

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**

(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)

'Cooling' – protektive oder zellschädigende Wirkung?

- Eine zellbiologische *in vitro* Studie -

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der theoretischen Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2005

vorgelegt von Claudia Scheuer

geboren am 02.09.1960 in Bexbach

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 'Cooling' – protektive oder zellschädigende Wirkung?	1
2 SUMMARY	5
2.1 'Cooling' – protective or injurious effect on cells?	5
3 EINLEITUNG	9
3.1 Hypothermie	9
3.2 Apoptose	12
3.2.1 Induktion und Exekution der Apoptose	14
3.2.2 Intrinsischer und extrinsischer 'Pathway'	15
3.2.3 p53-Modulation der Apoptose	17
3.3 TNF-α-induzierte Apoptose	19
3.3.1 TNF- α	19
3.3.2 TNF-Rezeptoren TNF-R1/TNF-R2	21
3.3.3 Transkriptionsfaktor NF κ B	22
3.4 Zellstress	23
3.5 Proliferation	26
3.5.1 Zellzyklusprogression	26
3.5.2 DNA-Reparatur	28
3.5.3 p53 – Vermittler zwischen Proliferation und Apoptose	28
3.6 Ziel der Studie	30
4 MATERIAL UND METHODEN	31
4.1 Zellkultur	31
4.1.1 Zelllinien und Zellen	33
4.1.2 Apoptose-Induktoren	35
4.2 Versuchsprotokoll	35
4.3 Fluoreszenzmikroskopie	36
4.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe	37
4.3.2 Bisbenzimid/Propidiumjodid-(Bis/PJ)-Färbeprotokoll	38
4.3.3 Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbeprotokoll	38
4.4 Immunozytochemie	38
4.4.1 Antikörper	39
4.4.2 Indirekte Fluoreszenzfärbung	39
4.4.2.1 Bromo-Deoxyuridin-(BrdU)-Einbau	40
4.4.3 Indirekte HRP/DAB-Färbung	40

4.5 Durchflusszytometrie	41
4.5.1 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	41
4.5.2 Annexin-V-FITC/Propidiumjodid (PJ)	42
4.5.3 Dichloro-Fluoreszein-Diazetat (DCFH-DA)	42
4.5.4 Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluoreszein-Azetoxymethylester (BCECF-AM)	43
4.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz	43
4.5.5.1 Bromo-Deoxyuridin-(BrdU)-Einbau	44
4.6 Photometrie	45
4.6.1 WST-1-Test	45
4.7 Potentiometrische pH-, pCO₂- und pO₂-Messung	45
4.8 Western-Blot-Analyse	46
4.8.1 Proteinextraktion	47
4.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	48
4.8.3 Proteindenaturierung	48
4.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.8.5 Blotting	51
4.8.6 Detektion	52
4.8.7 Quantitative Auswertung	53
4.9 RT-PCR	54
4.9.1 RNA-Extraktion	54
4.9.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	55
4.9.3 RT-Reaktion	56
4.9.4 Primer	57
4.9.5 PCR	57
4.9.6 DNA-Gelelektrophorese	59
4.9.7 Quantitative Auswertung	60
4.10 Statistische Analyse	60
5 ERGEBNISSE	61
5.1 Auswirkung von Kälte auf verschiedene Apoptose-stimulierte und unstimulierte Zellen	61
5.2 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Apoptose TNF-α-stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen	64
5.2.1 Zellmorphologie	64
5.2.2 Ausprägung spezifischer Apoptosemarker	72
5.2.2.1 Sub-2n-Population (7-AAD)	72
5.2.2.2 Phosphatidylserin-Translokation (Annexin-V-FITC/PJ)	75
5.2.3 Expression Apoptose-assoziiierter Proteine	77
5.2.3.1 'cleaved' Caspase-3 Expression	77
5.2.3.2 Caspase-8 Expression	79

5.2.3.3 'cleaved' Caspase-9 Expression	80
5.2.3.4 'cleaved' PARP-1 Expression	81
5.2.3.5 TNF-R1/R2-Rezeptor Expression	83
5.2.3.6 p53 Expression	85
5.2.3.7 NF κ B Expression	86
5.2.4 Caspase-3 und p53 mRNA Expression	87
5.2.5 Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Caspase-3 Aktivierung stimulierter und unstimulierter WEHI-S Zellen	89
5.3 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Zellstress TNF-α-stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen	92
5.3.1 ROS-Generierung (DCFH-DA)	92
5.3.2 Extrazellulärer pH, pCO ₂ und pO ₂	95
5.3.3 Intrazellulärer pH (BCECF-AM)	96
5.3.4 HO-1, HSP70, HIF-1 α und iNOS Proteinexpression	99
5.4 Auswirkung von Kälte auf die Proliferation TNF-α-stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen	104
5.4.1 Indirekter Proliferationstest (WST-1-Test)	105
5.4.2 Direkter Proliferationstest (BrdU-Einbau)	108
5.4.3 PCNA und Ki67 Proteinexpression	110
5.4.4 Zellzyklus-Analyse	112
5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	115
6 DISKUSSION	120
6.1 Diskussion von Material und Methoden	120
6.1.1 WEHI-S und WEHI-R Zelllinien	120
6.1.2 Methoden	121
6.2 Diskussion der Ergebnisse	124
6.2.1 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Apoptose	124
6.2.1.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen	125
6.2.1.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen	140
6.2.2 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Zellstress	153
6.2.2.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen	153
6.2.2.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen	162
6.2.3 Auswirkung von Kälte auf die Proliferation	166
6.2.3.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen	166
6.2.3.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen	172
6.2.4 Schlussfolgerung	176
7 LITERATURVERZEICHNIS	177
8 DANKSAGUNG	199
9 LEBENS LAUF	200

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 'Cooling' – protektive oder zellschädigende Wirkung?

Obwohl die Anwendung von Kälte ein weitverbreitetes Konzept zur Protektion von Zellen und Geweben gegen Hypoxie und Entzündung darstellt, muss berücksichtigt werden, dass erniedrigte Temperaturen auch Zellschädigungen bewirken. In der klinischen Anwendung sind vor allem lokale hypotherme Applikationen sowie die anschließende Wiedererwärmung von Relevanz, wobei die Mechanismen der Schädigung durch Kühlung und Wiedererwärmung wohl unterschiedlicher Natur sind. Da fundierte Grundlagen zum Mechanismus des Kälteschadens nur in unzureichendem Ausmaß vorliegen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen und Regulationsmechanismen von Kälte und Wiedererwärmung *in vitro* mit und ohne entzündlicher Stimulierung durch Tumor-Nekrose-Faktor- α zu untersuchen. Die Untersuchungen konzentrierten sich hierbei auf die Manifestation des apoptotischen Zelltodes, die Induktion von Zellstress und die Modulation der Zellproliferation einer TNF- α -sensiblen (WEHI-S) und einer TNF- α -resistenten (WEHI-R) Zelllinie.

Methoden

In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss unterschiedlicher Kühltemperaturen zwischen 4°C und 32°C sowie der Einfluss der Dauer der Kühlung und der Dauer der Wiedererwärmung untersucht. Hierbei wurden Apoptosemerkmale morphologisch sowie die Caspase-3 Aktivierung immunzytochemisch beurteilt.

Für die weiteren Untersuchungen wurden dann die Zellen 4h bei 4°C gekühlt und 1h auf 37°C wiedererwärmt. Permanent 37°C inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Auswirkung einer TNF- α -Stimulierung auf morphologische Merkmale der Apoptose und Aktivierung spezifischer Apoptose- 'Pathway'-Proteine wurde mit Hilfe zytochemischer und immunzytochemischer Methoden, sowie licht- bzw. fluoreszenzmikroskopischer und durchflusszytometrischer Techniken untersucht. Die Apoptose-spezifischen morphologischen Merkmale wurden über die Diskriminierung apoptotischer Kernstadien und Zytoplasmamembran-Eigenschaften (Bisbenzimid/Propidiumjodid), der DNA-Fragmentierung (7-AAD) und der Phosphatidylserin-Translokation (Annexin-FITC) begutachtet. Zur Ermittlung Apoptose-spezifischer 'Pathway'-Proteine wurden die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Caspase-3, 8, 9, PARP-1-Spaltung) sowie die Expression der TNF-Rezeptoren TNF-R1/R2 und der Apoptose-regulierenden Proteine p53 und NF κ B untersucht. Die Protein- bzw. mRNA-Expression einiger 'Pathway'-Proteine wurden zusätzlich durch Western-Blotting (Caspase-3, TNF-R1, NF κ B) bzw. semiquantitativer RT-PCR (Caspase-3, p53) analysiert. Zur Beurteilung der Stressantwort wurden verschiedene Stressoren (ROS, intra-/extrazellulärer pH) bzw. Stress-induzierte Proteine (HO-1, HSP70, HIF-1 α , iNOS) nach Kälte und Wiedererwärmung durchflusszytometrisch, potentiometrisch, bzw. Western-Blot-analytisch ermittelt. Der Einfluss des hypothermen Insults auf die Zellproliferation wurde über die Interaktion mit der Stoffwechselaktivität (WST-1), der DNA-Synthese (BrdU-Einbau),

der proliferativen Progression (Zellzyklus-Analyse) und der Expression einiger proliferationsassoziierter Proteine (PCNA, Ki67) photometrisch, fluoreszenzmikroskopisch, durchflusszytometrisch bzw. Western-Blot-analytisch überprüft.

TNF- α -sensible WEHI-S Zellen

In TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen induzierte alleinige Kälteapplikation mit Wiedererwärmung bereits apoptotischen Zelltod. Das Ausmaß der Apoptose reduzierte sich jedoch mit abnehmender Temperatur, und war bei 4°C am geringsten ausgeprägt. Trotz der Eigenschaft selbst Apoptose zu induzieren, konnte durch Hypothermie der TNF- α -induzierte apoptotische Zelltod signifikant inhibiert werden. Diese Protektion war vor allem nach hypothermer Inkubation über einen Zeitraum von ≥ 4 h zu beobachten, und beschränkte sich auf die ersten Stunden (≤ 4 h) der Wiedererwärmung. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade ging dabei grundsätzlich der Manifestation der morphologischen Apoptosemerkmale voraus.

Apoptose und Zellstress. Mit der vorliegenden Untersuchung konnte weiter erstmals nachgewiesen werden, dass die alleine durch 4°C Kälte induzierte Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen nicht aber über den extrinsischen Signalweg vermittelt wird, da 4h Kälte und 1h Wiedererwärmung neben einem Anstieg der Caspasen-3 und -8 sowie einer verstärkten PARP-1 Spaltung, mit einer Erhöhung der Caspase-9, einer massiv vermehrten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), nicht aber mit einer TNF-Rezeptorstimulation und auch nicht mit einer Aktivierung von NF κ B einherging.

Der TNF- α -stimulierte Apoptose-Signalweg verlief in 37°C Kontrollzellen über die extrinsische TNF-R1-Rezeptor-Stimulation, welche mit einer massiven Erhöhung der Sub-2n-Population, der Translokation von Phosphatidylserin und der Aktivierung der Caspasen-Kaskade einherging. Zusätzlich fand sich ein NF κ B-vermittelter TNF-R2-Support, sowie eine mitochondriale Verstärkung über die Caspase-8-induzierte Amplifikationsschleife bei jedoch nur geringer Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies.

4h Kälte und 1h Wiedererwärmung reduzierten den TNF- α -induzierten apoptotischen Zelltod über eine Inhibierung der Hochregulation der beiden TNF-Rezeptoren. Dies ging mit einer Verminderung der Sub-2n-Population, einer Blockierung der Phosphatidylserin-Translokation sowie einer Hemmung der Caspasen- und NF κ B-Aktivierung, jedoch nicht mit einer Beeinträchtigung der ROS Generierung einher. Des weiteren bewirkte Kälte einen Anstieg des intrazellulären pH sowie einen G2/M-Phasen-Arrest. Diese können über Alkalisierung bzw. Initiierung von DNA-Reparaturmechanismen der Manifestation der TNF- α -induzierten Apoptose entgegenwirken. Umgekehrt konnte die Kälteapplikation weder die Expression der Hitzeschock-Proteine 32 (HO-1) und 70 (HSP70) noch des zytoprotektiven Transkriptionsfaktors HIF-1 α oder der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) signifikant beeinflussen.

Proliferation. Alleinige Hypothermie bewirkte eine Reduktion der Stoffwechselaktivität, welche als indirekter Indikator für Proliferation gesehen werden kann. Entsprechend fanden sich ein G2/M-Arrest und eine verminderte PCNA und Ki67 Expression. Der BrdU-Einbau war durch alleinige Kälteapplikation nicht beeinflusst. Zur Interpretation des letzteren Ergebnisses muss jedoch bedacht werden, dass BrdU nicht nur bei Replikation, sondern auch bei Reparaturprozessen eingebaut wird. Als Indikator der vermehrten DNA-Reparatur war neben dem G2/M-Arrest die Anzahl von polyploiden Zellen erhöht.

Die Stimulierung von 37°C inkubierten Zellen mit TNF- α bewirkte ebenfalls eine Reduktion der Stoffwechselaktivität. Neben einem verminderten BrdU-Einbau fand sich jedoch eine erhöhte Ki67 Expression. Neben Proliferation kann diese allerdings auch durch die massiv vermehrte Apoptose verursacht sein, da Ki67 nachweislich in apoptotischen Zellen exprimiert wird.

Die Applikation von Kälte verstärkte die TNF- α -induzierte Reduktion der Stoffwechselaktivität, kompensierte, wohl durch vermehrte Reparatur, den verminderten BrdU-Einbau, und wirkte der durch TNF- α vermehrten Apoptose-assoziierten Ki67 Expression entgegen. Vergleichbar zu Kontrollen, induzierte die Kälte auch in TNF- α -stimulierten Zellen einen G2/M-Arrest.

TNF- α -resistente WEHI-R Zellen

Apoptose und Zellstress. In TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen bewirkte alleinige Kälteapplikation bereits eine fulminante Apoptose, welche mit einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade, jedoch ohne Beteiligung der TNF-Rezeptoren und NF κ B einherging. Im Gegensatz zu TNF- α -sensiblen Zellen zeigten die WEHI-R Zellen auf Kälte, neben einer mäßiggradigen Generierung von ROS, eine massive Stress-Antwort mit intrazellulärer Ansäuerung und Expression von HO-1, HSP70, HIF-1 α und iNOS.

Unter 37°C Bedingungen verursachte TNF- α in WEHI-R Zellen eine signifikante NF κ B-Aktivierung, jedoch war keine Stimulierung der TNF-Rezeptoren zu beobachten. Entsprechend fand sich eine lediglich mäßiggradige Aktivierung der Caspasen-Kaskade, eine geringer ausgeprägte Generierung von ROS und eine geringere Manifestation der Apoptose. Vergleichbar zu TNF- α -sensiblen Zellen zeigten die WEHI-R Zellen nach TNF- α Stimulierung keine Beeinträchtigung des intrazellulären pH sowie der Expression von HO-1 und HSP70.

Die Kälteapplikation TNF- α -stimulierter WEHI-R Zellen inhibierte die Zytokin-vermittelte NF κ B-Aktivierung und zeigte, wie Kälteapplikation alleine, eine vergleichbar fulminante Aktivierung der Caspasen-Kaskade ohne Beteiligung der TNF-Rezeptoren. Durch die zusätzliche Kälteapplikation wurde wiederum eine massive Stress-Antwort mit intrazellulärer Ansäuerung und Expression von HO-1, HSP70, HIF-1 α und iNOS erzeugt.

Proliferation. Alleinige Hypothermie führte in WEHI-R Zellen nach initialer Inhibition zu einer Proliferationsstimulierung, welche durch einen vermehrten BrdU-Einbau und eine erhöhte PCNA- und Ki67-Expression angezeigt war. Ein signifikanter G2/M-Arrest, wie bei WEHI-S Zellen unter Hypo-

thermie, war bei WEHI-R Zellen nicht nachzuweisen. Die Steigerung der Proliferation muss wohl der durch Kälte induzierten intrazellulären Azidose zugeschrieben werden.

Die Stimulierung von 37°C inkubierten WEHI-R Zellen mit TNF- α verursachte, wie bei TNF-Resistenz bekannt, ebenfalls eine mäßiggradige Steigerung der Proliferation mit vermehrtem BrdU-Einbau und erhöhter PCNA-Expression.

Die Applikation von Kälte auf TNF- α -stimulierte WEHI-R Zellen bewirkte eine vergleichbare Stimulierung der Proliferation wie alleinige Hypothermie auf unstimulierte Zellen. Im Vergleich zu unstimulierten 37°C inkubierten Zellen war der BrdU-Einbau vermehrt und die PCNA- und Ki67-Expression erhöht.

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass 4°C Hypothermie in TNF- α -sensiblen Zellen vermehrt Apoptose induziert, jedoch eine über TNF- α induzierte Apoptose signifikant reduziert. Diese konträre Wirkungsweise der Hypothermie beruht darauf, dass sie selbst die Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert, dabei aber im Sinne einer Protektion den TNF- α -vermittelten extrinsischen Signalweg durch Blockierung der TNF-Rezeptorexpression inhibiert. Resistenz gegen TNF- α vermindert, aufgrund fehlender Rezeptorstimulierbarkeit, den durch dieses Zytokin induzierten apoptotischen Zelltod. Hypothermie bewirkt in TNF- α -resistenten Zellen jedoch keine zusätzliche Protektion, sondern führt über eine vermehrte Stimulierung des intrinsischen Signalwegs unabhängig von der Zytokin-Exposition zu einer fulminanten Apoptose.

Dies lässt im Rahmen der Evolution, aufgrund der frequenten Exposition niedriger Temperaturen, auf einen Selektionsvorteil TNF- α -sensibler Zellen schließen. Umgekehrt geben die vorliegenden Ergebnisse Anhalt, dass bei entzündlichen Erkrankungen in Organismen mit TNF- α -sensiblen Zellen die Hypothermie als therapeutische Konditionierungsstrategie zur Verhinderung TNF- α -induzierter Gewebeschädigung von größtem Interesse sein könnte. Des Weiteren bleibt in künftigen Studien zu klären, inwieweit 4°C Hypothermie ein neuer Therapieansatz zur adjuvanten Behandlung TNF- α -resistenter Tumoren sein könnte.

2 Summary

2.1 'Cooling' – protective or injurious effect on cells?

The use of cooling is a well accepted procedure to protect cells and tissues against hypoxia and inflammation. However, exposure of tissues to reduced temperatures is also known to induce cell injury. In clinical practice, both cooling and rewarming are capable of contributing to injury, although the mechanisms of injury induced by cooling may be considered different in nature when compared with that of rewarming. Because little details are known of cooling-induced cell injury, the present study aimed at investigating *in vitro* the mechanisms and effects of cooling and rewarming with and without tumor necrosis factor- α -associated inflammatory stimulation. The analyses focused on manifestation of apoptotic cell death, induction of cell stress and modulation of proliferation of TNF- α -sensitive (WEHI-S) and TNF- α -resistant (WEHI-R) cell lines.

Methods

In a first set of experiments, the effect of different cooling temperatures between 4°C and 32°C as well as the influence of duration of cooling and duration of rewarming were studied. In these experiments morphological signs of apoptosis and activation of Caspase-3 were assessed by immunocytochemistry and FACS analysis.

For subsequent studies, cells were cooled for 4h at 4°C and were then rewarmed for 1h to 37°C. Cells permanently incubated at 37°C served as controls. The effect of stimulation by TNF- α on morphological signs of apoptosis and activation of specific apoptosis-pathway proteins was analyzed by cytochemical and immunocytochemical methods using light and fluorescence microscopy as well as flowcytometric techniques. Morphological signs of apoptosis were discriminated by assessment of nuclear DNA and plasma membrane integrity using bisbenzimidazole and propidium iodide, DNA fragmentation (7-AAD) and translocation of phosphatidylserine (Annexin-FITC). For determination of apoptosis-specific pathway proteins, the activation of the caspase cascade (Caspase-3, -8, -9 and PARP-1 cleaved products) as well as the expression of the TNF-receptors TNF-R1/R2 and the apoptosis-controlling proteins p53 and NF κ B were analyzed. Additionally, protein and mRNA expression of some of the pathway proteins were determined by Western blotting (Caspase-3, TNF-R1, NF κ B) and semiquantitative RT-PCR (Caspase-3, p53). For assessment of stress response after cooling and rewarming, different stressors (reactive oxygen species, intracellular pH) and stress induced proteins (HO-1, HSP70, HIF-1 α , iNOS) were studied by flow cytometry, potentiometry and Western blotting. The effect of hypothermia on cell proliferation was analysed by the interaction with cell metabolic activity (WST-1), DNA synthesis (incorporation of BrdU), proliferative progression (analysis of cell cycle) and expression of proliferation-associated proteins (PCNA, Ki67) using photometry, fluorescence microscopy, flow cytometry and Western blotting.

TNF- α -sensitive WEHI-S cells

In TNF- α -sensitive WEHI-S cells hypothermia and rewarming induced apoptotic cell death. The reduction of culture temperature from 32°C to 4°C was associated with a reduction of the number of apoptotic cells. Accordingly, apoptosis was found lowest at 4°C. Of interest, hypothermia, although inducing apoptosis *per se*, was effective in significantly reducing TNF- α -induced programmed cell death. This protection was primarily observed in experiments with a duration of hypothermia \geq 4h, and was restricted to the first few hours (\leq 4h) of rewarming. The activation of the caspase cascade strictly preceded the manifestation of morphological signs of apoptosis.

Apoptosis and cell stress. The present study shows for the first time that the 4°C cooling-induced apoptotic cell death was mediated via the intrinsic mitochondrial but not the extrinsic TNF-receptor-mediated signaling pathway. This result is based on the fact that 4h cooling and 1h rewarming induced caspase-3, -8 and -9, PARP-1 cleavage, and massive generation of reactive oxygen species, but did not result in stimulation of TNF-receptors and activation of NF κ B.

In contrast, the TNF- α -mediated signalling pathway in 37°C warm control cells involved the extrinsic stimulation of the TNF-R1-receptor, which was associated with a massive increase of the sub-2n-population, a translocation of phosphatidylserine and an activation of the caspase cascade. In addition, a NF κ B-mediated TNF-R2-support as well as a mitochondrial aggravation of the caspase-8-induced amplification loop was observed, however, with only minor contribution of reactive oxygen species.

Four hours cooling and 1h rewarming effectively reduced the TNF- α -induced apoptotic cell death through inhibition of the upregulation of the two TNF-receptors. This was associated with an attenuation of the sub-2n-population, a diminution of the translocation of phosphatidylserine and a blockade of the activation of caspases and NF κ B. Of interest, generation of reactive oxygen species was not affected by cooling treatment. Further, cooling and rewarming provoked an increase of intracellular pH and a G2/M-phase arrest. These events are capable of counteracting manifestation of TNF- α -induced apoptotic cell death due to alkalization or initiation of DNA repair. In contrast, cooling was not effective to affect the expression of the heat shock proteins 32 (HO-1) and 70 (HSP70), neither did it significantly influence the expression of the cytoprotective transcription factor HIF-1 α and the inducible nitric oxide synthase (iNOS).

Proliferation. Cooling alone provoked a reduction of the metabolic activity, indicating a decrease of proliferation. Accordingly, a G2/M arrest and a reduced PCNA and Ki67 expression were observed. The incorporation of BrdU was not affected by cooling, however, it has to be considered that BrdU is incorporated not only during replication but also during repair. The fact that cooling may have induced increased DNA repair was further supported by the G2/M arrest and the elevated number of polyploid cells.

The stimulation of 37°C incubated cells by TNF- α provoked also a reduction in metabolic activity. Incorporation of BrdU was reduced, however, expression of Ki67 was found increased. Apart from

indicating proliferation the latter may just reflect massively increased apoptotic cell death, because others have clearly demonstrated that apoptotic cells frequently express Ki67.

The application of cooling aggravated the TNF- α -induced reduction of the metabolic activity, however, compensated the attenuated BrdU incorporation (probably due to increased repair), and counteracted the TNF- α -mediated apoptosis-associated increase in Ki67 expression. Comparable to controls, cooling induced also G2/M arrest in the TNF- α -stimulated cells.

TNF- α -resistant WEHI-R cells

Apoptosis and cell stress. In TNF- α -resistant WEHI-R cells, cooling and rewarming produced fulminant apoptosis, which was associated with an activation of the caspase cascade, however, without contribution of TNF-receptors and activation of NF κ B. In contrast to TNF- α -sensitive cells, the WEHI-R cells showed, beside a slight increase of generation of reactive oxygen species, a massive stress response, including intracellular acidification and increased expression of HO-1, HSP70, HIF-1 α and iNOS.

Under 37°C warm culture conditions, TNF- α induced in WEHI-R cells a significant activation of NF κ B, however, without stimulation of the TNF-receptors. Accordingly, only a slight activation of the caspase cascade was observed, and generation of reactive oxygen species and manifestation of apoptosis were less pronounced. Comparable to TNF- α -sensitive cells, intracellular pH and expression of the heat shock proteins 32 and 70 were not affected after exposure to TNF- α .

Cooling and rewarming of TNF- α -stimulated WEHI-R cells significantly inhibited the cytokine-mediated activation of NF κ B and resulted in a fulminant activation of the caspase cascade. Comparable to cooling and rewarming in non-TNF- α -stimulated cells this response was not associated with a stimulation of the TNF-receptors. The additional application of cooling again induced a massive stress response, as indicated by the intracellular acidification and an increased expression of HO-1, HSP70, HIF-1 α and iNOS.

Proliferation. In WEHI-R cells, hypothermia and rewarming induced an initial inhibition and a later stimulation of proliferation, as indicated by an increased incorporation of BrdU and an enhanced expression of PCNA and Ki67. A significant G2/M arrest, as observed with hypothermia in WEHI-S cells, could not be encountered in WEHI-R cells. The increased proliferation probably has to be attributed to the cooling-induced intracellular acidosis.

As also known from other experiments with TNF- α -resistant cells, stimulation of 37°C warm incubated WEHI-R cells by TNF- α caused a moderate increase of proliferation. This was reflected by an enhanced incorporation of BrdU and an elevated expression of PCNA.

The application of cooling to TNF- α -stimulated WEHI-R cells provoked a comparable stimulation when compared with that observed in hypothermic, non-stimulated cells. Thus, compared to un-

stimulated cells incubated under 37°C conditions, the incorporation of BrdU and the expression of PCNA were found significantly enhanced.

Conclusion

The present study shows that 4°C hypothermia in TNF- α -sensitive cells increases apoptosis, however, reduces TNF- α -induced programmed cell death. These contrary actions of hypothermia are due to the fact that the cold temperature induces apoptosis via the intrinsic signalling pathway, by this, however, protecting from the extrinsic pathway-mediated TNF- α injury due to inhibition of TNF-receptor expression. Resistance against TNF- α reduces cytokine-induced apoptotic cell death due to the lack of capability of stimulation of TNF-receptors. In TNF- α -resistant cells, however, hypothermia does not induce additional protection from apoptosis, but results in fulminant manifestation of programmed cell death due to increased stimulation of the intrinsic signalling pathway. Of interest, this response is independent of TNF- α exposure.

Evolutionary, these results may indicate a selection advantage for TNF- α -sensitive cells due to the frequent exposure of mammals to low temperatures in nature. Further, the present results may provide the background for the development of novel therapeutic strategies of inflammatory diseases. Hypothermia may be used as a preconditioning procedure in organisms with TNF- α -sensitive cells to protect from pro-inflammatory stimuli-induced apoptotic cell death. In addition, further studies may clarify whether 4°C cooling represents an adjuvant treatment option for TNF- α -resistant tumors.

3 EINLEITUNG

3.1 Hypothermie

Die Anwendung von Kälte (Hypothermie) ist ein seit langer Zeit gebräuchliches, nicht-medikamentöses Behandlungsverfahren in der Schmerz- und Entzündungstherapie post-traumatischer und post-operativer Zustände. Die günstige Wirkung von Kälte auf Schmerz und Schwellung bei Verletzungen gilt daher als empirische Grundlage für den therapeutischen Einsatz von lokaler Kälte in der Versorgung von meist akuten Verletzungen mit dem Ziel, den Schmerz zu lindern und die Dauer der Rehabilitation zu verkürzen.

Schon durch die Heilkundigen des alten Ägyptens war die therapeutische Anwendung von Kälte eine verbreitete Maßnahme. Auch in der Neuzeit erkannte man den Nutzen der therapeutischen Applikation von Kälte. So führte der Naturheilkundige Vinzenz Priessnitz (1799-1851) die Anwendung von kaltem Wasser als Behandlungsprinzip bei Verletzungen ein und eröffnete schon 1831 kurbetriebliche Badeanstalten, in denen seine Kälte-Behandlungsmethoden in Form von Waschungen, Abreibungen und Packungen angewendet wurden. Der Militärarzt Dr. Lorenz Gleich definierte 1849 die „Neuen Naturheilverfahren“: „Man therapie ohne Arzneistoffe und Blutentziehung, dagegen mit Kälte und Wärme, Trinken von kaltem Wasser, Umschlägen, Diät und frischer Luft“. Auch der bayerische Pfarrer Sebastian Kneipp erkannte in der Mitte des 19. Jahrhunderts den günstigen therapeutischen Einfluss von Kühlung und nahm die Kältetherapie in Form von kalten Güssen und Wechselbädern in sein bis heute bekanntes Heilungskonzept auf (SCHOTT, 1996).

Neben des Einsatzes zur Schmerzlinderung werden Schnee und Eis seit alters her auch zur Blutstillung verwendet. Daneben ist die lokale Anwendung von Kälte zur symptomatischen Behandlung von Prellungen, Verbrennungen, Gelenkentzündungen, Blinddarmentzündungen und der Einsatz von Wadenwickel zur Absenkung der Körpertemperatur bei Fieber weit verbreitet. Weitere Anwendungsgebiete der Kältetherapie eröffnen sich bei der Behandlung von Migräne und bei der Ganzkörperbehandlung von Rheumatikern in der Kältekammer. Wie bei der medikamentösen Therapie richten sich auch bei der Kältetherapie Intensität, Dauer, Fläche und Frequenz nach der individuellen Ausgangssituation des Patienten. Die lokale Kühlung kann dabei durch Applikation von Eiskübeln, Eispackungen, Kaltwasser, kühlenden Sprays, Wickel oder Kälteaerosole erfolgen und je nach Zielsetzung in unterschiedlicher Dauer angewendet werden. Eine weitere wichtige Anwendung der Hypothermie erschließt sich in der Absenkung der Körpertemperatur zur Protektion von Organen, insbesondere des Gehirns, während operativen Eingriffen.

Trotz der vielfach belegten protektiven Einflüsse von Kälte ist der therapeutische Einsatz nicht unumstritten. Bei der Auswirkung von Kälte in medizinischer Hinsicht sind die perioperative Hypothermie und die akzidentielle Hypothermie als prognostisch ungünstige Einflüsse, von der Hypothermie während extrakorporalem Bypass bei herzchirurgischen Operationen und der moderaten Hypothermie als Therapiekonzept in der Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas als günstige Einflüsse abzugrenzen.

Die perioperative Hypothermie, die bei längeren operativen Eingriffen häufig auftritt, ist durch die Störung des im Wachzustand aufrechterhaltenen Temperatur-Fließgleichgewichtes verursacht, das während der Narkose durch zwei Mechanismen beeinflusst wird: Die verminderte Wärmeproduktion und die vermehrte Wärmeabgabe bedingen eine negative Wärmebilanz und damit den intraoperativen Wärmeverlust. Obwohl sich durch die Applikation von Kälte bei größeren Blutungen eine beschleunigte Blutstillung herbeiführen lässt, haben *in vitro* Studien gezeigt, dass perioperative Hypothermie auch intra- und post-operative Blutungen verstärken kann. Beschrieben wurden eine herabgesetzte Thrombozytenfunktion (MICHELSON et al., 1994), eine reduzierte Aktivität der Gerinnungskaskade (REED et al., 1992) und eine Verlängerung der Prothrombinzeit sowie der partiellen Thromboplastinzeit (ROHRER und NATALE, 1992). Auch konnte gezeigt werden, dass perioperative Hypothermie mit einem erhöhten Proteinverlust (CARLI et al., 1989) und einer reduzierten Kollagensynthese (KURZ et al., 1996) in Zusammenhang gebracht werden muss. Die Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten sinkt ebenso wie die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten als Maß für zelluläre Immunabwehr (WENISCH et al., 1996). Des weiteren vermindert die durch Hypothermie verursachte thermoregulatorische Vasokonstriktion die Sauerstoffspannung in subkutanen Geweben (SHEFFIELD et al., 1994). Sämtliche dieser Störungen werden als Ursache für eine herabgesetzte Wundheilungsrate und ein vermehrtes Auftreten post-operativer Wundinfektionen diskutiert.

Die akzidentielle Hypothermie, die als unbeabsichtigtes Absinken der Körpertemperatur unter 35°C bei Kälteexposition von Personen ohne intrinsische Störung der Wärmeregulation definiert ist, gilt als prognostisch ungünstiges Zeichen für das Überleben und erfordert eine schnellst mögliche Wiedererwärmung (SEGERS et al., 1998).

Die Herabsetzung der Kerntemperatur während Herz-Operationen ist nötig, um die Stoffwechsellaktivität der Gewebe zu reduzieren, und so vor allem das zerebrale Gewebe vor Schädigungen zu schützen. Hypothermer Schutz kann durch Applikation von Kälte während des ischämischen Insults geboten werden. Im Kardioplegie-arretierten Herzen verbessert Hypothermie die Ischämie-Resistenz über den Einfluss auf spezifische Signal-²Pathways¹ mitochondrialer Membran-Proteine (NING et al., 2002). Hypotherme Adaptation ist weiterhin charakterisiert durch verstärkte post-ischämische Gen-Expression von spezifischen Stress-involvierten Hitzeschock-Proteinen (NING et al., 1998). Daneben ist jedoch zu bedenken, dass das kardiovaskuläre System selbst schon für geringe Absenkungen der Körpertemperatur sensibel ist.

Aus neurobiologischen Untersuchungen in fokalen und globalen Ischämie-Modellen ist bekannt, dass milde und moderate Hypothermie sekundäre Schädigungen verhindern, die Infarktgröße reduzieren und zudem die neurologische Rehabilitation verbessern (BUSTO et al., 1987; KARIBE et al., 1994; COIMBRA et al., 1996). Aufgrund der Reduzierung des erhöhten intrakraniellen Drucks, der die Haupttodesursache nach ausgedehnter zerebraler Ischämie darstellt (BOUNDS et al., 1981; HACKE et al., 1996), wirkt sich die Hypothermiebehandlung auch günstig auf den klinischen Verlauf in der Behandlung von Schlaganfallpatienten aus (SHIOZAKI et al., 1993; MARION et al., 1997). Neu-

robiologische Studien zeigen weiterhin einen günstigen Effekt von milder und moderater Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma (MARION et al., 1997). WESTERMANN et al. (1999) zeigten, dass sich lokales 'Cooling' auf den TNF- α -induzierten mikrovaskulären Perfusionsschaden, die Leukozyten-Adhärenz und die Entstehung von Apoptose inhibierend auswirkt.

Neben des Einsatzes zur symptomatischen Behandlung kann die Auswirkung von Kälte auch kausaltherapeutisch genutzt werden. So können beispielsweise bei Tumoren, die mit den konventionellen Methoden nicht resezierbar sind, kryochirurgische Maßnahmen zur Entfernung des geschädigten Gewebes eingesetzt werden. Die Kryochirurgie gehört zu den lokal destruierenden Therapieverfahren, bei denen durch Einfrieren und Wiederauftauen des Tumorgewebes mit Hilfe einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Sonde eine Nekrose induziert wird. HANAI et al. (2001) zeigten, dass neben der durch die Kryobehandlung induzierten Nekrose auch apoptotische Mechanismen an der Zerstörung des Tumorgewebes beteiligt sein können.

Ein weiteres Anwendungsgebiet findet der Einsatz von Kälte in der Konservierung von Zellen, insbesondere von Eizellen und Blutzellen, oder von Geweben und Organen, sowohl zu Forschungszwecken als auch zur Transplantation. Nach der erfolgten Temperaturabsenkung wird die Kältebehandlung unterteilt in milde (35-33°C), moderate (31-29°C), tiefe (24-20°C) und sehr tiefe (unterhalb 20°C bzw. 10-4°C) Hypothermie (SHIBANO et al., 2002; PARDI et al., 2004). Klinische Organkonservierung zur Transplantation wird in der Regel bei 2-4°C vorgenommen, um zelluläre Schädigungen während der Aufbewahrungsphase zu reduzieren.

Obwohl der Einsatz von Hypothermie ein weitverbreitetes Konzept zur Protektion von Zellen und Geweben gegen schädigende Prozesse repräsentiert, können durch den Kälteeinfluss auch Zellschädigungen hervorgerufen werden (NAGLE et al., 1990; RAUEN et al., 1997a; 2000; BAUST et al., 2000; COOPER et al., 2000; VAIRETTI et al., 2001). Wenngleich einige Studien belegen, dass der Einfluss der Hypothermie das Risiko von oxidativem Stress, Zellschaden und programmiertem Zelltod erniedrigt (SLIKKER III et al., 2001; RIESS et al., 2004; CHILDS et al., 2005), haben vielfache Untersuchungen gezeigt, dass die Einwirkung der Hypothermie Zellschäden verursacht, die vorrangig auf die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediäre als Vermittler für kälteinduzierte Apoptose zurückgeführt werden (DE GROOT und BRECHT, 1991; RAUEN et al., 1997a; 1997b; RAUEN und DE GROOT, 1998; PETERS et al., 1998; RAUEN et al., 1999; 2000; VAIRETTI et al., 2001). In der klinischen Anwendung sind vor allem hypotherme Applikationen mit anschließender Wiedererwärmungsphase (Organtransplantationen, Ischämie/Reperusionsmodelle u. a.) von Relevanz. Es wird vermutet, dass der Schaden während der Kühlungsphase auf nekrotischen Prozessen beruht, während dem Schaden während der Wiedererwärmungsphase apoptotische Mechanismen unterliegen (SALAHUDEEN et al. 2003). Bei BARTELS-STRINGER et al. (2003) wird sogar formuliert, dass die Hypothermie selbst einen potenten Apoptose-Induktor darstellt.

3.2 Apoptose

Das Erlöschen aller Zellfunktionen und das Absterben der Zelle wird als Zelltod bezeichnet, i. d. R. ausgelöst durch Noxen und ursprünglich als passives Phänomen dargestellt. KERR et al. (1972) revolutionierten dieses Konzept, als sie den Mechanismus der Apoptose als aktive Form des Zelltodes neben der passiven Form, der Nekrose, beschrieben. Aktuell wird der Begriff der Apoptose als Synonym für den programmierten Zelltod verwendet (THOMPSON, 1995). Apoptose ist ein phylogenetisch altes Phänomen, das bei einer Vielzahl von Tieren, darunter auch niedere Tiere, wie z. B. dem vielfach erforschten Nematoden *Caenorhabditis elegans*, und auch bei Pflanzen beobachtet wurde (WYLLIE et al., 1980; ELLIS und HORVITZ, 1986; BURSCHE et al., 1992; GREENBERG et al., 1994). Das genetische Programm der Apoptose ist in allen Zellen gespeichert und von der Embryonalentwicklung bis zum Tode aktiv. Während der embryonalen und fetalen Morphogenese der Organe ist Apoptose ein entscheidender Vorgang der Homöostase und erlaubt auch dem multizellulären adulten Organismus eine kontinuierliche Regenerierung der Gewebe unter ‚steady-state‘-Bedingungen aufrechtzuerhalten (BEN-SASSON et al., 1995; KRAMMER, 1999). Apoptose stellt das Komplement zur Mitose dar (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1973) und determiniert zusammen mit ihr Organwachstum, Organinvolution und die Aufrechterhaltung der Organgröße. Darüber hinaus kann der Organismus über diesen Mechanismus geschädigte, präkanzerogene und überschüssige Zellen eliminieren (BURSCHE et al., 1992).

Im Gegensatz zur Nekrose ist der programmierte Zelltod ein Selbstmordmechanismus unter aktiver zellulärer Kontrolle, durch den die Zelle den eigenen Tod herbeiführt (STELLER, 1995; ENDRES et al., 1998). Nach Schädigung der Zelle verschiebt sich das Gleichgewicht der intrazellulären Regulationsproteine zugunsten pro-apoptischer Mediatorproteine (KROEMER et al., 1995). Das genetisch determinierte Selbstmordprogramm, als aktiver, energiekonsumierender, nicht reversibler Prozess, läuft über ganz bestimmte morphologisch erkennbare Stadien ab, die je nach Zelltyp variieren können. Zu den morphologischen Merkmalen zählen die Chromatinkondensation, die Kondensation und Fragmentation des Nukleus mit erhaltener Zellmembranintegrität, die Zellschrumpfung und die Ausbildung sogenannter Apoptosekörperchen (MAJNO und JORIS, 1995). Nach JESCHKE et al. (2001) tritt zu Beginn des Prozesses die Verringerung des Zellvolumens ein, gefolgt von Veränderungen in der Mitochondrienmembran. Gleichzeitig sind zu diesem Zeitpunkt Chromatinkondensation und Chromatinverlagerung zur Kernmembran (Margination) zu beobachten. In vielen Fällen folgt die Kernfragmentierung und die Ausbildung der apoptotischen Körperchen. Die Translokation von Phospholipiden aus der inneren zur äußeren Zytoplasmamembran stellt ein starkes Phagozytosesignal für Makrophagen dar und führt zum gezielten Abbau apoptotischer Zellen im Gewebeverband. Da die Zytoplasmamembranintegrität erhalten bleibt, geht der Prozess der Apoptose ohne Entzündungsreaktion einher; im Gegensatz zur Nekrose erfolgt die Membranschädigung, wenn überhaupt, erst sekundär. Ein zunächst apoptotischer Zelltod kann aber infolge ungenügender Energieverfügbarkeit in Nekrose übergehen (ENDRES et al., 1998). Hierbei scheinen die Stärke des Reizes und das Ausmaß

der Zellschädigung eine Rolle zu spielen (LENNON et al., 1991). PADOSCH et al. (2001) beschreiben die Möglichkeiten einer Reizantwort in Abhängigkeit von der Reizdauer, Reizintensität und dem intrazellulären ATP-Gehalt. So führt ein niedrigschwelliger Reiz bei hohem Energiepotential zum apoptotischen Zelltod, während einem hochschwelligem Reiz bei geringem ATP-Gehalt sich über das Stadium der primären Apoptose ein nekrotischer Zelltod anschließen kann. Ein sehr hoher Reizstimulus bei niedrigem Energieangebot hat einen primär nekrotischen Zelltod zur Folge. In Tab. 1 sind die typischen morphologischen Veränderungen des apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes in chronologischer Abfolge dargestellt.

Apoptose	Nekrose
Verlust der Oberflächenmikrovilli Verlust der Zelladhäsion, Abrundung der Zellen Ausbildung von zytoplasmatischen 'Blebs'	Anschwellen der Organellen, insbesondere der Mitochondrien
Zellschrumpfung Erhalt der Zytoplasmamembranintegrität	Anschwellen der gesamten Zelle und anschließende Ruptur, Verlust der Zytoplasmamembranintegrität, Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme
Chromatinkondensation, Chromatinmargination Kernkondensation, DNA-Fragmentierung, Kernfragmentierung	Heteromorphe Chromatinkondensation
Zellfragmentierung, Ausbildung von Apoptosekörperchen mit Chromatinanteilen und Zellorganellen	Kernpyknose, Karyolyse

Tab.1: Chronologische Abfolge der morphologischen Veränderungen des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes

Nekrotischer Zelltod als Konsequenz extremer Zellschädigung, unterliegt im Unterschied zur Apoptose nicht der transkriptionellen Kontrolle. Die Nekrose ist ein passiver, degenerativer Prozess, gekennzeichnet durch massive und irreversible Zellveränderungen. Charakterisiert ist die Nekrose durch den Verlust der Zytoplasmamembranintegrität, gefolgt von Enzymfreisetzung und unspezifischer DNA-Degradierung (WALKER et al., 1988). Durch die Schädigung der Zellmembran und den dadurch bedingten Verlust des osmotischen Gleichgewichts kommt es zu einem Anschwellen und zur Destruktion der Organellen bzw. der gesamten Zelle (WYLLIE, 1981; THOMPSON, 1998). Die daraus resultierenden Zellfragmente und freigesetzten zytoplasmatischen Enzyme (Proteasen, Lysozym) lösen im benachbarten Gewebeverband eine entzündliche Reaktion aus. Das Kernchromatin zeigt eine unregelmäßige Kondensierung, der Zellkern schrumpft (Kernpyknose) und wird aufgelöst (Karyolyse). Ein weiterer gravierender Unterschied zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod ergibt sich aus der intrazellulären Calcium-Konzentration, die bei der Nekrose schnell und fulminant ansteigt, während in apoptotischen Zellen nur ein moderater Ca^{2+} -Anstieg zu beobachten ist (McCONKEY et al., 1989). Trotz dieser definierten Unterschiede ist die Diskriminierung zwischen apoptoti-

schen und nekrotischen Prozessen in vielen Fällen schwierig. Apoptose und Nekrose stellen sich überlappende Phänomene dar, die einige Zelltod-induzierende Mechanismen bzw. Signal-'Pathways' gemeinsam zu nutzen scheinen.

3.2.1 Induktion und Exekution der Apoptose

Apoptose kann durch verschiedene Stimuli, wie z. B. Chemotherapeutika, Wachstumsfaktorentzug, UV- und ionisierende Strahlung oder durch die Vermittlung transmembranöser Proteine, den sogenannten Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (SARTORIUS et al., 2001), induziert werden. Daneben können auch beispielsweise freie Radikale und Hitzeschock den apoptotischen Zelltod auslösen (VAN ANTWERP et al., 1998). Weitere Apoptose-Induktoren stellen Störungen der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen (Cadherine, Integrine) und des Steroidhormonspiegels dar.

Vermittelt wird die Apoptose i. d. R. über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Die Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Aspartat-Proteasen und spalten eine Anzahl von Proteinen, die in normale Zellfunktionen involviert sind (NICHOLSON und THORNBERRY, 1997; HARPER et al., 2001). Strukturell sind bei allen Pro-Caspasen drei Bereiche zu unterscheiden, die N-terminale Pro-domäne mit variabler Länge sowie die große und kleine Untereinheit (p20 und p10 'subunits'). Die Prozessierung des inaktiven Zymogens in die aktive heterotetramere Form $(p20p10)_2$ erfordert die Spaltung des Moleküls nach Aspartat-Resten und kann über Autoaktivierung oder über die Spaltung durch andere Caspasen in einer hierarchischen Anordnung erfolgen. Die Proteolyse durch Caspasen ist spezifisch und limitiert, das Cystein im aktiven Zentrum der Enzyme spaltet Peptidverbindungen, die an ihrem N-Terminus ein Aspartat tragen (YANG et al., 1998).

Caspasen befinden sich konstitutiv exprimiert als inaktive 'Precursor'-Moleküle (Procaspasen, Caspasen-Zymogene) meist im Zytoplasma der Zelle (COHEN, 1997). Daneben ist auch die Lokalisierung im Mitochondrium (KRAJEWSKI et al., 1999; CHANDRA et al., 2004), im Nukleus (RAMUZ et al., 2003) sowie im endoplasmatischen Retikulum (NAKAGAWA et al., 2000), oft auch der aktivierten Enzyme, beschrieben worden.

Bei Säugern sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind. Die Caspasen werden im wesentlichen in Initiator-Caspasen (z. B. 2, 8, 9, 10) und Exekutions- oder Effektor-Caspasen (z. B. 3, 6, 7) unterschieden. Die Effektor-Caspasen sind 'downstream' von den Initiator-Caspasen lokalisiert und werden durch diese aktiviert (ALNEMRI, 1997; SALVESEN und DIXIT, 1997; NUEZ et al., 1998; THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998). Initiator-Caspasen werden über Autoaktivierung in ihre aktive Form übergeführt. Daneben sind auch Enzyme beschrieben, die die Proteolyse und Aktivierung der Pro-Caspasen auslösen können. So sind beispielsweise Granzyme B in der Lage Pro-Caspase-3 zu aktivieren (VAN DE CRAEN et al., 1997) und Cathepsin G aktive Caspase-7 zu generieren (ZHOU und SALVESEN, 1997).

Der Prozess der Caspasen-abhängigen Apoptose ist prinzipiell in drei Phasen einzuteilen: Die Induktionsphase, die von dem Apoptose-induzierenden Stimulus abhängig ist, die Effektorphase und die Exekutionsphase (KROEMER et al., 1995). Die ersten proteolytischen Ereignisse werden durch

die Initiator-Caspasen ausgelöst und führen in einem sehr frühen Stadium zur enzymatischen Auflösung des Zytoskeletts. Betroffen sind davon Strukturproteine wie Actin, Vimentin und Fodrin; daneben kommt es zur Phosphorylierung von Myosin. Die erfolgten Interaktionen bewirken schließlich das morphologisch erkennbare Membran-’blebbing’ (KAYALAR et al. 1996; JÄNICKE et al., 1998). Weiterhin wird in diesem Stadium die ATP-abhängige Aminophospholipid-Translocase („flippase“) gespalten und im Gegenzug die Scramblase („floppase“) aktiviert. Die nachfolgende Translokation von Phosphatidylserin ermöglicht durch dieses „eat-me“ Signal die Anlockung von phagozytierenden Zellen (MARTIN und PAGANO, 1987; HIRT et al., 2000; JÄÄTTELÄ und TSCHOPP, 2003).

Die Initiator-Caspasen aktivieren nachfolgend die Effektor- bzw. Exekutions-Caspasen, die für den Abbau verschiedener, für das Überleben der Zelle essentiellen Proteine und Enzyme verantwortlich sind: Zytoplasmatische Filamentproteine (Zytokeratine), nukleäre Hüllproteine (Lamine), Proteine, die in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind (PARP) und Enzyme, die während der DNA-Helix-Relaxation und der Mitose aktiv sind (Topoisomerase II α). Unter Einfluss der Exekutions-Caspasen werden weiterhin Endonukleasen (CAD, ’Caspase-activated deoxyribonuclease’ bzw. DFF, ’DNA-fragmentation factor’) aktiviert, die die DNA-Kondensation und Fragmentierung verursachen (CAULIN et al., 1997; KAWAHARA et al. 1998). Dabei entstehen durch Angriff der doppelsträngigen DNA zwischen den Nukleosom-Linker-Regionen oligonukleäre DNA-Fragmente zwischen 180 und 200bp und deren Vielfachen. Schließlich stirbt die Zelle durch nukleären und zellulären Kollaps, in der Regel unter Ausbildung apoptotischer Körperchen, und kann durch die angelockten Phagozyten ohne Entzündungsreaktion eliminiert werden.

Die Familie der Caspase-Inhibitoren, die IAPs (’inhibitors of apoptosis’), ist in der Lage die Effektor-Caspasen selektiv zu inhibieren und den apoptotischen Prozess zu blockieren. Daneben vermögen die IAPs auch Caspase-unabhängige Mechanismen, wie die Modulation von Transkriptionsfaktoren und die Kontrolle der Zellzyklus-Progression zu inhibieren (LaCASSE et al., 1998). Viele Caspasen-Inhibitoren entstammen einem viralen Proteinrepertoire und dienen der Verhinderung der Virus-Eliminierung über Apoptose durch die infizierte Wirtszelle. Als Beispiele seien die Caspase-8 spezifische Inhibitoren CrmA (’cowpox virus product cytokine response modifier A’) und FLIP (’FLICE inhibitory protein’) genannt (RAY et al., 1992; SCAFFIDI et al., 1999). Neben der viralen Variante (v-FLIP) existiert auch ein zelluläres c-FLIP Protein, das einen homologen Aufbau zur Caspase-8 aufweist und sich nur durch das Fehlen des katalytischen Zentrums von ihr unterscheidet. Durch die kompetitive Rekrutierung von c-FLIP kann Caspase-8-abhängige Apoptose inhibiert werden (SCAFFIDI et al., 1999).

3.2.2 Intrinsischer und extrinsischer ’Pathway’

Zwei Pathomechanismen zur Einleitung des apoptotischen Zelltodes sind beschrieben; der extrinsische Mechanismus ist an die Vermittlung externer Signale über membranständige Rezeptoren gebunden, während der intrinsische Weg ohne externe Signale auskommt (ASHKENAZI und DIXIT, 1998).

Die Aktivierung des intrinsischen 'Pathways' erfolgt u. a. durch toxische Substanzen, UV- oder γ -Strahlung, Mangel an Überlebensfaktoren oder DNA-Schädigung (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1993; LI et al., 1997). Die apoptotischen Signale konvergieren im Mitochondrium und lösen Ereignisse, wie die Freisetzung der pro-apoptotischen Intermembranspalt-Proteine Cytochrom c, AIF ('apoptosis-inducing factor'), Smac/ DIABLO, Caspase-2 und Caspase-9 (KROEMER et al., 1997; REED, 1997a; REED, 1998; GREEN und REED, 1998), Störungen des Elektronentransportes (SAWADA et al., 2004), Störungen der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Generierung (BERNARDI et al., 1998), Verlust des Transmembranpotentials und Veränderungen zellulärer Redox-Vorgänge (MARCHETTI et al., 1996) aus. Über die Freisetzung pro- bzw. anti-apoptotischer bcl-2-Familienmitglieder trägt das Mitochondrium zur Exekutionssteuerung des programmierten Zelltodes bei (SHIMIZU et al., 1999; SONG et al., 1999).

Die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol ist ein wichtiger Schritt für die Einleitung des apoptotischen Zelltodes; über die genauen Mechanismen wird jedoch weiterhin diskutiert (REED und GREEN, 2002). Cytochrom c, ein zentrales Protein der Atmungskette, das den Elektronentransfer zwischen der Cytochrom c Reduktase und der Cytochrom c Oxidase vermittelt, spielt eine Schlüsselfunktion für die Auslösung des intrinsischen Apoptose-'Pathways' (SEGAL und BEEM, 2001). Der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, die auch ohne Herabsetzung des Transmembranpotentials erfolgen kann (HAKEM et al., 1998; LUO et al., 1998), wirken die anti-apoptotischen Proteine der bcl-2-Familie entgegen (KLUCK et al., 1997; KROEMER, 2001; MARTINOU und GREEN, 2001), während bax und BH3-Proteine einen ausschließlich pro-apoptotischen Effekt aufweisen (TSUJIMOTO und SHIMIZU, 2000). Eine Vielzahl dieser pro-apoptotischen Homologa befindet sich in inaktiver Form im Zytoplasma; unter Einwirkung eines Stimulus bewirken sie die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium (GOTTLIEB, 2000). Zytosolisches Cytochrom c induziert in Gegenwart von ATP Konformationsänderungen im Adaptermolekül Apaf-1 ('apoptotic protease-activating factor'-1). Konvertiertes Apaf-1 bindet und dimerisiert nachfolgend Pro-Caspase-9, setzt deren Autoaktivierung in Gang und führt zur Bildung des Apoptosoms (LIU et al., 1996a; LI et al., 1997; SRINIVASULA et al., 1998; RATHMELL und THOMPSON, 1999). Die im Apoptosom proteolytisch aktivierte Caspase-9 setzt ihre aktiven Untereinheiten frei, die konsekutiv über die Aktivierung der Pro-Caspasen-3, 6 und 7 letztendlich die genannten Enzyme aktivieren, deren Wirkung zwingend zum Absterben der Zelle führen (NICHOLSON et al., 1995; GREEN und REED, 1998; HU et al., 1998b; PAN et al., 1998; STENNICKE et al. 1999; MARTINOU et al., 2000; JOZA et al., 2001).

Neben Cytochrom c können auch andere pro-apoptotische Komponenten durch das Öffnen der Poren der inneren Mitochondrienmembran ('permeability transition pores', PTP) aus dem Mitochondrium freigesetzt werden (BERNARDI et al., 1992). Durch die Freisetzung von AIF kann eine Caspase-unabhängige mitochondrienvermittelte Apoptose ausgelöst werden. Zytoplasmatisches AIF transloziert in den Nukleus und induziert apoptotische Merkmale, wie Chromatin-Kondensation und CAD-unabhängige Chromatin-Fragmentation in große 50kB Fragmente (LORENZO et al., 1999). Daneben

kann u. a. auch die Aktivierung von Caspase-12 über einen intrinsischen Mechanismus, der insbesondere durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) ausgelöst wird, zum apoptotischen Zelltod führen (NAKAGAWA et al., 2000). Neben der Stress-induzierten Aktivierung ist der 'intrinsic' Apoptose-'Pathway' auch notwendig und suffizient für eine p53-abhängige Aktivierung der Caspasen-Kaskade (SCHULER und GREEN, 2001).

Beim extrinsischen 'Pathway' ist die Apoptose-Induktion an die Bindung spezifischer Apoptose-auslösender Liganden mit membrangebundenen Todesrezeptoren gekoppelt (ASHKENAZI und DIXIT, 1998). Todesrezeptoren sind differentiell glykosylierte Oberflächenmoleküle mit charakteristischen Cystein-reichen Domänen und gehören der TNF-Rezeptor-Superfamilie an. Zu den sechs bekannten Todesrezeptoren zählen die TNF-R1, CD95 (APO-1, Fas), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 und DR6 Rezeptoren (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1998); sie werden durch ihre natürlichen Zelltod-Liganden, sämtlich Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie, aktiviert. Die extrazellulären Signale leiten die Aktivierung des membranständigen Todesrezeptors ein, der die ersten Schritte in der Caspasen-Kaskade auslöst (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998). Die Signaltransduktion des zytotoxischen Signals erfolgt über die intrazelluläre Todesdomäne ('death domain', DD) (TARTAGLIA und GOEDDEL, 1992). Von vielen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie ist bekannt, dass sie als Homotrimer vorliegen (ECK und SPRANG, 1989; BAZAN, 1993). Die homotrimeren Liganden binden an ihren entsprechenden Rezeptor und führen zu einer Oligomerisierung der intrazellulären Todesdomänen dreier Rezeptormoleküle (SMITH et al., 1994). Aber auch in Abwesenheit der Ligandenbindung ist schon eine Rezeptortrimerisierung durch Autoaggregation beschrieben worden (SIEGEL et al., 1998; 2000). Nach der Trimerisierung des Rezeptors lagert sich in der Regel das Adaptermolekül FADD ('Fas associated death domain') über seine intrazelluläre Todesdomäne an den DD-Komplex des Rezeptors an (BOLDIN et al., 1995; CHINNAIYAN et al., 1996a,b). FADD besitzt neben der DD ein zweites Interaktionsmodul, das als Todeseffektordomäne ('death effector domain', DED) bezeichnet wird. Über Interaktion der Todeseffektordomäne rekrutiert FADD die Initiator-Caspase-8 in den Rezeptorkomplex (MUZIO et al., 1998a; BOLDIN et al., 1996). Dieser Komplex aus trimerem Todesrezeptor, FADD und Pro-Caspase-8 wird als DISC ('death inducing signaling complex') bezeichnet (KISCHKEL et al., 1995). Im DISC wird die Pro-Caspase-8 proteolytisch prozessiert und ihre aktiven Spaltprodukte zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade freigesetzt (MUZIO et al., 1998a,b).

3.2.3 p53-Modulation der Apoptose

p53 ist ein wichtiges Apoptose-modulierendes Protein und das am häufigsten mutierte Protein in Tumorzellen (HOLLSTEIN et al., 1991; VOGELSTEIN und KINZLER, 1992). Zelltod, induziert durch den p53 'Pathway', wird durch die Caspase-Proteinasen exekutiert (SCHULER und GREEN, 2001). In Abhängigkeit von dem auslösenden Stimulus können Zellen einer p53-abhängigen oder p53-unabhängigen Apoptose unterliegen (WOOD und YOULE, 1995). In Antwort auf DNA-'Damage' und viele Stress-Stimuli wird p53 aktiviert (BURNS und EL-DEIRY, 1999). NELSON und KASTAN (1994) zeigten, dass DNA-Strangbrüche suffizient und möglicherweise notwendig sind für die Induk-

tion von p53 in Wildtyp-Zellen, die DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt sind. Die Akkumulation des Tumor-Suppressor-Proteins p53 im Nukleus gehört zu einem der frühesten Ereignisse der zellulären Stressantwort. Die Stabilität des p53 Proteins hängt primär von seinen Interaktionen mit verschiedenen Proto-Oncogenen und dem p53 Target-Gen Mdm2 ab. Durch Bindung von p53 an die Ubiquitin-Ligase Mdm2 auf Proteinebene ist die p53 Aktivität inhibiert (MOMAND et al., 1992; BARGONETTI und MANFREDI, 2002). Die Bindung von Mdm2 an p53 vermittelt dessen nukleären Export zur zytosolischen Degradierung über das Ubiquitin-Proteasom-System (HAUPT et al., 1997; CHANG, 2002). In vielen Zelltypen führen eine verstärkte p53 Expression oder die Störung der Negativ-Regulation durch Mdm2, auch ohne DNA-Schädigung, zur nukleären Akkumulation von p53 und lösen eine suffiziente apoptotische Antwort aus. Mögliche Auslöser der p53 Induktion ohne DNA-Schädigung sind beispielsweise Nährstoffmangel, Hitzeschock, Hypoxie oder auch physikalische Schädigungen (siehe Übersicht in EVAN und LITTLEWOOD, 1998). Die p53-abhängige Apoptose kann transkriptionell, durch die Transaktivierung pro-apoptotischer bzw. Repression anti-apoptotischer und 'Survival' Targetgene (SHARPLESS und DePINHO, 2002), oder post-transkriptionell durch Einwirkung des p53 Proteins selbst (CAELLES et al., 1994; HAUPT et al. 1996; SCHULER et al., 2000) induziert werden. Aktivität und Expressionsstärke des p53 Proteins sind in erster Linie auf post-transkriptionellem Niveau reguliert (KASTAN et al., 1992). Die Regulierung der p53 DNA-Bindungsaktivität erfolgt über verschiedene post-translationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung und Acetylierung (HUPP et al., 1993). In Antwort auf Stress phosphoryliert beispielsweise die 'c-Jun N-terminal kinase' (JNK) p53 und stabilisiert bzw. steigert dessen transkriptionelle Aktivität (BUSCHMANN et al., 2001).

Das Phospho-Protein p53 ist vornehmlich zytoplasmatisch lokalisiert. Unter physiologischen Bedingungen sind sowohl das zytosolische als auch das nukleäre Expressionslevel sehr niedrig bzw. kaum nachweisbar und p53 interferiert nicht mit Zellzyklusprogression und Zell-'Survival' (OREN, 1999). Nach Aktivierung transloziert p53 zur Aktivierung seiner Targetgene in den Zellkern. Auch eine mitochondriale Lokalisation von p53 nach exogenen Stress-Stimuli sowie Komplexe mit Chaperon-'Heatshock'-Proteinen (HSP) an der äußeren Mitochondrienmembran wurden beschrieben. Kurz nach der mitochondrialen p53 Akkumulation kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c, AIF und anderer pro-apoptotischer Proteine (siehe Übersicht in CHANG, 2002).

p53 kann über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (KOVAR et al., 2000; WU und DING, 2002) und bax bzw. anderer pro-apoptotischer Target-Gene (MIYASHITA und REED, 1995; REGULA und KIRSHENBAUM, 2001; BORRIELLO et al., 2002) sowie über Repression von bcl-2 (MIYASHITA und REED, 1995) Apoptose induzieren. Auch beeinflusst p53 über transkriptionelle und transkriptionsunabhängige Mechanismen die Expression und Aktivität von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie (OWEN-SCHAUB et al., 1995; WU et al., 1997; BENNETT et al., 1998) und kann über die Induktion von PIGs ('p53-induced genes'), sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (POLYAK et al., 1997) bzw. durch die Translokation seiner aktivierten Form aus dem Kern

zum Mitochondrium (MARCHENKO et al., 2000; CHANG, 2002) apoptotische Prozesse unterstützen. Daneben beschrieben POLYAK et al. (1997) die Caspase-3 als direktes Target-Gen des Tumor-Suppressor-Proteins, wohingegen die Caspase-8 ein direkter transkriptionsunabhängiger 'downstream' Effektor von p53 zu sein scheint (DING et al., 2000b). Eine weitere direkte Caspasen-Aktivierung durch p53 wird durch die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium, wie z. B. Cytochrom c und Smac/DIABLO vermittelt. Die Freisetzung mitochondrialer Apoptose-Faktoren wird durch das Zusammenspiel pro- und anti-apoptotischer bcl-2 Familien-Mitglieder reguliert, die teilweise unter der transkriptionellen Kontrolle von p53 stehen (SCHULER und GREEN, 2001). Auch in TNF- α -induzierte Apoptose ist p53 involviert und TNF- α führt in verschiedenen Zelltypen zur p53-Akkumulierung (GOTLIEB et al., 1994; DONATO und PEREZ, 1998; ROKHLIN et al., 2000).

