antiproliferative und apoptotische Wirkung auf tierische Ovarialkarzinomzellen (CHO: chinese hamster ovary carcinoma cells) untersucht.

### **1.1. Synthese und Stoffwechsel von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$**

Durch die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls an G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren kommt es in vielen Fällen durch die Stimulierung der  $\alpha$ -Untereinheit trimerer G-Proteine des Typs  $G_0$  oder  $G_\alpha$ , zur Aktivierung der Phospholipase- $C_\beta$ . Dieses Enzym wird dann an dem freiwerdenden  $\beta/\gamma$ -Komplex der G-Proteine, an der Innenseite der Plasmamembran verankert und spaltet im aktivierten Zustand Phosphatidyl-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositol(1,4,5)trisphosphat ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ). Beide Spaltprodukte dienen der Zelle als second messenger. Alternativ kann die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren Phospholipase C- $\gamma$  aktivieren. Dieser Weg führt ebenfalls zur Freisetzung dieser beiden sekundären Botenstoffe (bereits Lehrbuchwissen).  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  ist ein kleines, hydrophiles Molekül, das sofort ins Zytosol diffundiert und an einen spezifischen, tetrameren Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet. Daraufhin erfolgt eine Konformationsänderung, die zur Öffnung von Kalzium-Kanälen im ER führt. In der Folge (binnen 5 s bis einigen min) kommt es zu einem kurzfristigen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch es zu einer Aktivierung multipler  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin-Komplex-abhängiger Proteine kommt.

### **1.2. Die *D*-myo-inositol(1,4,5)trisphosphat-3-kinase (IP3K) ist das Schlüsselenzym im anabolen Inositolphosphatstoffwechsel**

Der kurzfristige kalziummobilisierende Effekt von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  wird durch zwei verschiedene Wege abgeschaltet. Zum Einen kann das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  über die 5-Phosphatasen zu  $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$  dephosphoryliert werden, das weiter durch eine 1-Phosphatase oder 4-Phosphatase zu *myo*-Inositol abgebaut wird (Inhorn und Majerus, 1988).  $\text{Ins}$ -1P,  $\text{Ins}$ -3P und  $\text{Ins}$ -4P dienen dem Recycling der Phosphoinositide. Von der 5-Phosphatase existieren bisher vier bekannte Subgruppen (Typ1-4), die alle eine hydrolytische Spaltung der fünften Phosphatgruppe verschiedenster Inositolphosphate katalysieren (A.B. Jefferson et

al., 1997, B. Verjans et al., 1994, K. Laxminarayan et al., 1994, A.B. Jefferson et al., 1995, S.P. Jackson et al., 1995, S.B. Shears, 1998). Zum Anderen entsteht durch die IP3K aus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  das  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ . Dieses  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ist der Ausgangsmetabolit für alle weiteren, höher phosphorylierten Inositolphosphate, von denen einige spezielle biologische Funktionen besitzen. Die IP3K bindet mit sehr hoher Spezifität und Affinität an ihr Substrat, das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , wie die  $K_m$ -Werte zwischen 0,4 und 2,1  $\mu\text{M}$  zeigen. 1990 wurden zwei Isoformen der IP3K entdeckt und die complementary-DNA dieser Isoformen A und B aus dem Hirngewebe vom Menschen und der Ratte isoliert. Man fand heraus, dass Ratten-IP3K und humane IP3K zu 93% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen. Bei der Isoform-A handelt es sich um ein 51 kDa und bei der Isoform-B um ein 74 kDa (Ratte) bzw. 65 kDa (Mensch) schweres Protein. (Takazawa et al., 1991, Lin A. et al., 1993, Vanweyenberg et al., 1995). Mittlerweile wurde im Labor von Prof. Mayr die vollständige complementary-DNA der B-Form kloniert, welche für ein Protein mit knapp über 100 kDa codiert (Mayr G., unveröffentlicht). Kürzlich wurde noch eine Isoform-C entdeckt. Diese besitzt ein Molekulargewicht von 75.207 kDa und eine  $K_m$  für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  von 6  $\mu\text{M}$ . Isoliert wurde die Isoform-C aus Bakterienzellen ( $\text{DH5}\alpha\text{F}'$ ) und Hefezellen (COS-7). Die IP3K-Isoform-C zeigt nur eine geringe Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexe im Vergleich zu den anderen Isoformen (Dewaste V. et al., 2000). Inzwischen wurde die IP3K aus verschiedenen Geweben identifiziert, wie z.B. aus: Hirn, Leber, Erythrozyten, Makrophagen, glatte Muskulatur, Retina und humanen Thrombozyten (Irvine et al., 1986; Biden et al., 1988; Morris et al., 1987; Tarver et al., 1988; Lin et al., 1989; King und Rittenhouse, 1989). Das generalisierte Vorkommen der IP3K spricht für eine wichtige Position im Signalstoffwechsel der Inositolphosphate. Gewebe von humaner und tierischer Herkunft, mit besonders hoher Expression an IP3K-Isoform-A sind neuronale Zellen des Cortex, Hippocampus und Cerebellum (Takazawa et al., 1990). Zwischen den drei Isoformen bestehen große Differenzen im Bereich der N-terminalen Domäne, die eine bisher noch unbekannte Funktion beinhaltet. Es besteht eine größere Homologie in Bezug auf die Calmodulin-Bindungsstelle. Die höchste Übereinstimmung beinhaltet die C-terminale katalytische Domäne (Bertsch U. et al., 1998). Aufgrund mehrerer Berichte liegt die Vermutung nahe, dass die IP3K über rezeptorvermittelte, aktivierte

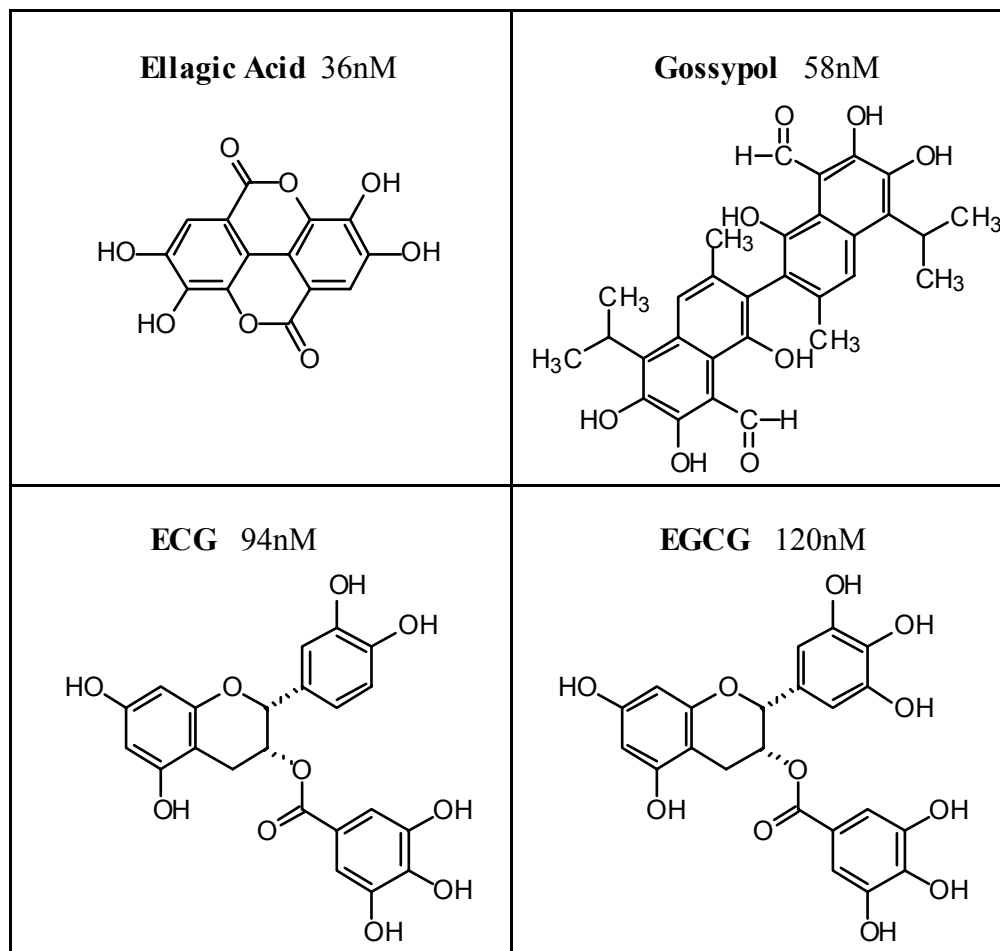
Proteinkinasen (PKC, cAMP-abhängige Proteinkinase-A, CaM-kinase-II) phosphoryliert und damit aktiviert wird (Wymann et al., 1998; Communi et al., 1997; Takazawa et al., 1990). So bewirken Carbachol, Acetylcholin, UTP, Okadainsäure und Calmodulin-Kinase-II einen vorübergehenden Anstieg der IP3K-Aktivität in der Zelle. CaM-Kinase-II ist eine der bedeutetsten Proteinkinasen in neuronalen Geweben. Es spielt eine signifikante Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung und vielleicht auch eine Rolle bei der sogenannten long term potentiation (LTP). IP3K-A kommt in besonders hohen Konzentrationen in den Dendriten des Hippocampus und den cerebellären Purkinjezellen vor, was für eine bedeutende Rolle bei der Langzeitwirkung und Langzeitabnahme von synaptischen Übertragungen sprechen könnte (Choi et al., 1990). Experimentell konnte gezeigt werden, dass durch einen CaM-Kinase-II-Inhibitor die IP3K-Aktivität gehemmt wird (Communi, Vanweyenberg, Erneux, 1997). Die CaM-abhängige IP3K kann über zwei Wege aktiviert werden. Zum Einen direkt über Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ :CaM und zum Anderen über eine Phosphorylierung der IP3K (Takazawa et al., 1988; Communi et al., 1994). Durch die Phosphorylierung des Enzyms (Isoform-A) erhöht sich sowohl seine Aktivität, als auch seine Sensitivität gegenüber dem  $\text{Ca}^{2+}$ :CaM-Komplex. Die Stimulation durch CaM ist dosisabhängig und spielt sich im nanomolaren Bereich ab. Das Wirkungsmaximum des Enzyms liegt bei einem pH-Optimum von 7,2. In der Gegenwart von Calmodulin kommt es zu einer biphasischen Antwort mit einem Anstieg der zellulären Kalzium-Konzentration. Erhöht sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-7}$  auf  $10^{-6}$ , dann erhöht sich die IP3K-Aktivität um das 1,5-fache. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weiterhin an, kommt es zu einem Abfall der Enzymaktivität. (Lin, Wallace, Barnes, 1993).

Durch die Inhibition der IP3K kommt es in den bisher untersuchten Zelltypen zu einer Blockade in der Synthese höher phosphorylierter Inositole. Die dadurch reduzierte, oder fehlende Bildung von  $\text{InsP}_5$  und  $\text{InsP}_6$  bewirkt eine Wachstumsstagnation einiger kultivierter Zellen (Dissertation K. Hillemeier, 2001). Inhibitoren der IP3K (in vitro) vom Typ der Polyphenole aus dem grünen Tee, sowie der Wirkstoff Gossypol, aus der Baumwollpflanze hemmen in diesen bisher untersuchten Zelltypen (Jurkat-T-, 3T3-Zellen) das Zellwachstum. Da die genannten Hemmstoffe auch noch andere zelluläre Signaltransduktionsenzyme und wachstumsrelevante Funktionsproteine, wie z.B. die Topoisomerase-II hemmen, ist es von besonderer Wichtigkeit, den

kausalen Zusammenhang der Wirkung auf das Zellwachstum, mit dem hemmenden Effekt der IP3K weiter zu untersuchen.

### 1.3. Die im grünen Tee enthaltenen Polyphenole und ihre Wirkung auf das Wachstum von CHO-Zellen

Frischer grüner Tee (*Camellia sinensis*) besteht zu 36% aus Polyphenolen, 25% Kohlenhydraten, 15% Proteinen, 4% Aminosäuren und 1,5% organischen Säuren (Trockengewicht). Die 36% der Polyphenole teilen sich folgendermaßen auf: 40-60% Epigallocatechingallat (EGCG), 10-20% Epigallocatechin (EGC), 10-20% Epicatechingallat (ECG), 4-6% Epicatechin (EC) und 2-4% Katechin (N. Matsuo, K.Yamada et al.;1997)



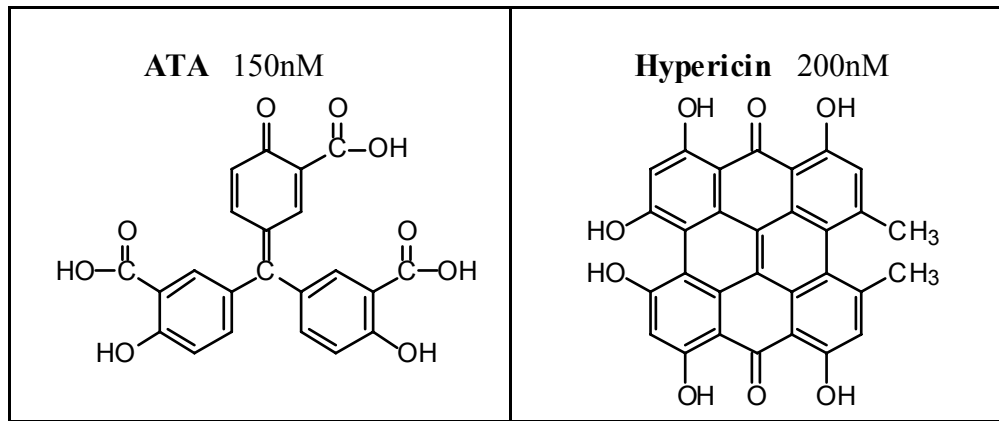


Diagramm 1) Darstellung der chemischen Strukturformeln der eingesetzten Hemmstoffe Ellagicsäure, Gossypol, ECG, EGC, EGCG, ATA und Hypericin, die Zahlen in nM geben den  $IC_{50}$ -Wert für die Ins(1,4,5) $P_3$ -3-Kinase-Hemmung an. ( Die Strukturformeln und  $IC_{50}$ -Werte wurden freundlicher weise von K. Hillemeier zur Verfügung gestellt)

#### **1.4. Epigallocatechingallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC) und Epicatechingallat (ECG)**

EGCG ist der Hauptbestandteil der Polyphenole im grünen Tee und dessen Extrakten. In der letzten Zeit wurde viel zur Wirkungsweise von Polyphenolen geforscht. Dabei entdeckte man zahlreiche protektive Mechanismen, wie antioxidative, antiatherosklerotische, antitumoröse, antibakterielle, sowie inhibitorische Wirkungen auf unterschiedliche Enzymgruppen, wie z.B.: die Reverse-Transkriptase und Topoisomerase-II (C.A. Austin, S. Patel et al.; 1992). Der  $IC_{50}$ -Wert des EGCG liegt für Topoisomerase-II bei 0,4  $\mu$ M und für die IP3K bei 120 nM (Hillemeier K., Promotionsarbeit). EGCG stellte sich, im Vergleich zu Ascorbinsäure und Glutathion, als signifikant besseres Antioxidans heraus (E.S. Fiala, R.S. Sodom, et al.; 1996). Anhand von Wachstumsversuchen mit einer menschlichen Lungenkrebszelllinie (PC-9), zeigte sich in Bezug auf den Zellzyklus, eine Zunahme der Zellen, die sich in der  $G_2M$ -Phase befinden von 13,8% (ohne Hemmstoff) auf 24,1% (mit 100  $\mu$ M EGCG). Zusätzlich zeigte sich eine Abnahme des Mitoseindex von 11,6% (unbehandelte PC-9-Zellen) auf 7,25% (mit 100  $\mu$ M EGCG). Mit Hilfe von Mikroautoradiographie zeigte sich, dass sich radioaktiv markiertes EGCG in der Membran, im Zytosol sowie im Nucleolus anreichert, was für eine multifunktionale

Wirkungsweise des EGCG spricht. (S.Okabe, M.Suganuma, M.Hayashi, E.Sueoka, A.Komori und H.Fujiki; Jpn. J. Cancer Res., 1997). Man vermutet, dass EGCG die Interaktion zwischen Tumorpromoter und seinem Rezeptor blockiert, der sogenannte "sealing-effect of EGCG". (S.Yoshizawa, T.Horiuchi, M.Suganuma, S.Nishiwaki, J.Yatsunami, S.Okabe et al., American Chemical Society Press, 1992). Anhand von Versuchen mit basophilen Leukämiezellen von Ratten, die mit verschiedenen Konzentrationen von Polyphenolen (EGCG, EGC, ECG, EC, C) behandelt worden sind, zeigte sich ein histamininhibitorischer Effekt. Die Hemmung der Histaminausschüttung dieser Zellen ist dosisabhängig und scheint in einem direkten Zusammenhang mit der Triphenolstruktur dieser Stoffe zu stehen. Die stärkste Histamininhibition besitzt EGCG (100 µM hemmen zu 59%), welches zwei Triphenolstrukturen beinhaltet. EGC (100 µM hemmen zu 18%) und ECG (100 µM hemmen zu 35%) mit jeweils nur einer Triphenolstruktur sind schwächere Histamininhibitoren, im Gegensatz zu Epikatechin (EC) und Katechin (C), die in ihrer Strukturformel keine Triphenolstruktur enthalten haben und somit auch keine Hemmung der Histaminliberation bewirken (N.Matsuo, K.Yamada, K.Shoji et al.; 1997).

Es gibt bisher zwei bekannte Mechanismen, um Mastzellen zur Produktion und Freisetzung von chemischen Mediatoren zu stimulieren. Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, sowie deren hervorgerufene Aktivierung der Proteinkinase-C, führen zu einer Histaminausschüttung. Zusätzlich aktiviert das erhöhte Kalzium die Phospholipase-A, wodurch es zu einer verstärkten Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen kommt. Da es bei den Hemmversuchen mit EGCG und den anderen Polyphenolen zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration kommt, also folglich auch  $\text{InsP}_3$  und DAG gebildet werden, greifen diese Stoffe in die metabolischen Geschehnisse nach dem Anstieg des intrazellulären Kalziums und vermutlich auch nach Produktion des  $\text{InsP}_3$  in vitro ein (z.B. über eine Hemmung der  $\text{IP}_3$ -Kinase). Andere Studien belegten, dass Katechinverbindungen in der Lage sind, (EGC, EGCG, Persimmonextrakt) in Zellen eine Apoptose zu induzieren und dadurch limitierend auf das Zellwachstum zu wirken (H.Hibasami, Y.Achiwa et al.; 1996). Die Topoisomerase-II ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle zu Beginn der DNA-Replikation spielt. Dieses Enzym bewirkt die Auflösung der DNA-Helixstruktur und

macht dadurch überhaupt ein Ablesen des Erbgutes möglich. EGCG ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor (Adlakha R.C. et al., 1989). Die  $IC_{50}$ -Werte von EGCG für die Topoisomerase-II und IP3K wurden von K. Hillemeier zur Verfügung gestellt (Dissertation, 2001).

EGCG, $IC_{50}$ -Wert für Topoisomerase-II- Hemmung	0,4 $\mu$ M
EGCG, $IC_{50}$ -Wert für IP3K-Hemmung	120 nM

Diagramm 2) Beschreibung der  $IC_{50}$ -Werte von EGCG für die Hemmung des Enzyms Topoisomerase-II (0,4  $\mu$ M) und der IP-3K (120 nM).

### 1.5. Gossypol

Gossypol ist eine polyphenolische Verbindung, die in den Pigmentdrüsen der Baumwollpflanze (Malvaceae) enthalten ist. Bekannt wurde Gossypol, aus klinischen Versuchen, über nicht-steroidale, orale, männliche Kontrazeptiva. Zahlreiche Versuche zeigten, dass Gossypol über direkte Mitochondrienschädigung, Unterbindung der Zellkommunikation über gap-junctions (Barhoumi R. and Burghardt R.C., 1995) und durch Stimulation, oder Hemmung zahlreicher Enzymgruppen, (besonders die den Energiemetabolismus betreffenden), in vielfältiger Weise auf den Zellstoffwechsel einwirkt.

Diese Stoffgruppe ist unter anderem ein potenter Inhibitor der Laktat-DH-X, die zu 40% in den Mitochondrien lokalisiert ist und zu 60% zytosolisch. Die Aktivität dieses Enzyms ist stark mit der Beweglichkeit der Spermien assoziiert. Gossypol hemmt die Spermienmotilität (K.L. Oligiati, W.A.Jr. Toscano et al.; 1983) und führt zu einer Umorganisation von Hodenepithel, wodurch es zu einer irreversiblen Verdrängung der Spermatozyten kommt (A. Ranga, N.R. Kalla, U. Kanwar; 1990).

Es existieren verschiedene optische Isomere von Gossypol, wobei sich das (-) - Isomer, in Bezug auf seine antiproliferative und kontrazeptive Wirkung, als die potenteste Form herausstellte (3,6 bis 12,4-fach höhere Wirkung in Bezug auf die (+)



-Form und 1,48-2,65-fach höher, in Bezug auf die (+/-) -Form). Die schwächere Wirkung des (+) -Isomers erklärt sich durch eine erhöhte Bindungsaffinität an Serumproteine, wodurch die Bioverfügbarkeit reduziert wird (Wang J.M. et al., 1992). Gossypol reagiert mit vielen Makromolekülen der Zelle, indem es eine kovalente Bindung mit  $\epsilon$ -Aminosäuren über eine Schiff'sche Basenkondensation eingeht und darüber möglicherweise für den Gossypoleffekt verantwortlich ist (Adams et al., 1960; Strom-Hansen et al., 1989; Adlakha R.C. et al., 1989; Yu Bao-Zhu et al., 1997). Da Gossypol zahlreiche Enzyme hemmt, hat man bisher dazu geneigt seine Wirkung durch eher nicht-spezifische Interaktion mit wichtigen Zellwachstums regulierenden Proteinen zu erklären. Mit der Hemmung der IP3K durch Gossypol wurde nun jedoch das bisher höchstafine, zelluläre Target des Wirkstoffes gefunden, so dass bisher unerkannte spezifische Wirkungen durchaus auch möglich erscheinen. Sensitivster Indikator der wachstumshemmenden Gossypol-Wirkung ist eine Abnahme der DNA-Syntheserate, RNA-Syntheserate sowie die Hemmung der Proteinbiosynthese (V. Band, A.P. Hoffer et al.; 1989). Versuche mit Prostatazellen der Ratte zeigten, dass 0,02  $\mu$ M Gossypol ausreichen, um einen Rückgang der sich in der S-Phase befindenden Zellen, zu verzeichnen und zwar von 43 auf 31% (S.M. Chang, L.F. Lei, L. Tian; 1992). Im Gegensatz dazu stehen die Daten von Rosenberg, der bereits 1986 zeigte, dass sich mit Gossypol behandelte HeLa-Zellen durch Hemmung der DNA-Polymerase in der S-Phase arrestieren lassen (Rosenberg et al., 1986). Hierfür verantwortlich ist eine Blockade von Enzymen, die maßgeblich an der Replikation und Reparatur der DNA beteiligt sind (DNA-Polymerase, Ribonucleotid-Reduktase, Topoisomerase-II). Der  $IC_{50}$ -Wert von Gossypol für die Topoisomerase-II liegt bei 4  $\mu$ M. Die Zellen treten zwar noch in die S-Phase ein, es findet aber keine vollständige DNA-Replikation mehr statt (Adlakha R.C. et al., 1989). Zusätzlich führt Gossypol zu einem dosisabhängigen Absinken der Serumkonzentration von Schilddrüsenhormonen bei jungen Ratten. Histopathologisch findet man eine Degeneration von Schilddrüsenfollikeln (Y. Rikihisa, Y.C. Lin; 1989). Weiterhin verfügt Gossypol über einen antiinflammatorischen Effekt (dosis- und zeitabhängig), indem es verantwortlich ist für die erhöhte Expression des Mac-1-Gens (kodiert für CD11b und CD18, welches Oberflächenantigene von neutrophilen Leukozyten sind), sowie die verstärkte Produktion von Superoxid in Neutrophilen. 3-5

$\mu\text{M}$  Gossypol bewirken nach einer Einwirkungszeit von 15 Minuten eine um den Faktor 14 gesteigerte Expression des Mac-1-Gens, im Vergleich zu der Kontrolle. (In Vitro-Versuche mit humanen Neutrophilen mit einer Gossypolkonzentration von 3-20  $\mu\text{M}$ ; P. Benhaim, S.J. Mathes et al.; 1994).

Bei Langzeitbehandlung mit höher dosiertem Gossypol zeigte sich, als eine akute und subchronische Nebenwirkungen, eine Hypokaliämie und eine permanente Sterilität (A. de Peyster and Y.Y. Wang, 1993). Die Hypokaliämie ist auf die Hemmung der  $11\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zurückzuführen, wodurch aktives Kortisol nicht mehr inaktiviert wird und es zu einem mineralkortikoiden Effekt kommt (J. Guo and M.M. Reidenberg, 1998). Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Gossypol für die IP3K liegt gegenüber anderen bekannten zellulären Targets deutlich niedriger, nämlich bei 58 nM (Hillemeier K., Promotionsarbeit in Vorbereitung).

Gossypol, $\text{IC}_{50}$ -Wert für Topoisomerase-II-Hemmung	4 $\mu\text{M}$
Gossypol, $\text{IC}_{50}$ -Wert für IP3K-Hemmung	58 nM

Diagramm 3) Beschreibung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Gossypol für die Hemmung des Enzyms Topoisomerase-II (4  $\mu\text{M}$ ) und der IP-3K (58 nM). Die Daten wurden von K. Hillemeier bereitgestellt, die mit Hilfe des Topoisomerase-II Drug Screening Kits der Firma TopoGen (USA) die Reaktionsansätze zusammen pipettierte und nach Stoppen der Reaktion eine Elektrophorese durchführte (Dissertation Hillemeier K., 2001).

### **1.6. Die verschiedenen Inositolphosphate und ihre Wirkungsweise auf zellulärer Ebene**

Einige Inositolphosphate wie  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  beeinflussen die intrazelluläre Kalziumhomöostase. Für die kalziummobilisierende Wirkungsweise scheint die Phosphorylierung an der 4. und 5. Position des *myo*-Inositolrings, sowie das Vorhandensein zweier benachbarter OH-Gruppen ausschlaggebend zu sein. Der Phosphoinositol-Stoffwechsel ist bei

neoplastischen Prozessen stark erhöht, weil Onkogene (ras, src, erbB)

Tyrosinkinassen aktivieren, die wiederum die Tyrosingruppen der Phospholipase-C phosphorylieren und damit aktivieren (Wahl M.I., 1989, Mayr G.W., 1990).

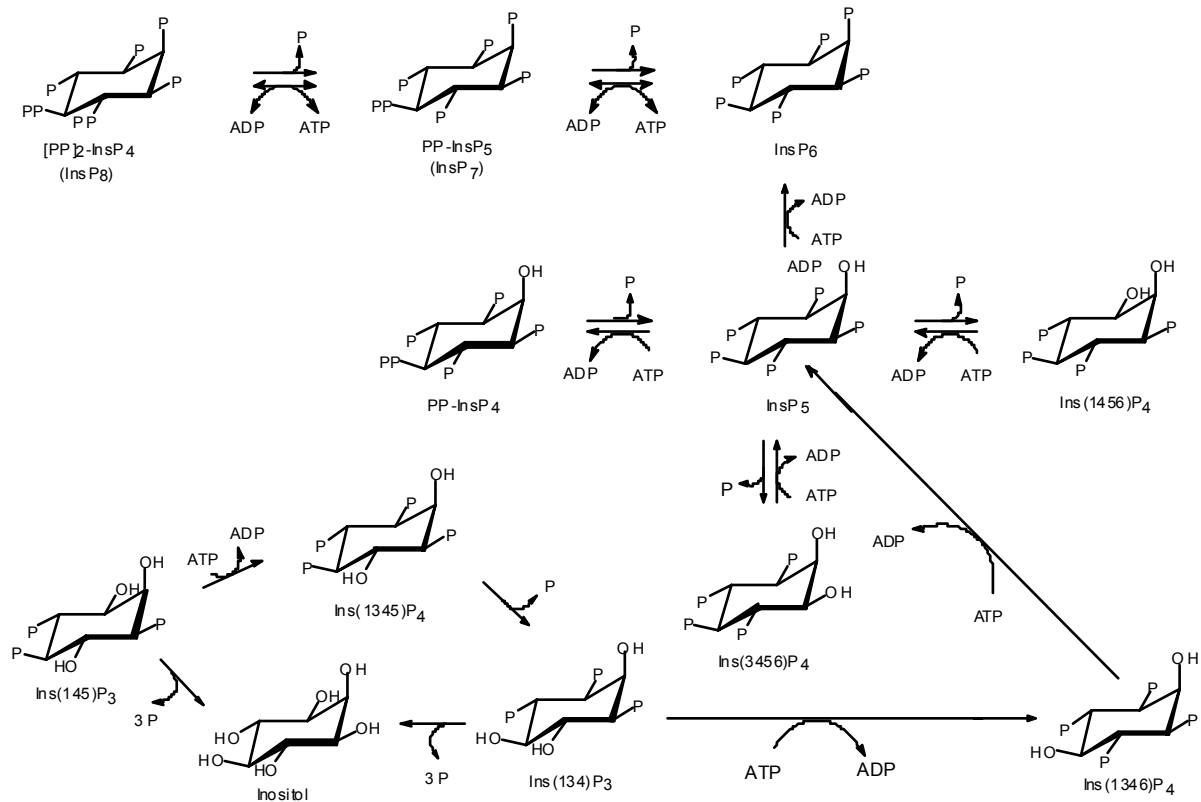


Diagramm 4) Darstellung der Synthese und des Abbaus der einzelnen Inositolphosphatisomere vom einfachen Inositol bis zum InsP<sub>8</sub> (aus dem Review von Stephen B. Shears, 1998).

### 1.6.1. Inositol(1,4,5)P<sub>3</sub>

Ist eins der Spaltprodukte, dass bei der Phospholipase-C katalysierten, hydrolytischen Spaltung aus Inositol(4,5)bisphosphat entsteht. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> wird durch die membranständige, Magnesium-abhängige Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-5-Phosphatase zu Ins(1,4)P<sub>2</sub> deaktiviert, welches selber nur noch über eine äußerst geringe Kalzium-mobilisierende Wirkung verfügt. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> führt nach Andocken an einen spezifischen Kalziumkanal-Rezeptor im ER zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums (Streb H. et al., 1983). Dieser Initiale sehr kurzfristige

Konzentrationsanstieg (unabhängig von den membranösen L+T-Typ-Kalziumkanälen) ist gefolgt von einem bemerkenswerten Anstieg von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (8-facher Konzentrationsanstieg für 15 Sekunden, danach Abfall bis zum Basalwert) (Li G. et al., 1992).

### **1.6.2. Inositol(1,3,4) $\text{P}_3$**

Entsteht aus  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , durch die Dephosphorylierung (InsP-5-Phosphatase) an der 5. Position. Wird über weitere Dephosphorylierungsschritte, über  $\text{Ins}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$  zu *myo*-Inositol abgebaut, oder zu  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  phosphoryliert ( $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ -6-Kinase). Von diesem  $\text{InsP}_4$  aus, entstehen alle weiteren bekannten  $\text{InsP}_5$ ,  $\text{InsP}_6$  und  $5\text{PPInsP}_5$ .  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  öffnet ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im ER (Irvine R.F., 1986; Mayr G.W., 1988).

### **1.6.3. Inositol(2,4,5) $\text{P}_3$**

Besitzt einen zum  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  fast identischen kalziummobilisierenden Effekt (Burgess G.M., 1984; Mayr G.W., 1988). Es besteht ein Synergismus in der  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Wirkung zwischen  $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  (S.B.Shears, 1998).