3.3 TNF- α -induzierte Apoptose

TNF- α gehört zur Familie der Zytokine und ist entscheidend an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Wie bei allen Zytokinen ist auch für TNF- α das Auslösen einer zellulären Antwort an das Vorhandensein eines spezifischen Zellmembranrezeptors gebunden. Die Signal-'Pathways' von TNF- α werden über zwei unterschiedliche Rezeptoren, den TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptor, vermittelt. Nach Aktivierung des Rezeptors wird innerhalb der Zelle eine Kaskade von Reaktionen, darunter die Induktion von Apoptose, eingeleitet. Neben der Aktivierung der Caspasen-Kaskade induziert TNF- α über die Aktivierung von Sphingomyelinasen die Produktion von Ceramiden, die über einen mitochondrialen, Rezeptor-unabhängigen 'Pathway' zum apoptotischen Zelltod führen können (VON HAEFEN et al., 2002). In vielen Zelltypen löst TNF- α nicht nur eine apoptotische Antwort aus, sondern induziert auch simultan die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der über die Expression anti-apoptotischer Gene der Prozessierung des Zelltodes entgegenwirkt (SMIRNOV et al., 2001).

3.3.1 TNF- α

Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), ursprünglich beschrieben als Serum-Faktor, der nach bakteriellen Infekten gebildet wird, verdankt seinen Namen der Fähigkeit, bei Mäusen bestimmte Tumoren zu nekrotisieren (CARSWELL et al., 1975). TNF- α gehört zur Klasse der pro-inflammatorischen Zytokine, die nach Stimulation durch infektiöse Erreger vor allem in mononukleären Phagozyten gebildet werden.

Unter physiologischen Bedingungen wird TNF- α von Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert. Da zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten wenig bzw. kein TNF- α produzieren, stammt der von Lymphozyten generierte TNF- α hauptsächlich von CD4⁺ T-Helfer-Zellen. Neben diesen immunkompetenten Zellen können auch Endothelzellen, Astrozyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten TNF- α produzieren (URBAN et al., 1986; FELDMANN et al., 1996). Außer TNF- α , der

hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird, existiert ein weiteres TNF-Zytokin, TNF- β , das in erster Linie von mitogen-stimulierten Lymphozyten ausgeschieden wird und auch als Lymphotoxin bezeichnet wird (AGGARWAL et al., 1984; 1987). TNF- α weist eine extensive genetische Homologie zu Lymphotoxin auf und ist auch mit dem Lipoprotein-Lipase-hemmenden Cachetin identisch (BEUTLER et al., 1985).

TNF- α existiert als membrangebundene und lösliche Form und kann sowohl parakrin als auch systemisch wirken (Grell et al., 1996). Der 17kD schwere monomere TNF- α wird als TypII-transmembranes Protein mit intrazellulärem N- und extrazellulärem C-Terminus synthetisiert. Die Proteolyse der transmembranen Form führt zu löslichem TNF- α -Ligand, der andere biologische Aktivität aufweist, als die membrangebundene Vorläuferform (GERSPACH et al., 2000). Sowohl löslicher und membrangebundener TNF- α liegen als Homotrimere vor und können beide den TNF-R1 und den TNF-R2 Rezeptor binden (TANG et al., 1996).

Durch die Aktivierung unterschiedlicher immunmodulatorischer Gene ist TNF- α an der zellulären Antwort auf Zellschaden, Entzündungen, nekrotischen bzw. apoptotischen Zelltod sowie Wachstum und 'Survival' beteiligt (FIERS et al., 1995; MAY und GHOSH, 1998; DARNAY und AGGARWAL, 1999). Die Antwort auf TNF- α ist nicht uniform und abhängig vom Zelltyp, vom Status der zellulären Aktivierung und der lokalen Konzentration des Zytokins. So kann TNF- α beispielsweise unter bestimmten Bedingungen Zell-'Survival' und pro-inflammatorische Genexpression bewirken, während in Gegenwart von Transkriptionsfaktor-Inhibitoren im gleichen System Apoptose und Zelltod ausgelöst wird. Diese Kontext-Abhängigkeit der TNF- α -Wirkung ist sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Systeme beschrieben (LEWIS et al., 1987; RATH und AGGARWAL, 1999; HENRIKSEN und NEWBY, 2003). TNF- α führt zur Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (BRUCCOLLERI et al., 1997; DIEHL et al., 1994; DIEHL und RAI, 1996), wie z. B. STAT-3, c-jun, c-fos, AP-1 ('activating protein'-1) und NF κ B ('nuclear factor' κ B). Schon allein über die Aktivierung von NF κ B, der für die Regulierung einer Reihe von Genen verantwortlich ist (MAY und GHOSH, 1998), zeigt TNF- α ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten.

In vitro verursacht TNF- α die Zytolyse oder Zytostase vieler Tumorzelllinien. Über direkte chemotaktische Eigenschaften gibt es unterschiedliche Meinungen, jedoch gilt die stimulierende Wirkung auf die Migration neutrophiler Granulozyten als gesichert. In Makrophagen stimuliert TNF- α die Phagozytosefähigkeit und die Synthese von Superoxid-Dismutase, sowie die Expression der HLA-Antigene der Klasse 1 und 2. Differenzierungsantigene auf den Zellmembranen aller Leukozyten werden durch TNF- α -Einwirkung verstärkt ausgebildet. Ebenfalls stimulierend wirkt TNF- α auf die Produktion von Interleukin 1 (IL-1), koloniestimulierender-Faktoren, γ -Interferon (γ -IFN) sowie auf den Arachidonsäurestoffwechsel und die Biosynthese von Kollagen in Endothel- und Synovialzellen (NACY et al., 1991; BONAVIDA, 1991; BROUCKAERT et al., 1993).

Obwohl TNF- α für die normale Immunantwort notwendig ist, führt eine Überexpression zu pathogenen Effekten. So ist TNF- α Hauptmediator für die bei Tumor- und AIDS-Patienten beobachteten Kachexie und mitverantwortlich für die Toxizität bei gramnegativer Sepsis.

Daneben kann TNF- α auch zur Behandlung verschiedener Krankheitsbilder eingesetzt werden. Zahlreiche Studien weisen einen direkten zytostatischen und zytotoxischen Effekt auf Lymphknotenmetastasen von Mäusen, sowie zahlreiche immunmodulatorische Effekte auf verschiedenste Immuneffektorzellen, einschließlich neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten nach (BEUTLER, 1999). Versuche zur klinischen Anwendung in der Behandlung von Tumoren zeigen die bislang besten Therapieergebnisse in der kombinierten Applikation von TNF- α und zytotoxischen oder immunmodulatorischen Faktoren, speziell γ -INF und möglicherweise IL-2 (GNANT et al., 2000). Vielversprechend erscheint die Anwendung von TNF- α -Inhibitoren bei rheumatoider Arthritis sowie bei entzündlichen Darmerkrankungen (DINARELLO, 2000). Ein Fall von schwerem therapieresistenten Morbus Chron wurde beispielsweise mit monoklonalen Antikörpern gegen TNF- α behandelt und führte zu einer Vollremission für einen Zeitraum von drei Monaten (DERKX et al., 1993).

Unter den 17 Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie ist TNF- α wahrscheinlich der potenteste Apoptose-Induktor. Die TNF- α -induzierte Apoptose wird vornehmlich über die Aktivierung des TNF-R1-Rezeptors prozessiert. Die Aktivierung von NF κ B-abhängigen Genen reguliert das 'Survival' und die Proliferation, während die Aktivierung von Caspasen den apoptotischen Zelltod induziert (RATH und AGGARWAL, 1999). Daneben spielen auch rezeptorunabhängige Mechanismen, wie die Vermittlung über reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Ceramide, Phospholipasen und Serin-Proteasen eine Rolle bei der Induktion TNF- α -abhängiger Apoptose (RATH und AGGARWAL, 1999).

3.3.2 TNF-Rezeptoren TNF-R1/TNF-R2

Die Wirkung von TNF- α wird vorrangig durch seine zwei Transmembran-Rezeptoren TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75) vermittelt (TARTAGLIA und GOEDDEL, 1992; VANDENABEELE et al., 1995a und 1995b; DARNAY et al., 1999; LOCKSLEY et al., 2001). Je nach Gewebetyp und zellulärem Signalkontext leiten die beiden Rezeptoren unterschiedliche Signale weiter (LIU et al., 1996b).

Der TNF-R1 Rezeptor gehört zur Gruppe der Todesrezeptoren, die durch die intrazelluläre 'death domain' charakterisiert sind, welche für die apoptotische Signal-Transduktion entscheidend ist (YUAN, 1997; SARTORIUS et al., 2001). Die Bindung von trimerem TNF- α an den Rezeptor induziert dessen Trimerisierung und die Aktivierung einiger Signalproteine im zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors (WALLACH et al., 1997). Da die TNF-Rezeptoren keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften besitzen, benötigen sie zytoplasmatische Adaptermoleküle, um ihre Funktionen zu vermitteln. Die Adaptermoleküle, die an die intrazelluläre Todesdomäne des TNF-R1 Rezeptors binden, sind in der Lage, Apoptose zu induzieren oder aber auch 'Signal-Pathways' zur Induktion von Zellproliferation, anti-apoptotischer Mechanismen bzw. inflammatorischer 'Response' zu prozessieren. Das erste im TNF-R1-'Pathway' angelagerte Protein ist TRADD ('TNF-R1-associated death do-

main protein'), das als Plattform für die Mediatoren TRAF2 ('TNF-receptor associated factor 2'), RIP ('receptor-interacting protein') und FADD ('Fas-associated death domain protein') fungiert (TAKEUCHI et al., 1996). TNF-R1 aktiviert über TRAF2 und RIP die Transkriptionsfaktoren NF κ B und JNK ('jun N-terminus kinase' und initiiert über Rekrutierung von FADD und TRADD die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (HSU et al., 1996; KAYE et al., 1996; WALLACH et al., 1997; BAUD und KARIN, 2001). Die Rekrutierung von TRAF2 und RIP führt über NF κ B-Aktivierung zur Induktion von 'Survival' und Proliferationssignalen (KAYE et al., 1996). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei TNF-R1-Rezeptor-vermittelter Apoptose weder FADD noch Caspase-8 in den Rezeptor-Komplex rekrutiert werden und die Aktivierung der Caspase-8 nicht im DISC stattfindet. Es wird vermutet, dass der Rezeptor nach erfolgter Ligandenbindung internalisiert, das gebundene TRADD abdissoziiert und die Caspase-8 Aktivierung über die Interaktion mit TRADD/FADD rezeptorunabhängig stattfindet (HARPER et al., 2003).

Der TNF-R1 Rezeptor ist konstitutiv, mit Ausnahme von Erythrozyten, nahezu in fast allen Zellen bzw. Geweben exprimiert und repräsentiert den Hauptmediator der zellulären TNF-Antwort (GERSPACH et al., 2000). Die zumindest geringfügige TNF- α -Responsibilität der meisten Zelltypen trägt mit zur Erklärung des breiten Wirkungsspektrums des Zytokins bei (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1998). Der TNF-R2 Rezeptor weist hingegen eine mehr restringierte Expression auf und zählt aufgrund der fehlenden 'death domain' zu den Nicht-Todesrezeptoren bzw. TRAF-bindenden Rezeptoren (LOCKSLEY et al., 2001).

Der TNF-R2 Rezeptor wird als 'Survival'-Rezeptor angesprochen, da durch die Rekrutierung von Mitgliedern der TRAF Familie und anderer Adaptermoleküle die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und JNK, die ihrerseits die Transkription von AP-1 vermitteln, erfolgen kann. Durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kann die Expression von Zellwachstumsgenen (ARCH et al., 1998) und die Expression anti-apoptotischer Proteine, die die Zelle resistent für TNF-R1-Stimulierung macht (ASHKENAZI und DIXIT, 1998), induziert werden. Aber auch der TNF-R2-Rezeptor, der nur durch membrangebundenes TNF- α voll aktiviert wird, kann Apoptose induzieren (HARIDAS et al., 1998), indem er über NF κ B-abhängige endogene TNF- α -Produktion die TNF- α -Antwort in Kooperation mit dem TNF-R1-Rezeptor moduliert (GRELL et al., 1995).

3.3.3 Transkriptionsfaktor NF κ B

NF κ B ist ein Sammelbegriff für dimere Transkriptionsfaktoren, die den DNA-bindenden Proteinen der Rel-Familie angehören und alle ein gemeinsames Sequenzmotiv erkennen (KARIN und BEN NERIAH, 2000). Bei Säugern sind bislang 5 Rel Proteine identifiziert (GHOSH et al., 1998): NF κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Erstmals beschrieben wurde NF κ B von SEN und BALTIMORE (1986a,b) als nukleärer Faktor in B-Zellen, der an den 'Enhancer' der leichten κ -Kette des Immunglobulins bindet. In seiner DNA-bindenden Form bildet NF κ B Hetero-Dimere, deren Monomere der NF κ B/Rel-Familie entstammen

(SCHMITZ et al., 2001). Der erste beschriebene NF κ B-Komplex war ein Hetero-Dimer der p50 und p65 Proteine (GRILLI et al., 1993).

Die Familie der NF κ B Transkriptionsfaktoren spielt eine entscheidende Rolle für das Immunsystem (WALLACH et al., 1999; 2002). Mehr als 60 separate pro-inflammatorische Gene, die an der Kontrolle der Zelladhäsion, der Apoptose, des Redox-Metabolismus und der Produktion von Mediatoren beteiligt sind, werden über NF κ B reguliert (BAEUERLE, 1998). Mit TNF- α , Interleukin 1, ICAM-1, induzierbare NO-Synthase (iNOS) und Interleukin 6 seien nur einige der wichtigsten NF κ B-Target-Gene genannt.

In den meisten Zellen ist NF κ B, in inaktiver Form an inhibitorische Proteine der I κ B Familie gebunden, zytoplasmatisch lokalisiert (THANOS und MANIATIS, 1995; VERMA et al., 1995; BAEUERLE und BALTIMORE, 1996). Diese inaktiven Komplexe können über TNF/Fas-Rezeptoren aktiviert werden. Die Aktivierung von NF κ B über den TNF- α -induzierten 'Pathway' erfolgt über die Rekrutierung von TRAF1, TRAF2 und RIP an TNF-R1 gebundenes TRADD (CARPENTIER et al., 1998; WALLACH et al., 2002). Die Rezeptor-initiierten Signale führen zunächst zur Aktivierung von I κ B-Kinase (IKK), die über Phosphorylierung des NF κ B-Inhibitors I κ B dessen Ubiquitinierung und proteolytische Degradierung bewirkt (REGNIER et al., 1997). Nach Translokation des Rel/NF κ B Heterodimers in den Kern, nimmt NF κ B die transkriptionelle Aktivierung seiner anti-apoptotischen Target-Gene TRAF1, TRAF2, cIAP-1, cIAP-2, A20 und bcl-2 auf (BALDWIN, 1996; VERMA und STEVENSON, 1997; CARPENTIER et al., 1998; SIMEONIDIS et al., 1999; CARPENTIER und BEYAERT 1999; BEYAERT et al., 2000; WALLACH et al., 2002).

Physiologisch ungünstige Einflüsse setzen die Zelle unter Stress. Stress induziert zelluläre Gegenmaßnahmen und führt bei erfolgloser Stressantwort zum Zelltod. Zellstress kann durch extrazelluläre Stimuli, wie zytotoxische Substanzen, UV-Strahlung, genotoxische Agenzien, ungünstige Temperatureinwirkung, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hypoxie sowie durch endogene Stressoren, wie die Störung der mitochondrialen Elektronentransportkette, Ungleichgewichte der pH-, Elektrolyt- und Osmolyt-Homöostase, Zytokineinwirkung oder DNA-Schaden induziert sein.

Die Stressoren bewirken Denaturierungs-, Fehlfaltungs- und Aggregationsprozesse von Proteinen, Schädigungen der nukleären bzw. mitochondrialen DNA und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die die Zelle zusätzlich oxidativem Stress aussetzen. Die primären auf Stress reagierenden Zellkompartimente sind der Zellkern, das Mitochondrium und das endoplasmatische Retikulum (ER). Neben der essentiellen Funktion für die Lipidsynthese und der Ca²⁺-Speicherung, ist das ER für die korrekte Faltung und Reifung neusynthetisierter membrangebundener und sekretorischer Proteine verantwortlich (SZEGEZDI et al., 2003; SHEN et al., 2004).

Eine unter Stress gesetzte Zelle reagiert durch Induktion von Stressmediatoren bzw. physiologischer Instrumente der Stressantwort, mit Gegenmaßnahmen, der sogenannten zellulären Stressantwort. Dazu gehören u. a. die 'unfolded protein response' (UPR) des ER, die die transkriptionelle

Expression von ER-Chaperonen und 'folding' Enzymen koordiniert, die 'ER-associated degradation' (ERAD) zur Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen, die Induktion bzw. Aktivierung von Enzymen und Schutzproteinen, die Arretierung des Zellzyklus, die Einleitung von DNA-Reparatur-Mechanismen und die Induktion der Genexpression. Neben Enzymen und Transkriptionsfaktoren sind auch nukleäre Phosphoproteine, 'second messenger' (Elektrolyte, ROS, NO-Metabolite) und O₂-Sensoren in die Modulation der Stressantwort involviert. (ALBERTS et al., 1990; HERRLICH und RAHMSDORF, 1994; SHEN et al., 2004; MA und HENDERSHOT, 2004; KADOWAKI et al., 2004).

Ein bei fast allen Zellen aufzufindender Mechanismus ist die sogenannte Hitzeschock-Reaktion. Als Antwort auf Stress reagieren die meisten Zellen mit der Expression genetisch hochkonservierter 'Heatshock' Proteine, wie z. B. HO-1 und HSP70. HO-1, auch als 'Heatshock' Protein 32 (HSP32) benannt, ist die induzierbare Isoform der Häm-Oxygenase-1, die unter physiologischen Bedingungen zusammen mit der konstitutiven Isoform HO-2 den ersten und reaktionsgeschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Häm-Degradierung katalysiert. HO-1 wird unter Stressbedingungen hochreguliert, wirkt anti-oxidativ und schützt die Zelle bei Bildung von ROS vor oxidativem Stress (TAKETANI et al, 1989). Das induzierbare 'Major Heatshock' Protein HSP70 wirkt als molekulares Chaperon, um Proteinfehlfaltungen und DNA-Schäden zu verhindern, und ist daher bei Induktion von zellulärem Stress während der frühen Synthesephase des Zellzyklus hochreguliert (SCHLESINGER, 1990). Die Stress-induzierte Synthese von HSP70 ist transkriptionell über die Aktivierung von 'Heatshock' Transkriptionsfaktoren (HSF) reguliert. Als potenter Apoptose-Inhibitor bindet HSP70 verschiedene Komponenten des mitochondrialen 'Pathways' und schützt die Zelle vor oxidativem Stress und apoptotischem Zellschaden (GARRIDO et al., 2001).

Neben den 'Heatshock'-Proteinen existieren weitere durch Stress-induzierbare Proteine. HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) ist ein Schlüsselregulator für die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. Der heterodimere Transkriptionsfaktor beinhaltet die induzierbare HIF-1 α Untereinheit und die konstitutiv exprimierte HIF-1 β Untereinheit. Obwohl HIF-1 hauptsächlich durch den vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck über die Sauerstoff-abhängige Degradierung seiner α Untereinheit reguliert ist, unterliegt HIF-1 daneben einer Modulation durch Zytokine, Hormone und genetische Veränderungen, so dass HIF-1 α auch unter normoxischen Bedingungen induzierbar ist (STROKA et al., 2001). Unter hypoxischen Bedingungen reguliert HIF-1 α die Transkription vieler Genprodukte, die die Sauerstoff-homöostase verbessern und in die Angiogenese, die Erythropoese, die Glykolyse und den Eisenmetabolismus involviert sind. Über Interaktion mit p53 und ROS ist HIF-1 α darüber hinaus an apoptotischen Prozessen beteiligt (BRÜNE et al., 2001; SWINSON et al., 2004). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) katalysiert die Generierung von NO aus L-Arginin und wird unter Einfluss von Zytokinen exprimiert (FEINSTEIN et al., 1994). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges physiologisches Messenger- und Effektor-Molekül in vielen biologischen Systemen. Neben iNOS sind die konstitutiven Isoformen nNOS und eNOS für die Produktion von Stickstoffmonoxid verantwortlich. NO-

kann durch Nitrosylierung von Thiolgruppen die Funktion von Proteinen modifizieren und ist an der Regulierung von Apoptose mitbeteiligt (MANNICK et al., 1997).

Der Redox-Status spielt eine wichtige Rolle für das 'Survival' der Zelle und oxidativer Stress stellt eine potentielle Bedrohung für die meisten Pro- und Eukaryonten dar. Die Vermittlung des oxidativen Stresses erfolgt über reaktive Sauerstoffspezies, die der chemischen Stoffgruppe der freien Radikale angehören. Freie Radikale sind charakterisiert durch ungepaarte Elektronen, die für den äußerst reaktiven Charakter dieser Moleküle verantwortlich sind. Zu den ROS gehören verschiedene oxidative Spezies, wie z. B. das Superoxid-Anion (O_2^-), das weitere ROS generiert, wie beispielsweise das relativ langlebige Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singlet-Sauerstoff ($O_2(^1\Delta G)$) sowie das sehr kurzlebige und hochreaktive Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot). In Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO^\cdot), das selbst aufgrund seines freien Elektrons schon als Radikal wirkt, kann das sehr reaktive Peroxynitrit ($ONOO^-$) entstehen.

ROS werden nach Stress-Stimulierung induziert und sind an der Induktion und Verstärkung von apoptotischen Prozessen beteiligt. Der primäre Bildungsort der ROS ist die mitochondriale Atmungskette, in der bei der Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors O_2 zu H_2O freie Radikale generiert werden können. ROS werden demnach ständig über Elektronentransfer-Reaktionen gebildet und auch unter physiologischen Bedingungen findet eine homöostatische Basis-ROS-Produktion statt, die sich auf 1-2% des totalen O_2 -Verbrauchs beläuft (BOVERIS und CHANCE, 1973).

Aufgrund ihrer Reaktivität führen ROS zu einer oxidativen Modifikation zellulärer Bestandteile wie Proteine, Nucleinsäuren, und Lipide. In der Folge kann es zu Störungen der zellulären Funktion durch Proteolyse oder Akkumulierung von Proteinen, Mutationen nukleärer und mitochondrialer DNA und Schädigungen der zellulären Membranen kommen (FREEMAN und CRAPO, 1982; KROEMER et al., 1995). Sauerstoffradikale reagieren beispielsweise mit Strukturen des Chromatins, zum einen mit DNA direkt, was zur Oxidation von Nucleobasen und DNA-Strangbrüchen führt, zum anderen mit den die DNA zu Nucleosomen organisierenden Histonen, die die DNA vor oxidativen Schäden schützen (FREEMAN und CRAPO, 1982). Auch die mitochondriale DNA kann unter Einwirkung oxidativen Stresses Mutationen unterliegen, die wiederum durch Störung der oxidativen Phosphorylierung in einer vermehrten ROS-Generierung resultieren. Daneben beeinflussen ROS die Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken, die für die Konformation der sekundären bzw. tertiären Proteinstruktur und somit für die Reifung und Stabilisierung der Proteine verantwortlich sind. Bei Eukaryonten werden Disulfidbrücken im leicht oxidativen Milieu des ER eingeführt und die korrekte Paarung der Cystein-Reste erfordert oft die Katalyse von redox-aktiven Enzymen (ELLGAARD, 2004).

Neben dieser ungerichteten Schädigung zellulärer Funktionen führen ROS auch zur Aktivierung spezifischer Signalwege und Modulation der Genexpression. Die genetische Stressantwort wird beispielsweise induziert, wenn ein Zell- bzw. DNA-schädigendes Agent auf intakte proliferierende Zellen trifft (HERRLICH und RAHMSDORF, 1994). Auf nukleärer Ebene führt zellulärer Stress zu Anpassungsvorgängen, die neben der spezifischen Genaktivierung durch eine vermehrte Replikation charak-

terisiert sind (HERRLICH et al., 1992, HERRLICH und RAHMSDORF, 1994). Die Aktivierung der spezifischen Signalkaskaden und das Ausmaß der Schädigung zellulärer Makromoleküle regulieren im Folgenden die Stressantwort.

Unter physiologischen Bedingungen werden ROS in der reduzierenden Umgebung der Mitochondrien neutralisiert. Zum Schutz vor der toxischen Wirkung der ROS hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes enzymatisches und nicht-enzymatisches anti-oxidatives System entwickelt. Haupt-Redox-Puffer der Zelle ist reduziertes Glutathion (GSH) und es wurde gezeigt, dass die Inhibition von GSH zu einer dramatischen ROS-Akkumulierung führt (ZIMMERMAN et al., 1989; GOOSSENS et al., 1995). Neben den mitochondrialen Glutathion-Peroxidasen und Glutathion-Reduktasen, denen GSH als Co-Enzym dient, wird dem mitochondrialen Matrixprotein Mn-Superoxid-Dismutase (MnSOD) eine entscheidende Schutzwirkung zugesprochen (JONES et al., 1997). Auch im Nukleus findet sich ein ATP-abhängiges GSH Sequestrationssystem, das den Redoxstatus von SH-Proteinen und die strukturelle Organisation des Chromatins moduliert (VAIRETTI et al., 2001).

ROS induzieren zum einen zelluläre Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress, können aber auch apoptotischen Zelltod auslösen. Wenn der zelluläre Stress nicht durch die initiierten Stressantworten abgeschwächt werden kann, führt die Induktion des intrinsischen 'Pathways' zu endogen induzierter Apoptose. Dabei können ROS die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium mit nachfolgender Aktivierung der Caspasen-Kaskade verursachen (HIGUCHI et al., 1997; 1998) und sie gelten auch als Schlüsselmediatoren der kälteinduzierten Apoptose (RAUEN et al., 1999; 2000).

3.5 Proliferation

Wie die Apoptose ist auch die Proliferation und der Zellzyklus eukaryonter Zellen ein phylogenetisch hoch konservierter Mechanismus. Obwohl beide Prozesse sich entgegenwirken, gibt es auf morphologischer und molekularer Ebene Indizien zugrundeliegender Verbindungen und es wird vermutet, dass eine erfolgreiche Proliferation die aktive Unterdrückung des apoptotischen Programms erfordert und beide Prozesse über Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert sind (EVAN et al., 1995; EVAN und LITTLEWOOD, 1998; YU et al., 2000; BAISCH, 2001). Umgekehrt gibt es Anhalt dafür, dass apoptotischer Zelltod aus dem Zusammenbruch der Zellzyklus-Maschinerie resultiert (MURRAY, 1993).

Die Zellproliferation ist einer der fundamentalsten biologischen Prozesse. Durch mitotische Zellteilungen entstehen aus der befruchteten Oozyte die Gewebe eines Organismus, welche sich wiederum mittels Mitosen regenerieren. Zellteilung erfolgt im embryonalen, fetalen, neonatalen, juvenilen und maturen Stadium. Im adulten Lebewesen sind die Gewebezellen in ihrem weiteren Proliferationsverhalten unterschiedlich determiniert (IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996). Moduliert wird die Proliferation durch das Zusammenspiel der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparaturmechanismen und interferierender apoptotischer Prozesse.

3.5.1 Zellzyklusprogression

Die mitotische Zellteilung verläuft über eine zyklische Abfolge verschiedener Phasen: Die G1-Phase ('gap'), die die eigentliche Wachstumsphase der Zelle darstellt, die S-Phase, in der die DNA-Synthese bis zur vollständigen Replikation des doppelten Chromosomensatzes stattfindet, die G2-Phase, die zwischen DNA-Synthese und Zellteilung liegt und zur DNA-Reparatur genutzt wird sowie die M-Phase, in der die mitotische Kernteilung und die abschließende Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen mittels Zytokinese erfolgt. Die Interphase, die im Normalfall mindestens 90% des Zellzyklus ausmacht, besteht aus den aufeinanderfolgenden Phasen G1, S und G2 und steht der Mitose-Phase, in der die eigentliche Zellteilung stattfindet und die sich über morphologische Merkmale in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase sowie Zytokinese-Phase differenzieren lässt, gegenüber. Nach erfolgter M-Phase beginnt für die Tochterzellen die Interphase des neuen Zellzyklus (ALBERTS et al., 1990).

Die Gesamtdauer des Zellzyklus ist zellspezifisch und variiert in Abhängigkeit vom Proliferationsgrad zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen. Die große zeitliche Variation ergibt sich in erster Linie aus der variablen Dauer der G1-Phase (ALISON, 1995), die z. B. in exponentiell wachsenden Geweben sehr verkürzt ist und die zudem durch den Übergang in die G0-Phase, in der die Zelle nicht proliferiert, verlängert werden kann. Die übrigen Zellzyklusphasen sind in ihrer Dauer weniger variabel. Die S-Phase dauert i. d. R. 6 bis 8 Stunden, die G2-Phase 1 bis 4 Stunden und die Mitose-Phase 1 bis 2 Stunden (ALISON, 1995). In der frühen G1-Phase findet, neben RNA-Synthese, Proteinbiosynthese und Aufbau des Zytoskeletts, die Generierung von Cyclinen und DNA-Polymerasen statt, die die Zellzyklusprogression steuern (PARDEE, 1989).

Der Zellzyklus weist komplexe regulative Mechanismen über Kontrollpunkte ('Checkpoints') auf, die durch Interaktionen zwischen Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen ('Cyclin-dependent Kinases', CDK's) und dem Phosphorylierungsgrad des Retinoblastoma-Proteins (Rb) koordiniert werden (MALUMBRES et al., 2000). Die Zellzyklusprogression ist abhängig von einem biochemischen Prozess, in dem die Cycline aufeinanderfolgend verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen binden und aktivieren. Die aktivierten Cyclin-CDK-Komplexe regulieren die Aktivität ihrer Target-Moleküle durch Phosphorylierungsreaktionen (BORRIELLO et al., 2002). Der Eintritt in den Zellzyklus und die Progression in der G1-Phase wird durch die Expression von D-Typ-Cyclinen gesteuert. Cyclin E wird erst in der späten G1-Phase akkumuliert und seine Expression gipfelt beim Übergang in die Synthesephase, um im weiteren Verlauf wieder abzusinken (REED, 1997b). Die Zellzyklusprogression ist weiterhin abhängig von MPF ('mitosis-promoting factor'), einem Komplex aus Cyclin B und Cdc2 Kinase (p34 cdk1), dessen Aktivierung chronologisch über die vier Zellzyklus-Phasen verläuft. MPF phosphoryliert verschiedene Substrate einschließlich Lamine, Histone und MAP's, die die Spindelbildung, den Abbau der Kernmembran und die Chromosomenkondensation induzieren (ERENPREISSA und CRAGG, 2001).

Die geordnete Progression des Zellzyklus durch die sequentielle Aktivierung der CDK's gewährleistet die Passage der Restriktionspunkte (PARDEE, 1989; MURRAY, 1994). Neben dem

G2/M-’Checkpoint’ ist insbesondere der G1-’Checkpoint’ am G1/S Phasen-Übergang das wichtigste Target der Zellzyklusregulation. Inzwischen sind noch weitere ’Checkpoints’, wie z. B. der S/M-’Checkpoint’ (RHIND und RUSSELL, 1998), der Telophase-’Checkpoint’ (PRICE, 1999), der Centrosom-Duplikations-’Checkpoint’ (WINEY, 1996) sowie der Spindel- und Post-Spindel-’Checkpoint’ (AMON, 1999; LANNI und JACKS, 1998) bekannt und die meisten von ihnen stehen unter Kontrolle von p53.

3.5.2 DNA-Reparatur

’Checkpoint’-Mechanismen spielen eine wichtige Rolle zur Erhaltung der genetischen Integrität, denn fehlende ’Checkpoints’ führen zur Induktion genomischer Instabilität und zur Änderung des Ploidiegrades während der Zellteilung. ’Checkpoints’ erlauben DNA-’Damage’-Sensorproteinen den DNA-Schaden zu detektieren und entsprechende Signaltransduktionskaskaden zu initiieren, die typischerweise zur p53-Aktivierung und Inaktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen führen, um die Zellzyklus-Progression zu inhibieren (SANCAR et al., 2004). Über die Aktivierung solcher ’Checkpoints’ werden Mechanismen zur Reparatur falsch replizierter DNA bzw. genotoxisch-induzierter geschädigter DNA eingeleitet, die die Integrität des Genoms wiederherstellen. DNA-Reparaturmechanismen beinhalten neben dem direkten ’Repair’, das Basen-’Exzisionsrepair’, Doppelstrangbruch-’Repair’ sowie ’Cross-link-Repair’. Fast alle Reparaturmechanismen machen sich die Tatsache zunutze, dass die genetische Information in zwei Kopien, nämlich eine auf jedem Strang der Doppelhelix, vorliegt. Der veränderte Abschnitt in dem beschädigten Strang wird nach Erkennung von DNA-Reparatur-Nukleasen entfernt. Der resultierende einzelsträngige Abschnitt wird von DNA-Polymerasen über die Information im intakten Strang, die als Matrize dient, wieder aufgefüllt. Der Einzelstrangbruch, den die DNA-Polymerase nach dem Auffüllen der Lücke hinterlässt, wird von der DNA-Ligase geschlossen und die genetische Integrität wiederhergestellt (ALBERTS et al., 1990).

DNA-’Damage’ induziert, neben der Aktivierung der DNA-’Damage-Checkpoints’ und der Beseitigung des Schadens durch Wiederherstellung der Kontinuität der DNA-Duplex, die transkriptionelle Antwort zur Unterstützung der Zelle und die Auslösung von Apoptose zur Eliminierung zu stark geschädigter Zellen. Als „Wächter des Genoms“ (LANE, 1992) moduliert p53, neben der Induktion von Apoptose, die transkriptionelle Regulation der Zellantwort auf DNA-Schädigungen und die Reparatur geschädigter Gene (CHO et al., 1994).

3.5.3 p53 - Vermittler zwischen Proliferation und Apoptose

Ein eingetretener DNA-Schaden induziert über p53 einen Zellzyklus-Arrest, um Reparaturprozesse zu initiieren (KASTAN et al., 1991) oder Apoptose auszulösen (LOWE et al., 1993), und führt dadurch zur Limitierung der zellulären Proliferation. Nach CHEN et al. (1996) ist die zelluläre Antwort auf eine p53 Akkumulierung abhängig von der p53 Proteinexpression. Niedrige p53 Level führen über transkriptionelle Aktivität zum Zellzyklus-Arrest, wohingegen eine hohe p53 Konzentration über post-translationale Mechanismen Apoptose bewirkt. p53 kann direkt an DNA binden und DNA-Schäden

(ss und ds-Strangbrüche) erkennen. Bei reparablem Schaden, gibt die p53-abhängige Zellzyklusblockierung Gelegenheit zum DNA-’Repair’ (BORRIELLO et al., 2002). Dabei ist auch p53 selbst in Reparaturmechanismen involviert; so ist neben der direkten Beteiligung von p53 bei der Basen-Exzisionsreparatur (ZHOU et al., 2001), eine direkte Beziehung von p53 in DNA-Reparatur-Mechanismen über das Ribonukleotid-Reduktase-Gen (p53R2) beschrieben (TANAKA et al., 2000).

p53 spielt eine entscheidende Rolle im G1/S- und im G2/M-Phasen-Arrest und verhindert die chromosomale Replikation während des Zellzyklus, wenn ein DNA-Schaden gegenwärtig ist (MERCER, 1998). Nach MORGAN und KASTAN (1997) bzw. SCHWARTZ und ROTTER (1998) vermittelt p53 bei niedrigem bzw. reparablem DNA-Schaden den Zellzyklus-Arrest an ’Checkpoints’, die für DNA-Replikation (G1/S), prämitotische Chromosomenkondensation (G2) und die Chromosomentrennung (Spindel-’Checkpoint’) vorrangig sind. In normalen gesunden ’wild-type’ p53 Zellen wird der apoptotische Zelltod meist am G1/S-’Checkpoint’ eingeleitet, während in Tumorzellen meist in einem späteren Stadium des Zellzyklus (G2/M-’Checkpoint’) der mitotische Zelltod, auch als mitotische Katastrophe oder verzögerte Apoptose bekannt, initiiert wird (ERENPREISA und CRAGG, 2001).

Über Induktion der Genexpression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21/WAF1/Cip1 führt p53 zum Stillstand am G1-’Checkpoint’ (EL-DEIRY et al., 1993) oder durch Induktion von Gadd45 (KASTAN et al., 1992; ZHAN et al., 1999), p21 (BUNZ et al., 1998) oder 14-3-3 σ (HERMEKING et al., 1997) zur Arretierung am G2/M-’Checkpoint’ und hemmt dadurch den Übergang in die Synthese-Phase bzw. in die Mitose-Phase (BURNS und EL-DEIRY, 1999).

Wenn geschädigte Zellen in der G1- oder S-Phase nicht oder nur insuffizient repariert und auch nicht durch Apoptose eliminiert wurden, wird in der G2-Phase die Entscheidung über Leben oder Tod getroffen. Der Mechanismus, durch den p53 Zellen am G2-’Checkpoint’ blockiert, involviert die simultane Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 durch die drei transkriptionellen p53-Targets Gadd45, p21 und 14-3-3 σ . Daneben trägt auch die p53-induzierte Repression des Cdc2 und des Topoisomerase II Gens dazu bei, den Eintritt in die Mitose zu blockieren und den G2-Arrest zu verstärken (TAYLOR und STARK, 2001). Durch Induktion von Gadd45 kann p53 zudem die Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen steuern (KASTAN et al., 1992). Zellen mit exzessiven Chromosomenläsionen können den G2/M-’Checkpoint’ nicht passieren und starten aus dem G2-Arrest Endozyklen, in denen vermehrt endopolyploide Zellen generiert werden. Die endozyklischen Zellen haben eine weitere Möglichkeit, die geschädigte DNA zu reparieren. Bei erfolglosem ’Repair’ werden diese Zellen durch Detektion über den Spindel-’Checkpoint’ dem mitotischen Tod, einer Apoptose aus der Metaphase, die zum Mitose-Abbruch führt, zugeleitet (ERENPREISA und CRAGG, 2001).

3.6 Ziel der Studie

Obwohl klinische Erfahrungen den positiven Effekt der therapeutischen Applikation von Kälte vielfach belegen, liegen wissenschaftlich fundierte Grundlagen zum Verständnis der Mechanismen und zum Nachweis der Wirksamkeit nur in unzureichendem Ausmaß vor und es gibt Hinweise, dass sich Hypothermie nicht nur protektiv, sondern auch zellschädigend auswirkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung von Kälte *in vitro* mit und ohne Apoptose-Stimulierung auf verschiedene Zelllinien zu untersuchen und gegebenenfalls Regulationsmechanismen zu erarbeiten. Im Fokus der Untersuchungen stand dabei die Wirkung der Hypothermie auf die Entwicklung apoptotischer Prozesse, auf die Entstehung von Zellstress und auf die Modulation der Zellproliferation einer TNF- α -sensiblen und einer TNF- α -resistenten Zelllinie. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung morphologischer Apoptose-Merkmale sowie auf die Aktivierung spezifischer 'Signal-Pathway'-Proteine gelegt werden. Neben der Generierung verschiedener apoptotischer Kernstadien, der DNA-Fragmentierung und der PS-Translokation sollte auf Proteinebene die Aktivierung der Caspasen-Kaskade sowie die Expression der TNF-Rezeptoren evaluiert werden. Zwei Markerproteine des extrinsischen und intrinsischen 'Pathways' sollten zudem einer Überprüfung der transkriptionellen Regulierung unterzogen werden. Des Weiteren sollte die Induktion verschiedener Stressoren sowie die Induktion einer protektiven Stressantwort infolge der Kälteapplikation überprüft werden. Die Einwirkung hypothermer Temperaturen auf die Zellproliferation sollte über die Modulation des Metabolismus, der DNA-Synthese, einiger proliferationsassoziiierter Proteine und der Zellzyklusphasen erfasst werden.

Hierzu wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

1. Wirkt sich die Kältebehandlung protektiv oder zellschädigend auf ein Apoptose-induziertes System aus?
2. Induziert die Kälteapplikation selbst apoptotische Prozesse?
3. Ist der Einfluss auf die Apoptose temperatur- bzw. zeitabhängig?
4. Welchen Einfluss hat die Kältebehandlung auf die TNF- α -induzierte Apoptose?
Welche Bedeutung kommt dabei den TNF-Rezeptoren zu?
5. Welche Wirkung hat die Kältebehandlung auf die Entstehung von Stress, insbesondere oxidativen Stress?
6. Wie wirkt sich die Kälteapplikation auf die Zellproliferation aus?

4 MATERIAL UND METHODE

4.1 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Mikroflow Biological Safety Cabinet, Nunc Intermed, Wiesbaden, BRD) durchgeführt. Die 37°C-Temperierung erfolgte im Cellstar 150 CO₂-Inkubator (Nunc Intermed), die 10°C-, 24°C- und 32°C-Inkubationen wurden in einem temperierbaren CO₂-Inkubator der Fa. Rengli (SalvisLab Biocenter BC 150, Wohlen, Schweiz) vorgenommen. Zur 4°C-Temperierung wurden die Zellen auf Eis bei einer 24°C-Einstellung im SalvisLab Biocenter inkubiert. Die Abkühlzeiten der auf Eis exponierten Medien wurden in einem Vorversuch ermittelt (Abb. 1). Kulturmedium mit den Ausgangstemperaturen a) Kühlschranktemperatur (KT), b) Raumtemperatur (RT) und c) Brutschranktemperatur (BT) wurde auf Eis inkubiert und die Temperaturabnahme über die Zeit mit einer LICOX-Sonde (LICOX type K thermocouple probe, Licox System, GMS, Kiel-Mielkendorf, BRD) evaluiert. Da die kühlenschrankgekühlten Medien bereits nach einer 10-minütigen Eisinkubation eine Abkühlung des Mediums auf 4°C erreichten, wurden Kühlschrank-äquilibrierte Medien und Zusätze für die Versuchsreihen bei 4 und 10°C eingesetzt. Für die Versuchsansätze bei 24, 32 und 37°C wurde mit RT-äquilibrierten Reagenzien gearbeitet.

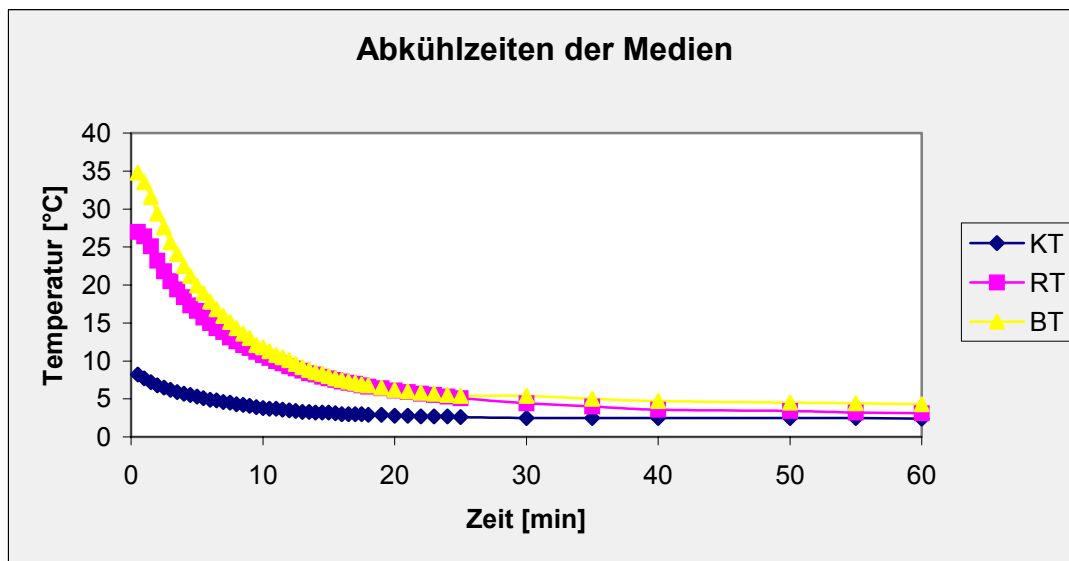


Abb. 1: Abkühlzeiten der auf Eis exponierten Medien über einen Zeitraum von 60min – Kühlschranktemperatur (KT), Raumtemperatur (RT), Brutschranktemperatur (BT)

Die Zelllinien wurden bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, Dänemark) kryokonserviert. Zur Kultivierung wurde der Inhalt eines Gefäßes schnell in 37°C temperiertem Wasser aufgetaut, die Oberfläche des Gefäßes mit 70% Isopropanol desinfiziert und sofort in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD) mit vorgelegtem, RT-äquilibrierten, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS, Foetal Calf Serum, Gold, PAA, Cölbe, BRD) überführt. Nach zwei fünfminütigen Zentrifugationsschritten (Universal 30 F, Hettich, Tuttlingen, BRD) bei 1600U/min (400xg), wurden die Zellen in Petrischalen (Cellstar, 100/20mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen,

BRD) ausgesät und bei 37°C unter einer 5%igen humiden CO₂-Atmosphäre in den entsprechenden Medien (Tab. 2) kultiviert.

Zelllinien und Zellen	Kulturmedien
WEHI 164 S	RPMI 1640 mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 10% FCS (PAA) 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)
WEHI 164 R	RPMI 1640 mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 10% FCS (PAA) 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)
L929	DMEM mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 10% FCS (PAA) 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)
HeLa	DMEM mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 10% FCS (PAA) 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)
HL-60	RPMI 1640 mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 15% FCS (PAA), Na-Pyruvat 110mg/l 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)
PBL	RPMI 1640 mit 300mg/l L-Glutamin (Sigma) 10% FCS (PAA) 100U/ml Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (PAA)

Tab. 2: Übersicht über die untersuchten Zelllinien bzw. Zellen und die verwendeten Kulturmedien

Der Medienwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Zur Vermehrung wurden die Zellen nach Vorliegen einer Konfluenz von ca. 70-80% passagiert. Um die Konzentration an enzymhemmenden Ca²⁺-Ionen aus dem Medium zu reduzieren, wurden die Zellen einmal mit sterilem PBS (PAA) gespült und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g/l; 0,2g/l; Virolex; PAA) versetzt. Unter der Trypsin-Einwirkung, die durch den Zusatz des Ca²⁺-bindenden Komplexbildners EDTA verstärkt wird, lösen sich die Zellen ohne großen Verlust an Oberflächenmolekülen aus den Kulturschalen. Zur Erhaltung der Integrität extrazellulärer membrangebundener Rezeptoren für durchflusszytometrische Messungen und Western-Blot-Analysen wurden die Zellen mit dem besonders schonenden Enzym Accutase (PAA) aus den Kulturgefäßen gelöst. Nach einer ca. fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Enzymwirkung nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung mit FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert und der Zellansatz durch Zentrifugieren (5min, 1600U/min) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und bis zur nächsten 70- bis 80%igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden i. d. R. in der folgenden zweiten Passage noch einmal 1:4 bis 1:5 ausgedünnt und am zweiten Tag nach Passagierung für die Experimente eingesetzt. Suspen-

sionszellen wurden durch Abzentrifugieren des Zellüberstandes und Zugabe von frischem Kulturmedium zum 1:2 reduzierten Zellpellet passagiert. Nicht benötigte Zellen wurden anschließend durch Zusatz von 10% DMSO (Sigma, Taufkirchen, BRD) und 50% FCS zum Kulturmedium unter Verwendung einer Einfrierbox (Nalgene Cryo Freezing Container, Fisher Scientific, Niderau, BRD), die eine langsame Abkühlung um 1°C/min gewährleistet, in einer –80°C-Gefriertruhe über Nacht heruntertemperiert und danach weiter in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zellen, die nach dem Experiment einer immunzytochemischen Färbung unterzogen wurden, wurden nicht in Petrischalen, sondern nach der ersten Passage auf autoklavierten runden Deckgläschen (Durchmesser 12mm; Marienfeld Laboratory Glassware, VWR, Darmstadt, BRD) in 24-Well-Platten (Nunclon Surface, Nunc) bis zur 70-80%igen Konfluenz kultiviert. Zellen, die auf Glas schlecht adhärten, wurden auf Permanox Chamber Slides (Lab-Tek, Brand Products, Nunc) für anschließende zytochemische Färbungen ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der entsprechenden Zellsuspension mit PBS verdünnt und mit 10 Vol% Trypanblau-Lösung (Sigma) versetzt. Der Vitalfarbstoff Trypanblau, der von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird und nur bei gestörter Membranintegrität in die Zelle permeiert, kann zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen eingesetzt werden. Ausgezählt wurden die Zellen über der Fläche der vier Eckquadrate (1mm²) einer Neubauer-Zählkammer, die aus 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von 0,25mm besteht. Bei einer Kammerhöhe von 0,1mm beträgt das Volumen über einem Eckquadrat 0,1mm³ bzw. 0,1µl. Die Zellzahl in einem definierten Volumen errechnet sich dann wie folgt:

$$N/ml = N_{EQ} \times 10^4 \times VF$$

N	:	Gesamtzellzahl
N_{EQ}	:	Mittelwert der Zellzahl/Eckquadrat
VF	:	Verdünnungsfaktor

Die Zellzählung wurde mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Leica DMIL, Solms, BRD) bei einer 100x Gesamtvergrößerung (Objektiv Leica C Plan 10x/0.22, PH1, Okkular Leica 10x/18) durchgeführt. Um den statistischen Fehler möglichst gering zu halten, wurden die Zellsuspensionen so verdünnt, dass die Zellzahl pro Eckquadrat zwischen 30 und 70 lag. Die Lebendzellzahl ergibt sich aus dem prozentualen Anteil der vitalen Zellen zur Gesamtzellzahl.

4.1.1 Zelllinien und Zellen

WEHI-164 S:

Die Mausfibrosarkomzelllinie WEHI-S (ATCC-Nr. CRL-1751, Cell Lines Service, Eppelheim, BRD) wurde durch Induktion eines Fibrosarkoms über subkutane Injektion von 3-Methylchloanthren in Balb/c-Mäusen generiert (ROLLINGHOFF und WARNER, 1973). Die Zellen zeichnen sich, v. a. nach Vorbehandlung mit Actinomycin D, als hoch sensitiv für TNF-α-induzierte Zytotoxizität aus (ESPEVIK und NISSEN-MEYER, 1986). Sie wachsen als Monolayer mit einem fibroblastenähnlichen Habitus. Die Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS kultiviert.

WEHI-164 R:

Die Mausfibrosarkomzelllinie WEHI-R (überlassen von Dr. Stefan Bauer, Universität des Saarlandes, Innere Medizin I, Homburg/Saar), die durch Selektionierung und Klonierung aus TNF- α -sensiblen WEHI 164 S Zellen generiert wurde und weitgehend TNF- α -resistent ist (AUSTGULEN et al., 1986), wurde unter identischen Bedingungen wie die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen kultiviert.

L929:

Die Mausbindegewebsfibroblasten L929 (DSMZ, Nr. ACC 2, Essen, BRD) wurden aus normalem subkutanen Areolar- und Fettgewebe einer männlichen C3H/An Maus gewonnen und sind für TNF- α -Zytotoxizität sensibel (GARABEDIAN und SCOTT, 1967). Die Fibroblasten wachsen in DMEM mit 10% FCS als Monolayer.

HeLa:

Diese Zelllinie wurde 1951 aus den Zellen eines humanen Adeno-Karzinoms der Cervix etabliert: Die Zellen, bezogen vom DSMZ (Nr. ACC 57), sind TNF- α -empfindlich (ROSETTE und KARIN, 1996) und wachsen in DMEM Medium mit 10% FCS als epithelzellähnlicher Monolayer.

HL-60:

Bei der HL-60 Zelllinie (DSMZ, Nr. ACC 3) handelt es sich um Zellen eines humanen myeloiden Lymphoms, die 1976 aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau mit akuter myeloider Leukämie gewonnen wurden (BIRNIE, 1988). Die Zellen können mit Camptothecin Apoptose-stimuliert werden und wachsen in RPMI 1640 Medium mit 15% FCS und 110mg/l Na-Pyruvat als runde solitäre Einzelzellen in Suspension.

PBL:

Zur Isolierung humaner Lymphozyten aus peripherem Blut ('peripheral blood lymphocytes', PBL) wurde Citrat-Vollblut gesunder Spender verwendet. Die Isolierung erfolgte nach der Methode von ROMANI et al. (1994), durch die sich mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) mit Hilfe eines Polysucrose-Gradienten (Lympholyte-H; 1,077 g/cm³ Dichte, Cedarlane, Ontario, Kanada) gewinnen lassen. 5ml Citratblut wurde mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS 1:2 verdünnt und vorsichtig über 3ml Lympholyte-Lösung geschichtet. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 2300U/min (800xg) konzentrierten sich die mononukleären Zellen in der Interphase und konnten mit einer Pasteurpipette abgeerntet werden. Zur Abtrennung der in dieser Fraktion noch vorhandenen Monozyten wurden die Zellen nach zwei Waschschritten in Kulturmedium für zwei Stunden bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Nach Überprüfung der Monozytenadhärenz wurde der Überstand (PBL) in einem neuen Kulturgefäß ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurden die PBL für 48 Stunden mit 5µg/ml des Mitogens Concanavalin A (ConA, Sigma) stimuliert. Die Abbildung 2 zeigt die kultivierten Zelllinien und Zellen vor Versuchsansatz.

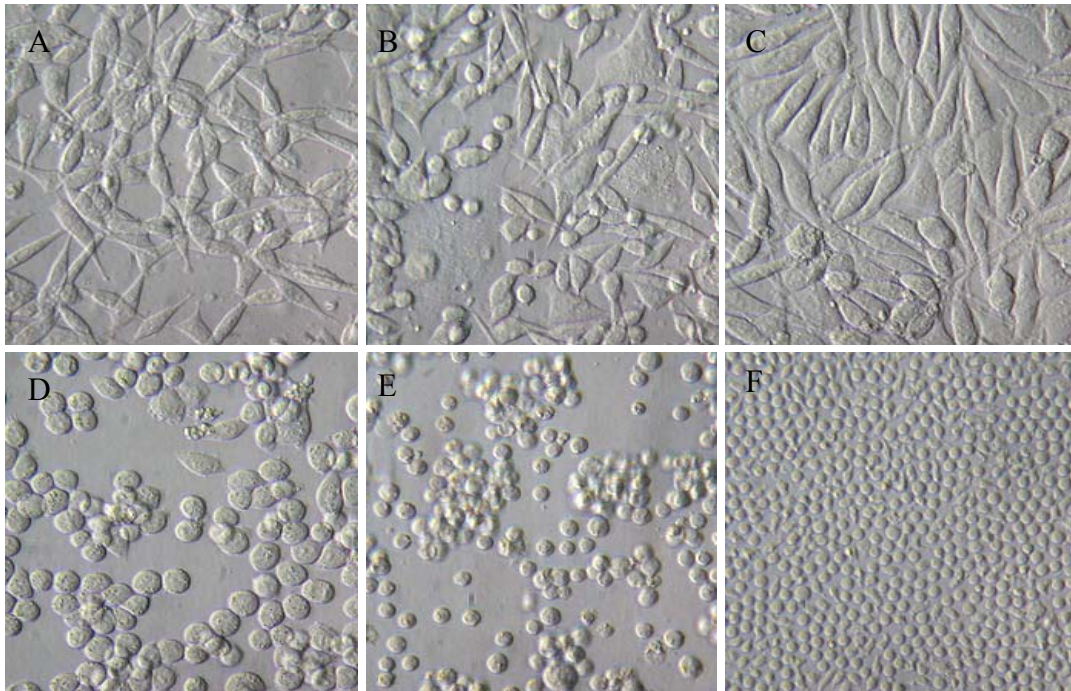


Abb. 2: Kultivierte Zelllinien bzw. Zellen am Tag 2 nach der zweiten Subkultivierung. Die PBL sind am Tag 1 nach Isolierung dargestellt. – Mausfibrosarkom WEHI-S (A), Mausfibrosarkom WEHI-R (B), Mausbindegewebsfibroblasten L929 (C), humanes Cervix-Adenokarzinom HeLa (D), humanes myeloides Lymphom HL-60 (E), humane periphere Blutlymphozyten PBL (F), (Vergrößerung 300x).

4.1.2 Apoptose-Induktoren

TNF- α :

Die Zelltod-Induktion mit TNF- α ist ein weitverbreitetes etabliertes Apoptose-Induktionsmodell (ESPEVIK und NISSEN-MEYER, 1986). Rekombinantes murines TNF- α , produziert in *E. coli* (Roche, Mannheim, BRD), mit der spezifischen Aktivität von 4×10^8 U/mg, gelöst in sterilem PBS mit 0,1% BSA (Sigma) wurde in einer Arbeitskonzentration von 200 U/ml (0,5 ng/ml) in die Versuche eingesetzt.

Camptothecin:

Eines der meist untersuchten Apoptose-Modellen ist die Camptothecin-Behandlung der myeloiden Lymphom-Zelllinie HL-60 (KING et al., 2000). 10 mg Camptothecin (CPT, Sigma), ein pflanzliches Alkaloid, dessen zytotoxisches Potential sich als DNA Topoisomerase I Inhibitor während der Zellzyklus-S-Phase äußert (WALL et al., 1966), wurde nach Angaben des Herstellers in 1 ml DMSO (Sigma) gelöst. Die resultierende gelbe, milchig-trübe Flüssigkeit wurde bis zur Klärung der Lösung kurz auf 60°C erwärmt und kam in einer Arbeitskonzentration von 4 μ g/ml zum Einsatz.

4.2 Versuchsprotokoll

Die Zellen wurden mit bzw. ohne TNF- α bei 4°C im CO₂- Inkubator auf Eis unter 5%iger CO₂-Begasung für 4 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Nach einer anschließenden einstündigen Wiederer-

wärmung bei 37°C/5% CO₂ wurden die Extrakte für die Protein- bzw. RNA-Analysen gewonnen oder die entsprechenden Proliferations- und Apoptosetests bzw. zytochemischen und immunzytochemischen Methoden direkt im Anschluss an das Experiment durchgeführt. Die Kontrollansätze wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll für 5 Stunden bei 37°C unter einer 5%igen CO₂-Atmosphäre gehalten. Für alle Versuche mit WEHI-S, WEHI-R, L929, HeLa, PBL wurde das nachfolgende Ansatzschema (Tab. 3) eingehalten.

Ansatz	Stimulierung	Inkubationsbedingungen
TNF/4°C	200U TNF- α /ml	4h 4°C + 1h 37°C Inkubation
TNF/37°C	200U TNF- α /ml	5h 37°C Inkubation
4°C	ohne TNF- α	4h 4°C + 1h 37°C Inkubation
37°C	ohne TNF- α	5h 37°C Inkubation

Tab. 3: Ansatzschema des allgemeinen Versuchsprotokolls: Die verschiedenen Versuchgruppen mit und ohne TNF- α -Stimulierung und die entsprechenden Inkubationsbedingungen

HL-60-Zellen wurden nach gleichem Ansatzschema (Tab. 3) mit 4 μ g/ml CPT anstelle von TNF- α Apoptose-induziert. Die Arbeitskonzentration der jeweiligen Apoptose-Induktoren wurde in Vorversuchen ausgetestet.

Nur für zeitabhängige Versuchsanordnungen wurde das prinzipielle Versuchsprotokoll erweitert, indem nach der vierstündigen Kühlungsphase die 37°C-Inkubation (Wiedererwärmungsphase) auf ein Zeitintervall bis zu 20h ausgedehnt wurde. Zur Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher hypothermer Temperaturen und verlängerter hypothermer Inkubationsintervalle wurden die Zellen bei 32°C, 24°C, 10°C und 4°C über einen Zeitraum von 1 bis 24h und einer anschließenden 4-stündigen 37°C Inkubation kultiviert. Alle Experimente wurden mit präkonfluenten Kulturen (70-80% Konfluenz) am Tag zwei in der ersten bis dritten Passage nach Kultivierung durchgeführt.

4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszierende Moleküle absorbieren Photonen einer bestimmten Anregungswellenlänge. Die bei der Anregung aufgenommene Energie hebt Elektronen auf ein höheres nicht stabiles Niveau an. Bei der Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand wird die zuvor aufgenommene Energie in Form energieärmerer Photonen, dem sogenannten Fluoreszenzlicht, emittiert. Dieses Prinzip macht man sich bei der Anfärbung zellulärer Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung zunutze. Die Selektivität kann durch die individuellen Eigenschaften des Farbstoffes selbst (pH-Abhängigkeit, Membranpermeabilität, Protein-, DNA-Bindung u. a.) oder durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunfluoreszenz) vermittelt werden.

Vereinfacht dargestellt besteht das optische System eines Fluoreszenzmikroskops neben den Linsensystemen aus einer Lichtquelle mit kontinuierlichem Linienspektrum (Hg-Dampflampe), einem

Anregungsfilter, einem dichroiden Spiegel und einem Emissionsfilter. Der Anregungsfilter lässt selektiv nur Licht im Bereich der Anregungswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes passieren, der dichroide Spiegel reflektiert dieses Licht auf das Präparat, welches energieärmeres langwelligeres Licht emittiert. Über den dichroiden Spiegel wird das von der Probe emittierte Licht zum Emissionsfilter, den nur selektive Wellenlängen passieren können, gelenkt.

4.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Bisbenzimid:

Apoptotisch bedingte Chromatinverdichtungen und andere morphologische Kernveränderungen können durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden. Besonders geeignet ist der gelbe, lichtsensitive Bisbenzimidazol-Farbstoff Höchst 33342, der sich selektiv an Adenin-Thyminreiche DNA-Regionen anlagert und ausschließlich dsDNA-bindend ist, ohne dass eine Interkalation in die Doppelhelix stattfindet. Der Farbstoff kann sowohl aktiv als auch passiv in die Zelle aufgenommen werden und führt bei UV-Anregung zu einer blauen Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 330-380nm, Emissionswellenlänge 461nm).

Propidiumjodid:

Der interkalierende Vitalfarbstoff Propidiumjodid (PJ) kann bei intakter Membranintegrität nicht in die Zelle aufgenommen werden und ist daher zur Darstellung membrangeschädigter nekrotischer Zellen geeignet. Apoptotische Zellen in fortgeschrittenem Stadium nehmen durch Zellmembranveränderungen PJ in geringer Menge auf, während sich nekrotische Zellen stark anfärben lassen und vitale Zellen hingegen nicht. Bei gleichzeitiger Anfärbung mit Bisbenzimid können daher neben primär nekrotischen auch apoptotische Zellen und als späte Apoptosestadien sekundär-nekrotische Zellen diskriminiert werden. Bei einer Excitation im grünen Bereich (Anregungswellenlänge 535nm) emittiert der Farbstoff ein rotes Fluoreszenzlicht (Emissionswellenlänge 617nm).

Sowohl Bisbenzimid als auch Propidiumjodid (Sigma) wurden als Stammlösung in einer Konzentration von 2mg/ml in PBS gelöst und 15min vor der mikroskopischen Begutachtung in einer 1:1000 Verdünnung dem Versuchsansatz zugesetzt.

Annexin-V-FITC/PJ:

In vitalen Zellen findet sich unter physiologischen Bedingungen eine asymmetrische Verteilung intra- und extrazellulärer Phospholipide in der Dilipidmembran: Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sind hauptsächlich extrazellulär, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin intrazellulär ausgerichtet (ZACHOWSKI et al., 1989). In der Frühphase der Apoptose kommt es unter Einfluss aktivierter Caspasen zur Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen inneren zur äußeren Zellmembran. Annexin-V, ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin, bindet in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen spezifisch an die translozierten Lipide und ermöglicht unter geeigneter Fluoreszenzmarkierung den Nachweis dieses frühen Apoptosestadiums. FITC (Fluorescein-Isothiocyant)-markiertes Annexin-V kann mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchfluss-

zytometrie (Anregung 490nm, Emission 510nm) nachgewiesen werden (VERMES et al., 1995). Eine Gegenfärbung der Zellen mit dem Vitalfarbstoff Propidiumjodid erlaubt die Differenzierung zwischen frühen und späten Apoptosestadien (primäre Apoptosen = Annexin-positiv bzw. sekundäre Nekrosen = Annexin- + PJ-positiv) sowie primären Nekrosen (PJ-positiv).

4.3.2 Bisbenzimid/Propidiumjodid (Bis/PJ)-Färbeprotokoll

Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls (Apoptoseinduktion, 4h 4°C-Inkubation und anschließender 37°C Inkubation) wurden für adhärente Zellen die morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit nach Anfärbung mit je 2µg/ml Bisbenzimid und Propidiumjodid direkt in den Kulturgefäßen evaluiert. Beurteilt wurde die Ausbildung von zytoplasmatischen Blebs, Chromatinkondensation, Chromatinmargination, Kernkondensation, Kernfragmentierung und apoptotischer Körperchen vor Versuchsbeginn und nach 4, 5, 6, 7, 8, 10 und 24h. Die Befunde wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV, Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, BRD) über Videotape-Erfassung (Panasonic Ag 7350, Panasonic Deutschland GmbH, Wiesbaden, BRD) ermittelt. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer STORZ tricam SL pal Kamera (Karl STORZ GmbH, Tuttlingen, BRD) auf die Videoeinheit übertragen. Die Auszählung erfolgte mit einem 40er Objektiv (40/Achrostigmat 40x/0.55 Ph2, Zeiss) in 20 Beobachtungsfeldern ('high power fields', HPF), wobei im Randbereich nur Zellen gezählt wurden, deren größter Zellanteil noch innerhalb der Bildschirmfläche lag.

4.3.3 Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbeprotokoll

Die Annexin-V-FITC/PJ-Färbung wurde mit dem Annexin-V-Fluos Staining Kit der Fa. Roche nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Beendigung des prinzipiellen Versuchsprotokolls wurden die adhärennten Zellen direkt in den Kulturgefäßen angefärbt. Nach zwei Waschschritten mit sterilem PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PAA) wurden die 'Monolayer' mit Markierungslösung (20µl Annexin-V-FITC + 1000µl Hepes Puffer + 20µl PJ) für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und im Anschluss, zur Darstellung der Zellkerne, eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid (2µg/ml) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls am inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) über Videotape-Erfassung mit der STORZ tricam Kamera.

Bisbenzimid wurde mit dem UV-Filter-Block (Excitation 330-390nm), Propidiumjodid mit dem Grünlicht-Filterblock N2 (Excitation 530-560nm) und FITC mit dem Blaulicht-Epi-Illuminations-Filterblock I2/3 (Excitation 450-490nm) der Firma Leitz GmbH (Wetzlar, BRD) angeregt.

4.4 Immunzytochemie

Zur Lokalisierung von Antigenen in zellulären Strukturen stehen eine Vielzahl immunchemischer Färbemethoden zu Verfügung. Bei den direkten Färbemethoden wird mit nur einem Antikörper gearbeitet, der entweder direkt fluoreszenzmarkiert, oder zum Einsatz für die Lichtmikroskopie enzymmarkiert ist und durch eine nachfolgende Chromogenumsetzung sichtbar gemacht werden kann. Vor-

teil dieser Methode ist die schnelle Durchführung und das geringe Auftreten unspezifischer Reaktionen. Um die Signalstärke zu erhöhen, werden meist indirekte Färbemethoden angewandt, bei denen ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen bindet. Ein zweiter z. B. enzymmarkierter Sekundärantikörper, welcher gegen das Immunglobulin (Ig) des Primärantikörpers gerichtet ist, bindet an seinem Antigen und vermittelt die nachfolgende Enzym-Chromogenreaktion. Da mehrere Sekundärantikörper an verschiedene Epitope des Primärantikörpers binden, ist diese Methode weitaus sensitiver, jedoch auch unspezifischer als die direkte Methode. Eine weitere Verstärkung des Signals wird durch die Streptavidin-Biotin-Methode erreicht, die die starke Affinität dieser beiden Substanzen zueinander ausnützt. So binden am biotinylierten Sekundärantikörper mehrere Moleküle enzymkonjugiertes Streptavidin mit nachfolgender Enzym-Chromogenreaktion.

4.4.1 Antikörper

Die für die Immunzytochemie eingesetzten Primärantikörper sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt (Tab.4).

Primär-Antikörper	Klon/Bezeichnung/Ursprung	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation	Charakteristik
Caspase-3	ASP175 Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt, BRD	1:50 über Nacht; 4°C	Apoptose-Schlüssel- Exekutionsprotease
BrdU	Ab-2 Maus	Oncogene Research Products, Darmstadt, BRD	1:100 über Nacht; 4°C	Thymidin-Basenanalogen, Einbau in replizierende Zellen

Tab. 4: Übersicht über die für die Immunzytochemie verwendeten Primärantikörper

Die Markierung erfolgte durch Einsatz der nachstehenden Sekundärantikörper:

- Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 (Dianova, Hamburg, BRD)
- Ziege-anti-Maus/Kaninchen-IgG-Biotin (LSAB2-System-HRP, DAKO, Hamburg, BRD)

Die Inkubation des Cy3 (Indocarbocyanin, Anregung 550nm, Emission 570nm)-markierten Sekundärantikörpers wurde in einer 1:800 Verdünnung über einen Zeitraum von 45min vorgenommen. Die biotinylierten Antikörper des LSAB-Kits wurden als gebrauchsfertige Lösung für 10min inkubiert.

4.4.2 Indirekte Fluoreszenzfärbung

Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden nach Durchführung des Experimentes 3x mit PBS gewaschen und 10min in 4% Formalin fixiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS erfolgte für intrazelluläre Färbungen, nach einer 10-minütigen Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Triton X 100 (Roth) in PBS (Permeabilisierungspuffer), die Blockierung unspezifischer Bindungen mit 1% Ziegen-Normalserum (DAKO) in Permeabilisierungspuffer. Alle nachfolgenden Handhabungen wurden für intrazelluläre Anfärbungen in Permeabilisierungspuffer durchgeführt. Nach Inkubation des unmarkierten Primärantikörpers wurden die Zellen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern Flou-

reszenz-markiert und anschließend die Kerne mit 2µg/ml Bisbenzimid für 10min gegengefärbt. Nach mehreren Waschschritten mit PBS und A. dest wurden die Präparate mit Kaiser's Glycerin-Gelatine (60°C, Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt. Extrazelluläre Färbungen wurden in gleicher Weise ohne Permeabilisierung (PBS anstelle des Permeabilisierungspuffers) durchgeführt.

4.4.2.1 Bromo-Deoxyuridin (BrdU)-Einbau:

Während der Synthesephase kann das Basenalogon BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin), das sich von Thymidin lediglich durch die Substitution eines Br-Atoms anstelle der Methylgruppe in C₅-Stellung unterscheidet, in die DNA inkorporiert werden. Eingebautes antikörpermarkiertes BrdU kann über einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden und ist ein exzellenter Marker für Zellzyklus und Zellproliferation.

Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls schloss sich zur Bestimmung der Mitoserate bzw. einer DNA-Synthese-Zuwachsrates eine BrdU-Inkubationszeit von 0,5 bzw. 4h an. BrdU (Roche), gelöst in PBS, wurde in einer 10µM Arbeitskonzentration dem Kulturmedium zugesetzt. Da nur einzelsträngige DNA eine Antikörperbindung gewährleistet, wurde nach erfolgtem BrdU-Einbau eine DNA-Denaturierung mit 4M HCl für 20min bei RT vorgenommen. Anschließend folgte eine Neutralisierung durch drei Waschschrritte mit PBS. Die weitere Prozedur wurde nach dem Protokoll für intrazelluläre Fluoreszenzfärbung durchgeführt.

4.4.3 Indirekte HRP/DAB-Färbung

Das Enzym Peroxidase ('horseradish peroxidase', HRP), das aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen wird, besitzt als aktives Zentrum eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin). Das Hämatin bildet mit Wasserstoffperoxid einen Komplex, der unter Abspaltung von Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt. Aufgrund der Tatsache, dass Peroxidase bei Substratüberschuss (H₂O₂) katalytisch inaktiv und bei Fehlen eines Elektronendonors reversibel blockiert ist, kann die zelluläre endogene Peroxidaseaktivität durch Zusatz von H₂O₂ im Überschuss unterdrückt werden. In Anwesenheit eines Elektronendonors bildet HRP einen Enzym-Substratkomplex mit nachfolgender Oxidation des Elektronendonors. Elektronendonoren, die sich durch Oxidation in unlösliche, gefärbte Verbindungen umwandeln, nennt man Chromogene. 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) stellt ein solches Chromogen dar und bildet nach Umsatz durch HRP ein braunes Reaktionsprodukt, das in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Konjugiert man HRP kovalent mit Streptavidin, das hochaffin an Biotin bindet, kann durch dieses Detektionssystem die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion durch Einsatz eines biotinylierten Sekundärantikörpers um ein vielfaches verstärkt und lichtmikroskopisch visualisiert werden.

Bei der indirekten intrazellulären HRP/DAB-Färbung wurde, nach Fixierung der auf runden Deckgläschen kultivierten Zellen mit 4% Formalin für 10min bei Raumtemperatur, eine Permeabilisierung mit 0,2% Triton X 100 in PBS für 10min vorgenommen. Nach Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 0,3% H₂O₂ (Roth) in PBS für 30min und Blockierung unspezifischer Bindungen mit 1% Ziegen-

Normalserum in Permeabilisierungspuffer für 30min, folgte die Bindung eines spezifischen unkonjugierten Primärantikörpers i. d. R. für 1h bei RT-Inkubation. Nachfolgend wurde ein Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper und Streptavidin-konjugierte HRP (LSAB) für je 10min zugesetzt. Zuletzt wurde das H₂O₂-aktivierte Chromogen DAB/ (0,7mg/ml; DAKO) für 5min inkubiert. Nach erfolgter Gegenfärbung mit 1:10 verdünntem Meyers Hämalaun wurden die Präparate ohne Entwässerung mit wasserhaltigem Aquatex (Merck) eingedeckt.

4.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Darstellung zellulärer Strukturen, wie z. B. intra- und extrazellulärer Proteine und nukleärer DNA, die unter Verwendung geeigneter fluoreszenzkonjugierter Antikörper bzw. Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch markiert werden können. Durch Anregung der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser können über das emittierte Fluoreszenzlicht verschiedene Zellmerkmale quantitativ detektiert werden.

Ein fixiertes Zellgemisch wird durch eine Kapillare gedrückt, so dass feine Tröpfchen erzeugt werden, die jeweils nur eine einzige Zelle enthalten. Jedes Tröpfchen passiert einen Laserstrahl, wodurch jede Zelle sowohl Streulicht erzeugt als auch Fluoreszenzlicht emittiert, deren Intensität über verschiedene Detektoren erfasst wird. Die Lichtstreuung ist abhängig von Größe und Oberflächen- bzw. Zytoplasmabeschaffenheit der Zelle: Die Intensität des in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichts ist ein Maß für die Zellgröße, das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht lässt Rückschlüsse auf die Zelldichte und die Granularität der Zellen zu. Die Intensität des Fluoreszenzlichts gibt Auskunft über die Bindung der Fluoreszenzsonde.

Messung und Auswertung erfolgten am FACScan (BD Biosciences, Heidelberg, BRD) mit Hilfe der Cellquest Software (BD Biosciences); die Instrumentenqualität wurde vor jeder Messung durch Einsatz von Calibrate-Beads (BD Biosciences) mit der FACScomp-Software (BD Biosciences) überprüft. Die Messeinstellungen wurden je nach Zelllinie und Messprinzip variiert.

4.5.1 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, Anregung 546nm, Emission 647nm, 7-AAD-DNA-Komplexe Emission 610nm) kann zur durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analyse vitaler Zellen als auch zur Detektion der apoptotischen Sub-2n-Population eingesetzt werden. Der Farbstoff ist schwach permeabel und bindet selektiv an GC-reiche DNA-Regionen. In der Spätphase der Apoptose wird DNA in kleine Fragmente ('internucleosomal linker regions') geschnitten. Durch Fixierung und nachfolgende Rehydratisierung der Zellen während der Färbeprozedur kann die Zelle diesen Anteil an 'lower' DNA verlieren. Durch Messung der 7-AAD-markierten chromosomalen Gesamt-DNA kann der DNA-Verlust als hypodiploider Peak (Sub-G1-Peak, Sub-2n-Peak) bestimmt werden. Neben der Sub-2n-Population wurden anhand der durchflusszytometrischen Analyse auch die Zellzyklusphasen (G0/G1, S, und G2/M) quantifiziert.

Nach Durchführung des allgemeinen Versuchsprotokolls wurden die Zellen eines Versuchsansatzes (ca. 5×10^6 Zellen) quantitativ zur Analyse eingesetzt. Hierzu wurden die adhärennten Zellen gründlich mit Trypsin/EDTA aus den Inkubationsgefäßen gelöst und mit den entsprechenden Kulturüberständen vereint. Nach Neutralisierung mit Vollmedium wurden die Zellen noch zweimal mit 4°C $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS-Puffer (PAA) gewaschen (400xg, 3min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde in 400µl PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) resuspendiert und mit 3,6ml Methanol (70% in PBS) versetzt. Nach gründlichem Resuspendieren wurden die Zellen mindestens 20min bei -20°C fixiert und anschließend zweimal mit 5-10ml 4°C PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen (400xg, 3min, 4°C). Um störende RNA zu eliminieren, wurde das erhaltene Pellet in 250µl RNase A (25µg/ml in PBS, Roth) resuspendiert und 15min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend mit 750µl PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) verdünnt und mit 10µl der 1mM 7-AAD-Stammlösung (1mg/1,72ml DMSO, MoBiTec GmbH, Göttingen, BRD) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Unmarkierte Kontrollzellen wurden bis auf die 7-AAD-Inkubation in gleicher Weise behandelt.

4.5.2 Annexin-V-FITC/Propidiumjodid

Die Annexin-V-FITC/PJ-Färbung wurde mit dem Annexin-V-Fluos Staining Kit der Fa. Roche durchgeführt. Nach Beendigung des prinzipiellen Versuchsprotokolls wurden die adhärennten Zellen als auch die Zellen im Kulturüberstand zweimal 5min bei 1150U/min (200xg) mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und das resultierende Pellet in 100µl Markierungslösung (2µl Annexin-V-FITC + 100µl Hepes Puffer + 2µl PJ) für 30min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zugabe von 400µl Hepes Puffer wurde die durchflusszytometrische Messung direkt im Anschluss vorgenommen.

4.5.3 Dichloro-Fluoreszein-Diazetat (DCFH-DA)

Die Überprüfung von oxidativem Stress durch die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) wurde mithilfe des Fluoreszenzindikators Dichloro-Fluoreszein-Diazetat (DCFH-DA) durchgeführt. Nach Passage durch die Zellmembran werden die Acetylgruppen des stabilen unpolaren nicht fluoreszierenden DCFH-DA durch intrazelluläre Esterasen abgespalten. Das reduzierte nicht fluoreszierende Dichloro-Fluoreszin (DCFH), das aufgrund seiner Polarität in der Zelle akkumuliert, wird in Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (v. a. H_2O_2) schnell zu grünfluoreszierendem Dichloro-Fluoreszein (DCF) oxidiert (BASS et al., 1983). Die resultierende Fluoreszenz, die der Menge aktiver ROS proportional ist, kann mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt werden.

Die Zellen eines Versuchsansatzes wurden zum einen direkt nach der vierstündigen Kälteapplikation und des weiteren nach einer Stunde Wiedererwärmung quantitativ gewonnen und nach Neutralisierung mit Vollmedium noch zweimal mit PBS gewaschen (400xg, 3min). Zur Beladung der Zellen mit DCFH-DA wurde das resultierende Pellet in 1ml PBS mit 1µl 5mM DCFH-DA Stammlösung gründlich resuspendiert und für 30min im 37°C temperierten Schüttelwasserbad unter Lichtabschluss

inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte sofort nach Beendigung der Inkubation durch Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität des Dichloro-Fluoreszeins (DCF).

4.5.4 Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluoreszein-Azetoxymethylester (BCECF-AM)

Die Quantifizierung der intrazellulären H^+ -Ionenkonzentration wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein) vorgenommen. Nach Beendigung des prinzipiellen Versuchsprotokolls wurden die Zellen mit der zellpermeablen Vorstufe BCECF-Azetoxymethylester (BCECF-AM) beladen. Der farblose unpolare Ester wird über Hydrolyse durch endogene Esterasen in ein fluoreszierendes Produkt überführt. Das hydrolysierte fluoreszierende Produkt akkumuliert aufgrund seines polaren Charakters in der Zelle und ist ein Maß für den intrazellulären pH-Wert. Da keine pH-Kalibrierung vorgenommen wurde, konnten die pH-Unterschiede nur als relative Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben werden.

Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls wurden die Zellen eines Versuchsansatzes direkt nach der Kälteapplikation und zudem nach einstündiger Wiedererwärmung quantitativ gewonnen und nach Neutralisierung mit Vollmedium zweimal mit PBS gewaschen (400xg, 3min). Zur Beladung der Zellen mit BCECF-AM wurde das resultierende Pellet in 1ml PBS mit 10% BCECF-AM gründlich resuspendiert und 30min bei 37°C unter Lichtabschluss inkubiert. Nach einmaligem Zentrifugieren (400xg, 3min) wurden die Zellen mit 1% Formalin in PBS fixiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte sofort nach Beendigung der Färbeprozedur durch Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität.

4.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis der Proteinexpression mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte mit unmarkierten Primärantikörpern und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (BD Biosciences; Santa Cruz, Heidelberg, BRD). Die eingesetzten Primärantikörper sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 5).

Nach Beendigung des prinzipiellen Versuchsprotokolls wurden die adhärenenten sowie die Zellen aus dem Kulturüberstand quantitativ gewonnen, mit FCS-haltigem Medium neutralisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Für die intrazellulären Färbungen wurde das erhaltene Zellpellet in 500µl Zyto-Fix/ZytoPerm (BD Biosciences) für 20min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten in Perm/Wash-Puffer (Permeabilisierungspuffer, BD Biosciences) für 3min bei 1600U/min (400xg) wurde der Überstand dekantiert und die resultierende Zellsuspension mit den entsprechenden Primärantikörpern in einer 1:100 Verdünnung für 30min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschritt mit Perm/Wash-Puffer (3min, 1600U/min) erfolgte die Markierung mit den Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern in einer 1:100 Verdünnung für 30min bei RT unter Lichtausschluss. Der Ansatz wurde anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und in 1ml Fixierungslösung (1% Formalin in PBS) bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Entsprechende Kontrollansätze zur Einstellung der Messschranke wurden in gleicher Weise, jedoch ohne Inkubation mit Primärantikörpern hergestellt. Extrazelluläre Färbungen wurden nach gleichem Schema ohne Permeabilisierung mit PBS durchgeführt.

Primär-Antikörper	Klon/Bezeichnung/Ursprung	Bezugsquelle	Charakteristik
'cleaved' Caspase-3	ASP175 Kaninchen	Cell Signaling Technology	Apoptose-Schlüssel-Exekutionsprotease
Caspase-8	- Kaninchen	Santa Cruz	Initiator-Protease des 'Extrinsic Pathways'
'cleaved' Caspase-9	Asp353 Kaninchen	Cell Signaling Technology	Initiator-Protease des 'Intrinsic Pathways'
'cleaved' PARP-1	Asp214 Kaninchen	Cell Signaling Technology	PARP-1 Spaltprodukte durch Caspase3- 'Cleavage'
TNF-R1	H-271 Kaninchen	Santa Cruz	Apoptose-induzierender TNF-Rezeptor
TNF-R2	- Ziege	R&D Systems, Wiesbaden, BRD	'Survival'-vermittelnder TNF-Rezeptor
p53	G59-12 Maus	BD Biosciences	Tumorsuppressor-Protein, involviert in die Regulation apoptotischer Prozesse
HIF-1 α	H-206 Kaninchen	Santa Cruz	Induzierbare Untereinheit des HIF- Transkriptionsfaktors
iNOS	N-20 Kaninchen	Santa Cruz	Ca ²⁺ -abhängige, induzierbare Stickstoff- monoxid-Synthase
HO-1 (HSP32)	- Kaninchen	StressGen, Glan- ford, Kanada	induzierbare Isoform der Hämooxygenase ('Heatshock' Protein 32)
HSP70	- Kaninchen	DAKO Cytomation	Stress-induzierbares Haupt-'Heatshock' Protein 70
BrdU	Ab-2 Maus	Oncogene	Thymidin-Basenanalogen, Einbau in replizie- rende Zellen
PCNA	PC10 Maus	DAKO Cytomation	Co-Faktor der DNA-Polymerase- δ in S-Phase, assoziiert mit DNA-'Repair'
Ki67	MIB5 Maus	DAKO Cytomation	in G ₁ , S, G ₂ , M-Phase exprimiertes Zellzyklus- protein

Tab. 5: Übersicht über die für die Durchflusszytometrie verwendeten Primärantikörper

4.5.5.1 Bromo-Deoxyuridin (BrdU)-Einbau:

Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls schloss sich eine BrdU-Inkubationszeit von 0,5 bzw. 4h wie in 4.4.2.1 beschrieben an. Nach erfolgter DNA-Denaturierung und Neutralisierung wurde die weitere Prozedur nach dem Protokoll für intrazelluläre Fluoreszenzfärbung durchgeführt.

4.6 Photometrie

Absorptionsmessungen im sichtbaren und im UV-Bereich beruhen auf Elektronen-Übergängen im Makromolekül. Mathematisch wird die optische Absorption durch das Lambert-Beersche Gesetz formuliert:

$$\ln I_0/I = A = \epsilon \times c \times d$$

I₀:	Intensität des eingestrahnten Lichts
I:	Intensität des gemessenen Lichts
A:	Absorption
ε:	molarer Absorptionskoeffizient (cm ² x mol ⁻¹)
c:	Konzentration der absorbierenden Moleküle (mol x l ⁻¹)
d:	Absorptionsweglänge (cm)

4.6.1 WST-1-Test

Zur Bestimmung der Zellproliferation können verschiedene Messprinzipien eingesetzt werden. Eine weit verbreitete Methode ist die Bestimmung des radioaktiv-markierten [³H]-Thymidin-Einbaus während der DNA-Synthese-Phase. Alternative Methoden sind die Messung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nukleinbasenderivaten (z. B. BrdU) und der indirekte Nachweis über die Stoffwechselaktivität (z. B. MTT, WST-1).

Das Zellproliferationsreagenz WST-1 gehört zur Stoffgruppe der Tetrazoliumsalze und wird durch Katalyse von mitochondrialen Dehydrogenasen zu dem dunkelroten Farbstoff Formazan reduziert, dessen Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm detektiert wird. Eine Referenzmessung wird bei einer Wellenlänge > 600nm durchgeführt. Die Absorption des gebildeten Formazans ist der Anzahl metabolisch aktiver Zellen direkt proportional und kann als indirektes Maß für die Zellproliferation herangezogen werden.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 3x10⁴ in 100µl Medium/Well in einer 96-Well-Platte (Nunc) ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurde die gleichmäßige Aussaat über Absorptionsmessung im ELISA-Reader (ASYS HITECH DigiScan, Deelux Labortechnik, Gödensdorf, BRD) überprüft. Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls erfolgte die Zugabe von 10µl WST-1-Reagenz (Roche) pro Well. Nach einer halbstündigen Brutschrank-Inkubation bei 37°C wurde das farbige Reaktionsprodukt durch Absorptionsmessung bei 450nm photometrisch quantifiziert. Zur Beurteilung der Stoffwechselaktivitätsrate wurden die Messungen nach 4h wiederholt. Zu Korrekturberechnungen wurde zudem die Absorption des Mediums bzw. Des Mediums mit TNF-α ohne Zellen in gleicher Weise bestimmt.

4.7 Potentiometrische pH-, pCO₂- und pO₂-Messung

Die Konzentrationsabhängigkeit von Redoxpotentialen kann zur Messung von Ionen-Konzentrationen verwendet werden. Mithilfe der Potentiometrie lassen sich elektrische Potentialdifferenzen bestimmen, die in Abhängigkeit von der Aktivität eines bestimmten Ions in der Lösung an der Phasengrenze zwi-

schen zwei Elektroden und Elektrolytlösungen auftreten. Potentiometrische Messungen basieren auf thermodynamische Zusammenhänge, für die die Nernstsche Gleichung, welche die Relation zwischen Potential und Aktivität beschreibt, eine zentrale Bedeutung hat. Da es nicht möglich ist, das Potential einer einzelnen Elektrode direkt zu bestimmen, erfolgt die Messung der Potentialdifferenz gegen eine Referenz- bzw. Bezugselektrode mit einem bekannten konstanten Potential.

Der pH-Wert und die partiellen CO₂ und O₂ Drücke (pCO₂, pO₂) wurden potentiometrisch mithilfe eines Blutgasanalysators (Chiron 348, Bayer AG, Leverkusen, BRD) direkt nach der 4-stündigen Kälteapplikation und zusätzlich nach einer Stunde Wiedererwärmung im Kulturüberstand der verschiedenen Versuchsgruppen überprüft. Ein Aliquot des Überstandes wurde unverzüglich nach Versuchsende in eine Glaskapillare aufgenommen und sofort dem Analysengerät zugeführt.

4.8 Western-Blot-Analyse

Beim Western- bzw. Immunoblotting handelt es sich um eine quantitative Methode zur Ermittlung der Proteinexpression in verschiedenen Proben. Nach der Auftrennung extrahierter Proteine in einer vertikalen Gelmatrix im elektrischen Feld werden die resultierenden Proteinbanden in einer zweiten horizontalen Elektrophorese vom Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert. Im Anschluss werden spezifische Targetproteine durch Färbung mit Enzym-konjugierten Antikörpern markiert und die Stärke der Proteinexpression über eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert. Durch Einstellung der gewonnenen Proteinextrakte auf eine identische Proteinkonzentration kann die Proteinexpression verschiedener Proben bei gleicher Beladung der Gel-taschen und gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ verglichen werden. Zur Überprüfung dieser Bedingungen können die verbleibenden Proteinbanden im Gel nach erfolgtem Membrantransfer durch eine Anfärbung mit Coomassie Brilliantblau und die transferierten Banden auf der Membran durch eine reversible Anfärbung mit Ponceau S visuell dargestellt werden. Zur weiteren Absicherung der Quantifizierbarkeit ist als interner Standard ein ubiquitär konstitutiv exprimiertes Protein (i. d. R. β -Actin) mitzuführen, das in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen muss. Ursprünglich wurde die Methode entwickelt, um das Molekulargewicht eines Proteinantigens zu bestimmen und die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem in einer Proteinmischung befindlichen Antigen zu überprüfen (TOWBIN et al., 1979). Die Bezeichnung "Western-Blotting" ist auf BURNETTE (1981) zurückzuführen.

4.8.1 Proteinextraktion

Die Qualität des zu trennenden Proteingemisches ist für das Gelingen eines Protein-Blotting-Experimentes von entscheidender Bedeutung. Je nach Fragestellung müssen unterschiedliche Proteinfraktionen gewonnen werden. Zu den löslichen Proteinen, die bei niedrigen Salzkonzentrationen ('low salt', Ionenstärke 0,15-0,2M) extrahierbar sind, gehört die Masse der Proteine des Zytosols und des Karyosols. Durch nicht-ionische Detergentien (Triton X 100, Nonidet P-40) werden die meisten

Membranproteine aus der hydrophoben Wechselwirkung mit den Membranlipiden gelöst und in Form komplexer Detergentmizellen in Lösung gebracht. Bei den meisten Standardextraktionen werden diese löslichen und membrangebundenen Proteine zusammen eluiert. Bei den salzlöslichen Proteinen ('high salt', Ionenstärke 0,5-1,5M) handelt es sich um Proteine, die über ionische bzw. polare Wechselwirkung mit anderen Molekülen in der Zelle assoziiert sind. Durch die hohen Salzkonzentrationen werden die elektrostatischen Interaktionen gestört und die Proteine, zu denen die Kernproteine bzw. die mit Nukleinsäuren assoziierte Proteine gehören, gehen in Lösung („salting in“). Proteine des Zytoskeletts (Intermediärfilamente) und der Kernlamina verbleiben bei allen üblichen Extraktionsmethoden aufgrund ihrer Unlöslichkeit im Rückstand.

Bei der mechanischen Zerkleinerung der Zellen und unter Einwirkung der Detergentien werden intrazelluläre Proteasen freigesetzt, welche die zu untersuchenden Proteine bereits vor der Analyse enzymatisch abbauen können. Zur Minimierung dieser Gefahr werden den Extraktionspuffern unmittelbar vor Einsatz Protease-Inhibitoren zugesetzt. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Serinproteasen-Inhibitor und EDTA als Metalloproteasen-Inhibitor sind in nahezu allen Extraktionspuffern enthalten. Je nach Empfindlichkeit der zu untersuchenden Proteine werden noch weitere Inhibitoren mit engerem Wirkungsspektrum eingesetzt: Pepstatin A (Pepsin-/Cathepsin D-Inhibitor), Leupeptin (Plasmin-/Trypsin-/Cathepsin-B-Inhibitor) oder Aprotinin (Kallikrein-/Trypsin-/Chymotrypsin-/Plasmin-Inhibitor). Außerdem kann dem Extraktionspuffer Dithiotreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol zur Verhinderung der Oxidation von Thiolgruppen durch direkten Kontakt mit Luftsauerstoff zugefügt sein.

Zur Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (lösliche zytoplasmatische und nukleäre sowie membrangebundene Proteine) wurden nach Durchführung des allgemeinen Versuchsprotokolls sowohl die im Kulturüberstand befindlichen als auch die adhärennten Zellen quantitativ zur Proteinanalyse gewonnen. Nach Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA bzw. Accutase und Neutralisierung mit Vollmedium wurden die Zellen dreimal mit 4°C-kaltem sterilen PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 300 μ l Lysispuffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA; 0,5% Triton X 100; 0,02% NaN₃ (Roth)) mit 3 μ l Proteinaseinhibitor-Cocktail (Sigma) und 6 μ l 100mM PMSF (Roth) resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, BRD) bei 13000U/min (16000xg), 4°C, wurden die Überstände abpipettiert und Aliquots bei -20°C kryokonserviert bzw. auf Eis gelagert sofort zur Proteinbestimmung eingesetzt.

4.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Es existieren verschiedenen Methoden, Proteine in Lösungen quantitativ zu bestimmen. Die einfachste Bestimmung ist die direkte Messung der Extinktion bei 280nm, die auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan beruht. Aufgrund des unterschiedlichen Anteils dieser Aminosäuren führt dies jedoch zu z. T. sehr starken Unterschieden im molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) zwischen verschiedenen Proteinen und setzt außerdem relativ gereinigte Protein-

lösungen voraus. Die colorimetrischen Methoden nach Lowry oder Bradford erlauben Proteine auch in komplexen Mischungen und Rohextrakten quantitativ zu bestimmen. Die Methode nach LOWRY et al. (1951) beruht auf einer Farbreaktion mit Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz und Kupfersulfat. In alkalischer Lösung bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex, wobei Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird. Cu^+ reagiert mit dem Folin-Reagenz durch Reduktion von Heteropolysäuren zu einem tiefblauen Farbkomplex, dessen Konzentration photometrisch gemessen wird und der Proteinkonzentration proportional ist.

Die Messlösungen wurden unmittelbar vor der Bestimmung frisch angesetzt. Reagenz A (10g $\text{Na}_2\text{CO}_3/500\text{ml}$ 0,1M NaOH, Roth) wurde in einer 50+1 Verdünnung mit Reagenz B (0,5g KNa-Tartrat, 0,25g Cu-Sulfat*5 $\text{H}_2\text{O}/50\text{ml}$ A. dest, Merck) gemischt. 250 μl dieser Lösung wurden 50 μl Proteinextrakt, der i. d. R. 1:10 mit A. dest vorverdünnt war, zugesetzt und sofort 15s intensiv gemischt (Vortex, Heidolph Reax top, Fisher Scientific). Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte der Zusatz von 25 μl der 1:2 mit A. dest verdünnten Folinlösung (Sigma) und eine sofortige intensive Durchmischung (Vortex) über 15s. Der Ansatz wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption des entstandenen Farbkomplexes photometrisch (GeneQuant pro, Amersham pharmacia biotech, Freiburg, BRD) bei einer Wellenlänge von 595nm gegen A. dest gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Zu jedem Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In der Regel lagen die gemessenen Konzentrationen zwischen 2 und 4mg/ml.

4.8.3 Proteindenaturierung

Niedermolekulare Thiole wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) bewirken eine Reduktion von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten und führen zur Entfaltung der Proteine und ggf. zur Zerlegung in ihre Untereinheiten. Durch den Zusatz des amphiphatischen Detergentes SDS (Natriumdodecylsulfat), das sich mit dem hydrophoben Ende an die entfalteten Polypeptidketten anlagert, wird die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit entstehen (ca. 1,4g SDS/g Protein).

Die auf Eis gelagerten Proteinextrakte wurden nach der Konzentrationsbestimmung mit A. dest verdünnt, so dass die Konzentration zwischen 1 und 2 μg Protein/ μl betrug. Die verdünnten Extrakte wurden mit 2x 'Sample Buffer' nach Laemmli (4% SDS; 20% Glycerin; 10% β -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 0,125M TRIS-HCl pH 6,8; Sigma) versetzt und 5min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die denaturierten Extrakte ($c = 0,5\text{-}1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein) wurden bei -20°C kryokonserviert oder sofort in die anschließende Proteinanalyse eingesetzt.

4.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Grundlegendes Prinzip der elektrophoretischen Trennung von Proteinen ist die Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Man unterscheidet zwischen trägerfreien und trägergebundenen Systemen, wobei zur Trennung von Proteinen nahezu ausschließlich Polyacrylamid als Träger verwendet

wird, das durch radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden N, N'-Methylenbisacrylsäureamids („Bis“) eine dreidimensionale Matrix ausbildet.

Die zugrundeliegende Vinyladdition-Polymerisationsreaktion wird durch freie Radikale gestartet, die bei der Wechselwirkung von Ammoniumpersulfat (APS) mit dem tertiären aliphatischen Amin Tetramethylethyldiamin (TEMED) entstehen. TEMED katalysiert zunächst den Zerfall von APS in Sulfatradikale, die dann wiederum TEMED aktivieren, indem sie ihm ein Elektron entreißen. Die aktivierten TEMED-Moleküle fungieren dann als Startradikale, indem sie mit den Acrylamidmonomeren reagieren und die radikalische Kettenreaktion einleiten. Dabei entstehen mehr oder weniger lange Polymerketten sowie Quervernetzungen durch den gelegentlichen Einbau des bifunktionellen Bisacrylamid in zwei wachsenden Ketten. Die Porengröße des Gels ergibt sich aus dem Verhältnis der zugesetzten Konzentrationen an Acrylamid und Quervernetzungsreagenz und wird je nach Molekülgröße der zu trennenden Proteine variiert.

Die elektrophoretische Beweglichkeit geladener Teilchen im Gel ist abhängig von Ladung, Größe und Form des Moleküls, der Porengröße des Gels, dem pH-Wert, der Temperatur und Ionenstärke des Puffers und der elektrischen Feldstärke. Proteine besitzen als amphotere Makromoleküle eine unterschiedliche pH-abhängige Gesamtladung, die sich aus unterschiedlichen Anteilen an positiv (Lysin, Arginin) und negativ geladenen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) sowie ionisierbaren Aminosäureresten (z. B. Histidin, Cystein) ergibt. Da die elektrophoretische Mobilität von Proteinen in einer porösen Gelmatrix in großem Ausmaß von der Proteinnettoladung abhängig ist, wird durch Behandlung mit dem anionischen Detergent SDS in Verbindung mit schwefelbrückenspaltenden Thiolreagenzien (z. B. β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol) eine Auftrennung rein nach Molekulargewicht ermöglicht, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit dann zudem nur noch von der Porengröße des Gels beeinflusst wird.

Gelelektrophoresen können kontinuierlich und diskontinuierlich durchgeführt werden. Die Diskontinuität bezieht sich auf vier Parameter: Gelstruktur, pH-Wert und Ionenstärke der Puffer sowie Art der Ionen im Gel- und Elektrodenpuffer. Liegen die elektrophoretischen Mobilitäten verschiedener Proteine in einem engen Bereich, so kann - vor der eigentlichen Trennung der Komponenten im Trenngel - ihre Konzentrierung in einer scharfen Bande im Sammelgel durch Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme in Kathoden- und Gelpuffer erzielt werden. Die Proteine passieren zunächst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Der Sammelgel-Puffer (TRIS-HCl, pH 6,8) enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteine in der Probe (Probenpuffer, TRIS-HCl, pH 6,8). Der Elektroden-Puffer (TRIS-Glycin, pH 8,8) hingegen enthält Glycin-Ionen, deren Wanderungsgeschwindigkeit geringer ist als die der Proteinproben. Als Resultat erzeugen die schneller wandernden Cl⁻-Ionen zwischen sich und den langsamer wandernden Glycin-Ionen eine Zone geringerer Ionendichte, d. h. geringerer Leitfähigkeit bzw. hohen elektrischen Widerstands. Der höhere Spannungsgradient in dieser Zone ermöglicht den Proteinen schneller zu wandern, was sich in einem Fokussieren zwischen den Chlorid- und Glycin-Ionen in einer

scharfen Bande äußert. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel (Trenngelpuffer, TRIS-HCl, pH 8,8), das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert als das Sammelgel besitzt, wandern die Glycin-Ionen aufgrund ihrer pH-abhängigen negativen Ladung an der Front und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Alle Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach LAEMMLI (1970) mit einer generellen Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und einer je nach Molekulargewicht des Targetproteins variierenden Acrylamidkonzentration zwischen 8 und 12% im Trenngel durchgeführt (30% Acrylamid/Bis Solution, 29:1, BioRad, München, BRD; Tab. 6).

Zusätze [ml]	Sammelgel 5%	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
30% Acrylamid/Bis	0,67	2,7	3,3	4,0
Trenngelpuffer		2,5	2,5	2,5
Sammelgelpuffer	0,5			
A. dest	2,7	4,6	4,0	3,3
10% SDS	0,04	0,1	0,1	0,1
10% APS	0,04	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,02	0,02	0,02	0,02

Tab. 6: Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachgelapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) nach Anleitung des Herstellers gegossen. Nach Einfüllen der Trenngellösung wurden vorsichtig ca. 200µl Isopropanol (Roth) überschichtet, um eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Luftsauerstoff zu verhindern und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde nach Entfernung des Alkohols das Sammelgel in die Apparatur gegossen. Die Geltaschen, die mit einem sofort ins Sammelgel zentriert eingesteckten Teflon-Kamm (10 Zähne, 4mm x 1cm x 0,75mm, BioRad) ausgeformt wurden, erlauben ein maximales Beladungsvolumen von 30µl, so dass bei jeder Analyse 15 bzw. 30µg Protein/Geltasche aufgetragen wurden. Während der 45-minütigen Polymerisation wurden 10µl eines Proteinmolekulargewichtstandards (Rainbow High Range, Amersham) mit 10µl Laemmli 2x 'Sample Buffer' (Sigma) verdünnt und in gleicher Weise wie die Proteinextrakte im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach Beladung des Gels wurde die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II) in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125M TRIS Base; 0,96M Glycin; 0,5% SDS, Roth) durchgeführt. Die erforderliche Niederspannung wurde mit Hilfe eines speziellen Netzgerätes für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) generiert. Zur Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde eine anfängliche Spannung von 100V gewählt. Nach ca. 15min wurde diese zur Passage durch das Trenn-

gel für ca. 1h auf 140V erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde beendet, wenn die blaue Lauf-front der Bromphenolblau-Bande des 'Sample Buffers' das untere Gelende erreichte. Nach Beendi-gung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entnommen und in einem Transferpuf-ferbad (12mM TRIS Base, 96mM Glycin, Roth) für das anschließende Membranblotting äquibriert.

4.8.5 Blotting

Ziel dieser Methodik ist es, die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine syn-thetische Membran zu transferieren, so dass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters resultiert. Die auf der Membrantextur gebundenen Targetproteine sind dann einem immunochemischen Nach-weis mit spezifischen Antikörpern leicht zugänglich. Diese Technik ermöglicht somit, das hohe Auf-lösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Nachweisspezifität immunologischer Sonden zu kombinieren.

Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers gibt es mit dem 'Wet'- oder Tank-Blot und dem 'Semi-Dry'-Blot zwei Verfahren, die vergleichbare Transfer-Qualität liefern (TOVEY und BAL-DO, 1987). Ein 'Wet'-Blot nimmt i. d. R. längere Zeit in Anspruch und erfordert größere Mengen an Transferpuffer, dafür ist der Transfer sehr schonend und das transferierte Protein wird aufgrund des großen Puffervolumens nur geringfügig erwärmt. Für die Wahl der Membran sind prinzipiell alle Ma-terialien geeignet, die zur Proteinbindung befähigt sind. Die Bandbreite erstreckt sich von Nitro-cellulose, Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) und Nylon bis hin zu Polypropylen und diazotiertem Pa-pier. Die hydrophobe PVDF-Membran besitzt sehr hohe Proteinbindekapazität, eine hohe Reißfes-tigkeit, gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln und ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Die Äquibrierung der Membran mit Methanol erleich-tert durch Reduktion der Oberflächenspannung ihre Benetzung und lockert die Bindung zwischen Protein und SDS, wodurch die Proteinbindung an der Membran verbessert und die Transferrate gesteigert werden kann. Für die Wahl des Transferpuffers gibt es ebenfalls mehrere Alternativen, bei denen zu beachten ist, dass kein Natriumchlorid oder andere gut leitende Salze im Puffer enthalten sind, da die resultierenden hohen Ströme einen schlechten Transfer und Überhitzung bewirken könnten. Der pH-Wert des Transferpuffers kann für das 'Wet'-Blotting in Bereichen zwischen 7,3 und 11 liegen (BOLT und MAHONEY, 1997); es ist lediglich zu berücksichtigen, dass sich der pH-Wert des Trans-ferpuffers vom isoelektrischen Punkt der zu transferierenden Proteine unterscheidet.

Der horizontale Proteintransfer erfolgte als Tank-Blotting in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad). Die PVDF-Membran (0,2µm Porengröße, BioRad) wurde zunächst zum Ausgleich von Oberflächenladungen für 20s in Methanol (Roth) gebadet und sofort mit A. dest abgespült. Danach erfolgte eine 10-minütige Äquibrierung in Transferpuffer (25mM TRIS Base, 192mM Glycin in A. dest). Das Blot-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut: Ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm wurde in die Blotkassette eingelegt, darauf ein getränktes Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, BRD). Anschließend wurden die äquibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei positioniert und wiederum ein getränktes Filterpapier und ein Schwamm eingelegt. Nach Verschließen

der Sandwich-Kassette wurde diese derart in der Blotkammer ausgerichtet, so dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Um lokale Überhitzungen zu vermeiden und eine gleichmäßige niedrige Temperatur zu erhalten, wurde ein Eis-’Spacer’ in die Blotkammer eingestellt und auf einem Magnetrührer gearbeitet. Die Blotkammer wurde vollständig mit Transferpuffer aufgefüllt und die Elektroden am Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) angeschlossen. Der Proteintransfer wurde nach 2h bei einer angelegten konstanten Spannung von 50V (Anfangsstromstärke 800mA/2 Gele) beendet. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T Puffer (1,5mM TRIS Base pH 7,5; 1% NaCl; 0,01% Tween 20 (Roth) in A. dest) bei 4°C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

4.8.6 Detektion

Die Detektion der Targetproteine erfolgt durch eine spezifische Antikörper-Färbung der membrantransferierten Proteine. Zur Saturierung überschüssiger Proteinbindestellen wird die Membran mit einem Blockierungsreagenz behandelt, um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Als Blockierungsreagenzien können für die Detektion nicht relevante Proteinlösungen (z. B. entfettete Trockenmilch, Rinderserumalbumin) und nichtionische Detergentien (z. B. Tween 20) eingesetzt werden. Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgt im Anschluss durch die Bindung eines spezifischen unkonjugierten Primärantikörpers am Targetprotein und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper zur Signalverstärkung. Bei der Wahl von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern lässt sich zur Detektion ein Chemilumineszenz-Substrat einsetzen, das enzymatisch zu einem Licht emittierenden Produkt umgesetzt wird. Durch Exposition eines Röntgenfilms kann die Position und Expressionsstärke des Targetproteins sichtbar gemacht werden, indem die Schwärzung des Röntgenfilms durch die proteinkonzentrationsabhängige emittierte Strahlung erfolgt. Eine weitere Signalverstärkung wird dadurch erzielt, dass die energiereichen Elektronen, die den Film durchdringen, in der Verstärkerfolie der Röntgenkassette vollständig absorbiert werden und dort eine feste phosphoreszierende Verbindung anregen; das bei der anschließenden Relaxation emittierte Licht belichtet den Röntgenfilm erneut.

Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in einer 5%igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T für 30min inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper i. d. R. für 120min bei Raumtemperatur inkubiert (Tab.7). Die Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T. Die HRP-konjugierten Schaf-anti-Maus-IgG- bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper entstammten dem ECL-Western Blotting Analysis System-Kit (Amersham pharmacia biotech) und wurden i. d. R. in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. Nach einer 90-minütigen Inkubation wurden die Membranen fünfmal in TBS-T gewaschen und anschließend der Chemilumineszenzreakti-

on unterzogen. Dazu wurden die feuchten Membranen mit einem 1:2 Gemisch des ECL-Reagenzes 1 und 2 (3-Aminophthalhydrazid + unbekannter Chemilumineszenzverstärker mit H_2O_2) mit einer Einwirkdauer von einer Minute inkubiert. Nach Entfernung des Reagenzes wurden die in Autoklavierfolie eingepackten Membranen zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham pharmacia biotech) in einer Röntgenkassette positioniert. Die Expositionszeiten waren von der Signalstärke der zu detektierenden Proteine abhängig und wurden zwischen 1 und 20min variiert. Die Signale der belichteten Filme wurden anschließend in Entwicklungs- bzw. Fixierungsbädern (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, BRD) visualisiert und haltbar gemacht.

Primär-Antikörper	Klon/Bezeichnung/Ursprung	Bezugsquelle	Verdünnung/Inkubation	Charakteristik
'cleaved' Caspase-3	ASP175 Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:800 2h RT	Apoptose-Schlüssel- Executionsprotease
TNF-R1	H-271 Kaninchen	Santa Cruz	1:200 2h RT	Apoptoseinduzierender TNF- Rezeptor
PCNA	PC10 Maus	DAKO Cytomation	1:250 2h RT	Co-Faktor der DNA- Polymerase- δ in S-Phase, asso- ziiert mit DNA-'Repair'
NF κ B	- Maus	Chemicon, Hofheim	1:300 2h RT	Transkriptionsfaktor 'Nuclear factor κ B' (p65-Untereinheit)

Tab. 7: Auflistung der für die Western-Blot-Analysen eingesetzten Antikörper

Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde der monoklonale β -Actin-Antikörper Klon AC-15 (Sigma) als interner Standard eingesetzt. β -Actin ist eines der höchst konservierten eukaryotischen Proteine und kann aufgrund seiner konstanten intrazellulären Verteilung im Zytoskelett als Proteinkonzentrationsstandard herangezogen werden. In sämtlichen Western-Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte auf gleiche β -Actin-Konzentrationen korrekturgerechnet. Die Antikörperkonzentration betrug für alle Analysen 1:5000.

4.8.7 Quantitative Auswertung

Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm 'Quantity One – Geldoc' (BioRad). Die quantitative Analyse der Proteinmuster wurde als Vergleich der relativen Mengenverhältnisse der einzelnen Fraktionen durch densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption vorgenommen, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung gemessen wurden. Die ermittelten Daten wurden über den internen β -Actin-Standard korrigiert.

4.9 RT-PCR

Die RT-PCR ist ein semiquantitatives Verfahren, um die Transkriptionsstärke verschiedener Gene, aufgrund des Ausmaßes der synthetisierten mRNA, zu bestimmen. Prinzip dieses Verfahrens ist die Extraktion der Gesamt-RNA aus den entsprechenden Versuchsansätzen, die auf gleiche RNA-Gehalte eingestellt werden, so dass exakt die gleiche Menge an Gesamt-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase (rT) quantitativ in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird (RAPPOLEE et al., 1989; CHEN und FUGGLE, 1993; TESTONI et al., 1996). Werden bei dieser cDNA-Erststrangsynthese Hexanukleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung, sog. 'random hexamere', als Primer verwendet, können diese entsprechend ihrer individuellen Sequenz an den verschiedensten Stellen eines m-RNA-Moleküls hybridisieren und eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Benutzt man einen oligo-T-Primer, der mit dem polyA-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer mRNA hybridisiert, so lässt sich ebenfalls eine der mRNA komplementäre DNA (RNA/DNA-Hybrid-Erststrang) generieren. Wird der RNA-Strang partiell abgebaut, kann der Erststrang als 'template' für die DNA-Polymerase I dienen. Die resultierende doppelsträngige DNA stellt ein direktes Abbild der zellulären mRNA-Transkripte dar.

In der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient die gebildete cDNA als Matrize der folgenden Strangsynthesen, so dass die amplifizierten PCR-Produkte quantitativ vergleichbar sind. Die PCR erfolgt mit Primern, die spezifisch für die cDNA ausgewählter Marker-Gene sind. Unter Verwendung dieser genspezifischen Primern kann die Quantifizierung des jeweiligen Transkripts über die selektive Amplifikation der zugehörigen cDNA erfolgen. Unter der Voraussetzung, dass die Zyklenzahl nicht im Bereich der Sättigung, sondern im linearen Bereich liegt, ist die Bandenstärke des PCR-Produkts auf einem Agarosegel direkt proportional zum Anteil der entsprechenden mRNA an der Gesamt-RNA. Zur Kontrolle, dass in allen Ansätzen gleich viel RNA eingesetzt wurde, wird ein ubiquitär konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen (z. B. β -Actin) amplifiziert, das in allen Ansätzen gleiche Bandenstärke aufweisen muss. Im Vergleich zu anderen RNA-Nachweisverfahren, wie z. B. der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensitivität der RT-PCR erheblich größer.

4.9.1 RNA-Extraktion

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Die zusätzliche Hydroxylgruppe im Ribosering bewirkt diese Anfälligkeit für hydrolytischen Abbau, besonders in stark alkalischer Lösung oder in Anwesenheit von Lewis-Säuren (z. B. Mg^{2+} -Ionen) und ist zusätzlich verantwortlich für das Vorliegen der weitgehenden Einzelsträngigkeit der RNA und der daraus resultierenden zusätzlichen Anfälligkeit für exo- und endonukleotischen Abbau. Ein kritischer Schritt bei der Isolierung von RNA aus lebenden Zellen ist daher der rasche Zellaufschluss, bei dem endogene Ribonukleasen (RNasen) möglichst vollständig inaktiviert werden müssen, um den Abbau der zellulären RNA zu verhindern. Das ist von besonderer Bedeutung, da Ribonukleasen extrem stabile Enzyme sind und die mRNA einer Zelle nur einen geringen Anteil der Gesamt-RNA ausmacht. Eine übliche Methode ist der Aufschluss mit Puffern, die chaotrope Salze wie Guanidin-Isothiocyanat ent-

halten, das als potentes Denaturierungsmittel die zellulären RNasen inaktiviert (CHIRGWIN et al., 1979). Auch die Extraktion mit Phenol/ CHCl_3 -Mischungen, die Behandlung der Proben mit Proteinase K oder mit Polyanionen (Heparin, Polyvinylsulfat, Tonerden) in hoher Konzentration können zur Inaktivierung von RNasen eingesetzt werden (PALMITER et al., 1970; COX, 1976; BLUMBERG, 1987).

Gesamt-RNA wurde durch eine Einzelschrittmethod nach CHOMOCZYNSKI und SACCHI (1987) bzw. der von CHOMOCZYNSKI (1993) modifizierten Schnellmethode mit Hilfe des phenol- und guanidin-isothiocyanathaltigen Monophasenreagenz Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) isoliert. Nach Homogenisierung und Lysierung der Zellen wird das Zelllysate nach Zusatz von Chloroform und anschließender Zentrifugation in eine wässrige RNA-haltige, eine DNA-haltige Interphase und in eine proteinhaltige organische Phase separiert. Aus der wässrigen Phase kann die RNA mit Hilfe einer Isopropanolfällung präzipitiert werden.

Der Zellaufschluss erfolgte direkt im Kulturgefäß. Nach Durchführung des Versuchsprotokolls wurden die Zellüberstände in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit 1600U/min (Universal 30 F, Hettich, 400xg) 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert und dekantiert. Die adhärenen Zellen (ca. 1×10^7) wurden mit 3ml Trizol-Reagenz pro Petrischale (100/20mm) versetzt, homogenisiert und lysiert. Das Zelllysate wurde mit dem zuvor gewonnenen Zellpellet aus dem jeweiligen Überstand vereint und 5min bei Raumtemperatur zur weiteren Lyse und Dissoziation der Nukleoprotein-komplexe inkubiert. Nach Zufügen von 0,6ml Chloroform (Roth) erfolgte nach einer sofortigen Durchmischung (15s Vortex, Heidolph Reax top) und einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur von 3min die Phasentrennung durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 11000U/min (10500xg). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene RNA mit 1,5ml Isopropanol in einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur ausgefällt. Die anschließende Zentrifugation bei 10000U/min (9500xg), 4°C führte zu einem sichtbaren RNA-Pellet, das nach Dekantierung des Überstands zur Entfernung von Salzen durch Zugabe von 3ml Ethanol (75% in DNase-RNase-freiem Wasser, 18 Megohm, Sigma) nach viermaligem vorsichtigen Kippen des Reaktionsgefäßes und 5-minütiger Zentrifugation bei 8000U/min (6000xg), 4°C gewaschen wurde. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig entfernt und das gereinigte Pellet nach ca. 5min Lufttrocknung in 20µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Extrakte wurden sofort zur photometrischen Konzentrationsbestimmung verdünnt oder bei -80°C kryokonserviert.

4.9.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA-Extrakte wurde durch eine photometrische Messung aufgrund der UV-Absorption aromatischer Basen der Nukleinsäuren bestimmt. Durch Messung der Absorption bei 260nm lässt sich für einzelsträngige, kurze DNA eine relativ genaue Konzentration ermitteln, während sich für RNA- und längere DNA-Fragmente nur eine Abschätzung treffen lässt. Eine Absorption von 1 einer Lösung entspricht einer Konzentration von 33µg/ml einzelsträngiger (ss)DNA, 50µg/ml doppelsträngiger (ds)DNA bzw. 40µg/ml RNA.

Um Messfehler durch Verunreinigungen von Proteinen oder DNA, die ebenfalls im UV-Bereich absorbieren, auszuschalten, wurden Referenzmessungen bei den Wellenlängen 230 und 280nm durchgeführt. Mithilfe des Absorptionsquotienten 260nm/280nm wurde der Reinheitsgrad der gewonnenen RNA überprüft; nur Extrakte mit einem Quotienten von 1,5 bis 1,8 wurden für die anschließende Analyse herangezogen.

Frisch isolierte oder kryokonservierte, auf Eis aufgetaute RNA-Extrakte wurden mit DNase-RNase-freiem-Wasser 1:80 verdünnt und die RNA-Konzentration in einer Vierfachbestimmung photometrisch im RNA-Determinationsprogramm am Spektralphotometer GeneQuant pro (Amersham pharmacia biotech) bestimmt. Die RNA-Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$c = A_{260} \times F \times K$$

c : Konzentration der Probe [$\mu\text{g/ml}$]
A₂₆₀ : gemessene Absorption bei 260 nm
F : Verdünnungsfaktor
K : Konzentration bei $A_{260} = 1$ für RNA ($40\mu\text{g/ml}$)

Die erzielten Ausbeuten für eine große Petrischale (ca. 1×10^7 Zellen) lagen zwischen $60\text{-}120\mu\text{g}$ ($3\text{-}6\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

4.9.3 RT-Reaktion

Eine komplementäre DNA (cDNA) entsteht durch reverse Transkription, bei der mRNA als Matrize zur Erstellung einer DNA-Kopie dient. Vermittelt wird dieser Prozess von einem retroviralen Enzym, der reversen Transkriptase.

Als Initiationsprimer wurde ein oligo-T-Primer, der mit dem polyA-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer mRNA hybridisiert, eingesetzt. Alle RNA-Extrakte wurden für die reverse Transkriptase-Reaktion auf einen Gehalt von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und mit der M-MuLV (RNase H⁻)-Transkriptase (Peqlab, Erlangen, BRD), Reaktionsoptimum bei 42°C , in komplementäre DNA umgeschrieben. Die Reagenzien zum Ansatz von $20\mu\text{l}$ RT-Reaktion wurden wie folgt gemischt.

Ansatz für RT-Reaktion (20 μl):

RNase-freies H ₂ O (18 Megohm)	9,2 μl	DTT 50mM (Peqlab)	2,0 μl
10x Reaktionspuffer (Peqlab)	2,0 μl	Oligo-T-Primer 50 μM (PE Biosystems)	1,0 μl
MgCl ₂ 25mM (Peqlab)	2,0 μl	RNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,0 μl
NTP-Mix 10mM (Peqlab)	2,0 μl	Reverse Transkriptase (100U/ μl)	<u>0,3μl</u>
RNase-Inhibitor 30U/ μl (Peqlab)	0,5 μl		20 μl

Die RT-Ansätze wurden 10min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend 15min in einem Heizblock (Techne Dri-Block DD-2a, Cambridge, UK) bei 42°C temperiert. Zur Denaturierung der cDNA und des Enzyms wurden die Ansätze 5min im kochenden Wasserbad behandelt und anschließend 15min auf Eis inkubiert. Die thermostabilen cDNA-Extrakte können bei 4°C aufbewahrt werden.

4.9.4 Primer

Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR hängen im hohen Maße vom Design der verwendeten Primer ab. Ein Primer sollte weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können. Die beiden gegenläufigen Primer sollten die gleiche Schmelztemperatur besitzen. Zur Überprüfung dieser Kriterien stehen verschiedene Computerprogramme zur Verfügung.

Die Sequenzen der Zielgene wurden der Sequenzdatenbank Nukleotid-GenBank/Pubmed (NCBI, National Center for Biotechnology Information) entnommen und mit Hilfe des Primer-Design-Programms DNASTAR 4.95 Primer Select (DNASTAR Inc., Madison, USA) geeignete Primer-Sequenzen abgeleitet (Tab. 8). Die von der Fa. Sigma-Genosys (Steinheim, BRD) synthetisierten Primer wurden in TE-Puffer (10mM TRIS-HCl pH 8, 1mM EDTA, Roth) gelöst und als 100µM Lösung bei -20°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Einsatz wurden sie auf eine Arbeitskonzentration von 10µM mit 18 Megohm-Wasser verdünnt.

Primer	Nukleotidsequenz	Produktlänge [bp]
Caspase-3	Sense 5'-TCTCGCTCTGGTACGGATGTGGA-3'	479
	Antisense 5'-TGCTGCAAAGGGACTGGATGAAC-3'	
p53	Sense 5'-CCGAGGCCGGCTCTGAGTATAACCACCATC-3'	371
	Antisense 5'-TCATTCAGCTCCCGGAACATCTCGAAGCG-3'	
β-Actin	Sense 5'-TGCTTCTAGGCGGACTGTTACTGA-3'	420
	Antisense 5'-GACGCGACCATCCTCCTCTTAG-3'	

Tab. 8: Sequenzen und Produktlängen der für die RT-PCR verwendeten Primer

4.9.5 PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische *in vitro* Herstellung millionenfacher Kopien bestimmter DNA-Fragmente, so dass durch die Amplifikation sehr geringe DNA-Mengen einer Analyse zugänglich gemacht werden können. Die Vervielfältigung der DNA-Fragmente ähnelt dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation: Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert vom 3'-Ende einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, ausgehend von synthetischen genspezifischen DNA-Oligonukleotid-Primern, die an der Matrize hybridisieren, einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden.

Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang wird zunächst bei 95°C denaturiert. An die generierten Einzelstränge hybridisiert bei niedriger Temperatur je ein komplementäres Oligonukleotid einer Länge von 15 bis 30bp ('annealing'), die als Primer für eine DNA-Polymerase fungieren. Ansetzend am 3'-Ende der Primer wird jeder Einzel-

strang wieder zum Doppelstrang aufgefüllt ('extension'). Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen (z. B. *Taq*-, *Pfu*-, *Pwo*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* bzw. *Pyrococcus woesei*) ermöglicht die zyklische Wiederholung der Denaturierungs-, 'annealing'- und 'extension'-Phasen, wodurch die exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments erreicht wird (SAIKI et al., 1988; MULLIS, 1990).

Die Spezifität der PCR wird allein durch die Nukleotidsequenz der Primer und die Wahl der optimalen 'annealing'-Temperatur erreicht. Ist die 'annealing'-Temperatur zu niedrig gewählt, treten aufgrund unspezifischer Primerbindung häufig Nebenprodukte auf, während bei zu hohen Temperaturen die Gefahr besteht, dass überhaupt keine Primerbindung an der DNA-Matrize stattfindet. Die maximal zu wählende 'annealing'-Temperatur kann unter Einbeziehung der Schmelztemperatur T_m , bei der ein gegebener DNA-Doppelstrang zu 50% denaturiert ist, also einzelsträngig vorliegt, abgeleitet werden. T_m kann bis zu einer Größe von ca. 25bp annäherungsweise anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren nach folgender Formel errechnet werden:

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{C} + \text{G}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T})]$$

T_m : Schmelztemperatur
 C : Zytosin
 G : Guanin
 A : Adenin
 T : Thymin

Oberhalb diesem maximalen Wert für die 'annealing'-Temperatur denaturieren die Primer und eine Bindung an das 'template' ist nicht mehr gewährleistet. Im allgemeinen wird eine 'annealing'-Temperatur empfohlen, die 5°C unter dem T_m -Wert liegt.

Die PCR wurde mit Ingredienzien der Firma Peqlab durchgeführt. Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz für 50µl PCR-Reaktion beschrieben:

DNase-freies H ₂ O (18 Megohm)	21,0µl	RT-Mix ('template')	20,0µl
10x Reaktionspuffer (Peqlab)	3,0µl	Primer sense 10µM	1,0µl
MgCl ₂ 50mM (Peqlab)	1,5µl	Primer antisense 10µM	1,0µl
NTP-Mix 10mM (Peqlab)	2,0µl	Taq Polymerase 5U/µl	<u>0,5µl</u>
			50µl

Die PCR wurde mit einem ThermoCycler (MasterCycler personal, Eppendorf, Hamburg, BRD) als Hot-Start-PCR (SAWADY Taq(H)-DNA-Polymerase, Peqlab) durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass die Reaktion im linearen Bereich abläuft, wurden in Vorversuchen die optimale DNA- (und Mg²⁺)-Konzentration und die Anzahl der Amplifizierungszyklen ermittelt.