### **1.6.4. Inositol(1,3,4,5) $\text{P}_4$**

Ist keinesfalls nur das Inaktivierungsprodukt von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  sondern veranlasst möglicherweise selbst die Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und kalziumabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanälen in den Plasmamembranen (Irvine R.F. et al., 1992). Es dient als Verstärkungsmechanismus des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Zusätzlich ist es Ausgangspunkt für alle weiteren, höher phosphorylierten Inositolphosphate, über den Zwischenschritt einer Dephosphorylierung zu  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  (Mayr G.W., 1988). Als Antwort auf die kurzfristige  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung ( $\text{InsP}_3$ -Wirkung) bewirkt  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  einen langanhaltenden, Kalzium-Influx über die Plasmamembran (Li G. et al., 1992; Jun

K.S. et al. 1996). Durch das Klonen von Schweinethrombozyten entdeckte Cullen 1995 ein spezifisches  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Bindungsprotein. Dieses Bindungsprotein gehört zu den GTP`ase-aktivierenden Proteinen (GAP-1). Es zeigt GAP-Aktivität gegenüber *ras* und wird spezifisch über  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  stimuliert.

Immunzytochemische Untersuchungen ergaben, dass das Bindungsprotein in der Plasmamembran vorkommt (Lockyer P.J. et al., 1998). Die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  scheint die Loslösung des GAP-1-Proteins von der Membran zu bewirken und damit auch seine GAP-Aktivität zu erhöhen (Shears S.B., 1998).  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  bindet an membranständige und nukleäre Rezeptoren, sowie an  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  /  $\text{InsP}_6$ -Rezeptorproteine.

$\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{InsP}_6$  und  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  hemmen die Funktion von Vesikeladaptern und Proteincoating. Zusätzlich findet eine Bindung mit der  $\text{C}_2\text{B}$ -Domäne des cerebralen Proteins Synaptogamin II statt, wodurch die Transmitterfreisetzung in der präsynaptischen Membran unterbunden wird (Jun K.S. et al. 1996). Die kürzlich identifizierten  $\text{InsP}_4$ -Rezeptorprotein (p42IP4) und Centaurin- $\alpha$  scheinen periphere Membranproteine zu sein, die zusätzlich als zytosolische Proteine existieren (Hammonds-Odie et al., 1996; Venkateswarlu et Cullen, 1999). Dadurch kann eine Kommunikation, ausgelöst durch  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , oder  $\text{PtdInsP}_3$ , zwischen Membranen und zytosolischen Kompartments stattfinden (Stricker L., 1997).

#### **1.6.5. Inositol(1,3,4,6) $\text{P}_4$**

Entsteht aus dem  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  durch Phosphorylierung an der 6. Position und wird zu  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  phosphoryliert. Dieses  $\text{InsP}_4$  zeigt zusammen mit  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  die höchste und langwirksamste Kalziumerhöhung in der Zelle (Li G. et al., 1992).

#### **1.6.6. Inositol(1,4,5,6) $\text{P}_4$**

Entsteht entweder durch die Phosphorylierung des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  an der 6-OH-Gruppe durch eine  $\text{InsP}_3$ -6-Kinase, oder ist das Dephosphorylierungsprodukt des  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  am 3-Phosphat. Letzterer ist in den meisten Zellen der häufigste Syntheseweg.

### **1.6.7. Inositol(3,4,5,6)P<sub>4</sub>**

Wird durch die Dephosphorylierung an der 1. Position aus Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> gebildet und blockiert selektiv epitheliale, Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare Chloridkanäle (Shears S.B., 1998; Vajanaphanich m. et al., 1994) nach muscarinergem Stimulation. Diese Wirkung kann durch das Protein Annexin verstärkt werden.

### **1.6.8. Inositol(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>**

Seine Synthese erfolgt aus Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub> und Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>. Es dient bei Vögeln als allosterischer Regulator für die Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins, ähnlich wie die Funktion des 2,3-Bisphosphoglycerat (Isaaks R.E. et al., 1980). Es bindet sich an nucleosomale Cores und das Histon-H1, sowie einige der Bindungsproteine des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Landes G.M., 1982; Mayr G.W., 1988).

### **1.6.9. Inositol-P<sub>6</sub>**

InsP<sub>6</sub> ist das am häufigsten vorkommenden Inositolphosphat, das in Pflanzen gefunden wurde (10 – 100 µM) (Huang C. et al, 1997). Sowohl InsP<sub>5</sub>, als auch InsP<sub>6</sub> unterliegen einem raschen Metabolismus. Beide sind Aktivitätsmodulatoren von glykolytischen Enzymen (Stephens L. et al., 1993). InsP<sub>6</sub> hat starke metallkomplexbildende Eigenschaften (Kalzium, Magnesium, Eisen, Zink), wofür die 1,2,3-Trisphosphatgruppe verantwortlich gemacht wird (Larsson O. et al., 1997). Zusätzlich senkt es so wie InsP<sub>5</sub> die Sauerstoffaffinität von Säuger-Hämoglobin, wodurch die arteriovenöse-Sauerstoffdifferenz ansteigt und das Herzzeitvolumen abnimmt. Ältere und neuere Studien ergaben eine tumorostatische Wirkung in vitro und in vivo. Immunzytochemische Versuchsreihen mit humanen Kolon-Karzinomzellen zeigten, dass InsP<sub>6</sub> eine Up-Regulation des Tumorsuppressor-Gens (p53, beschützt die Zelle auf molekularer Ebene vor genetischen Defekten) und des p21WAF1/CIP1-Gens (Wachstumsinhibitor) bewirkt (Saied I.T., 1998). Über 50% des InsP<sub>6</sub> sind wahrscheinlich im Kern lokalisiert, der Rest in der Zellmembran (Mayr G.W., 1990). InsP<sub>6</sub> reguliert offensichtlich Ionenkanäle über die Beeinflussung von

Phosphorylierungsprozessen. Durch die konzentrationsabhängige Inhibition ( $\text{InsP}_6$ :  $10\mu\text{M}$ ) der Serin-Threonin-Proteinphosphatase Typ 1, 2A, 3 (Typ 3 selektiv) kommt es zum Anstieg der Kalziumkanalaktivität des ladungsabhängigen L-Typs.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  ist nur ein Halb so potenter Inhibitor dieses Enzyms ( $\text{InsP}_5$ :  $50\mu\text{M}$ ) und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  sogar nur ein Fünftel so potent, wie  $\text{InsP}_6$  (Larsson O. et al., 1997; Barker C.J., 1999).  $\text{InsP}_6$  soll unter anderem auch die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3) hemmen und dadurch tumorstatisch wirken. PI-3 aktiviert epidermale Wachstumsfaktoren (Huang C. et al 1997).

Es wurden bereits mehrere  $\text{InsP}_6$ -Bindungsproteine entdeckt, wie Vinculin (Komponente des Zytoskeletts von Thrombozyten), oder ein Myelin-Proteolipid-Protein, AP-2 (Retrograder Vesikeltransport vom Golgiapparat zum ER und Wiederherstellung von plasmalem Clathrinvesikeln), AP-3 verursacht die Polymerisation von Clathrin (Endozytoseprozesse) (Beck K.A. et al., 1991; Norris F.A. et al., 1995), Synaptogamin, COP-I, *non-Histon*-Rezeptorproteine, nucleosomale Cores, Histon H1 und ein Coatomer, dass für die Regulation des Vesikeltransportes zwischen ER und Golgiapparat verantwortlich ist (Shears S., 1998). Über spezifische Bindungsproteine scheint  $\text{InsP}_6$  eine wesentliche Rolle während der DNA-Replikation, den mRNA-Export aus Kernen, der Transkription und dem vesikulären Transport zu spielen. Zusätzlich beeinflusst es die Wirkungsweise von Neurotransmittern. Neuere Versuche belegten, dass abgesehen von Proteinen auch Inositolphosphate und Phosphoinositide eine Bindung mit Phosphotyrosinbindungsdomänen (PTB) eingehen und dadurch möglicherweise einen noch unbekanntem Weg der intrazellulären Kommunikation darstellen (Takeuchi H. et al, 1998). Mit Hilfe eines rekombinant hergestellten Proteolipid-Proteins (PLP), dass hauptsächlich in den Myelinscheiden im zentralen Nervensystem vorkommt, gelang der Nachweis, dass das PLP eine hohe Bindungsaffinität zum  $\text{InsP}_6$  besitzt (Fukuzono S., 1998). Vor mehreren Jahren entdeckte man ein sogenanntes ARGR-III-Gen, dass in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) enthalten ist. Dieses Gen enthält die Information für die Synthese verschiedener, den Proteinmetabolismus regulierender Enzyme. Vor kurzem entdeckte man, dass dieses Gen ein Protein kodiert, das eine Inositolphosphat-Multikinase-Aktivität besitzt. Versuchsreihen mit defektem ARGR-III-Gen zeigten eine starke Abnahme des nukleären mRNA-Exportes, begleitet von einem reduzierten

Zellwachstums, sowie ein 170-facher Anstieg von  $\text{InsP}_3$  und eine 100-fach reduzierte Phosphorylierung von  $\text{InsP}_3$  zu  $\text{InsP}_6$  (Saiardi A. et Shears S. et al., 2000). Zu den selben Ergebnissen kamen York und seine Mitarbeiter, die ebenfalls eine Phospholipase-C abhängige Polyphosphat-Kinase aus Hefe isolierten und feststellten, dass dieses Enzym für einen effizienten mRNA-Export zuständig ist (York J.D. et al., 1999).

### **1.6.10. Inositolpyrophosphate (PP- $\text{InsP}_5$ + bisPP- $\text{InsP}_4$ )**

Seit Kurzem ist eine neue Klasse von Inositolphosphaten entdeckt worden und zwar enthalten diese  $\text{InsP}$  energiereiche Pyrophosphatgruppen. Im Zytosol von Amöben wurden zwei solcher Verbindungen entdeckt. Zum Einen das D/L-1-Diphosphoinositol-Pentakisphosphat (PP- $\text{InsP}_5$ ) und zum Anderen das D/L-Bis(1,4)-Diphosphoinositol-Tetrakisphosphat (PP- $\text{InsP}_4$ ) in Konzentrationen von 0,05 bis 0,25 mM. Diese energiereichen Verbindungen werden schnell metabolisiert und aus  $\text{InsP}_6$  und ATP synthetisiert. Sie dienen als Phosphatgruppendonatoren in Phosphotransferase-Reaktionen (Stephens L. et al., 1993). PP- $\text{InsP}_5$  und PP- $\text{InsP}_4$  können beide wieder zu  $\text{InsP}_6$  dephosphoryliert werden, dabei kann das  $\beta$ -Phosphat auch auf ADP transferiert werden und es entsteht so eine weitere energiereiche Anhydridbindung (Shears S.B., 1998). Mit Hilfe der micro-MDD-HPLC konnten verschiedene PP $\text{InsP}_5$ -Isomere isoliert werden, wie 5-PP $\text{InsP}_5$ , 4-PP $\text{InsP}_5$ , 6-PP $\text{InsP}_5$ , 1-PP $\text{InsP}_5$  und 3-PP $\text{InsP}_5$ , sowie das 4/6 Enantiomerpaar des 5-PP $\text{InsP}_5$ . Zusätzlich wurde entdeckt, dass sich die Phosphatgruppen des bis-PP $\text{InsP}_4$  (isoliert am Beispiel des Dictyosteliums) auf den Positionen 4,6 und 5 befinden. 5-PP $\text{InsP}_5$  ist bisher das einzige Isomer, welches bereits in vier weiteren Zelltypen gefunden wurde (FTC humane Schilddrüsenkrebszellen, Swiss 3T3 Fibroblasten, Jurkat-T-Zellen, CHO) (Albert C., 1997). Aus Leberzellen der Ratte wurde eine Diphosphoinositol-polyphosphat-Phosphohydrolase (DIPP) gereinigt, die das  $\beta$ -Phosphat aus den Diphosphatgruppen in PP- $\text{InsP}_5$  ( $K_m$ : 340 nM) und bisPP- $\text{InsP}_4$  ( $K_m$ : 34 nM) spaltet.  $\text{InsP}_6$  ist kein Substrat der DIPP, sondern hemmt den Metabolismus beider hochphosphorylierter Substanzen ( $IC_{50}$ : 0,2 – 3  $\mu\text{M}$ ) (Safrany S.T., 1998). Erst kürzlich wurde eine IP6-Kinase aus Hefe isoliert und geklont, sowie eine IP6-Kinase Typ 1 und 2 aus tierischen Zellen. IP6K ist ein Enzym, dass PP- $\text{InsP}_5$  synthetisiert.



Die Typ 1 IP6-Kinase phosphoryliert  $\text{InsP}_5$  mit einer  $K_m$  von  $1,2 \mu\text{M}$  und  $\text{InsP}_6$  mit einer  $K_m$  von  $6,7 \mu\text{M}$  zu *bis*PP- $\text{InsP}_4$ , während die Typ 2 IP6K und die IP6K aus Hefe eher spezifisch für die Phosphorylierung von  $\text{InsP}_6$  sind. Die IP6K aus Hefe zeigt eine 30%ige Homologie zu den tierischen IP6K Typ 1 und 2 und ist um das Dreifache größer (Saiardi A. et al., 2000).

## 2. Material und Methoden:

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien (die der MDD-HPLC aufnimmt)

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Puffer : 0.15% Bromphenolblau (1500µl)	Merck, Darmstadt
0.15% Xylencyanol (1500µl)	
1mM EDTA pH 8.0 (20µl)	
30% Glycerin (3030µl)	
H <sub>2</sub> O (3950µl)	
Ethanbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylformiat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Helium	Linde
Lyse-Mix : 0.45% Tween 20, 0.45% NP 40, 50µg Proteinkinase-K	Sigma
Methanol	Merck, Darmstadt
Minimalmedium : 140 mM NaCl	Merck, Darmstadt
5 mM KCl	
1 mM MgSO <sub>4</sub>	
1 mM CaCl <sub>2</sub>	
20 mM HEPES	
1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
5.5 mM Glucose	
pH 7.4	
Monomethylamin	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (2mM)	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF, 0.1M)	Merck, Darmstadt

n-Butanol	Merck, Darmstadt
Norit-A	Biomol, Hamburg
n-Propanol	Merck, Darmstadt
4-(2-Pyridylazo)resorcin (PAR)	Merck, Darmstadt
Petroletherbenzin	Merck, Darmstadt
Proteinase-K	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, 2M)	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau (0.4%)	Sigma cell culture
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Linde
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Yttriumchlorid	Janssen, Belgien

### **2.1.2. Zelllinie**

Bei der hier verwendete Zelllinie handelt es sich um die Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-K1). Diese adhären wachsenden, fibroblastischen Zellen stammen ursprünglich von einem Subklon eines chinesischen Hamsters ab, der auf das Jahr 1957 zurückgeht.

### **2.1.3. Lösungen und Puffer für Zellkultur**

Fötale Kälberserum, (Chargennummer: 06F 1676K und 06Q 4185)	GIBCO BRL, Eggenstein
Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) - mit L-Glutamin, 4,5 g/l D-Glucose - mit 0,1 g/l Natriumpyruvat	GIBCO BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 IU/ml-10.000 UG/ml)	GIBCO BRL, Eggenstein
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> = 10 mM - NaCl = 0,154 M - in sterilem H <sub>2</sub> O, pH 7,4 (NaOH)	Merck, Darmstadt
Trypsin (0,05%, für 4Liter)	Merck, Darmstadt

- 2 g Trypsin
- 0,8 g Titriplex III, EDTA (0,02%)
- 400 ml 10-fach PPS (steril filtriert durch Satoriusfilter), pH 7,2
- in 4l sterilem H<sub>2</sub>O, pH 7,4
- sterilisieren und bei -20 Grad Celsius lagern

### 2.1.4. Hemmstoffe

Ellagsäure	FLUKA, München
Epicatechin-3gallat (ECG)	Sigma, Deisenhofen
Epigallocatechin (EGC)	Sigma, Deisenhofen
Epigallocatechin-3gallat (EGCG)	Sigma, Deisenhofen
Gossypol	Sigma, Deisenhofen
Hypericin	Calbiochem
Myrecitin	FLUKA, München

### 2.1.5. Weitere Materialien

Flaschen für die Gewebekultur aus Polystyrol (steril) 25 und 75 cm	GREINER
Flaschen für die Gewebekultur aus Polystyrol (steril), 175 cm	NUNC
Petrischalen für Gewebekulturen aus Polystyrol, Durchmesser von 10 oder 14.5 cm	GREINER
Multi-Well-Gewebekulturplatten aus Polystyrol mit 96 Vertiefungen, Kulturfläche pro Vertiefung 0.32 cm, Füllvolumen je Vertiefung 380 µl	GREINER
Probenröhrchen mit Spitzboden aus Polypropylen, steril mit Schraubverschluß und einem Durchmesser von 30 mm und einem Füllvolumen von 50 ml (Falcon Tubes)	GREINER
Reagenzröhrchen aus Polypropylen mit Spezialstopfen, steril verpackt, Ges.Vol.14 ml, Durchmesser 17 mm	GREINER
Reaktionsgefäße aus Polypropylen für DNA/PCR (Ges.Vol. 1.5 ml)	GREINER
Pipettenspitzen, in autoklavierbaren Racks, passend für Eppendorf-pipetten, Ges.Vol. 1-5000 µl	GREINER
Pipetten	Eppendorf

Einmahl-Pipetten aus Polystyrol, steril

GREINER

## 2.2. Geräte

### 2.2.1. High-Performance Liquid Chromatography mit Metall-Indikator Detektion (MDD-HPLC)

- Pufferlösungen:** **A:** 0,2 mM HCl, 15  $\mu$ M YCl  
**B:** 0,5 M HCl, 15  $\mu$ M YCl (beide Puffer werden filtriert (0.45  $\mu$ m-Filter) und entgast. In den Vorratsflaschen werden sie permanent mit Helium begast und während der Entnahme durch Teflon-Fritten angesaugt.  
**C:** 1,6 M Triäthanolamin (TEA) mit 300  $\mu$ M PAR, pH 9,0 (eingestellt mit HCl), (Puffer C wird nach der Herstellung filtriert (0,45  $\mu$ m-Filter) und entgast. Während der Entnahme wird er mit Helium begast u. durch Teflon-Fritte angesaugt).
- Säulen:** Mini Q PC 3.2/3, Anionen-Austauscher (Styrol-DVB mit quarternären Aminen), 3  $\mu$ m Bead-Material, 32 x 3 mm (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg)
- Steuergerät:** computergesteuerte "SMART"-Einheit (Fa. Pharmacia LKB, Freiburg)
- Pumpen A/B:**  $\mu$ -Precision Pump (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg), hochpräzise Spritzenpumpen  
Flussrate 500  $\mu$ l / min
- C-Pumpe:** Shimadzu LC10/AD (Doppelkolbenhub-Pumpe) Pulsdämpfung: 1m-Teflon-Kapillare (0.5 mm ID), Pulsdämpfer SSI LP21 (Scientific Systems Inc.), sowie zwei RP Vorsäulen (Vorsäule LiChrosob RP8, 5  $\mu$ m

Beads; Vorsäule GRP-1 R, 7.5 x 4.6 mm zur  
Filtration des Puffers, Flussrate 250 µl / min

**Probengeber:** Kontron AS 560

**Monitor:** UVM-II (Pharmacia-LKB, Freiburg)

**Integrator:** "SMART"-Steuereinheit

**Messzelle:** optische Weglänge, 8 mm bei 546 nm

**Gradienten- Protokoll:**

0,00 LOOP	8
0,01 FILL	A, 1, 10, 15000
0,01 FILL	B, 1, 10, 15000
0,02 AUXILIARY_OUTPUT	
0,05 FLOW	500
0,10 CONC_B	1
0,40 NEW_CHROMATOGRAM	
1,00 FLOW	500,00
1,50 AUXILIARY_OUTPUT	
1,60 INJECT	
4,00 LOAD	
4,00 CONC_B	1,0
7,50 CONC_B	4
10,00 CONC_B	7,3
12,50 CONC_B	12,5
14,50 CONC_B	18
15,60 CONC_B	23,5
16,50 CONC_B	29
17,00 CONC_B	35
17,50 CONC_B	44
18,30 CONC_B	69
18,70 CONC_B	79
19,10 CONC_B	85
20,00 CONC_B	94
20,70 CONC_B	99
21,00 CONC_B	100
21,50 CONC_B	100,0
21,50 CONC_B	0
22,00 FLOW	500,0
22,00 CONC_B	0,0
23,50 FLOW	10
25,00 CONC_B	0,0
25,10 END_LOOP	

25,15 FILL	A, 1, 10, 15000
25,15 FILL	B, 1, 10, 15000
25,20 FLOW	5
25,20 CONC_B	0,0
825,20 FLOW	5,00
825,20 CONC_B	0,0

Die analytische HPLC mit Metall-Indikator-Detektion ermöglicht den Nachweis von Inositolphosphaten, durch das Prinzip des Ligandenaustausches. Das System enthält drei Komponenten, das dreiwertige Metallkation Yttrium, den metallbindenden Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)resorcin (PAR) und die ebenfalls metallbindenden Inositolphosphate. Die Basisabsorption von PAR, die maximal bei 520 nm ist, erhöht sich durch die Komplexierung mit Yttrium, und kann auch bei 550 nm (entspricht dem Spektralbereich des VIS-Filters bei 546 nm) gut detektiert werden. Mit Hilfe des computergesteuerten Probengebers (Kontron AS 560) werden die Proben, die Inositolphosphate enthalten, automatisch off-line mit einer Flussrate von 0,5 ml/min, in eine 1 ml Probenschleife eines Injektionsventils vor der Trennsäule aufgetragen. Die Mini-Q-Trennsäule wird stets mit einer sehr kleinen Konzentration (15 µM) des Metalls Yttrium (im Sauren) eluiert, das nach der Säule bei der Alkalisierung durch Zufuhr des C-Reagens, welches alkalischen Puffer und 300 µM PAR enthält, mit Phosphaten einen Komplex bildet. Mit Hilfe von Puffer A (mit niedrigem Salzsäuregehalt) und Puffer B (mit hohem Salzsäuregehalt) wird mittels zweier Spritzenkolbenpumpen (welche ihre Elutionspuffer durch on-line Filter (0,2 µM Titan) in eine µ-Mischkammer (30 µl) und von hieraus auf die Säule fördern) langsam der pH-Wert der Säule nach unten verschoben. Dadurch werden erst die niedrig phosphorylierten Inositole und mit steigender Salzsäurekonzentration, abhängig vom Phosphatgehalt immer mehr und zeitlich verzögert die höher phosphorylierten Inositole eluiert. Hinter der Säule wird nun mittels der C-Pumpe und einer gestrickten Kapillare mit einem Totvolumen von 150 µl, nach einem Misch-Totvolumen, der (den metallbindenden Farbstoff PAR enthaltende) Puffer-C mit einer Flussrate von 0,25 ml / min hinzu gemischt. Bei dieser Nachsäulen-Derivatisierung reagiert nun (im Alkalischen) freies Yttrium mit dem PAR und dieser Komplex wird bei 546 nm photometrisch gemessen. Da es immer dann, wenn Inositolphosphate und andere Phosphatverbindungen im Eluat mit dem PAR um das Yttrium kompetieren es zu weniger Y:PAR Komplexbildung kommt, erfolgt jeweils eine Abnahme der Absorption

bei 546 nm. Es entstehen primär negative Absorptionsausschläge, die durch eine Spannungsumkehr am Monitor, als positive Ausschläge sichtbar gemacht werden (Mayr G.W. 1990, Guse A.H. et al., 1995).

### **2.2.2. Coulter Counter**

**Bereich:** misst Teilchen im Bereich von 0,4-800  $\mu\text{m}$  Durchmesser (jeweils abhängig von der verwendeten Messkapillare).

**Bereich der Kapillaröffnung:** Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 15  $\mu\text{m}$  –2000  $\mu\text{m}$ . Jede Größe der Kapillaröffnung misst Teilchen eines Nominaldurchmessers von 1.5 - 60% des Durchmessers der Kapillaröffnung.

## **2.3. Allgemeine Arbeitsmethoden**

### **2.3.1. Sterilisation**

Die verwendeten Lösungen, hitzestabile Geräte, Pipettenspitzen und Medien werden bei 121°C, für 20 Minuten in einem Autoklaven (Medizin und Labortechnik, Fritz-Gößner, HH:GVA 570) sterilisiert. Glasware wird vor Benutzung in einem Trockenschrank der Firma *Haraeus*, bei 180°C, für 3-4 Stunden sterilisiert.

### **2.3.2. Aseptische Arbeitstechnik**

Das Arbeiten mit Zellkulturen verlangt aseptische Arbeitsmethoden, einerseits, um den Schutz der Zellen vor Kontamination zu gewährleisten und andererseits, um den Arbeitenden vor einem möglichen Infektionsrisiko zu bewahren. Es wird versucht, durch Zugabe von Antibiotika (6 ml des Penicillin/Streptomycin-Gemisches von GIBCO, auf 500 ml DMEM), durch sauberes Arbeiten unter der sterilen Werkbank und sorgfältigem Abflämmen der Pipetten und Glasflaschen eine Kontamination durch Bakterien, Mycoplasmen und Pilzen, so gering wie möglich zu halten.



### **2.3.3. Stammerhaltung und Subkultivierung von CHO**

CHO-Zellen wachsen in Form von Monolayern in Flaschen und Petrischalen. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wird alle 48h ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei einer Konfluenz von 100%, wird eine Subkultivierung durchgeführt. Zuerst wird eine Pasteurpipette kurz über die Flamme gehalten und an die Pumpe angeschlossen. Damit wird das alte Medium abgesaugt, dann wird 3-4 ml PBS auf die Zellen pipettiert, um Mediumrückstände und nekrotische Zellen von den intakten Zellen zu waschen. Hierzu wird das PBS über die Zellen verteilt und wieder abgesaugt. Danach wird 1-3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, so dass die Kulturfläche gerade davon bedeckt ist. (Trypsin hat dabei die Aufgabe, die Adhäsionsproteine zu spalten.) Es wird 3 bis 5 Minuten gewartet bis die Zellen sich abgelöst haben, notfalls werden sie mit vorsichtigem, sanftem Klopfen gelöst. Mit Hilfe einer sterilen Pipette und 7-9 ml DMEM (10%) werden die Zellen sorgfältig suspendiert, vereinzelt und zu je gleichen Volumina auf zwei Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium (DMEM 10%) verteilt. Das vorgelegte Medium variiert zwischen 5-30 ml, abhängig von der Größe der Flasche oder Schale. Anschließend werden die Flaschen mit aufgedrehtem Deckel (damit die Zellen ausreichend mit Sauerstoff versorgt sind) in den Brutschrank gestellt, der bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Gasphase betrieben wird.

### **2.3.4. Wachstumsversuche mit 2% FCS-Zusatz in DMEM**

Mit Hilfe des folgenden Versuches wurde ausgetestet, wie viele Zellen man benötigt um eine optimale Wachstumskurve der Zelllinie über einen Verlauf von drei Tagen zu erhalten. Zusätzlich musste herausgefunden werden, ob die CHO-Zellen auch bei einem DMEM mit 2%igem FCS-Zusatz gut wachsen, weil die verwendeten Hemmstoffe bei 10% FCS sehr stark an Plasmaproteine und vor allem an das Albumin gebunden werden, was mit einem partiellen Wirkungsverlust der Hemmsubstanzen einhergeht. Es werden pro Vertiefung der Multi-Well-Platte 1-5 x 10<sup>4</sup> Zellen auf 200 µl DMEM (2%) verteilt. Danach werden die Zellen, an drei aufeinanderfolgenden Tagen, aufgearbeitet und gezählt. Zuerst wird das alte Medium und der Zelldetritus abgesaugt, dann mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend

abgesaugt. Danach werden die Zellen mit 100  $\mu$ l Trypsin abgelöst, mit 100  $\mu$ l DMEM (2%igem FCS-Zusatz) versetzt und mit einer 200  $\mu$ l-Eppendorfpipette ausreichend suspendiert. Anschließend wird unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob auch alle Zellen aus der Mikrowellplatte entfernt worden sind. Von jedem Well werden 100  $\mu$ l Zellsuspension in einen Zählbecher gegeben. Mit Hilfe des Coulter-Counter werden dann die Zellen wie beschrieben ausgezählt.

### ***2.3.5. Wachstumsversuche in Mikrowell-Platten mit verschiedenen Hemmstoffen und unterschiedlichen Konzentrationen***

Der Versuchsaufbau entspricht exakt dem, wie er in 2.3.4. beschrieben ist. Als erstes werden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  pro Well in 190  $\mu$ l DMEM mit 2% FCS ausgesät. Nach 24h werden jeweils 3 Wells aufgearbeitet, gezählt und gemittelt und als Anwachskontrolle bestimmt. Anschließend wird der Hemmstoff so aus seiner Stocklösung verdünnt, dass die gewünschte Konzentration im Well durch Zugabe von 10  $\mu$ l Hemmstofflösung (1:20 Verdünnung) erreicht wird. Es wurden getestet: ECG in den Endkonzentrationen von 0,2/1/5  $\mu$ M im Well, EGC in Konzentrationen von 0,2/1/5  $\mu$ M, EGCG in Konzentrationen von 0,2/1/5/10/20/40, Gossypol in Konzentrationen von 0,2/1/2/5  $\mu$ M, Hypericin in folgenden Konzentrationen 0,5/1/2,5/5/10  $\mu$ M und Myrecitin in Konzentrationen von 25/50/100  $\mu$ M. Da die Hemmstoffe stark lichtempfindlich sind, wird unter verdunkelten Bedingungen gearbeitet, um keinen Wirkungsverlust zu erhalten. Es wird nach 24, 48 und nach 72 h jedes einzelne Well aufgearbeitet, wie in 2.2.6. beschrieben und ausgezählt. Für jeden Tag und jede einzelne Konzentration werden drei Wells bearbeitet und die Zellzählungen gemittelt. An jedem Tag und zu jedem einzelnen Versuch werden zusätzlich Kontroll-Wells, nur mit derselben Konzentration an DMSO (Angaben zum DMSO und der Verdünnung s. 2.3.6.) wie bei den Hemmstoffen, mitlaufen gelassen und aufgearbeitet. Mit Hilfe des Lichtmikroskops und des Viability-Tests wurde die Vitalität der Zellen unter dem Einfluss des Hemmstoffes (parallel zu den Wachstumsversuchen) mitkontrolliert.

### **2.3.6. Quantitative Analyse des Inositolphosphatspektrums in CHO-Zellen nach Gossypolbehandlung mittels MDD-HPLC**

Es werden auf fünf großen Petrischalen (Durchmesser 14,5 cm) jeweils  $0.5 \times 10^7$  Zellen ausgesät. Eine Schale dient als Anwachskontrolle (Entsprechend dem Null-Stundenwert), zwei Schalen ohne Hemmstoff (nur exakt mit der Konzentration an DMSO, die verwendet wird um den Hemmstoff zu lösen). Da DMSO eine zytotoxische Wirkung hat, wird die Konzentration so niedrig wie möglich gehalten. Aus der DMSO-Stocklösung wird eine Verdünnungsreihe von 1:12 hergestellt, so das pro Well eine Konzentration von 0,4 %igem DMSO enthalten ist (Sowohl in den Schalen mit Hemmstoff, als auch in den Kontrollschalen). Diese ergeben je einen 24- und einen 48-Stundenwert. Die letzten zwei Schalen mit einer Hemmstoffkonzentration von 2 oder 3  $\mu\text{M}$  Gossypol werden ebenfalls einmal nach 24 und nach 48 Stunden bearbeitet, wie im folgenden Text beschrieben. Die einzelnen Schritte sind jeweils:

#### **1) Ablösen der Zellen**

- Das Medium wird abgesaugt, mit PBS gespült und nochmals abgesaugt
- Die Zellen werden mit 5 ml Trypsin abgelöst
- Dann werden die Zellen mit 10 ml Minimalmedium suspendiert und in vorgekühlte Falcon Röhren (50 ml) überführt.

#### **2) Waschen der Zellen**

- Die Zellen werden abzentrifugiert, bei 1500 rpm, 5 Minuten, 4°C
- Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das Pellet mit 10 ml Minimalmedium gewaschen und nochmals zentrifugiert, bei 1500 rpm, 5 Minuten, 4°C
- 20 Minuten auf Eis gelagert, ruhen gelassen
- Abzentrifugiert, 1500 rpm, 5 Minuten, 4°C und Überstand vorsichtig entfernt

### **3) Extraktion der Inositolphosphate**

- Auf das Pellet werden mit den Eppendorfpipetten jeweils 1 ml TCA, 5 µl 0,2M EDTA (1 µMol) und 5 µl 0,1 M NaF (0,5 µMol) gegeben, das Gemisch wird gut suspendiert und gevortext
- Anschließend wird das milchige Gemisch kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Hand o. im Wasserbad aufgetaut, diese Prozedur wird 2 x wiederholt
- Zentrifugieren bei 5000 rpm, 5 min., 4°C
- Der Überstand wird vom Pellet getrennt, in ein anderes Reagenzröhrchen (12 ml) pipettiert und für 15 Minuten in ein 37°C temperiertes Wasserbad gestellt.
- In dem 37°C warmen Wasserbad soll die Kreatin-Phosphatkinase zerstört werden, welche sonst zu Artefakten bei der Analytik von Inositolphosphaten mittels MDD-HPLC-Analyse führen würde.