Das prinzipielle Cycler-Programm wurde mit einer einmaligen initialen Enzymaktivierung und DNA-Denaturierung von 10min 95°C und anschließenden 29 Zyklen DNA-Denaturierung (20s 94°C), Primer-'annealing' (45s 60-65°C) und Nukleotid-'extension' (1min 72°C) gewählt. Die 'annealing'-Temperaturen wurden je nach Primerlänge und CG-Gehalt variiert (Tab. 9). Nach Beendigung des letzten Amplifizierungszyklus wurden die PCR-Produkte nach einer finalen 10-minütigen 'extension'-

Phase bei 72°C auf 4°C abgekühlt. Zur Kontrolle einer Kontamination der Reaktionszusätze wurde bei jeder PCR eine Wasserprobe mitgeführt, bei der anstelle des RT-Mixes RNase/DNase-freies H₂O zugesetzt war. Die amplifizierten thermostabilen PCR-Produkte wurden im Anschluss direkt in die DNA-Gelelektrophorese eingesetzt oder bei 4°C aufbewahrt.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10min	1
Denaturierung	94	20s	29
'annealing'	50-65	45s	29
'extension'	72	60s	29
Finale 'extension'	72	10min	1
Kühlung	4	∞	1

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten PCR-Temperaturen, Zeitintervalle und Zyklenzahlen

4.9.6 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese von DNA ermöglicht die analytische Auftrennung der negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Die Wanderung erfolgt aufgrund des Molekulargewichts in Richtung Anode (positiver Pol), wobei ein mitgeführter DNA-Molekulargewichtsstandard eine Zuordnung der Größe einer jeden DNA-Bande zulässt. Die elektrophoretische Mobilität der DNA im Gel verhält sich proportional zum negativen natürlichen Logarithmus der Anzahl an Basenpaaren im Molekül. Daneben beeinflussen die Porengröße des Gels und die angelegte Spannung die Wandergeschwindigkeit. Agarose, ein lineares Polysaccharid aus roten Meeresalgen, bildet bei Erwärmung in geeigneten Puffern und nachfolgender Abkühlung eine gelartige Polymermatrix, deren Porengröße in Abhängigkeit des zu detektierenden DNA-Molekulargewichts über die Konzentration der eingesetzten Agarosemenge variiert werden kann. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Banden erfolgt durch Anfärbung der Gele mit dem Nukleinsäure-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der zwischen die Nukleinbasen interkaliert und bei Anregung im UV-Bereich ein rot-orange leuchtendes Fluoreszenzlicht im sichtbaren Bereich (500-590nm) emittiert. Die Sensitivität der Detektion ist sehr hoch, die Nachweisgrenze liegt unter 5ng DNA.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in der Regel in einem 2% Agarose-Gel. Dazu wurde 1g Agarose (Roth) in 50ml 1x TBE-Puffer (1M TRIS-Borat, pH 8,3; 20mM EDTA; Roth) unter dreimaliger Mikrowellenbehandlung (600W, bis zum Aufschäumen) gelöst. Nach kurzer Abkühlung und Entgasung wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer (Sub-cell GT, Bio-Rad) mit kleinem Kamm (max. 15µl Beladungsvolumen) gegossen und nach einer Polymerisierungszeit von ca. 1h mit 15µl/Geltasche der entsprechenden cDNA-Proben beladen. Die Proben wurden zuvor mit einer 6x Gel 'loading solution' Typ I (Sigma) 1:6 verdünnt. Der 'loading'-Puffer enthält

40% Sucrose zur Beschwerung der Proben und je 0,25% der Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die sich während der elektrophoretischen Auftrennung als blaue Lauffronten darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass Bromphenolbau und Xylencyanol mit 300bp bzw. 4Kb 'double strand' DNA ko-migrieren und sich die Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente zwischen 371 und 479bp bewegte, wurde die Elektrophorese beendet, nachdem die schnellere Lauffront (Bromphenolblau) das Gelende erreichte.

Auf jedem Gel wurde zur Überprüfung gleicher Beladung β -Actin-PCR-Produkt als interner Standard mitgeführt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden 2 μ l eines DNA-Standards (PeqGold 100bp Plus, Peqlab) mit 2,5 μ l 6x 'loading'-Puffer und 10,5 μ l DNase-freiem-Wasser verdünnt und zusammen mit den Proben unter gleichen Bedingungen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit 300ml Laufpuffer (0,5x TBE mit 12 μ l Ethidiumbromid, c=10mg/ml, Roth) bei einer konstanten Spannung von 100V, generiert über ein Power Supply (Consort E 143, Peqlab), durchgeführt. Nachdem die erste Lauffront das Gelende erreichte, wurde die Auftrennung beendet und die Gele sofort mit der Gel-Dokumentation unter UV-Anregung im Transilluminator analysiert.

4.9.7 Quantitative Auswertung

Die Analyse der DNA-Gele erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm 'Quantity One' der Fa. BioRad. Zur Quantifizierung wurde die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung gemessen. Die ermittelten Daten wurden über Quotientenbildung mit dem internen β -Actin-Standard korrigiert.

4.10 Statistische Analyse

Für jedes Experiment wurden 4 unabhängige Versuchsreihen ($n = 4$) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung der Werte durch eine 'one way analysis of variance' (ANOVA) mittels paarweisem multiplen Vergleich durch den Tukey Test oder die Student-Newman Keuls Methode, die die Korrektur des α -Fehlers zur Kompensation multipler Vergleiche beinhalten. Zwei Gruppen wurden als statistisch signifikant unterschiedlich gewertet, wenn die statistische Wahrscheinlichkeit für die Null-Hypothese (p) < 0,05 war. Sämtliche statistische Tests wurden unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat 2.3 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Auswirkung von Kälte auf verschiedene Apoptose-stimulierte und unstimulierte Zellen

Zur Überprüfung der Auswirkung von Kälte auf die Entstehung von Apoptose wurden für die TNF- α - bzw. CPT-stimulierten und unstimulierten Zelllinien WEHI-S, WEHI-R, HL-60 und HeLa sowie L929 Fibroblasten und periphere Blutlymphozyten (PBL) die Aktivierung des Schlüsselenzyms apoptotischer Prozesse, Caspase-3, durchflusszytometrisch ermittelt (Abb. 3 bis 5). Da der eingesetzte Antikörper ausschließlich die aktiven Caspase-3 Spaltprodukte markiert, konnte das Ausmaß der induzierten Apoptose evaluiert werden.

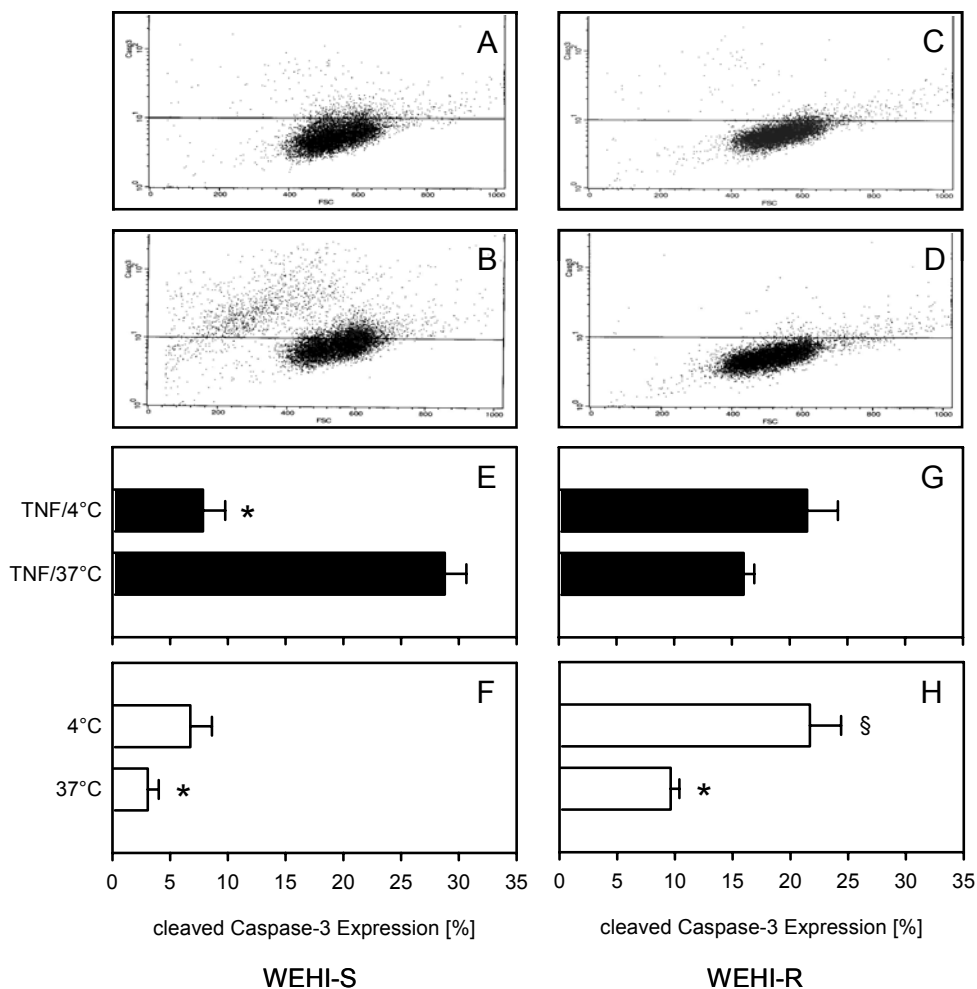


Abb. 3: 'Cleaved' Caspase-3 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□): Repräsentative FACS-Analyse (A) WEHI-S (TNF/4°C), (B) WEHI-S (TNF/37°C), (C) WEHI-S (4°C), (D) WEHI-S (37°C) und Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); * p <0,05 vs TNF/37°C, § p <0,05 vs 37°C.

Nachdem sich bereits in Vorversuchen mit der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zelllinie zeigte, dass eine fünfständige TNF- α -Stimulierung eine ausgeprägte Apoptose induzierte, wurde für die einleitenden Versuche ein fünfständiges Inkubationsintervall mit einer vierständigen Kühlungsphase bei 4°C und

1h Wiedererwärmung bei 37°C bzw. eine fünfständige permanente 37°C Inkubation für die korrespondierenden Kontrollen gewählt. Für die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie konnte durch die vierstündige Kälteeinwirkung nach einer Stunde Wiedererwärmung ein protektiver Einfluss auf die TNF- α -induzierte Apoptose gegenüber der 37°C-TNF- α -behandelten Versuchsgruppe festgestellt werden. Mit ca. 8% Caspase-3-aktivierter Zellen im kälteapplizierten Ansatz war ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) gegenüber dem wärmebehandelten Ansatz mit ca. 29% zu verzeichnen (Abb. 3E). Im Gegensatz dazu zeigten die unstimulierten Zellen durch die Kältebehandlung eine verstärkte Apoptose gegenüber dem warmen Kontrollansatz (ca. 7% versus ca. 3%, Abb. 3F), deren Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant war ($p = 0,063$).

Die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie reagierte auf die Kälteeinwirkung, unabhängig von der Apoptosestimulierung, mit einer gesteigerten 'cleaved' Caspase-3 Expression gegenüber den korrespondierenden 37°C-Ansätzen (Abb. 3G,H). Beide 4°C-Inkubationen, mit und ohne TNF- α , wiesen eine vergleichbare Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion von ca. 22% auf. Im TNF- α -stimulierten warmen Ansatz wurden ca. 16%, im unstimulierten ca. 10% 'cleaved' Caspase-3-positive Zellen detektiert (Abb. 3G,H).

Eine den WEHI-S Zellen vergleichbare Wirkung zeigte der Kälteeinfluss auch auf die TNF- α -stimulierten L929 Fibroblasten und die CPT-stimulierten HL-60 Lymphomzellen, wenn auch in schwächerem Ausmaß (Abb. 4A,C).

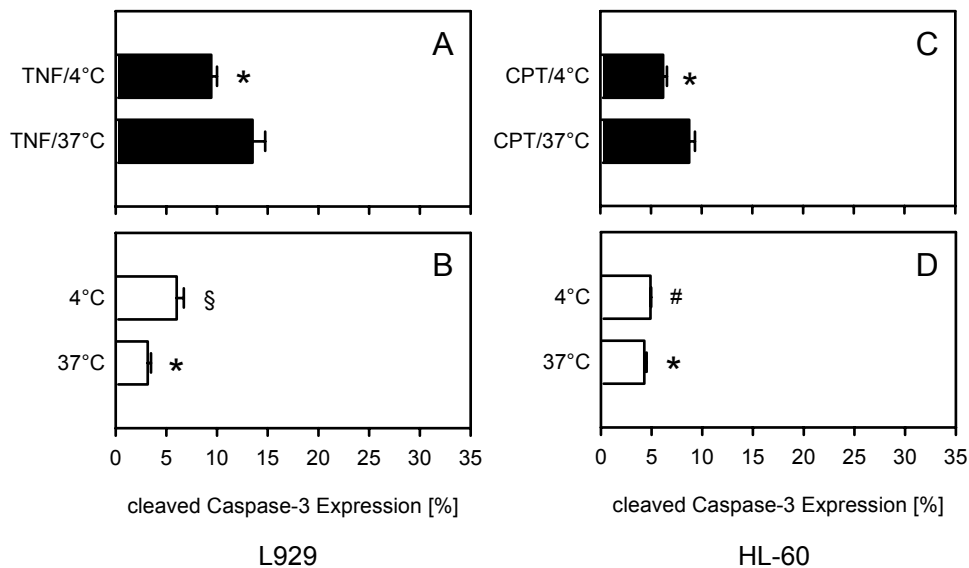


Abb. 4: 'Cleaved' Caspase-3 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibroblasten L929 (A,B) und der humanen myeloiden Lymphomzelllinie HL-60 (C,D) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α /CPT (□). Jede Gruppe beinhaltet vier Versuchsansätze. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs TNF(CPT)/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C, # $p < 0,05$ vs TNF(CPT)/4°C.

Durch die Kälteapplikation konnte eine Reduktion der TNF- α - bzw. CPT-induzierten Caspase-3-abhängigen Apoptose gegenüber der korrespondierenden 37°C-Versuchsgruppe erzielt werden. Die Verminderung der Caspase-3 Aktivierung unter Kälteeinfluss belief sich auf 30 bis 40% und fiel damit

geringer aus als bei WEHI-S Zellen mit einer Reduktion um ca. 70%. Die um ca. 100% vermehrte Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte in der Kälte ohne TNF- α -Stimulierung gegenüber der 37°C-Kontrolle fand sich vergleichbar mit den entsprechenden unstimulierten WEHI-S Zellen auch für die unstimulierten L929 Fibroblasten (Abb. 4B). Die unstimulierten HL-60 Zellen zeigten in der Kälte hingegen lediglich eine 14%ige nicht signifikante Steigerung aktivierter Caspase-3 im Vergleich zu den warminkubierten Kontrollansätzen (Abb. 4D).

Für die humane Zervix-Karzinom Zelllinie HeLa und die peripheren Blutlymphozyten (PBL) konnte durch die Kältebehandlung nach Stimulierung mit TNF- α keine protektive Wirkung auf die Caspase-3-abhängige Apoptose gegenüber den korrespondierenden 37°C-Ansätzen verzeichnet werden (Abb. 5A,C). Vergleichbar mit der WEHI-R Zelllinie (34% Steigerung der aktivierten Caspase-3 gegenüber dem TNF- α -stimulierten warmen Ansatz) wurde für HeLa und PBL Zellen eine kälteinduzierte Steigerung aktiver Caspase-3 Spaltprodukte von 25 bzw. 16% detektiert (Abb. 5A,C).

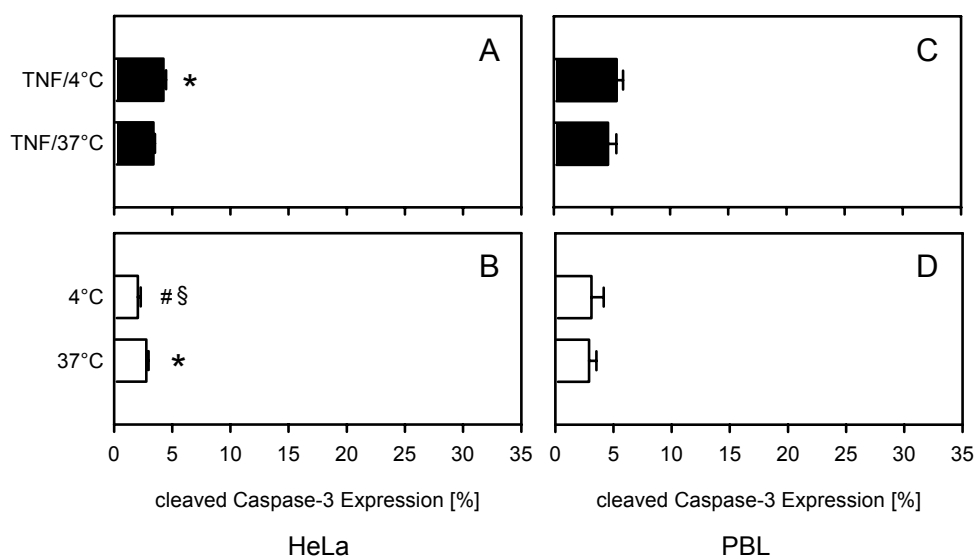


Abb. 5: 'Cleaved' Caspase-3 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa (A,B) und der peripheren Blutlymphozyten (PBL; C,D) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Jede Gruppe beinhaltet vier Versuchsansätze. Mittelwerte \pm SEM; * p <0,05 vs TNF/37°C, § p <0,05 vs 37°C, # p <0,05 vs TNF/4°C.

Die unstimulierten HeLa Zellen reagierten nicht mit einer kälteinduzierten Caspase-3 Aktivierung, sondern zeigten eine 26%ige signifikante Reduktion an aktiven Caspase-3-Spaltprodukten gegenüber dem warmen Kontrollansatz (Abb. 5B). Für die unstimulierten PBL wurde nach Kältebehandlung kein Unterschied aktivierter Caspase-3 Expression bezüglich des korrespondierenden 37°C-Ansatzes detektiert (Abb. 5D).

Zusammenfassend ergaben sich bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien und Zellen zwei prinzipiell unterschiedliche Reaktionsmuster der Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Apoptose. Während sich die Hypothermie bei Apoptose-stimulierten WEHI-S, L929 und HL-60 Zellen protektiv auswirkte, löste die Kälte bei den Apoptose-stimulierten WEHI-R und HeLa Zellen sowie in eingeschränktem Ausmaß bei den PBL eine Verstärkung der Apoptose aus. Die unstimulierten Zellen

reagierten unter Kälteeinwirkung i. d. R. mit einer Apoptose-Induktion. Stellvertretend für die zwei divergent reagierenden Zellsysteme wurden die Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R, die die stärkste Caspase-3 Aktivierung aufwiesen und sich deutlich unterschieden, für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

5.2 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Apoptose TNF- α -stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen

5.2.1 Zellmorphologie

Durch Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Bisbenzimid und Propidiumjodid wurden primär apoptotische Zellen, das späte Apoptosestadium der sekundär nekrotischen Zellen sowie primär nekrotische Zellen aufgrund ihrer Kernmorphologie und Zytoplasmamembraneigenschaften diskriminiert. Nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls (\pm Apoptoseinduktion, 4h 4°C Inkubation und anschließender 37°C Inkubation bzw. ausschließlicher 37°C Inkubation in den Kontrollansätzen) wurden die morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit evaluiert. Beurteilt wurden Zellen mit primären und sekundären Apoptosen über die Ausbildung von Chromatin- bzw. Kernkondensationen und Kernfragmentationen vor Versuchsbeginn und nach 4, 5, 6, 7, 8, 10 und 24h (prozentualer Anteil des jeweiligen Apoptosestadiums an der Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld).

Die TNF- α sensiblen WEHI-S Zellen zeigten unter TNF- α -Stimulierung über den gesamten Zeitraum nach Versuchsbeginn im kälteapplizierten Ansatz eine verminderte Apoptose gegenüber dem warmen TNF- α -Kontrollansatz (Abb. 6A). Direkt nach Kühlung (4h) bis zum Zeitpunkt 7h unterschieden sich die beiden Gruppen signifikant, wobei sich die Reduktion der apoptotischen Zellen im gekühlten Ansatz gegenüber der warmen Kontrollgruppe von anfänglich ca. 90% (4h) auf ca. 24% (8h) verminderte. 10h nach Versuchsbeginn glich sich die Anzahl apoptotischer Zellen in beiden Ansätzen an. Der Anteil apoptotischer Zellen im gekühlten Ansatz lag bis zum Versuchsende nach 24h mit einer Reduktion von ca. 5% nur geringfügig unterhalb der 37°C Kontrolle (Abb. 6A). Primäre Nekrosen konnten während des gesamten Untersuchungsintervalls nur in geringem Ausmaß detektiert werden; nach 24h wurden im gekühlten lediglich ca. 1% und im warmen Ansatz ca. 2% primär nekrotische Zellen aufgefunden (Tab. 10,11).

Die unstimulierten WEHI-S Zellen (Abb. 6B) entwickelten unter der Kältebehandlung eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen (ca. 10% nach 24h) und unterschieden sich über den restlichen Untersuchungszeitraum (0h bis 10h) nur geringfügig von dem korrespondierenden warmen Ansatz (2,5-3% gegenüber 1-2% Apoptosen). Trotz der geringen Differenz des Anteils apoptotischer Zellen der beiden Ansätze waren die erzielten Ergebnisse zu allen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn signifikant unterschiedlich, so dass die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen ohne Stimulierung eine kälteabhängige verstärkte Apoptose gegenüber dem korrespondierenden warmen Kontrollansatz indizierten (Abb. 6B).

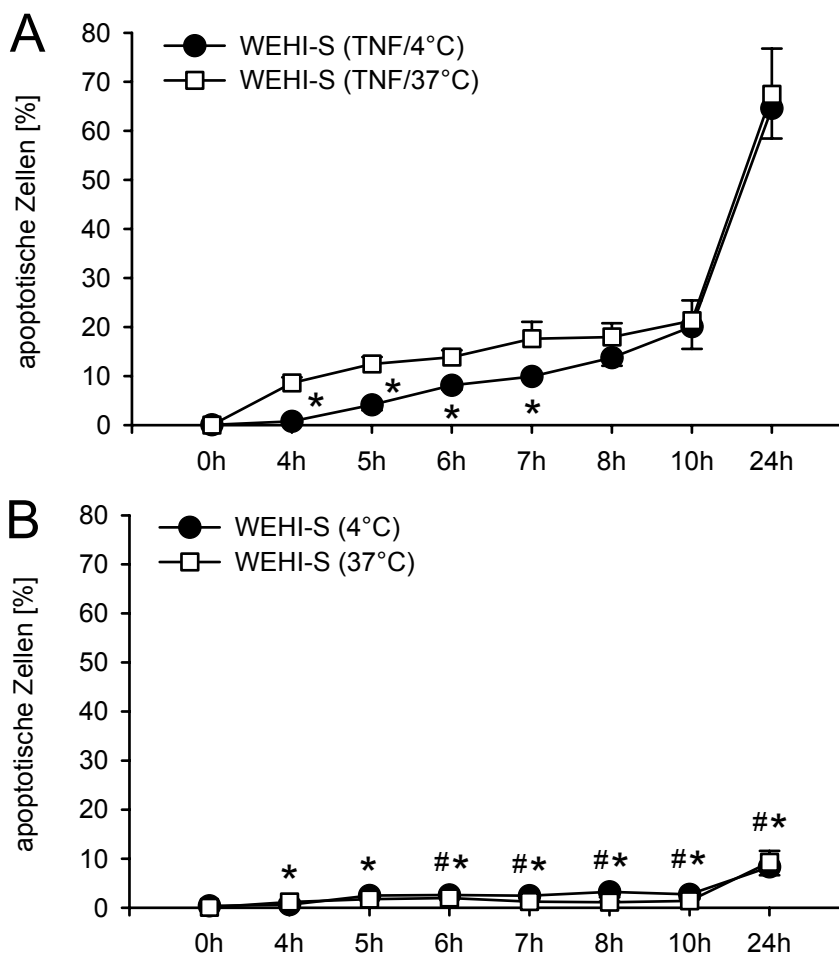


Abb. 6: Apoptotische Zellen in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S Zelllinie vor Versuchsbeginn und zu verschiedenen Zeitpunkten (A) mit und (B) ohne TNF- α -Inkubation. Die Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C, im weiteren Verlauf bei 37°C kultiviert (●), die Kontrollen wurden über den gesamten Zeitraum bei 37°C inkubiert (□). Jede Gruppe beinhaltet vier unabhängige Versuchsansätze. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie generierte nach 4h TNF- α -Stimulierung unter der 37°C Inkubation die größte Apoptoserate (ca. 9%), verglichen mit allen anderen Versuchsgruppen (Abb. 7A,B). Während zu allen weiteren Zeitpunkten die kälteapplizierten Ansätze mit und ohne TNF- α demgegenüber eine stark vermehrte Apoptose aufwiesen, stagnierte die Apoptoserate im 37°C-TNF- α -Ansatz über die Zeit und zeigte nach 7h bis zum Versuchsende sogar eine abfallende Tendenz (Abb. 7A,B). Nach einer Stunde Wiedererwärmung konnte für beide, den stimulierten und unstimulierten kältebehandelten Ansatz, ein massiver Anstieg apoptotischer Zellen von ca. 0,5% (4h) auf 36 und 39% (5h) ermittelt werden. Die TNF- α -stimulierten gekühlten WEHI-R Zellen hielten die Apoptoserate über das gesamte Zeitintervall bis zum Zeitpunkt 10h in etwa konstant (36-28%), danach war bis zum Versuchsende nach 24h noch einmal ein Zuwachs apoptotischer Zellen bis auf 53% der Gesamtzellzahl zu verzeichnen (Abb. 7A). Die unstimulierten gekühlten WEHI-R Zellen reagierten, nach dem fulminanten Apoptoseanstieg zum Zeitpunkt 5h, weiterhin mit einem kontinuierlichen langsamen Rückgang der Apoptoserate bis zum Zeitpunkt 24h auf 15% der Gesamtzellzahl (Abb. 7B).

Die detaillierte Untersuchung der Entwicklung der Apoptosestadien zeigte, ausgehend von der in allen Versuchsansätzen vergleichbaren Anzahl an ausgesäten WEHI-S Zellen ($27,87 \pm 0,22$ pro

Gesichtsfeld), ein unterschiedliches Adhärenzverhalten der verschiedenen Versuchsgruppen (Tab. 10,11). Während für die TNF- α -stimulierten gekühlten und warmen Versuchsgruppen bis zum Versuchsende ein Rückgang adhärenter Zellen auf 35 bzw. 38% zu verzeichnen war, konnte für die unstimulierten Versuchsgruppen eine Reduktion adhärenter Zellen auf 73 und 77% beobachtet werden. In allen Versuchsgruppen wurde als primäres Apoptosestadium in der Hauptsache Chromatin- bzw. Kernkondensationen differenziert, wohingegen sich Fragmentationen lediglich bei bereits membrangeschädigten sekundären Nekrosen auffinden ließen (Tab. 10,11).

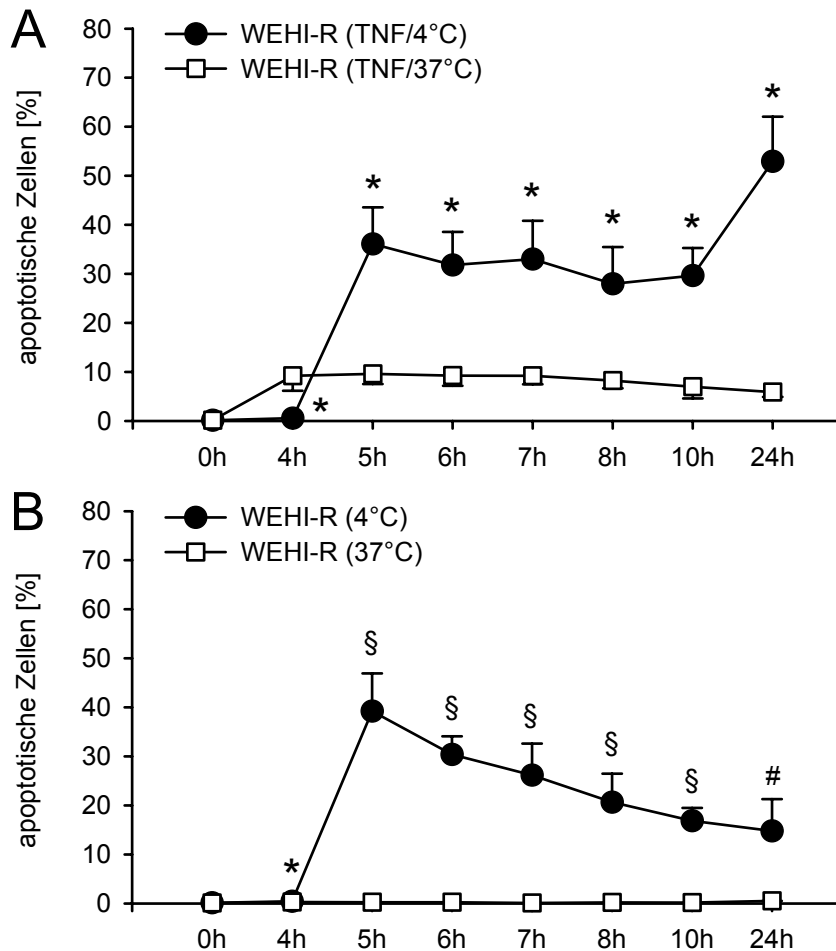


Abb. 7: Apoptotische Zellen in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-R Zelllinie vor Versuchsbeginn und zu verschiedenen Zeitpunkten (A) mit und (B) ohne TNF- α -Stimulierung. Die Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C, im weiteren Verlauf bei 37°C kultiviert (●), die Kontrollen wurden über den gesamten Zeitraum bei 37°C inkubiert (□). Jede Gruppe beinhaltet vier unabhängige Versuchsansätze. Mittelwerte \pm SEM; [§] $p < 0,05$ vs 37°C [#] $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Der größte Unterschied bzgl. der Entwicklung kondensierter Stadien zwischen den gekühlt bzw. warm stimulierten WEHI-S Zellen wurde direkt nach der Kälteapplikation beobachtet (ca. 0,7% versus 4,9%, Tab. 10). Danach war zu allen Untersuchungszeitpunkten der Anteil kondensierter primärer Apoptosen beider Ansätze vergleichbar. Als Besonderheit zeigten die 37°C-inkubierten stimulierten Zellen einen schnellen Übergang in das Stadium der sekundären Nekrose. Bereits nach 4h war in 3 bis 4% der Zellen dieses fortgeschrittene Apoptosestadium ausgeprägt, während im gekühlten Ansatz ein

erster Anstieg sekundärer Nekrosen auf ca. 2% erst zur sechsten Stunde nach Versuchsbeginn zu detektieren war.

WEHI-S – TNF/4°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	27,59 ± 3,00	0,06 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,06	0,00 ± 0,00
4	25,30 ± 2,81	0,69 ± 0,27	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,06	0,75 ± 0,28	0,00 ± 0,00
5	27,08 ± 3,23	4,04 ± 1,05	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,09	4,12 ± 1,08	0,05 ± 0,05
6	24,82 ± 2,95	5,69 ± 1,07	0,03 ± 0,03	2,39 ± 0,90	8,12 ± 0,92	0,36 ± 0,16
7	21,69 ± 1,49	6,65 ± 0,85	0,05 ± 0,05	3,22 ± 0,59	9,92 ± 0,52	0,28 ± 0,24
8	23,34 ± 4,50	8,41 ± 1,25	0,13 ± 0,13	5,19 ± 0,92	13,73 ± 1,63	0,26 ± 0,15
10	22,56 ± 4,28	9,06 ± 1,77	0,00 ± 0,00	11,02 ± 3,40	20,08 ± 4,53	0,31 ± 0,17
24	9,72 ± 1,47	8,13 ± 3,61	0,00 ± 0,00	56,48 ± 7,40	64,60 ± 6,16	1,04 ± 0,91

WEHI-S – TNF/37°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	28,47 ± 4,90	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,09
4	22,85 ± 4,38	4,91 ± 0,64	0,12 ± 0,12	3,55 ± 0,71	8,58 ± 1,17	0,27 ± 0,05
5	25,23 ± 6,45	4,78 ± 0,52	0,13 ± 0,13	7,55 ± 1,16	12,46 ± 1,43	0,33 ± 0,18
6	22,24 ± 4,42	3,71 ± 0,41	0,00 ± 0,00	10,13 ± 1,67	13,84 ± 1,42	0,20 ± 0,11
7	21,11 ± 3,32	5,30 ± 2,15	0,00 ± 0,00	12,32 ± 2,79	17,62 ± 3,44	0,11 ± 0,06
8	20,71 ± 2,04	5,91 ± 2,72	0,08 ± 0,08	11,95 ± 2,20	17,94 ± 2,84	0,15 ± 0,10
10	18,97 ± 3,80	7,82 ± 2,51	0,14 ± 0,14	13,31 ± 2,71	21,27 ± 4,15	0,41 ± 0,29
24	10,88 ± 2,74	8,62 ± 3,74	0,00 ± 0,00	58,82 ± 10,89	67,44 ± 9,32	2,39 ± 1,27

Tab. 10: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld sowie Zellen mit nukleärer Kondensation, Fragmentation und sekundärer bzw. primärer Nekrose (in % der Gesamtzellzahl) vor Versuchsbeginn (0h) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNF- α -vermittelter Apoptose-Induktion. Die Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C und im weiteren Verlauf bei 37°C (WEHI-S – TNF/4°C), die Kontrollen permanent bei 37°C (WEHI-S – TNF/37°C) kultiviert; Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400x Vergrößerung ausgezählt.

Erst 10h nach Versuchsbeginn entwickelten beide Versuchsgruppen vergleichbare Anteile sekundär nekrotischer Zellen. Unter dem Einfluss der Kälte generierte sich in den TNF- α -stimulierten WEHI-S Ansätzen demnach das späte Apoptosestadium mit zeitlicher Retardierung. Während sich das Verhältnis sekundärer Nekrosen zu primär apoptotischen Kondensationen in den gekühlten Ansätzen bis zur achten Inkubationsstunde auf \leq 30% gegenüber der 37°C Inkubation belief, glich sich diese Rela-

tion nach 10h sehr schnell an (72%) und wies nach 24h keinen Unterschied zur korrespondierenden warmen Kontrollgruppe mehr auf (Tab. 10).

WEHI-S – 4°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	27,49 ± 2,99	0,23 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,15	0,38 ± 0,20	0,00 ± 0,00
4	25,24 ± 2,70	0,44 ± 0,19	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,18	0,62 ± 0,24	0,00 ± 0,00
5	23,25 ± 3,68	2,09 ± 0,46	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,24	2,49 ± 0,56	0,04 ± 0,04
6	24,17 ± 2,60	1,61 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,26	2,59 ± 0,46	0,14 ± 0,08
7	23,07 ± 2,23	1,55 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,35	2,45 ± 0,56	0,21 ± 0,12
8	24,97 ± 4,04	2,15 ± 0,81	0,00 ± 0,00	1,06 ± 0,43	3,21 ± 1,08	0,26 ± 0,16
10	21,05 ± 2,28	1,24 ± 0,47	0,00 ± 0,00	1,47 ± 0,55	2,70 ± 0,77	0,26 ± 0,16
24	21,27 ± 2,04	2,99 ± 0,68	0,00 ± 0,00	5,32 ± 1,70	8,30 ± 1,68	1,16 ± 0,63

WEHI-S – 37°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	27,93 ± 4,54	0,06 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,06	0,17 ± 0,11
4	24,00 ± 3,90	1,08 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	1,15 ± 0,35	0,06 ± 0,06
5	23,03 ± 3,14	1,05 ± 0,21	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,20	1,72 ± 0,21	0,34 ± 0,24
6	26,69 ± 3,60	1,64 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,15	1,96 ± 0,14	0,24 ± 0,09
7	22,10 ± 1,71	1,18 ± 0,18	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,05	1,24 ± 0,16	0,09 ± 0,09
8	23,46 ± 1,98	0,98 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,08	1,11 ± 0,15	0,08 ± 0,08
10	22,01 ± 2,36	1,20 ± 0,30	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,13	1,40 ± 0,33	0,40 ± 0,18
24	20,42 ± 3,09	3,04 ± 1,17	0,00 ± 0,00	6,22 ± 2,36	9,25 ± 2,32	0,67 ± 0,23

Tab. 11: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld sowie Zellen mit nukleärer Kondensation, Fragmentation und sekundärer bzw. primärer Nekrose (in % der Gesamtzellzahl) vor Versuchsbeginn (0h) und zu verschiedenen Zeitpunkten ohne TNF- α -vermittelter Apoptose-Induktion. Die WEHI-S Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C, im weiteren Verlauf bei 37° (WEHI-S – 4°C) und die Kontrollen unter permanenter 37°C Inkubation (WEHI-S – 37°C) kultiviert; Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400x Vergrößerung ausgezählt.

In den unstimulierten kälteapplizierten und warmen Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen fand sich eine vergleichbare Entwicklung primärer Apoptosestadien. Auch für die unstimulierten WEHI-S Zellen waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt Kernfragmentationen nachweisbar. Sekundäre Nekrosen waren im Zeitraum zwischen 6 und 10h vermehrt im kälteapplizierten Ansatz zu detektieren (Tab. 11).

Auch für die WEHI-R Ansätze war die Aussaat der Zellen ($33,20 \pm 0,65$) in allen Versuchsgruppen vergleichbar (Tab. 12,13).

WEHI-R – TNF/4°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	32,29 ± 2,96	0,09 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,00 ± 0,00
4	28,45 ± 3,36	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,05	0,52 ± 0,18	0,57 ± 0,21	0,00 ± 0,00
5	22,74 ± 3,32	29,73 ± 7,79	5,90 ± 1,75	0,46 ± 0,36	36,09 ± 7,46	0,15 ± 0,09
6	19,51 ± 2,48	20,79 ± 6,77	3,36 ± 0,79	7,65 ± 4,19	31,80 ± 6,77	3,85 ± 2,72
7	18,58 ± 2,47	9,96 ± 1,97	1,31 ± 0,75	21,74 ± 9,51	33,01 ± 7,80	0,41 ± 0,15
8	15,05 ± 1,44	7,55 ± 0,23	1,40 ± 0,52	19,02 ± 7,98	27,97 ± 7,49	0,72 ± 0,25
10	12,09 ± 1,77	5,68 ± 1,78	0,63 ± 0,36	23,36 ± 6,57	29,66 ± 5,62	1,35 ± 0,97
24	13,88 ± 2,25	1,04 ± 0,68	0,37 ± 0,24	51,54 ± 9,17	52,95 ± 9,08	4,97 ± 1,61

WEHI-R – TNF/37°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	32,44 ± 4,83	0,07 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,00 ± 0,00
4	24,55 ± 2,04	2,75 ± 0,69	1,41 ± 0,53	5,06 ± 2,60	9,22 ± 3,05	0,50 ± 0,28
5	26,18 ± 2,11	2,93 ± 0,98	1,40 ± 0,32	5,27 ± 1,86	9,61 ± 2,07	0,25 ± 0,14
6	24,99 ± 2,13	0,86 ± 0,35	1,10 ± 0,29	7,28 ± 2,22	9,24 ± 2,06	0,36 ± 0,16
7	26,72 ± 2,79	1,12 ± 0,48	0,20 ± 0,14	7,89 ± 2,23	9,21 ± 1,72	0,47 ± 0,15
8	25,69 ± 1,86	0,59 ± 0,17	0,42 ± 0,28	7,21 ± 1,87	8,22 ± 1,54	0,51 ± 0,22
10	21,79 ± 0,97	0,67 ± 0,27	0,24 ± 0,10	6,08 ± 2,57	6,98 ± 2,38	0,29 ± 0,16
24	23,34 ± 1,22	0,12 ± 0,08	0,35 ± 0,20	5,42 ± 0,97	5,90 ± 1,00	1,93 ± 0,75

Tab. 12: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld sowie Zellen mit nukleärer Kondensation, Fragmentation und sekundärer bzw. primärer Nekrose (in % der Gesamtzellzahl) vor Versuchsbeginn (0h) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNF- α -vermittelter Apoptose-Induktion. Die Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C, im weiteren Verlauf bei 37°C (WEHI-R – TNF/4°C) kultiviert, Kontrollzellen bei 37°C (WEHI-R – TNF/37°C); Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400x Vergrößerung ausgezählt.

Das Adhärenzverhalten der verschiedenen Versuchsgruppen äußerte sich in einem dem Schweregrad der eingetretenen Apoptose äquivalenten Rückgang adhärenter Zellen über den Untersuchungszeitraum. Während für die TNF- α -stimulierten und unstimulierten gekühlten Ansätze bis zu Versuchsende ein Rückgang adhärenter Zellen um 57 bzw. 45% zu verzeichnen war, konnte für den stimulierten 37°C Ansatz eine Reduktion adhärenter Zellen um 28% beobachtet werden. Im unstimulierten

37°C Ansatz konnte für die WEHI-R Zellen bis Versuchsende sogar ein geringer Zuwachs (ca. 5%) adhärenter Zellen ermittelt werden (Tab. 12,13).

WEHI-R – 4°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	35,11 ± 3,48	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,00 ± 0,00
4	30,44 ± 3,99	0,18 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,14	0,45 ± 0,23	0,05 ± 0,05
5	23,43 ± 2,96	28,62 ± 8,00	9,04 ± 1,63	1,55 ± 1,19	39,22 ± 7,70	0,11 ± 0,11
6	18,88 ± 0,30	17,57 ± 2,29	4,78 ± 1,96	8,03 ± 2,72	30,38 ± 3,73	0,19 ± 0,12
7	16,64 ± 1,93	3,70 ± 0,93	1,30 ± 0,16	21,16 ± 6,93	26,16 ± 6,46	0,39 ± 0,31
8	16,66 ± 1,74	0,90 ± 0,68	0,25 ± 0,09	19,49 ± 6,30	20,64 ± 5,84	0,24 ± 0,24
10	15,45 ± 1,51	1,96 ± 0,38	0,52 ± 0,24	14,39 ± 2,98	16,88 ± 2,59	0,25 ± 0,14
24	17,69 ± 1,18	0,21 ± 0,13	0,00 ± 0,00	14,60 ± 6,55	14,81 ± 6,47	5,88 ± 0,99

WEHI-R – 37°C

Zeit (h)	Gesamt-Zellzahl (n)	Kondensation (%)	Fragmentation (%)	Sekundäre Nekrose (%)	Gesamt-Apoptose (%)	Primäre Nekrose (%)
0	32,95 ± 1,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,06	0,09 ± 0,06	0,00 ± 0,00
4	30,70 ± 3,00	0,13 ± 0,09	0,09 ± 0,09	0,08 ± 0,05	0,29 ± 0,21	0,04 ± 0,04
5	31,27 ± 2,01	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,15	0,27 ± 0,13	0,05 ± 0,05
6	32,83 ± 1,23	0,08 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,08	0,26 ± 0,11	0,06 ± 0,06
7	32,58 ± 3,10	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,11 ± 0,07	0,12 ± 0,08
8	31,20 ± 1,86	0,14 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	0,22 ± 0,12	0,10 ± 0,06
10	30,68 ± 1,28	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,09 ± 0,05	0,16 ± 0,06	0,04 ± 0,04
24	34,65 ± 1,76	0,12 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,08	0,54 ± 0,10	0,00 ± 0,00

Tab. 13: Gesamtzellzahl/Gesichtsfeld sowie Zellen mit nukleärer Kondensation, Fragmentation und sekundärer bzw. primärer Nekrose (in % der Gesamtzellzahl) vor Versuchsbeginn (0h) und zu verschiedenen Zeitpunkten ohne TNF- α -vermittelter Apoptose-Induktion. Die Zellen wurden während der ersten 4h bei 4°C, im weiteren Verlauf bei 37°C (WEHI-R – 4°C) kultiviert, Kontrollzellen bei 37°C (WEHI-R – 37°C); Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 20 Gesichtsfelder bei 400x Vergrößerung ausgezählt.

Im Gegensatz zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen waren für die WEHI-R Zellen, mit Ausnahme des unstimulierten warmen Kontrollansatzes, auch primäre Fragmentationsstadien auszumachen. Vor allem nach der Kühlphase in den ersten beiden Stunden der Wiedererwärmung wurden im stimulierten und unstimulierten Versuchsansatz vermehrt Fragmentationen als primäre Apoptosestadien beobachtet, deren Anzahl sich bis Versuchsende verminderte (Tab. 12,13). Primäre Kondensationen wurden in den beiden kalteapplizierten Versuchsgruppen ebenfalls in den ersten beiden Stunden der Wieder-

erwärmung verstärkt aufgefunden. In Relation zur Abnahme der primären Apoptosen stieg die Anzahl sekundärer Nekrosen an. In Übereinstimmung mit den kälteapplizierten Zellen wiesen auch die warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen zu Versuchsbeginn die stärkste Entwicklung primärer Kondensations- und Fragmentationsstadien auf, wenn auch in geringerem Ausmaß. Für die TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen unter warmer Inkubation konnte zum Zeitpunkt 4 und 5h die größte Anzahl primärer Apoptosen (ca. 3% Kondensationen und 1% Fragmentationen, Tab. 12) verzeichnet werden. Sekundäre Nekrosen wurden nach 4h bis zum Versuchsende mit einem Anteil zwischen 5 und 8% detektiert, wobei sich nach einem allmählichen Anstieg nach 7h ein kontinuierlicher Rückgang bis Versuchsende abzeichnete. Im Vergleich zu den WEHI-S Zellen stellte sich bei den warminkubierten stimulierten WEHI-R Zellen ein noch schnellerer Übergang von primären Apoptosestadien mit erhaltener Zellmembranintegrität zu sekundären Apoptosestadien dar. Auch nach der anfänglichen kälteinduzierten Retardierung wechselten die WEHI-R Zellen schon früher, ab der 7. Inkubationsstunde in das Stadium der sekundären Nekrose.

Zusammenfassend wurde für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24h eine kälteinduzierte protektive Wirkung bezüglich TNF- α -vermittelter Apoptose beobachtet. Die unstimulierten WEHI-S Zellen hingegen zeigten durch die Kälteapplikation eine verstärkte Apoptose gegenüber der korrespondierenden warmen Kontrolle. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten mit und ohne TNF- α -Stimulierung unter Kälteeinwirkung mit einem fulminanten Anstieg apoptotischer Zellen gegenüber den entsprechenden 37°C-Kontrollen. Da sich sowohl für WEHI-S als auch für WEHI-R Zellen nach einer vierstündigen Kälteeinwirkung und einer Stunde Wiedererwärmung sehr deutliche Unterschiede in der Expression apoptotischer Merkmale evaluieren ließen, wurde für die weiteren Untersuchungen dieses Inkubationsintervall festgelegt.

5.2.2 Ausprägung spezifischer Apoptosemarker

Zur weiteren Überprüfung der fluoreszenzmikroskopisch erhobenen morphologischen Befunde wurden nachfolgend Untersuchungen verschiedener apoptosespezifischer Marker durchgeführt.

5.2.2.1 Sub-2n-Population (7-AAD)

Mithilfe der 7-AAD-Methode konnte die anteilige apoptotische Zellfraktion durchflusszytometrisch über die Detektion des hypodiploiden Sub-G₁- bzw. Sub-2n-Peaks in Relation zur Gesamtzellzahl ermittelt werden.

Die Abbildungen 8 bis 10 zeigen beispielhaft die zeitliche Entwicklung des apoptotischen Sub-2n-Peaks für 37°C-inkubierte WEHI-S Zellen mit und ohne TNF- α -Stimulierung.

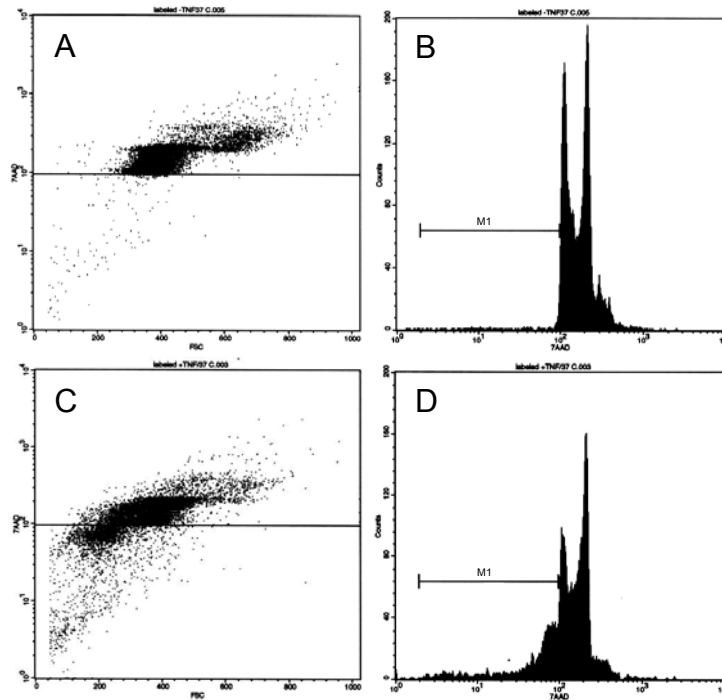


Abb. 8: Repräsentative FACS-Analyse der 7-AAD-positiven Sub-2n-Population der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S nach 5h 37°C Inkubation ohne (A,B) bzw. mit TNF- α -Stimulierung (C,D). Die Sub-2n-Population ist im Intervall unter dem Marker M1 dargestellt.

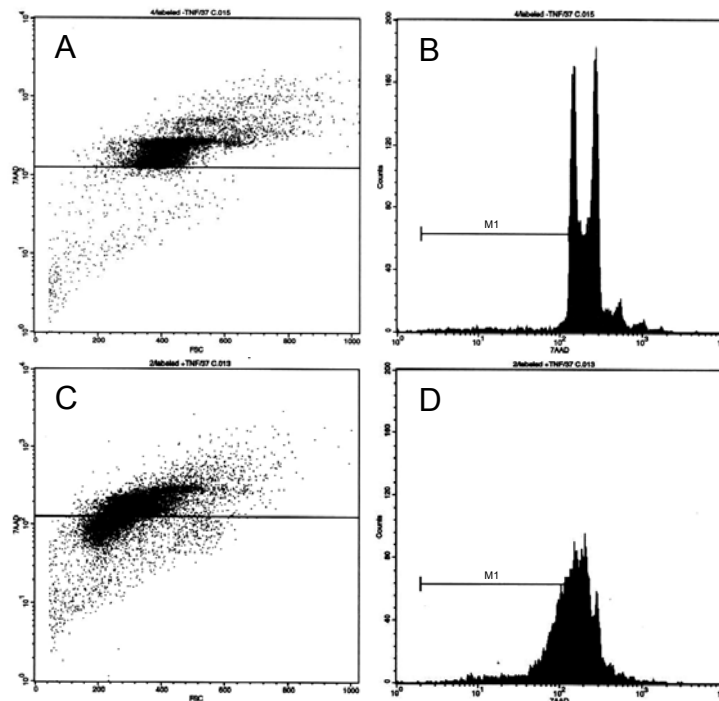


Abb. 9: Repräsentative FACS-Analyse der 7-AAD-positiven Sub-2n-Population der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S nach 7h 37°C Inkubation ohne (A,B) bzw. mit TNF- α -Stimulierung (C,D). Die Sub-2n-Population ist im Intervall unter dem Marker M1 dargestellt.

Während nach 5h für die unstimulierten Kontrollzellen noch kein Sub-2n-Peak zu beobachten war (Abb. 8A,B), konnte für den TNF- α -stimulierten Ansatz bereits eine Sub-2n-Population von ca. 25% detektiert werden (Abb. 8C,D). Nach 7h 37°C-Inkubation waren für die unstimulierten WEHI-S Zellen weiterhin keine Anzeichen für die Entwicklung einer Sub-2n-Population zu verzeichnen (Abb. 9A,B), hingegen bewirkte die TNF- α -Stimulierung einen weiteren Zuwachs apoptotischer Zellen auf ca. 40% (Abb. 9C,D). Zum Zeitpunkt 24h fanden sich auch im unstimulierten WEHI-S-Ansatz ein ca. 12%iger Anteil apoptotischer Sub-2n-Zellen (Abb. 10A,B). Bei den TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen verursachte die Apoptose-Induktion nach 24-stündiger Einwirkdauer einen weiteren Anstieg apoptotischer Zellen auf 80% der Gesamtpopulation (Abb. 10C,D).

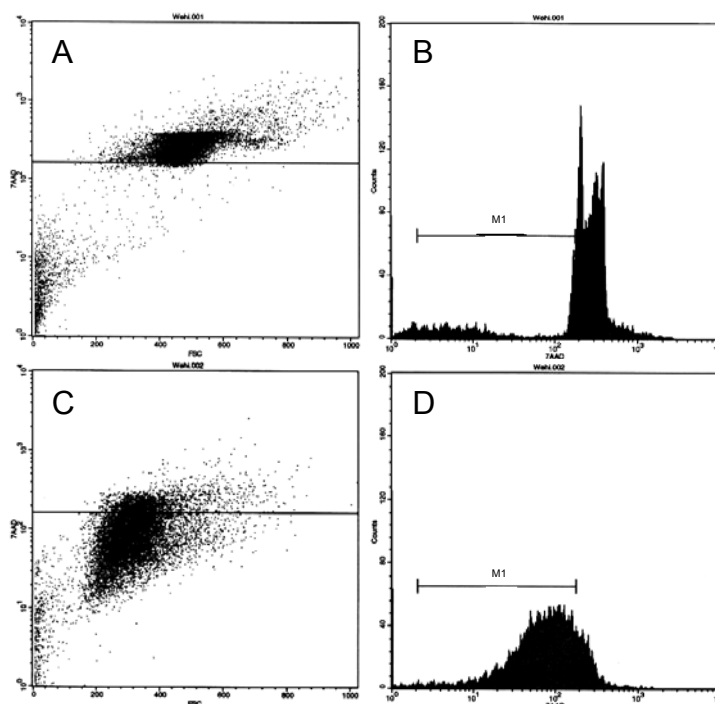


Abb. 10: Repräsentative FACS-Analyse der 7-AAD-positiven Sub-2n-Population der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S nach 24h 37°C Inkubation ohne (A,B) bzw. mit TNF- α -Stimulierung (C,D). Die Sub-2n-Population ist im Intervall unter dem Marker M1 dargestellt.

Nach 4h Kälteapplikation und 1h Wiedererwärmung zeigten TNF- α -stimulierte WEHI-S Zellen gegenüber dem korrespondierenden 5h warmen Ansatz eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen (7,2% versus 27,9%, Abb. 11A). Kälteapplizierte unstimulierte WEHI-S Zellen hingegen wiesen eine den stimulierten Zellen vergleichbare Induktion apoptotischer Sub-2n-Zellen auf, die sich mit 6,4% versus 2,7% im korrespondierenden warmen Ansatz jedoch nicht signifikant von diesem unterschied (Abb. 11B). Die kälteapplizierte stimulierten und unstimulierten WEHI-R Zellen unterschieden sich bezüglich der Sub-2n-Population nach 5h gegenüber dem warminkubierten stimulierten Ansatz nur sehr geringfügig (Anstieg apoptotischer Zellen von 7-8% versus TNF- α -stimuliertem warminkubierten Ansatz, Abb. 11C,D). In Bezug auf die korrespondierenden warmen Kontrollzellen

bewirkte die Kälte im unstimulierten Ansatz eine signifikant verstärkte Entwicklung apoptotischer Zellen (127% Anstieg apoptotischer Zellen versus unstimulierten warmen Ansatz, Abb. 11D).

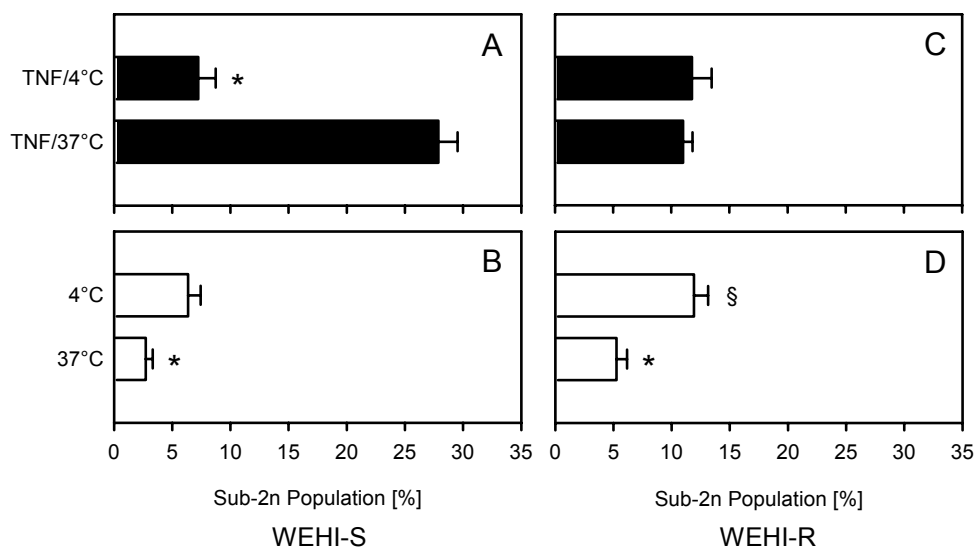


Abb. 11: 7-AAD-positive Sub-2n-Population in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α (□): WEHI-S (A,B), WEHI-R (C,D) und Mittelwerte ± SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Zusammenfassend zeigt die Apoptose-Detektion mittels der 7-AAD-Methode in Einklang mit den morphologischen Befunden, dass zum Zeitpunkt 5h die Kältebehandlung TNF-α-sensible WEHI-S Zellen vor TNF-α-vermittelter Apoptose schützt, dass aber im unstimulierten Versuchsansatz durch die Kälte gegenüber der warmen Kontrolle eine verstärkte Apoptose hervorgerufen wird. Bei TNF-α-resistenten WEHI-R Zellen kann die Kälte nach 5h keinen Schutz vor TNF-α-induzierter Apoptose bewirken und induziert auch ohne Stimulierung selbst Apoptose.

5.2.2.2 Phosphatidylserin-Translokation (Annexin-V-FITC/PJ)

Das frühe Apoptosestadium der Translokation von Phosphatidylserin-Lipiden konnte mithilfe der Annexin-V-FITC-Methode nachgewiesen werden. FITC-markiertes Annexin-V wurde mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Gegenfärbung mit dem Vitalfarbstoff Propidiumjodid (PJ) erlaubte die Differenzierung zwischen frühen und späten Apoptosestadien bzw. sekundären Nekrosen (Abb. 12).

Die kälteapplizierten TNF-α-stimulierten WEHI-S Zellen zeigten gegenüber dem warmen korrespondierenden Ansatz eine signifikant reduzierte Anzahl Annexin-V-positiver Zellen (ca. 5% versus ca. 15%, Abb. 12D,E,H und Tab. 14). Unstimulierte WEHI-S Zellen wiesen nach Kältebehandlung eine den stimulierten Zellen vergleichbare Apoptoseinduktion auf, die sich mit 3% versus 1,5% im korrespondierenden warmen Ansatz signifikant von diesem unterschied (Abb. 12J und Tab. 14).

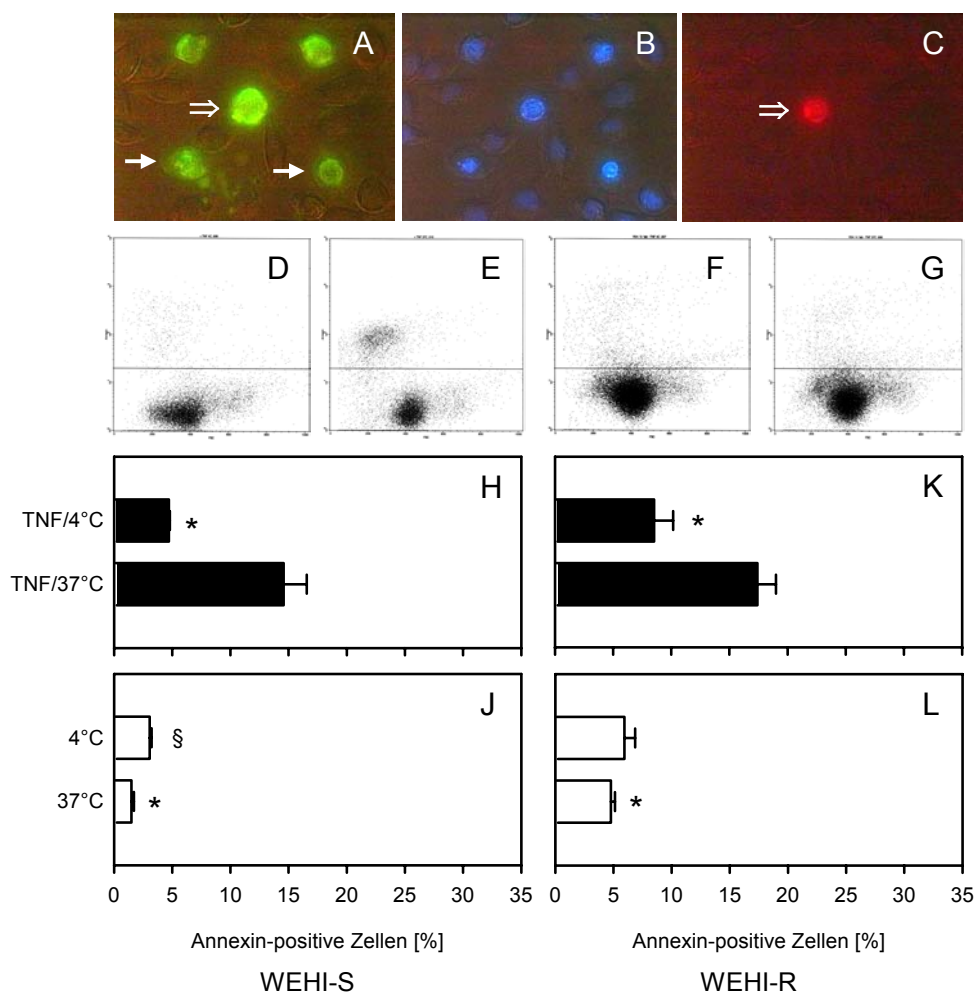


Abb. 12: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung nach 5h 37°C Inkubation: (A) Annexin-V-Färbung mit primär apoptotischen (\rightarrow) und sekundär nekrotischen Zellen (\Rightarrow), (B) Bisbenzimid-Färbung und (C) Propidiumjodid-Färbung (Vergrößerung 400x). Repräsentative FACS-Analyse Annexin-V-positiver (D) WEHI-S (TNF/4°C), (E) WEHI-S (TNF/37°C), (F) WEHI-R (4°C), (G) WEHI-R (37°C) Zellen. Apoptotische Annexin-V- positive Zellen in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□): WEHI-S (H,J), WEHI-R (K,L) und Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Der Anteil primärer Apoptosen an der Gesamtapoptose unter TNF- α -Stimulierung belief sich bei Kälteapplikation auf ca. 66% und unter warmen Bedingungen auf ca. 21%. Der Anteil primärer Apoptosen der kältebehandelten unstimulierten Zellen war mit 66% versus 72% im korrespondierenden warmen Ansatz mit dem Ergebnis der kälteapplizierten stimulierten Zellen vergleichbar, so dass davon auszugehen ist, dass im stimulierten warmen Ansatz mit ca. 80% sekundären Apoptosen bzgl. der Gesamtapoptose, das Stadium der frühen Apoptose nur sehr kurzlebig ist. Somit indiziert auch die Annexin-V-Methode, in Einklang mit der Diskriminierung der morphologischen Apoptose-Merkmale mit der Bis/PJ-Färbung, unter warmer Inkubation einen schnellen Übergang der TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen in das Stadium der sekundären Nekrose.

Die kälteapplizierten TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen entwickelten gegenüber dem korrespondierenden warmen Ansatz eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen (ca. 9% versus ca. 17%, Abb. 12K und Tab. 14). Unstimulierte WEHI-R Zellen reagierten auf die Kältebehandlung mit der Entwicklung von ca. 6% apoptotischer Zellen; im korrespondierenden warmen Ansatz waren

ca. 5% Annexin-V-positive Zellen zu detektieren (Abb. 12L und Tab. 14). Die Ergebnisse der Annexin-V-Methode standen somit für die WEHI-R Zellen nicht im Einklang mit den bis dato ermittelten Ergebnissen.

WEHI-S

Ansatz	Primäre Apoptosen (%)	Sekundäre Nekrosen (%)	Gesamt-Apoptose (%)
TNF/4°C	3,11 ± 0,51	1,60 ± 0,42	4,71 ± 0,09
TNF/37°C	3,01 ± 0,88	11,57 ± 2,72	14,56 ± 1,98
4°C	2,04 ± 0,05	1,04 ± 0,18	3,07 ± 0,15
37°C	1,08 ± 0,12	0,42 ± 0,08	1,50 ± 0,20

WEHI-R

Ansatz	Primäre Apoptosen (%)	Sekundäre Nekrosen (%)	Gesamt-Apoptose (%)
TNF/4°C	8,50 ± 1,64	0,03 ± 0,01	8,53 ± 1,63
TNF/37°C	17,37 ± 1,59	0,03 ± 0,02	17,40 ± 1,60
4°C	5,93 ± 0,93	0,02 ± 0,00	5,94 ± 0,92
37°C	4,76 ± 0,37	0,01 ± 0,00	4,77 ± 0,37

Tab. 14: Differenzierung Annexin-V-positiver Zellen in primäre Apoptosen bzw. sekundäre Nekrosen und Gesamt-Apoptosen in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF-α-Stimulierung und Mittelwerte ± SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen.

Der Anteil primärer Apoptosen an der Gesamtapoptose erstreckte sich in allen Versuchsgruppen auf fast 100%. Somit korrespondieren die Ergebnisse der Annexin-V-Methode für die beiden kälteapplieden WEHI-R Versuchsgruppen mit den morphologisch erhobenen Bis/PJ-Befunden, bei denen sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls hauptsächlich primäre Apoptose-Stadien (96-99%) evaluieren ließen. Keine Übereinstimmung ließ sich allerdings für die 37°C inkubierten TNF-α-stimulierten Zellen finden, da der Anteil primär apoptotischer Zellen an der Gesamt-Apoptose nach der morphologischen Bis/PJ-Erhebung nur 45% ausmachte.

Zusammenfassend kann für die TNF-α-sensiblen WEHI-S Zellen bezüglich der Apoptose-Detektion mittels Annexin-V-Methode die Aussage getroffen werden, dass die Kältebehandlung, in Einklang mit den morphologischen Befunden und der 7-AAD-Methode zum Zeitpunkt 5h, vor TNF-α-vermittelter Apoptose schützt und dass die Kälte im unstimulierten Versuchsansatz eine verstärkte Apoptose gegenüber der warmen Kontrolle verursacht. Bei TNF-α-resistenten WEHI-R Zellen bot die Kälteapplikation nach 5h Schutz vor TNF-α-induzierter Apoptose, ohne Stimulierung blieb die hypotherme Inkubation jedoch ohne Einfluss auf die Translokation der Phosphatidylserin-Lipide.

5.2.3 Expression Apoptose-assoziiertes Proteine

Um die hypotherme Auswirkung auf die Expression Apoptose-assoziiertes Proteine und insbesondere auf die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zu verfolgen, wurden neben der Haupt-Exekutionsprotease Caspase-3, Markercaspasen des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-’Pathways’ und zur Überprüfung der Caspasen-Aktivität die Generierung von PARP-1 Spaltprodukten untersucht. Als Indikatormolekül des extrinsischen bzw. des intrinsischen Apoptose-’Pathways’ wurde die Expression der Initiatorprotease Caspase-8 bzw. die Expression aktivierter Caspase-9 Spaltprodukte ermittelt. Zur Klärung, ob die Aktivierung der Caspasen-Kaskade rezeptorvermittelt oder über andere Mechanismen induziert war, wurde zudem die Expression der TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptoren und daneben einiger regulatorischer Proteine analysiert.

5.2.3.1 ’cleaved’ Caspase-3 Expression

Die in Kapitel 5.1 als Vergleich verschiedener Zelllinien und Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie evaluierte Expression aktivierter Caspase-3, wurde im Folgenden für die Zelllinien WEHI-S und WEHI-R immunzytochemisch mittels indirekter HRP/DAB-Färbung und Western-Blot-analytisch überprüft.

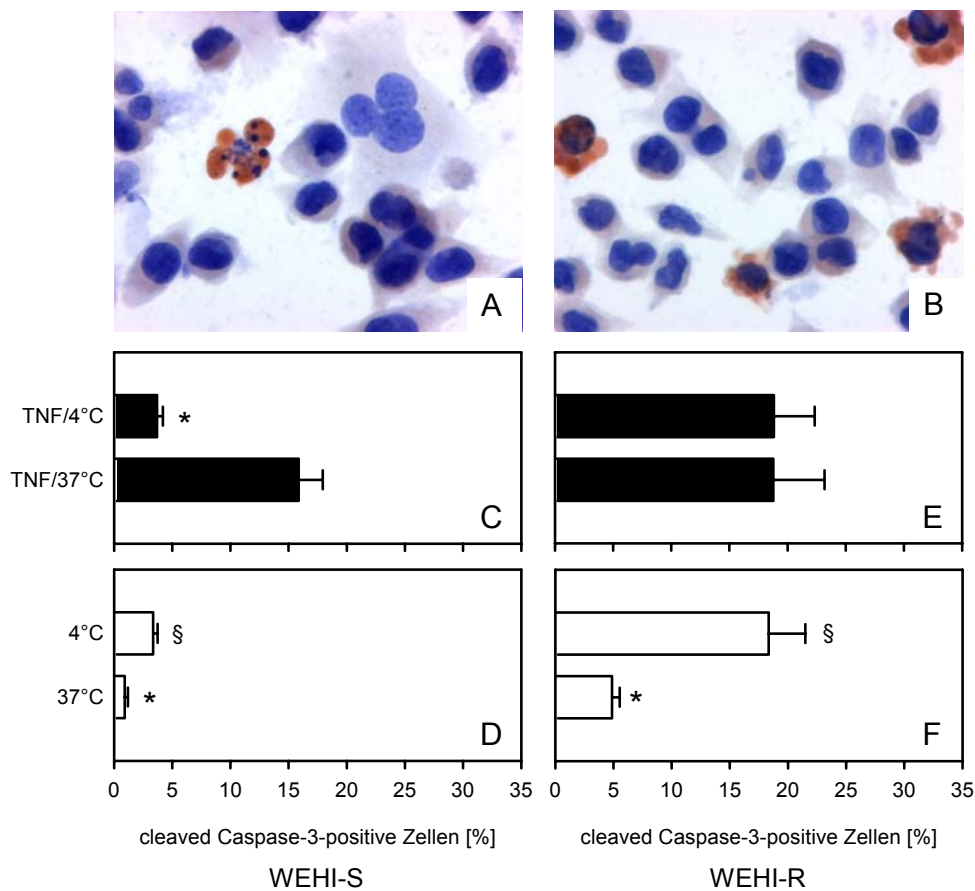


Abb. 13: Repräsentative immunzytochemische Darstellung aktiver Caspase-3-Spaltprodukte TNF- α -stimulierter WEHI-S Zellen nach 5h 37°C Inkubation mit der indirekten HRP/DAB-Technik (A,B), (Vergrößerung 600x). Apoptotische ’cleaved’ Caspase-3-positive Zellen in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□): WEHI-S (C,D), WEHI-R (E,F) und Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie zeigte nach der vierstündigen Kälteeinwirkung und einer Stunde Wiedererwärmung durch die immunzytochemische Detektion eine Protektion TNF- α -induzierter Apoptose gegenüber der 37°C-TNF-Kontrolle (Abb. 13C). Mit ca. 4% Caspase-3-aktivierter Zellen im kälteapplizierten Ansatz war ein hoch signifikanter Unterschied gegenüber dem wärmebehandelten Ansatz mit ca. 16% (Abb. 13A,B,C) zu verzeichnen. Die unstimulierten Zellen reagierten unter der Kältebehandlung mit einer signifikant verstärkten Apoptose gegenüber dem warmen Kontrollansatz (3,35% versus 0,92%, Abb. 13D).

Die TNF- α -resistente WEHI-R-Zelllinie entwickelte durch die Kälteeinwirkung, unabhängig von der Apoptose-Stimulierung, eine gesteigerte 'cleaved' Caspase-3 Expression gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrolle (Abb. 13E,F). Beide 4°C Inkubationen, mit und ohne TNF- α , und die TNF- α -stimulierte 37°C Gruppe wiesen eine vergleichbare Caspase-3-abhängige Apoptose-Induktion zwischen 18-19% auf (Abb. 13E,F). Im unstimulierten warmen Versuchsansatz wurden dagegen lediglich ca. 5% 'cleaved' Caspase-3-positive Zellen detektiert (Abb. 13F).

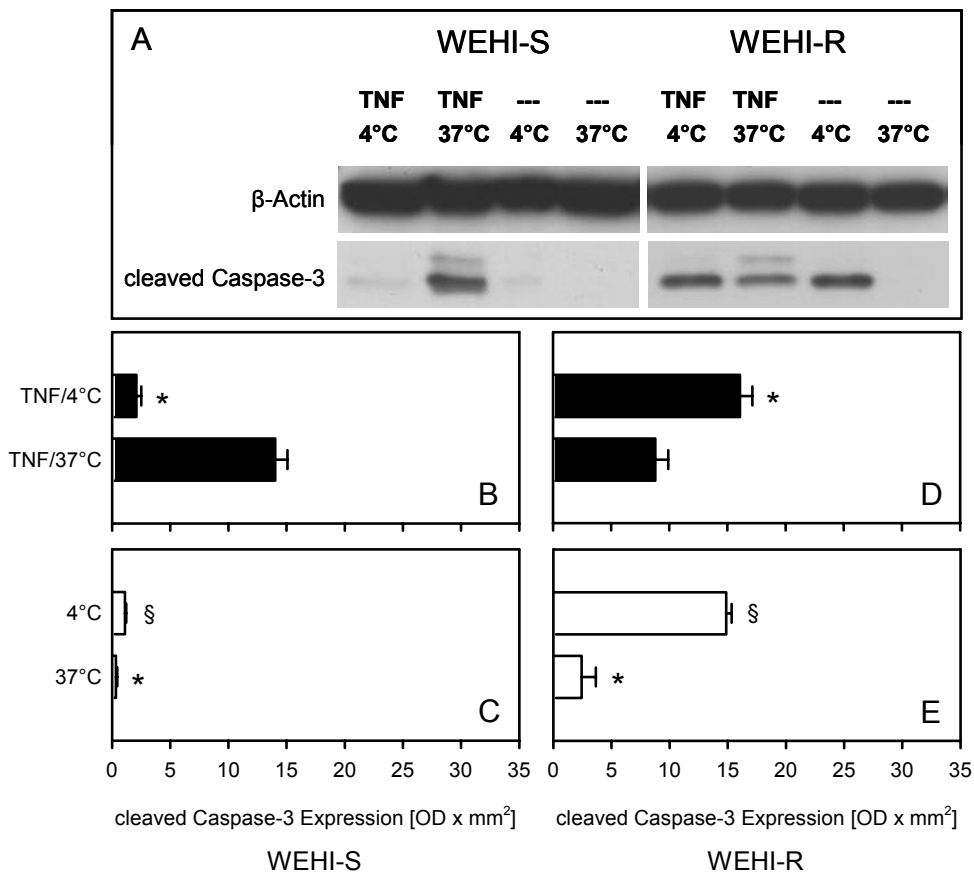


Abb. 14: Repräsentative Western-Blot-Analyse aktiver 'cleaved' Caspase-3 Spaltprodukte von WEHI-S und WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (A). Apoptotische 'cleaved' Caspase-3-positive Zellen der untersuchten WEHI-S (B,C) und WEHI-R (D,E) Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; * p <0,05 vs TNF/37°C, § p <0,05 vs 37°C. Verglichen wurde die β -Actin-korrigierte Protein-Expression über die densitometrisch ermittelte optische Dichte* Fläche (OD*mm²) der Banden.

Auch mittels Western-Blot-Analyse konnte das Expressionsmuster der aktiven Caspase-3-Spaltprodukte (Abb. 14A,B,C) in Einklang mit den durchflusszytometrisch und immunzytochemisch erhobenen Ergebnissen bestätigt werden. Die Kältebehandlung bewirkte bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen eine Protektion TNF- α -induzierter Apoptose gegenüber der 37°C-TNF-Kontrolle (Abb. 14B). Mit einer Caspase-3 Aktivierung entsprechend einer optischen Dichte von ca. 2 OD*mm² im kälteapplizierten Ansatz war ein hoch signifikanter Unterschied gegenüber dem warmen Ansatz mit ca. 14 OD*mm² (Abb. 14A,B) zu verzeichnen. Die unstimulierten Zellen reagierten unter der Kältebehandlung mit einer signifikant verstärkten Apoptose gegenüber dem korrespondierenden warmen Kontrollansatz (1,11 OD*mm² versus 0,33 OD*mm², Abb. 14A,C).

Die Kälteapplikation verursachte bei der TNF- α -resistenten WEHI-R Zelllinie, unabhängig von der Apoptosestimulierung, eine gesteigerte 'cleaved' Caspase-3 Expression gegenüber den 37°C Ansätzen (Abb. 14A,D,E). Für beide 4°C Inkubationen, mit und ohne TNF- α , konnte eine vergleichbare Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion entsprechend einer Caspase-3 Aktivierung von ca. 16 OD*mm² bzw. ca. 15 OD*mm² (Abb. 14D,E) ermittelt werden. Die TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen entwickelten nach der fünfstündigen 37°C Inkubation einen Anteil aktivierter Caspase-3-positiver Zellen entsprechend einer optischen Dichte von ca. 9 OD*mm² (Abb. 14D). Im unstimulierten warmen Versuchsansatz wurden 'cleaved' Caspase-3-positive Zellen äquivalent einer optischen Dichte von ca. 2 OD*mm² detektiert (Abb. 13E).

Zusammenfassend konnte die durchflusszytometrisch ermittelte Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte beider Zelllinien immunzytochemisch und Western-Blot-analytisch bestätigt werden. Das abweichende immunzytochemisch ermittelte Ergebnis bei WEHI-R Zellen ist auf das starke 'detachment' der beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen zurückzuführen.

5.2.3.2 Caspase-8 Expression

Als Indikatormolekül des extrinsischen rezeptorvermittelten Apoptose-'Pathways' wurde die Expression aktivierter Caspase-8 inklusive der inaktiven Vorläuferform mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelt.

Die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie zeigte unter warmer Inkubation eine TNF- α -induzierte Caspase-8 Expression. Mit einem Anteil von ca. 24% Caspase-8-positiver Zellen wurde auch in der stimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe eine vergleichbare Expression bzgl. TNF- α -induzierter Apoptose erzielt (Abb. 15A). Die unstimulierten Zellen reagierten unter der Kältebehandlung mit einem geringen jedoch signifikant unterschiedlichen Anstieg Caspase-8-positiver Zellen gegenüber dem warmen Kontrollansatz (ca. 19% versus 15%, Abb. 15B).

Die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie reagierte auf die Kälteeinwirkung, unabhängig von der Apoptose-Stimulierung, mit einer gesteigerten Caspase-8 Expression gegenüber der unstimulierten 37°C-Kontrollgruppe (Abb. 15C,D). Die kälteapplizierte TNF- α -stimulierte Versuchsgruppe antwortete mit einem Anteil von ca. 33% Caspase-8-positiver Zellen am stärksten auf den Apoptose-induzie-

renden Reiz, währenddessen die warmen stimulierten Zellen mit einem Anteil von 24% eine vergleichbare Apoptoseinduktion mit der kälteapplizierten unstimulierten Versuchsgruppe aufwies. In der unstimulierten warmen Kontrollgruppe wurden ähnlich wie bei WEHI-S Zellen mit ca. 15% Caspase-8-positive Zellen eine auffallend hohe Basisexpression detektiert.

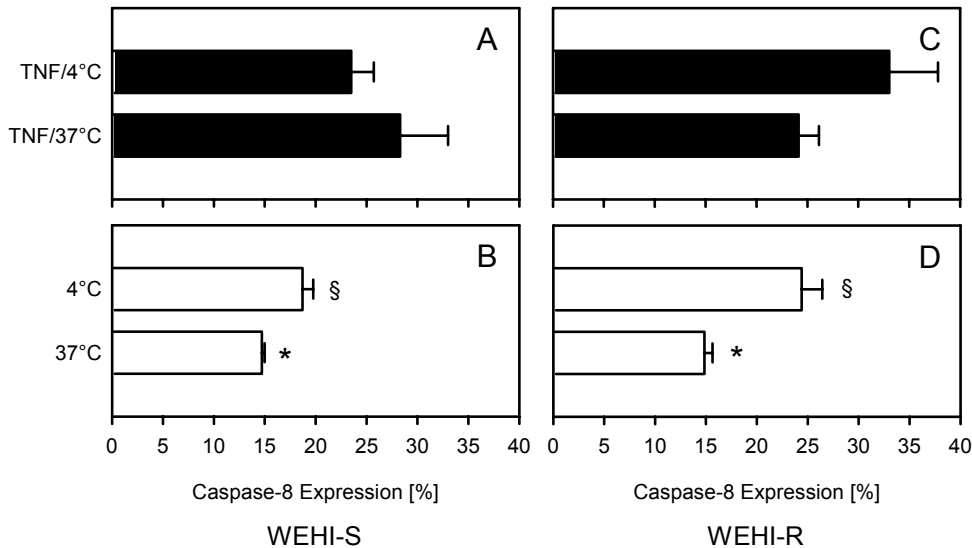


Abb. 15: FACS-Analyse der Caspase-8 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α (□). (A) WEHI-S (TNF/4/37°C), (B) WEHI-S (4/37°C), (C) WEHI-R (TNF/4/37°C), (D) WEHI-R (4/37°C) Zellen; Mittelwerte ± SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Zusammenfassend wurde für die Caspase-8 bei TNF-α-sensiblen WEHI-S Zellen sowohl eine TNF-α-induzierte, als auch eine kälteinduzierte gesteigerte Expression gegenüber der warmen unstimulierten Kontrolle beobachtet, wobei die Kälte die TNF-α-induzierte Caspase-8 Expression geringfügig und statistisch nicht signifikant inhibierte. Auch die TNF-α-resistenten WEHI-R Zellen reagierten auf den TNF-α- bzw. Kälte-Reiz in ähnlicher Weise, wobei die Kälte gegenüber den WEHI-S Zellen eine stärkere Caspase-8 Expression bewirkte und die TNF-α-induzierte Caspase-8 Expression verstärkte.

5.2.3.3 'cleaved' Caspase-9 Expression

Als Markerprotein des intrinsischen mitochondrienvermittelten Apoptose-'Pathways' wurde die Expression aktivierter Caspase-9 Spaltprodukte durchflusszytometrisch detektiert.

Die TNF-α-sensible WEHI-S Zelllinie zeigte nach der fünfstündigen 37°C-Inkubation eine TNF-α-induzierte Expression aktiver Caspase-9 Spaltprodukte. Die 'cleaved' Caspase-9 Expression der kälteapplizierten WEHI-S Zellen deutet auf eine Protektion vor TNF-α-induzierter Apoptose gegenüber der 37°C-TNF-Versuchsgruppe hin (Abb. 16A): Mit ca. 24% Caspase-9-aktivierter Zellen im kälteapplizierten Ansatz war eine 20%ige, jedoch nicht signifikant unterschiedliche Reduzierung der Caspase-9 Aktivierung gegenüber dem wärmebehandelten Ansatz mit einem ca. 30%igen Anteil

Caspase-9-aktivierter Zellen unter TNF- α -Stimulierung zu verzeichnen. Die unstimulierten Zellen reagierten unter der Kältebehandlung wiederum mit einer verstärkten Caspase-9 Aktivierung gegenüber dem warmen Kontrollansatz (ca. 21% versus ca. 14%, Abb. 16B).

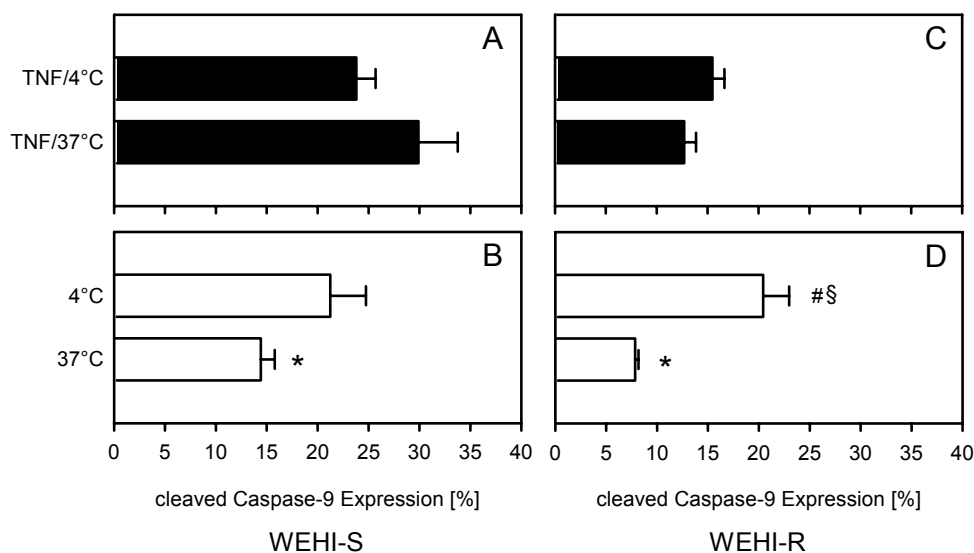


Abb. 16: FACS-Analyse der 'cleaved' Caspase-9 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). (A) WEHI-S (TNF/4/37°C), (B) WEHI-S (4/37°C), (C) WEHI-R (TNF/4/37°C), (D) WEHI-R (4/37°C) Zellen; Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie zeigte gegenüber den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen eine geringere Caspase-9 Aktivierung und entwickelten unter dem Kälteeinfluss ohne TNF- α -Stimulierung mit ca. 20% die größte Anzahl Caspase-9 aktivierter Zellen, die sich statistisch signifikant sowohl von der kälteapplizierten TNF- α -stimulierten als auch von der warmen unstimulierten Versuchsgruppe unterschied (Abb. 16C,D). Die stimulierten kältebehandelten und warmen WEHI-R Zellen wiesen mit einem Anteil von ca. 15% bzw. 13% Caspase-9 aktivierter Zellen eine vergleichbare TNF- α -induzierte mitochondriale Aktivierung auf. In der unstimulierten 37°C-Kontrollgruppe wurden ca. 8% Caspase-9-positive Zellen detektiert.

Zusammenfassend wurde für Caspase-9 bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen sowohl eine TNF- α induzierte, als auch eine kälteinduzierte gesteigerte Aktivierung gegenüber der warmen unstimulierten Kontrolle ermittelt. Auch die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten auf den TNF- α - bzw. Kälte-Reiz in ähnlicher Weise, wobei der Einfluss der Kälte auf die Caspase-9 Aktivierung überwog.

5.2.3.4 'cleaved' PARP-1 Expression

Die Polyadenyl-Ribose-Polymerase-1 (PARP-1), deren Expression durch Stressinduktion und während DNA-Reparaturvorgängen hochreguliert wird, dient als Substrat aktivierter Caspasen, insbesondere der Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7. Das kleinere Spaltprodukt der Caspasen-'cleaved'

PARP-1 bindet während apoptotischen Prozessen irreversibel an entstandene DNA-Strangbrüche und kehrt so die eigentliche Reparaturfunktion um, indem das DNA-’Repair’ verhindert wird. Der Anteil ’cleaved’ PARP-1 positiver Zellen der Gesamtpopulation wurde als weiterer Indikator für Apoptose durchflusszytometrisch ermittelt.

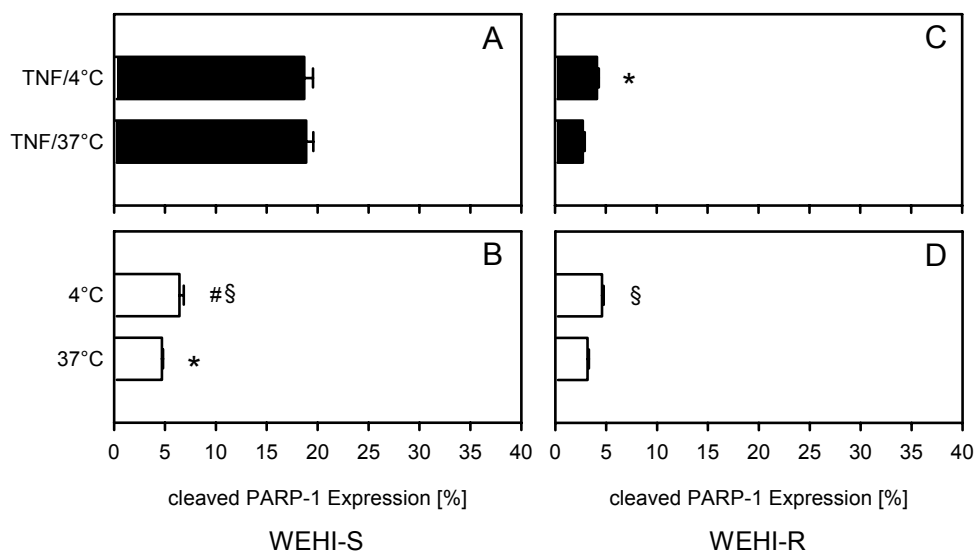


Abb. 17: FACS-Analyse der ’cleaved’ PARP-1 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). (A) WEHI-S (TNF/4/37°C), (B) WEHI-S (4/37°C), (C) WEHI-R (TNF/4/37°C), (D) WEHI-R (4/37°C) Zellen; Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Nach der fünfstündigen TNF- α -Inkubation wies die TNF- α -sensible Zelllinie WEHI-S in den stimulierten kälteapplizierten und warmen Ansätzen mit einem Anteil von ca. 19% ’cleaved’-PARP-1-positiver Zellen die größte Spaltungsaktivität der involvierten Caspasen auf (Abb. 17A). In den unstimulierten kältebehandelten und warmen Versuchsgruppen wurde eine vergleichbare, jedoch signifikant unterschiedliche Anzahl von ca. 6% und ca. 5% PARP-1-Spaltprodukt-positiven Zellen ermittelt (Abb. 17B). Von ihren korrespondierenden unstimulierten Versuchsgruppen unterschieden sich sowohl die kälteapplizierten stimulierten WEHI-S Zellen mit einer Steigerung von ca. 200%, als auch die 37°C-inkubierten Zellen mit einem Zuwachs von ca. 300% ’cleaved’ PARP-1 positiver Zellen hoch signifikant.

Für die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie wurde im Vergleich zur WEHI-S Zelllinie eine geringere Anzahl ’cleaved’ PARP-1 positiver Zellen detektiert. Die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen entwickelten mit ca. 4% unter TNF- α -Stimulierung und ca. 5% ohne Stimulierung den größten Anteil an ’cleaved’ PARP-1 positiven Zellen und unterschieden sich statistisch signifikant von den korrespondierenden warmen Versuchsgruppen (Abb. 17C,D). Die Spaltungsaktivität der involvierten Caspasen lag in beiden kältebehandelten Versuchsgruppen ca. 50% über der der korrespondierenden warmen Ansätze.

Zusammenfassend wurde für die Aktivität der in die PARP-1-Spaltung involvierten Caspasen, für TNF- α -sensible WEHI-S Zellen, eine TNF- α induzierte gesteigerte 'cleaved' PARP-1 Expression gegenüber den korrespondierenden unstimulierten Versuchsgruppen detektiert. Daneben war auch unter alleinigem hypothermen Einfluss eine geringe signifikant unterschiedliche Caspasen-abhängige PARP-1 Spaltung zu verzeichnen. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten lediglich unter dem Kälte-Reiz mit einem geringen, jedoch signifikant unterschiedlichen Anstieg der PARP-1-Spaltprodukte im Vergleich zu den korrespondierenden warmen Versuchsgruppen.

5.2.3.5 TNF-R1/R2-Rezeptor Expression

Zur Klärung, wie sich die Kälteapplikation auf den Apoptose-induzierenden TNF-R1 und den 'Survival'-induzierenden TNF-R2 Rezeptor auswirkt, wurde die extrazelluläre Expression der beiden Rezeptoren am Durchflusszytometer, sowie die intra- und extrazelluläre Expression Western-Blot-analytisch ermittelt.

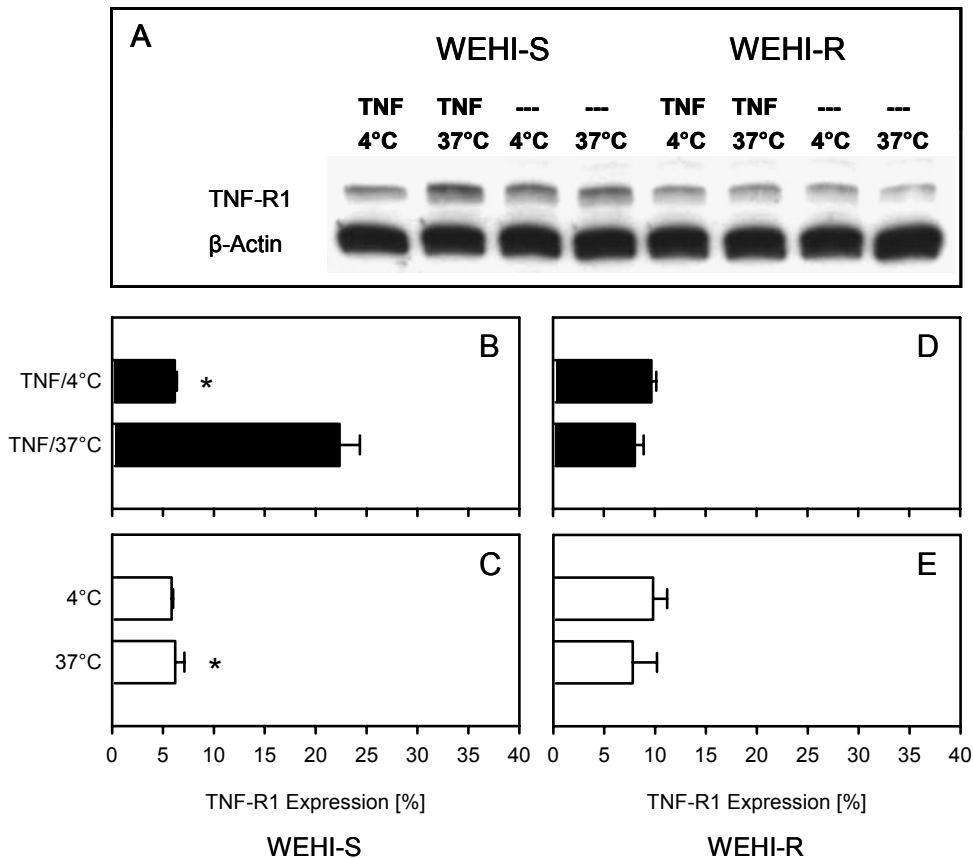


Abb. 18: Repräsentative Western-Blot-Analyse der TNF-R1-Rezeptor Expression von WEHI-S und WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (A). Durchflusszytometrisch ermittelte TNF-R1-positive Zellen in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S (B,C) und WEHI-R (D,E) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C.

Während die durchflusszytometrisch ermittelte extrazelluläre TNF-R1 Expression in den beiden kältebehandelten Versuchsgruppen der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen im Bereich der warmen unstimulierten Kontrollgruppe lag, erhöhte sich die extrazelluläre TNF-R1 Rezeptorexpression in der TNF- α -stimulierten warmen Versuchsgruppe um ca. 245% bzgl. der korrespondierenden unstimu-

lierten Kontrollgruppe (Abb. 18B,C). Der TNF-R1 Rezeptor der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen war weder durch die TNF- α -Stimulierung noch durch die Kälteapplikation zu induzieren. Lediglich für die beiden hypotherm inkubierten Versuchsgruppen deutete sich eine schwache Tendenz einer Rezeptorexpression an. In der Western-Blot-Analyse ergab sich für den TNF-R1 Rezeptor ein analoges Expressionsmuster (Abb. 18A).

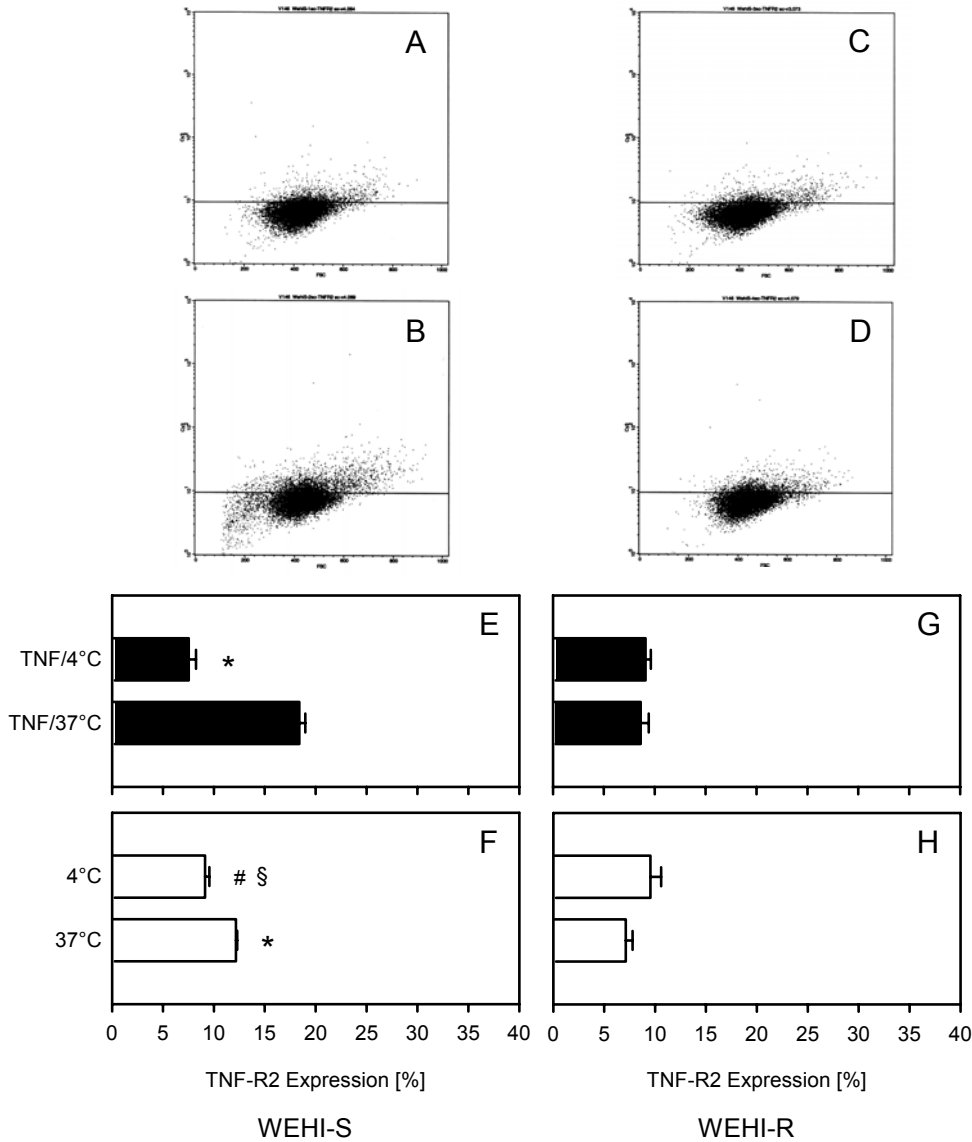


Abb. 19: TNF-R2 Expression in % der Gesamtzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□): Repräsentative FACS-Analyse (A) WEHI-S (TNF/4°C), (B) WEHI-S (TNF/37°C), (C) WEHI-S (4°C), (D) WEHI-S (37°C) Zellen und Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); * p <0,05 vs TNF/37°C, § p <0,05 vs 37°C, # p <0,05 vs TNF/4°C.

Der extrazelluläre membranständige TNF-R2 Rezeptor der WEHI-S Zellen reagierte bei permanenter 37°C Inkubation mit einer TNF- α -vermittelten Induktion im Vergleich zur unstimulierten korrespondierenden Versuchsgruppe (Abb. 19B,E). Unter Kälteapplikation war mit und ohne TNF- α -Stimulierung sogar eine Verminderung membrangebundener TNF-R2 Rezeptoren im Vergleich zur unstimulierten warmen Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 19A-F).

Die Expressionsstärke des TNF-R2 Rezeptors der WEHI-R Zellen wurde weder durch die TNF- α -Stimulierung noch durch die hypotherme Einwirkung beeinflusst. In Analogie zur TNF-R1 Expression deutete sich auch für die TNF-R2 Rezeptor Expression lediglich eine schwache Tendenz einer Kälte- und auch TNF- α -vermittelten Induktion an.

Zusammenfassend ließ sich für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen eine Induktion der membrangebunden TNF-R1 und TNF-R2-Rezeptoren ermitteln. Die Kälteapplikation verhinderte die TNF- α -induzierte Expression beider Rezeptoren. Für den TNF-R2 Rezeptor zeichnete sich sogar eine kälteinduzierte Expressionsinhibierung ab. TNF- α -resistente WEHI-R Zellen wiesen in allen Versuchsgruppen keine signifikant unterschiedliche Expression beider Rezeptoren auf. Es deutete sich lediglich eine schwache Tendenz der TNF-R1 Expression durch die Kälte sowie der TNF-R2 Expression durch den Einfluss der Kälte und TNF- α an.

5.2.3.6 p53 Expression

Als weiterer Apoptoseindikator wurde die Expression des Tumorsuppressor-Proteins p53, das in die Regulierung der zellulären Antwort auf zytotoxischen Stress involviert ist, mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. p53 führt die Zelle nach erfolgten DNA-Schäden in den G₁/G₂-Zyklusarrest, um Gelegenheit zum DNA-’Repair’ zu geben. Sind die DNA-Reparaturmechanismen nicht erfolgreich, induziert p53 Apoptose.

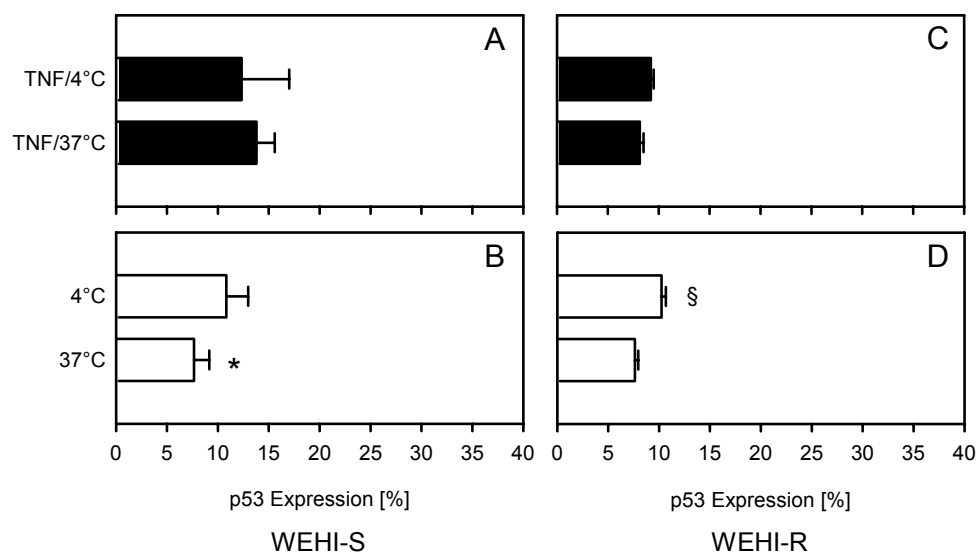


Abb. 20: FACS-Analyse der p53 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S (A,B) und WEHI-R (C,D) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Jede Gruppe beinhaltet vier Versuchsansätze. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Die p53 Protein-Expression beider Zelllinien war nicht stark induziert. Die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie zeigte nach der fünfstündigen Inkubation mit einem Anteil von ca. 12% p53-positiver Zellen im stimulierten kälteapplizierten und ca. 14% im stimulierten warmen Ansatz eine vergleichbare Expression des Tumorsuppressors (Abb. 20A). In ähnlicher Weise reagierten auch die

kältebehandelten Zellen ohne TNF- α -Stimulierung mit einem Anteil von ca. 11% p53-positiver Zellen gegenüber dem warmen Kontrollansatz mit ca. 8% (Abb. 20B). Die TNF- α -stimulierte 37°C inkubierte Versuchsgruppe unterschied sich von dem unstimulierten korrespondierenden Ansatz mit statistischer Signifikanz (80% Anstieg p53-positiver Zellen unter TNF- α -Stimulierung). Der Kältestimulus führte mit und ohne TNF- α -Einwirkung zu einer Steigerung von ca. 60 bzw. 40% p53-positiver Zellen gegenüber der warmen unstimulierten Kontrollzellen.

Die TNF- α -resistente WEHI-R-Zelllinie reagierte auf die Kälteeinwirkung, unabhängig von der Apoptosestimulierung, mit einer schwachen p53 Expressionssteigerung gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrollgruppe (Abb. 20C,D). Die kälteapplizierte unstimulierte Versuchsgruppe antwortete mit einem Anteil von ca. 10% p53-positiver Zellen am stärksten.

Zusammenfassend wurde für die p53 Expression TNF- α -sensibler WEHI-S Zellen sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte schwache Expressionssteigerung gegenüber der warmen unstimulierten Kontrolle beobachtet. Bei TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen ließ sich durch die gewählten Versuchsbedingungen nur eine sehr mäßige p53 Expression hervorrufen. Lediglich die kälteapplizierten Zellen reagierten mit einer 20 bis 30%igen p53 Induktion.

5.2.3.7 NF κ B Expression

Die Expression des Transkriptionsfaktors NF κ B, der in die TNF- α -induzierte Signaltransduktion involviert ist, wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Der verwendete Antikörper erkennt selektiv nur die aktivierte p65 Untereinheit. Da das gewonnene Proteinextrakt zytosolisches und karyosolisches Protein enthielt, kann lediglich eine Aussage über die Quantität des löslichen aktivierten Transkriptionsfaktors, aber nicht über seine DNA-Bindung bzw. Transaktivierung, getroffen werden.

Die quantitative Auswertung der Western-Blot-Analyse ergab für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen in der warminkubierten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe einen signifikant unterschiedlichen Anstieg der NF κ B Expression von ca. 80% gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrolle. Auch die kälteapplizierte TNF- α -stimulierte Versuchsgruppe wies einen leichten Anstieg der NF κ B Expression auf (Abb. 22A-C). Für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen war nur in der warminkubierten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe eine vermehrte Expression der p65 Untereinheit zu verzeichnen (Abb. 22 A,D,E).

Zusammenfassend wurde für die NF κ B Expression der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen eine TNF- α -abhängige Aktivierung evaluiert, die sich durch die Kälteapplikation verminderte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen lediglich unter warmen Inkubationsbedingungen eine schwache TNF- α -stimulierte NF κ B Aktivierung auf, die ebenfalls durch die Kälte inhibiert wurde. Der hypotherme Einfluss ohne TNF- α -Stimulierung hatte keinen Effekt auf die NF κ B Aktivierung.

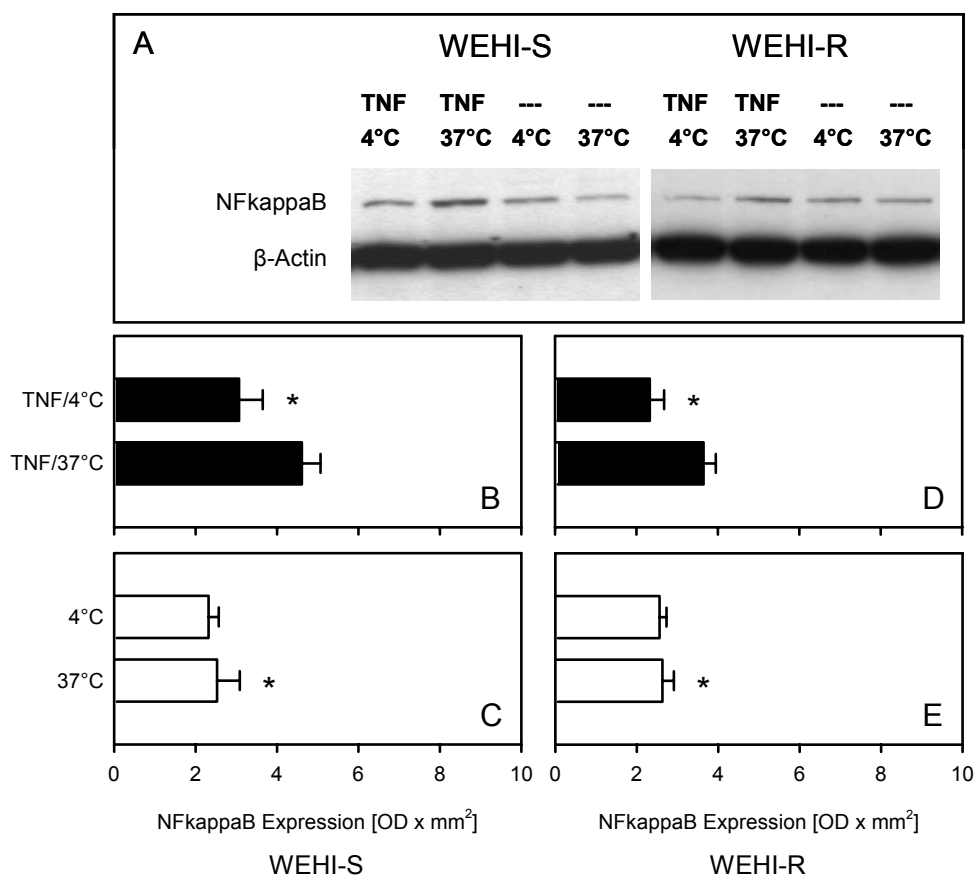


Abb. 22: Repräsentative Western-Blot-Analyse der NFκB Expression von WEHI-S und WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF-α-Stimulierung (A). NFκB-positive Zellen der untersuchten WEHI-S (B,C) und WEHI-R (D,E) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α (□). Mittelwerte ± SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; *p < 0,05 vs TNF/37°C, §p < 0,05 vs 37°C. Verglichen wurde die β-Actin-korrigierte Protein-Expression über die densitometrisch ermittelte optische Dichte*Fläche (OD*mm²) der Banden.

5.2.4 Caspase-3 und p53 mRNA Expression

Zur Klärung, ob die Apoptose-involvierten Proteine Caspase-3 und p53 transkriptionell oder transkriptionsunabhängig reguliert sind, wurde die mRNA Expression der beiden Apoptoseparameter als Indikatoren für den extrinsischen und intrinsischen Apoptose'Pathway' mithilfe der semiquantitativen RT-PCR überprüft (Abb. 24 und 25).

Für die TNF-α-sensible WEHI-S Zelllinie konnten mittels RT-PCR keine signifikant unterschiedliche Ergebnisse der Caspase-3 Expression erzielt werden (Abb. 24A-C). Im gekühlten TNF-α-stimulierten Ansatz wurde nach 5h eine geringfügig gesteigerte mRNA Expression gegenüber allen anderen Versuchsgruppen ermittelt (0,64 versus 0,48-0,42). Der Anstieg an mRNA betrug für den kälteapplizierten stimulierten Ansatz ca. 52% und für den warmen stimulierten und gekühlten unstimulierten Ansatz ca. 14% gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle. Für die p53 mRNA Expression konnte in den TNF-α-stimulierten gekühlten und warmen Ansätzen ebenfalls nur ein geringer Anstieg (ca. 49% und ca. 28%) gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 14A,D,E). Die p53 mRNA Expression der gekühlten unstimulierten WEHI-S Zellen unterschied sich nicht vom warmen unstimulierten Kontrollansatz (ca. 3% Anstieg der p53 mRNA Expression).

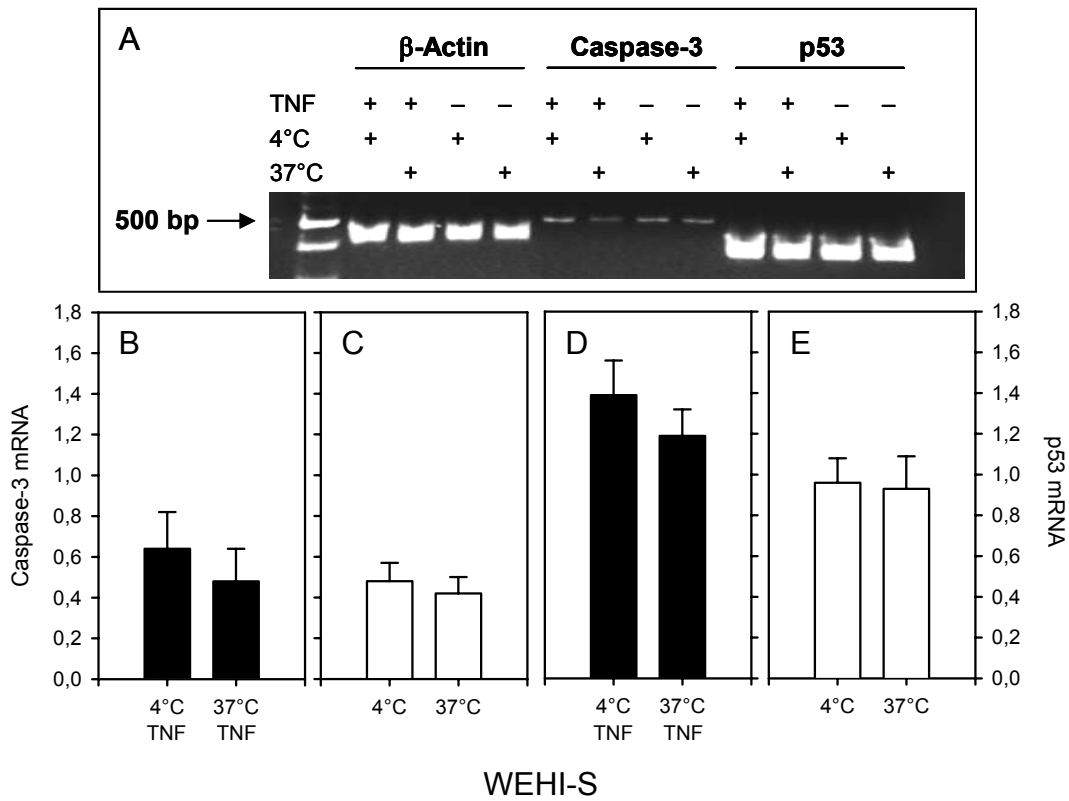


Abb. 24: Repräsentative Caspase-3 und p53 RT-PCR-Analyse von WEHI-S Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (A). Caspase-3 mRNA Expression (B,C) und p53 mRNA Expression (D,E) der untersuchten WEHI-S Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Dargestellt sind die β -Actin-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und β -Actin-Banden) \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen.

Für die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie konnten nach 5h ebenfalls nur eine sehr geringfügig gesteigerte Caspase-3 mRNA Expression aller Versuchsgruppen gegenüber dem unbehandelten warmen Kontrollansatz ermittelt werden (Abb. 25A-C). In den TNF- α -stimulierten warmen und gekühlten Ansätzen wurde für die Caspase-3 mRNA Expression ein geringer Anstieg (ca. 41% und ca. 31%) gegenüber der unbehandelten warmen Kontrollzellen festgestellt. Für die gekühlten unstimulierten WEHI-R Zellen wurde ein noch geringerer Unterschied im Vergleich zur warmen unstimulierten Kontrollgruppe (ca. 11% Anstieg der Caspase-3 mRNA Expression im gekühlten Ansatz) ermittelt (Abb. 25A-C). Die p53 mRNA Expression war in den beiden gekühlten Versuchsansätzen und im warmen stimulierten Ansatz gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle erhöht (Abb. 25A,D,E). Der größte, statistisch signifikante Unterschied mit einem mRNA Anstieg von ca. 122% bezüglich der warmen Kontrollgruppe wurde für die TNF- α -stimulierten 37°C Inkubation evaluiert. Die gekühlten stimulierten WEHI-R Zellen reagierten mit einer mRNA Expressionssteigerung von ca. 83% (Abb. 25A,D). Für die gekühlten unstimulierten Zellen konnte eine vermehrte statistisch signifikante mRNA Expression von ca. 54% gegenüber der warmen unstimulierten Kontrolle bestimmt werden.

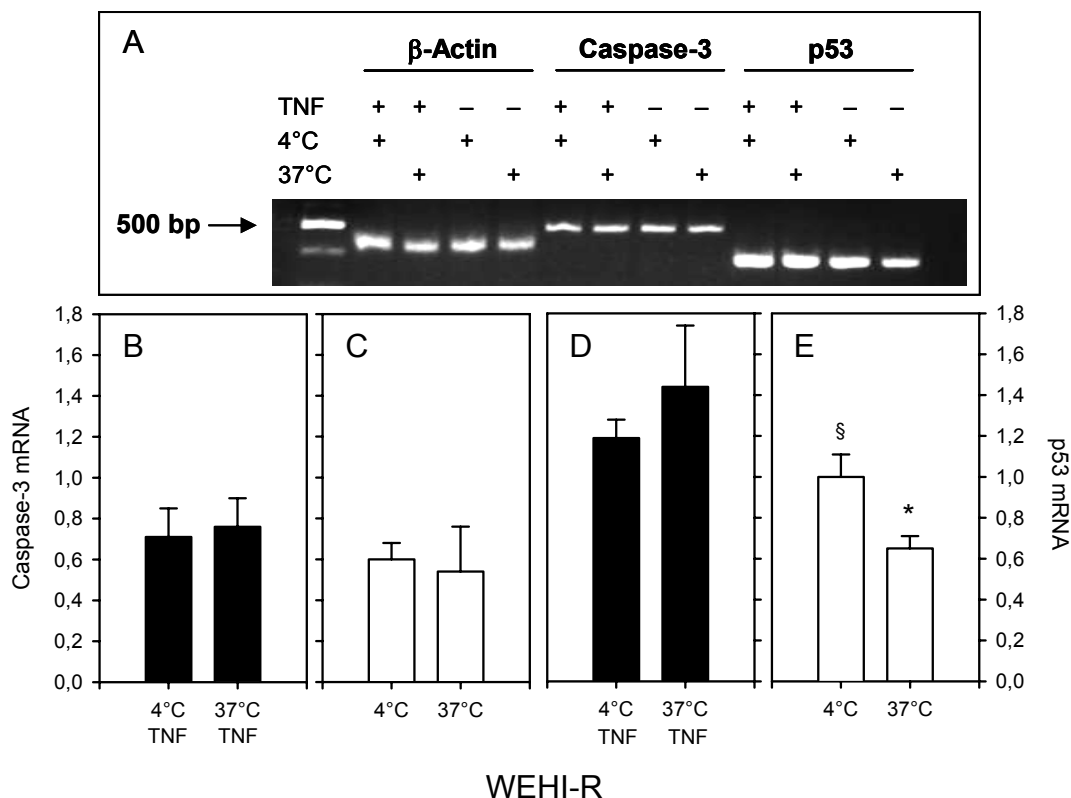


Abb. 25: Repräsentative Caspase-3 und p53 RT-PCR-Analyse von WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (A). Caspase-3 mRNA Expression (B,C) und p53 mRNA Expression (D,E) der untersuchten WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□). Dargestellt sind die β -Actin-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und β -Actin-Banden) \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Zusammenfassend müssen für die Regulation der Caspase-3 und p53 Aktivierung der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung und Kältebehandlung in erster Linie transkriptionsunabhängige Mechanismen vermutet werden. Auch für die WEHI-R Zellen kann für die Caspase-3 Aktivierung unter TNF- α -Stimulierung und Kältebehandlung vorrangig von posttranskriptionellen Regulationsmechanismen ausgegangen werden, während die p53 Aktivierung eher einer transkriptionellen Regulation zu unterliegen scheint. Das Basis-Level der p53 mRNA Expression war für beide Zelllinien gegenüber dem Grund-Level der Caspase-3 mRNA Expression erhöht.

5.2.5 Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Caspase-3 Aktivierung stimulierter und unstimulierter WEHI-S Zellen

Da sich die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C gefolgt von einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C für die WEHI-S Zelllinie unter TNF- α -Stimulierung auf Entstehung von Apoptose protektiv auswirkte, sollte nun der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen und verlängerter Inkubationsintervalle anhand der Caspase-3 Expression überprüft werden. Dazu wurden die WEHI-S Zellen mit und ohne TNF- α -Stimulierung für 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20 und 24h bei 32°C, 24°C, 10°C und 4°C mit einer anschließenden Wiedererwärmungsphase von 4h bei 37°C inkubiert und der Anteil aktiver Caspase-3

Spaltprodukt-positiver Zellen an der Gesamtpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten permanent 37°C inkubierte TNF- α -stimulierte und unstimulierte WEHI-S Zellen.

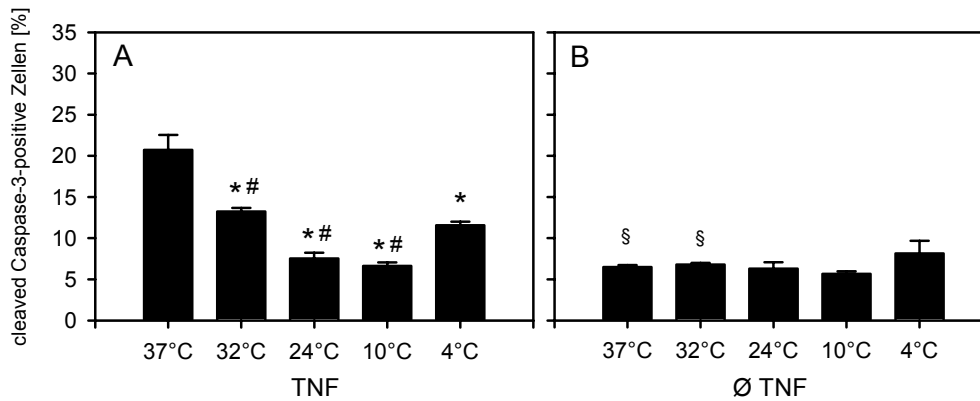


Abb. 26: Durchflusszytometrisch ermittelte 'cleaved' Caspase-3 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S nach 4h bei 37°C, 32°C, 24°C, 10°C und 4°C Inkubation (A) mit bzw. (B) ohne TNF- α -Stimulierung als Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs korrespondierendes TNF, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Um den ausschließlichen Einfluss der Hypothermie ohne Wiedererwärmungsphase zu evaluieren, wurde zunächst die 'cleaved' Caspase-3 Expression nach vier Stunden Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen untersucht. Für sämtliche Temperaturen konnte nach der vierstündigen Einwirkdauer eine Verminderung Caspase-3-positiver Zellen unter TNF- α -Stimulierung gegenüber der TNF- α -stimulierten 37°C Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 26A). Der Anteil Caspase-3-aktivierter Zellen verminderte sich zwischen 37°C und 10°C in Abhängigkeit von der Temperaturabnahme. Nur für die 4°C inkubierten TNF- α -stimulierten Zellen war ein Zuwachs Caspase-3-aktivierter Zellen von ca. 75% gegenüber den 10°C inkubierten Zellen zu verzeichnen, der aber dennoch gegenüber der 37°C Kontrolle einer signifikant unterschiedlichen Verminderung der Caspase-3 Aktivierung von 45% entsprach. Die unstimulierten WEHI-S Zellen zeigten zwischen 37°C und 10°C keinen Unterschied in der Expression aktivierter Caspase-3. Auch hier wurde lediglich für die 4°C inkubierten Zellen ein Zuwachs der Caspase-3 Aktivierung beobachtet, der im Vergleich zur unstimulierten 37°C Kontrolle einem nicht signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen von 25% entsprach (Abb. 26B). Außer den beiden 37°C und 32°C Ansätzen unterschieden sich die übrigen Inkubationstemperaturen nicht signifikant von ihren korrespondierenden TNF- α -stimulierten Ansätzen.

Im zeitlichen Verlauf reagierten die gekühlten unstimulierten WEHI-S Zellen nach der vierstündigen Wiedererwärmung gegenüber der 37°C Kontrolle mit einer temperaturabhängigen verstärkten Expression aktivierter Caspase-3 (Abb. 27E-H), die sich mit abnehmender Temperatur verringerte. Nach 2 bis 3h gekühlter Inkubation und nachfolgender Wiedererwärmung zeichnete sich für alle untersuchten Temperaturen ein erster Gipfel aktivierter Caspase-3 Expression ab. Nach 4h gekühlter Inkubation war nach erfolgter Wiedererwärmung für alle Temperaturen ein Rückgang der Caspase-3 Aktivierung zu beobachten. Nach 8 bis 12h schloss sich ein weiterer Anstieg der Caspase-3 Expression an.

sion an. Der größte Unterschied der Caspase-3 Aktivierung gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrollgruppen war für alle Versuchsgruppen nach 2 bis 3h bzw. 24h Kühlung und erfolgter vierstündiger Wiedererwärmung vorzufinden.

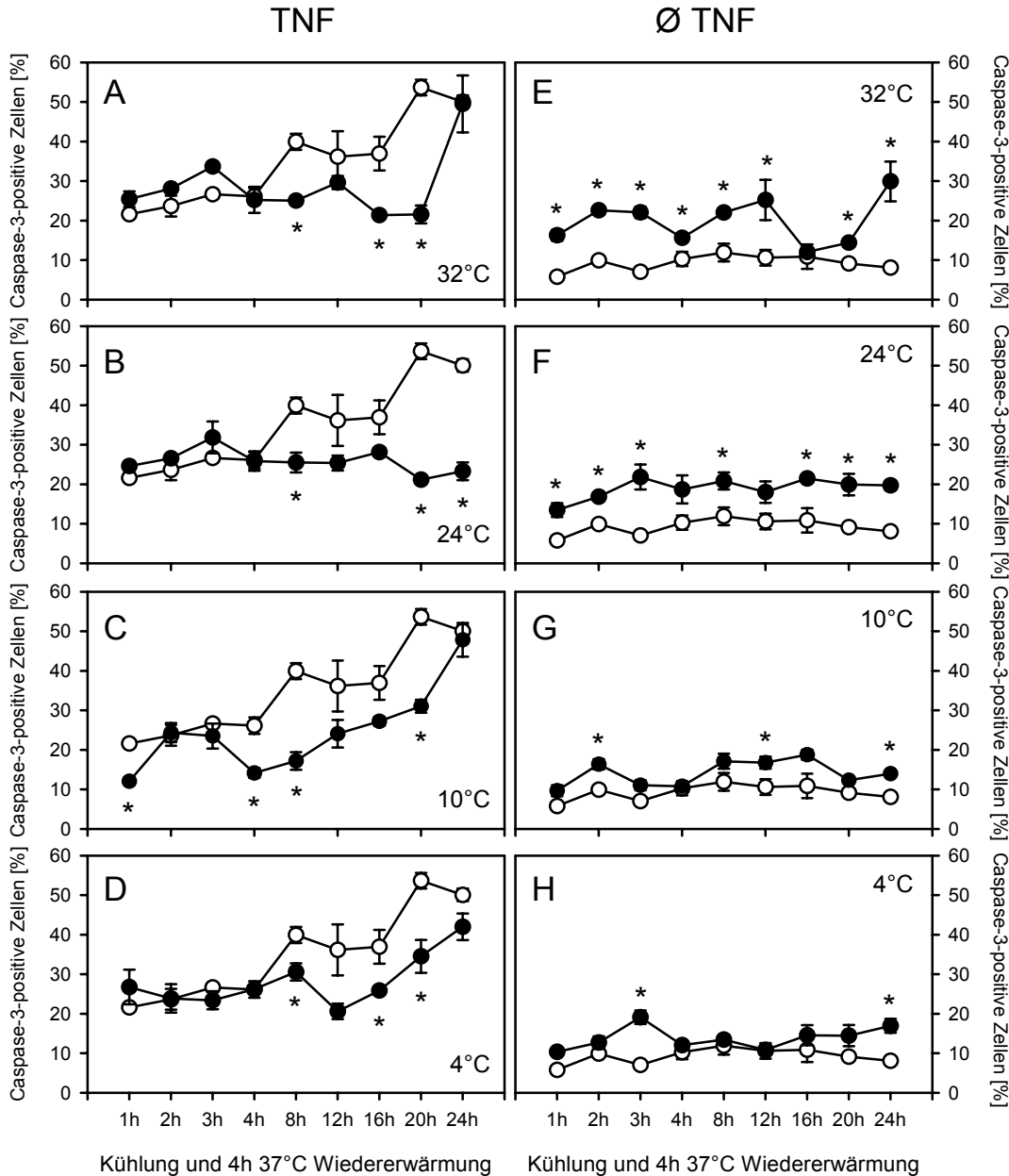


Abb. 27: Durchflusszytometrisch ermittelte 'cleaved' Caspase-3 Expression in % der Gesamtzellzahl der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S nach 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h und 24h Kühlung (●) bei 32°C (A) mit bzw. (E) ohne TNF- α , bei 24°C (B) mit bzw. (F) ohne TNF- α , bei 10°C (C) mit bzw. (G) ohne TNF- α und 4°C Inkubation (D) mit bzw. (H) ohne TNF- α -Stimulierung. Als Kontrollgruppe sind jeweils die 37°C inkubierten WEHI-S Zellen mit und ohne TNF- α (○) dargestellt. Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen; * p <0,05 vs 37°C/Kontrollen.