### **4) Ausschütteln der Trichloressigsäure**

- Nach 15 min wird der Überstand aus dem Wasserbad genommen und mit 3 ml Diethylether (wassergesättigt) versetzt, zwei Minuten ausgeschüttelt (um die zuvor zugefügte TCA wieder zu entfernen). Diese löst sich im Ether und bildet die obere Phase, welche dann mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wird. Insgesamt wird der Überstand 3x mit Diethylether versetzt, die TCA ausgeschüttelt und die obere Phase abgesaugt.
- Anschließend wird eine pH-Kontrolle durchgeführt und mit 1 M TEA, in 10 µl Schritten, auf pH 6-7 eingestellt. Es wird entweder weitergearbeitet, oder bei -20°C eingefroren.
- Die Proben werden danach für ca. 1h in die Speed-Vac (Rotationsverdampfer) gestellt, um den Rest-Ether zu verdampfen

### **5) Entfernung von Nucleotiden**

- Zuerst wird 25 µl der vorher gut durchgeschüttelten Aktivkohlesuspension (20%iges Norit A, säuregewaschen, in 0,1 M NaCl und 50 mM Natriumacetat, pH 4,0) auf jede Probe gegeben

- Anschließende Inkubation für 10 min, jede Minute werden sie nochmals für einige Sekunden gevortext
- Abzentrifugieren der Kohlepartikel mit der Eppendorffzentrifuge (4 min, 10.000 rpm). Der Überstand wird abgenommen. Die Aktivkohlebehandlung wird weitere 2x wiederholt. Die Pellets aller drei Behandlungen werden aufbewahrt.
- Das 1. Pellet wird mit 100 µl 0,1 M NaCl und 0,5 mM EDTA versetzt, gevortext und abzentrifugiert (4 min, 10.000 rpm). Der Überstand (wash) wird auf das 2. Pellet überführt, gut gevortext und zentrifugiert (wie oben). Der Vorgang wird mit dem 3. Pellet ebenfalls wiederholt.
- Die klaren, Aktivkohle-freien Überstände werden vereinigt (Gesamtvol. ca. 1,1 ml)

### **2.3.7. HPLC-Analytik mit der Micro-MDD-Methode**

Die lyophilisierten Proben werden in 1 ml 2 mM NaF, 2 mM NaAcetat, pH 6,0 aufgelöst, kurz zentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge), und durch Einmalfilter (0,45 µm Poren) filtriert. Die klare Probe wird in eine 1 ml PP-Spritze quantitativ und blasenfrei aufgenommen und in das Injektionssystem der Micro-HPLC eingespritzt. Die Analyse (Injektion, Pumpen und Gradientensteuerung) wird computerkontrolliert durchgeführt.

Die Trennung der Inositolphosphate erfolgt an einem starken Anionenaustauscher (MiniQ, 3 µm Partikel, Säulendimensionen 3,2 x 3 mm, Pharmacia) durch einen konkav ansteigenden HCl-Gradienten bei einer Flussrate von 500 µl / min (Puffer A: 0,2 mM HCl, 15 µM YCl, Puffer B: 0,45 M HCl, 15 µM YCl). Die Detektion wird durch Zupumpen eines Farbstoffes (PAR = 4-(2-Pyridylazo)resorcinol) in alkalischem, hochkonzentriertem Puffer mit einer Flussrate von 250 µl / min, hinter der Säule, jedoch vor dem Detektor erreicht (Prinzip der "Nachsäulenkomplexierung", siehe 2.2.1).

### **2.3.8. Zell-Vitalitätstest**

Parallel zu jedem Versuch läuft eine Multiwell-Platte zwecks Vitalitätskontrolle mit. Die Zellen werden nach dem obigem Schema aus den Vertiefungen gelöst. Die 200 µl Zellsuspension werden mit 200 µl Trypanblau (0,4%) versetzt und gut vermischt. Trypanblau kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren, färbt aber das Zytoplasma toter Zellen blau an, selbst wenn diese völlig intakt erscheinen. Von diesen 400 µl Zell / Farbstoff-Gemisch werden nun 10 µl auf den Haemocytometer gegeben und unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Hierbei werden die äußeren vier Quadranten sorgfältig ausgezählt, sowohl die intakten, als auch die gefärbten Zellen registriert und prozentual die Vitalität errechnet.

### **2.3.9. Mykoplasmentest**

Diese sehr kleinen eukaryontischen Organismen unterscheiden sich von Bakterien darin, dass sie kleiner sind, keine Zellwand besitzen und sich intrazellulär vermehren. Dies ist einer der Gründe warum eine Kontamination mit Mykoplasmen sehr schwer zu entdecken ist, da sie weder im Lichtmikroskop zu erkennen sind, noch das Medium sichtbar verunreinigen. Trotzdem beeinflussen sie die Zellen und behindern ihr Wachstum. Besteht der Verdacht auf eine Infektion dann müssen die Zellen mit dem Originalstamm verglichen werden, ob optisch eine Übereinstimmung herrscht. Eine sichere Methode ist der Nachweis der Mycoplasmen-DNA mit Hilfe des Mycoplasmen PCR-Assays. Die CHO-Zellen wurden vor den Versuchsreihen diesem Test unterzogen und waren Mycoplasmen-negativ. Vorbereitung der zu testenden Zellen:

- Zuerst werden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Deckel (Safe-Lock) transferiert
- Zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, Raumtemperatur)
- Dann wird der Überstand vorsichtig entfernt
- Das Pellet wird in 50 µl H<sub>2</sub>O (Zellkulturqualität) aufgenommen und sofort durch starkes vortexen resuspendiert

- Die Eppendorf-Gefäße werden sofort auf Eis und bis zum Test bei 20°C gelagert -

### Zellyse:

- Der Heizblock wird auf 56°C vorgeheizt
- Danach werden die Proben aufgetaut
- pro Ansatz werden 245 µl Lyse-Mix und 5 µl Proteinase K (10mg/ml) als Stock angesetzt
- Zu jeder Probe werden 250 µl dieses Stock's zugegeben
- Die Proben werden im Heizblock (56°C, 60 min) inkubiert und, anschließend auf 100°C hoch geheizt (100°C, 10 min), danach auf Eis abgekühlt
- Die Ansätze werden bis zur PCR auf Eis (gleicher Tag) oder bei 20°C (später) gelagert -

Lyse-Mix (Lagerung bei 4°C); H<sub>2</sub>O (Zellkulturqualität), 0,45% (v/v) Nonidet P-40 (Äquivalent IGEPAL CA-630;Sigma), 0,45% (v/v) Tween 20 (Sigma), Proteinkinase K (Lagerung bei -20°C; aliquottiert); Molekularbiologie-Qualität (keine Nuklease-Aktivität; Sigma); Stock 10 mg / ml in H<sub>2</sub>O (Molekularbiologie-Qualität), Kontrollansätze: Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O; Positivkontrolle mit Mykoplasmen-positiven Zellen (U 937). Jeweils eine Negativ- und Positiv-PCR vom letzten Versuch zur Kontrolle mitlaufen lassen.

### PCR-Reaktion:

- Zuerst wird der Thermocycler angestellt, Programm 1 (MYCO 2) gewählt, Heizdeckel und der Block auf 95°C vorgeheizt, dann wird das Programm auf "Pause" gestellt
- Test-Proben, Negativ- und Positiv-Kontrolle werden aufgetaut und auf Eis gelagert
- Dann wird der PCR-Prä-Mix auf Eis angesetzt, pro Ansatz (Endvolumen 47,5 µl)

• H <sub>2</sub> O	39,25	µl	
• 10 x Puffer	5	µl	
• dNTP's	1	µl	(jedes 10 nmol; 200 µM)
• Primer 1	1	µl	(50 pmol; Myco 1 hin)
• Primer 2	1	µl	(50 pmol; Myco 2 rev)

- Taq-Polymerase 0,25 µl (1,25 U/Ansatz)
- Taq-Polymerase: Qiagen (5 Units / µl; Puffer und dNTP`s auch Qiagen)
- Taq-Polymerase wird erst zugegeben, wenn der 2. Schritt abgeschlossen ist
- Pro Ansatz unter der Sterilwerkbank werden 2,5 µl jedes Lyseansatzes in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß mit Deckel (Aufschrift "PCR" in der Zellkultur) vorgelegt (Rest wurde bei -20°C gelagert)
- Pro Ansatz werden 47,5 µl Prä-Mix an den Rand des Eppendorf-Gefäßes pipettiert (Endvolumen 50 µl)
- Die PCR-Proben werden auf Eis gelagert, kurz in der Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert (Adapter) und in den Thermocycler gestellt; der Heizdeckel fest zugedreht und das folgende Thermocycler-Programm gestartet:

	<b>Programm Nr.1</b>		<b>Myco2</b>
	°C	sec	Zylen
▪ <b>Step1:</b>	95	180	1
	60	20	
	72	60	
▪ <b>Step2:</b>	95	20	29
	60	20	
	72	60	
▪ <b>Step3:</b>	72	300	
	4	∞	

- Folgende Pipettierschritte werden unter der Sterilwerkbank mit Filter-Tips durchgeführt. (PCR in Biometra Uno II mit Heizdeckel, 48 Plätze).
- Primer: 50 Aliquots a 50 pmol / µl (-20°C;Molekularbiol.)
- Taq-Polymerase: 5 U/µl (-20°C; Eisschrank)
- 10 x Puffer: (-20°C;Lager;Eisschrank)
- dNTP`s: 10 mM jedes (-20°C;Lager;Eisschrank)

Dann legt man in die Eppendorfgefäße jeweils 15 µl TE (10 mM TRIS, HCl pH 8.0 und 1 µMEDTA pH 8.0) vor und gibt 5 µl der Proben hinzu. Plus je 4 µl (6 x DNA-Proben-Puffer; 0,15% Bromphenolblau und 0,15% Xylencyanol+1 mM EDTA pH 8.0, sowie 30% Glycerin). Diese 24 µl werden nun vorsichtig in die Agarosegeltaschen gespritzt.



Es wird eine 80 mVolt-Spannung angelegt und die Proben eine Stunde lang laufen gelassen (DNA läuft zur Kathode)

Das Agarosegel wird folgendermaßen hergestellt:

50 ml 1 x TAE (Trisacetatpuffer; 40 mM Tris Acetat 1 mM EDTA) und 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml) werden abgewogen, erhitzt und in Form gegossen. Es wird mindestens 20 Minuten gewartet, bis das Gel benutzt werden kann.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Wachstumsverhalten von CHO-Zellen

Diese Arbeit beschäftigt sich damit, die wachstumshemmende Wirkung von Gossypol auf CHO-Zellen nachzuweisen. Mit Hilfe der Isolierung von einzelnen Inositolphosphatisomeren, mittels HPLC, soll gezeigt werden welche Rolle der Inositolphosphatstoffwechsel beim Zellwachstum spielt und welche Wirkung Gossypol auf den InsP-Haushalt der Zelle hat. Durch die Darstellung unterschiedlicher Inositolphosphat-Massenspektren wird versucht, der Substanz Gossypol eine IP3K-Hemmung nachzuweisen. Um diese Hypothesen wissenschaftlich zu untersuchen wurden folgende Versuche durchgeführt.

Durch vielfältige Versuchsansätze mit unterschiedlicher Anzahl der ausgesäten Zellen wurde die genaue Zahl der Zellen in den Multiwellplatten ermittelt, die zu einem genügend starken Wachstum, d.h. zu einer Erhöhung der Zellzahl um mindestens Faktor 2, innerhalb einer Zeitdauer von drei Tagen führt. Die Höhe der ausgesäten Zellen muss bis zum letzten Versuchstag eine fortlaufende Proliferation gewährleisten, damit die durch den Zusatz der Hemmstoffe hervorgerufene Wachstumsinhibition nicht auf den Verbrauch des Mediums, oder eine Kontakthemmung bei zu dichtem Zellrasen zurückgeführt werden kann. Die CHO-Zellen verdoppeln ihre Zellzahl innerhalb von 24 h oder weniger, unabhängig davon, ob das Medium einen 10%igen oder 2%igen Zusatz an FCS enthält. Jeder Wachstumsversuch wurde einmal wiederholt mit je zwei parallel laufenden Multiwellplatten. Für jeden Versuchstag wurden drei Wells analysiert, jedes Well wurde zweimalig gezählt und anschließend die Mittelwerte berechnet und in Kurvenform aufgetragen. Es zeigte sich, dass Versuchsreihen, die mit  $0,5 \times 10^5$  Zellen / Well angesetzt wurden ein lineares Wachstum aufwiesen, während Versuchsansätze mit  $1,5$  oder  $2 \times 10^5$  Zellen / Well zu dicht gesät waren und es zu einem frühzeitigen Abfall der Wachstumskurve kam. Weiterhin erwies sich die Dauer des Versuches von vier Tagen als ungünstig, weil die Zellen wegen des fehlenden Mediumwechsels abstarben. Auf den Mediumwechsel wird während der Versuchsreihe verzichtet, weil bei den später folgenden Versuchen mit dem Zusatz der Hemmstoffe, dieser in den laufenden Versuch neu hinzugegeben werden

müsste. Zusätzlich sollten jegliche Manipulationen (z.B. absaugen) in den Wells unterlassen werden, die das Zellwachstum beeinträchtigen könnten und damit das Ergebnis verfälschen würden.

### **3.2. Wachstumsversuche mit Hemmstoffzusatz in Mikrowells**

Im Vorfeld wurden auf den Mikrowellplatten sieben verschiedene wachstumshemmende Substanzen ausgetestet (Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin, Ellagsäure, Epigallocatechin-3-gallat, Gossypol, Hypericin, Myrecitin), wie in 2.3.5. beschrieben, um herauszufinden, welcher der Inhibitoren in Bezug auf die CHO-Zellen der potenteste ist. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die Zellen zwischen 0,5 und  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Jeder der Versuche wurde mindestens zweimal wiederholt. Anhand der Auswertungen konnten die korrekten Dosierungen ermittelt werden, bei denen es zu einer eindeutigen Wachstumshemmung kam. So wurde ECG in den Konzentrationen 0.2, 1.0 und 5.0  $\mu\text{M}$  auf die Zellen gegeben und nachdem selbst bei der niedrigsten Konzentration noch eine eindeutige Wachstumshemmung erfolgte, wurden die Konzentrationen 0.1, 0.05 und 0.02  $\mu\text{M}$  ausgetestet. EGC wurde in den Konzentrationen 0.2, 1.0 und 5.0  $\mu\text{M}$  getestet, ebenso Ellagsäure, Gossypol und EGCG. Da EGCG selbst bei einer Konzentration von 5.0  $\mu\text{M}$  zu keiner nennenswerten Hemmung führte, wurden die Konzentrationen auf 10.0, 20.0 und 40.0  $\mu\text{M}$  erhöht. Hypericin wurde in 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 und 10.0  $\mu\text{M}$  Dosierungen verwendet und der Hemmstoff Myrecitin in den Dosen 25.0, 50.0 und 100.0  $\mu\text{M}$ .

Parallel zu den Versuchsreihen mit den CHO-Zellen wurden Wachstumskurven mit Hemmstoffzusatz an HL60-Zellen (humane Leukämiezelllinie) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Zellen konnte ein Fehler im Versuchsaufbau entdeckt werden. Anfangs wurden die Hemmstoffe in DMSO gelöst und anschließend auf die Zellen gegeben. Da DMSO selbst zytotoxisch ist und zusätzlich bei den HL60-Zellen zu einer Ausdifferenzierung führt, konnte der antiproliferative Effekt nicht sicher auf die verwendeten Hemmstoffe zurückgeführt werden. Während sich dieser Effekt bei der HL60-Zelllinie deutlich bemerkbar macht, beeinflusst DMSO das Wachstum der CHO-Zellen nur geringfügig. Um jegliche, das Zellwachstum beeinträchtigende,

Störfaktoren auszuschließen wurde das DMSO im Well immer auf eine Konzentration unter 0,4 % gehalten. Dies wurde durch geeignete Vorverdünnungen der Hemmstoffe durch die Zugabe von sterilem H<sub>2</sub>O erreicht.

### 3.3. Die Einflüsse von Epicatechin-3-gallat auf das Zellwachstum von CHO-Zellen

Zuerst wurden  $3 \times 10^5$  Zellen / Well in 190  $\mu$ l 2%igem DMEM ausgesät. Nach 24h wurde die Anwachskontrolle ausgezählt (wie in 2.3.4. und 2.3.5. beschrieben). Auf die verbleibenden Wells, ausgenommen die Kontrollserie, wurden jeweils 10  $\mu$ l des ECG-Hemmstoffes in folgenden Konzentrationen zugegeben: 0.2, 1.0, 5.0  $\mu$ M. Da diese Konzentrationen zu einer guten Proliferationshemmung führten, wurde die Konzentration auf 0.02, 0.05 und 0.1  $\mu$ M reduziert. Im weiteren Verlauf werden die Zellen wie unter 2.3.6. beschrieben aufgearbeitet, gezählt und berechnet.

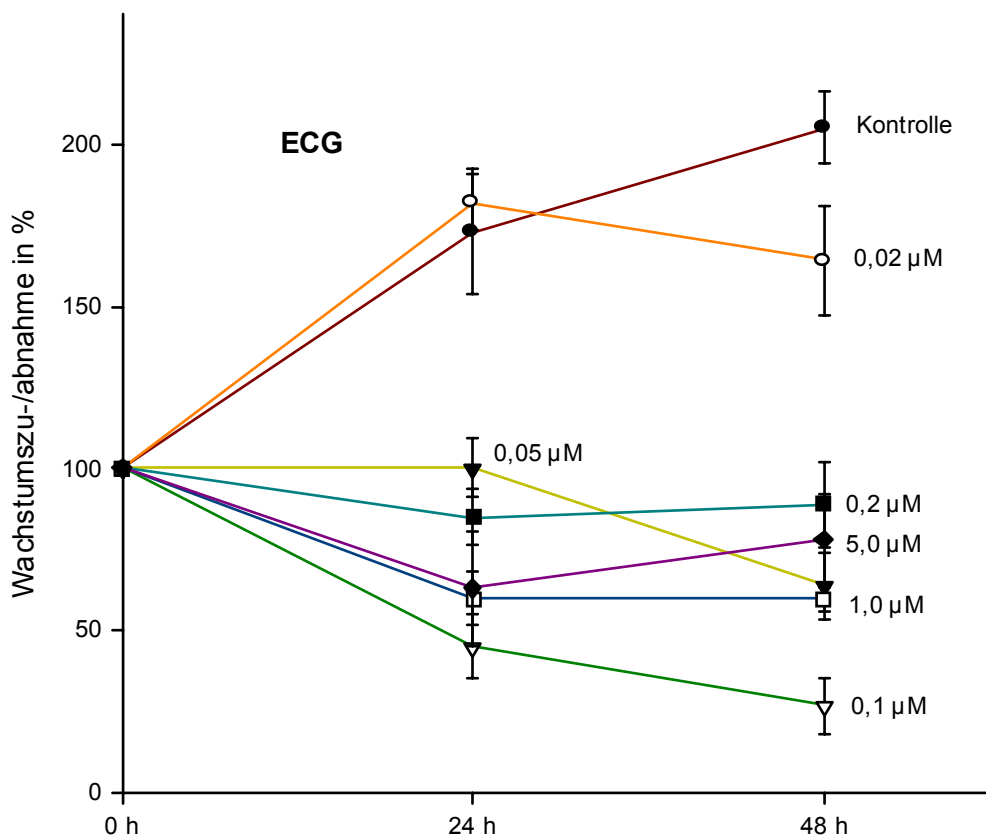
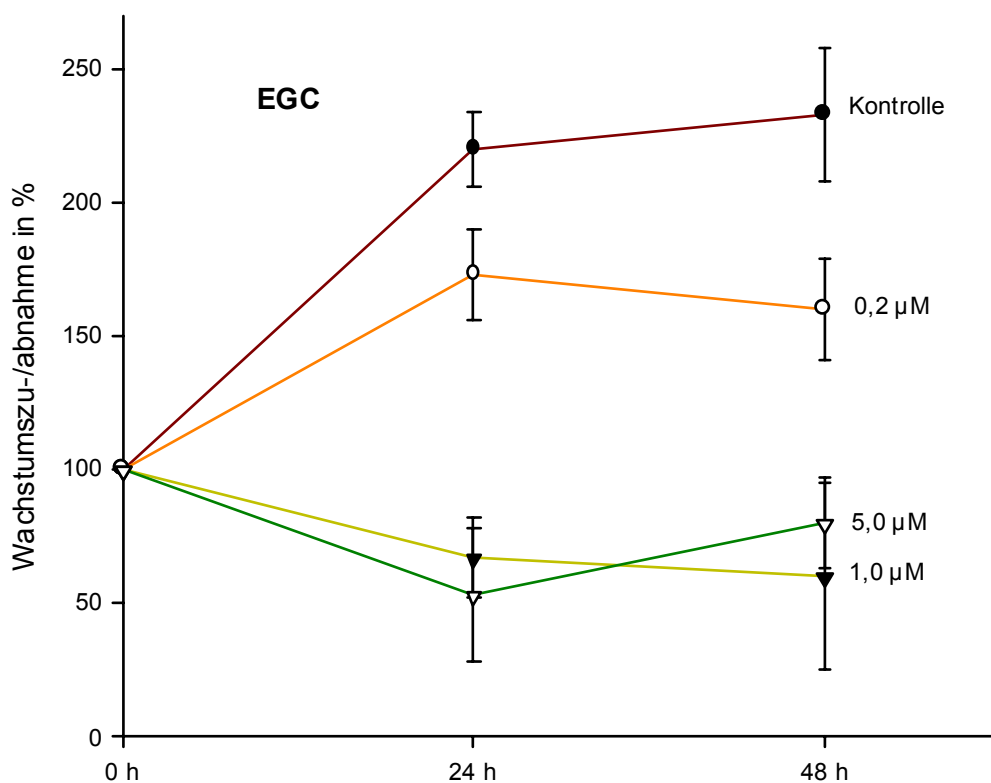


Diagramm 5: **Wachstumsversuch CHO-Zellen mit ECG-Zusatz**

Darstellung der Wirkung des Hemmstoffes ECG in unterschiedlichen Konzentrationen (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 1,0; 5,0  $\mu\text{M}$ ) auf CHO-Zellen. Die Y-Achse gibt die Wachstumszu-/Abnahme der CHO-Zellen in Prozent an. Die initiale Zellzahl betrug  $3,5 \times 10^4$ . Die Standardabweichung wurde berechnet, ausgehend von einer Stichprobe ( $n=2$ ). Die Kontrollserie, sowie die niedrigste ECG-Konzentration (0,02  $\mu\text{M}$ ) zeigen ein Zellwachstum (Kurven oberhalb der 100%), während die ECG-Konzentrationen größer 0,1  $\mu\text{M}$  für 24 h eine Abnahme des Wachstums oder ein steady state verzeichnen. Da es nach 48 h zu einer allgemeinen Abnahme des Zellwachstums kam, auch in der Kontrollserie, wurde die Daten weggelassen.

### 3.4. Die Einflüsse von Epigallocatechin auf das Zellwachstum von CHO-Zellen

Der Hemmstoff Epigallocatechin (EGC) besitzt gegenüber den CHO-Zellen eine sehr potente Wirkung in Bezug auf die Proliferationshemmung. Es wurden insgesamt drei Versuchsserien durchgeführt, deren Ergebnisse im Diagramm 6 dargestellt werden.



#### Diagramm 6: **Wachstumsversuch CHO-Zellen mit EGC-Zusatz**

Darstellung der Wirkung des Hemmstoffes EGC in unterschiedlichen Konzentrationen auf CHO-Zellen. Die Y-Achse gibt die Wachstumszu-/Abnahme der CHO-Zellen in Prozent an. Die Initiale Zellzahl betrug  $1,5 \times 10^4$ . Die Standardabweichung wurde berechnet, ausgehend von einer Stichprobe ( $n=2$ ). Die Kontrollserie, sowie die niedrigste EGC-Konzentration ( $0,2 \mu\text{M}$ ) zeigen ein Zellwachstum (Kurven oberhalb der Anwachskontrolle der 100%), während die EGC-Konzentrationen größer  $1,0 \mu\text{M}$  eine Abnahme des Wachstums verzeichnen. Da es nach 48 h zu einer allgemeinen Abnahme des Zellwachstums kam, auch in der Kontrollserie, wurde die Daten weggelassen. Der Abfall der Kurven nach 48 h erklärt sich durch den Mediumverbrauch und einem zu dichten Zellrasen mit daraus resultierender Kontakthemmung.

### **3.5. Die Einflüsse von Epigallocatechin-3-gallat auf das Zellwachstum von CHO-Zellen**

Insgesamt übt EGCG nur einen geringen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Zellen aus. Bei den anfänglich verwendeten Konzentrationen von 5, 10 und  $20 \mu\text{M}$  ergab sich keine gravierende Auswirkung auf das Zellwachstum. Anschließend wurden zwei Versuchsreihen mit  $40 \mu\text{M}$  EGCG durchgeführt. Diese Konzentrationen erbrachten den gewünschten Erfolg in Bezug auf das Zellwachstum der CHO-Zellen.

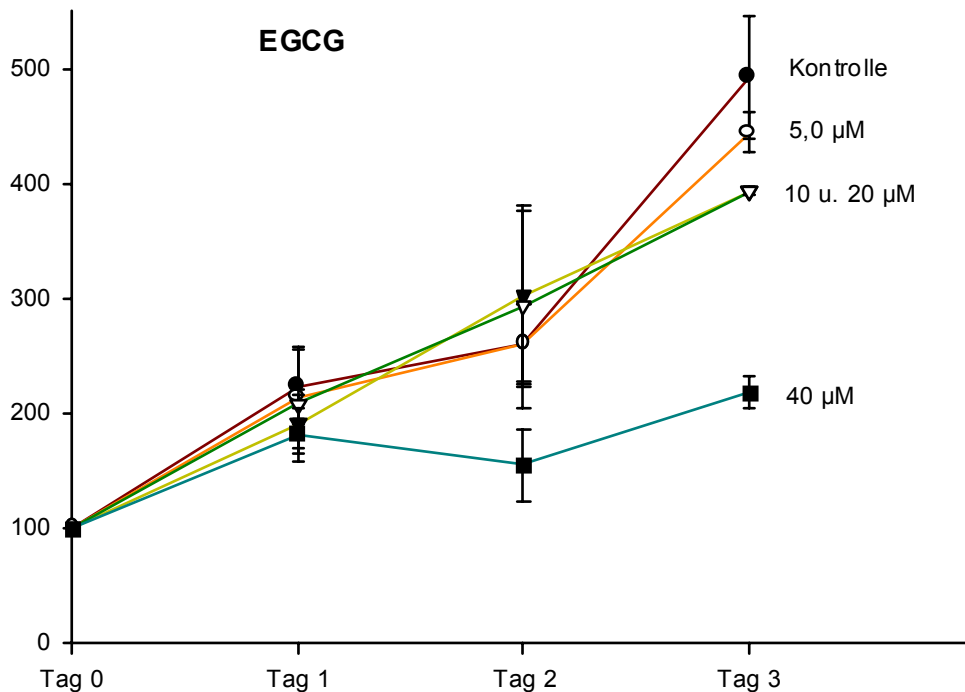


Diagramm 7: **Wachstumsversuch CHO-Zellen mit EGCG-Zusatz**

Darstellung der Wirkung des Hemmstoffes EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen (5;10; 20; 40 µM) auf CHO-Zellen. Die Y-Achse gibt die Wachstumszu-/Abnahme der CHO-Zellen in Prozent an. Die Initiale Zellzahl beträgt  $1 \times 10^4$ . Das Wachstumsverhalten wird in Prozent angegeben. Nur die höchste Konzentration von 40,0 µM EGCG zeigt eine Wachstumshemmung auf CHO-Zellen. Die Standardabweichung wurde berechnet, ausgehend von einer Stichprobe (n=2).

### 3.6. Wachstumsversuche mit Hypericin

Die Tatsache, dass Hypericin im niedrigen Konzentrationsbereich (0.5 und 1.0 µM) eher stimulierend auf die Zellen wirkt, jedoch bei Konzentrationen über 2.5 µM ein sehr potenter Wachstumsinhibitor ist, veranlasste uns, bei den Versuchen in den Petrischalen auf Hypericin zu verzichten. Der Vollständigkeit halber werden hier die Ergebnisse der Versuchsreihe gezeigt. Insgesamt wurden je drei Versuchsserien durchgeführt in den Konzentrationen 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 und 10.0 µM.

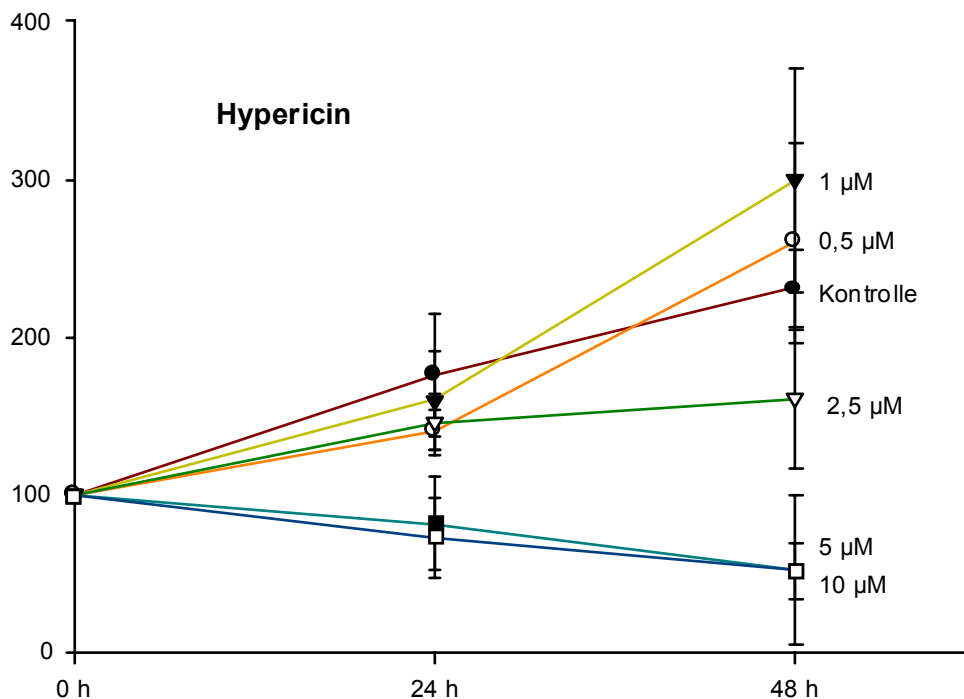


Diagramm 8: **Wachstumsversuch CHO-Zellen mit Hypericin-Zusatz**

Darstellung der Wirkung des Hemmstoffes Hypericin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5;1,0; 2,5; 5,0; 10 µM) auf CHO-Zellen. Die Y-Achse gibt die Wachstumszu-/Abnahme der CHO-Zellen in Prozent an. Die initiale Zellzahl beträgt  $1 \times 10^4$ . Die Kontrollserie, sowie die niedrigste verwendete Hypericin-Konzentration (0,5 µM) zeigen ein gutes Zellwachstum. Unter dem Einfluss von 0,5 µM Hypericin kommt es nach 48 h zu einem Wachstumsschub. Die Standardabweichung wurde berechnet, ausgehend von einer Stichprobe ( $n=2$ ). Da es nach 48 h zu einer allgemeinen Abnahme des Zellwachstums kam, auch in der Kontrollserie, wurde die Daten weggelassen.

### 3.7. Wachstumsversuche mit Gossypol

Es wurden zahlreiche Wachstumsversuche mit diesem Hemmstoff durchgeführt und es zeigte sich lediglich bei einer Konzentration von 5,0 µM Gossypol eine deutliche Hemmung des Zellwachstums. Im folgenden Diagramm wurden die reproduzierbaren



Auswertungen aufgetragen. Mit Gossypol wurden später die Versuche durchgeführt, die dem Nachweis einer IP3K-Hemmung dienen sollten.

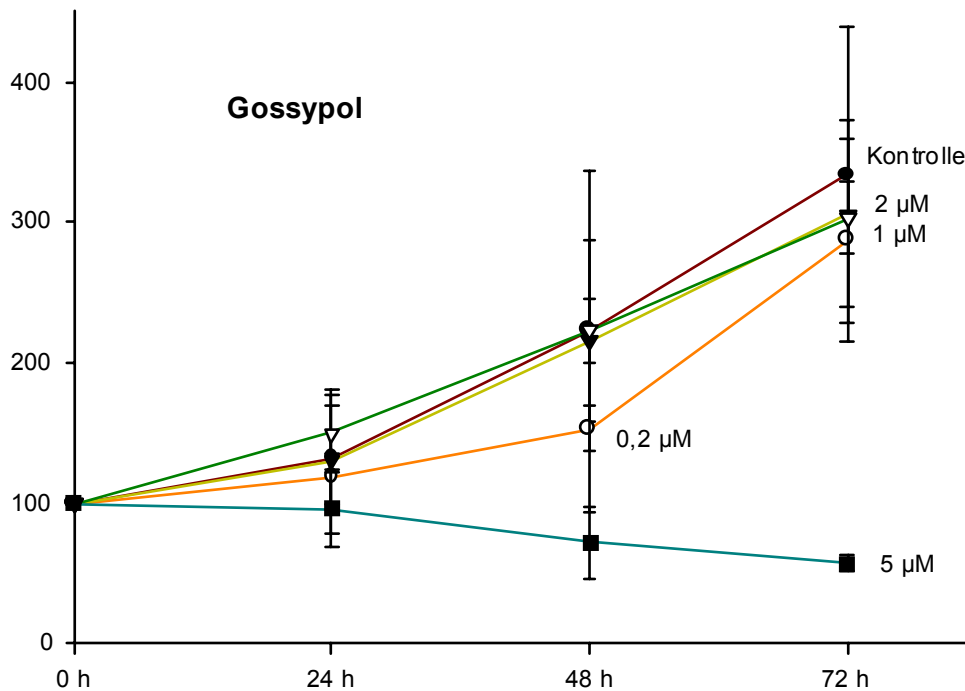


Diagramm 9: **Mittelwerte aller Wachstumsversuche CHO-Zellen mit Gossypol-Zusatz**

Darstellung der Wirkung des Hemmstoffes Gossypol in unterschiedlichen Konzentrationen (0,2;1,0; 2,0; 5,0 µM) auf CHO-Zellen. Die Y-Achse gibt die Wachstumszu-/Abnahme der CHO-Zellen in Prozent an. Die Initiale Zellzahl beträgt  $1 \times 10^4$ . Die Standardabweichung wurde berechnet, ausgehend von einer Stichprobe ( $n=2$ ). Bis zu einer Konzentration von 2 µM wachsen die Zellen ungehindert weiter, während die mit 5 µM Gossypol behandelten Zellen nicht mehr proliferieren.

Kriterien zur Auswahl des Hemmstoffes Gossypol waren zum Einen ein deutlicher Rückgang des Zellwachstums zwischen 3-5 µM bei vollem Erhalt der Zellvitalität und zum Anderen, liefen parallel dazu in Prof. Mayr's Labor, Wachstumsversuche mit Jurkat-T-Zellen und 3T3-Zellen ebenfalls mit Gossypol als Hemmstoffzusatz (durchgeführt von K. Hillemeier), so das man den Datensatz über Gossypolwirkung auf unterschiedliche Zellreihen vervollständigen konnte. Auch wenn sich andere

Substanzgruppen als potentere Inhibitoren von CHO-Zellen erwiesen, so hindert Gossypol die Zellen eindeutig am normalen Wachstum, ohne dabei in größerem Maße eine Apoptose oder Nekrose zu induzieren.

### 3.8. Verteilungsmuster der Inositolphosphatisomere am Beispiel eines einzelnen Wachstumsversuches (Nr.12)

Zur Veranschaulichung der Wirkung von Gossypol auf das Inositolphosphat-Massenspektrum, wird der Versuch Nummer 12 graphisch dargestellt. Dieser Versuch präsentiert das typische Verteilungsmuster der Inositolphosphate in CHO-Zellen unter Gossypoleinwirkung.

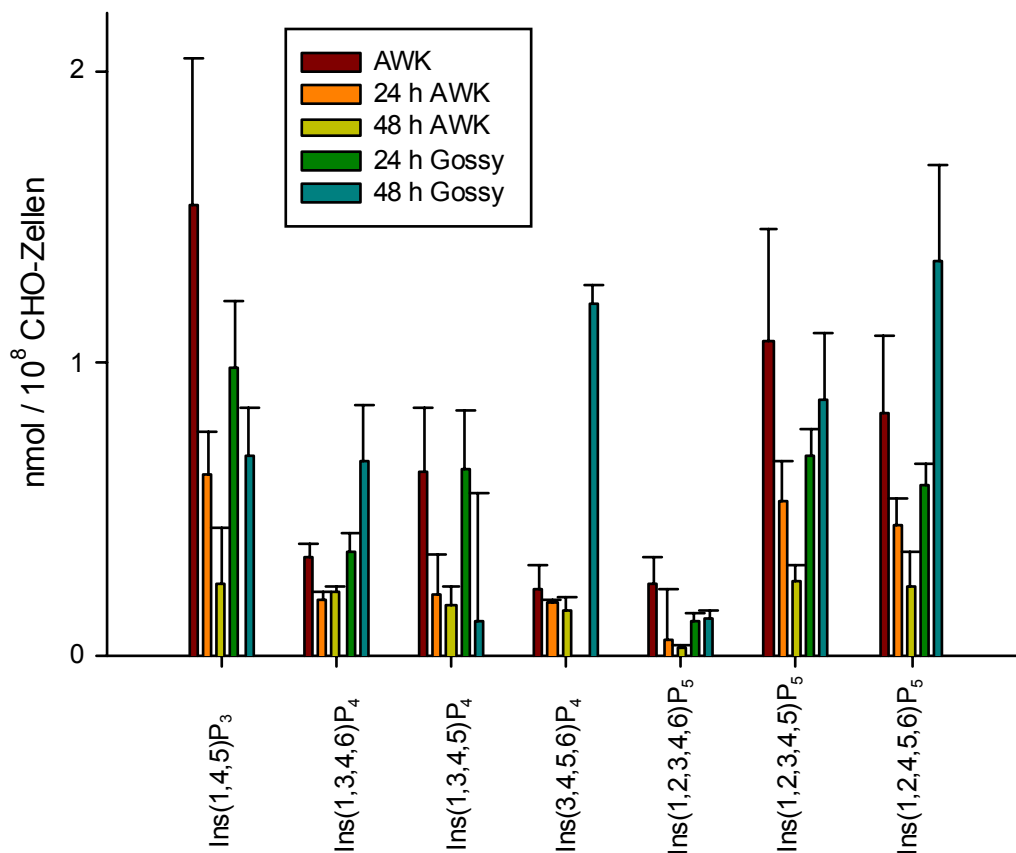
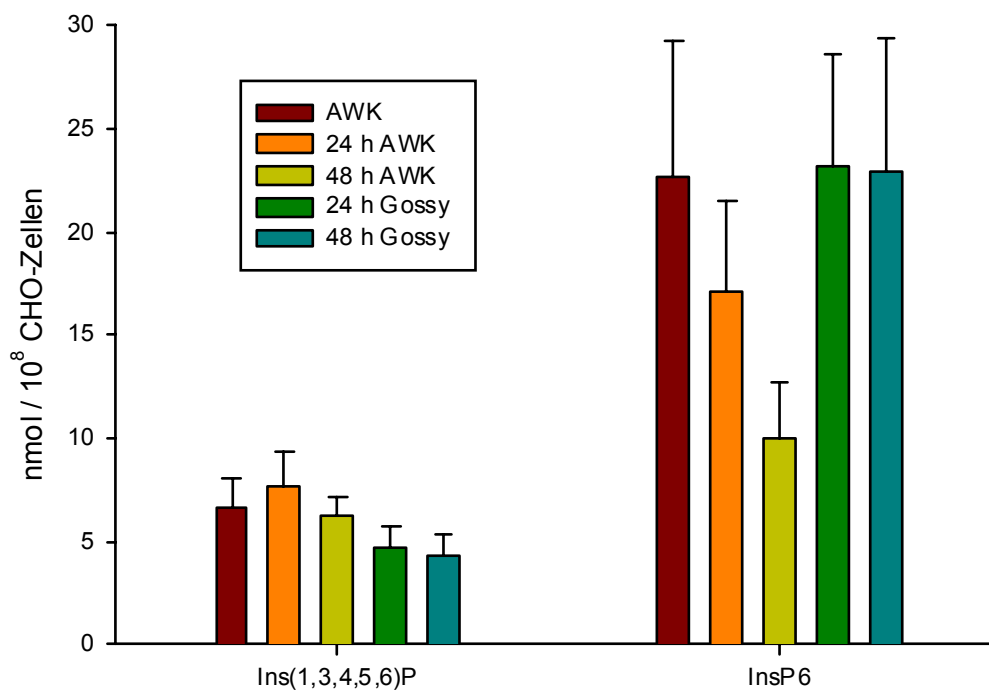


Diagramm 10a: **Wachstumsversuch mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypol (Versuch 12)**

Graphische Darstellung der Verteilung von  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und angegeben in  $\text{nmol}$  pro  $10^8$  CHO-Zellen. Von links nach rechts (in Rottönen gehalten) wurden jeweils die Werte der Anwachskontrolle, 24 h und 48 h Wert der Kontrolle, sowie (in Blautönen dargestellt) 24 h und 48 h Wert der Gossypolreihe aufgetragen. Weiterhin stellt die Graphik die Standardabweichungen ausgehend von einer Stichprobe ( $n=3$ ) dar. Das Diagramm zeigt die zum Teil unterschiedlichen Verteilungsmuster der Inositolphosphatisomere in CHO-Zellen mit und ohne Hemmstoffzusatz.

Diagramm 10b: **Wachstumsversuch mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypol (Versuch 12)**

Graphische Darstellung der Verteilung von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_3$  und  $\text{InsP}_6$  angegeben in  $\text{nmol}$  pro  $10^8$  CHO-Zellen. Von links nach rechts wurden jeweils die Werte der Anwachskontrolle, 24 h und 48 h Wert der Kontrolle, sowie 24 h und 48 h Wert der Gossypolreihe aufgetragen. Weiterhin stellt die Graphik die Standardabweichungen ausgehend von einer Stichprobe ( $n=3$ ) dar. Das Diagramm zeigt die zum Teil unterschiedlichen Verteilungsmuster der Inositolphosphatisomere in CHO-Zellen mit und ohne Hemmstoffzusatz.

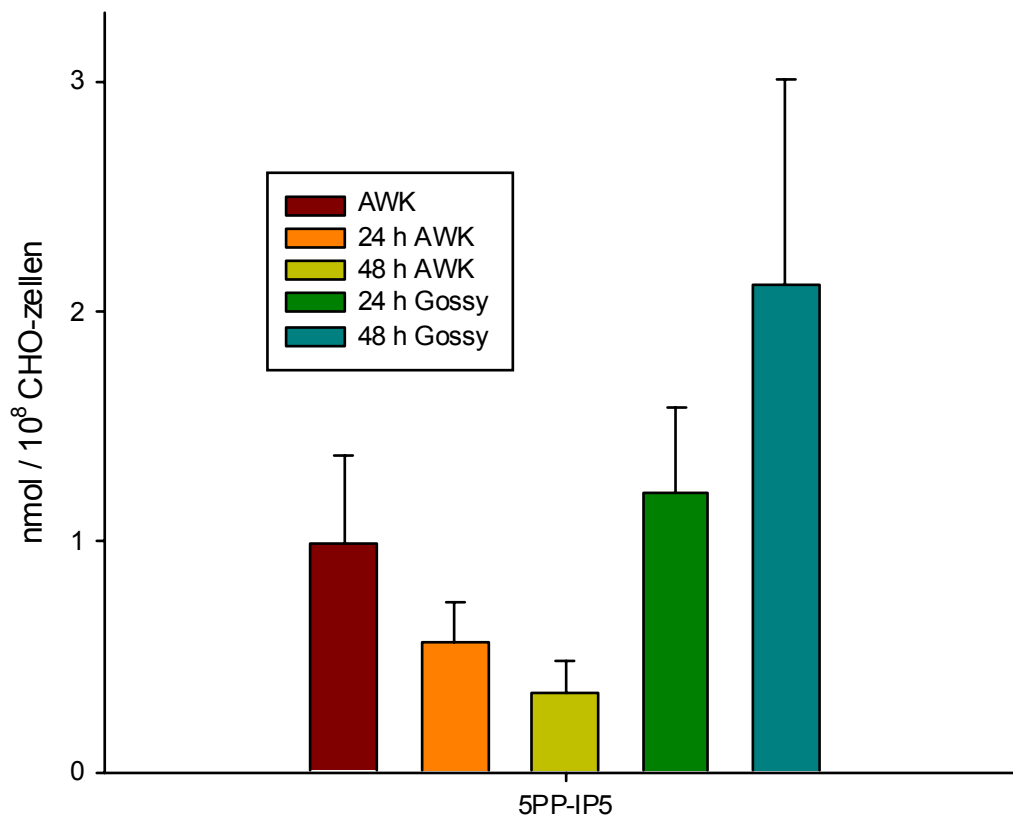


Diagramm 10c: **Wachstumsversuch mit 2  $\mu$ M Gossypol (Versuch 12)**

Graphische Darstellung der Verteilung von Ins 5PP-IP<sub>5</sub> angegeben in nmol pro 10<sup>8</sup> CHO-Zellen. Von links nach rechts wurden jeweils die Werte der Anwachskontrolle, 24 h und 48 h Wert der Kontrolle, sowie 24 h und 48 h Wert der Gossypolreihe aufgetragen. Weiterhin stellt die Graphik die Standardabweichungen ausgehend von einer Stichprobe (n=3) dar. Das Diagramm zeigt die zum Teil unterschiedlichen Verteilungsmuster der Inositolphosphatisomere in CHO-Zellen mit und ohne Hemmstoffzusatz.

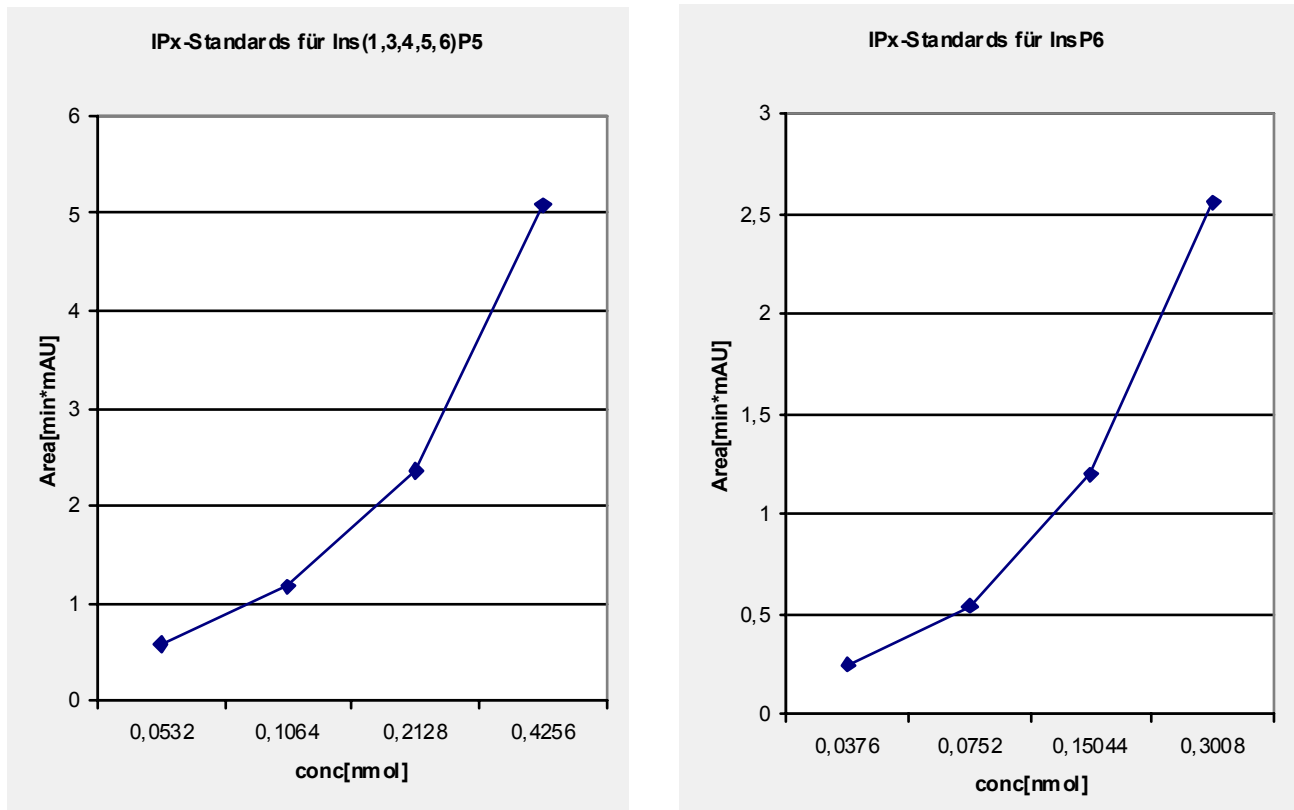


Diagramm 11a+b: **IPx-Standards für Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub>**

Dargestellt sind die InsPx-Standards von dem Versuch Nr. 12. Vor jedem einzelnen Versuch wurden Standardkurven mit 2,5, 5, 10, 20 und 30  $\mu\text{l}$  der einzelnen Inositolphosphatisomeren erstellt, mit deren Hilfe man die berechneten Daten kontrollieren und im Bereich der höher phosphorylierten InsP genauer berechnen konnte.

### **3.9. Ergebnisse und Auswertungen aller Wachstumsversuche mit Gossypol Zusatz**

Nachdem anhand der Wachstumsversuche in den Multiwells erst eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Gossypol zu dem gewünschten proliferationshemmenden Effekt führte wurden die ersten Versuche in den Petrischalen, zur Aufarbeitung der InsP-Isomere mit 3  $\mu\text{M}$  begonnen (wie in 2.3.6. ausführlich beschrieben). Ziel war es, eine Gossypolkonzentration zu finden, bei der die Zellen noch normales Wachstum zeigten, eine Konzentration bei der optimale Wachstumshemmung stattfindet und

eine Konzentration bei der die Zellen apoptotisch werden. Es wurde eine neue Stocklösung des Hemmstoffes angesetzt und die Versuche zeigten nun bereits bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Gossypol einen hohen Anteil von nekrotischen Zellen unter dem Mikroskop. Es wurde auf 2  $\mu\text{M}$  reduziert und mit dieser Konzentration wurden sieben Versuche durchgeführt, um reproduzierbare Werte zu erhalten. Zusätzlich wurden zwei Versuche in den Petrischalen mit 1,5  $\mu\text{M}$  Gossypol durchgeführt.

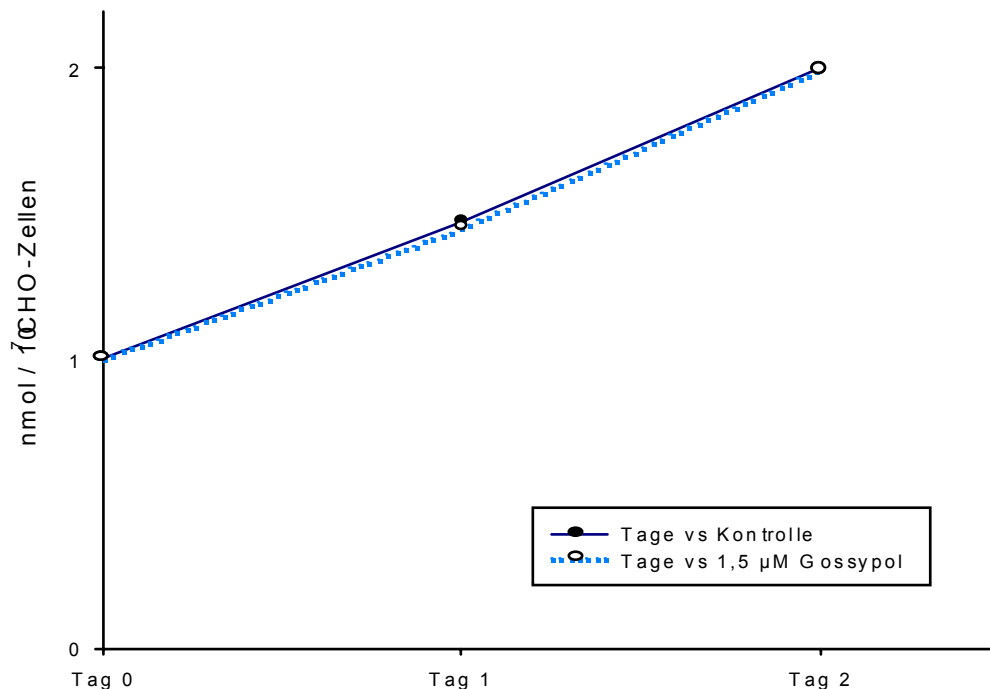


Diagramm 12: **Wachstumsversuch mit 1,5  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz**

Aufgetragen wurden die gemittelten Daten aller Wachstumsversuche mit 1,5  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz. Der Versuch umfasst einen Zeitraum von 48 h und entspricht den CHO-Zellen  $\times 10^7$ . Es findet bei 1,5  $\mu\text{M}$  Gossypol keine Wachstumshemmung statt. Die Standardabweichung wurde wie auch in den folgenden Diagrammen ausgehend von einer Stichprobe ( $n=3$ ) berechnet.

Das folgende Diagramm zeigt die Mittelwerte der Wachstumsversuche unter dem Einfluss von 2  $\mu\text{M}$  Gossypol.

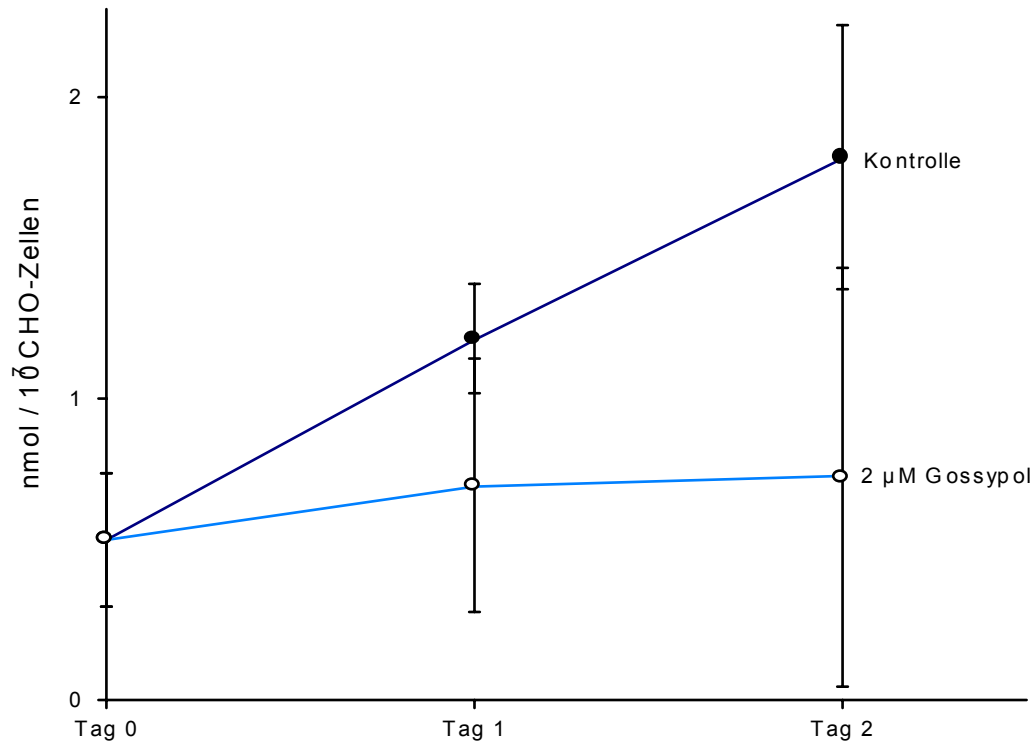


Diagramm 13: **Mittelwerte aller Wachstumsversuche mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz**

Aufgetragen wurden die gemittelten Daten aller Wachstumsversuche mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz. Der Versuch umfasst einen Zeitraum von 48 h und entspricht den CHO-Zellen  $\times 10^7$ . Während die Kontrolle ein annähernd lineares Wachstum zeigt, wachsen die mit Gossypol behandelten Zellen deutlich langsamer. Die Standardabweichung wurde berechnet anhand von Stichproben ( $n=5$ ).

Es wurden daraufhin drei Versuche mit 3  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz durchgeführt, wie die folgende Graphik zeigt.

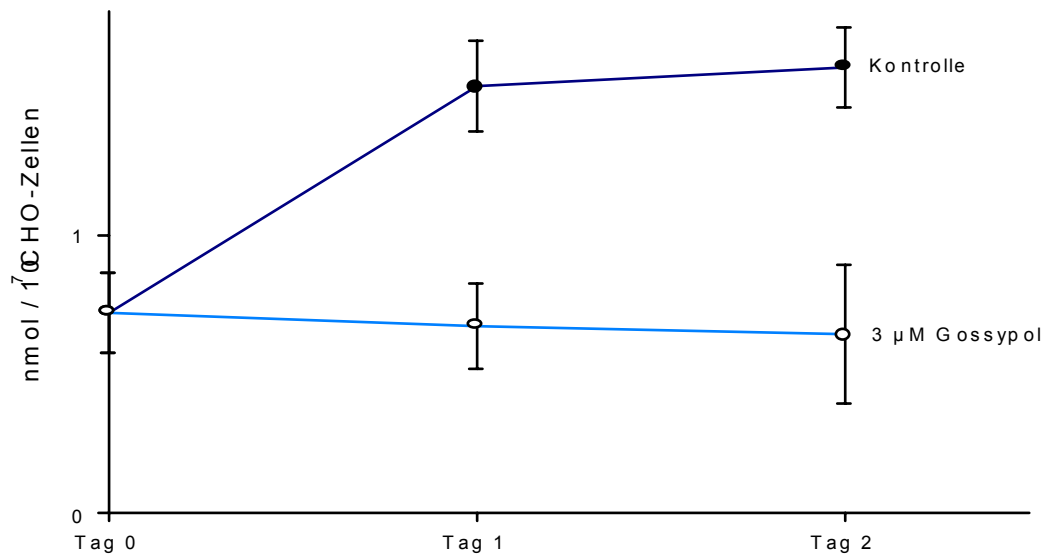


Diagramm 14: **Mittelwerte aller Wachstumsversuche mit 3 μM Gossypolzusatz**

Aufgetragen wurden die gemittelten Daten aller Wachstumsversuche mit 3 μM Gossypolzusatz. Der Versuch umfasst einen Zeitraum von 48 h und entspricht den CHO-Zellen  $\times 10^7$ . Es findet bei 3 μM Gossypol eine signifikante Wachstumshemmung statt.

Die folgenden Graphiken zeigen die charakteristische Verteilung der Inositolphosphatisomere bei normal wachsenden CHO-Zellen und unter dem Einfluss von Gossypol (2 μM).

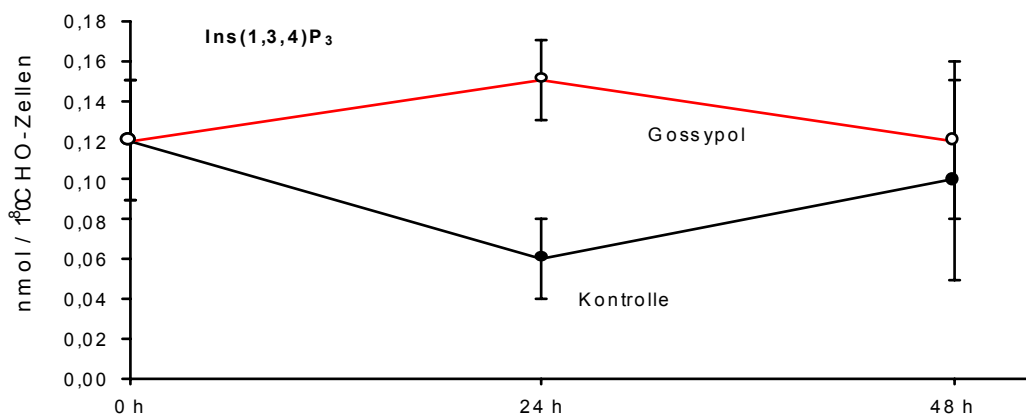


Diagramm 15 a) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung



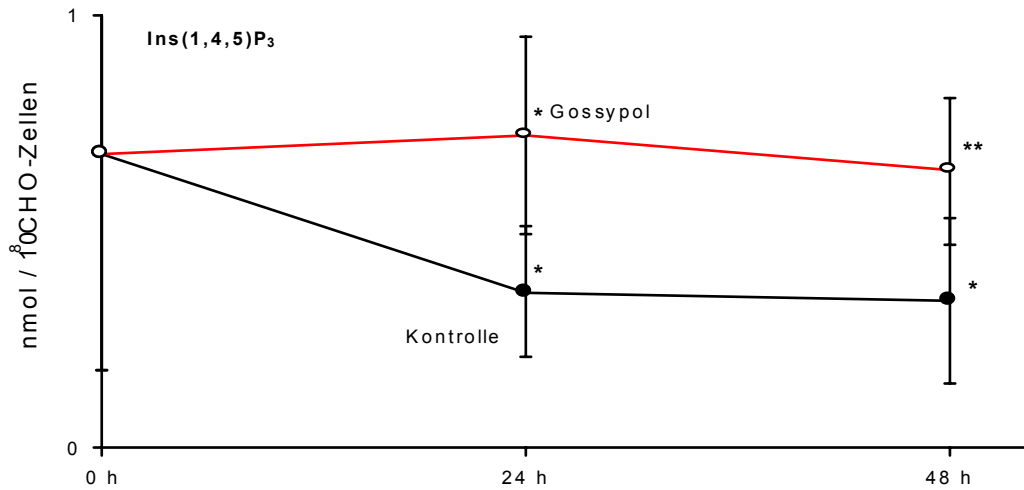


Diagramm 15 b) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

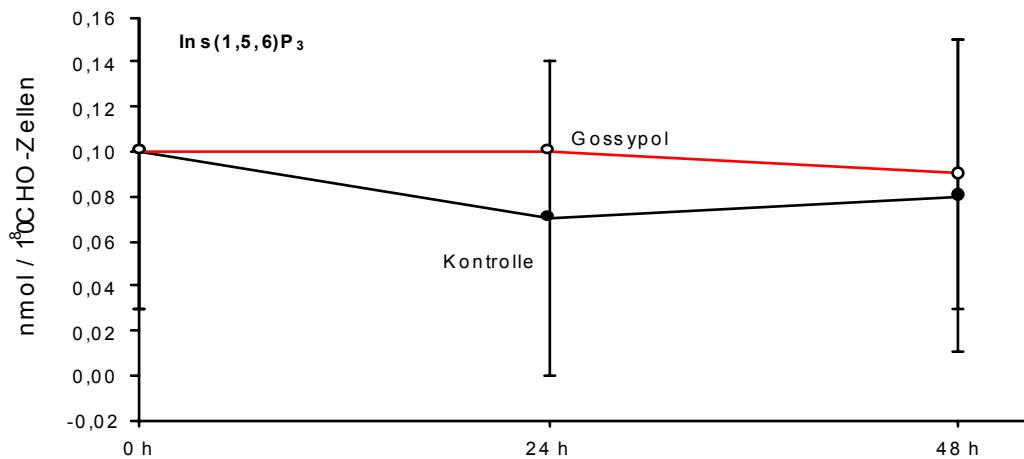


Diagramm 15 c) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,5,6)P<sub>3</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

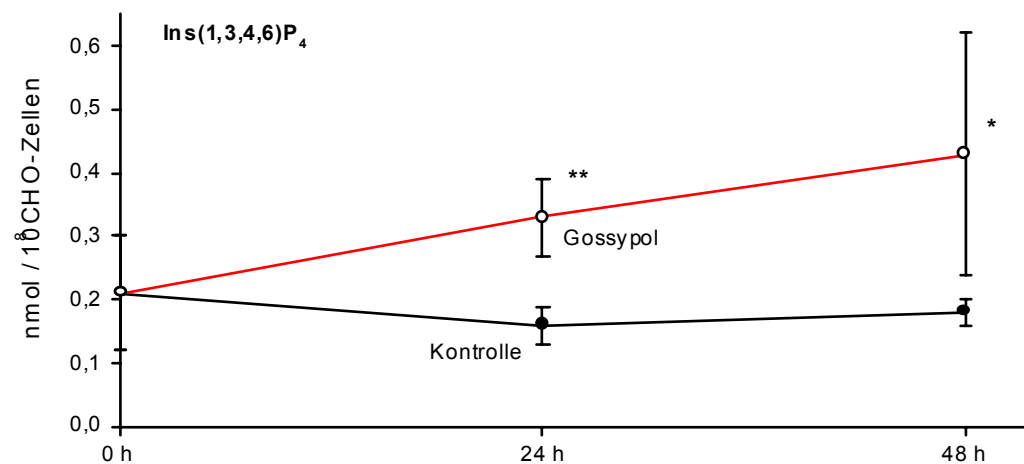


Diagramm 15 d) Verteilung des Inositolphosphatisomeres  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  in der Kontrollreihe und unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypoleinwirkung.