Unter TNF- α -Stimulierung zeigten die 32 und 24°C inkubierten WEHI-S Zellen übereinstimmend in den ersten drei Stunden der gekühlten Inkubation nach erfolgter Wiedererwärmung einen geringen Anstieg der Caspase-3 Aktivierung im Vergleich zur 37°C Kontrolle. Nach 4h gekühlter Inkubation war für beide Versuchsgruppen kein Unterschied der Caspase-3 Expression gegenüber der

37°C Kontrolle zu ermitteln. Im weiteren Fortgang übte die Kälteapplikation ab der achten gekühlten Inkubationsstunde einen protektiven Effekt aus, wobei sich im 32°C Ansatz nach 24h gekühlter Inkubation, im Gegensatz zur 24°C Inkubation, die Expressionsstärke der aktivierten Caspase-3 wiederum an die 37°C Kontrolle anglich. Ein vergleichbarer Verlauf ergab sich auch für die 10 und 4°C Inkubationen; während sich die Messwerte in den ersten 3 bis 4h im Bereich der 37°C Kontrolle bewegten, war für die 10°C Versuchsgruppe eine Protektion ab der vierten und für die 4°C Gruppe ab der achten gekühlten Inkubationsstunde zu verzeichnen.

Zusammenfassend konnte für die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie nach alleiniger vierstündiger hypothermer Inkubation für alle untersuchten Temperaturen eine Protektion vor TNF- α -induzierter Apoptose im Vergleich zur 37°C inkubierten Kontrollgruppe demonstriert werden. Die unstimulierten Zellen reagierten auf die unterschiedlichen Temperaturen ohne Einfluss auf die Expression aktivierter Caspase-3. Lediglich die 4°C Inkubationen zeigten sowohl mit als auch ohne TNF- α einen Zuwachs des Anteils apoptotischer Zellen. Im zeitlichen Verlauf ließ sich für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung für die gewählten Temperaturen i. d. R. ab der dritten bis vierten Inkubationsstunde mit nachfolgender vierstündiger Wiedererwärmung eine Verminderung der aktiven Caspase-3 Spaltprodukte gegenüber der korrespondierenden 37°C Kontrolle beobachten. Die unstimulierten WEHI-S Zellen hingegen zeigten eine vermehrte Produktion aktiver Caspase-3 Spaltprodukte gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrolle, die sich mit abnehmender Temperatur verminderte.

5.3 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Zellstress TNF- α -stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen

Zur Überprüfung, ob die TNF- α -stimulierten und unstimulierten WEHI-S und WEHI-R Zellen unter Einwirkung von Kälte mit Zellstress reagieren, wurden verschiedene Stress-spezifische Parameter in der Regel direkt nach der Kälteeinwirkung (4h) und zusätzlich nach einer Stunde Wiedererwärmung (5h) untersucht.

5.3.1 ROS-Generierung (DCFH-DA)

Die Ermittlung von ROS-vermitteltem Zellstress wurde durchflusszytometrisch mithilfe des Fluoreszenzindikators Dichlorofluoreszein-Diazetat (DCFH-DA) durchgeführt, der die Bildung intrazellulärer ROS, insbesondere H₂O₂, indiziert, indem das durch endogene Esterasen reduzierte nicht fluoreszierende Dichlorofluoreszin (DCFH) in Anwesenheit von ROS schnell zu grünfluoreszierendem Dichlorofluoreszein (DCF) oxidiert wird.

Die TNF- α -Stimulierung induzierte nach 4h eine ROS-Generierung der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen sowohl in der kälteapplizierten, als auch in der warmen Versuchsgruppe (Abb. 28A-E). Während der hypotherme Einfluss auf die TNF- α -induzierte ROS-Generierung keine Auswirkung zeigte, verursachte die vierstündige Kälteapplikation ohne TNF- α -Stimulierung einen fulminanten

ROS-Anstieg, der sich mit statistischer Signifikanz von der korrespondierenden warmen und auch TNF- α -stimulierten kältebehandelten Versuchsgruppe unterschied (Abb. 28E). Nach einer Stunde Wiedererwärmung war für beide kälteapplizierte Versuchsgruppen ein Rückgang der DCF-indizierten ROS-Generierung zu verzeichnen. Die warminkubierten Versuchsgruppen hielten hingegen die zum Zeitpunkt 4h ermittelte DCF-Fluoreszenzintensität auf konstantem Niveau bei (Abb. 28E). Trotz des Rückgangs der ROS-Generierung im unstimulierten kälteapplizierten Versuchsansatz war die Kälte ohne TNF- α -Stimulierung auch nach der einstündigen Wiedererwärmungsphase der stärkste ROS-Induktor.

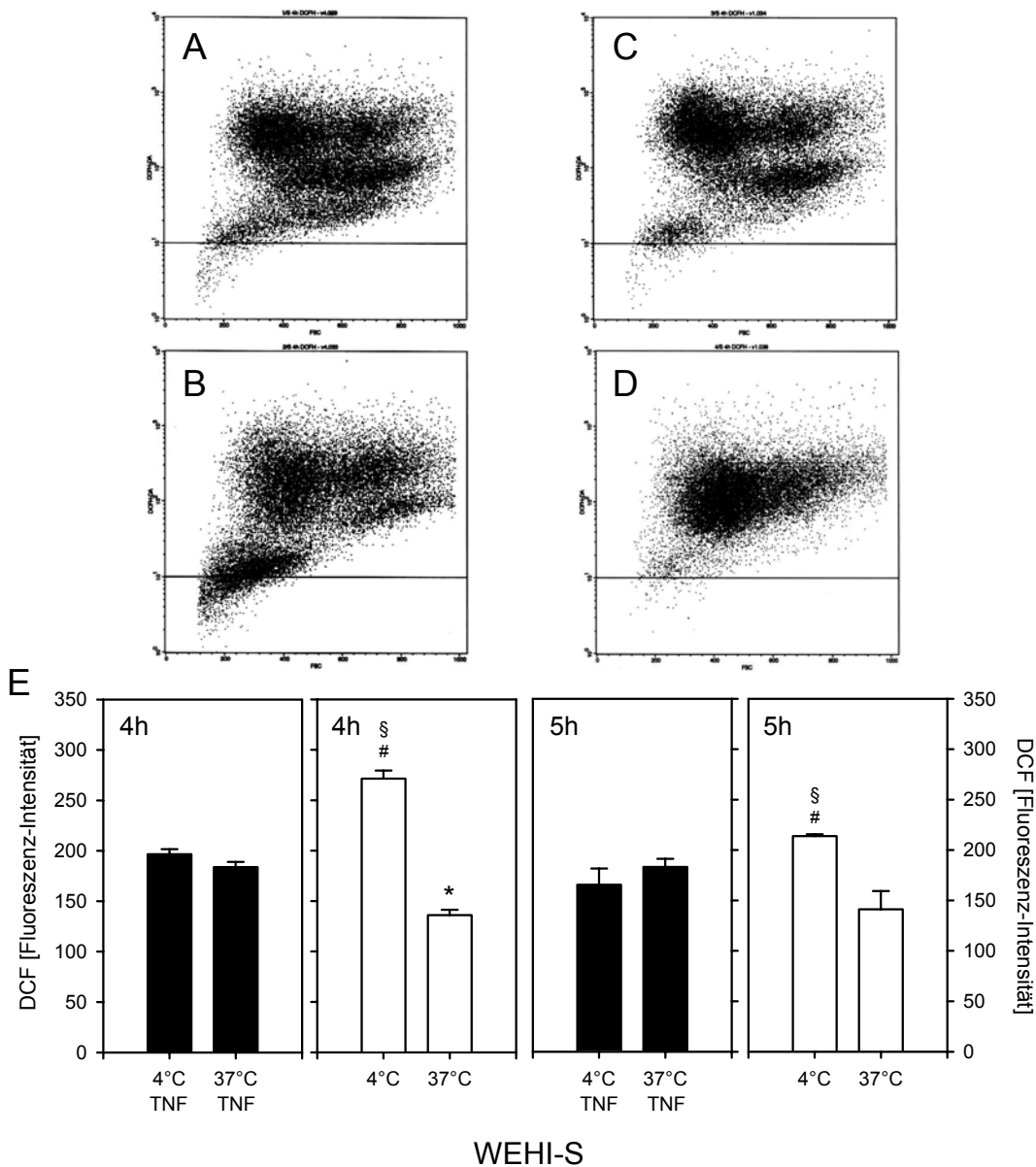


Abb. 28: Repräsentative FACS-Analyse der durch ROS generierten mittleren DCF-Fluoreszenzintensität der untersuchten WEHI-S Zelllinie nach 4h: TNF/4°C (A), TNF/37°C (B), 4°C (C), 37°C (D). ROS-Generierung der WEHI-S Zellen nach 4h 4°C bzw. 37°C und 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation (E) mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

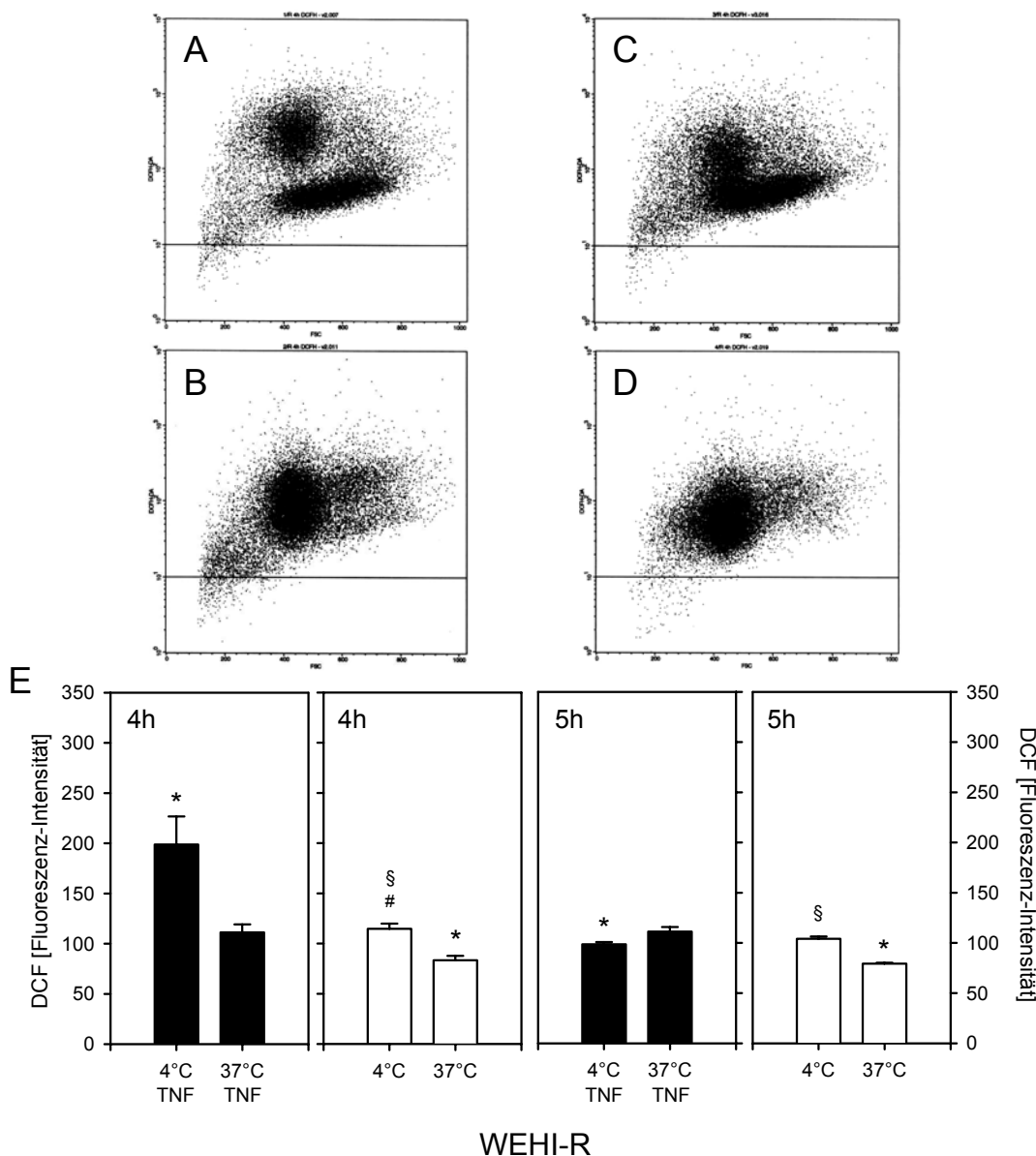


Abb. 29: Repräsentative FACS-Analyse der durch ROS generierten mittleren DCF-Fluoreszenzintensität der untersuchten WEHI-R Zelllinie nach 4h: TNF/4°C (A), TNF/37°C (B), 4°C (C), 37°C (D). DCF-Fluoreszenzintensität der WEHI-R Zellen nach 4h 4°C bzw. 37°C und 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation (E) mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C, # $p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen mit der DCFH-DA-Methode im Vergleich zu ihrer TNF- α -sensiblen Parental-Zelllinie WEHI-S eine geringere Basis-ROS-Generierung auf (Abb. 29A-E). Die Kälte induzierte nach der vierstündigen Inkubation die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. 29A,C, E). Die TNF- α -Stimulierung bewirkte in der kälteapplizierten Versuchsgruppe einen additiven drastischen Anstieg der detektierten DCF-Fluoreszenzintensität. Unter permanent warmer Inkubation hingegen verursachte die TNF- α -Stimulierung lediglich einen geringen, jedoch signifikant unterschiedlichen ROS-Zuwachs von 35% gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 29 B,E). Nach der einstündigen Wiedererwärmung war für die kälteapplizierten WEHI-R Zellen, v. a. unter TNF- α -Stimulierung, ein deutlicher Rückgang der ROS-Generierung zu verzeichnen. Die beiden

warminkubierten Versuchsgruppen hielten die ROS-Generierung, wie auch schon zuvor die WEHI-S Zellen, auf konstantem Niveau (Abb. 29E).

Zusammenfassend zeigten die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen gegenüber den WEHI-S Zellen eine niedrigere ROS-Basisgenerierung. Für beide Zelllinien war sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte ROS-Produktion zu ermitteln. Während sich die ROS-Generierung bei den WEHI-S Zellen am stärksten unter alleinigem Kälteeinfluss induzieren ließ, bewirkte die zusätzliche TNF- α -Stimulierung bei den WEHI-R Zellen die stärkste ROS-Induktion. Die einstündige Wiedererwärmungsphase führte für beide Zelllinien zu einem deutlichen Rückgang der kälteinduzierten ROS-Produktion.

5.3.2 Extrazellulärer pH, pCO₂ und pO₂

Als weitere Parameter zur Evaluierung der Induktion von Zellstress wurden der pH-Wert und die partiellen CO₂ und O₂ Drücke (pCO₂, pO₂) mithilfe eines Blutgasanalysators nach 4 und 5h im Kulturüberstand der verschiedenen Versuchsgruppen überprüft.

Direkt nach der vierstündigen Kälteapplikation war die H⁺-Ionenkonzentration der Kulturüberstände der TNF- α -stimulierten und unstimulierten WEHI-S Zellen mit pH-Werten von 6,93 bzw. 6,95 gegenüber den korrespondierenden warmen Ansätzen mit einem pH-Wert von 7,40 erhöht (Tab. 15). Nach einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C wiesen die kältebehandelten und warmen Versuchsgruppen mit und ohne TNF- α -Stimulierung keinen pH-Unterschied auf. Der partielle CO₂ Druck war nach der hypothermen Inkubation um ca. 250%, der pO₂ um ca. 60% gegenüber der korrespondierenden 37°C Inkubation erhöht. Während der einstündigen Wiedererwärmung adaptierten sich auch die partiellen Gasdrücke in Richtung des Niveaus der permanent 37°C inkubierten Versuchsgruppen (Tab. 15).

Die Analyse der Kulturüberstände der WEHI-R Zellen lieferte prinzipiell analoge Ergebnisse. Ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien bestand lediglich darin, dass die H⁺-Ionenkonzentration der WEHI-R Zellen direkt nach Kälteapplikation gegenüber der WEHI-S Zelllinie leicht erhöht war und CO₂ bzw. O₂ noch etwas stärker in Lösung gingen (Tab. 15).

Zusammenfassend wurde für die WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach der Kälteapplikation eine erhöhte H⁺-Ionenkonzentration und erhöhte CO₂ und O₂ Partialdrücke gegenüber den warminkubierten Versuchsgruppen aufgefunden. Nach einer Stunde Wiedererwärmung konvergierten alle Parameter in Richtung der warmen Korrespondenten.

WEHI-S

4h	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)
TNF/4°C	6,93 ± 0,02	104,00 ± 5,09	202,65 ± 14,60
TNF/37°C	7,40 ± 0,03	29,30 ± 3,68	127,10 ± 0,98
4°C	6,95 ± 0,02	101,08 ± 3,79	197,93 ± 16,83
37°C	7,40 ± 0,00	29,53 ± 0,91	126,73 ± 1,89
5h	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)
TNF/4°C	7,37 ± 0,01	34,30 ± 0,35	132,25 ± 3,45
TNF/37°C	7,36 ± 0,04	32,93 ± 2,25	123,50 ± 4,63
4°C	7,37 ± 0,02	33,43 ± 1,36	130,50 ± 3,23
37°C	7,39 ± 0,04	29,58 ± 1,31	124,00 ± 3,24

WEHI-R

4h	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)
TNF/4°C	6,90 ± 0,01	112,65 ± 4,21	219,58 ± 8,51
TNF/37°C	7,39 ± 0,01	29,65 ± 0,41	125,50 ± 1,91
4°C	6,89 ± 0,00	115,95 ± 1,39	209,43 ± 9,89
37°C	7,35 ± 0,00	38,45 ± 2,62	123,75 ± 2,66
5h	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)
TNF/4°C	7,40 ± 0,01	31,93 ± 0,54	135,25 ± 1,14
TNF/37°C	7,37 ± 0,02	32,15 ± 1,74	126,20 ± 2,50
4°C	7,36 ± 0,01	35,35 ± 0,96	131,20 ± 1,27
37°C	7,32 ± 0,01	36,20 ± 1,16	126,18 ± 1,12

Tab. 15: Potentiometrische Analyse von pH, pCO₂ und pO₂ in den Kulturüberständen der untersuchten Mausfibrosarkom-Zelllinien WEHI-S und WEHI-R nach 4h 4°C bzw. 37°C und 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF-α. Die Daten wurden an einem BGA-Gerät erhoben und sind als Mittelwerte ± SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen angegeben.

5.3.3 Intrazellulärer pH (BCECF-AM)

Die Messung des intrazellulären pH-Wertes wurde durchflusszytometrisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF vorgenommen. Zur Beladung der Zellen wurde die farblose unpolare zellpermeable Vorstufe BCECF-Azetoxymethylester (BCECF-AM) verwendet, die intrazellulär durch endogene Esterasen hydrolysiert wird. Das hydrolysierte fluoreszierende Produkt akkumuliert aufgrund seines polaren Charakters in der Zelle und ist ein Maß für den intrazellulären pH-Wert. Da keine pH-Kalibrierung

vorgenommen wurde, konnten die pH-Unterschiede nur als relative Einheiten der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben werden.

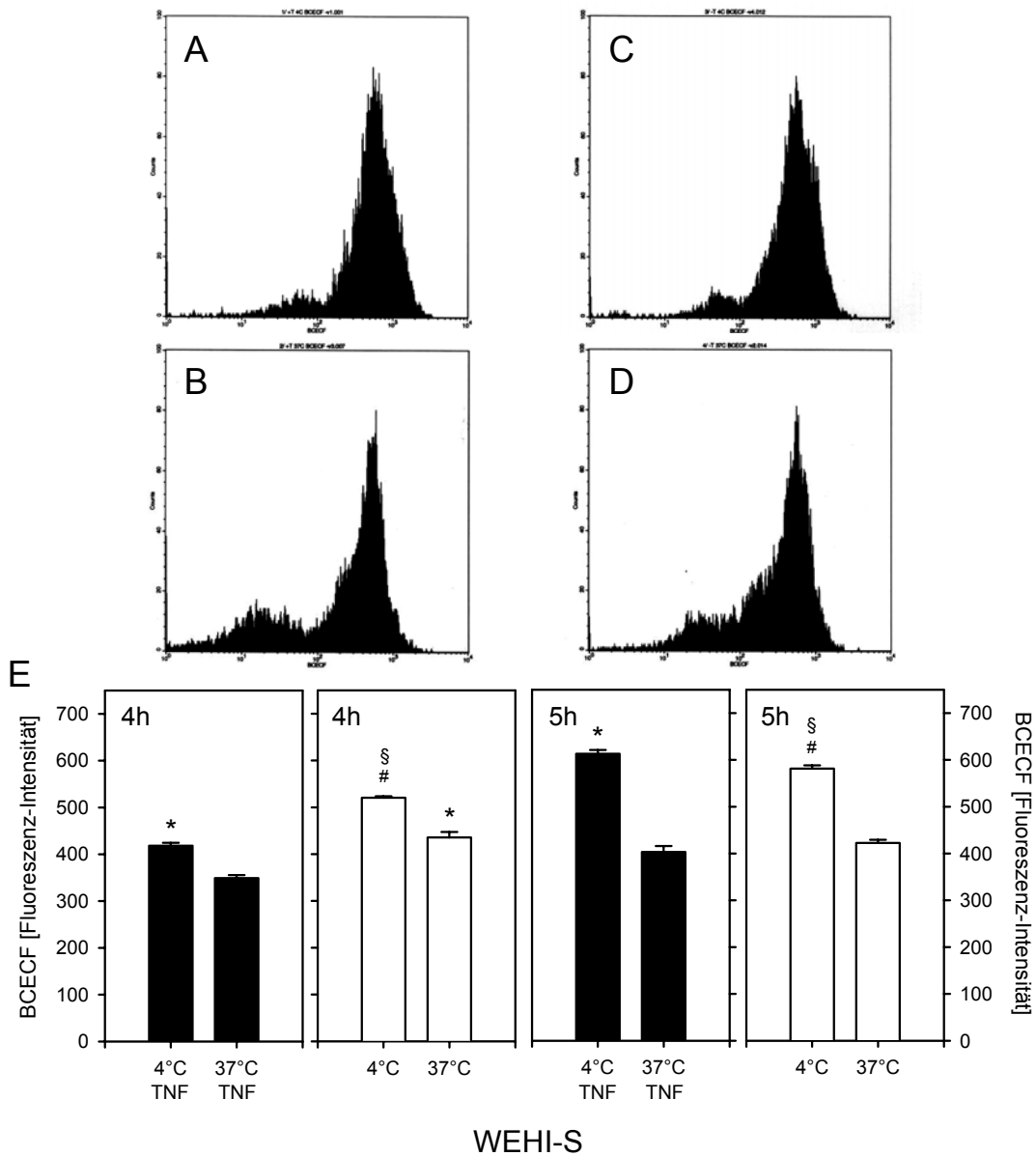


Abb. 30: Repräsentative FACS-Analyse des intrazellulären pH-Wertes gemessen als relative Einheiten der mittleren BCECF-Fluoreszenzintensität der untersuchten WEHI-S Zelllinie nach 5h: TNF/4°C (A), TNF/37°C (B), 4°C (C), 37°C (D). Die BCECF-Fluoreszenzintensität der WEHI-S Zellen nach 4h 4°C bzw. 37°C und 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation (E) mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, $^{\S}p < 0,05$ vs 37°C, $^{\#}p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Nach 4h Inkubation zeigten die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen im TNF- α -stimulierten warmen Ansatz einen Rückgang der mittleren Fluoreszenzintensität um 20% im Vergleich zur korrespondierenden unstimulierten Kontrolle. Die mittlere Fluoreszenzintensität der TNF- α -stimulierten kalten Versuchsgruppe unterschied sich mit einer Reduzierung um 4% kaum von der warmen unstimulierten Kontrollgruppe. Für die kälteapplizierten WEHI-S Zellen ohne TNF- α -Stimulierung war nach 4h Käl-

teinwirkung ein Anstieg der mittleren Fluoreszenz um ca. 20% gegenüber der warmen unstimulierten Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 30A-E).

Nach einer Stunde Wiedererwärmung reagierten die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen mit einer Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes gegenüber der unstimulierten warmen Kontrollgruppe, wobei für die TNF- α -stimulierten Zellen ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von ca. 45% und für die unstimulierte Versuchsgruppe von ca. 38% zu ermitteln war. Die warminkubierten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen zeigten nach der weiteren Inkubationsstunde einen geringen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von ca. 13% und unterschieden sich damit nicht mehr von ihrer unstimulierten Kontrolle (Abb. 30E).

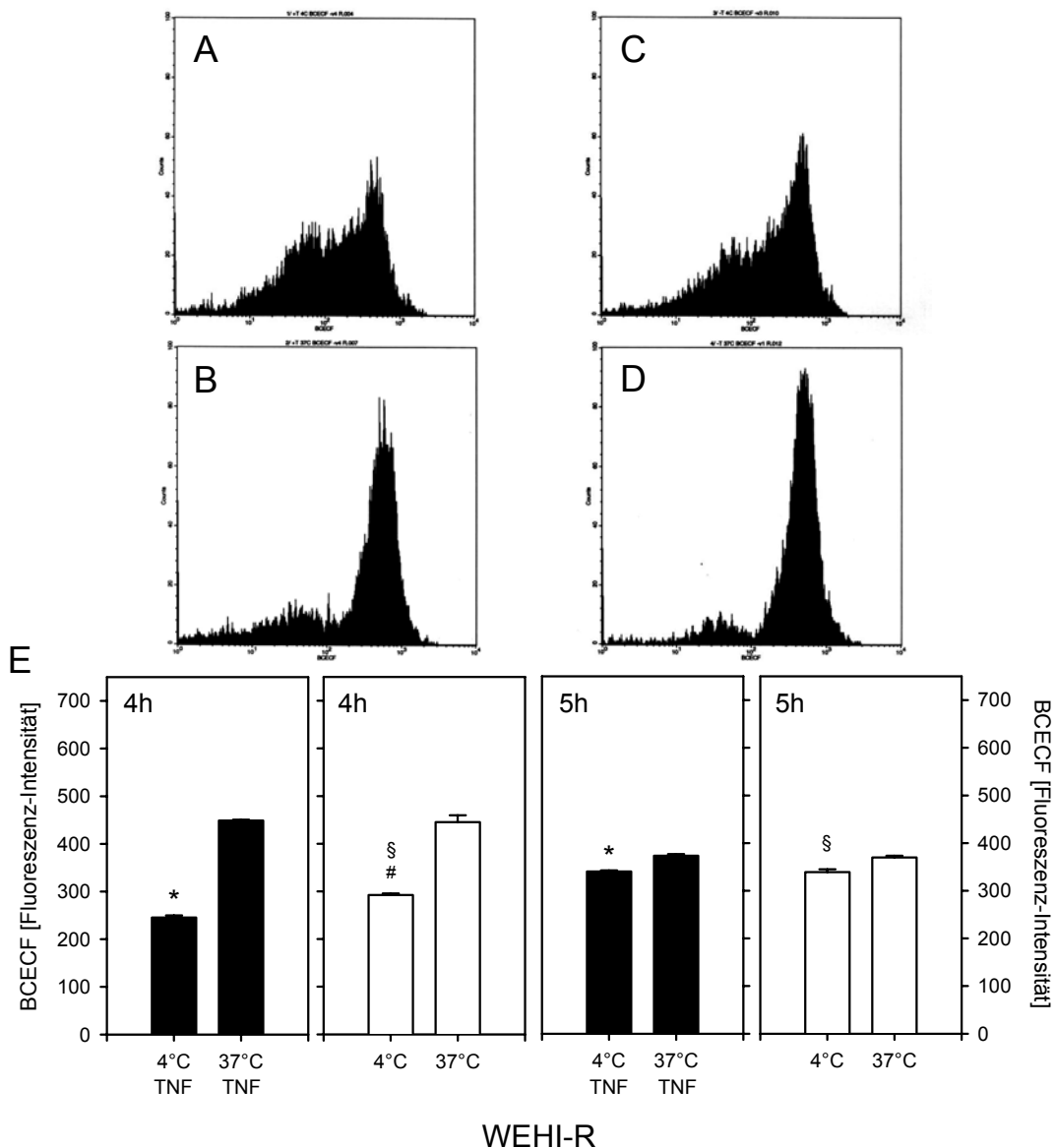


Abb. 31: Repräsentative FACS-Analyse des intrazellulären pH-Wertes gemessen als relative Einheiten der mittleren BCECF-Fluoreszenzintensität der untersuchten WEHI-R Zelllinie nach 4h: TNF/4°C (A), TNF/37°C (B), 4°C (C), 37°C (D). Die BCECF-Fluoreszenzintensität der WEHI-R Zellen nach 4h 4°C bzw. 37°C und 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation (E) mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□). Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, $^{\$}p < 0,05$ vs 37°C, $^{\#}p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Für die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie wurde in den beiden kälteapplizierten Ansätzen mit und ohne TNF- α -Stimulierung direkt nach der Kälteeinwirkung eine Erniedrigung der mittleren Fluoreszenzintensität gegenüber der unbehandelten 37°C Kontrollgruppe von ca. 45% bzw. 34% detektiert (Abb. 31A-E). Nach einer Stunde Wiedererwärmung hatte sich der pH-Wert für beide Versuchsgruppen schon wieder fast an das Niveau der unstimulierten warmen Kontrolle angeglichen. Die TNF- α -stimulierte warme Versuchsgruppe hingegen zeigte weder nach 4 noch nach 5h einen Unterschied bzgl. der korrespondierenden unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 31E).

Zusammenfassend ergab sich für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen durch TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen eine leichte intrazelluläre Ansäuerung, während die Kälteapplikation vor allem nach einer Stunde Wiedererwärmung mit und ohne TNF- α zu einer Alkalisierung des intrazellulären Milieus führte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten direkt nach der Kälte TNF- α -unabhängig mit einer stärkeren intrazellulären Ansäuerung, die sich aber nach einer Stunde Wiedererwärmung in Richtung eines physiologischen pH-Wert entwickelte. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen zeigte bei WEHI-R Zellen keinen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert.

5.3.4 HO-1, HSP70, HIF-1 α und iNOS Proteinexpression

Als weitere Stressindikatoren wurde die Proteinexpression von HO-1, HSP70, HIF-1 α und iNOS durchflusszytometrisch bestimmt. Als Antwort auf Stress durch toxische Chemikalien oder ungünstige Temperatureinwirkung reagieren die meisten Zellen mit der Expression genetisch hochkonservierter 'Heatshock' Proteine, wie z. B. HO-1 und HSP70, die durch ihre anti-oxidative Wirkung Schutz vor oxidativem Stress und apoptotischem Zellschaden bieten.

Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde eine geringe kälteinduzierte HO-1 Expression festgestellt, die mit einem Anteil von ca. 78% HO-1-positiver Zellen im TNF- α -stimulierten und ca. 81% im unstimulierten Versuchsansatz einen statistisch nicht signifikanten Zuwachs von 19 bzw. 22% gegenüber der unstimulierten warmen Kontrollgruppe aufwies. In der warmen TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe war mit einem Anteil von ca. 74% HO-1-positiver Zellen ein Zuwachs von ca. 12% gegenüber der korrespondierenden Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 32E,F).

Auch die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen zeigten dieses kälteinduzierte HO-1 Expressionsmuster, jedoch waren hier die Unterschiede statistisch signifikant (Abb. 32A-D,G,H). Im kältebehandelten TNF- α -stimulierten Versuchsansatz waren ca. 72% und im unstimulierten ca. 82% HO-1-positiv Zellen zu detektieren. Damit ergab sich ein signifikanter Anstieg HO-1-positiver Zellen von ca. 38% in der TNF- α -stimulierten und ca. 54% in der unstimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe im Vergleich zu den korrespondierenden warmen Kontrollgruppen. Die unstimulierten 37°C-inkubierten WEHI-R Zellen exprimierten mit ca. 53% einen vergleichbaren Anteil HO-1-positiver Zellen wie die TNF- α -stimulierten korrespondierenden Zellen.

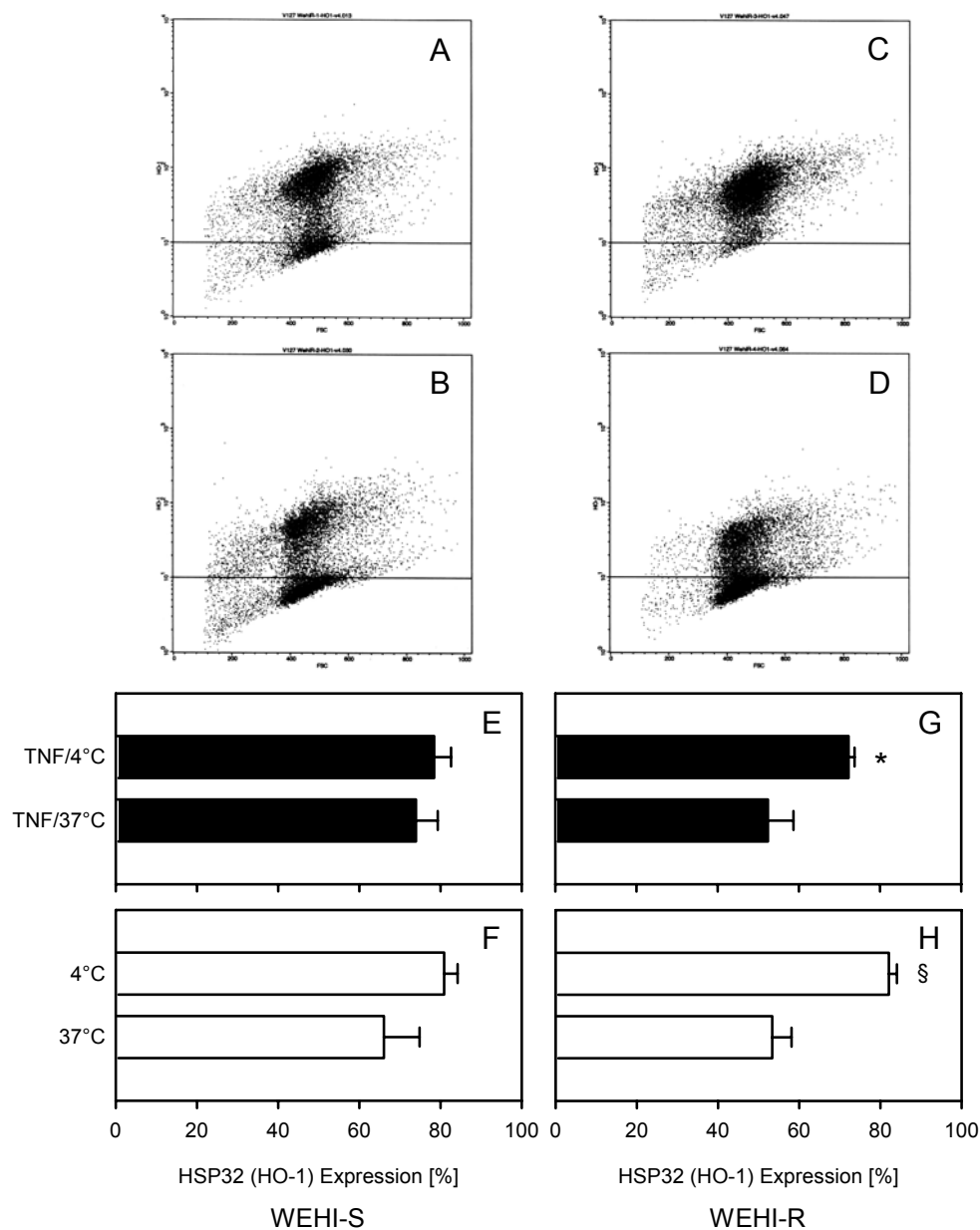


Abb. 32: Repräsentative FACS-Analyse der HSP32 (HO-1) Expression (A) WEHI-R (TNF/4°C), (B) WEHI-R (TNF/37°C), (C) WEHI-R (4°C), (D) WEHI-R (37°C) Zellen und durchflusszytometrisch ermittelte HSP32 Expression in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); * p < 0,05 vs TNF/37°C, § p < 0,05 vs 37°C.

Die Änderung der HSP70 Proteinoxpression war vergleichbar mit der der HO-1 Änderung; sowohl bei TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen als auch TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wurde in den beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen eine erhöhte HSP70 Expression gegenüber den warmen korrespondierenden Gruppen ermittelt. Ebenso wie für HO-1 war auch für HSP70 eine auffällig hohe Expression bei unstimulierten kältebehandelten WEHI-R Zellen zu beobachten (Abb. 33).

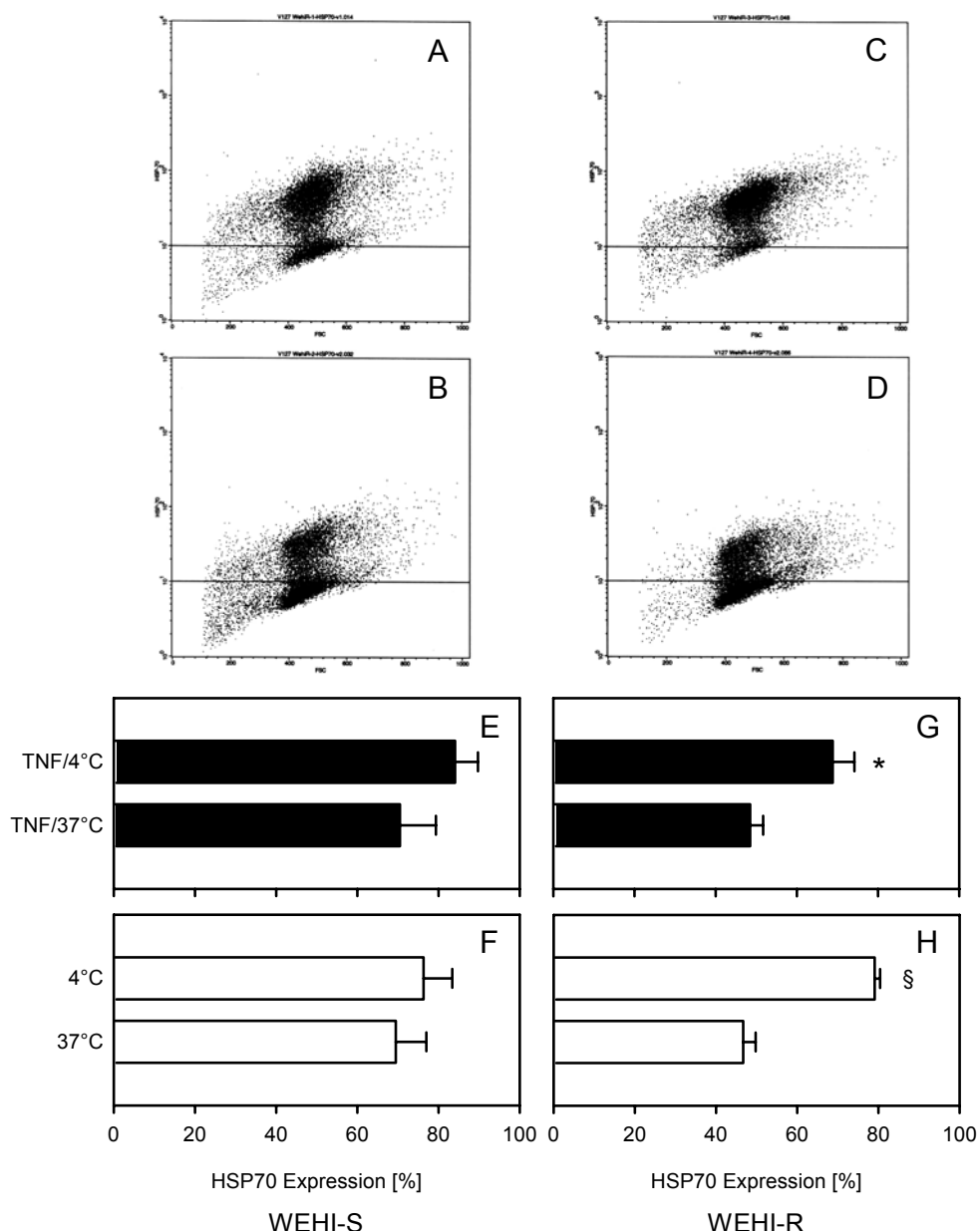


Abb. 33: Repräsentative FACS-Analyse der HSP70 Expression (A) WEHI-R (TNF/4°C), (B) WEHI-R (TNF/37°C), (C) WEHI-R (4°C), (D) WEHI-R (37°C) Zellen und durchflusszytometrisch ermittelte HSP70 Expression in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α (□); Mittelwerte ± SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); *p < 0,05 vs TNF/37°C, §p < 0,05 vs 37°C.

HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) ist ein Schlüsselregulator für die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. Der heterodimere Transkriptionsfaktor beinhaltet die induzierbare HIF-1α Untereinheit und die konstitutiv exprimierte HIF-1β Untereinheit. Obwohl HIF-1 hauptsächlich durch den vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck über die Sauerstoff-abhängige Degradierung seiner α Untereinheit reguliert ist, unterliegt HIF-1 zusätzlich einer Modulation durch Zytokine, Hormone und genetische Veränderungen, so dass HIF-1α auch unter normoxischen Bedingungen induzierbar ist.

Die HIF-1α Expression der TNF-α-sensiblen WEHI-S Zellen zeigte mit einem Anteil von ca. 37% positiver Zellen ihre größte Ausprägung in der kältebehandelten TNF-α-stimulierten Versuchs-

gruppe und lag damit ca. 53% über der HIF-1 α Expression der unstimulierten warmen Kontrollgruppe, während in der TNF- α -stimulierten warmen und kälteapplizierten unstimulierten Versuchsgruppe ein vergleichbarer Anteil von 28 bzw. 29% HIF-1 α -positiver Zellen ermittelt wurde, was einen Zuwachs an HIF-1 α exprimierender Zellen von ca. 20% gegenüber der unstimulierten warmen Kontrollgruppe entsprach. Obwohl sich für die WEHI-S Zellen keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse erzielen ließen, deutete sich eine kälteinduzierte HIF-1 α Expression an (Abb. 34 E,F).

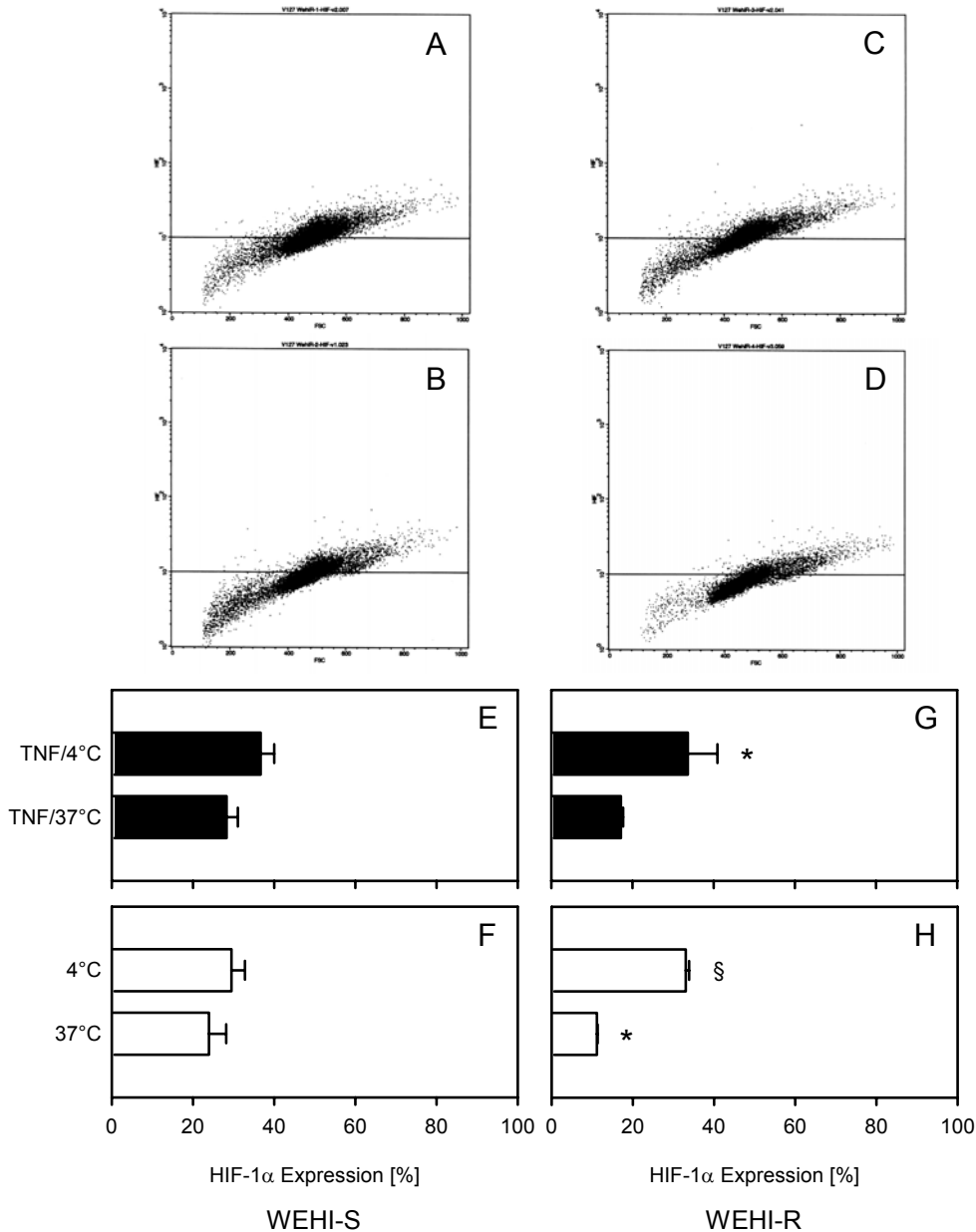


Abb. 34: Repräsentative FACS-Analyse der HIF-1 α Expression (A) WEHI-R (TNF/4°C), (B) WEHI-R (TNF/37°C), (C) WEHI-R (4°C), (D) WEHI-R (37°C) Zellen und durchflusszytometrisch ermittelte HIF-1 α Expression in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); * p < 0,05 vs TNF/37°C, § p < 0,05 vs 37°C.

TNF- α induzierte die HIF-1 α Expression der WEHI-R Zellen, die Kälte verstärkte die TNF- α -induzierte HIF-1 α Expression und induzierte sie auch ohne TNF- α -Stimulierung in gleichem Ausmaß. Der Anteil HIF-1 α positiver WEHI-R Zellen war in den beiden kälteapplizierten Ansätzen mit ca. 34% bzw. 33% mit und ohne TNF- α -Stimulierung sehr vergleichbar und unterschied sich damit von der unstimulierten warmen Kontrollgruppe durch einen Anstieg der HIF-1 α Expression um ca. 200%. Die TNF- α -stimulierte 37°C-inkubierte Versuchsgruppe zeigte demgegenüber lediglich einen Zuwachs von ca. 53% HIF-1 α -positiver Zellen (Abb. 34 A-D, G und H).

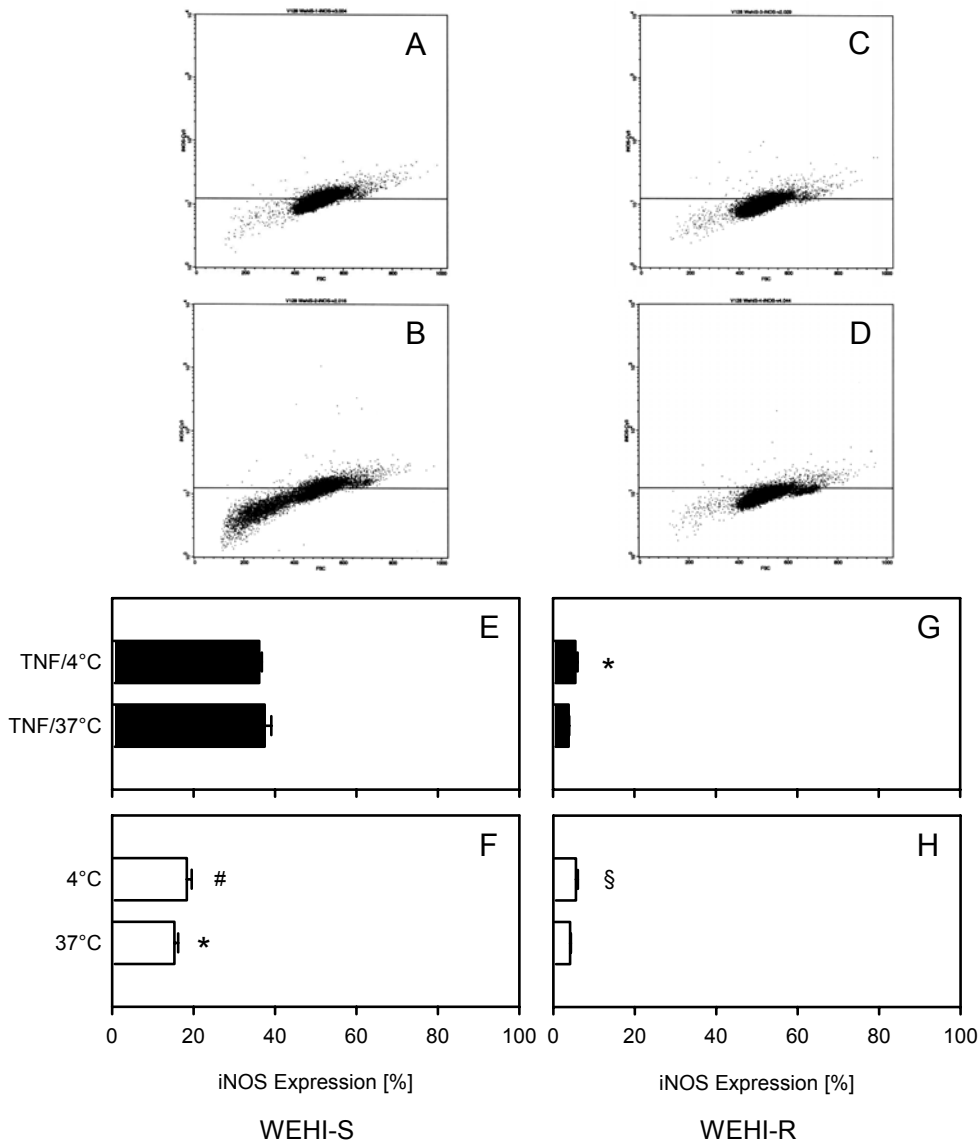


Abb. 35: Repräsentative FACS-Analyse der iNOS Expression (A) WEHI-S (TNF/4°C), (B) WEHI-S (TNF/37°C), (C) WEHI-S(4°C), (D) WEHI-S (37°C) Zellen und durchflusszytometrisch ermittelte iNOS Expression in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen mit WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H); * p < 0,05 vs TNF/37°C, § p < 0,05 vs 37°C, # p < 0,05 vs TNF/4°C.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist neben den konstitutiven Isoformen nNOS und eNOS verantwortlich für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem wichtigen physiologischen Messenger- und Effektor-Molekül, das u. a. auch zur Modulation von apoptotischen Prozessen beiträgt.

In WEHI-S Zellen verstärkte TNF- α die iNOS-Expression, unabhängig von der Temperatur. In den beiden TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen wurde mit 36 bzw. 37% ein vergleichbarer Anteil iNOS-positiver Zellen detektiert, während in den beiden unstimulierten Ansätzen unter Kälteapplikation ca. 18% und unter permanenter 37°C Inkubation ca. 15% iNOS-positive Zellen ermittelt wurden (Abb. 35A-F).

Die iNOS Expression der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wies ähnlich wie auch für HO-1, HSP70 und HIF-1 α , unabhängig von der TNF- α -Stimulierung, ein kälteinduziertes Muster auf. Der Anteil iNOS-exprimierender WEHI-R Zellen war allerdings für alle Versuchsgruppen sehr gering und lag mit ca. 6% in den beiden kältebehandelten Ansätzen signifikant unterschiedlich um ca. 34% über der iNOS Expression der unstimulierten warmen Kontrollgruppe. Die TNF- α -stimulierte warme Versuchsgruppe unterschied sich nicht von der unstimulierten korrespondierenden Kontrolle (Abb. 35G,H).

Zusammenfassend wurde sowohl für die TNF- α -sensiblen WEHI-S als auch für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen ein TNF- α -unabhängiges kälteinduziertes HO-1 und HSP70 Expressionsmuster ermittelt. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen hatte für beide Zelllinien keinen Einfluss auf die Expression der 'Heatshock' Proteine. Sowohl für HO-1 als auch für HSP70 fiel die verhältnismäßig hohe Expression bei unstimulierten kältebehandelten WEHI-R Zellen auf. Ein kälteinduziertes TNF- α -unabhängiges Expressionsmuster zeigte sich für WEHI-R auch für HIF-1 α und iNOS. Die HIF-1 α Expression der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wies in der kältebehandelten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe die größte Ausprägung auf und war unter TNF- α -Stimulierung bei warmer Inkubation und unter unstimulierten kälteapplizierten Bedingungen nur schwach induziert. Umgekehrt konnte für die iNOS Expression in WEHI-S Zellen eine TNF- α -induzierte Abhängigkeit ohne Temperatureinfluss beobachtet werden.

5.4 Auswirkung von Kälte auf die Proliferation TNF- α -stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen

Um die Auswirkung von Kälte auf die Proliferation, dem Pendant der Apoptose, TNF- α -stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen zu evaluieren, wurden nach Durchführung des prinzipiellen Versuchsprotokolls verschiedene Marker für Proliferation überprüft.

5.4.1 Indirekter Proliferationstest (WST-1-Test)

Mithilfe des WST-1-Tests wurde die Zellproliferation über die Anzahl metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird über Katalyse mitochondrialer Dehydrogenasen zu Formazan reduziert, dessen Konzentration ein Maß für die Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation darstellt.

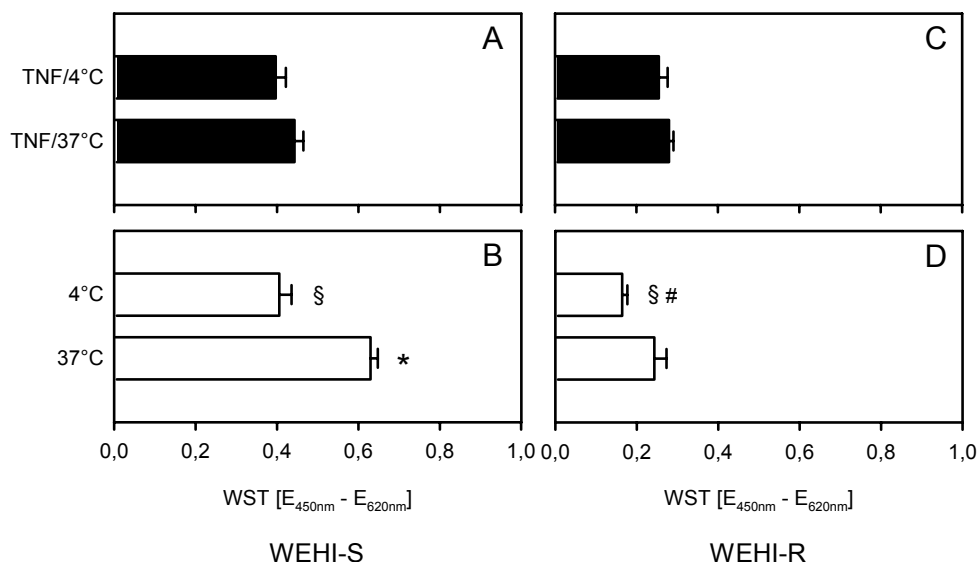


Abb. 36: Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α-Stimulierung (□) ermittelt über den colorimetrischen WST-1-Test. Das WST-1-Reagenz wurde direkt nach Versuchsende zugesetzt und die Stoffwechselaktivität nach 30min evaluiert: WEHI-S Zellen (A,B) und WEHI-R Zellen (C,D), Mittelwerte ± SEM aus vier Versuchsansätzen; **p* < 0,05 vs TNF/37°C, §*p* < 0,05 vs 37°C, #*p* < 0,05 vs TNF/4°C.

Sowohl die Kälte, als auch die TNF-α-Stimulierung inhibierten die Stoffwechselaktivität der WEHI-S Zellen. In den stimulierten kälteapplizierten und warmen Versuchsgruppen war 30min nach Versuchsende eine vergleichbare Stoffwechselaktivität (Extinktion 0,397 versus 0,443; Abb. 36A) zu detektieren. Im weiteren Zeitverlauf entwickelte sich die Stoffwechselaktivität in der warmen Gruppe jedoch mit größerer Steigung und unterschied sich nach 4h von der kälteapplizierten Gruppe mit einer Extinktion von 1,641 versus 1,283 von dieser signifikant (Abb. 37A). Für die kälteapplizierte TNF-α-stimulierte Gruppe wurde über den Untersuchungszeitraum von 4h ein Aktivitätszuwachs von 223% im Vergleich zur Ausgangsaktivität ermittelt. In der warmen TNF-α-stimulierten Gruppe stieg die Stoffwechselaktivität nach 4h um 270% des Ausgangswertes an und verhielt sich damit ähnlich der metabolischen Aktivität des unstimulierten gekühlten Ansatzes, die sich von einer Ausgangsextinktion von 0,406 um 261% auf einen Extinktionswert von 1,465 nach 4h erhöhte (Abb. 37A,B). Die größte metabolische Aktivität war in der warmen unstimulierten Kontrollgruppe mit einem Aktivitätszuwachs von 337% bezüglich der Ausgangsaktivität zu beobachten. Mit einer Extinktion von 0,630 zeigte diese Gruppe auch 30min nach Beendigung des prinzipiellen Versuchsprotokolls die größte Stoffwechselaktivität (Abb. 37B).

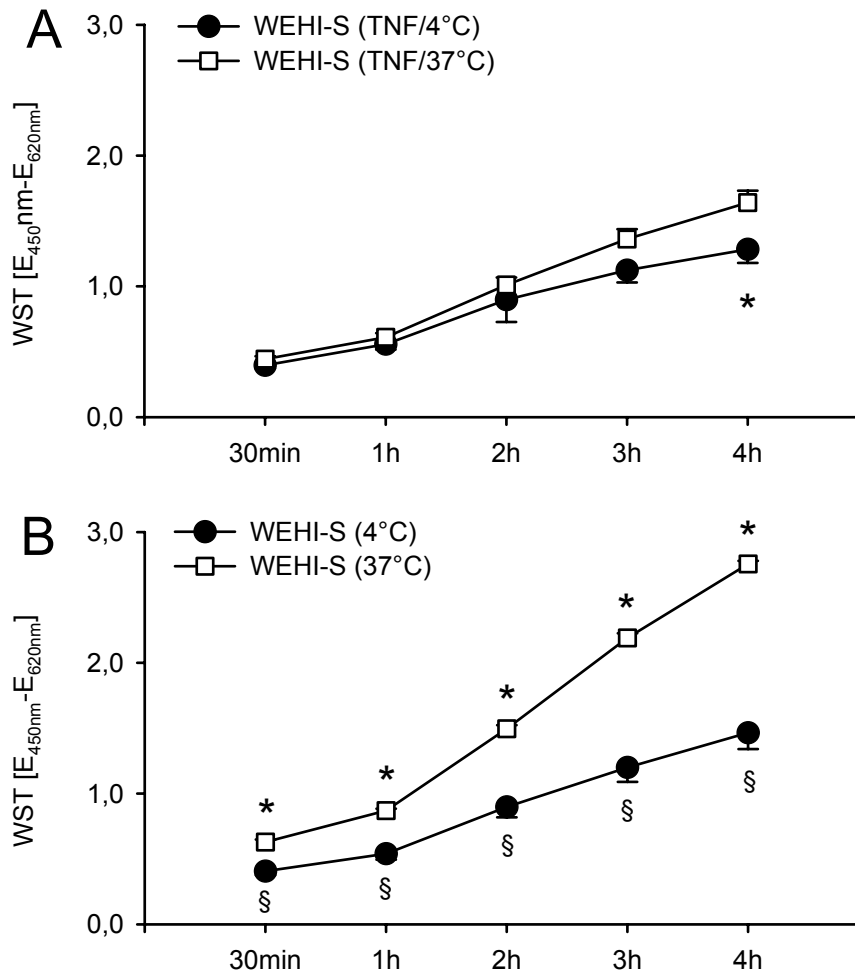


Abb. 37: Zeitlicher Verlauf der Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität der untersuchten WEHI-S Zelllinie nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung, ermittelt über den colorimetrischen WST-1-Test. Das WST-1-Reagenz wurde direkt nach Versuchsende zugesetzt und die Stoffwechselaktivität über einen Zeitraum von 4h evaluiert. (A) Metabolisierende WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung nach Kältebehandlung (●) bzw. ausschließlicher 37°C Inkubation (□). (B) Metabolisierende WEHI-S Zellen ohne TNF- α -Stimulierung nach Kältebehandlung (●) bzw. ausschließlicher 37°C Inkubation (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Die Stoffwechselaktivität TNF- α -resistenter WEHI-R Zellen war für alle Versuchsgruppen im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen mit Ausgangsextingtionen zwischen 0,164 und 0,280 versus 0,397 bis 0,630 niedriger und entwickelte sich auch weiter im untersuchten Zeitraum mit geringerer Steigung (Abb. 38A,B). Die größte Stoffwechselaktivität 30min nach Versuchsende konnte für die WEHI-R Zellen unter der warmen TNF- α -Stimulierung beobachtet werden (Abb. 36C), obwohl der Aktivitätszuwachs im zeitlichen Verlauf mit 214% unterhalb der beiden gekühlten Ansätze mit einem Aktivitätsanstieg von ca. 230% lag. Der geringste Aktivitätszuwachs von ca. 200% war für die warmen unstimulierten Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 38B). Eine auffallend geringe Stoffwechselaktivität zeigten die unstimulierten kalteapplizierten WEHI-R Zellen zum ersten Messzeitpunkt 30min nach Versuchsende (0,164 versus 0,243 bis 0,280 in allen anderen Versuchsgruppen, Abb. 36D).

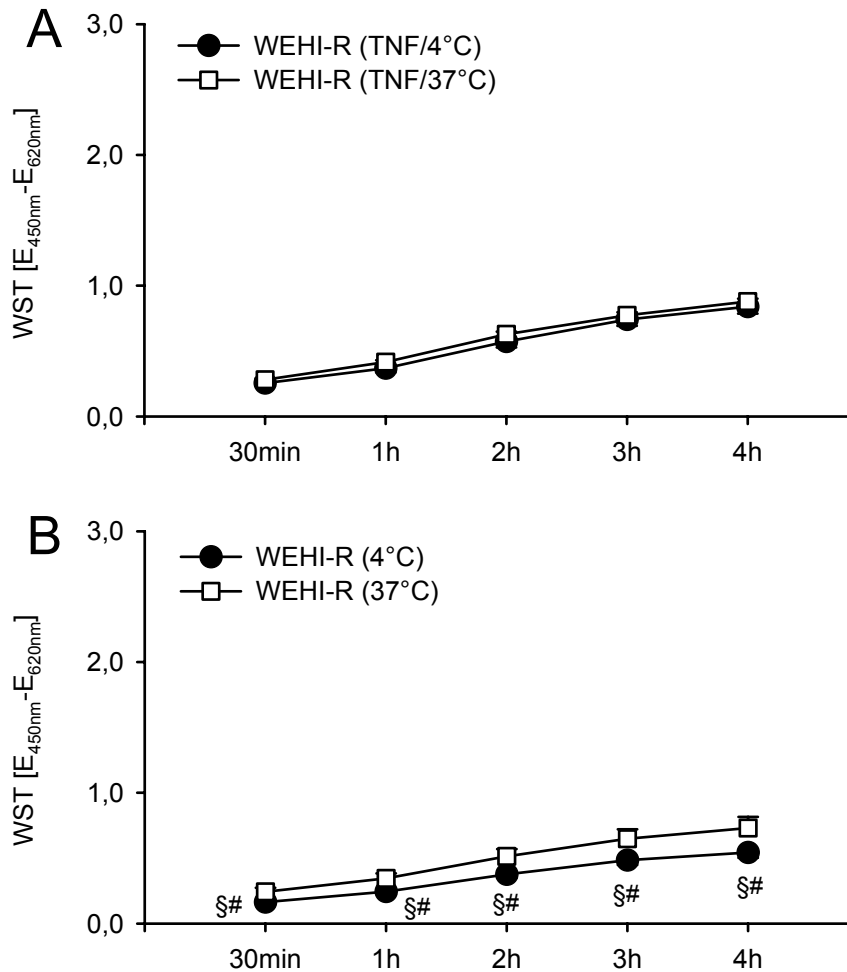


Abb. 38: Zeitlicher Verlauf der Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität der untersuchten WEHI-R Zelllinie nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung, ermittelt über den colorimetrischen WST-1-Test. Das WST-1-Reagenz wurde direkt nach Versuchsende zugesetzt und die Stoffwechselaktivität über einen Zeitraum von 4h evaluiert. (A) Metabolisierende WEHI-R Zellen unter TNF- α -Stimulierung nach Kältebehandlung (●) bzw. ausschließlicher 37°C Inkubation (□). (B) Metabolisierende WEHI-R Zellen ohne TNF- α -Stimulierung nach Kältebehandlung (●) bzw. ausschließlicher 37°C Inkubation (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, $^{\S}p < 0,05$ vs 37°C, $^{\#}p < 0,05$ vs TNF/4°C.

Zusammenfassend reduzierte sowohl die Kälteapplikation als auch die TNF- α -Stimulierung die Stoffwechselaktivität der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen im Vergleich zur warmen unstimulierten Kontrollgruppe, wobei die Kälteapplikation eine zusätzliche Inhibierung im zeitlichen Verlauf aufwies. Bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, die sich im Vergleich zu den WEHI-S Zellen durch einen stark retardierten Stoffwechsel auszeichneten, zeigte vor allem die kälteapplizierte Versuchsgruppe ohne TNF- α -Stimulierung eine starke initiale metabolische Inhibierung; im zeitlichen Verlauf war der Stoffwechsel der beiden gekühlten Versuchsgruppen jedoch gegenüber den beiden warminkubierten Ansätzen aktiviert. TNF- α stimulierte die Stoffwechselaktivität mit und ohne Kälteapplikation. Die geringste Stoffwechselaktivitätsrate wurde in der unstimulierten warmen Kontrollgruppe der WEHI-R Zellen ermittelt.

5.4.2 Direkter Proliferationstest (BrdU-Einbau)

Während der DNA-Synthese-Phase wurde das Nukleinbasenanalogen BrdU in Konkurrenz mit Thyminidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Mittels nachfolgender immunzytochemischer Fluoreszenzfärbung konnten die proliferierenden Zellen durchflusszytometrisch (Abb. 39A-D) bzw. fluoreszenzmikroskopisch (Abb. 40A,B) visualisiert werden.

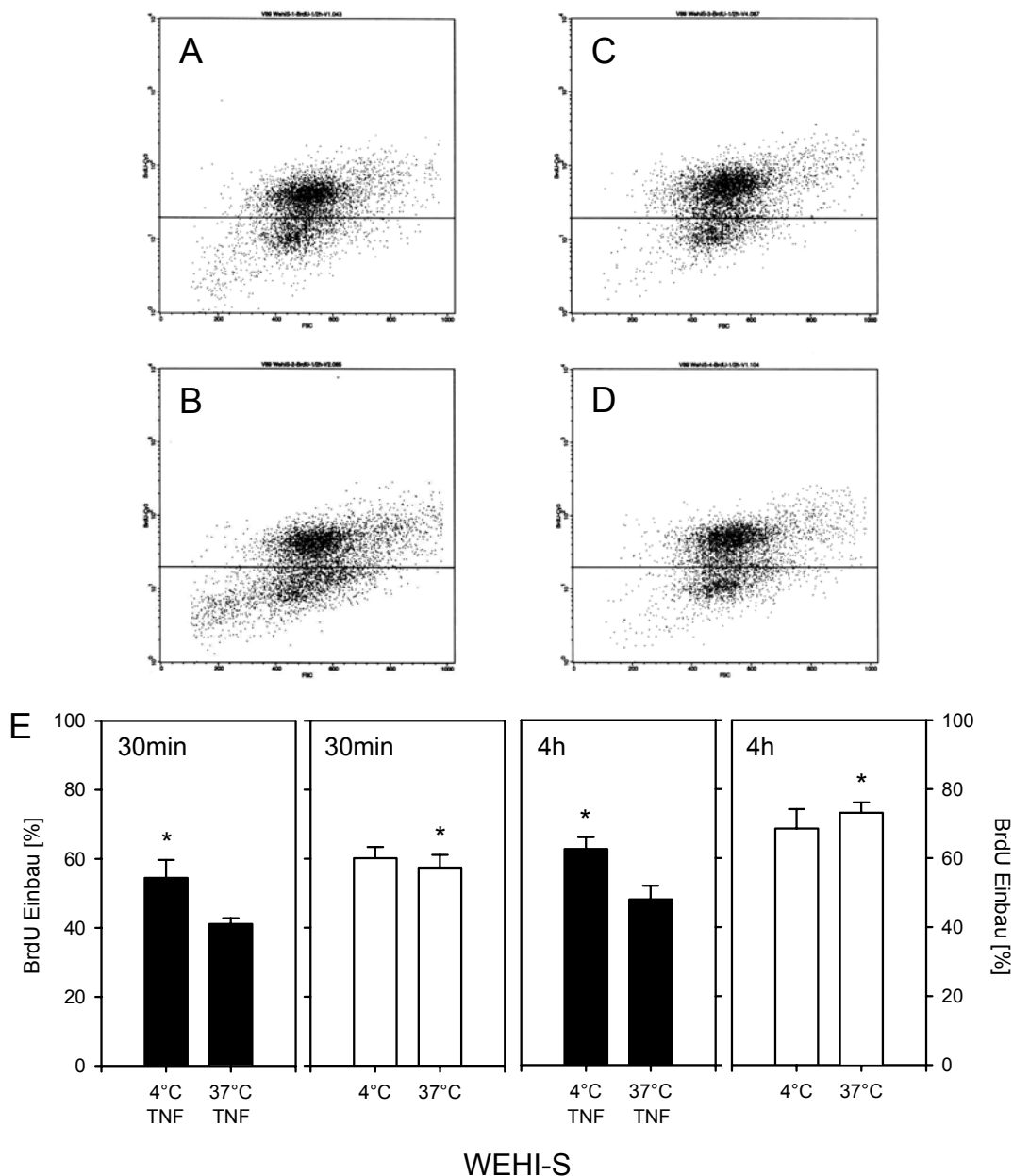


Abb. 39: Repräsentative FACS-Analyse der BrdU-positiven Zellen der untersuchten WEHI-S Zelllinie: (A) TNF/4°C, (B) TNF/37°C, (C) 4°C, (D) 37°C. (E) Proliferation bzw. DNA-Synthese in % der Gesamtzahl der WEHI-S Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□): Das Basenanalogen BrdU wurde direkt nach Versuchsende zugesetzt und die DNA-Synthese, ermittelt über den BrdU-Einbau, zum Zeitpunkt 30min und 4h evaluiert; Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C.

Die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen zeigten unter warmer TNF- α -Stimulierung 30min nach Versuchsende die geringste Proliferation (ca. 41% BrdU-positive Zellen versus 55 bis 60% in allen

anderen Versuchsgruppen, Abb. 39E). Obwohl in dem TNF- α -stimulierten 37°C-Ansatz auch nach 4h BrdU-Einbau die geringste Anzahl proliferierender Zellen zu detektieren war, unterschied sich die Proliferationsrate (Zuwachs proliferierender Zellen zwischen 30min und 4h BrdU-Einbau) im Vergleich zu den kälteapplizierten stimulierten und unstimulierten Ansätzen nicht signifikant (17% versus 14 und 15%).

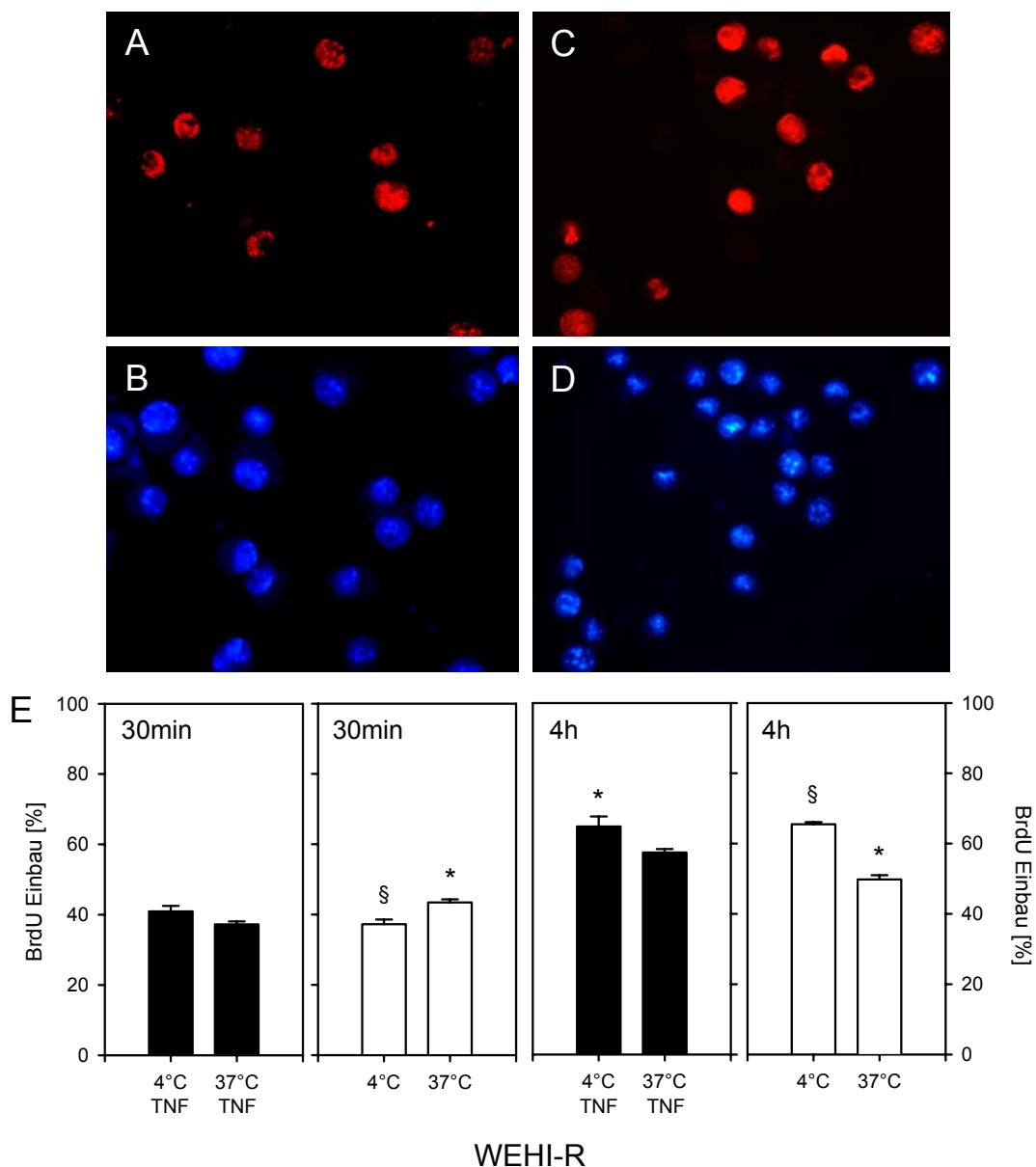


Abb. 40: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung BrdU-positiver Zellen der untersuchten WEHI-R Zelllinie unter TNF- α -Stimulierung bei 37°C nach 30min (A) und 4h BrdU-Einbau (C) und Gegenfärbung der Zellkerne mit Bisbenzimid nach 30 min (B) und 4h (D), Vergrößerung 500x. Proliferation bzw. DNA-Synthese in % der Gesamtzahl der WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α -Stimulierung (□): Das Basenanalogen BrdU wurde direkt nach Versuchsende zugesetzt und die DNA-Synthese, ermittelt über den BrdU-Einbau, zum Zeitpunkt 30min und 4h evaluiert; Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Der größte Zuwachs proliferierender DNA-synthetisierender Zellen (ca. 27%) war in der unstimulierten warmen Kontrollgruppe der WEHI-S Zellen zu verzeichnen. In dieser Gruppe wurden nach 4h BrdU-Einbau, also 8h nach Versuchsbeginn, ca. 73% proliferierende Zellen aufgefunden, während in

der TNF- α -stimulierten warmen Versuchsgruppe nur 48% der Zellen neue DNA synthetisiert hatten. In den beiden kälteapplizierten Ansätzen konnte mit ca. 63 und 69% eine vergleichbare Anzahl proliferierender Zellen ermittelt werden (Abb. 39A-E).

Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen nach 30min BrdU-Einbau einen geringeren Anteil proliferierender Zellen im Vergleich zur WEHI-S Zelllinie auf. In der unstimulierten 37°C-Kontrollgruppe wurden zum ersten Messzeitpunkt lediglich 43% BrdU-positive Zellen versus 57% bei der TNF- α -sensiblen Zelllinie detektiert (Abb. 40E). Die auffallend geringe Proliferationsrate von ca. 15% nach 4h BrdU-Einbau in der unstimulierten warmen WEHI-R Kontrollgruppe weist auf eine Stimulierung der Proliferation durch die TNF- α - bzw. die Kälte-Einwirkung hin, da sich in den entsprechenden Gruppen ein Zuwachs von 54 bis 59% an proliferierenden Zellen ermitteln ließ. Die größte Proliferationsrate konnte für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen im unstimulierten kälteapplizierten Ansatz mit einem Zuwachs BrdU-positiver Zellen von ca. 76% gemessen werden.

Zusammenfassend wurde für TNF- α -sensible WEHI-S Zellen eine verminderte Proliferation in der TNF- α -stimulierten 37°C Gruppe evaluiert, während die Kälteapplikation mit und ohne TNF- α -Stimulierung einen geringen Einfluss auf die DNA-Synthese hatte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, die gegenüber der WEHI-S Zelllinie eine geringe Proliferation aufwiesen, erfuhren sowohl durch die TNF- α -Stimulierung als auch durch die Kältebehandlung eine Aktivierung der Proliferation.

5.4.3 PCNA und Ki67 Proteinexpression

Als weitere Proliferationsparameter wurde die Expression der Zellzyklus-abhängigen Proteine PCNA und Ki67 durchflusszytometrisch untersucht. PCNA als Co-Faktor der DNA-Polymerase δ wird während der Synthese-Phase hochreguliert, ist aber aufgrund der langen Halbwertszeit bis über die M-Phase hinaus stabil. Außerdem ist PCNA mit DNA-’Repair’-Mechanismen assoziiert und kann auch in geringen Mengen in nicht proliferierenden Zellen gefunden werden. Ki67 wird während des gesamten Zellzyklus, nicht aber in ruhenden G0-Zellen exprimiert.

Die durchflusszytometrischen Befunde ergaben für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen nach der fünfstündigen Inkubation eine geringfügig gesteigerte PCNA Expression der TNF- α -stimulierten warmen gegenüber der korrespondierenden unstimulierten und der TNF- α -stimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe (Anstieg PCNA-positiver Zellen von ca. 9%, Abb. 41A-C). Die unstimulierte gekühlte Versuchsgruppe wies mit ca. 19% PCNA-positiver Zellen die geringste Anzahl proliferierender Zellen auf. Gegenüber den warmen unstimulierten Zellen befanden sich damit ca. 21% weniger Zellen in der proliferierenden Phase (Abb. 41C).

WEHI-R Zellen hingegen exprimierten ein geringeres PCNA Basislevel als die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen; in der unstimulierten warmen Kontrollgruppe war mit ca. 13% PCNA-positiver Zellen eine um 45% verminderte Anzahl gegenüber dem korrespondierenden WEHI-S Ansatz zu verzeichnen (Abb. 41D,E). Die gekühlten stimulierten und unstimulierten WEHI-R Zellen reagierten mit einer um ca. 30% vermehrten PCNA Expression und die warmen stimulierten WEHI-R

Zellen mit einer um ca. 20% signifikant vermehrten Expression gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle.

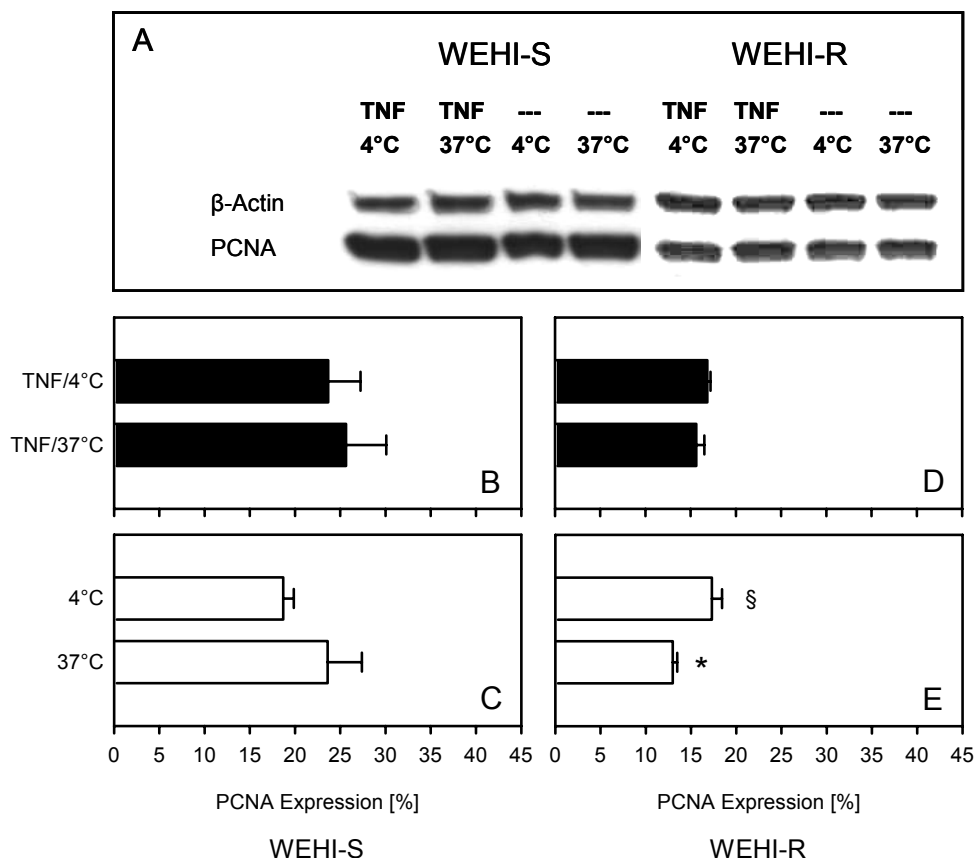


Abb. 41: Repräsentative Western-Blot-Analyse der PCNA Expression von WEHI-S und WEHI-R Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF-α-Stimulierung (A). FACS-Analyse PCNA-positiver Zellen in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S (B,C) und WEHI-R (D,E) Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF-α (□); Mittelwerte ± SEM aus vier Versuchsansätzen; * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Die durchflusszytometrische Detektion ergab für die TNF-α-sensiblen WEHI-S Zellen nach der fünfständigen Inkubation eine gesteigerte Ki67 Expression der TNF-α-stimulierten warmen gegenüber der korrespondierenden unstimulierten und der TNF-α-stimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe (ca. 36% Ki67-positiver Zellen versus ca. 28%, Abb. 42A-F). Die unstimulierte gekühlte Gruppe wies mit ca. 20% Ki67-positiver Zellen die geringste Anzahl sich im Zellzyklus befindlicher Zellen auf. Gegenüber den warmen unstimulierten Zellen waren damit ca. 23% weniger Zellen in der proliferierenden Phase (Abb. 42F).

Die Ki67-Expression der stimulierten und unstimulierten warmen WEHI-R Versuchsgruppen unterschied sich mit ca. 20% positiver Zellen nicht. Die Kälte hingegen induzierte die Ki67 Expression in einem geringem, jedoch statistisch signifikanten Ausmaß (Abb. 42G,H).

Zusammenfassend wies die TNF-α-sensiblen WEHI-S Zelllinie eine verstärkte basale PCNA und Ki67 Proteinexpression gegenüber den TNF-α-resistenten Zellen auf. Die TNF-α-Stimulierung hatte auf die PCNA Expression keinen Effekt, verursachte jedoch eine verstärkte Ki67 Induktion. Die Kälte inhibierte die Expression beider proliferationsassoziierten Proteine. Die PCNA und Ki67 Ex-

pression der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen war durch die Kälte erhöht. Die TNF- α -Stimulierung hatte auf die Ki67 Expression keinen Einfluss, führte aber zu einer geringen, jedoch signifikanten PCNA Induktion.

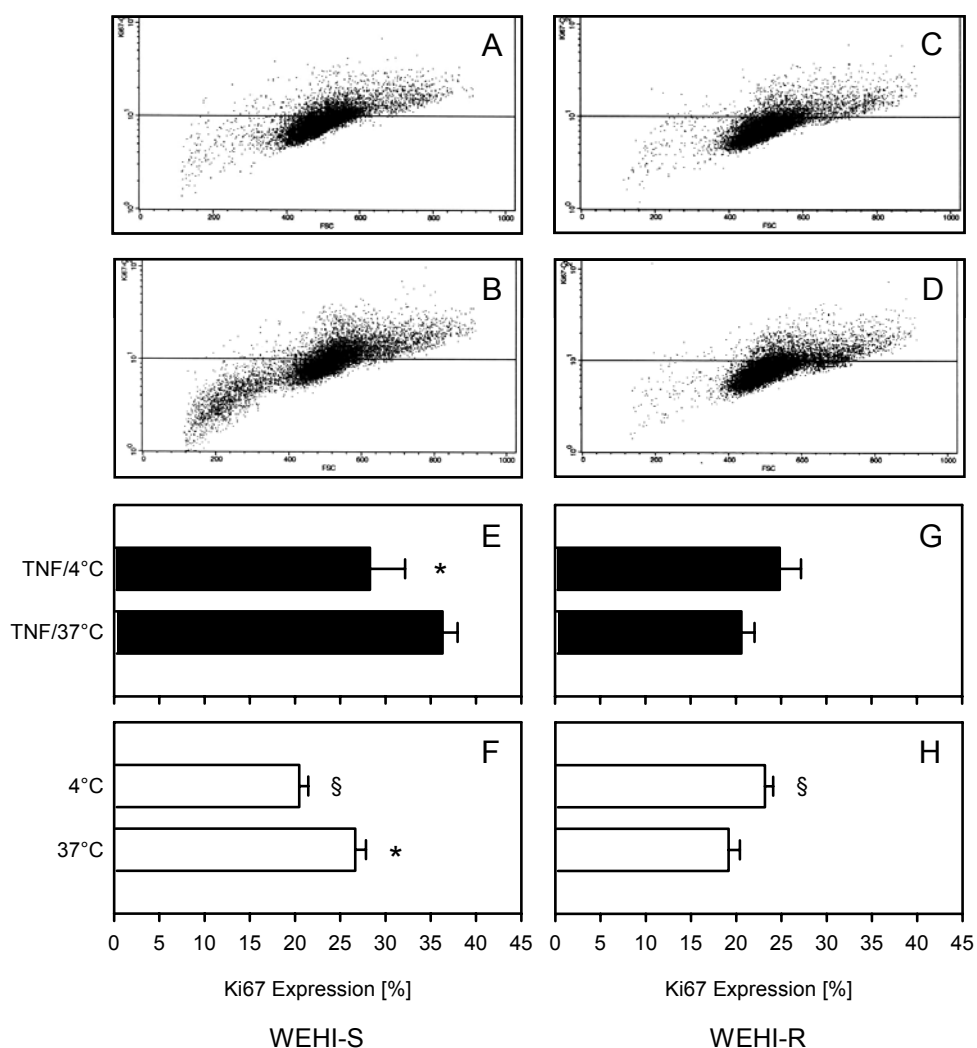


Abb. 42: Repräsentative FACS-Analyse der Ki67 Expression von WEHI-S Zellen nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung: TNF/4°C (A), TNF/37°C (B), 4°C (C) und 37°C (D). Ki67-positive Zellen in % der Gesamtzahl der untersuchten WEHI-S (E,F) und WEHI-R (G,H) nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit (■) bzw. ohne TNF- α (□); Mittelwerte \pm SEM aus vier Versuchsansätzen, * p <0,05 vs TNF/37°C, § p <0,05 vs 37°C.

5.4.4 Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklusphasen (G0/G1-, S-, G2/M-Phase) wurden durch Anfärbung der genomischen DNA nicht synchronisierter Zellen mithilfe der 7-AAD-Methode als DNA-Histogramm durchflusszytometrisch ermittelt.

Die Zellzyklusanalyse der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wies in der TNF- α -stimulierten warminkubierten Versuchsgruppe eine Zellverminderung in der G0/G1- und S-Phase von jeweils ca. 30% gegenüber der unstimulierten korrespondierenden Kontrollgruppe auf (Tab. 16 und Abb. 43A). In der G2/M-Phase reduzierte sich die Zellzahl um ca. 22% und die Anzahl polyploider Zellen sank um

ca. 11% gegenüber der korrespondierenden Kontrolle. Dies indiziert, unter Einbeziehung der erzielten Ergebnisse der Sub-2n-Population, dass die Apoptose der WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation verstärkt in der G0/G1- und in der S-Phase induziert wurde. In den kälteapplizierten Versuchsgruppen war die stärkste Zellzahlreduktion in der S-Phase auszumachen. Die S-phasische Zellzahl nahm unter TNF- α -Stimulierung ca. 35% und ohne TNF- α -Stimulierung ca. 42% gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle ab. Besonders eindrucksvoll war die durch die Kälte induzierte Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase, die sich in einem Zuwachs von ca. 43% in der TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe bzw. von ca. 52% ohne TNF- α -Stimulierung manifestierte. Des weiteren wiesen die kälteapplizierten Versuchsgruppen der WEHI-S Zelllinie einen Zuwachs polyploider Zellen von ca. 22% unter TNF- α -Stimulierung bzw. von ca. 36% ohne TNF- α -Stimulierung auf.

WEHI-S

Ansatz	G0/G1-Phase (%)	S-Phase (%)	G2/M-Phase (%)	8n-Population (%)
TNF/4°C	22,77 ± 3,61	21,45 ± 0,79	41,50 ± 3,31	7,50 ± 0,17
TNF/37°C	21,59 ± 2,39	22,94 ± 0,77	22,47 ± 1,10	5,43 ± 0,56
4°C	22,13 ± 2,09	19,13 ± 1,13	44,09 ± 3,15	8,33 ± 0,60
37°C	31,23 ± 1,80	32,89 ± 0,82	28,97 ± 2,11	6,13 ± 0,07

WEHI-R

Ansatz	G0/G1-Phase (%)	S-Phase (%)	G2/M-Phase (%)	8n-Population (%)
TNF/4°C	32,78 ± 2,36	20,54 ± 1,35	32,76 ± 2,96	3,38 ± 0,50
TNF/37°C	39,91 ± 2,36	21,76 ± 0,96	26,10 ± 2,43	2,63 ± 0,16
4°C	32,64 ± 4,34	18,65 ± 2,59	34,19 ± 3,58	2,92 ± 0,18
37°C	41,96 ± 3,46	17,15 ± 0,53	29,67 ± 2,56	2,99 ± 0,27

Tab. 16: Zellzyklusphasen in % der Gesamtzellzahl der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung und Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen.

Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen gegenüber ihrer TNF- α -sensiblen Parentalzelllinie unter unstimulierten physiologischen Inkubationsbedingungen eine geringere Anzahl sich in der Synthese-Phase befindlicher Zellen auf (ca. 17% versus ca. 33%). Dem gegenüber fiel die erhöhte Anzahl an G0/G1-Phase-Zellen auf (ca. 42% versus ca. 31% bei WEHI-S Zellen, Tab. 16 und Abb. 43B). Auch für die WEHI-R Zellen deutete sich ein kälteinduzierter G2/M-Arrest an. Der Zuwachs an G2/M-Phase-Zellen war jedoch gering (ca. 10 bis 15% gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen) und zudem nicht statistisch signifikant. Die gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle um ca. 22% verminderte Zellzahl in der G0/G1-Phase weist auf eine Apoptose-Induktion der kälteapplizierten

WEHI-R Zellen in dieser Zellzyklusphase hin. Unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation gingen die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen vornehmlich in der G2/M-Phase in Apoptose über. Eine durch die Einwirkung der Kälte verursachte Induktion einer polyploiden Population war für die WEHI-R Zellen nicht zu detektieren.

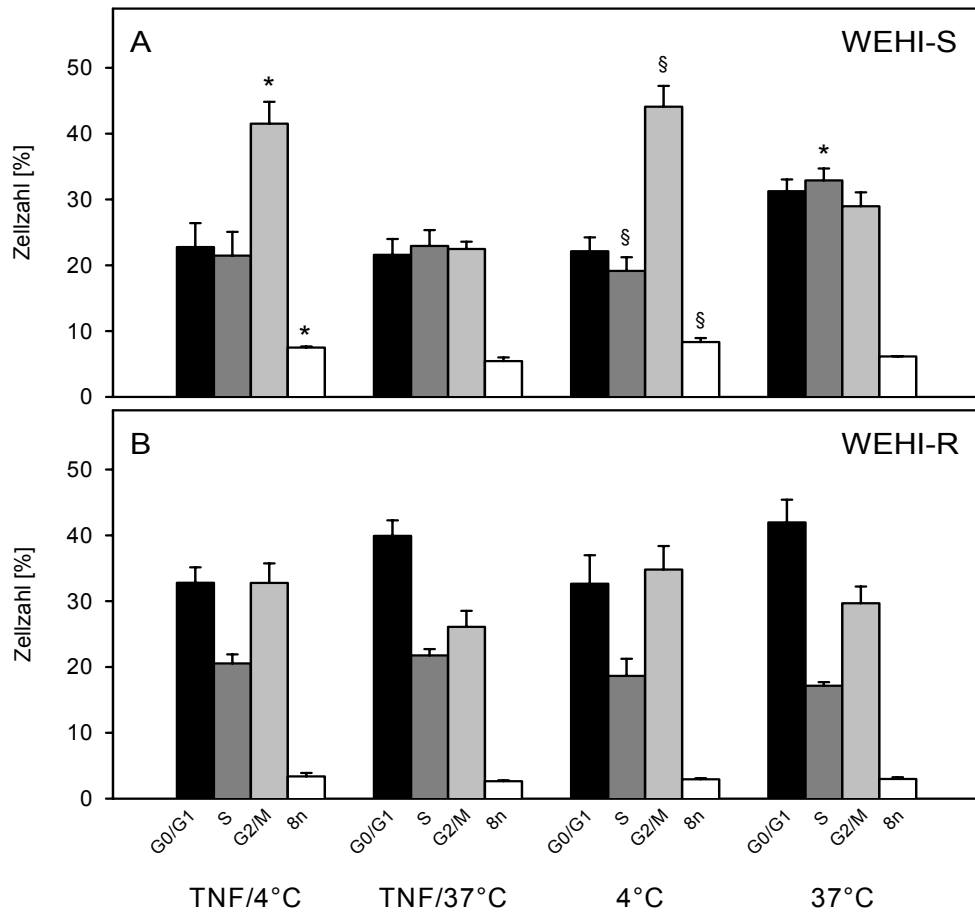


Abb. 43: Durchflusszytometrisch ermittelte Zellzyklusanalyse der untersuchten WEHI-S und WEHI-R Zelllinien nach 4h 4°C + 1h 37°C bzw. 5h 37°C Inkubation mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung. Anteilige Zellen der Zellzyklusphasen G0/G1 (■), S (■), G0/M (■) und polyploide (8n) Zellen (□) in % der Gesamtzellzahl als Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchsansätzen, * $p < 0,05$ vs TNF/37°C, § $p < 0,05$ vs 37°C.

Zusammenfassend ergab die Zellzyklusanalyse für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen einen kälteinduzierten G2/M-Arrest und eine kälteabhängige Induktion einer polyploiden Population. Die Einbeziehung der erzielten Ergebnisse der Sub-2n-Population indizierte eine Apoptose-Induktion unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation vornehmlich aus der G0/G1- und S-Phase. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen gegenüber ihrer TNF- α -sensiblen Parentalzelllinie eine geringere Anzahl S-Phase-Zellen und eine höhere Anzahl an G0/G1-Zellen auf. Ein G2/M-Arrest war für die WEHI-R Zellen lediglich tendenziell auszumachen. Die Verminderung der Zellzahl in der G0/G1-Phase weist auf eine Apoptose-Induktion der kälteapplizierten WEHI-R Zellen in dieser Zellzyklusphase hin. Eine kälteinduzierte Generierung einer polyploiden Population war für die WEHI-R Zellen nicht zu detektieren.

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Überprüfung der Auswirkung von Kälte auf die Entstehung von Apoptose wurde in den einleitenden Versuchen die Aktivierung des Schlüsselenzyms apoptotischer Prozesse, Caspase-3, für verschiedene Zelllinien durchflusszytometrisch ermittelt. Da die Applikation von Kälte auf verschiedene Zellspezies sowohl protektive als auch induzierende Wirkung auf die Caspase-3-abhängige Apoptose aufwies, wurden stellvertretend für die zwei divergent reagierenden Zellsysteme, die TNF- α -sensiblen WEHI-S und TNF- α -resistenten WEHI-R Mausfibrosarkom-Zelllinien, die mit der stärksten Caspase-3 Aktivierung reagierten und sich deutlich voneinander unterschieden, für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

Die Beurteilung apoptotischer Merkmale anhand von Veränderungen der Kernmorphologie und Zytoplasmamembraneigenschaften nach Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Bisbenzimid und Propidiumjodid ergab nach einer vierstündigen Kälteinkubation bei 4°C und anschließender Wiedererwärmung auf 37°C für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24h eine kälteinduzierte protektive Wirkung gegen die TNF- α -vermittelte Apoptose, die sich aber schon nach vierstündiger Wiedererwärmung deutlich reduzierte. Allerdings zeigte sich in unstimulierten WEHI-S Zellen, dass Kälteapplikation per se eine geringe, jedoch statistisch signifikante Apoptose-Induktion bewirkt. In TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen verursachte die Kälte, unabhängig von TNF- α , einen massiven Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen. Da sich für beide Zelllinien nach einer vierstündigen Kälteeinwirkung und einer Stunde Wiedererwärmung sehr deutliche Unterschiede in der Expression apoptotischer Merkmale evaluieren ließen, wurde dieses Inkubationsintervall für die weiteren Untersuchungen festgelegt.

Die zur Ermittlung der apoptotischen Sub-2n-Population durchgeführte 7-AAD-Methode indizierte für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, dass die Kälte, in Einklang mit den morphologischen Befunden zum Zeitpunkt 5h, eine Protektion vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet, und dass Kälte ohne TNF- α -Stimulierung eine verstärkte Apoptose hervorruft. Bei TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen konnte die Kälte nach 5h keinen Schutz vor TNF- α -induzierter Apoptose bewirken und induzierte auch ohne Stimulierung, ebenso wie bei WEHI-S Zellen, selbst Apoptose. Die zum Nachweis translozierter Phosphatidylserin-Lipide eingesetzte Annexin-V-Methode ergab für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, dass die Kältebehandlung, in Einklang mit den zuvor ermittelten Befunden, vor TNF- α -vermittelter Apoptose schützt, und dass im unstimulierten Versuchsansatz die Kälte eine verstärkte Apoptose verursacht. Bei TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen bot die Kältebehandlung im Widerspruch zu den morphologischen Erhebungen und zur 7-AAD-Methode Schutz vor TNF- α -induzierter Apoptose, ohne Stimulierung blieb die hypotherme Inkubation jedoch ohne Einfluss auf die Translokation der Phosphatidylserin-Lipide.

Um die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zu verfolgen, wurden neben dem Haupt-Exekutionsprotein Caspase-3, Markercaspasen des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-³Pathways³ und zur

Überprüfung der Caspasenaktivität die Generierung von PARP-1 Spaltprodukten untersucht. Die durchflusszytometrisch ermittelte Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte, die mit den Ergebnissen der Apoptose-Morphologie und der 7-AAD-Methode korreliert, konnte sowohl für WEHI-S als auch für WEHI-R Zellen immunzytochemisch und Western-Blot-analytisch bestätigt werden. Als Indikatormolekül des extrinsischen rezeptorvermittelten Apoptose-’Pathways’ wurde die Expression aktivierter Caspase-8, inklusive der inaktiven Vorläuferform, mithilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte Caspase-8 Expression ermittelt, wobei die Kälte die TNF- α -induzierte Expression inhibierte. Auch die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten auf den TNF- α - bzw. Kälte-Reiz in ähnlicher Weise, wobei der Einfluss der Kälte gegenüber den WEHI-S Zellen eine stärkere Caspase-8 Expression bewirkte. Als Markerprotein des intrinsischen mitochondrienvermittelten Apoptose-’Pathways’ wurde die Expression aktivierter Caspase-9 Spaltprodukte durchflusszytometrisch detektiert. Für TNF- α -sensible WEHI-S Zellen wurde eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte Caspase-9 Aktivierung evaluiert, wobei die Kälte die TNF- α -induzierte Expression inhibierte. Auch die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen zeigten auf den TNF- α - bzw. Kälte-Reiz ein ähnliches Verhalten, wobei der Einfluss der Kälte auf die Caspase-9 Aktivierung überwog und die TNF- α -induzierte Expression verstärkte. Als weiterer Apoptose-Indikator wurde die Aktivität der in die PARP-1-Spaltung involvierten Caspasen, insbesondere der Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7, anhand des Anteils ’cleaved’ PARP-1 positiver Zellen an der Gesamtpopulation durchflusszytometrisch ermittelt. Für TNF- α -sensible WEHI-S Zellen wurde eine TNF- α induzierte, temperaturunabhängige sowie auch eine rein kälteinduzierte ’cleaved’ PARP-1 Expression detektiert. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten lediglich auf die Kältebehandlung mit einem sehr geringen, jedoch statistisch signifikanten Anstieg der PARP-1 Spaltprodukte.

Zur Klärung, wie sich die Kälteapplikation auf die TNF-Rezeptoren auswirkt, wurde die extrazelluläre Expression des TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptors durchflusszytometrisch, sowie die intra- und extrazelluläre Expression mithilfe der Western-Blot-Analyse untersucht. Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen ließ sich unter TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen eine Induktion der membrangebundenen TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptoren feststellen. Die Kälteapplikation verhinderte die Expression beider Rezeptoren unabhängig von der TNF- α -Stimulierung. TNF- α -resistente WEHI-R Zellen wiesen in allen Versuchsgruppen keine signifikant unterschiedliche Expression beider Rezeptoren auf. Es deutete sich lediglich eine schwache Tendenz einer TNF-R1 Induktion durch die Kälte sowie der TNF-R2 Induktion durch den Einfluss der Kälte und TNF- α an. Die durchflusszytometrische Ermittlung der Expression des Tumor-Suppressor-Proteins p53, das in die zelluläre Antwort auf zytotoxischen Stress involviert ist und Apoptose auslösen kann, ergab für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte Expression, wobei die Kälte die TNF- α -induzierte Expression verminderte. In TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen ließ sich

durch die gewählten Versuchsbedingungen nur eine gemäßigte p53 Expression hervorrufen. Am stärksten reagierten die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen mit einer 20 bis 30%igen p53 Induktion. Die Expression des Transkriptionsfaktors NF κ B, der mit der TNF- α -induzierten Signaltransduktion interferiert, wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Für die NF κ B Expression der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde eine TNF- α -vermittelte Induktion evaluiert, die sich durch die Kälteapplikation verminderte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen lediglich unter warmen Inkubationsbedingungen eine schwache TNF- α -stimulierte NF κ B Expression auf.

Zur Überprüfung, ob die Apoptose-involvierten Proteine Caspase-3 und p53 transkriptionell oder transkriptionsunabhängig reguliert sind, wurde die mRNA Expression der beiden Apoptoseparameter als Indikatoren für den extrinsischen und intrinsischen Apoptose-’Pathway’ mithilfe der semi-quantitativen RT-PCR überprüft. Da sich die mRNA Expression in allen Versuchsgruppen von WEHI-S Zellen nur geringfügig und nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollzellen unterschied, mussten für die Regulation der Caspase-3 und p53 Aktivierung unter TNF- α -Stimulierung und Kältebehandlung in erster Linie transkriptionsunabhängige Mechanismen angenommen werden. Auch für die WEHI-R Zellen kann für die Caspase-3 Aktivierung unter TNF- α -Stimulierung und Kältebehandlung vorrangig von transkriptionsunabhängigen Regulationsmechanismen ausgegangen werden, während die p53 Aktivierung einer TNF- α - als auch Kälte-abhängigen mRNA Induktion unterlag.

Da sich die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C gefolgt von einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C für die WEHI-S Zelllinie auf Entstehung von TNF- α -induzierter Apoptose protektiv auswirkte, sollte der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen und verlängerter Inkubationsintervalle anhand der Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte überprüft werden. Die hypothermen Inkubationen (32, 24, 10, 4°C) wurden zwischen 1 und 24h variiert und eine vierstündige Wiedererwärmungsphase bei 37°C angeschlossen. Als korrespondierende Kontrollen dienten permanent 37°C inkubierte WEHI-S Zellen mit bzw. ohne TNF- α -Stimulierung. Um den ausschließlichen Einfluss der Temperatur ohne Wiedererwärmungsphase zu evaluieren, wurden die Caspase-3 Aktivierung direkt im Anschluss an die vierstündige Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen untersucht. Für alle hypothermen Temperaturen wurde ein protektiver Effekt bzgl. TNF- α -induzierter Apoptose festgestellt. Die unstimulierten Zellen reagierten auf die unterschiedlichen Temperaturen ohne Einfluss auf die Caspase-3 Aktivierung. Lediglich die 4°C Inkubation zeigte sowohl mit als auch ohne TNF- α einen Zuwachs des Anteils apoptotischer Zellen. Im zeitlichen Verlauf ließ sich nach erfolgter Wiedererwärmung unter TNF- α -Stimulierung für die gewählten Temperaturen nach der vierten hypothermen Inkubationsstunde eine Verminderung der aktiven Caspase-3 Spaltprodukte gegenüber der korrespondierenden 37°C Kontrolle beobachten. Die unstimulierten WEHI-S Zellen hingegen zeigten eine vermehrte Generierung aktiver Caspase-3 Spaltprodukte, die sich mit abnehmender Temperatur verminderte.

Zur Begutachtung der Auswirkung der Kälte auf die Induktion von Zellstress wurden Methoden zur Ermittlung verschiedener Stressparameter in der Regel direkt nach der Kälteeinwirkung (4h) sowie

nach einer Stunde Wiedererwärmung (5h) durchgeführt. Der Nachweis von oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) erfolgte mithilfe des Fluoreszenzindikators Dichlorofluoresceindiazetat (DCFH-DA), der die Bildung intrazellulärer ROS, insbesondere H_2O_2 , indiziert. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen zeigten gegenüber den WEHI-S Zellen eine niedrigere ROS-Basisgenerierung. Für beide Zelllinien war sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte ROS-Produktion zu verzeichnen. Während sich die ROS-Generierung bei den WEHI-S Zellen am stärksten unter alleinigem Kälteeinfluss induzieren ließ, bewirkte die zusätzliche TNF- α -Stimulierung bei den WEHI-R Zellen die stärkste ROS-Induktion. Die einstündige Wiedererwärmungsphase führte für beide Zelllinien zu einem deutlichen Rückgang der kälteinduzierten ROS-Produktion.

Als weitere Parameter in Frage kommender Stressoren wurden der pH-Wert und die partiellen CO_2 und O_2 Drücke (pCO_2 , pO_2) im Kulturüberstand der verschiedenen Versuchsgruppen mithilfe eines Blutgasanalysators ermittelt. Für beide Zelllinien wurden nach der Kälteapplikation TNF- α -unabhängig eine erhöhte H^+ -Ionenkonzentration und erhöhte CO_2 und O_2 Partialdrücke nachgewiesen. Nach einer Stunde Wiedererwärmung konvergierten alle Parameter in Richtung der warmen Korrespondenten, so dass die hypotherm inkubierten Zellen von einer transienten extrazellulären Ansäuerung beeinflusst waren. Die Messung des intrazellulären pH-Wertes wurde durchflusszytometrisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF vorgenommen. Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen ergab sich durch TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen eine leichte intrazelluläre Ansäuerung, während die Kälteapplikation, vor allem nach einer Stunde Wiedererwärmung, mit und ohne TNF- α zu einer Alkalisierung des intrazellulären Milieus führte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen reagierten direkt nach der Kälte TNF- α -unabhängig mit einer starken intrazellulären Ansäuerung, die sich bereits nach einer Stunde Wiedererwärmung in Richtung eines neutralen pH-Wertes hin entwickelte. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen zeigte bei WEHI-R Zellen keinen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert.

Des Weiteren wurden verschiedene Stress-induzierbare Proteine nach dem fünfständigen Inkubationsintervall durchflusszytometrisch evaluiert. Sowohl für die TNF- α -sensiblen WEHI-S als auch für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wurde ein TNF- α -unabhängiges kälteinduziertes HO-1 und HSP70 Expressionsmuster ermittelt. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen hatte für beide Zelllinien keinen Einfluss auf die Expression der 'Heatshock' Proteine. Wie für HO-1 fiel auch für HSP70 die verhältnismäßig hohe Expression der unstimulierten kältebehandelten WEHI-R Zellen auf. Ein kälteinduziertes TNF- α -unabhängiges Expressionsmuster zeigte sich bei den WEHI-R Zellen auch für die HIF-1 α und iNOS Induktion. Die HIF-1 α Expression der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wies in der kältebehandelten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe die größte Ausprägung auf und war unter TNF- α -Stimulierung bei warmer Inkubation und unter unstimulierten kälteapplizierten Bedingungen nur schwach induziert. Umgekehrt konnte für die iNOS Expression in WEHI-S Zellen eine TNF- α -induzierte Abhängigkeit ohne Temperatureinfluss beobachtet werden.

Um die Auswirkung von Kälte auf die Proliferation TNF- α -stimulierter und unstimulierter WEHI-S und WEHI-R Zellen zu evaluieren, wurden verschiedene Proliferationsparameter überprüft. Mithilfe des WST-1-Tests wurde die Zellproliferation indirekt über die Anzahl metabolisch aktiver Zellen diskriminiert. Sowohl die Kälteapplikation als auch die TNF- α -Stimulierung reduzierte die Stoffwechselaktivität der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, die sich im Vergleich zu den WEHI-S Zellen durch einen stark retardierten Stoffwechsel auszeichneten, zeigten vor allem direkt nach der Kälteapplikation ohne TNF- α -Stimulierung eine starke metabolische Inhibierung; im weiteren Verlauf war der Stoffwechsel der beiden gekühlten Versuchsgruppen jedoch gegenüber den beiden warminkubierten Ansätzen aktiviert. Die geringste Zuwachsrate metabolischer Aktivität wurde in der unstimulierten warmen Kontrollgruppe der WEHI-R Zellen ermittelt. Während der DNA-Synthese-Phase wurde das Nukleinbasenanalogen BrdU in Konkurrenz mit Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Mittels nachfolgender immunzytochemischer Fluoreszenzfärbung konnten die proliferierenden Zellen durchflusszytometrisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde eine verminderte Proliferation in der TNF- α -stimulierten 37°C Gruppe evaluiert, während die Kälteapplikation mit und ohne TNF- α -Stimulierung nur geringen Einfluss auf die DNA-Synthese hatte. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, die gegenüber der WEHI-S Zelllinie eine geringere replikative Aktivität aufwiesen, erfuhren sowohl durch die TNF- α -Stimulierung als auch durch die Kältebehandlung eine Proliferationsaktivierung. Als weitere Parameter für Proliferation wurde die Expression der Zellzyklus-abhängigen Proteine PCNA und Ki67 durchflusszytometrisch untersucht. Für die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie wurde eine verstärkte PCNA und Ki67 Protein-Basisexpression gegenüber den TNF- α -resistenten Zellen beobachtet. Ki67 wurde von den WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung und 37°C Inkubation vermehrt exprimiert, während die PCNA Expression ohne Einfluss blieb. Beide Proteine wurden hingegen durch die Kälteeinwirkung inhibiert. Die PCNA und Ki67 Expression der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen war durch die Kälte induziert. Die TNF- α -Stimulierung hatte auf die Ki67 Expression keinen Einfluss, führte aber zu einer geringen, jedoch signifikanten PCNA Induktion. Nach Anfärbung der genomischen DNA mithilfe der 7-AAD-Methode ergab die durchflusszytometrisch ermittelte Zellzyklusanalyse der unsynchronisierten TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen einen kälteinduzierten G2/M-Arrest und eine kälteabhängige Induktion einer polyploiden Population. Die Einbeziehung der erzielten Ergebnisse der Sub-2n-Population indizierte eine Apoptose-Induktion unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation vorrangig aus der G0/G1- und S-Phase. Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen gegenüber ihrer TNF- α -sensiblen Parentalzelllinie eine geringere Anzahl S-Phase-Zellen und eine höhere Anzahl an G0/G1-Zellen auf. Ein G2/M-Arrest war für die WEHI-R Zellen lediglich tendenziell auszumachen. Die Verminderung der Zellzahl in der G0/G1-Phase weist auf eine Apoptose-Induktion der kälteapplizierten WEHI-R Zellen in dieser Zellzyklusphase hin. Eine kälteinduzierte Induktion einer polyploiden Population war für die WEHI-R Zellen nicht zu detektieren.

6 DISKUSSION

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 WEHI-S und WEHI-R Zelllinien

Die Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-164, die durch Induktion eines Fibrosarkoms in Balb/c-Mäusen generiert wurde (ROLLINGHOFF und WARNER, 1973), zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität für TNF- α -induzierte Zytotoxizität aus (HERBERMANN und HOLDEN, 1978; ESPEVIK und NISSEN-MEYER, 1986; ESKANDARI et al., 1990). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte WEHI-S Zelllinie ist ein TNF- α -hochsensibler Subklon von WEHI-164 'clone' 13 Zellen (JÄÄTTELÄ et al., 1991). Die Zellen wachsen als Monolayer mit einem fibroblastenähnlichen Habitus und wurden mit RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FCS bei 37°C unter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-R, die durch TNF- α -Selektionierung und Klonierung aus TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen generiert wurde und weitgehend TNF- α -resistent ist (KILDAHL-ANDERSEN et al., 1986; AUSTGULEN et al., 1986), wurde unter identischen Bedingungen kultiviert. Neben ihres divergenten Verhaltens gegenüber TNF- α -Stimulierung wurden weitere funktionelle Modifikationen, durch die sich die WEHI-R Zellen von ihrer Parentalzelllinie unterscheiden, bisher nicht evaluiert.

Unter identischen Kulturbedingungen fiel für die WEHI-R Zellen bei den Versuchen zu dieser Arbeit eine geringere Wachstumsrate gegenüber der TNF- α -sensiblen Zelllinie auf (Generationszeit ca. 22h versus ca. 15h bei WEHI-S Zellen zwischen Tag 1 und 2 nach Aussaat). Aufgrund der Zellmorphologie und der Ausbreitungs- und Verteilungsmodi in den Kulturgefäßen unterschieden sich die beiden Zelllinien in ihren Wachstumsmodalitäten nicht, lediglich bezüglich der Zellgröße waren die TNF- α -resistenten Zellen den WEHI-S Zellen geringfügig unterlegen. Daneben zeigten beide Zelllinien ein unterschiedliches Adhärenzverhalten, das sich in einer schnelleren Ablösung der WEHI-R Zellen aus den Kulturschalen nach Trypsin-Einwirkung äußerte. Für beide Zelllinien war ferner zu verzeichnen, dass sich das Adhärenzvermögen unter Kälte- und TNF- α -Einwirkung verringerte. Auch KATSEN et al. (1998) sowie WILSON und BROWNING (2002) beschrieben ein gesteigertes 'detachment' von WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung. Besonders für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen war nach der Kälteapplikation eine drastische Zellablösung zu detektieren. Die Anzahl adhärenter Zellen reduzierte sich nach der vierstündigen Kälteeinwirkung um ca. 10% und nach einer erfolgten einstündigen Wiedererwärmung, unabhängig von der TNF- α -Stimulierung, um ca. 30%. Da sich die WEHI-R Zellen auch nach der Kryokonservierung nur sehr schwer kultivieren ließen, kann für diese Zellen auf ein geringes Adaptationsvermögen gegenüber niedrigen Temperaturen bzw. schneller Temperaturänderung geschlossen werden. Unter warmer Inkubation zeigten hingegen die WEHI-S Zellen ein geringeres Adhärenzvermögen: Bereits eine 24-stündige 37°C Inkubation bewirkte bei unstimulierten WEHI-S Zellen eine Reduktion adhärenter Zellen von ca. 25%, während für die WEHI-R Zellen unter gleichen Bedingungen sogar ein Zuwachs adhärenter Zellen von 5% zu ver-

zeichnen war. Die Ablösung adhärenter Zellen kann von mitotischen sowie von die Zellvitalität beeinträchtigenden Prozessen verursacht sein. Die Vitalfärbung mit Trypanblau bzw. die Analyse der Kernmorphologie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid ergaben für WEHI-S Zellen nach der 24-stündigen 37°C Inkubation ohne TNF- α -Stimulierung einen Anteil membrangeschädigter bzw. mitotischer Zellen von je ca. 5% der Gesamtpopulation. Somit ist ein Großteil der abgelösten Zellen als vital anzusehen und es ist anzunehmen, dass ein Anteil vitaler WEHI-S Zellen als Suspensionszellen existieren.

Da die in der Literatur beschriebenen TNF- α -Konzentrationen zur Apoptoseinduktion bei WEHI-S Zellen in weiten Bereichen variierten (0,005-0,1ng/ml, FOGHSGAARD et al., 2001; 0,1ng/ml, LEE et al., 1999; 1ng/ml = 80U/ml, BREKKE et al., 1999; 100ng/ml = 23000U/ml, FARACO et al., 1999; 860ng/ml = 50nM, JARVIS et al., 1994), wurde die TNF- α -Arbeitskonzentration, mit der sich eine suffiziente Apoptose induzieren ließ, in Vorversuchen ausgetestet und in Anlehnung an eine Arbeit unserer Arbeitsgruppe (KATSEN et al., 1998) auf 200U/ml entsprechend 0,5ng/ml festgelegt.

6.1.2 Methoden

Durch ein standardisiertes Vorgehen in der Durchführung der Experimente wurde versucht Varianzen der Ergebnisse weitestgehend gering zuhalten. So wurden die Zellen für alle Untersuchungen ausschließlich am zweiten Tag nach Subkultivierung in der ersten bis dritten Passage bei einer 70 bis 80%igen Konfluenz eingesetzt. Nach Ansicht einiger Autoren hat schon allein die Ausprägung der Zelldichte einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß einer eintretenden Apoptose (SAKAMURO et al., 1995; MERLO et al., 1995; PANDEY und WANG, 1995). Auch wurde darauf geachtet, dass die Zellen eines Versuchsansatzes zur Durchführung der entsprechenden Methoden immer quantitativ aus den Kulturgefäßen gelöst und so die Zellen der gesamten Population zur Analyse eingesetzt wurden. Da die Zellen unsynchronisiert wuchsen, könnten die Ergebnisse, neben durchführungsbedingten Varianzen, auch von einer zellzyklusabhängigen Regulierung von Mechanismen und der daraus resultierenden Expression verschiedener Apoptose-involvierter Proteine beeinflusst sein. Eine zellzyklusabhängige Beeinflussung der Expression apoptotischer Charakteristika wurde von FARACO et al. (1999) bei TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen in derart beschrieben, dass proliferierende Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen, primär apoptotische Merkmale entwickelten, während sich stationäre Zellen, die in der G0/G1-Phase arretiert waren, unter gleichen Bedingungen einem sekundär nekrotischen Zellschaden unterlagen. Einen weiteren Einfluss auf die Varianz der Ergebnisse könnte eine ungleichmäßige Temperaturverteilung in den Gefäßen der kalteexponierten Proben, aufgrund der Grobkörnigkeit des Eises bewirkt haben, da die direkt eisexponierten Bereiche eine andere Temperatureinwirkung erfahren als die luftgefüllten Zwischenräume. Auch ein ungleiches Abschmelzen des Eises, vor allem in den Randbereichen der Eisunterlage, könnte bei den Langzeitversuchen durch einseitiges Absinken der Kulturgefäße zu Fehlern geführt haben. Zur Konstanterhaltung der Temperatur über den ausgedehnten Inkubationszeitraum der Langzeitversuche mussten die Eisunterlagen daher vierstündlich

erneuert bzw. die Temperierung des Inkubatorinnenraums mit Kühlpackungen gewährleistet werden. Weiterhin muss bei der Interpretation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden, dass sich die Abkühlung der Medien während der Kälteinkubation, aufgrund der Exposition der Kulturgefäße direkt auf der Eisunterlage (Wärmeleitung), um einen Faktor 3 bis 4 schneller vollzog als der Temperaturanstieg während der Wiedererwärmungsphase im Inkubator (Wärmeströmung).

Die Beurteilung apoptotischer Prozesse unter Kälteeinfluss und TNF- α -Stimulierung über die Detektion mit verschiedenen Methoden lieferte weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. Aufgetretene Abweichungen können in Unterschieden der Messverfahren und der Durchführungsmodalitäten begründet sein. So wurden bei der morphologischen Beurteilung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Bisbenzimid und Propidiumjodid nur adhärente Zellen und Zellen in direkter Nachbarschaft zur Kulturgefäßoberfläche bewertet. Da sich die apoptotische Zellpopulation in der Regel im fortgeschrittenen Stadium von der Gefäßoberfläche ablöste, ging ein Anteil apoptotischer Zellen nicht in die Beurteilung ein und verfälschte das Ergebnis zugunsten vitaler Zellen; dieses Phänomen war für alle immunzytochemischen Färbungen von Relevanz. Demgegenüber kann ein heftiges Zell-'detachment' die Ruptur der Zytoplasmamembran bewirken, so dass ursprünglich vitale Zellen als nekrotisch, bzw. primäre Apoptosen als sekundäre Nekrosen fehlbewertet werden können. Bei der morphologischen Beurteilung bereitete daneben die Diskriminierung zwischen apoptotischen Kernstadien und Kernteilungsstadien dem ungeübten Auge Schwierigkeiten. So kann v. a. die Beurteilung mitotischer Telophase-Zellen und apoptotischer Chromatin-Kondensations- und -Marginationsstadien zu Fehlinterpretationen führen (STAUNTON und GAFFNEY, 1995; WIJSMAN et al., 1993). Zur Absicherung der erfassten Daten wurde daher eine zweite unabhängige Auswertung der Videobänder vorgenommen. Ein weiterer Aspekt dieser Methode, der ebenfalls zu Fehldeutungen führen könnte, ist der nicht einzukalkulierende zelltoxische Effekt der Farbstoffe selbst, der sich vor allem bei längeren Inkubationszeiten additiv zur versuchsinduzierten Zellschädigung auswirken kann. Um diesen Fehler zu minimieren, wurden die Experimente mit einer geringen Farbstoffkonzentration von 2 μ g/ml durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Zellen mithilfe der 7-AAD- und der Annexin-V-Methode umfasste hingegen die gesamte Zellpopulation. Eine Fehlerquelle der 7-AAD-Methode ist in der zusätzlichen Anfärbung von RNA durch den nukleinsäurebindenden Farbstoff gegeben, weshalb während der Färbeprozedur versucht wurde, vorhandene RNA unter Einwirkung einer RNase zu eliminieren. Ferner konnte es bei der durchflusszytometrischen Auswertung Schwierigkeiten bereiten, die dem G0/G1-Peak vorgelagerte Sub-2n-Population von kleineren Partikel bzw. Zelldebris zu differenzieren. Die Annexin-V-Methode stellt, obwohl die Translokation der Phosphatidylserin-Lipide ein Apoptose-spezifisches Merkmal ist (MARTIN und PAGANO, 1987), keinen sehr sicheren Apoptosemarker dar, da bei der Beurteilung sekundärer Nekrosen zu berücksichtigen ist, dass auch primär nekrotische Zellen Annexin-positiv sein können: Das Protein kann bei geschädigter Zellmembran ins Zellinnere permeieren und nicht transloziertes intrazelluläres Phosphatidylserin markie-

ren. Durch 'detachment'-bedingte Ruptur der Zytoplasmamembran können zudem ursprünglich vitale Zellen fälschlicherweise als sekundäre Nekrosen beurteilt werden.

Die Fehlerminimierung der durchflusszytometrischen Ermittlung der Expression verschiedener Proteine setzte ebenfalls eine quantitative Gewinnung der gesamten Zellpopulation voraus und war in erster Linie an eine standardisierte Durchführung der Färbeprozedur gebunden. Des Weiteren könnten sich Ergebnisschwankungen durch die unvermeidbare Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Chargen ergeben haben. Die gleiche Problematik stellte sich auch für die Western-Blot-Analysen, für die die quantitative Zellgewinnung und ein standardisiertes quantitatives Arbeiten unerlässlich war. Der kritischste Punkt der Western-Blot-Analyse ist die exakte Proteinextraktion, bei der sichergestellt sein muss, dass zum einen die Gesamtheit aller Zielproteine extrahiert wird und dass die gewählte Extraktionsmethode für die Gewinnung des Targetproteins geeignet ist. Zur Absicherung der Richtigkeit der Protein-Konzentrationsbestimmung wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und jede Proteinprobe mindestens zweimal photometrisch gemessen, um zudem Spannungsschwankungen des Gerätes auszuschließen. Auch für die mRNA-Analyse mittels RT-PCR wurde, um die gesamte Zellpopulation eines Versuchsansatzes zu erfassen, die Gesamt-RNA sowohl aus adhärenenten als auch aus Zellen des Kulturüberstandes extrahiert. Da die instabile RNA schnell proteolytisch degradiert werden kann, mussten die Schritte sehr zügig durchgeführt werden.