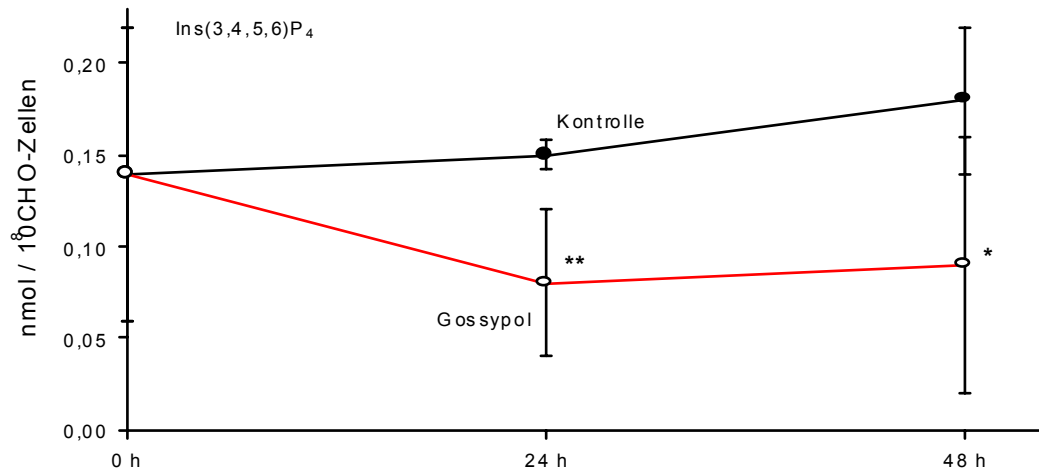


Diagramm 15 e) Verteilung des Inositolphosphatisomeres  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  in der Kontrollreihe und unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypoleinwirkung.

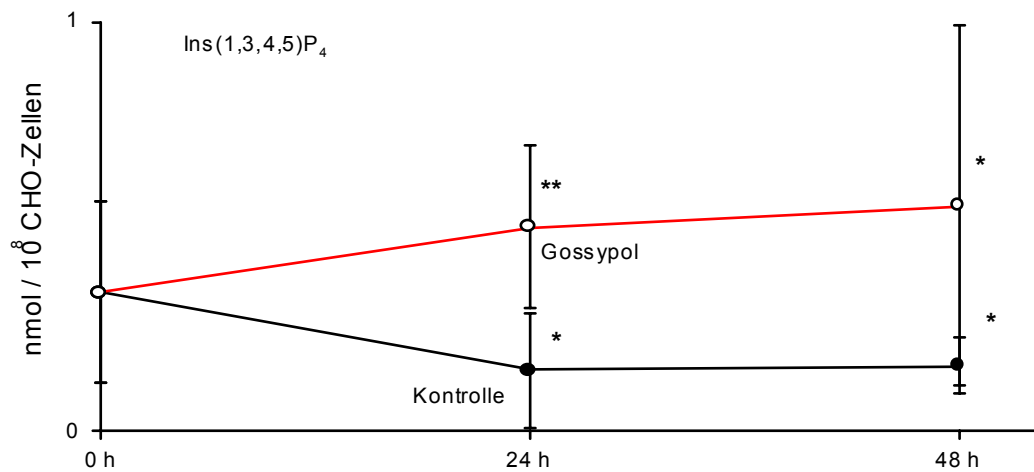


Diagramm 15 f) Verteilung des Inositolphosphatisomeres  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  in der Kontrollreihe und unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypoleinwirkung.

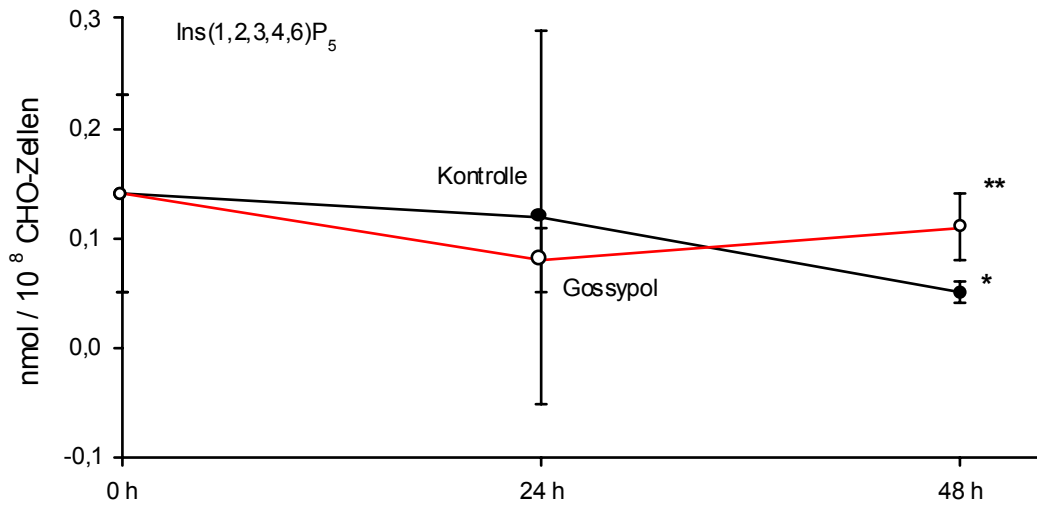


Diagramm 15 g) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

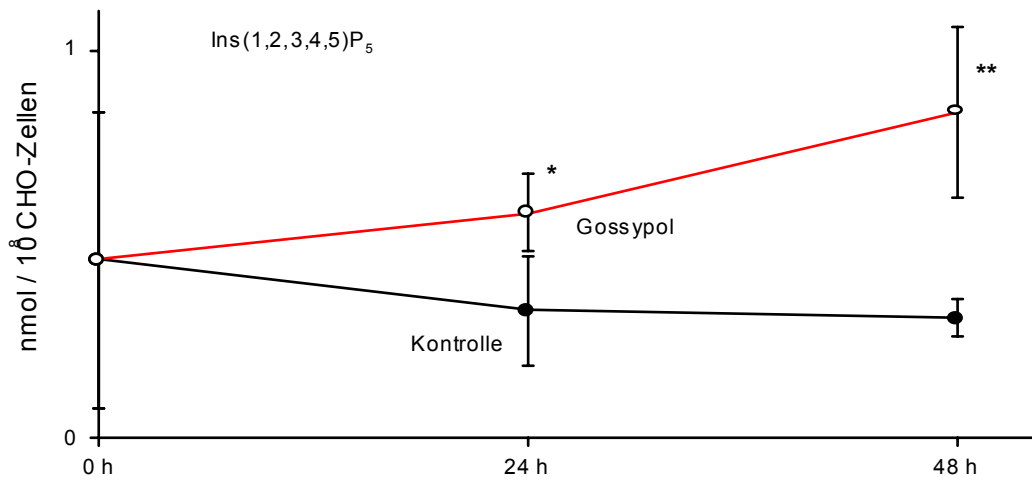


Diagramm 15 h) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

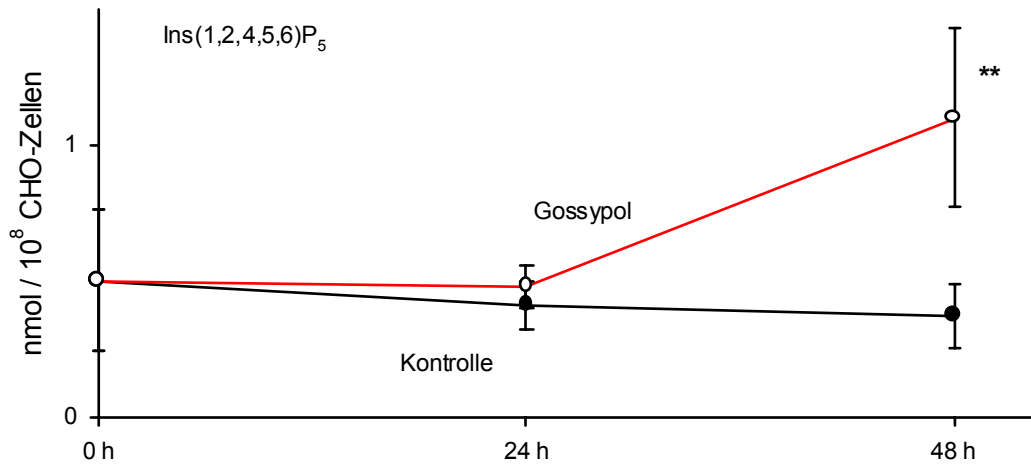


Diagramm 15 i) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

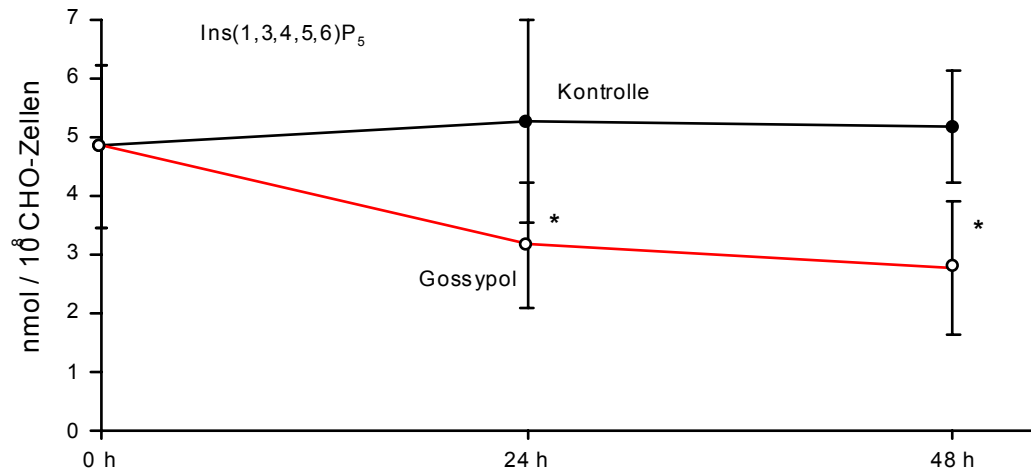


Diagramm 15 j) Verteilung des Inositolphosphatisomeres Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> in der Kontrollreihe und unter 2 μM Gossypoleinwirkung.

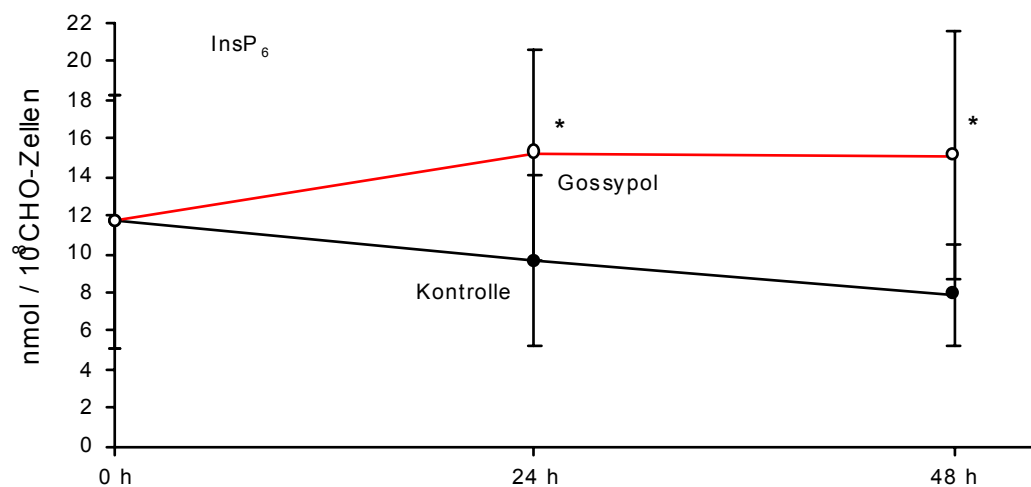


Diagramm 15 k) Verteilung des Inositolphosphatisomeres  $\text{InsP}_6$  in der Kontrollreihe und unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypoleinwirkung.

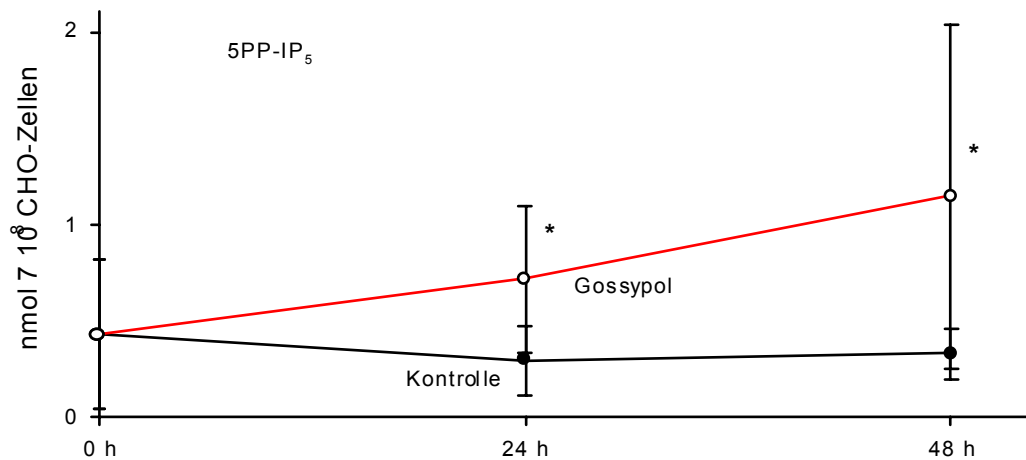


Diagramm 15 l) Verteilung des Inositolphosphatisomeres  $5\text{PP-IP}_5$  in der Kontrollreihe und unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypoleinwirkung.

Diagramm 15a-l: **Konzentrationen jedes einzelnen Inositolphosphatisomers unter normalen Wachstumsbedingungen und unter Einfluss von Gossypol**

Von a-l finden sich unter a:  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , b:  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , c:  $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$ , d:  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ , e:  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ , f:  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , g:  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ , h:  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , i:  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ , j:  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ , k:  $\text{InsP}_6$ , l:  $5\text{PP-IP}_5$  die einzelnen Konzentrationen in  $\text{nmol} / 10^8$  CHO-Zellen der Inositolphosphatisomer gegliedert. Die schwarze Kurve entspricht der Kontrolle und die rote Kurve dem Zusatz von  $2 \mu\text{M}$  Gossypol. Die Daten wurden in einem Zeitraum von 48 h erhoben, es handelt sich hierbei um die gemittelten Werte aller durchgeführten Wachstumsversuche in Petrischalen (wie in 2.3.6. beschrieben). Die Standardabweichungen wurde ausgehen von einer Stichprobe ( $n=5$ ) berechnet. Signifikantsniveaus im T-Test kleiner 0,1 wurden mit einem \* markiert und kleiner 0,01 mit zwei \*\*.

### 3. Ergebnisse

	Ins(1,3,4)P <sub>3</sub>		Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>			Ins(1,5,6)P <sub>3</sub>	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung
1 0h AWK	0,12	0,03	0,68	0,5		0,1	0,07
2 24h DMSO	0,06	0,02	0,36	0,15	<b>0,07</b> <sup>2/1</sup>	0,07	0,07
3 48h DMSO	0,1	0,05	0,34	0,19	<b>0,07</b> <sup>3/1</sup>	0,08	0,07
4 24h Gossypol	0,15	0,02	0,72	0,23	<b>0,04</b> <sup>4/2</sup>	0,1	0,0
5 48h Gossypol	0,12	0,04	0,64	0,17	<b>0,01</b> <sup>5/3</sup>	0,09	0,06

	Ins(1,3,4,6)P <sub>4</sub>			Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>			Ins(3,4,5,6)P <sub>4</sub>		
	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test
1 0h AWK	0,21	0,09		0,34	0,22		0,14	0,08	
2 24h DMSO	0,16	0,03	<sup>2/1</sup>	0,15	0,14	<b>0,06</b> <sup>2/1</sup>	0,15	0,008	<sup>2/1</sup>
3 48h DMSO	0,18	0,02	<sup>3/1</sup>	0,16	0,07	<b>0,09</b> <sup>3/1</sup>	0,18	0,04	0,1 <sup>3/1</sup>
4 24h Gossypol	0,33	0,06	<b>0,002</b> <sup>4/2</sup>	0,5	0,2	<b>0,01</b> <sup>4/2</sup>	0,08	0,04	<b>0,008</b> <sup>4/2</sup>
5 48h Gossypol	0,43	0,19	<b>0,04</b> <sup>5/3</sup>	0,55	0,44	<b>0,07</b> <sup>5/3</sup>	0,09	0,07	<b>0,02</b> <sup>5/3</sup>

	Ins(1,2,3,4,6)P <sub>5</sub>			Ins(1,2,3,4,5)P <sub>5</sub>			Ins(1,2,4,5,6)P <sub>5</sub>		
	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test
1 0h AWK	0,14	0,09		0,46	0,38		0,5	0,26	
2 24h DMSO	0,12	0,17	<sup>2/1</sup>	0,33	0,14	<sup>2/1</sup>	0,41	0,09	<sup>2/1</sup>
3 48h DMSO	0,05	0,01	<b>0,06</b> <sup>3/1</sup>	0,31	0,05	<sup>3/1</sup>	0,37	0,12	<sup>3/1</sup>
4 24h Gossypol	0,08	0,03	<sup>4/2</sup>	0,58	0,1	<b>0,01</b> <sup>4/2</sup>	0,48	0,08	<sup>4/2</sup>
5 48h Gossypol	0,11	0,03	<b>0,006</b>	0,84	0,22	<b>0,002</b>	1,1	0,33	<b>0,003</b>

	Ins(1,3,4,5,6)P <sub>5</sub>			InsP <sub>6</sub>			5PP-IP <sub>5</sub>		
	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test	Mittelwert	Standard-abweichung	T-Test
1 0h AWK	4,83	1,38		11,68	6,61		0,43	0,39	
2 24h DMSO	5,24	1,73	<sup>2/1</sup>	9,63	4,46	<b>0,06</b> <sup>2/1</sup>	0,3	0,18	<sup>2/1</sup>
3 48h DMSO	5,16	0,96	<sup>3/1</sup>	7,89	2,63	<sup>3/1</sup>	0,33	0,13	<sup>3/1</sup>
4 24h Gossypol	3,16	1,06	<b>0,02</b> <sup>4/2</sup>	15,19	5,47	<b>0,02</b> <sup>4/2</sup>	0,72	0,38	<b>0,07</b> <sup>4/2</sup>
5 48h Gossypol	2,76	1,12	<b>0</b> <sup>5/3</sup>	15,08	6,44	<b>0,04</b> <sup>5/3</sup>	1,15	0,89	<b>0,06</b> <sup>5/3</sup>

Diagramm 16: **Verteilung der einzelnen Inositolphosphatisomere bei normalen Zellwachstum und unter Einfluss des Hemmstoffes Gossypol**

In dieser Tabelle werden für jedes einzelne Inositolphosphatisomer die berechneten Mittelwerte für die Anwachskontrolle, die 24 und 48 h Werte der Kontrolle, sowie die 24 und 48 h Werte mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypolzusatz bezogen auf  $\text{nmol} / 10^8$  CHO-Zellen dargestellt. Die jeweiligen Standardabweichungen wurden ausgehend von Stichproben ( $n=5$ ) berechnet. Bei dem T-Test handelt es sich um einen einseitig durchgeführten Test vom homoskedastischen Typ (ausgehend von der gleichen Varianz zweier Stichproben). **2/1** vergleicht die AWK mit der 24 h Kontrolle, **3/1** vergleicht die AWK mit der 48 h Kontrolle, **4/2** vergleicht die 24 h Kontrolle mit dem 24 h Wert Gossypol, und **5/3** vergleicht die 48 h Kontrolle mit dem 48 h Werte Gossypol. Signifikante Tests kleiner 0.1 wurden **fett** hervorgehoben, während Signifikanzniveaus über 0.1 weggelassen wurden.

Nach Abschluss der Versuchsserien ergab sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Hinblick auf die verschiedenen Inositolphosphate. Bei den Versuchsreihen ohne Hemmstoffzusatz, entsprechend einer normal wachsenden tierischen Zellreihe, kommt es nach einem Zeitraum von 48 h zu einer Abnahme des  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  von  $-58\%$ , des  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  von  $-28\%$  und des  $\text{InsP}_6$  von  $-36\%$ .  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$  nimmt als einziges Inositolphosphat-Isomer kontinuierlich um  $27\%$  zu. Alle anderen Isomere nehmen erst an Konzentration ab, um dann nach 24 h wieder mit der Synthese der Inositolphosphate zu beginnen. So kommt es über 48 h betrachtet zu einer  $16\%$ igen Zunahme des  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , einer  $16\%$ igen Abnahme des  $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  nimmt um  $-49\%$  ab, ebenso  $5\text{PP-IP}_5$ , welches um  $-20\%$  abnimmt.

Unter dem Einfluss von 2  $\mu\text{M}$  Gossypol sieht das Verteilungsspektrum der  $\text{InsP}$ -Isomere wie folgt aus. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen sich signifikante Unterschiede beim  $\text{Ins}(1,2,3,4)\text{P}_4$ , das um  $87\%$  ansteigt,  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  ( $57\%$ ) und  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , welches um  $71\%$  ansteigt. Gravierend sind die sehr starken Konzentrationsanstiege von  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  (um  $130\%$ ) und  $5\text{PP-IP}_5$ , welches um  $127\%$  zunimmt.

Fast unverändert bleiben die Konzentrationen von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$ . Ähnlich zur Kontrollserie verhalten sich  $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$  ( $-10\%$ ) und  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  ( $-30\%$ ). Das einzige  $\text{InsP}$ , welches an Konzentration abnimmt, im Vergleich zur Kontrolle, ist  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  ( $-48\%$ ).

Inositolphosphate	Kontrolle		<i>Gossypol</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h
	Abweichung der Konzentrationen im Vergleich zur AWK		Abweichung der Konzentrationen im Vergleich zur AWK	
<b>Ins(1,3,4)P<sub>3</sub></b>	- 50 %	- 17 %	+25 %	+/- 0 %
<b>Ins(1,4,5)P<sub>3</sub></b>	- 47 %	- 50 %	+ 6 %	- 6 %
<b>Ins(1,5,6)P<sub>3</sub></b>	- 30 %	- 20 %	+/- 0 %	- 10 %
<b>Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub></b>	- 24 %	- 14 %	+ 57 %	+ 105 %
<b>Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub></b>	- 56 %	- 53 %	+ 47 %	+ 62 %
<b>Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub></b>	+ 7 %	+ 29 %	- 43 %	- 36 %
<b>Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub></b>	- 14 %	- 64 %	- 43 %	- 21 %
<b>Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub></b>	- 28 %	- 33 %	+ 26 %	+ 83 %
<b>Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub></b>	- 18 %	- 26 %	- 4 %	+ 120 %
<b>Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub></b>	+ 9 %	+ 7 %	- 35 %	- 43 %
<b>InsP<sub>6</sub></b>	- 18 %	- 32 %	+ 30 %	+ 29 %
<b>5PP-IP<sub>5</sub></b>	- 30 %	- 23 %	+ 67 %	+ 167 %

Diagramm 17: **Verteilung der Konzentrationsveränderungen der einzelnen InsP-Isomere in der Kontrollserie und mit Gossypolzusatz**

Aufgetragen wurde das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Inositolphosphatisomere im zeitlichen Verlauf von 48 h, einmal für die Kontrolle und zum Anderen für die mit Hemmstoff (2  $\mu$ M *Gossypol*) bearbeiteten CHO-Zellen. Der Ausgangswert waren die Konzentrationen der InsP, die bei der Anwachskontrolle (AWK) gemessen wurden, der 24 h Wert gibt die Abweichung der Konzentrationen von der AWK in Prozent an. Der 48 h Wert gibt die Abweichung der Konzentrationen im Vergleich zum 24 h Wert an. Die 24 h und 48 h Werte der mit *Gossypol* bearbeiteten Zellen wurden ebenfalls mit den Konzentrationen aus der AWK verglichen.

Anhand der hier ermittelten Daten zeigt sich abschließend das folgend beschriebene Verteilungsmuster von Inositolphosphatisomeren. Dabei kommt es zu einer generellen Abnahme der InsP<sub>3</sub>-Isomere nach 48 h (Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> nimmt um 67% ab, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> um 97% und Ins(1,5,6)P<sub>3</sub> um 50%). Ebenso nimmt die Konzentration der InsP<sub>4</sub>-Isomere stetig ab (Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> um 38% und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> um 109%) mit



der einzigen Ausnahme von  $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ , dass um 36% zunimmt. Gefolgt von den  $\text{InsP}_5$ -Isomere, die bis auf eine Ausnahme alle an Konzentration abnehmen ( $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  um 78%,  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  um 61% und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  um 44%), außer dem  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ , dass um 16% an Konzentration zunimmt.  $\text{InsP}_6$  nimmt um 50% ab und ebenso  $5\text{PP-IP}_5$  um 53%. Die soeben aufgelistete typische Verteilung der Inositolphosphate geht mit einem gesunden Zellwachstum einher.

Mit Hilfe der hier ermittelten Daten lässt sich ebenfalls ein typisches Verteilungsmuster der  $\text{InsP}$ -Isomere, für die mit Gossypol behandelten Zellen erstellen, entsprechend also einem gehemmten Zellwachstum. Man erkennt deutlich einen gravierenden Unterschied zwischen den beiden Inositolphosphat-Verteilungsmustern. Bei der gehemmten Zellreihe nimmt das  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  um 25% an Konzentration zu, das  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  bleibt unverändert und  $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$  nimmt nur geringfügig um 10% ab. Genau entgegengesetzt zur Kontrollreihe nehmen folgende  $\text{InsP}_4$ -Isomere an Konzentration zu ( $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  um 162% und  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  um 109%) und nur das  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  nimmt um 79% ab.  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  ist das einzige  $\text{InsP}$ -Isomer, dass sich in der Kontrolle sowie in der Hemmstoffreihe gleich verhält, nämlich um 64% an Konzentration abnimmt. Die beiden anderen  $\text{InsP}_5$ -Isomere nehmen im Verlauf von 48 h an Konzentration zu ( $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  um 109% und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  um 116%).  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  nimmt um 78% ab. Ebenfalls konträr zur Kontrolle verhalten sich  $\text{InsP}_6$ , das um 59% zunimmt und  $5\text{PP-IP}_5$ , dass um 234% zunimmt.

### 3.10. Darstellung der Inositolphosphat-Chromatogramme am Beispiel eines Wachstumsversuches

Mittels der analytischen HPLC mit Metall-Indikator-Detektion wurden wie in 2.2.1 ausführlich beschrieben, die einzelnen Inositolphosphatisomere isoliert und graphisch dargestellt.

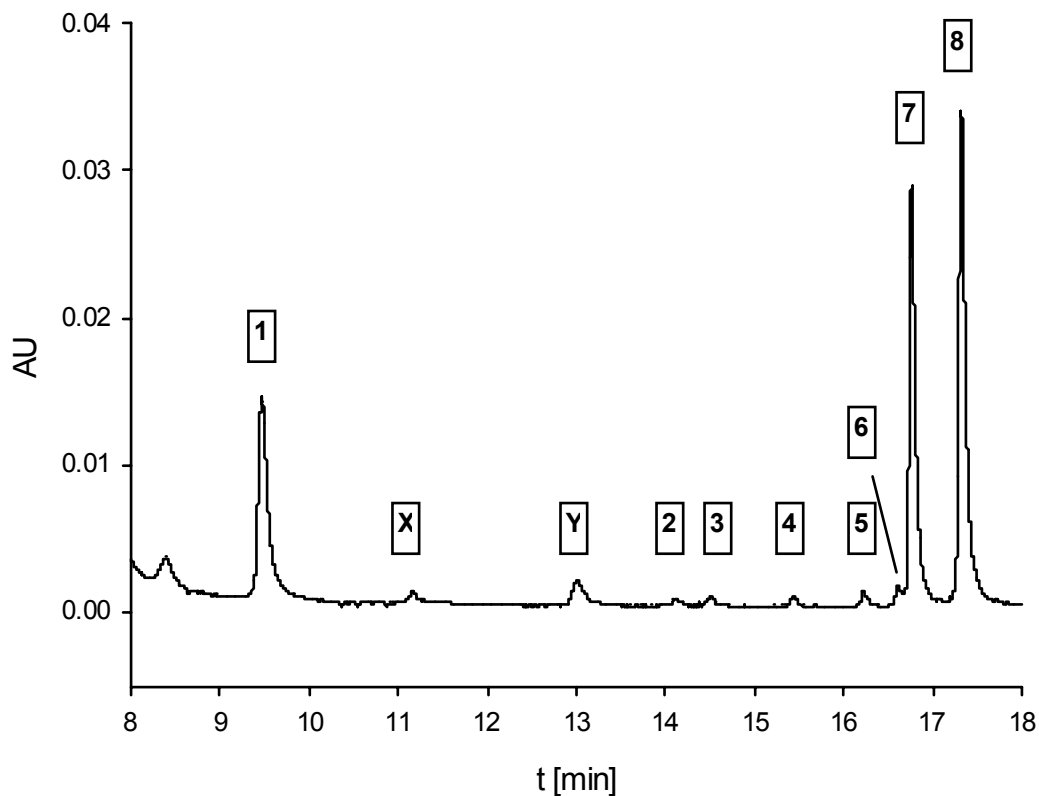


Diagramm 18: **Isolierte Inositolphosphatisomere aus dem 24 h Wert der Kontrolle**

Das Chromatogramm zeigt die Inositolphosphatisomere die mittels HPLC-Technik isoliert wurden. (24 h Wert der Kontrolle aus Versuch Nr.12) Der mit 1 nummerierte Peak steht für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , 2 für  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ , 3 für  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , 4 für  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ , 5 für  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , 6 für  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ , 7 für  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und 8 für  $\text{InsP}_6$ . Die mit X und Y gekennzeichneten Peaks konnten nicht sicher identifiziert werden.

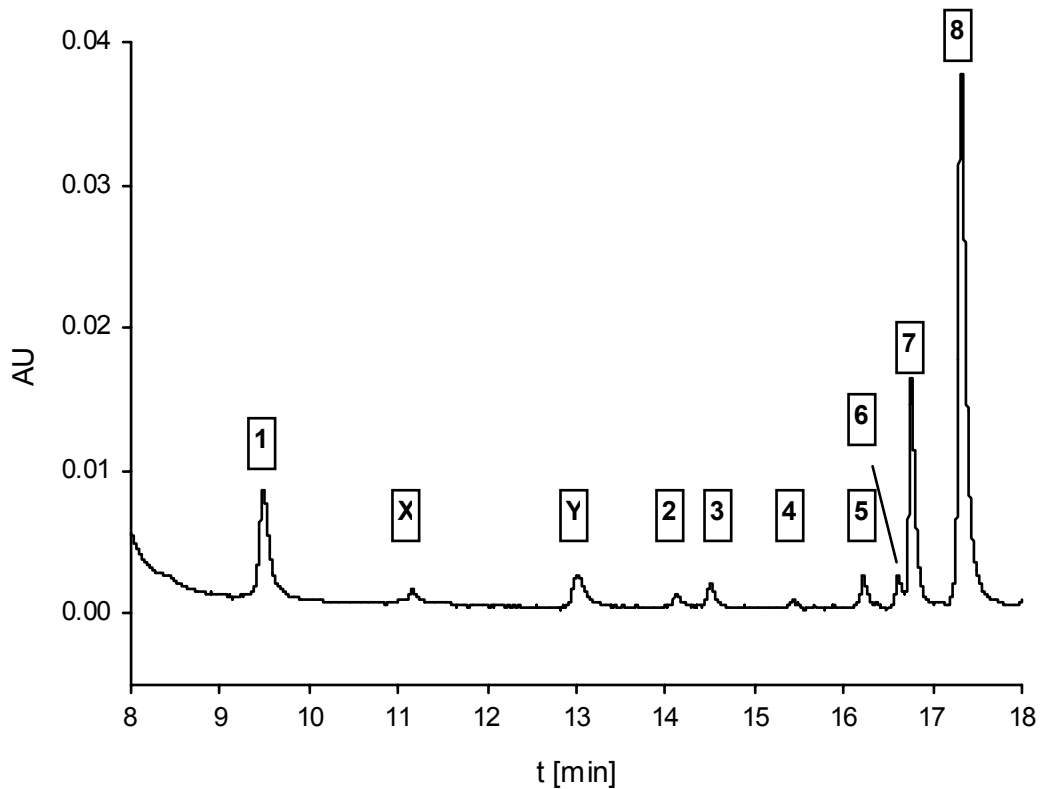


Diagramm 19: **Isolierte Inositolphosphatisomere aus dem 24 h Wert mit Gossypol**

Das Chromatogramm zeigt die Inositolphosphatisomere die mittels HPLC-Technik isoliert wurden. (24 h Wert mit Gossypol aus Versuch Nr.12) Der mit **1** nummerierte Peak steht für  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , **2** für  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ , **3** für  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , **4** für  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ , **5** für  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , **6** für  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$ , **7** für  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und **8** für  $\text{InsP}_6$ . Die mit X und Y gekennzeichneten Peaks konnten nicht sicher identifiziert werden.

### 3.11. Auswertung der Viability-Tests

Zu jeder Versuchsreihe sind parallel dazu je zwei Viability-Tests mitgelaufen. In dem folgenden Diagramm werden die gemittelten Daten der Vitalitätsprüfungen aus den Versuchsreihen mit Gossypol graphisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Hemmstoff Gossypol die Zellen an ihrem Wachstum hindert, ohne sie dabei zu zerstören oder ihnen großen Schaden zuzufügen. Während die Vitalität der Anwachskontrolle nach 48 Stunden 97,9% beträgt, liegt die der Zellen mit Gossypolzusatz bei 94,8%.

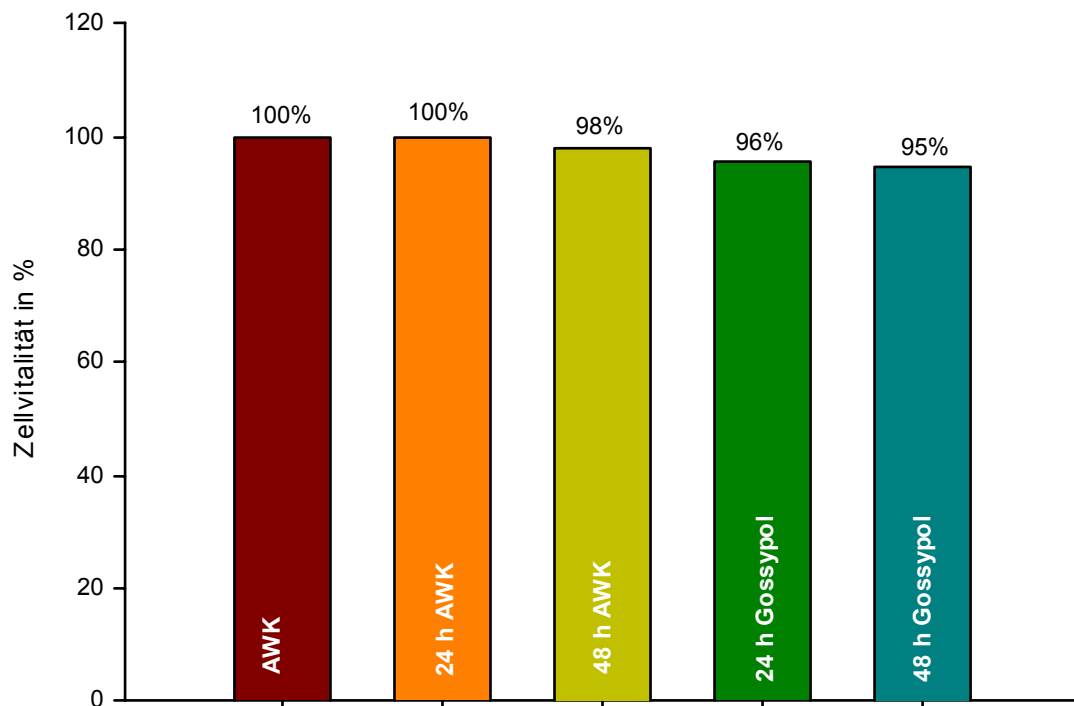


Diagramm 20: **Mittelwerte aller Viability-Tests mit 2  $\mu$ M Gossypol**

Die Graphik zeigt die prozentual angegebenen, gemittelten Daten aller durchgeführter Vitalitätstests. Nach 2  $\mu$ M Gossypolzusatz liegt der Anteil der vitalen Zellen bei 95%, was für eine geringe Toxizität von Gossypol in der hier angegebenen Konzentration spricht.

Zum Vergleich wurden die Vitalitätstests der Versuchsreihen mit 3  $\mu$ M Gossypol ebenfalls gemittelt und graphisch aufgetragen.

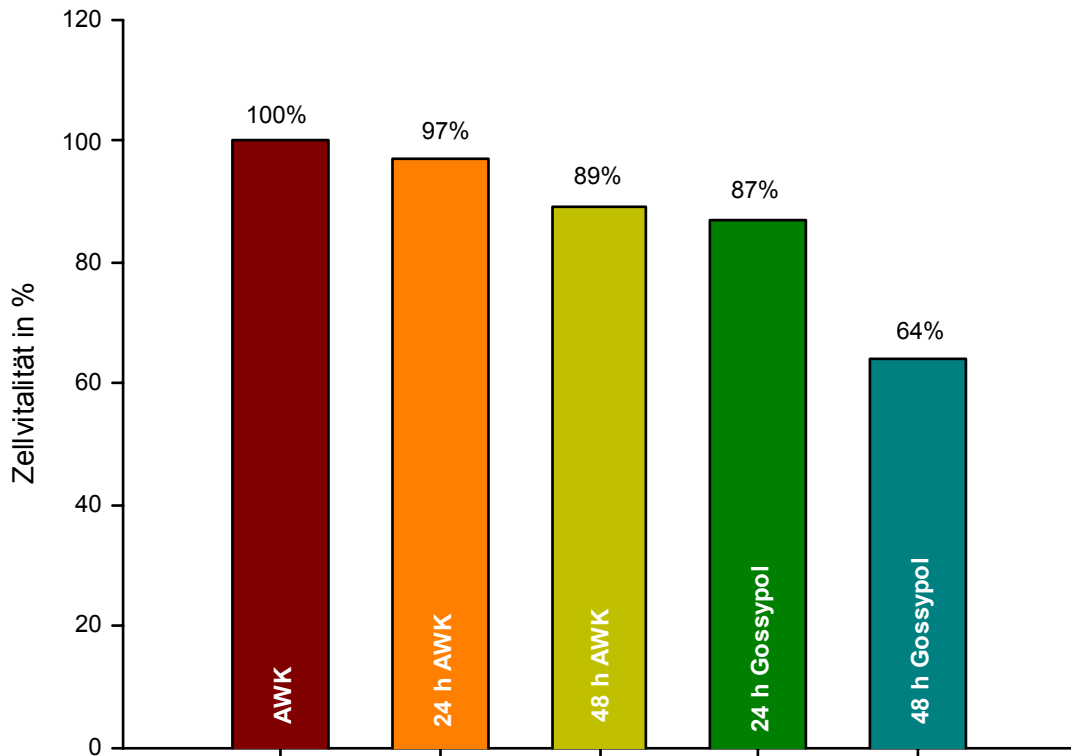
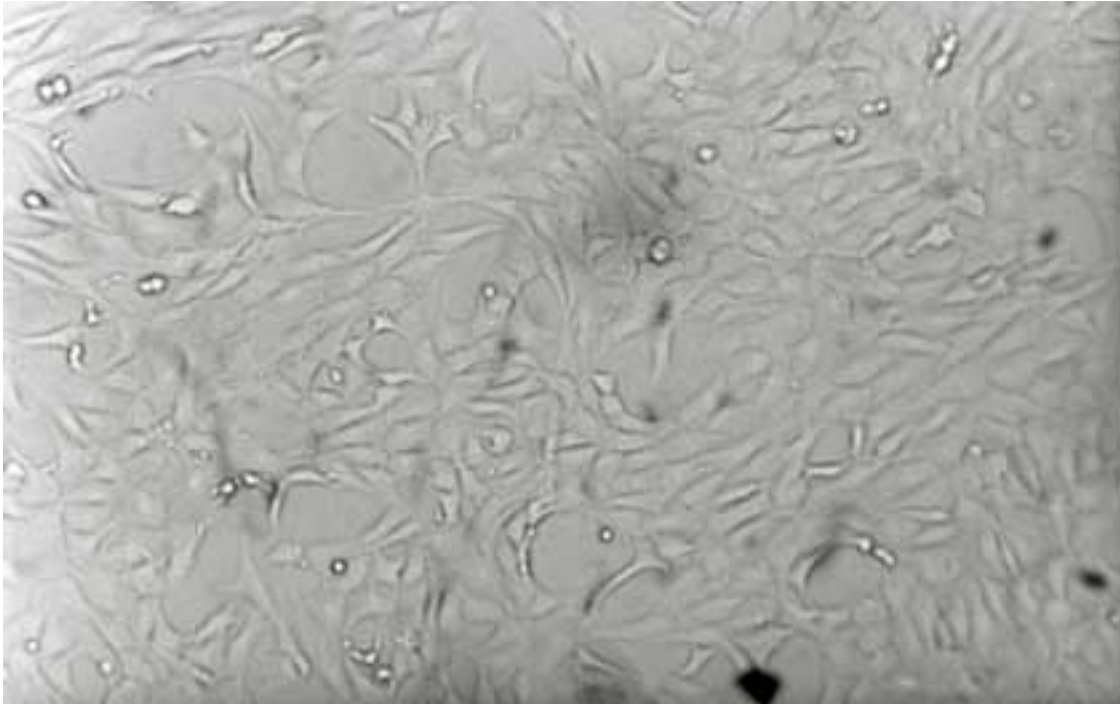
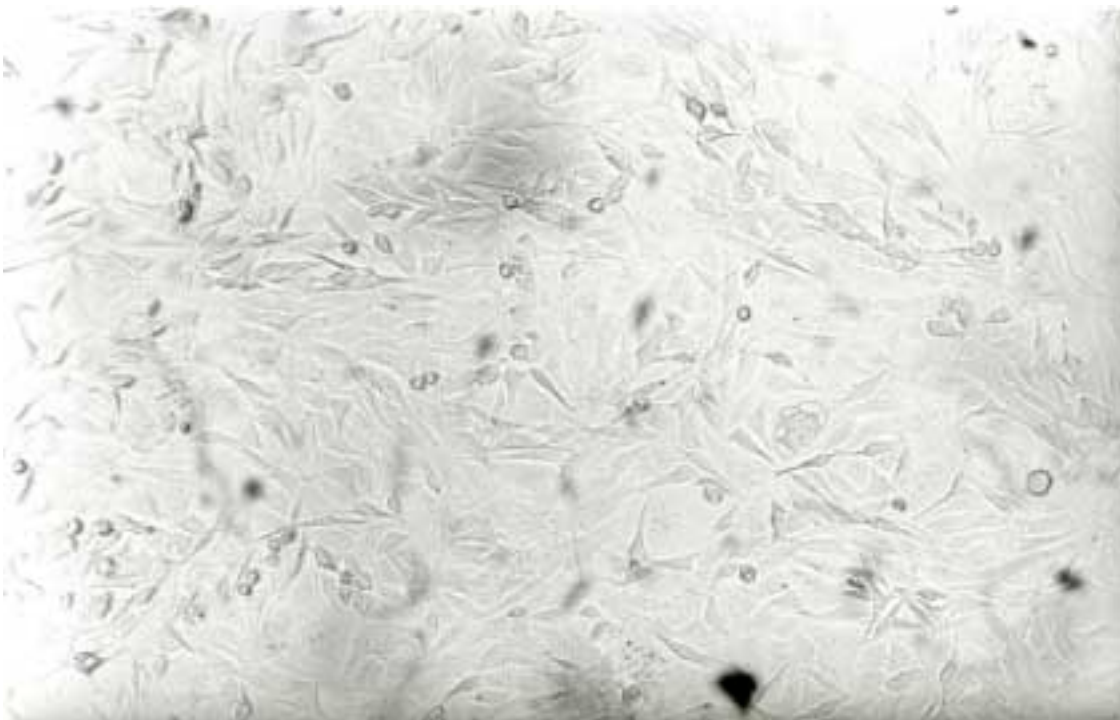


Diagramm 21: **Mittelwerte aller Viability-Tests mit 3  $\mu$ M Gossypol**

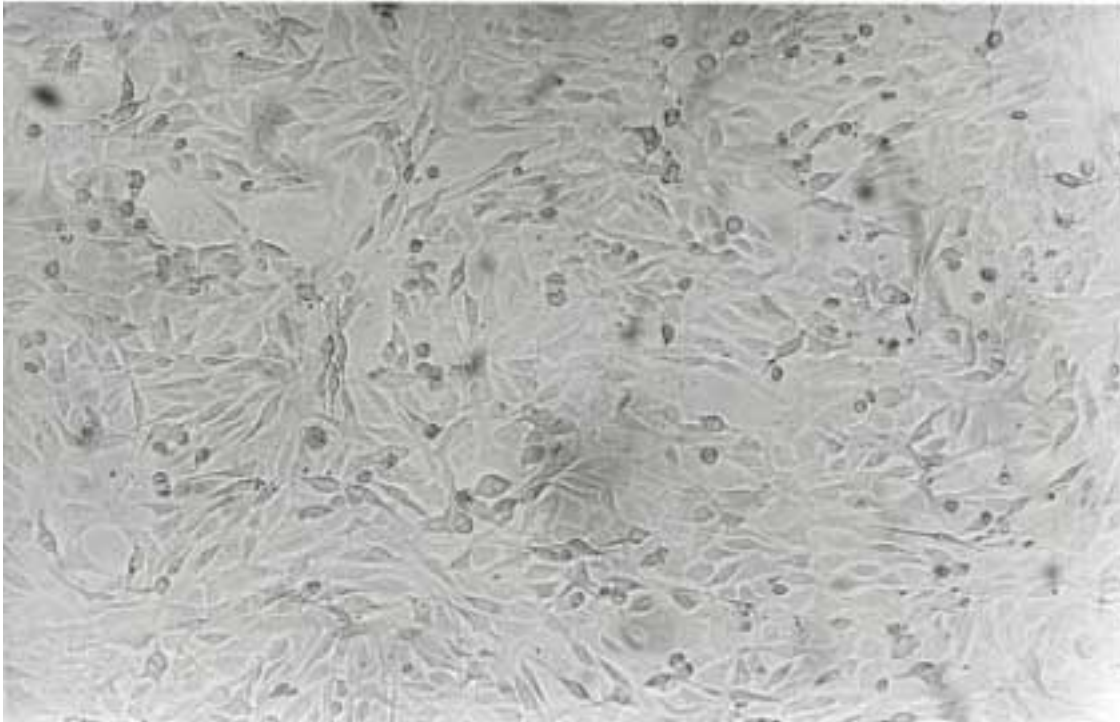
Die Graphik zeigt die prozentual angegebenen, gemittelten Daten aller durchgeführten Vitalitätstests. Deutlich zu erkennen ist die zunehmende Toxizität des Stoffes Gossypol bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M überleben nach 48 h nur noch 64% der CHO-Zellen (vergleiche Diagramm 20).



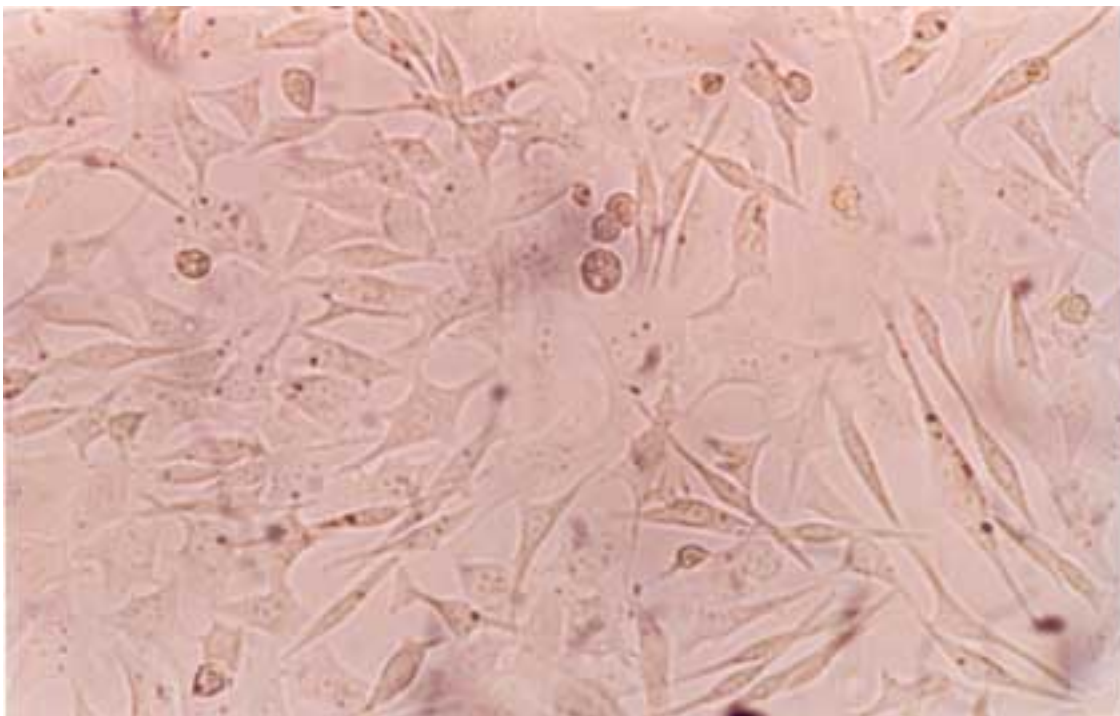
**Abb. 1:** Die Anwachskontrolle der CHO-Zellen unter dem Lichtmikroskop in einer Vergrößerung von 1 : 10.000



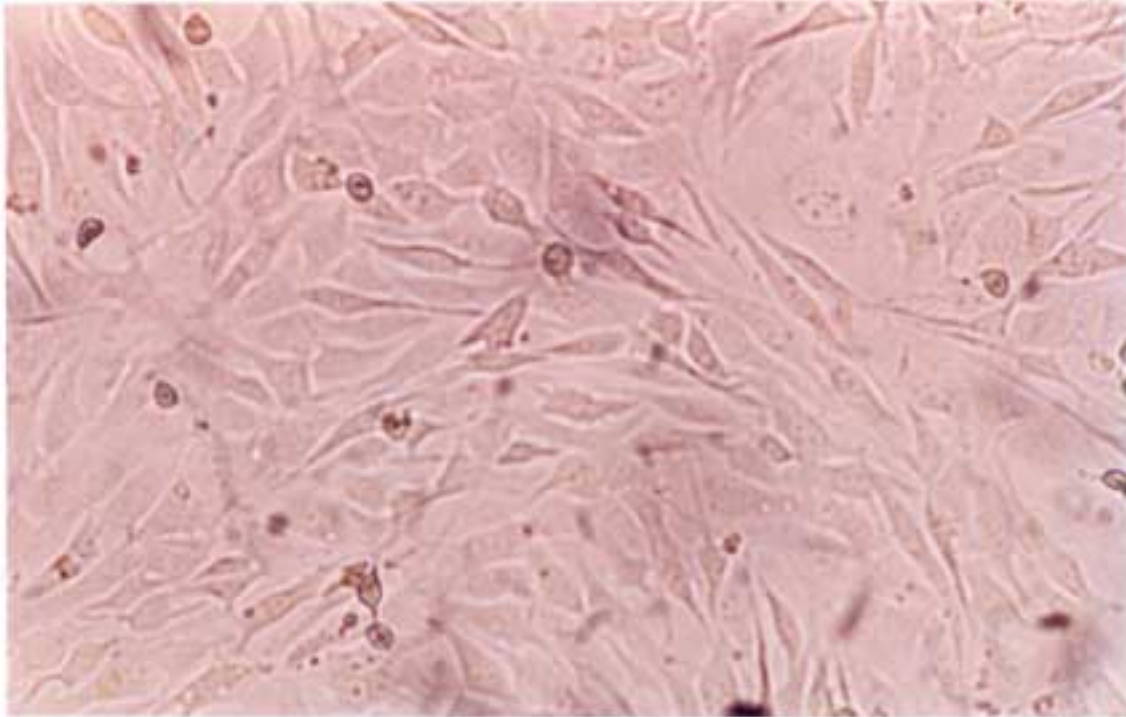
**Abb. 2:** CHO-Zellen (Kontrolle) nach 24 h, unter dem Lichtmikroskop in einer Vergrößerung von 1 : 6.000



**Abb. 3: CHO-Zellen (Kontrolle) nach 48 h, unter dem Lichtmikroskop in einer Vergrößerung von 1 : 6.000**



**Abb. 4: CHO-Zellen (Gossypol) nach 24 h, unter dem Lichtmikroskop in einer Vergrößerung von 1 : 10.000**



**Abb. 5:** CHO-Zellen (Gossypol) nach 48 h, unter dem Lichtmikroskop in einer Vergrößerung von 1 : 10.000



## 4. Diskussion

### 4.1. *Optimierung der Wachstumsbedingungen und des Versuchsaufbaus*

Die CHO-Zellen wurden zur Durchführung der Versuchsreihe vom Heinrich-Pette-Institut zur Verfügung gestellt. Während andere Forschungsteams die Zellen in  $\alpha$ -MEM (Medium) (Scott P.H., 1997, Suda N., 1997) oder McCoy's Medium 5A (Wang Y., 1984) kultivierten, zeigten die CHO-Zellen in dem hier verwendetet DMEM (enthält 7,2 mg / l Inositol) eine Verdopplungszeit innerhalb von 24 h in Gegenwart von 2% FCS. Scott, Suda und Wang verwendeten aber auch einen 10%igen FCS-Zusatz im Medium. Bei den Versuchen in den Mikrowells zur Ermittlung der optimalen initialen Anzahl der Zellen in der Anwachskontrolle wurden Werte zwischen  $0,5$  und  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Well ermittelt. Minegishi et al. (1997) führten Ihre Wachstumsversuche mit  $1,5 \times 10^5$  Zellen / Well durch und erzielten damit zufriedenstellende Ergebnisse. Die Schwankungen in unserer Versuchsreihe traten auf, weil sich die Zellen zum Teil unterschiedlich von der Trypsinbehandlung erholten. Manche Zellen waren bereits nach 12 h wieder adhärent und proliferierten, andere wiederum brauchten 24 h oder mehr, um wieder adhärent zu werden und wurden dann vermutlich nach 24 h mit abgesaugt und gingen dadurch verloren. Um einen Mediumswechsel mit eventuellen Verlust der Zellen zu vermeiden wurde die Versuchsdauer auf 48 h reduziert. Durch die Verwendung von frischen, bzw. länger gelagerten Stammlösungen an Hemmstoffen, ergaben sich während der laufenden Versuche Differenzen in Bezug auf die Wirkung gleicher Hemmstoffkonzentrationen. Bei den in den Mikrowells durchgeführten Wachstumsversuchen wurde eine bereits ältere Stammlösung von  $2 \mu\text{M}$  Gossypol verwendet, die keinen nennenswerten Effekt auf das Zellwachstum ausübte. Bei den Wachstumsversuchen in den Petrischalen wurde eine frisch angesetzter Stocklösung des Hemmstoffes verwendet und dabei kam es unter  $2 \mu\text{M}$  Gossypol Wirkung zu einer Proliferationshemmung. Vermutlich verliert der Hemmstoff über einen gewissen Zeitraum an Wirkung, oder aber erleidet an der Wand in den Mikrowells hängen, wodurch sich seine effektive Konzentration verringert. Es muss daraus geschlossen werden, den Inhibitor jedes Mal frisch anzusetzen, oder zumindest nach Ablauf einer definierten Frist zu wechseln.

#### **4.1.1. Wachstumshemmung durch IP3K-Hemmstoffe**

Für die im Ergebnissteil ausführlich besprochenen Hemmstoffen ECG, EGC, EGCG, EA, Hypericin und Gossypol konnte K. Hillemeier eine IP3K-Hemmung nachweisen (Jurkat-T-Zellen und 3T3-Zellen) deren in vitro  $IC_{50}$ -Wert deutlich unterhalb des in vitro  $IC_{50}$ -Wertes für die Topoisomerase-II liegt (K. Hillemeier, Promotionsarbeit 2001). In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen zeigte sich unter ECG-Wirkung eine signifikante Wachstumshemmung der CHO-Zellen in Konzentrationen von 0.1, 0.2, 5 und 10  $\mu\text{M}$  nach 24 h, während die Konzentrationen 0.05  $\mu\text{M}$  kaum eine Veränderung der Zellzahl bewirkte und es unter 0.02  $\mu\text{M}$  ECG zu einem Zellwachstum ähnlich dem der Kontrolle kam. Nach 48 h Einwirkungszeit nahm die Zellzahl unter den unterschiedlichen Konzentrationen weiterhin ab, die stärkste Hemmung fand bei 0.1  $\mu\text{M}$  ECG statt (Diagramm 5).

Bei den Versuchen mit EGC kommt es bei der geringsten Konzentration (0.2  $\mu\text{M}$ ) zu keiner Proliferationshemmung, nur 1 und 5  $\mu\text{M}$  führen zu einer Wachstumshemmung, wobei es bei der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nach 24 h wieder zu einem leichten Zellwachstum kam (Diagramm 6).

Der Hemmstoff EGCG führt in Konzentrationen von 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  bei CHO-Zellen zu keiner Wachstumshemmung, lediglich bei 40  $\mu\text{M}$  EGCG verläuft das Wachstum deutlich langsamer, als in der Kontrolle (Diagramm 7).

Nach Zugabe von Ellagsäure (0.2, 1, 5  $\mu\text{M}$ ) auf die CHO-Zellen kommt es nach 24 h zu einer signifikanten Wachstumshemmung und nach 48 h zu einem leichten Anstieg der Zellzahl unter 5  $\mu\text{M}$  EA.

Beim Hemmstoff Hypericin sieht man in den niedrigsten Konzentrationen von 0.5 und 1  $\mu\text{M}$  ein Zellwachstum entsprechend der Kontrollreihe, bei einer Konzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  ein deutlich langsames Wachstum und bei den höheren Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Wachstumshemmung (Diagramm 8).

Der Wachstumsversuch mit Gossypol zeigt unter dem Einfluss von 1 und 2  $\mu\text{M}$  Gossypol ein Zellwachstum vergleichbar der Kontrolle und unter 0.2  $\mu\text{M}$  in den ersten 48 h ein verlangsamtes Wachstum, das sich nach 72 h der Kontrolle annähert. Nur bei 5  $\mu\text{M}$  Gossypol zeigen die CHO-Zellen über 72 h eine Abnahme der Zellzahl. Die graphischen Darstellungen der Wachstumsversuche zeigen ebenfalls, dass bei nicht kontinuierlicher Hemmstoffgabe der Effekt reversibel ist und sich die primär

gehemmten Wachstumskurven, langsam wieder der Kontrollreihe annähern (Diagramm 9 unter 3.7. im Ergebnissteil).

#### **4.2. Das InsP-Massenspektrum in CHO-Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen**

Um zu zeigen, dass der Inositolphosphatstoffwechsel eine gravierende Rolle beim Zellwachstum spielt und es von enormer Wichtigkeit dabei ist in welchem Konzentrationsverhältnis die einzelnen Inositolphosphatisomere zueinander stehen, wurden folgende Auswertungen miteinander verglichen.

Die zahlreich durchgeführten Versuchsserien ergeben ein ganz spezifisches Verteilungsmuster der einzelnen Inositolphosphatisomere in der Kontrolle und in der mit Gossypol behandelten Zellserie. Wie in Diagramm 17 (Ergebnissteil) dargestellt kommt es in der Kontrolle im Allgemeinen zu einer Abnahme der einzelnen InsP beim Zellwachstum. Ins(1,3,4)P<sub>3</sub> nimmt gegenüber des 0 h Wertes der Anwachskontrolle nach 24 h um 50% in seiner Konzentration ab und um weitere 17% nach 48 h. Ebenso nimmt Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> nach 48 h um insgesamt 97% und Ins(1,5,6)P<sub>3</sub> um 50% ab, ebenfalls ausgehend vom 0 h Wert der Kontrolle. Alle Angaben über die Konzentrationsveränderungen nach 24 und nach 48 h beziehen sich auf die 0 h Werte der Kontrolle. Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub> nimmt nach 48 h um 38% in seiner Konzentration ab. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> nimmt nach 24 h stark um 56% und nach 48 h um 53% in seiner Konzentration ab. Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub> ist das einzige InsP<sub>4</sub>, dass an Konzentration zunimmt und zwar innerhalb von 48 h um 36%. Erklärt werden kann dies nach den Daten von Shears über eine Desinhibition der Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>-1-Kinase durch die Abnahme des potenten Inhibitors Ins(1,3,4)P<sub>3</sub>. Ins(1,2,3,4,6)P<sub>5</sub> nimmt nach 24 h um 14% ab und nach 48 h um 64%, Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> nimmt insgesamt um 60% ab, ebenso Ins(1,2,4,5,6)P<sub>5</sub>, das um 44% in 48 h abnimmt. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ist das einzige InsP<sub>5</sub>, dass leicht mit der Konzentration ansteigt und zwar nach 48 h um 16%. InsP<sub>6</sub> nimmt erst um 18% und nach 48 h um weitere 32% ab. 5PP-IP5 nimmt um insgesamt 53% an Konzentration ab. Dieses spezifische InsP-Massenspektrum ist für normales Wachstum der CHO-Zellen charakteristisch und unterscheidet sich vollständig von dem Verteilungsspektrum der Inositolphosphate in den gehemmten Zellreihen.

Die leichten Schwankungen der einzelnen InsP-Konzentrationen, vom 24 h- bis zum 48 h-Wert, könnten auf biphasische Veränderung von Inositolphosphat metabolisierenden Enzymen, oder Phosphatasen zurückgeführt werden, auf transiente Aktivierungen oder Hemmungen von InsP-Kinasen oder auf Veränderungen von Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Zelldichte (Lindner K., 2000).

Geringfügige Konzentrationsänderungen nach 24 h, die nach 48 h dann eindeutige Tendenzen zur Zu- oder Abnahme zeigen (z.B.  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  und  $\text{InsP}_6$ ) könnten sich darüber erklären, dass der Stoffwechsel der Zellen nach dem wieder adhären werden Zeit benötigt, damit die für das Zellwachstum wichtigen Funktionen (z.B. Synthese und Abbau von Enzymen und Inositolphosphaten) wieder aufgenommen werden können. Diese Verteilung und Veränderung der InsP-Isomere bei wachsenden CHO-Zellen weist zahlreiche Unterschiede zu Jurkat-T-Zellen auf (K. Hillemeier, Dissertation 2001). Bei den Jurkat-T-Zellen verhält sich (bei ungehemmten Wachstum) das  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  völlig entgegengesetzt. In dieser Zellreihe nimmt es nach 24 h erst zu und nach 48 h wieder ab. Genauso verhält sich  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , das erst stark ansteigt und dann nach 48 h minimal absinkt. Das  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  verhält sich bei den Jurkat-T-Zellen ähnlich wie bei den CHO-Zellen, indem die Konzentration über die 48 h fast unverändert bleibt. Das  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  nimmt in Jurkat-T-Zellen, im Gegensatz zu der CHO-Zelllinie kontinuierlich ab. In Bezug auf das  $\text{InsP}_6$  unterscheiden sich die beiden unterschiedlichen Zelllinien in den Kontrollreihen nicht. Dieses unterschiedliche Verteilungsmuster der einzelnen Inositolphosphatisomere in zwei verschiedenen Zelllinien, die jede für sich betrachtet normales Wachstum verzeichnen, lassen sich vielleicht durch Ihre unterschiedliche biologische Funktion erklären. Die Jurkat-T-Zellen sind in Suspension wachsende, humane Leukämiezellen, die der T-Lymphozytenreihe entspringen und ursprünglich für eine Immunantwort und Infektabwehr im Organismus verantwortlich sind. Die CHO-Zellen sind neoplastisch entartete, epitheliale Zellen aus den Eierstöcken eines chinesischen Hamsters und mitverantwortlich für Sicherstellung von Fortpflanzung und Replikation eines Individuums.

Das folgende Diagramm veranschaulicht die Verteilung der einzelnen Inositolphosphat-Isomere bei ungehemmten Wachstum in der Kontrollreihe.

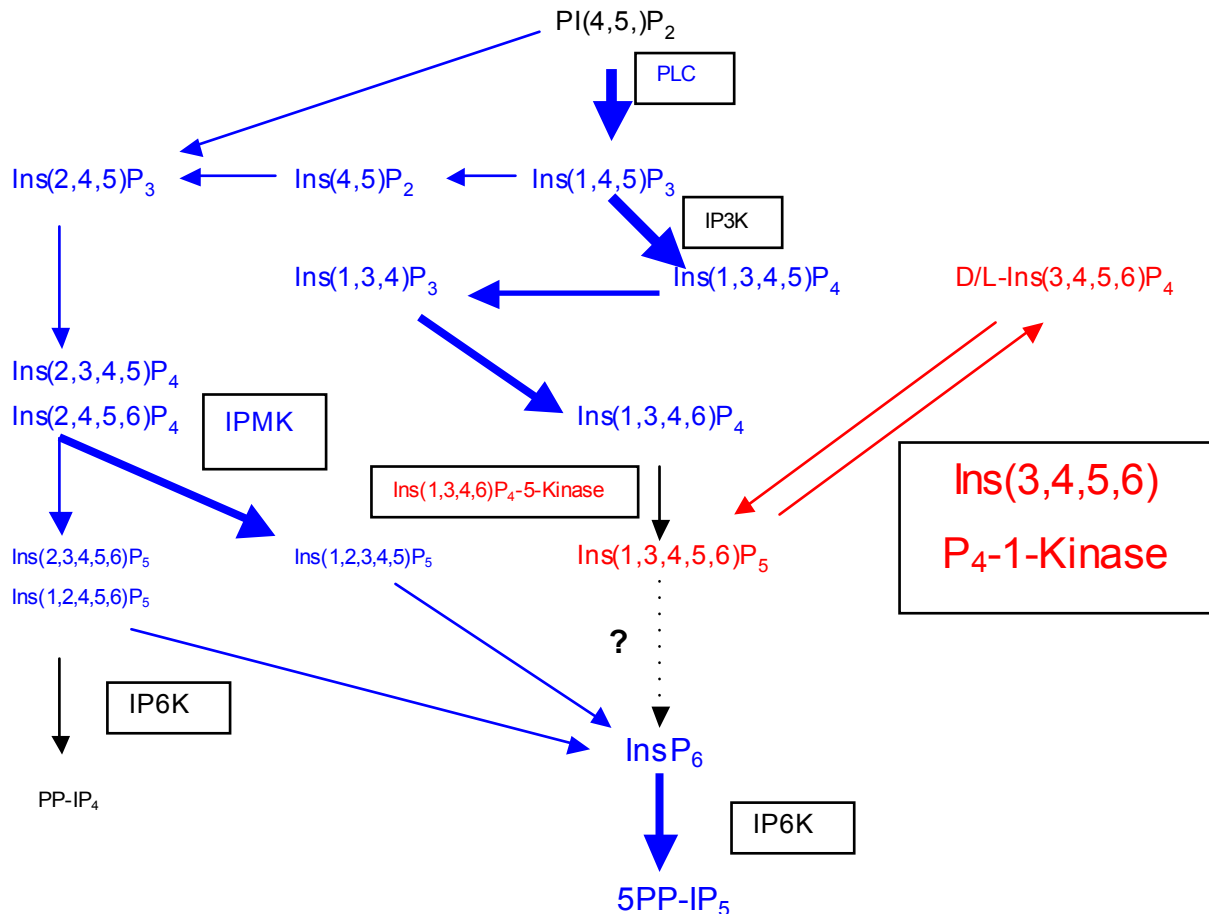


Diagramm 22: **Inositolphosphat-Stoffwechselkaskade der Kontrolle in CHO-Zellen**  
 Dieses Diagramm stellt die Inositolphosphat-Stoffwechselwege der Kontrollreihe dar. Die Dicke der Pfeile steht für die Menge an abgebauten InsP, gestrichelter Pfeil steht für noch nicht bewiesenen Stoffwechselweg. Die rot dargestellten InsP werden in den 48 h des Versuches verstärkt synthetisiert, die blau dargestellten verringert. In den Kästchen stehen die Enzyme, wobei PLC für Phospholipase-C steht und IPMK für Inositolphosphat-Multikinase.

### 4.3. Das InsP-Massenspektrum in CHO-Zellen unter dem Einfluss von 2 $\mu$ M Gossypol

Während die Kontrollwachstumsreihe ein lineares Wachstum innerhalb der untersuchten 48 h aufweist, wachsen die mit Gossypol behandelten Zellen insgesamt um ca. 50% weniger als die Kontrollserie. Wenn man parallel dazu die Verteilung der Inositolphosphatkonzentrationen der einzelnen Isomere betrachtet und dabei feststellt, dass sich diese stark von der Verteilung der Kontrolle unterscheidet, kommt

man zu der Schlussfolgerung, dass Gossypol in bisher noch unbekannter Weise, in den InsP-Metabolismus eingreift und dadurch zu einem reduzierten Zellwachstum bei CHO-Zellen führen könnte.

Unter dem Einfluss von 2  $\mu\text{M}$  Gossypol kommt es zu den folgend beschriebenen Veränderungen im Spektrum der Inositolphosphatmassen.  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  nimmt im Gegensatz zur Kontrolle, nach 24 h um 25% in seiner Konzentration zu, die Konzentration bleibt nach 48 h unverändert zum 24 h Wert mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypol. In den Kontrollwachstumsversuchen hatte es insgesamt um über 60% abgenommen.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  verändert sich kaum in seiner Konzentration gegenüber dem 0 h Wert der Kontrolle, in den Kontrollwachstumsversuchen hatte es hochsignifikant um 97% abgenommen. Gegenüber den Kontrollzellen muss also eine starke PLC-Stimulation nach 24 und 48 h postuliert werden.  $\text{Ins}(1,5,6)\text{P}_3$  nimmt minimal um 10% nach 48 h ab. Die  $\text{InsP}_4$  verhalten sich im Vergleich zur Kontrolle konträr. Die Isomere, die in der Kontrolle einen Konzentrationsverlust verzeichneten steigen in den mit Gossypol behandelten Zellen an und umgekehrt. Alle hier aufgeführten Konzentrationsveränderungen beziehen sich jeweils auf den 0 h Ausgangswert der Anwachskontrolle.  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  nimmt nach 24 h um 57% und nach 48 h um 105% in seiner Konzentration zu.  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  nimmt insgesamt um 109% zu, während  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  nach 24 h um 43% und nach 48 h um 36% abnimmt. Letztere Abnahme kann über den starken Anstieg von  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ , einem potenten Inhibitor der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-kinase (Shears) erklärt werden, wodurch die Konversion von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  zu  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  gehemmt wird.

In den Jurkat-T-Zellen wird das  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  unter Gossypoleinwirkung vermindert gebildet, was wahrscheinlich auf eine IP3K-Hemmung zurückzuführen ist (Hillemeier K., 2001).

$\text{Ins}(1,2,3,4,6)\text{P}_5$  ist eines der beiden  $\text{InsP}_5$ -Isomere bei dem es wie im Kontrollwachstumsexperiment zu einer Konzentrationsabnahme, ausgehend vom 0 h Wert der Kontrolle kommt und zwar nach 24 h um 43% und nach 48 h um 21%.

$\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  nimmt im Gegensatz zum Kontrollwachstumsexperiment erst um 26% und nach 48 h um 83% zu,  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  nimmt erst minimal um 4% ab, um dann nach 48 h um 120% an Konzentration zuzunehmen. Auch diese Zunahme steht im krassen Gegensatz zur Abnahme in der Kontrollreihe.  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ , welches beim Kontrollwachstum leicht zugenommen hat, nimmt signifikant um insgesamt 78%

nach 48 h in seiner Konzentration ab. Erklärt werden kann dies über die Hemmung der  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ -1-kinase durch hohe Konzentrationen an  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  (Shears).  $\text{InsP}_6$  nimmt insgesamt um 59% zu, während es beim Kontrollwachstum um ca. 50% abgenommen hat.  $5\text{PP-IP}_5$  verzeichnet den stärksten Konzentrationsanstieg aller Inositolphosphate von erst 67% und nach 48 h um 167%, ausgehend vom 0 h Wert der Kontrolle, während es bei Kontrollwachstum um insgesamt 53% abgenommen hat.

Da es unter dem Gossypoleinfluss zu einer verstärkten Synthese von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  kommt, ist eine gravierende IP3K-Hemmung auszuschließen. Man kann sogar eher vom Gegenteil ausgehen und vermuten, dass IP3K durch Gossypoleinwirkung aktiviert wird, ganz so, wie Lindner es kürzlich für die  $\text{InsP}_6$ -Kinase zeigen konnte. Herr Lindner zeigte, dass die  $\text{InsP}_6$ -Kinase durch niedrige Konzentrationen an Gossypol aktiviert und durch höhere gehemmt wird (Lindner K., 2000). Da auch die Folgeprodukte aus  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  gegenüber den Kontrollwachstumswerten erhöht sind, ist daher eine signifikante PLC-Stimulierung unter der Gossypoleinwirkung zu postulieren, welche den massiv erhöhten Flux zu  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  erklärt.

Im weiteren Verlauf zeigt sich im bisher postulierten klassischen  $\text{InsP}_6$ -Biosyntheseweg (siehe Diagramm 22, rechter Weg über  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  zu  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  dann über  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ ) zu  $\text{InsP}_6$ , eine erwartete, gesteigerte Produktion der  $\text{InsP}$ -Intermediate  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ . Da das  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  aber nicht vermehrt gebildet wird, sondern in seiner Konzentration abnimmt, könnte ein anderer  $\text{InsP}_6$ -Syntheseweg für den Anstieg von die  $\text{InsP}_6$  sowie  $5\text{PP-IP}_5$  verantwortlich sein. Hier kann man vermuten, dass die  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ -5-Kinase in CHO-Zellen in nur geringer Aktivität vorhanden ist oder fehlt, oder durch Gossypol im Gegensatz zur IP3K stark gehemmt wird. Eine alternative Erklärung wäre auch die unter Gossypol erfolgende kinetische Aktivierung einer bis dahin inaktiven  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -2-Kinase, welche somit zum starken Verbrauch bzw. zur starken Abnahme von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  führt. Für ein solches Enzym bei Tieren gibtes in der Literatur bisher jedoch keine sicheren Belege. Folgendes Diagramm veranschaulicht die Inositolphosphat-Stoffwechsellkaskade in CHO-Zellen unter  $2\ \mu\text{M}$  Gossypolwirkung.

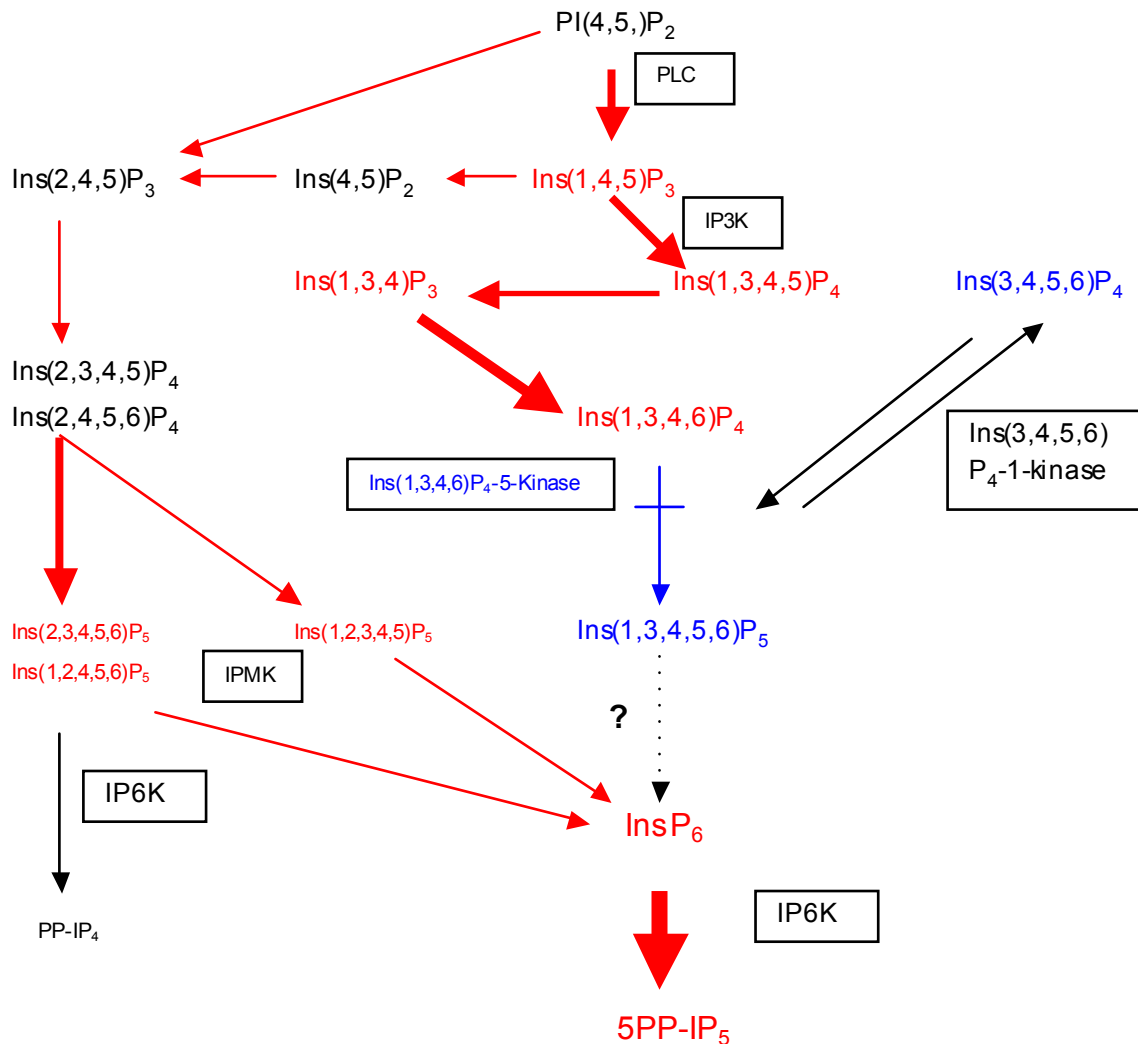


Diagramm 23: **Inositolphosphat-Stoffwechselkaskade in CHO-Zellen unter 2 µM**

#### **Gossypoleinwirkung**

Dieses Diagramm stellt die Inositolphosphat-Stoffwechselwege unter 2 µM Gossypolbehandlung dar. Die Dicke der Pfeile steht für die Menge an gebildeten InsP, gestrichelter Pfeil steht für noch nicht bewiesenen Stoffwechselweg, blau durchgestrichener Pfeil markiert eine unter Gossypol nicht stattfindende Metabolisierung. Die rot dargestellten InsP werden gegenüber dem Kontrollwachstum verstärkt synthetisiert, die blau dargestellten verringert. In den Kästchen stehen die Enzyme, wobei PLC für Phospholipase-C steht und IPMK für Inositolphosphat-Multikinase.



#### **4.4. Gesteigerte Synthese von $\text{InsP}_6$ und $5\text{PP-IP}_5$ unter Gossypolwirkung**

Die verstärkte Synthese von  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  spricht dafür, dass über diesen Weg, der kürzlich von S.Haverland entdeckt und belegt wurde, die CHO-Zellen nach Gossypolbehandlung eine erhöhte  $\text{InsP}_6$  und  $5\text{PP-IP}_5$  Synthese in Tierzellen veranlassen und nicht wie bisher vermutet über die Synthese und bisher nicht sicher belegte 2-Phosphorylierung von  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ . Dabei kommt es durch Gossypol wahrscheinlich zu keiner Hemmung der IPMK, welche vermutlich für einige Schritte dieses neuen Biosyntheseweges zum  $\text{InsP}_6$  verantwortlich ist, denn sonst würde es nicht zu diesem enormen Anstieg an  $\text{InsP}_6$  kommen. Da die Konzentration von  $5\text{PP-InsP}_5$  noch stärker als die des  $\text{InsP}_6$  ansteigt, ist eine signifikante Hemmung der  $\text{InsP}_6$ -Kinase durch Gossypol ebenfalls auszuschließen. Voraussetzung für die Aktivierung dieses mit den Substraten  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  bzw.  $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$  startenden Weges ist die signifikante Aktivierung von PLC, welche über die starken Anstiege der IP3K Produkte  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ,  $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$  und  $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$  belegt ist (siehe Diagramm 17 und 21).

Saiardi und seine Mitarbeiter entdeckten eine Inositolphosphat-Multikinase in *Saccharomyces cerevisiae*, die in der Lage ist unterschiedliche  $\text{InsP}$ -Intermediate an verschiedenen Positionen zu phosphorylieren (Saiardi A. et al., 2000). Dieses Enzym könnte für zahlreiche, der von Haverland entdeckten neuen Schritte der Biosynthese von  $\text{InsP}_6$  verantwortlich sein.

#### **4.5. Gossypol und seine Wirkungsweise auf die Zellreplikation**

Gossypol führt bei HeLa- und CHO-Zellen zu einer spezifischen Hemmung der DNA-Synthese. In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Gossypol erreichen die Zellen noch die S-Phase, sind aber nicht mehr in der Lage die komplette Zellreplikation abzuschließen (Wang Y. & Rao P.N., 1984). In den hier durchgeführten Versuchen mit 2  $\mu\text{M}$  Gossypol sind die Zellen durchaus noch in der Lage sich zu teilen, was gegen eine DNA-Synthesehemmung spricht. Andere Studien ergaben, dass Gossypol (10  $\mu\text{M}$ ) bei HeLa-Zellen nicht direkt mit der DNA interagiert, sondern die DNA-Polymerase- $\alpha$  hemmt (in vitro und vivo) und dadurch eine Blockade des

Wachstums in der S-Phase bewirkt (Rosenberg et al., 1985). Studien mit Rattenleberzelllinien (Clone 9) ergaben eine enge Spannbreite zwischen subtoxischer und akut toxischer Konzentration im niedrigen mikromolekularen Bereich ( $IC_{50}$ -Wert 2,5-3,3  $\mu\text{M}$ ). Die Versuche ergaben bei 1  $\mu\text{M}$  Gossypol eine 18%ige Unterbindung der über gap junctions erfolgten interzelluläre Kommunikation von Zellen, bei 3  $\mu\text{M}$  eine 30%ige Unterbindung und bei 10  $\mu\text{M}$  eine irreversible Zellschädigung (Hutchinson et al., 1995).

Die in dieser Studie durchgeführten Versuche konnten die enge therapeutische Breite von Gossypol aufzeigen. In den hier durchgeführten Arbeiten zeigte sich, dass die Vitalität der CHO-Zellen bei 2  $\mu\text{M}$  Gossypol 98% und bei 3  $\mu\text{M}$  nur noch 64% beträgt (jeweils nach 48 h Einwirkungszeit), bestätigen also diese Befunde.

#### **4.6. Allgemeines zum Wirkstoff Gossypol**

Gossypol ist eine polyphenolische, binaphtalene Verbindung, die aus den Pigmentdrüsen der Baumwollpflanzenwurzel extrahiert wird. Ursprünglich wurde Gossypol in Versuchsreihen aus den 80er Jahren in China als männliches Kontrazeptivum entdeckt. Dabei führt Gossypol zu einer reversiblen Inhibition der Ausreifung von Spermien und zu einer reduzierten Motilität (Ranga A. et al., 1990; Oligiati K.L. et al., 1983, Gottlieb C., 1999). Gossypol ist eine Substanz, die als genereller Enzymhemmer bekannt ist. Es hemmt die Laktatdehydrogenase-X in Rinderhoden mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 200  $\mu\text{M}$  (Oligiati K.L., 1983), die DNA-Polymerase  $\alpha$  (8  $\mu\text{M}$  Gossypol hemmen die Polymerase- $\alpha$  zu 50 %) in HeLa-Zellen (Rosenberg et al., 1986), die Ribonukleotidreduktase mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 10  $\mu\text{M}$  (McClarty et al., 1985), die Topoisomerase-II in HeLa-Zellen in Konzentrationen von 3,4 – 17,5  $\mu\text{M}$  führten zu einer Abnahme an DNA-Synthese bis zu 50-75% (Adlakha et al., 1989) und in Jurkat-T-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert für die Topoisomerase-II von 4  $\mu\text{M}$  (Hillemeier K., 2001). Gossypol hemmt zusätzlich die Aldose-Reduktase in humaner Plazenta ( $K_i$ : 0,5  $\mu\text{M}$ ) (Deck et al., 1991). Gossypol hemmt bevorzugt eine Reihe von Enzymen die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind und wirkt dadurch gerade auf schnell wachsende Zellen, da diese besonders abhängig sind, von einer optimalen Energiebereitstellung an den Organismus. Zellversuche zeigten, dass Gossypol in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (24 h Einwirkungszeit) auf

Melanom- und Kolon-Karzinomzellen, zum Zelltod in 90% der Fälle führt. Bei langsamer wachsenden Tumorzellen, wie embryonale Lungenfibroblasten und Adenokarzinomzellen der Mamma, führten erst höher verwendete Konzentrationen, wie 30  $\mu\text{M}$  Gossypol zu dem gleichen Effekt (90% Zelltod). Gossypol hat verschiedene zytotoxische Effekte auf unterschiedliche Zelllinien, auf schnell wachsende Zellen in Konzentrationen kleiner 5  $\mu\text{M}$ . Bei normalen Zellen werden Konzentrationen von über 20  $\mu\text{M}$  benötigt um einen toxischen Effekt zu erzielen (Tuszynski G.P. et Cossu G., 1984). Durch Versuche an schnellwachsenden Tumorzelllinien wie denen aus Ovarien, Gastrointestinaltrakt und Hoden zeigte sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert (Zelltod) von 0,86-1,98  $\mu\text{M}$ , während der ermittelt  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei langsam wachsenden Zellen 0,87-2,51  $\mu\text{M}$  betrug. Der antiproliferative Effekt des Gossypols ist abhängig von seinen optischen Isomeren. Die (-)-Isoform ist 3,6 – 12,4fach potenter als die (+)-Isoform und 1,48 – 2,65fach potenter, als das (+/-)-Racemat (Band V. et al., 1989, Guan M.Z., 1996). Ähnliche Ergebnisse erzielte ein weitere Versuchsreihe mit Leukämiezellen, hier zeigte sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert in Bezug auf den Zelltod von 20  $\mu\text{M}$  Gossypol (L-Enantiomer) und war damit signifikant potenter als das Racemat Gossypol, D-Enantiomer und Gossypolon (das oxidierte Gossypol-Enantiomer). Eine Exposition von 0,5-10  $\mu\text{M}$  L-Gossypol zeigten über vier Tage eine zeitabhängige Abnahme der Zellvitalität (Shelley M.D. et al, 1999, Blackstaffe L. et al 1997:  $\text{IC}_{50}$ -Wert für Gossypol 22  $\mu\text{M}$  und die (-)-Isoform von 4  $\mu\text{M}$ ). Zusätzlich zu der antitumorösen Wirkung des Gossypols, besitzt diese Substanz auch antiinflammatorische Eigenschaften. Gossypol führt in einer Konzentration von 3 - 5  $\mu\text{M}$  bei humanen Neutrophilen zu einer erhöhten Oberflächenexpression des Mac-1-Gens (kodiert für CD11b und CD18, Oberflächenantigene von neutrophilen Leukozyten) und in Konzentrationen von 3 – 20  $\mu\text{M}$  Gossypol zu einer erhöhten Superoxid-Synthese der Zellen. Gossypol bewirkt anscheinend zwei Protein-Kinase-C unabhängigen Stoffwechselwege, die zur Aktivierung von neutrophilen Leukozyten führen. Es wird vermutet, dass die Erschöpfung der Neutrophilen für den antiinflammatorischen Effekt von Gossypol verantwortlich ist (Benhaim P. et al., 1994). Eine weitere Versuchsreihe zeigte, dass Gossypol bei kontinuierlicher Zufuhr (10 mg pro kg Körpergewicht bei Albinoratten über 15 Tage) über eine Hemmung der Laktase, Maltase und alkalischen Phosphatase zu einem Gewichtsverlust von 27-50% und zu einer verminderten

Aufnahme von Glucose, Alanin, Leucin und Kalzium führt. Nach einem Zeitraum von 15 Tagen ohne Gossypolzufuhr, waren alle diese Parameter vollständig reversibel (Chada S. et al, 1989). Weiterhin führt Gossypol zu einem dosisabhängigen Absinken der Serumkonzentrationen von Schilddrüsen-Hormonen. Eine Dosis von 1 mg Gossypol pro kg Körpergewicht (KG) führt zu einer fokalen Degeneration von Schilddrüsenfollikeln, Dosen von 5 -10 mg pro kg KG bewirken bereits eine Atrophie der Schilddrüse (Rikihisa et al., 1989).

#### **4.7. Vergleich zwischen normalen und gehemmten Wachstum der CHO-Zellen**

Die Kontrollreihe ist über 48 h permanent gewachsen und zeigte eine Zellvitalität von 98%, so dass man annehmen kann, dass die spezifische Verteilung der InsP-Isomere typisch ist, für normales Zellwachstum bei zuvor tryptisch behandelten CHO-Zellen. Die mit 2  $\mu$ M Gossypol behandelten Zellen zeigen ein der Kontrollreihe entgegengesetztes Verteilungsmuster des Inositolphosphatmassenspektrums.

#### **4.8. Die Wirkung von Gossypol auf die IP3K bei CHO-Zellen**

Die Vermutung, dass Gossypol primär über eine IP3K-Inhibition das Wachstum der CHO-Zellen hemmt, konnte nicht bestätigt werden, da das Produkt, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> weiterhin gebildet wird. Es kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine leichte IP3K-Hemmung stattfindet, die möglicherweise auf Grund einer massiven PLC-Aktivierung der Zellen kaschiert wird, das könnte den erhöhten Anstieg der InsP<sub>3</sub> und InsP<sub>4</sub> erklären.

Eine andere Erklärung wäre das Vorhandensein der schlecht durch Gossypol und andere Hemmstoffe hemmbaren IP3K-Isoform-C in den CHO-Zellen (noch unveröffentlichte Daten von Deschermeier). Versuche von K. Hillemeier zeigten eine deutliche IP3K-Hemmung durch 2  $\mu$ M Gossypol mit resultierender Abnahme des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bei Jurkat-T-Zellen, die über die IP3K-Isoformen A und B verfügen (PCR und Northern-Experimente der AG Malaskowski, Deschermeier, Bertsch und Mayr).

Ebenfalls nicht auszuschließen ist eine Überlagerung der korrekten Konzentrationen von  $\text{InsP}_3$  und  $\text{InsP}_4$  durch andere Inositolphosphatisomere, die nicht durch die HPLC Methode von den „normalen“ Isomeren diskriminiert werden konnten.

Vielleicht verfügen CHO-Zellen durch ihre wichtige Funktion im Organismus (Wachstum und Fortpflanzung), im Gegensatz zu anderen Zellen, über besonders gute Schutzvorkehrungen gegen schädliche Wirkstoffe, wie z.B. eine hohe Konzentration von Multi-drug-resistance-Pumpen (MDR). Mit Hilfe von MDR's sind Zellen in der Lage pharmakologische Substanzen schnellstmöglich unter ATP-Hydrolysen aus der Zelle hinaus zu befördern, so dass diese keine oder eine geringere Wirkung zeigen. Mit Hilfe des MDR-Mechanismus wird die Resistenzentstehung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika erklärt. Abgesehen von  $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$  und  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ , die in Gossypol behandelten Zellen in deutlich niedrigeren Konzentrationen als in der Kontrolle vorkommen, befinden sich alle weiteren  $\text{InsP}$ -Isomere in höheren Konzentrationen in der Zelle, als bei ungehemmten Wachstum. Die Höhe der  $\text{InsP}_6$ -Konzentration scheint abhängig zu sein von der Wachstumsdynamik der Zelle. Bei den gehemmten Zellen steigt das  $\text{InsP}_6$  stark an, während es in der Kontrolle linear abfällt.

#### **4.9. Andere Substanzen die zu einer Steigerung des Inositolphosphathaushaltes in Zellen führen**

Onfelt und Mitarbeiter führten Zellversuche mit V79 (chinesischen Hamsterzellen) durch. Die Zellen wurden mit Bombesin behandelt (lokales Peptidhormon, zuständig für Wachstumsregulation, neuronale Funktion und Sekretion), wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Spindelfunktion der V79-Zellen kommt. Durch eine Rezeptor vermittelte Reaktion führt Bombesin zu einer Erhöhung der Konzentration von Inositolphosphaten und Diacylglycerol. Im Zusammenhang mit dem Inositolphosphatanstieg trat eine Häufung von mitotischen Zellen auf, die ein abnormes chromosomales Arrangement (c-Mitose) aufzeigten. (Onfelt A., 1992). Interessant hierbei ist der Anstieg der  $\text{InsP}$  verbunden mit abnormer Zellteilung. Die Verteilung des Inositolphosphatmassenspektrums lässt vermuten, dass es noch zusätzliche, bisher unbekannte Metabolismuswege im  $\text{InsP}$ -Stoffwechsel geben muss.

Ratovondrahona D. und seine Mitarbeiter, die in Versuchen mit CHO-E32-Zellen (CHO-Zellen die in der Lage sind einen Prolaktinoberflächenrezeptor zu exprimieren) die Auswirkungen auf den InsP-Haushalt unter Prolaktineinfluss beobachteten und die InsP-Isomere mit Hilfe der HPLC-Technik nach  $^3\text{[H]myo}$ -Inositolmarkierung isolierten (Ratovondrahona D. et al, 1998), entdeckten dabei eine durch Prolaktin vermittelte Synthesesteigerung von  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$  um 207 % nach 30 sec., ein Anstieg von  $\text{InsP}_5$  um 171 % und  $\text{InsP}_6$  um 241 % nach 30 sec.

#### **4.10. $\text{InsP}_6$ -Synthese**

Erst kürzlich entdeckte Sven Haverland einen bisher noch völlig unbekanntem Weg, um  $\text{InsP}_6$  zu synthetisieren, gleichzeitig widerlegte er einzelne Schritte in der Metabolisierung von  $\text{InsP}$ , die bisher fälschlicher Weise für richtig gehalten worden sind. Es wurden Homogenate aus Rattenleber, -hirn und -herzen gewonnen und mit einem neuen, aufwendigen Verfahren, sogenannte Hochsalz-Rohextrakte isoliert und gereinigt. Diese wurden dann mit Hilfe der MDD-HPLC-Technik einer Inositolphosphat-Isomerenspezifischen Substrat-Produkt-Zuordnung unterzogen. Dadurch konnten die einzelnen Phosphatasen und Kinasen die im  $\text{InsP}$ -Stoffwechsel beteiligt sind, sowie deren Substrate und Produkte, qualitativ und vor allem quantitativ erstmalig bestimmt werden. Entgegen den bisherigen publizierten Erkenntnissen, konnte kein anaboler Bezug zwischen  $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$  und dem  $\text{InsP}_6$  hergestellt werden, es gibt auch keine Hinweise für eine katabole Beziehung zwischen diesem  $\text{InsP}_5$  und dem  $\text{InsP}_6$ . Zusätzlich entdeckte S. Haverland, dass  $\text{InsP}_6$  von mehreren Phosphatasen (mindestens zwei) an der Position  $\text{C}_4$  und  $\text{C}_6$  zu anderen  $\text{InsP}_5$ -Isomeren dephosphoryliert wird. Außerdem wurde von ihm ein bis jetzt noch unbekannter, verzweigter, anaboler Biosyntheseweg entdeckt, der zur Synthese von  $\text{InsP}_6$  führt und zwar nicht über das durch die IP3K katalysierte  $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ , sondern vom  $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$  bzw.  $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$  ausgehend, über  $\text{Ins}(2,3,4,5)\text{P}_4$  und D/L- $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ , in geringem Maße über  $\text{Ins}(2,4,5,6)\text{P}_4$  und D/L- $(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  zum  $\text{InsP}_6$  (Haverland S., Dissertation 2001). Die von mir analysierten  $\text{InsP}$ -Isomere ( $\text{Ins}(1,2,4,5,6)\text{P}_5$  und  $\text{Ins}(1,2,3,4,5)\text{P}_5$ ), die zu einem Anstieg des  $\text{InsP}_6$  führten unterstützen den Weg, der von Herrn Haverland gefunden wurde.

#### **4.11. Wirkung von exogen zugeführten $\text{InsP}_6$ auf das Zellwachstum**

Der Anstieg des intrazellulären  $\text{InsP}_6$  verbunden mit einem reduzierten Zellwachstum stimmt phänomenologisch mit den bisherigen Beobachtungen von Saied und Mitarbeitern überein, dass extrazelluläres  $\text{InsP}_6$  ein sehr potenter, antitumoröser Wirkstoff (in vitro und in vivo) ist, der das Zellwachstum hemmt, einen Rückgang der Proliferation bewirkt und Zelldifferenzierung auslöst. Versuche an HT-29 Zellen (humane Kolon-Karzinomzellen) demonstrierten, dass exogenes  $\text{InsP}_6$  zu einer erhöhten Expression von Tumorsuppressorgenen (p53 und WAF1) führt und dadurch in Zukunft vielleicht, als ein Chemotherapeutika bei Neoplasien im Gastrointestinaltrakt eingesetzt werden kann (Saied I.T. et al., 1998). Weiterhin zeigt sich, dass exogenes  $\text{InsP}_6$  zu einem Rückgang der DNA-Synthese und des Zellwachstums in humanen Brustkrebs-Zelllinien (in vitro) führt und zwar unabhängig von dem Östrogenrezeptorstatus der Zellen (Shamsuddin A.M. et al., 1996). Eine andere Vermutung besteht darin, dass exogenes  $\text{InsP}_6$  das Zellwachstum reduziert, indem es die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3 K) hemmt, wie es Versuche mit der JB6-Zelllinie zeigten (Dong Z. et al., 1999).

In den von mir durchgeführten Versuchen handelt es sich allerdings ausschließlich um intrazelluläre Inositolphosphate und es besteht bis jetzt kein Anhalt dafür, dass diese  $\text{InsP}$  aus der Zelle in den Extrazellularraum gelangen.

#### **4.12. Wirkungsweise von Gossypol auf CHO-Zellen**

Die Versuchsserie zeigte, dass Gossypol das Wachstum von CHO-Zellen reduziert und es dabei zu einer für diese Zelllinie typischen Verteilung der  $\text{InsP}$ -Isomere kommt, wie z.B. dem Anstieg von intrazellulärem  $\text{InsP}_6$ . Die Studie konnte leider nicht zeigen über welchen molekularen Mechanismus Gossypol auf CHO-Zellen einwirkt.

Bei den Versuchen mit Jurkat-T-Zellen entstand durch Gossypoleinwirkung ein anderes  $\text{InsP}$ -Massenspektrum, das aber auch zu einer Proliferationshemmung der Zellen führte (Hillemeier K., 2001). Somit scheint jede Zelle, abhängig von ihrer Herkunft und Funktion eine bestimmte Konstellation an intrazellulären Inositolphosphaten zu benötigen, die ihr ein Wachstum ermöglicht.

In Gossypol steckt eine potente Substanz die für viele unterschiedliche Neoplasien als gezieltes Therapeutikum eingesetzt werden könnte. Versuche mit einer Langzeit-Applikation von Gossypol über 10 Monate, an männlichen Kälbern getestet, ergaben eine Abnahme des Hämoglobingehaltes und des Hämatokrits, sowie Leberschäden. Dabei stellte man fest, dass Vitamin-E ein potenter Antagonist des Gossypols in Bezug auf seine vermutlich oxidativen Zelltoxizität ist (Velasquez-Pereira J. et al., 1999). Gravierende Leberschäden entdeckte auch Deoras D.P. und sein Team an Hand von Versuchen mit Ratten (Deoras D.P. et al., 1997). Die höchsten Gossypolkonzentrationen wurden in Leber, Herz und Hoden gefunden. Die von Blackstaffe L. durchgeführten Versuche mit Melanom-Zelllinien, zeigten sogar eine bessere Wirksamkeit des (-)-Gossypols auf das Zellwachstum, als Cisplatin, Decarbazin und Melphalan (gängige Chemotherapeutika die bereits in der Klinik eingesetzt werden) (Blackstaffe L. et al., 1997).

Für die Zukunft wäre es wichtig zu erforschen, über welchen molekularen Mechanismus Gossypol auf CHO-Zellen antiproliferativ wirkt. In dem von mir erhobenen Datensatz erkennt man einen deutlich antiproliferativen Effekt von 2  $\mu\text{M}$  Gossypol auf das Wachstum von CHO-Zellen. Die Auswertung des Inositolphosphatmassenspektrums konnte die Vermutung einer IP3K-Hemmung nicht bestätigen und gibt Anlass für die Annahme multipler anderer Wirkmechanismen von Gossypol, welche Interaktionen der Inositolphosphat-metabolisierenden Enzyme einschließt. Diese Wirkmechanismen scheinen in CHO-Zellen deutlich unterschiedlich zu Jurkat-T-Zellen zu sein.



## 5. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit Veränderungen von zellulären Inositolphosphaten beim Wachstum von CHO-Zellen, unter dem Einfluss der proliferationshemmenden Substanz Gossypol. Mit Hilfe der MDD-HPLC-Technik konnten in entsprechend wachstumsgehemmten CHO-Zellen einzelne Inositolphosphatisomere isoliert werden. Es zeigte sich, dass Gossypol gravierend in den InsP-Metabolismus der Zellen eingreift, während es das Wachstum reduziert. Der genaue molekulare Mechanismus konnte nicht aufgeklärt werden, aber es zeigte sich, dass es in diesem Zelltyp einer bestimmten Konstellation der Konzentrationen von verschiedenen InsP-Isomeren bedarf, um einerseits Wachstum zu gewährleisten und andererseits bei Wachstumshemmung zu in anderen Zellen bisher nicht beobachteten, Anstiegen und Abfällen bestimmter InsP gegenüber den Kontrollen kommt.

Die vermutete IP3K-Hemmung durch Gossypol konnte zwar nicht bestätigt werden, aber es zeigte sich in CHO-Zellen, unter Gossypolwirkung ein aktivierender Metabolisierungsweg bis hin zum InsP<sub>6</sub> und 5PP-IP<sub>5</sub>. Diese Arbeit unterstützt den erst kürzlich von Herrn Sven Haverland entdeckten Stoffwechselweg, welcher von Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> ausgehend, über Ins(2,3,4,5)P<sub>4</sub> und Ins(1,2,3,4,5)P<sub>5</sub> bis zum InsP<sub>6</sub> führt. Herr Haverland entdeckte zusätzlich, dass der bisherig angenommene Syntheseweg von Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> bis zu InsP<sub>6</sub> auf falschen Vermutungen beruht und auch dieses konnte durch die hier durchgeführte Studie nur bestätigt werden. Gerade dieser hier aufgezeigte Biosyntheseweg zum InsP<sub>6</sub> scheint unter Gossypoleinwirkung stark stimuliert zu werden.

Interessanterweise ist die Wirkung von Gossypol auf das Inositolphosphat-Massenspektrum dabei abhängig vom Zelltyp. Die Versuche von K. Hillemeier mit lymphatischen Jurkatzellen zeigten eine IP3K-Hemmung durch Gossypol. Diese unterschiedliche Wirkungsweise von Gossypol auf epitheliale und lymphatische Tumorzellen liegt wahrscheinlich an deren unterschiedlichen biologischen Funktion und vermutlich am Vorkommen verschiedener Enzym-Isoformen für InsP-metabolisierender Enzyme in diesen Zelltypen. Für die Jurkatzellen wurden Isoform A und B der IP3K nachgewiesen. Bei den CHO-Zellen ist zu vermuten, dass es sich

hier um die Isoform C handelt, die nur leicht oder gar nicht durch Gossypol gehemmt wird (bisher noch unveröffentlichte Daten von Deschermeier). Eine Vermutung wäre auch, das Gossypol eine Wachstumshemmung in CHO-Zellen bewirkt, über die beobachtete signifikante, apparente Hemmung der Ins(1,3,4,6)P<sub>4</sub>-5-Kinase.

Diese Arbeit liefert wertvolle Daten und Hinweise für eine mögliche Tumorthherapie durch Gossypol. Für die Zukunft wäre es wünschenswert den Mechanismus, wie Gossypol in den InsP-Haushalt eingreift herauszufinden, um einen weiteren Baustein in der Aufklärung von inter- und intrazellulärer Kommunikation und Signaltransduktion zu liefern und um damit ein mögliches Therapeutikum in der Tumorthherapie besser in seiner Wirkung zu verstehen.

- Adams R., Geissman T.A., Edwards J.D. (1960) Gossypol, a pigment of cottonseed. *Chem. Rev.* 60, 555-574
- Adlakha R.C., Ashorn C.L., Chan D., Zwelling L.A. (1989) Modulation of 4'-(9-Acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide-induced, Topoisomerase II-mediated DNA Cleavage by Gossypol. *Cancer Research* 49, 2052-2058
- Albert C., Safrany S.T., Bembenek M.E., Reddy K.M., Reddy K.K., Falck J.R., Bröcker M., Shears S.B., Mayr G.W. (1997) Biological variability in the structures of diphosphoinositol polyphosphates in *Dictyostelium discoideum* and mammalian cells. *Biochem. J.* 327: 553-560
- Austin C.A., Patel S., Ono K., Nakane H., Fisher L.M. (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.* 282, 883-889
- Band V., Hoffer A.P., Band H., Reinehardt A.E., Knapp R.C., Matlin S.A., Anderson D.J. (1989) Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* 32: 273-277
- Barhoumi R., Burghardt R.C. (1995) Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity in vitro. *Fundamental and Applied Toxicology* 30, 290-297, Article No. 0067
- Barker C.J., Berggren P.O. (1999) Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer-Res.* 19 (5A): 3737-41
- Beck K.A., Keen J.H. (1991) Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J. Biol. Chem.* 266, pp 4442-4447
- Benhaim P., Mathes S.J., Hunt T.K., Scheuenstuhl H., Benz C.C. (1994) Induction of neutrophil Mac-1 integrin expression and superoxide production by the medicinal plant extract gossypol. *Inflammation*, 18 (5) 443-458
- Bertsch U., Haefs M., Möller M., Deschermeier C., Fanick W., Kitzrow A., Ozaki S., Meyer H.E., Mayr G.W. (1999) A novel A-isoform-like inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from chicken erythrocytes exhibits alternative splicing and conservation of intron positions between vertebrates and invertebrates. *Gene* 228: 61-71
- Biden T.J., Altin J.G., Karjalainen A., Bygrave F.L. (1988) Stimulation of hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate kinase activity by  $Ca^{2+}$ -dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.* 256: 697-701
- Blackstaffe L., Shelley M.D., Fish R.G. (1997) Cytotoxicity of gossypol enantiomers and its quinone metabolite gossypolone in melanoma cell lines. *Melanoma-Res.* 7 (5): 364-72
- Burgess G.M., Irvine R.F., Berridge M.J., McKinney J.S., Putney J.W.Jr. (1984) Actions of inositol phosphates on  $Ca^{2+}$  pools in guinea-pig hepatocytes. *Biochem. J.* 224: 741

Chada S., Sanyal S.N., Kanwar U. (1989) Reversibility of the effect of gossypol acetic acid an antispermatogenic / antifertility agent on the intestinal structure and functions on male albino rats. *Research in Experimental Medicin* 189 (3), 205-219

Chang S.M., Lei L.F., Tian L. (1992) Effect of gossypol on the proliferation of rat prostate cells studies in vivo and in vitro. *Shih Yen Sheng Wu Hsueh Pao (Acta Biologiae experimentalis sinica)* 25 (4) 317-327

Choi K.Y., Kim H.K., Lee S.Y., Moon K.H., Sim S.S., Kim J.W., Chung H.K., Rhee S.G. (1990) Molecular cloning and expression of a complementary DNA for inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Science* Vol. 248

Communi D., Vanweyenberg V., Erneux C. (1994) Purification and biochemical properties of a high-molecular-mass inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme in human platelets. *Biochem. J.* 298: 669-673

Communi D., Vanweyenberg V., Erneux C. (1997) D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A is activated by receptor activation through a calcium:calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation mechanism. *The EMBO J.* Vol. 16 No. 8, 1943-1952

Cullen P.J., Hsuan J.J., Truong O., Letcher A.J., Jackson T.R., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995) Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature*, 376, pp 527-530

Deoras D.P., Young-Curtis P., Dalvi R.R., Tippett F.E. (1997) Effect of gossypol on hepatic and serum gamma-glutamyltransferase activity in rats. *Vet.-Res.-Commun.* 21 (7) : 317-23

De Peyster A., Wang Yi Y. (1993) Genetic toxicity studies of gossypol. *Mutation Research*, 297: 293-312

Dewaste V., Pouillon V., Moreau C., Shears S., Takazawa K., Erneux C. (2000) Cloning and expression of an cDNA encoding human Inositol-1,4,5-triphosphate-3-kinase-C. *Biocheem. J.* 352: 343-351

Dong Z., Huang C., Ma W.Y. (1999) PI-3 Kinase in signal transduction, cell transformation, and as a target for chemoprevention of cancer. *Anticancer-Res.* 19(5A): 3743-7

Fiala E.S., Sodum R.S., Bhattacharya M., Li H. (1996) (-)-Epigallocatechingallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine. *Experientia* 52, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland

Fukami K., Matsuoka K., Nakanishi O., Yamakawa A., Kawai S., Takenawa T. (1988) Antibody to phosphatidylinositol-4,5-biphosphate inhibits oncogene-induced mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 85: 9057-9061

Fukuzono S., Takeshita T., Sakamoto T., Hisada A., Shimizu N., Mikoshiba K. (1998) Overproduction and immuno-affinity purification of myelin proteolipid protein (PLP), an inositol hexakisphosphate-binding protein, in a baculovirus expression system. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 249 (1): 66-72

Gottlieb C. et Aanesen A. (1999) A male contraceptive injection can be available within 5 years. *Lakartidningen* 96 (38): 4039-44

Guan M.Z., Wang N.G. (1996) Effect of (+), (-) and (+/-) gossypol on early pregnancy in rats. *Yao-Hsueh-Hsueh-Pao* 31 (1): 10-12

Guo J., Reidenberg M.M. (1998) Inhibition of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by bioflavonoids and their interaction with furosemide and gossypol.. *J. Lab. Clin. Med.* Volume 132, No. 1

Guse A.H., Goldwisch A., Weber K., Mayr G.W. (1995) Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J. of Chromatography B: Biomedical applications*, 672; 189-198

Hammonds-Odie L., Jackson T., Profit A., Blader I., Turck C., Prestwich G., Theibert A. (1996). Identification and cloning of centaurin- $\alpha$ . A novel phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein from rat brain. *J. of Biological Chemistry* 271 : 18859-18868

Hibasami H., Achiwa Y., Fujikawa T., Komiya T. (1996) Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Research* 16: 1943-1946

Huang C., Ma W.Y., Hecht S.S., Dong Z. (1997) Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer-Res.* 57 (14): 2873-8

Hutchinson R.W., Barhoumi R., Burghardt R.C. (1995) Laser cytometric analysis of gossypol-induced cytotoxicity. *Toxic Substance Mech.*, 14: 169-184

Inhorn R.C., Majerus P.W. (1987) Inositolpolyphosphate 1-phosphatase from calf brain. Purification and inhibition by  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* 262: 15946-15952

Irvine R.F., Letcher A.J., Heslop J.P., Berridge M.J. (1986) The inositol tris/tetrakisphosphate pathway – demonstration of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 320: 631-634

Irvine R.F., Letcher A.J., Lander D.J., Berridge M.J. (1986) Specificity of Inositolphosphate-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from swiss-mouse 3T3 cells. *Biochem. J.* 240: 301

Irvine R.F., Putney Jr. J.W. (1992) Advances in second messenger and phosphoprotein research. Raven Press, NY, pp 161-185

Isaaks R.E., Harkness D.R. (1980) Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function in birds, reptiles, and fishes. *Am. Zoologist* 20, pp 115-129

Jackson S.P., Schoenwaelder S.M., Matzaris M., Brown S., Mitchell C.A. (1995) Phosphoinositol 3,4,5-trisphosphate is a substrate for the 75 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase and a novel 5-phosphatase with forms a complex with the p85/p110 form of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 14: 4490-4500

Jefferson A.B., Auethavekiat V., Pot D.A., Williams L.T., Majerus P.W. (1997) Signaling inositol polyphosphate-5-phosphatase. Characterization of activity and effect of GRB2 association. *J. Biol. Chem.* 272: 5983-5988

Jefferson A.B., Majerus P.W. (1995) Properties of type II Inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 270: 9370-9377

Jun K.S., Choi G., Yang S.-G., Kim D., Kang N.-G., Choi K.Y., Kim H., Chan G.C.K., Storm D.R., Albert C., Mayr G.W., Lee C.-J., Shin H.-S. (1996) Dissociation of enhanced hippocampal CA1 LTP and spatial learning in inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase (A) deficient mice.

King W.G., Rittenhouse S.E. (1989) Inhibition of protein kinase C by staurosporine promotes elevated accumulations of inositol triphosphates and tetrakisphosphates in human platelets exposed to thrombin. *J. Biol. Chem.* 264: 6070-6074

Landes G.M., Villeponteau B., Pribyl T., Martinson H.G. (1982) Hemoglobin switching in chickens. Is the switch initiated post-transcriptionally? *J. Biol. Chem.* 257: 11008

Larsson O., Barker C.J., Sjöholm A., Carlqvist H., Michell R.H., Bertorello A., Nilsson T., Honkanen R.E., Mayr G.W., Zwiller J., Berggren P.-O. (1997) Inhibition of phosphatases and increased Ca<sup>++</sup> channel activity by inositol hexakisphosphate. *SCIENCE*, Vol. 278

Laxminarayan K., Chan B.K., Tetaz T., Bird P.I., Mitchell C.A. (1994) Characterization of a cDNA encoding the 43 kDa membrane-associated inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 269: 17305-17310

Li G., Pralong W.-F., Pittet D., Mayr G.W., Schlegel W., Wollheim C.B. (1992) Inositol tetrakisphosphate isomers and elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in vasopressin-stimulated insulin-secreting RINm5F cells. *The J. of Biological Chemistry* Vol. 267, No.7, pp 4349-4356

Lin A.N., Wallace R.W. (1990) Phosphorylation by protein kinase C inactivates an Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase purified from human platelets. *Biochem.-Biophys.-Res.-Commun.* Aug 16 ; 170(3) : 1371-6

Lin A., Wallace R. W., Barnes S. (1993) Purification and properties of a human platelet inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 303, No. 2: 412-420

Lindner K. (2000) Diphosphoinositolphosphate: Charakterisierung der Biosyntheseenzyme und ihrer Rolle in vivo. Diplomarbeit, Inst. Für medizinische Biochemie und Molekularbiologie UKE

Lockyer P.J., Bottomley J.R., Reynolds J.S., McNulty T.J., Venkateswarlu K., Potter B.V.L., Dempsey C.E., Cullen P.J. (1998) Distinct subcellular localisations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP RH domain directing plasma membrane targeting. *Curr. Biol.* 7, pp 1007-1010

Matsuo N., Yamada K., Shoji K., Mori M., Sugano M. (1997) Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leucemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 1997, 52: 58-64

Mayr G.W. (1988) Inositol Phosphates: structural components, regulators and signal transducers of cell-a Review. *Topics in Biochemistry*, Mannheim-Boehringer

Mayr G.W. (1990) Inositolphosphate und Inositolphospholipide. *Dt. Ärztebl.* 87, Heft 10, A-757

Mayr G.W. (1990) Mass determination of inositol phosphates by High-Performance Liquid Chromatography with postcolumn complexometry (Metal-Dye Detection). *Institut für physiol. Chemie, Universitätsklinikum Bochum*

Minegishi T. et al (1997) Dual Coupling And Down Regulation Of Human FSH-Receptors in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Life Science*, Vol. 60, No. 23 pp. 2043-2050

Morris A.J., Downes C.P., Harden T.K., Mitchell R.H. (1987) Turkey erythrocytes possess a membrane-associated inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase that is activated by  $Ca^{2+}$  in presence of calmodulin. *Biochem. J.* 248: 489-493

Norris F.A., Ungewickell E., Majerus P.W. (1995) Inositol hexakisphosphate binds to Clathrin assembly protein 3 (AP3/AP180) and inhibits Clathrin cage assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* 270, pp 214-218

Okabe S., Suganuma M., Hayashi M., Sueoka E., Komori A., Fujiki H. (1997) Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by Tea-polyphenols. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 639-643

Oligiati K.L., Toscano W.A. jr. (1983) Kinetics of gossypol inhibition of bovine Laktat-DH-X. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 115, No. 1

Onfelt A. (1992) Bombesin impairs spindle function in mitotic V79 Chinese hamster cells by receptor-dependent mechanism. *Mutat-Res.* 270 (2): 97-102

Ranga A., Kalla N.R., Kanwar U. (1990) Effect of gossypol on the fertility of male rats. *Acta Europaea Fertilitatis*, 21 (1) 7-15

- Ratovondrahona D., Fahmi M., Fournier B., Odessa M.F., Skryma R., Prevarskaya N., Djiane J., Dufy B. (1998) Prolactin induces an inward current through voltage independent Ca<sup>2+</sup> channels in Chinese hamster ovary cells stably expressing prolactin receptor. *J.-Mol.-Endocrinol.* 21 (1): 85-95
- Rikihisa Y., Lin Y.C. (1989) Effect of gossypol on the thyroid in young rats. *Journal of Comparative Pathology*, 100 (4) 411-417
- Rosenberg L.J., Adlakha R.C., Desai D.M., Rao P.N. (1985) Inhibition of DNA polymerase  $\alpha$  by gossypol. *Biochimica et Biophysica Acta* 866, 258-267
- Safrany S.T., Caffrey J.J., Yang X., Bembenek M.E., Moyer M.B., Burkhart W.A., Shears S.B. (1998) A novel context for the "MutT" module, a guardian of cell integrity, in a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase. *EMBO-J.* 17 (22):6599-607
- Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B. (2000) The Inositol Hexakisphosphate Kinase Family. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 275, No. 32, pp 24686-24692
- Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B. (2000) Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 468 (28-32)
- Saied I.T. et Shamsuddin A.M. (1998) Up-regulation of the tumour suppressor gene p53 and WAF 1 gene expression by IP6 in HT-29 human colon carcinoma cell line. *Anticancer-Res.* 18 (3A): 1479-84
- Scott P.H. and Lawrence Jr. J.C. (1997) Insulin activates a PD 098059-sensitive kinase that is involved in the regulation of p70<sup>S6K</sup> and PHAS-I. *FEBS Letters* 409 pp. 171-176
- Shamsuddin A.M., Yang G.Y., Vucenik I. (1996) Novel anti-cancer-functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. *Anticancer-Res.* 16 (6A): 3287-92
- Shears S.B. (1998) The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436: 49-67
- Shelley M.D., Hartley L., Fish R.G., Groundwater P., Morgan J.J., Mort D., Mason M., Evans A. (1999) Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer-Lett.* 135 (2): 171-180
- Stephens L., Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Khoo K.-H., Dell A., Jackson T.R., Hawkins P.T., Mayr G.W. (1993) The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *The J. of Biological Chemistry*, Vol. 268, No.6, pp 4009-4015
- Stephens L.R., Hawkins P.T., Morris A.J., Downes P.C. (1988) L-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate(3-hydroxy)kinase. *Biochemical Journal*, 249: 283-292



Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I. (1983) Release of  $Ca^{2+}$  from non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by Inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, pp 67-68

Stricker R., Hulser E., Fischer J., Jarchau T., Walter U., Lottspeich F., Reiser G. (1997) cDNA cloning of porcine p42IP4, a membrane associated and cytosolic 42 kDa inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high affinity for phosphatidylinositol(3,4,5)P3. *FEBS-Lett.* 405 (2): 229-36

Strom-Hansen T., Cornett C., Jaroszewski J.W. (1989) Interaction of gossypol with amino acids and peptides as a model of enzyme inhibition. *Int. J. Peptide Protein Res.* 34, 306-310

Suda N. et al. (1997)  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  Release in CHO-Cells Co-expressing Dihydropyridine and Ryanodine Receptors. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 109 pp. 619-631

Takazawa K., Passareiro H., Dumont J.E., Erneux C. (1988) Ca/calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat and bovine brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 632-641

Takazawa K., Vandekerckhove J., Dumont J.E., Erneux C. (1990) Cloning and expression in escherichia coli of rat brain cDNA encoding a Ca/calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* 272: 107-112

Takazawa K., Perret J., Dumont J.E., Erneux C. (1991) Molecular cloning and expression of a new putative inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoenzyme. *Biochem. J.* 278: 883-886

Tarver A.P., Anderson R.E. (1988) Detection of inositol 1,4,5-triphosphate kinase in retina. *Biochem. J.* 250: 891-895

Tuszynski G.P., Cossu G. (1984) Differential Cytotoxic Effect of Gossypol on Human Melanoma, Coloncarcinoma, and Other Tissue Culture Cell Lines. *Cancer Research* 44, 768-771

Vajanaphanich M., et al. (1994) Long-term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P4. *Nature*, 371, pp 711-714

Vanweyenberg V., Communi D., D`Santos C.S., Erneux C. (1995) Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P-3-kinase isoenzymes. *Biochem. J.* 306: 429-435

Velasquez-Pereira J., Risco C.A., McDowell L.R., Staples C.R., Prichard D., Chenoweth P.J., Martin F.G., Williams S.N., Rojas L.X., Calhoun M.C., Wilkinson N.S. (1999) Long-term effects of feeding gossypol and vitamin E to dairy calves. *J.-Dairy-Sci.* 82 (6): 1240-51

Venkateswarlu K., Cullen P.J. (1999) Molecular cloning and functional characterization of a human homologue of centaurin-alpha [In Process Citation] *Biochem. Biophys. Res Commun.* 262: 237-244

Verjans B., De Smedt F., Lecocq R., Vanweyenbergh V., Moreau C., Erneux C. (1994) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a dog thyroid cDNA encoding a novel inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Biochem. J.* 300: 85-90

Wahl M.I., Nishibe S., Suh P-G., Rhee S.G., Carpenter G. (1989) Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalisation and extracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*; 86: 1568-1572

Wakelam M.J.O. (1989) Amplification of fluoroaluminate-stimulated inositol phosphate generation in a cell line overexpressing the p21 N-ras gene. *Biochemical Journal*, 259: 737-741

Wang J.M., Tao L., Wu X.L., Lin L.X., Wu J., Wang M., Zhang G.Y. (1992) Differential binding of (+) and (-) gossypol to plasma protein and their entry into rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 95, 277-282

Wang Yong-chao and Rao P.N. (1984) Effect of gossypol on DNA Synthesis and Cell Cycle Progression of Mammalian Cells in Vitro. *Cancer Research* 44, pp. 35-38

Wymann M.P., Pirola L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1436: 127-150

York J.D., Odom A.R., Murphy R., Ives E.B., Wente S.R. (1999) A Phospholipase-C - dependent Inositol Polyphosphate Kinase Pathway Required for efficient Messenger RNA Export. *Science* Vol. 285

Yu B., Rogers J., Ranadive G., Baker S., Wilton D.C., Apitz-Castro R., Jain M.K. (1997) Gossypol modification of Ala-1 of secreted phospholipase A2: a probe for the kinetic effects of sulfate glycoconjugates. *Biochemistry*, Vol. 36, No. 41, 12400-12411

Harriet Bordon  
Gurlittstrasse 50  
20099 Hamburg  
Tel.: 040 / 28050826

## **Lebenslauf**

---

### **Persönliche Daten :**

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 16.11.1972
- Geburtsort: Reps

### **Schulbildung :**

- 1979 – 1983 Grundschohle am Elbsee, Hilden
- 1983 – 1992 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Hilden
- Abschluss: Abitur, Note: 1,8

### **Hochschulbildung:**

- 1993 – 2000 Medizinstudium an der Universität Hamburg
- Physikum 3 / 1995 Note: 3,0
- 1. Staatsexamen 3 / 1996 Note: 3,0
- 2. Staatsexamen 9 / 1998 Note: 2,66
- 3. Staatsexamen 5 / 2000 Note: 2,0
- Gesamtnote 2,46

### **Famulaturen und Praktika:**

- 10 / 1992 Pflegepraktikum im St. Joseph-Krankenhaus, achtwöchig
- 02 / 1997 Famulatur in der ZA im AK-Altona, vierwöchig
- 07 / 1997 Famulatur in der Pädiatrie im UKE, vierwöchig
- 08 / 1997 Famulatur in der Anästhesie im AK-St. Georg, zweiwöchig
- 09 / 1997 Praxisfamulatur: ambulanz-chirurgisch, dreiwöchig
- 02 / 1998 Praxisfamulatur: allgemeinmedizinisch, vierwöchig

### **Praktisches Jahr: 4/1999 – 4/2000**

- 1. Drittel: Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im AK-Altona
- 2. Drittel: Innere Medizin im UKE

Bereiche: Hämatologie und Onkologie,  
Pulmonologie

- 3. Drittel:

Chirurgie im Klinikum Borgo Trento in  
Verona  
Bereiche: Abdominalchirurgie

## **Tätigkeit und Weiterbildung als ÄiP:**

seit 01.07.2000 in der Abtlg. für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im  
Allgem. Krankenhaus Altona / Hamburg

- Präoperative Untersuchung und Aufklärung von Patienten
- Auswahl des geeigneten Narkoseverfahrens
- Durchführung von 400 balancierten Anästhesien, 270 TIVA und 45 rückenmarksnahen Anästhesieverfahren
- Postoperative Überwachung und Schmerztherapie
- Einführungskurs über den Strahlenschutz in der Diagnostik mit Röntgenstrahlen
- Weiterbildung im Bereich Transfusionsmedizin
- Teilnahme am Notfallseminar für Ärzte
- Besuch von Fortbildungsveranstaltungen der EuMeCom
- Regelmäßige Teilnahme an der innerbetrieblichen Fortbildung der Abteilung für Anästhesiologie im AK-Altona
- Besuch der Fortbildungsveranstaltungen der Ärztekammer Hamburg nach § 34 c der Approbationsordnung.

## **Promotion:**

Prof. Dr. Georg W. Mayr, Leiter des biochemischen Institutes im UKE, Hamburg

Thema: „Analyse von Inositolphosphatkinase-Inhibitoren und deren Auswirkung auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen (chinese hamster ovary-cells)“

## **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

- Europäische Multicenterstudie zur Quantifizierung von Konzepten zur Verringerung von Übelkeit und Erbrechen nach Narkosen
- Fallbeschreibung einer pelvinen Aktinomykose