Durch die DCFH-DA-Methode zur Detektion von oxidativem Stress wurde die gesamte Zellpopulation erfasst. Um die Aktivität der endogenen Esterasen zur Reduktion des Farbstoffes aufrechtzuerhalten, konnten die Zellen nicht sofort nach Versuchsende fixiert werden, so dass die ermittelten Ergebnisse der DCFH-DA-Analyse keine direkte Momentaufnahme der zellulären Situation auf die Behandlung wiedergibt, sondern eine zeitliche Verzögerung aufweisen. Bei der Ermittlung des pH-Wertes bzw. der $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ Partialdrücke im Kulturüberstand wurden, im Gegensatz zu allen anderen Methoden, Messungen von Parametern im extrazellulären Milieu durchgeführt. Dabei konnten in den verschiedenen Versuchsgruppen nur geringe Unterschiede erwartet werden, da die Mengen an Ionen aus zellulärem Geschehen, im Vergleich zum großen Volumen des Überstandes, verschwindend gering sind und daher in entsprechend hoher Verdünnung vorliegen. Zur Beurteilung der Parameter musste peinlichst darauf geachtet werden, dass möglichst keine Kontamination der Proben mit Luft-sauerstoff stattfinden konnte. Um hieraus resultierende Schwankungen zu minimieren, wurden die Proben sofort nach Versuchsende in Glaskapillaren überführt und unter sofortigem Luftabschluss dem Analysegerät zugeführt. Mit der BCECF-AM-Methode konnte der intrazelluläre pH-Wert der Gesamtpopulation bestimmt werden. Auch für diesen Nachweis musste sehr gleichmäßig und zügig gearbeitet werden, da der Farbstoff auch durch andere Vorgänge, wie z. B. durch Einwirkung von Licht schnell weiter oxidiert werden kann.

Die Proliferationstests, der WST-1-Test und der Einbau des Thymidin-Basenanalogs BrdU, wurden nach gleicher Versuchsanordnung, nämlich in einem Zeitraum zwischen 0,5 und 4h im Anschluss an das eigentliche Experiment durchgeführt, so dass die ermittelten Ergebnisse die Situation

nach 5,5 und 9h nach Versuchsbeginn widerspiegeln. In beiden Tests wurde die Proliferation der gesamten Zellpopulation ermittelt; ein methodischer Unterschied bestand lediglich zwischen der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen BrdU-Detektion, da bei der erstgenannten Methode die Gesamtpopulation und bei der zweiten nur adhärenzte Zellen in die Beurteilung eingingen. Die Bedeutung des WST-1 Tests, dessen Aussagekraft, aufgrund der gleichen metabolischen Umsetzung des weniger toxischen WST-Tetrazoliumsalses, mit dem MTT-Test gleichgesetzt werden kann, wird kontrovers diskutiert. Aufgrund der Reduktion des Tetrazoliumsalses durch endogene mitochondriale Dehydrogenasen zu dem farbigen Formazan, kann der Test als Synonym für die Stoffwechselaktivität verstanden werden. Daneben ist der Test von der Herstellerfirma selbst als indirekter Indikator für Zellproliferation ausgewiesen. LEE et al. (1999) interpretierten den Test als Methode zur Quantifizierung TNF- α -vermittelter Zytotoxizität, FOGHSGAARD et al. (2001) nutzten ihn zur Messung der Zellebensfähigkeit ('Survival/Vitalitäts-Test'). XIANG et al. (1998) setzten den Test zur Ermittlung allgemeiner Zellschädigung ein und ABRAHAMSE et al. (2003) ordneten ihm die Funktion als charakteristischen Nekrose-Indikator zu. Die Zyklusphasen der über DNA-Histogramme durchflusszytometrisch ermittelten Zellzyklusanalyse konnten nicht über ein entsprechendes Integrationsprogramm erfasst werden, sondern wurden durch manuelle Marker-Positionierung festgelegt.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Apoptose

Einfluss der Kälte auf die Apoptose-Induktion verschiedener Zellen und Zelllinien

Die Untersuchung des Einflusses von Kälte auf induzierte Apoptose in verschiedenen Zelllinien über die Bestimmung der Caspase-3 Aktivierung führte zu einer Aufspaltung in zwei prinzipiell unterschiedlich reagierende Gruppen. Für die erste Gruppe mit der TNF- α -sensiblen Mausfibrosarkom-Zelllinie WEHI-S, der humanen myeloiden Lymphom-Zelllinie HL-60 und den Mausfibroblasten L929 wurde ein protektiver Effekt der Kälteeinwirkung unter Apoptose-induzierender Stimulierung evaluiert. In der zweiten Gruppe, zu der die TNF- α -resistenten WEHI-R Zelllinie, die humane Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa und die humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL) zählten, bewirkte der Kälteeinfluss einen verstärkten Caspase-3-abhängigen Zelltod unter Apoptose-induzierenden Bedingungen. Der Befund, dass Zellen unterschiedlicher Genese unter derselben Apoptoseinduktion unterschiedliche Ausprägung bzw. Formen des Zelltodes aufweisen, ist keineswegs überraschend, da die Heterogenität der Todesmechanismen schon von einigen Arbeitsgruppen gezeigt wurde. So fanden WILSON und BROWNING (2002) bei der Untersuchung fünf verschiedener Zelllinien unter identischen Apoptose-induzierenden Bedingungen Caspase-3-abhängige Apoptose, Caspase-3-unabhängige Apoptose, Caspase-3-involvierte Nekrose und intermittierende Mischformen mit nekrotischen und apoptotischen Merkmalen. Auch LEIST und JÄÄTTELÄ (2001) beschrieben bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien neben Apoptose und Nekrose zwei weitere Zelltod-Kategorien, einen Apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod und Nekrose-ähnlichen programmierten Zelltod. Die

Induktion des eingeschlagenen Zelltod-’Pathways’ unter gegebenen Bedingungen scheint daher zelltypspezifisch zu sein.

Um den apoptotischen Prozess unter Kälteeinwirkung näher zu analysieren und die Auswirkung der Kälteapplikation auch auf die Entstehung von Zellstress und die Proliferation zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit stellvertretend für die beiden heterogen reagierenden Zellgruppen, die TNF- α -sensible WEHI-S und die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie, aufgrund ihrer deutlichen Apoptose-Induktion, für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

6.2.1.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen

Zeit- und Temperaturabhängigkeit der TNF- α -induzierten Apoptose unter Kälteeinfluss

Eine vierstündige Kälteapplikation bei 4°C, gefolgt von einer ein- bis zwanzigstündigen Wiedererwärmungsphase bei 37°C, bewirkte bei TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung über einen Inkubationszeitraum von acht bis zehn Stunden eine geringere Ausprägung morphologischer Apoptosemerkmale gegenüber der permanent bei 37°C-inkubierten Kontrollgruppe. Die vierstündige Kälteapplikation ohne TNF- α -Stimulierung mit anschließender Wiedererwärmung hingegen führte zu einer signifikant verstärkten Apoptose, deren Ausmaß jedoch gegenüber der 37°C Kontrolle gering war. Somit lässt sich für die TNF- α -induzierte Apoptose TNF- α -sensibler WEHI-S Zellen eine protektive Wirkung der Kälteapplikation ableiten, während ohne TNF- α -Stimulierung die Kälte selbst Apoptose induziert. Da sich die Anzahl apoptotischer Zellen nach der Kälteapplikation TNF- α -unabhängig zwischen der vierten und fünften Inkubationsstunde um ca. 20% erhöhte, kann weiterhin formuliert werden, dass sich sowohl im TNF- α -stimulierten als auch im unstimulierten System die morphologischen Apoptosemerkmale zeitverzögert erst unter Wärmeeinfluss sichtbar manifestieren.

Die Beobachtungen unter unstimulierten Bedingungen können durch die Ergebnisse von RAUEN et al. (1999) bestätigt werden, die nach einer hypothermen Inkubation bis zu 30h bei 4°C und anschließender einstündiger Wiedererwärmung bei 37°C eine Induktion von Apoptose in Hepatozyten und Leberendothelzellen der Ratte beschrieben, deren morphologische Veränderungen sich vorrangig während des ’rewarmings’ entwickelten. Charakteristisch veränderte Apoptosemorphologie kälteapplizierter Rattenhepatozyten (20h 4°C) wurden auch von VAIRETTI et al. (2001) evaluiert, deren Ausmaß sich ebenfalls nach einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C drastisch verstärkte. In Übereinstimmung mit RAUEN et al. (1999, 2000), die als Ursache der kälteinduzierten Apoptose oxidativen Stress durch Eisen-vermittelte Bildung von ROS vorschlugen, ermittelten auch VAIRETTI et al. (2001) als Auslöser apoptotischer Prozesse unter Kälte eine zeitabhängige ROS-Produktion mit gesteigerter Lipidperoxidation sowie Veränderungen im GSH-Status, die sich in einem Verlust an intrazellulärem reduzierten Glutathion äußerten. Schon KATSEN und RICKBERG (1991) interpretierten frühe, durch niedrige Temperaturen induzierte apoptotische Veränderungen der Zellmorphologie als Stressreaktion, so dass auch für die Apoptose-Induktion der unstimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen auf eine Mitbeteiligung von Zellstress geschlossen werden kann.

Die zeitverzögerte Entwicklung apoptotischer Merkmale erst während der Wiedererwärmung kann in einem reduzierten zellulären Metabolismus durch die kälteinduzierte Abnahme der temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse eine Erklärung finden. Durch die Kälteapplikation ausgelöste Schäden können sich dann erst nach Energiezufuhr während der Wiedererwärmungsphase visualisieren. Neben der Inhibierung der Reaktionsgeschwindigkeit kann die Kälte zudem degradierende bzw. denaturierende Prozesse initiiert haben, die zur Modifikation der Proteinfunktion und zur Inaktivierung von Enzymen führen können. Durch eine resultierende verminderte Zellatmung steht zudem eine geringere Menge an energiereichem ATP zur Verfügung, die eine Retardierung oder sogar eine Stagnierung energieabhängiger Prozesse in der Kälte zur Folge haben kann. Während der Wiedererwärmung kann, infolge energieverbrauchender Prozesse durch die Wiederaufnahme der normalen Zellfunktion, ein relativer ATP-Mangel ausgelöst werden, der zur Unterstützung apoptotischer Prozesse beitragen kann (COLOFIORE et al., 1995; FELDENBERG et al., 1999). Des Weiteren kann auch ein verringertes Nährstoffangebot infolge einer kälteinduzierten Hemmung des zellulären Stofftransports zur Apoptose-Induktion beigetragen haben, da nach PANDEY und WANG (1995) der Entzug von Serum und Wachstumsfaktoren sehr schnell apoptotischen Zelltod induzieren kann. Obwohl während der Kälteapplikation durch den reduzierten Stoffwechsel weniger Nährstoffe benötigt werden, kann während der Wiedererwärmungsphase bei Wiederherstellung der normalen Zellphysiologie ein erhöhter Nährstoffbedarf einen relativen Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren verursacht haben. Bei der Auflistung dieser Apoptose-induzierenden Prinzipien ist jedoch zu berücksichtigen, dass die kälteinduzierte Apoptose-Ausprägung der unstimulierten WEHI-S Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24h sehr gering war.

Auch die anfängliche kälteinduzierte Protektion im TNF- α -stimulierten System kann auf die Temperaturabhängigkeit chemischer Reaktionen zurückgeführt werden, die eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit um einen Faktor 2-4 bei einer Temperaturabnahme um 10°C bewirkt. Nach erfolgter Wiedererwärmung müssten sich die genannten kälteabhängigen Apoptose-induzierenden Prinzipien auch auf die TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen ausgewirkt und so den ausgelösten Schaden durch das Zytokin verstärkt haben. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Kälteapplikation ein transienter Schutz vor TNF- α -induzierter Apoptose initiiert wurde. Für die Aufrechterhaltung des protektiven Einflusses der Kälte über einen Zeitraum von vier bis sechs Stunden nach Wiedererwärmung müssen daher ursächliche Prozesse, die direkt in den Apoptose-Signalweg involviert sind, eine Rolle spielen.

Da sich die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C für TNF- α -stimulierte WEHI-S Zellen auf die Entstehung von Apoptose bis zu 8h protektiv auswirkte, sollte zunächst der hypotherme Einfluss verschiedener Temperaturen und variabler Inkubationsintervalle anhand der Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte im Vergleich zu einer permanent bei 37°C inkubierten TNF- α -stimulierten und unstimulierten Kontrollgruppe überprüft werden. Nachdem sich bei der Evaluierung der Apoptosemorphologie abzeichnete, dass sich der protektive Effekt der hypothermen Temperatureinwirkung nach erfolgter Wiedererwärmung lediglich bis zu drei Stunden aufrechterhielt und sich nach vierstün-

diger 37°C Inkubation schon merklich abschwächte, wurde für die Wiedererwärmungsphase ein konstantes vierstündiges Zeitintervall gewählt, um diesen kritischen Zeitpunkt näher zu untersuchen. Um zudem den ausschließlichen Einfluss der Temperatur ohne Wiedererwärmungsphase zu evaluieren, wurde die Caspase-3 Aktivierung zunächst nach vier Stunden Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen (32°C, 24°C, 10°C und 4°C) ermittelt.

Für alle Temperaturen unterhalb 37°C wurde nach vierstündiger Kühlung ohne Wiedererwärmung eine Protektion vor TNF- α -induzierter Apoptose im Vergleich zur 37°C Kontrolle festgestellt. Die unstimulierten Zellen reagierten auf die unterschiedlichen Temperaturen ohne Einfluss auf die Expression aktivierter Caspase-3. Lediglich die 4°C Inkubation zeigte einen geringen Zuwachs des Anteils apoptotischer Zellen, so dass sich eine rein kälteinduzierte Caspase-3 Aktivierung nur durch den Einfluss der extrem niedrigen Temperatur von 4°C andeutete. Unter TNF- α -Stimulierung wurde eine Caspase-3 Aktivierung durch die Inkubation bei 4°C und auch bei 32°C induziert, die jedoch gegenüber der 37°C Kontrolle noch immer eine Protektion bewirkte. Der protektive Einfluss der hypothermen Temperaturen unter TNF- α -Stimulierung zwischen 32°C und 10°C, der mit abnehmender Temperatur zunahm, kann als Überlagerungseffekt der durch die Zytokin-induzierten Apoptose und der Hypothermie-induzierten Herabsetzung des Zellmetabolismus verstanden werden. Die 4°C Inkubation hingegen führte mit und ohne TNF- α -Stimulierung zu einer Caspase-3 Aktivierung, so dass bei dieser sehr tiefen Temperatur der Apoptose-induzierende Stimulus überwog.

Im zeitlichen Verlauf ließ sich unter TNF- α -Stimulierung für die gewählten Temperaturen ab der achten (bei 10°C ab der vierten) hypothermen Inkubationsstunde nach erfolgter vierstündiger Wiedererwärmung eine Verminderung der aktiven Caspase-3 Spaltprodukte gegenüber der korrespondierenden 37°C Kontrolle beobachten. Eine hypotherme Inkubation zwischen einer und vier Stunden brachte für die evaluierten Temperaturen nach der vierstündigen Wiedererwärmung hingegen keinen Schutz vor TNF- α -induzierter Apoptose. Dies führte zu der Feststellung, dass längere hypotherme Inkubationsintervalle in einem günstigen Einfluss auf die Protektion vor TNF- α -stimulierter Apoptose resultieren. Da sich jedoch in den vorangegangenen Versuchen die vierstündige Hypothermie bei 4°C gefolgt von einer Stunde Wiedererwärmung protektiv gegenüber des TNF- α -induzierten Zelltodes auswirkte, indiziert auch der Dauer der Wiedererwärmungsphase einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Ausprägung apoptotischer Merkmale.

Die TNF- α -stimulierten Kontrollzellen entwickelten unter der permanenten 37°C-Inkubation einen ersten Gipfel der Caspase-3 Aktivierung nach ca. 12 Stunden und einen zweiten Gipfel nach ca. 24 Stunden. Auch CHO et al. (2003) fanden bei einer temporären Untersuchung der Caspase-3 Aktivierung in einem Ischämie-Modell der Ratte zwei unterschiedliche Caspase-3 Aktivierungs-*'peaks'* nach 6 bis 12 und nach 24 Stunden. Die biphasische Expression der Caspase-3 Spaltprodukte könnte die Beteiligung zweier unterschiedlicher Aktivierungsmechanismen, beispielsweise über den intrinsischen Mitochondrien-vermittelten und den extrinsischen Rezeptor-vermittelten *'Pathway'* indizieren. Ein biphasischer Verlauf der Caspase-3 Aktivierung war auch in den gekühlten TNF- α -stimulierten Ver-

suchsgruppen zu beobachten; hier zeichnete sich ein erster Gipfel nach ca. 3h und ein zweiter nach 24h Kühlung und nachfolgender vierstündiger Wiedererwärmungsphase ab. Eine Ausnahme bildete nur die 24°C Inkubation, für die nach der 24-stündigen Kühlungsphase kein erneuter Anstieg der Caspase-3 Spaltprodukte zu verzeichnen war, was durch mehrfache Wiederholungsversuche bestätigt wurde. Dies könnte bedeuten, dass die 24°C Kühlung eine ideale Temperatur für die Langzeitvermeidung von Apoptose ist, wie bei der Kultivierung von isolierten Langerhans Inseln bereits gezeigt werden konnte (CUI et al., 2005). Für die 4°C Inkubation war nicht nach 3h, sondern erst nach 8h ein erster Aktivierungs-’Peak’ zu ermitteln. Auch DITSWORTH et al. (2003) fanden in ihren Untersuchungen an gekühltem Gehirngewebe eine frühe Cytochrom c vermittelte Aktivierung der Caspase-3 nach 4h, neben einer späteren Aktivierung nach 24h, die mit dem extrinsischen Rezeptor-vermittelten ’Pathway’ in Verbindung gebracht wurde.

Die unstimulierten WEHI-S Zellen zeigten für alle evaluierten hypothermen Temperaturen nach der Wiedererwärmungsphase eine vermehrte Produktion aktiver Caspase-3 Spaltprodukte gegenüber der unstimulierten 37°C Kontrolle, die sich jedoch mit abnehmender Temperatur verminderte. Der Befund, dass Hypothermie unter Apoptose-induzierenden Bedingungen vor programmiertem Zelltod schützt, dass aber Hypothermie selbst eine kälteinduzierte Apoptose verursacht, wurde auch von SHIBANO et al. (2002) beschrieben. In ihren Versuchen führte eine milde bzw. moderate Hypothermie (29-35°C) zu einer Inhibition induzierter Apoptose in neuronalen PC12 Zellen, bewirkte aber in gekühlten intakten Kontrollzellen, bei Temperaturen unter 30°C, Apoptose. Auch MI et al. (2003) beschrieben einen protektiven Effekt hypotherm-inkubierter (25°C) Keratinozyten nach Apoptose-Induktion, der sich in einer Reduktion der DNA-Fragmentierung, der apoptotischen Morphologie und der p53 Expression manifestierte. EBERSPACHER et al. (2003) konnten eine protektive Auswirkung der Hypothermie in einem cerebralen Ischämie-Reperusionsmodell der Ratte in Form einer verminderten bax-Expression bei 34°C zeigen. ZHANG et al. (2001) wiesen einen Schutz vor Ischämie-induzierter Apoptose durch Induktion von bcl-2 infolge hypothermer Beeinflussung nach. Nach NING et al. (1998) ist die Modulation des Energiehaushaltes an der hypothermen Protektion beteiligt und Temperaturen über 30°C minimieren schnell den Vorteil des reduzierten Metabolismus. Die Arbeitsgruppen von YENARI et al. (2002) und XU et al. (2002) konnten zeigen, dass eine milde Hypothermie nach Ischämie die Menge der mitochondrialen Cytochrom c Freisetzung verminderte und schließen daraus, dass der protektive Einfluss der milden Hypothermie auf die Erhaltung der mitochondrialen Integrität zurückzuführen ist, während der protektive Effekt tiefer Hypothermie unter Apoptose-induzierenden Bedingungen in erster Linie aus der Reduzierung metabolischer Prozesse resultiert.

Die Tatsache, dass sich die kälteinduzierte Apoptose in den eigenen Versuchen im unstimulierten System mit abnehmender Temperatur abschwächte, kann als Überlagerungseffekt der durch die Hypothermie-induzierten Apoptose und der hypotherm-induzierten Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse und des Energie-Status verstanden werden. Da sich selbst die 32°C Inkubation nach Wiedererwärmung auf die unstimulierten Zellen Apoptose-induzierend aus-

wirkte, weist darauf hin, dass offenbar jede Abweichung von der optimalen „physiologischen“ Temperatur, apoptotische Prozesse auszulösen vermag und der Stimulus zur Apoptose-Induktion gegenüber der metabolischen Retardierung überwiegt.

Zusammen mit den erzielten Ergebnissen der Beurteilung der morphologischen Apoptosemerkmale kann für die Untersuchung der Caspase-3 Aktivierung der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen konstatiert werden, dass

1. die Aktivierung der Caspase-3 vor der Manifestierung der morphologischen Apoptosemerkmale initiiert wird
2. eine vierstündige hypotherme Inkubation zwischen 32 und 10°C ohne Wiedererwärmung im unstimulierten System keine Caspase-3 Aktivierung induziert
3. die hypotherm vermittelte Caspase-3 Aktivierung im unstimulierten System nach erfolgter Wiedererwärmung mit ansteigender Temperatur zunimmt, da die metabolische Inhibierung abnimmt
4. die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C eine Caspase-3 Aktivierung induziert, aber dennoch Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet
5. die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C während einer ein- bis dreistündigen Wiedererwärmung bei 37°C Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet
6. sich der protektive Einfluss der vierstündigen Kälteapplikation bei 4°C nach vierstündiger Wiedererwärmung bei 37°C aufhebt
7. die vierstündige Kälteapplikation bei 4°C nach verlängerten Wiedererwärmungsphasen bei 37°C (6-20h) keinen Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet
8. eine ein- bis vierstündige Kälteapplikation bei 4°C nach vierstündiger Wiedererwärmung bei 37°C keinen Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet
9. eine acht- bis zwanzigstündige Kälteapplikation bei 4°C nach vierstündiger Wiedererwärmung bei 37°C Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose bietet.

In Analogie zu der 4°C Kälteapplikation brachten auch die ein- bis vierstündigen 10, 24 und 32°C Inkubationen nach der vierstündigen Wiedererwärmungsphase bei 37°C keinen Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose, während sich verlängerte Kühlungsintervalle (8-20h) nach vierstündiger Wiedererwärmung bei 37°C protektiv auf die TNF- α -vermittelter Apoptose auswirkten.

Somit wurde gezeigt, dass der kälteinduzierte Schutz vor TNF- α -vermittelter Apoptose von der Dauer der Inkubationsintervalle, sowohl der Kühlungs- als auch der Wiedererwärmungsphase, abhängt. Während verlängerte Kühlungsintervalle die TNF- α -vermittelte Apoptose inhibieren, induzieren verlängerte Wiedererwärmungsphasen eine Aktivierung der TNF- α -vermittelten Apoptose. Für die Kälteapplikation der WEHI-S Zellen bei 4°C konnte gezeigt werden, dass sich Kühlungszeiten ab vier Stunden und eine weniger als vierstündige Wiedererwärmung bei 37°C die TNF- α -vermittelte Apoptose protegieren.

Induzierte 'Pathways' der Apoptose unter Kälteeinfluss

Die weiteren Untersuchungen zur Klärung des apoptotischen Prozesses unter Kälteeinwirkung und in Frage kommender verantwortlicher 'Pathways', wurden daher mit verschiedenen Apoptose-detektierenden Methoden prinzipiell nach vierstündiger Kälteeinwirkung bei 4°C und einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C durchgeführt, da in diesem Untersuchungsintervall sehr deutliche Unterschiede in der Expression der apoptotischen Merkmale eruiert wurden.

Internukleosomale DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserin-Translokation:

Die Ermittlung der apoptotischen Sub-2n-Population indizierte für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, dass die Kälteapplikation zwar eine Inhibition der TNF- α -vermittelten internukleosomalen DNA-Fragmentierung bewirkt, dass aber die Kälte selbst in unstimulierten Zellen einen DNA-Schaden hervorruft. Auch die zum Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin (PS) eingesetzte Annexin-V-Methode und die Expression aktiver Caspase-3 Spaltprodukte bestätigten den Befund, dass der Kälteeinfluss TNF- α -induzierte Apoptose inhibiert, hingegen die Kälte selbst Apoptose induziert. Da schon gezeigt wurde, dass die PS-Translokation Caspasen-abhängig und auch die DNA-Degradierung eine späte Konsequenz einer Caspasen-abhängigen Endonukleasen-Aktivierung ('Caspase-3-activated DNase I', CAD) ist (DEGEN et al., 2000; LANSIAUX et al., 2001), kann die Aktivierung der Caspasen-Kaskade in den eigenen Versuchen, die durch die Induktion der aktiven Caspase-3 Spaltprodukte indiziert ist und mit der PS-Translokation und der generierten Sub-2n-Population korreliert, für die Phosphatidylserin-Externalisierung und auch für die DNA-Fragmentierung verantwortlich sein.

Die Caspasen-Kaskade und TNF-Rezeptoren:

Um die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zu verfolgen, wurden neben der Haupt-Exekutionsprotease Caspase-3, Markercaspasen des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-'Pathways' und zur Überprüfung der Caspasenaktivität die Generierung von PARP-1 (Polyadenyl-Ribose-Polymerase-1)-Spaltprodukten untersucht. Als Indikatormolekül des extrinsischen rezeptorvermittelten Apoptose-'Pathways' wurde die Expression der Initiatorprotease Caspase-8 ermittelt. Da der eingesetzte Antikörper sowohl die aktiven Spaltprodukte, als auch den inaktiven 'Precursor' erkennt, konnte mithilfe der durchflusszytometrischen Untersuchung keine konkrete Aussage über die Caspase-8 Aktivierung getroffen werden. Die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen reagierten mit einer TNF- α -induzierten, als auch einer Kälte-induzierten Caspase-8 Expression, wobei die Kälte die TNF- α -induzierte Expression abschwächte. Als Markerprotein des intrinsischen mitochondrienvermittelten Apoptose-'Pathways' wurde die Expression aktivierter Caspase-9 Spaltprodukte detektiert. Auch für die Caspase-9 wurde nach gleichem Muster eine TNF- α induzierte, als auch eine kälteinduzierte Caspase-9 Aktivierung ermittelt. Als Indikator für die Aktivität der an der PARP-1 Spaltung involvierten Caspasen, wurde der Anteil 'cleaved' PARP-1 positiver Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt. Die Polyadenyl-Ribose-Polymerase-1, deren Expression nach Stressinduktion und während DNA-Reparaturvorgängen hochreguliert wird, dient als Substrat aktivierter Caspasen. Das kleinere Spaltprodukt der Caspasen-

'cleaved' PARP-1 bindet während apoptotischen Prozessen irreversibel an entstandene DNA-Strangbrüche und kehrt so die eigentliche Reparaturfunktion um, indem das DNA-'Repair' verhindert wird. Die PARP-1 Spaltung und Inaktivierung kann durch die Caspase-3, -6, -7 oder aber auch Caspasen-unabhängig durch Calpaine erfolgen (D'AMOURS et al., 1999; GERMAIN et al., 1999; WANG, 2000). Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde eine starke TNF- α induzierte, temperaturunabhängige Generierung von PARP-1 Spaltprodukten detektiert. Aufgrund der sehr schwach induzierten PARP-1-Spaltung, kann für die kälteapplizierten unstimulierten WEHI-S Zellen von einem protektiven Effekt über PARP-1 vermittelte Reparaturmechanismen auf die induzierte Apoptose ausgegangen werden.

Der klassische extrinsische TNF- α -induzierte Apoptose-'Pathway' verläuft über Vermittlung des Todesdomäne-(DD)-tragenden TNF-R1 Rezeptors, der im inaktiven Zustand durch Bindung von SODD vor Selbstaggregation geschützt ist (JIANG et al., 1999; TSCHOPP et al., 1999). Nach Trimerisierung des Rezeptors, induziert durch die Bindung von TNF- α (SMITH et al., 1994), erfolgt die Rekrutierung der Adaptermoleküle TRADD und FADD über die Todesdomänen dieser Moleküle, die die Übermittlung Apoptose-induzierender Signale in Gang setzen (BOLDIN et al., 1996; CHINNAIYAN et al., 1996a,b; HSU et al., 1996). Über die Interaktion der Todeseffektordomäne (DED) von FADD mit der Initiator-Caspase-8 wird diese in den DISC rekrutiert (MEDEMA et al., 1997). Die resultierende Oligomerisierung des Caspase-8-'Precursors' induziert dessen autoproteolytische Spaltung und Aktivierung (MUZIO et al., 1998b). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei TNF-R1-Rezeptor-vermittelter Apoptose weder FADD noch Caspase-8 in den Rezeptor-Komplex rekrutiert sind und die Aktivierung der Caspase-8 nicht im DISC stattfindet. Es wird vermutet, dass der Rezeptor nach erfolgter Ligandenbindung internalisiert, das gebundene TRADD abdissoziiert und die Caspase-8 Aktivierung über die Interaktion mit TRADD/FADD rezeptorunabhängig stattfindet (HARPER et al., 2003). Die Autoaktivierung der Caspase-8 erfolgt über die Dimerisierung zweier Pro-Caspase-8 Moleküle zu einem stabilen Intermediärprodukt, das schon ein voll aktiviertes Enzym darstellt (DONEPUDI et al., 2003). Aktivierte Caspase-8 aktiviert ihrerseits direkt, ohne mitochondriale Beteiligung, die Effektor-Caspase-3 (SCAFFIDI et al., 1998; CHEN und MAKINO, 2002), deren aktive Spaltprodukte dann über proteolytischen Abbau essentieller Zellkomponenten, wie z. B. der Reparatur-Polymerase PARP-1, spezifischer Zytoskelett-Proteine und nukleärer Lamine, sowie über Aktivierung von CAD ('Caspase-3-activated DNaseI'), zum Finalstadium des apoptotischen Zelltodes führen (NUNEZ et al., 1998). Auch eine Caspase-8-abhängige Aktivierung der Effektor-Caspasen 6 und 7 wurde schon beschrieben (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1998; WALCZAK und KRAMMER, 2000). Je nach Zelltyp kann eine Amplifikation des apoptotischen Caspase-8 Signals über einen Mitochondrien-abhängigen Mechanismus erfolgen. Dabei können bereits wenige Caspase-8 Moleküle die Spaltung von Bid, einem pro-apoptotischen Mitglied der bcl-2-Proteinfamilie, bewirken, dessen Spaltprodukt tBid ('truncated' Bid) die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium initiiert (LI et al., 1998b; LUO et al., 1998). ATP-abhängig wird nachfolgend die Bildung des Apoptosoms, beste-

hend aus Cytochrom c, Apaf-1 ('apoptotic protease activating factor 1') und Caspase-9, induziert (LI et al., 1997; WANG, 2001). Die Caspase-9 Rekrutierung in diesen multimeren Komplex vermittelt die Aktivierung des Zymogens (STENNICKE et al., 1999; ZOU et al., 1999). Aktivierte Caspase-9 vermag wiederum die Effektor-Caspase-3 zu aktivieren. Die aktiven Caspase-3 Spaltprodukte können im Anschluss Caspase-8 aktivieren und schließen so die apoptotische Amplifikationsschleife (ENGELS et al., 2000; TANG et al., 2000; WIEDER et al., 2001). Über diesen 'Link' des extrinsischen mit dem intrinsischen 'Pathway' erfährt der Rezeptor-vermittelte Signalweg eine Verstärkung. Da die Menge an prozessierter Caspase-8 verantwortlich zu sein scheint, welcher Apoptosemechanismus abläuft, wird vermutet, dass ein und dieselbe Zelle das Potential zur Aktivierung beider Apoptosewege hat. Welcher Mechanismus letztendlich abläuft scheint zelltypspezifisch von dem jeweils stimulierten Todesrezeptor abzuhängen (WAJANT et al., 2003).

Abgesehen von der initialen rezeptorvermittelten Aktivierung über Caspase-8 entspricht der intrinsische 'Pathway' der beschriebenen mitochondrialen Amplifikationsschleife. Die Aktivierung des mitochondrienvermittelten Todesmechanismus erfolgt über toxische Substanzen, UV- oder γ -Strahlung oder Mangel an Überlebensfaktoren (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1993) bzw. DNA-Schädigung (LI et al., 1998a). Die induzierten apoptotischen Signale konvergieren im Mitochondrium und lösen Ereignisse, wie z. B. die Freisetzung von Intermembranspalt-Proteinen, u. a. Cytochrom c, AIF ('apoptosis-inducing factor'), Smac/DIABLO, aber auch Caspase-2 und Caspase-9 (KROEMER et al., 1997; REED, 1997a; REED, 1998; GREEN und REED, 1998), Störungen im Elektronentransport z. B. durch Ceramide (SAWADA et al., 2004), Störungen der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Generierung (BERNARDI et al., 1998), Verlust des Transmembranpotentials, Veränderungen zellulärer Redox-Vorgänge (MARCHETTI et al., 1996) und die Beteiligung pro- bzw. anti-apoptischer bcl-2-Familienmitglieder aus, die die Exekution des programmierten Zelltodes steuern (SHIMIZU et al., 1999).

Cytochrom c, ein zentrales Protein der Atmungskette, das gleichzeitig eine Schlüsselfunktion für die Auslösung von Apoptose ausübt, befindet sich im Kompartiment zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, die auch ohne Herabsetzung des Transmembranpotentials erfolgen kann (HAKEM et al., 1998; LUO et al., 1998), wirken die anti-apoptotischen Proteine der bcl-2-Familie entgegen (KLUCK et al., 1997). Zytosolisches Cytochrom c induziert in Gegenwart von ATP, über Konformationsänderungen im Adaptermolekül Apaf-1, das nachfolgend Pro-Caspase-9 bindet und dimerisiert und so die Autoaktivierung der Caspase-9 in Gang setzt, die Bildung des Apoptosoms (HU et al., 1998b; PAN et al., 1998; STENNICKE et al., 1999). Das Apoptosom aktiviert dann, wie bereits beschrieben die Caspasen-Kaskade.

Neben der Freisetzung von Cytochrom c können auch andere pro-apoptotische Komponenten durch das Öffnen der Poren der inneren Mitochondrienmembran ('permeability transition pores', PTP) aus dem Mitochondrium freigesetzt werden. Das Öffnen dieser Poren ermöglicht die Äquilibration von Ionen und Substraten der Atmungskette zwischen Zytosol und mitochondrialer Matrix und führt

zur Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials und zum Stillstand der ATP-Synthese (BERNARDI et al., 1992). So erfährt der mitochondriale Mechanismus eine weitere Verstärkung durch die zusätzliche Freisetzung von Smac/DIABLO aus der Mitochondrienmembran, das anti-apoptische Moleküle wie die inhibierenden Apoptose-Proteine (c-IAP1, c-IAP2, XIAP) blockiert und so die Apoptose unterstützt (CHAI et al., 2000; VERHAGEN et al., 2000). Auch Caspasen-unabhängige Apoptose kann durch AIF-'Release' aus dem mitochondrialen Intermembranspalt vermittelt sein. AIF transloziert in den Nukleus und induziert apoptotische Merkmale, wie Chromatin-Kondensation und CAD-unabhängige Chromatin-Fragmentation in große 50kb Fragmente (LORENZO et al., 1999).

Die TNF- α -Stimulierung der WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen führte unter der 37°C Inkubation über eine gesteigerte Expression der Initiator-Caspase-8 zu einer starken Caspase-3 Aktivierung. Das Auftreten der aktiven Caspase-9 Spaltprodukte lässt auf die Beteiligung des mitochondrialen Amplifikationsmechanismus schließen, durch den zusätzlich über Caspase-9 selbst, als auch über erneute Caspase-3-vermittelte Caspase-8 Aktivierung eine weitere Induktion aktiver Caspase-3 Spaltprodukte erfolgt sein kann, durch die das Ausmaß der verstärkten Caspase-3 Aktivierung und äquivalenten Caspase-3-abhängigen PARP-1-Spaltung zu erklären ist.

Zur Klärung, ob die Aktivierung der Caspasen-Kaskade rezeptorvermittelt oder über andere Mechanismen induziert war, wurde die Expression des "Apoptose"-TNF-R1 und "Survival"-TNF-R2 Rezeptors sowohl durchflusszytometrisch als auch über Western-Blot-Analyse evaluiert. Der TNF-R2 Rezeptor, der aufgrund fehlender Todesdomäne zu den Nicht-Todesrezeptoren gehört, wird durch lösliches TNF- α nur schwach stimuliert, membranständiges TNF- α hingegen ist in der Lage den TNF-R2 Rezeptor zu aktivieren (GRELL et al., 1995; 1999). Über TRAF2 und NF κ B-Aktivierung kann auch der TNF-R2 Rezeptor die TNF-R1-induzierte Apoptose unterstützen (WEISS et al., 1997; GRELL et al., 1999). Die Initiierung der Apoptose geschieht dann indirekt über Bindung von endogenem membranständigen TNF- α , das über NF κ B-induzierte Expression des TNF- α -Gens generiert wird. Das endogen gebildete TNF- α kann so den TNF-R1 Rezeptor aktivieren und die TNF- α -abhängige Apoptose verstärken (GRELL et al., 1999). Die WEHI-S Zellen zeigten unter TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen eine fulminante Induktion der membrangebundenen TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptoren. Eine Aktivierung der Caspase-8 kann daher auf die Beteiligung des TNF-R1 Rezeptors zurückgeführt werden. Weiterhin lässt die verstärkte Expression des TNF-R2 Rezeptors auf eine unterstützende Wirkung über endogen produziertes TNF- α schließen.

Unter der Kältebehandlung schienen die TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen zunächst den gleichen Caspase-'Pathway', nämlich die direkte rezeptorvermittelte Caspase-3 Aktivierung durch Caspase-8 und die Caspase-8-induzierte mitochondriale Amplifikationsschleife zu beschreiten, wobei jedoch die Expression der Caspase-8 bzw. die Aktivierung von Caspase-9 und insbesondere der Caspase-3 geringer ausfielen. Die mit der 37°C-Inkubation vergleichbare Ausprägung der PARP-1 Spaltung muss daher, neben dem 'Cleavage' durch aktivierte Caspase-3, auf eine Mitbeteiligung anderer Effektor-Caspasen, beispielsweise der Caspase-6 und Caspase-7, deren Aktivierung über Caspase-9 Ver-

mittlung schon gezeigt wurde (SLEE et al., 1999), zurückzuführen sein. Da bereits auch ein Caspase-8-vermitteltes PARP-1-'Cleavage' von LE et al. (2002) beschrieben wurde, könnte die ausgeprägte Expression der PARP-1-Spaltprodukte in den eigenen Versuchen neben der Caspase-9 Vermittlung auch auf eine Mitbeteiligung der Caspase-8 hinweisen.

Einen Widerspruch zur rezeptorvermittelten Theorie ergab sich bei den kältebehandelten WEHI-S Zellen jedoch nach der Untersuchung der TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptor-Expression. Die Kälteapplikation inhibierte die Expression beider Membran-Rezeptoren. Da die Aktivierung der Caspase-8 in diesem Falle nicht vorrangig auf eine TNF-R1-Vermittlung zurückgeführt werden kann, könnte die Aktivierung, auch ohne Vermittlung der Adaptermoleküle TRADD und FADD, auf der Basis ihres hohen Expressionslevels erfolgt sein. DED-Proteine können auch unabhängig von Todesrezeptoren Apoptose auslösen. So wurde gezeigt, dass DED-Proteine in Überexpressionsexperimenten zytoplasmatische Caspase-8 aktivieren und dadurch Apoptose induzieren können (SIEGEL et al., 1998). MONROE et al. (2002) schlagen als Auslöser für die Aktivierung von Initiator-Caspasen, die aufgrund ihrer langen Prä-Domänen zur Autokatalyse bzw. Selbstaktivierung befähigt sind, die Expression gesteigerter Proteinlevels vor. Die Hypothese steht in Einklang mit dem Modell von SALVESEN und DIXIT (1999), nachdem die räumliche Nähe der Pro-Domänen deren Oligomerisierung induziert und zur Autoaktivierung der Initiator-Caspasen führt. Die indizierte Caspase-9 Aktivierung der kälteapplizierten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen kann somit u. a. auf eine Caspase-8-Vermittlung über die Amplifikationsschleife zurückgeführt werden. Die relativ schwache Ausprägung der Caspase-3 Aktivierung unterstützt weiterhin die Hypothese, dass unter Kälteeinfluss nicht primär der TNF-R1 Rezeptor vermittelte 'Pathway' eingeschlagen wurde, da eine direkte Aktivierung der Caspase-3 über die Caspase-8 nur in geringem Ausmaß stattgefunden haben kann. Die vergleichsweise hohe Expression der Caspase-8, die im Widerspruch zu der ermittelten TNF-R1 Expression und dem Ausmaß der induzierten Apoptose steht, wurde um eventuelle Messfehler auszuschließen, durch mehrfache Wiederholungen abgesichert und bestätigt.

Es stellte sich die Frage, was die Expression dieser Caspase auslöste und inwiefern das Enzym aktiviert ist. Es wäre denkbar, dass der Einfluss der Kälte selbst die Caspase-8 Expression und auch ihre Aktivierung bewirkt haben könnte. So fanden auch DITSWORTH et al. (2003) eine Aktivierung von Caspase-8 nach Kühlung von Gehirngewebe auf 19°C und anschließendem 'Rewarming'. Aufgrund der geringen Ausprägung der TNF- α -induzierten Apoptose in den eigenen Versuchen ist vorstellbar, dass trotz des hohen Expressionslevels, die induzierte Caspase-8 nicht vollständig aktiviert war. So könnte eine Beeinträchtigung ihrer Aktivierung z. B. durch die Schutzproteine c-IAP-1 und cIAP-2, die über NF κ B induzierte Genaktivierung kodiert werden (WANG et al., 1998; CHU et al., 1997), erfolgt sein. Gemeinsam mit TRAF2 und TRAF1 können diese Apoptose-inhibierenden Proteine die Caspase-8 Aktivierung hemmen (WANG et al., 1998).

Die relativ starke Aktivierung der Caspase-9 unter Kälteeinfluss bei TNF- α -Stimulierung könnte neben der tBid/Cytochrom c Vermittlung über Caspase-8 auch auf intrinsische Faktoren, wie die Gene-

rierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zurückzuführen sein. Nach FIERS et al. (1999) kann TNF- α -Stimulierung zu oxidativem Stress führen, in den gewöhnlich eine Generierung von ROS durch aktivierte Mitochondrien involviert ist. Die ROS können die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt bewirken und nachfolgend über die Bildung des Apoptosoms die Aktivierung der Caspase-9, Caspase-3 und Caspase-8 induzieren, so dass für die kälteapplizierten, so wie auch für die permanent warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen eine durch mitochondriale ROS-Bildung induzierte Caspase-9 Aktivierung denkbar wäre. Auch ein direkter Einfluss von Caspase-9 auf die Caspase-8 Aktivierung ist schon beschrieben worden (KRUIDERING und EVAN, 2000). Die vergleichsweise geringe Aktivierung der Caspase-3 unter hypothermer Inkubation könnte, unter der Annahme der Induktion von oxidativem Stress, auch durch NO inhibiert sein. Nach MANNICK et al. (1999) können ROS mit NO reagieren und zur Bildung von Nitrit-Superoxid Radikalen führen, die Sulfhydryl-Gruppen nitrosylieren können. Das im katalytischen Zentrum des inaktiven Caspase-3 Zymogens lokalisierte Cystein kann durch Nitrosylierung inaktiviert werden.

Kälteapplizierte unstimulierte WEHI-S Zellen zeigten gegenüber den TNF- α -stimulierten Zellen eine geringere Caspase-8 Expression, sowie Caspase-3 Aktivierung und PARP-1-Spaltung. Auch ohne TNF- α -Stimulierung wurden die TNF-Rezeptoren in der Kälte nicht hochreguliert, so dass eine Rezeptor-’Pathway’-Vermittlung ausgeschlossen werden kann. Da die Caspase-9 Aktivierung in ähnlicher Ausprägung wie bei kältebehandelten TNF- α -stimulierten Zellen detektiert wurde, wird die zuvor getroffene Hypothese eines kälteinduzierten intrinsischen mitochondrienvermittelten ’Pathways’ über ROS unterstützt. Diese Hypothese steht in Einklang mit den Ergebnissen von SALAHUDEEN et al. (2003), die einen Einfluss der Kälte auf die Mitochondrienpermeabilität demonstrierten, der auf ein kälteinduziertes Öffnen der PTP (’permeability transition pores’) zurückgeführt werden konnte. Des weiteren konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass auch die während der Wiedererwärmungsphase induzierte Apoptose zumindest teilweise über den mitochondrialen ’Pathway’ vermittelt war; eine Beteiligung des rezeptorvermittelten ’Pathways’ konnte jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden.

Das Tumor-Suppressor-Protein p53:

Die Ermittlung der Expression des Tumor-Suppressor-Proteins p53, das in die zelluläre Antwort auf zytotoxischen Stress involviert ist und Apoptose auszulösen vermag, ergab für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen sowohl eine TNF- α - als auch eine Kälte-vermittelte, wenn auch nicht stark ausgeprägte Induktion. p53 ist in TNF- α -induzierte Apoptose involviert und TNF- α führt in verschiedenen Zelltypen zur p53-Akkumulierung (GOTLIEB et al., 1994; DONATO und PEREZ, 1998; ROKHLIN et al., 2000). Dies steht im Einklang mit der p53-Induktion der WEHI-S Zellen nach TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation in den eigenen Versuchen. Nach CHEN et al. (1996) hängt die zelluläre Antwort vom p53 Protein-’Level’ ab und höhere p53 Konzentrationen können über posttranslationelle Mechanismen Apoptose bewirken. Zusätzlich zum TNF-R1 Rezeptor-vermittelten ’Pathway’ ist daher in den eigenen Versuchen auch eine Beteiligung p53-abhängiger Apoptose denkbar. p53 kann dabei

mit dem rezeptorvermittelten 'Pathway' direkt interagieren (OWEN-SCHAUB et al., 1995; WU et al., 1997; BENNETT et al., 1998). Ein direkter Auslöser der p53-Induktion könnte die erfolgte DNA-Schädigung sein, die über die, durch internukleosomale DNA-Fragmentierung, generierte Sub-2n-Population indiziert ist. Da die Akkumulierung von p53 zu einem der frühesten Ereignisse der zellulären Stressantwort gehört (BURNS und EI-DEIRY, 1999), könnte die p53 Expression in den eigenen Versuchen zusätzlich als Antwort auf mitochondrialen Stress induziert sein. Selbst eine mitochondriale Lokalisation von p53 nach exogener Stresseinwirkung mit Freisetzung von Cytochrom c, AIF und anderer pro-apoptotischer Proteine, die die Apoptose zusätzlich über Aktivierung der Caspasen-Kaskade oder über eine AIF-vermittelte DNA-Fragmentierung verstärken können, wurde schon demonstriert (s. Übersicht in CHANG, 2002; MARCHENKO et al., 2000). Darüber hinaus vermittelt p53 über einen linearen 'Pathway', unter Beteiligung von bax-Transaktivierung und bax-Translokation vom Zytosol zur Mitochondrienmembran, eine Verstärkung der Caspasen-abhängigen Apoptose über Freisetzung von Cytochrom c und zusätzliche Caspase-9 Aktivierung mit nachfolgender Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 (SHEN und WHITE, 2001). Auch ein direkter Einfluss von p53 auf die Aktivierung der Caspasen-Kaskade wurde schon gezeigt, so ist u. a. die Caspase-3 ein direktes Target-Gen des Tumorsuppressor-Proteins (POLYAK et al., 1997).

Auch die kältebehandelten TNF- α -stimulierten und unstimulierten WEHI-S Zellen reagierten mit einer Induktion von p53, die geringfügig niedriger ausfiel als die TNF- α -induzierte Expression unter warmer Inkubation. Die p53 Expression kann mit einer Induktion durch den eingetretenen DNA-Schaden und darüber hinaus mit der mutmaßlichen ROS-Produktion argumentiert werden. Die Tatsache, dass MI et al. (2003) einen protektiven Effekt hypotherm-inkubierter (25°C) Keratinozyten nach Apoptose-Induktion beschrieben, der sich in einer Reduktion der DNA-Fragmentierung, der apoptotischen Morphologie und der p53 Expression manifestierte, lässt die Vermutung zu, dass auch die 4°C Inkubation in den eigenen Versuchen zu einer Verminderung der p53 Expression gegenüber der 37°C Inkubation geführt haben kann. Auch NING et al. (2002) beschrieben eine hypotherm-induzierte Verminderung der postischämischen p53 Expression als auch einiger p53-Target-Gene.

p53 wird nach erfolgtem Insult sehr schnell akkumuliert und es ist wahrscheinlich, dass die Untersuchung nach fünfständiger Inkubation nicht die initiale Protein-Expression widerspiegelt. Der Befund, dass die p53 Expression unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation nur unwesentlich höher war als nach hypothermer Inkubation, könnte bedeuten, dass ein ursprünglich stärker induziertes Protein-Level des Tumorsuppressor-Proteins, das über posttranskriptionelle Mechanismen zusätzlich Apoptose auslöste, bereits durch die induzierte Caspasen-Aktivität minimiert wurde. Nach WANG und FRIEDMAN (2000) stellt p53 ein Apoptose-Target für aktivierte Caspasen dar und dient u. a. als Caspase-3-Substrat. So ist für die eigenen Versuche vorstellbar, dass der ursprüngliche p53-Level über die induzierte Caspasen-Aktivierung bereits degradiert wurde. KOVAR et al. (2000) zeigten beispielsweise, dass die p53-Akkumulierung schon vier Stunden vor einer Caspasen-Aktivierung initiiert wird. In den beiden kälteapplizierten WEHI-S Versuchsgruppen könnte hingegen der beobachtete G2-Arrest

nach Kälteapplikation darauf hindeuten, dass aufgrund der schon ursprünglich niedrigeren p53 Expression über transkriptionelle Aktivität ein Zellzyklusarrest am G2-'Checkpoint' ausgelöst wurde, um nach erfolgtem DNA-Schaden Gelegenheit zur Reparatur zugeben.

Die unverhältnismäßig hohe Caspase-8 Expression der kältebehandelten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen konnte nicht auf den Einfluss des TNF-R1 Rezeptors zurückgeführt werden. Eine Mitbeteiligung von p53 an der Caspase-8 Expression wäre möglich, da Caspase-8 neben PIG3, eine Schlüsselfunktion zur Regulierung der p53-abhängigen Apoptose zukommt (KOVAR et al., 2000). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Aktivierung der Caspasen-Kaskade und der mitochondriale Kollaps, koordiniert durch p53, in einer zeitlich geordneten Sequenz auftraten und suggerierten die Beteiligung von Caspase-8 an der Regulierung dieses Prozesses. Auch DING et al. (2000b) berichteten über eine p53-induzierte rezeptorunabhängige zytosolische Aktivierung von Caspase-8 und konstatierten, dass Caspase-8 ein direkter transkriptionsunabhängiger 'downstream' Effektor von p53 zu sein scheint.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B:

Die Expression des Transkriptionsfaktors NF κ B, der in die TNF- α -induzierte Signaltransduktion involviert ist, wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Der verwendete Antikörper erkennt selektiv nur die aktivierte p65 Untereinheit. Da das gewonnene Proteinextrakt zytosolisches und karyosolisches Protein enthielt, kann lediglich eine Aussage über die Quantität des löslichen aktivierten Transkriptionsfaktors, nicht aber über seine Lokalisierung oder seine DNA-Bindung bzw. Transaktivierung, getroffen werden.

Für die warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen wurde ein signifikanter Anstieg der NF κ B Expression ermittelt. Die Kälte inhibierte die TNF- α -induzierte NF κ B Expression signifikant. Damit war die NF κ B Expression unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation in Übereinstimmung mit der Induktion der beiden TNF-Rezeptoren und kann auf eine rezeptorvermittelte Induktion zugeführt werden. TNF- α löst in vielen Zelltypen nicht nur eine apoptotische Antwort aus, sondern induziert simultan die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der über die Expression anti-apoptotischer Gene der Prozessierung des Zelltodes entgegenwirkt (SMIRNOV et al., 2001). In inaktiver Form ist NF κ B zytoplasmatisch lokalisiert und an inhibitorische Proteine der I κ B Familie gebunden (THANOS und MANIATIS, 1995; VERMA et al., 1995; BAEUERLE und BALTIMORE, 1996). Diese inaktiven Komplexe können über die Vermittlung der TNF-Rezeptoren aktiviert werden. Die Aktivierung von NF κ B über den TNF- α -induzierten 'Pathway' erfolgt über die Rekrutierung von TRAF1, TRAF2 und RIP an TNF-R1 gebundenes TRADD (CARPENTIER et al., 1998; WALLACH et al., 2002). Die Rezeptor-initiierten Signale führen zunächst zur Aktivierung von I κ B-Kinase (IKK), die über Phosphorylierung des NF κ B-Inhibitors I κ B, dessen Ubiquitinierung und proteolytische Degradierung bewirkt (REGNIER et al., 1997). Nach Translokation des Rel/NF κ B Heterodimers in den Kern, nimmt NF κ B die transkriptionelle Aktivierung seiner anti-apoptotischen Target-Gene TRAF1,

TRAF2, cIAP-1, cIAP-2, A20 und bcl-2 auf (BALDWIN, 1996; VERMA und STEVENSON, 1997; SIMEONIDIS et al., 1999; CARPENTIER et al., 1998; CARPENTIER und BEYAERT, 1999; BEYAERT et al., 2000; WALLACH et al., 2002) oder initiiert die Induktion von 'Survival'- und Proliferationssignalen (KAYE et al., 1996). Insbesondere der TNF-R2 Rezeptor wird als 'Survival'-Rezeptor angesprochen, da durch die Rekrutierung von Mitgliedern der TRAF Familie und anderer Adaptor-moleküle die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und JNK erfolgen kann, die ihrerseits die Transkription von AP-1 vermitteln. Durch Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren kann die Expression von Zellwachstumsgenen und Stimulierung der Proliferation (KAYE et al., 1996; ARCH et al., 1998) sowie die Expression anti-apoptotischer Proteine erfolgen, die die Zelle resistent für TNF-R1 Stimulierung macht (ASHKENAZI und DIXIT, 1998). Aber auch der TNF-R2 Rezeptor, der nur durch membrangebundenes TNF- α voll aktiviert wird, kann Apoptose induzieren (HARIDAS et al., 1998), indem er, über NF κ B-abhängige endogene TNF- α -Produktion, die TNF- α -Antwort in Kooperation mit dem TNF-R1 Rezeptor moduliert (GRELL et al., 1995; 1996).

Für die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wurde in den eigenen Versuchen sowohl unter warmer Inkubation als auch in abgeschwächter Form nach Kälteapplikation eine TNF- α -induzierte NF κ B Expression evaluiert. Die NF κ B Expression unter warmer Inkubation kann über die Signaltransduktion der TNF- α -induzierten TNF-R1 und TNF-R2 Rezeptoren erfolgt sein. Da nach Kälteapplikation keine Rezeptor-Induktion zu ermitteln war, muss die Aktivierung der inaktiven NF κ B-Komplexe durch TNF- α über einen rezeptorunabhängigen Mechanismus, beispielsweise über ROS-Generierung, stattgefunden haben (SCHRECK und BAEUERLE, 1991; SCHRECK et al., 1991).

Genetische Kontrolle von Caspase-3 und p53

Zur Klärung, ob die wichtigen Apoptose-involvierten Proteine Caspase-3 und p53 unter den gewählten Versuchsbedingungen transkriptionell oder transkriptionsunabhängig reguliert sind und ob die Kälteapplikation einen Einfluss auf die Gen-Regulation hat, wurde die mRNA Expression der beiden Apoptoseparameter als Indikatoren mithilfe der semiquantitativen RT-PCR überprüft. Da sich die mRNA Expression in allen Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen nach der fünfstündigen Inkubation nur geringfügig und nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollzellen unterschied, müssen zu diesem Zeitpunkt für die Protein-Regulation der Caspase-3- und p53-Aktivierung unter TNF- α -Stimulierung und Kältebehandlung in erster Linie posttranskriptionelle Mechanismen vermutet werden. Obwohl in den kälteapplizierten Versuchsgruppen im Vergleich zu ihren korrespondierenden warmen Gruppen eine geringfügig höhere mRNA Expression beider Parameter zu verzeichnen war, kann der nicht signifikante Expressionsunterschied nicht als eine kälteinduzierte Neusynthese der Proteine bewertet werden. Für die p53 mRNA Expression könnte u. U. von einer tendenziellen Induktion unter TNF- α -Stimulierung ausgegangen werden. Auffallend war das im Vergleich zur Caspase-3 wesentlich höhere Grundlevel der p53 mRNA in den unstimulierten Kontrollansätzen, über das sich eine konstitutive Genexpression von p53 abzeichnet.

VON MERING et al. (2001) evaluierten in ihren Versuchen mit Pneumokokken-Meningitis-induzierten Mäusen, dass das Caspase-Netzwerk auf transkriptioneller Ebene engmaschig reguliert ist. Allerdings wurde die mRNA Expression von beispielsweise Caspase-6 und Caspase-7 nach 6 Stunden, von Caspase-8 nach 12 Stunden und insbesondere von Caspase-3 erst 24 Stunden nach Infektion induziert. CONTRERAS et al. (2004) zeigten hingegen in einem Ischämie/Reperfusionen-Modell der Leber, bei der die induzierte Apoptose vor allem unter TNF- α -Vermittlung abläuft, nach Gabe von Caspase-3 si-(small interfering)-RNA, die spezifisch an komplementäre 'messenger' RNA bindet, eine Inhibition der Caspase-3 Genexpression eine Stunde nach erfolgter Reperfusion. Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse scheint es plausibel, dass die Synthese der Caspase-3 mRNA zu einem sehr späten oder aber auch zu einem sehr frühen Zeitpunkt erfolgen kann.

Die Caspase-3 Aktivierung in den eigenen Versuchen war zum gewählten Zeitpunkt nach 5h vorrangig posttranslational auf Proteinebene reguliert. Auch ohne Apoptose-Induktion enthält jede Zelle konstitutiv das inaktive Caspase-3 Zymogen im Kern. Nach erfolgter Aktivierung translokieren die aktiven Spaltprodukte ins Zytoplasma und können in fortgeschrittenen späten Apoptosestadien wieder im Nukleus aufgefunden werden (RAMUZ et al., 2003). Auch die Tatsache, dass bei der zeitlichen Evaluierung der Caspase-3 Aktivierung auf Proteinebene nach Induktion von Apoptose, das Erscheinen der aktiven Spaltprodukte immer mit einer Abnahme des Caspase-Zymogens über einen längeren Zeitraum verbunden ist, spricht dafür, dass das 'processing' der Caspase-3 auf Proteinebene reguliert ist und die genetische Expression von neuem Caspase-3 Zymogen erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt. Im gewählten Zeitrahmen der eigenen Versuche war keine Induktion der Caspase-3 mRNA Synthese zu verzeichnen. Weder die TNF- α -Stimulierung noch die Wirkung der Hypothermie übten einen Einfluss auf die Genexpression von Caspase-3 aus.

Die Genexpression von p53 indizierte im Vergleich zur Caspase-3 höhere mRNA Level in allen Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen, was darauf hindeutet, dass p53 konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert wird. Die TNF- α -Stimulierung konnte die p53 mRNA Synthese nur geringfügig und ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe induzieren. Die hypotherme Einwirkung ohne Stimulierung hatte keinen Einfluss auf die p53 Neusynthese. Da jedoch durch die Ermittlung der p53 Proteinexpression von einer Mitbeteiligung einer p53-abhängigen Apoptose ausgegangen werden konnte, stellt sich die Frage, wie die Akkumulierung von p53 Protein zustande gekommen sein kann. p53 Protein wird infolge der konstitutiven Genexpression fortwährend synthetisiert und durch die Bindung an Mdm2 schnell über das Ubiquitin-System degradiert, so dass unter physiologischen Bedingungen, keine hohen p53 Proteinlevel zu detektieren sind. Induziert über verschiedene Stressstimuli kann p53 schnell akkumulieren, nicht indem die Neusynthese hochreguliert wird, sondern über die Unterbrechung des Degradierungsmechanismus. Daher ist eine p53-abhängige Apoptose nicht an die Expression von p53 mRNA gebunden und das p53 Proteinlevel muss nicht mit der p53 Genexpression korrelieren. Während die schnelle p53 Akkumulierung auf Proteinebene reguliert ist, scheint auch für p53 eine Proteinneusynthese erst zu einem späten Zeitpunkt nach erfolgter Apoptose-Induktion stattzu-

finden. So zeigte CUMMINGS (1996), dass bei milder hepatischer Ischämie-assoziiertes Apoptose mit geringem zellulären Schaden die Induktion von p53 mRNA erst nach Abklingen des mRNA Peaks apoptotischer Parameter auftrat.

6.2.1.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen

Zeitabhängigkeit der Apoptose unter Kälteeinfluss

Im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen entwickelte die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie einen sehr unterschiedlichen Verlauf und eine gänzlich andere Ausprägung der apoptotischen Morphologie (s. Abb. 6,7 und Tab. 9-12). Die kontinuierliche 37°C Inkubation unter TNF- α -Stimulierung bewirkte bei TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum von 24h eine gemäßigte Apoptose-Induktion mit einem Anteil apoptotisch veränderter Zellen unter 10%. Überraschend war zunächst der Befund, dass sich die Ausprägung morphologischer Apoptose-Merkmale der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen zum ersten Messzeitpunkt nach vierstündiger TNF- α -Einwirkdauer, trotz ihrer ausgewiesenen TNF- α -Resistenz (KILDAHL-ANDERSEN et al., 1986; AUSTGULEN et al., 1986), nicht wesentlich von der Apoptose-Induktion der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen unterschied. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass sich der Anteil apoptotischer WEHI-R Zellen auf dem Anfangslevel hielt und sich ab der siebten Inkubationsstunde bis zum Versuchsende sogar reduzierte, während bei den TNF- α -sensiblen Zellen das Ausmaß der Apoptose bis zum Versuchsende kontinuierlich zunahm. Im zeitlichen Verlauf bestätigte sich also die ausgewiesene TNF- α -Resistenz der WEHI-R Zellen und lässt auf die Mitwirkung unterschiedlicher Apoptose-Mechanismen der beiden Zelllinien schließen.

Die vierstündige 4°C Kälteapplikation induzierte bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen mit und ohne TNF- α -Stimulierung noch keine apoptotischen Merkmale, während schon nach einer Stunde Wiedererwärmung, unabhängig von der TNF- α -Stimulierung, eine drastisch verstärkte Apoptose gegenüber den korrespondierenden 37°C Kontrollen zu beobachten war. Somit kann, wie schon zuvor für die WEHI-S Zelllinie, auch für die WEHI-R Zellen formuliert werden, dass sich die morphologischen Apoptose-Merkmale zeitverzögert erst unter Wärmeeinfluss visuell manifestieren, was u. a. mit einem reduzierten zellulären Metabolismus unter Kälte und der nachfolgenden wärmeinduzierten Zunahme der temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse argumentiert werden kann. Die Wiederherstellung der normalen Zellfunktionen während der Wiedererwärmungsphase kann, wie schon für die WEHI-S Zellen ausgeführt, zu einem Mangel an Nährstoffen und Energieäquivalenten führen, der zu einer Apoptose-Induktion beitragen kann. Die stark induzierte Apoptose der kälteapplizierten WEHI-R Zellen nach einer Stunde Wiedererwärmung kann jedoch nicht alleine auf diesen Mechanismen beruhen. Die fulminante Entwicklung apoptotischer Morphologiemerkmale ist auch nicht mit einer TNF- α -vermittelten Apoptose-Induktion in Zusammenhang zu bringen, da die starke Ausprägung der Apoptose in der unstimulierten Versuchsgruppe im gleichen Ausmaß zu finden war. Vielmehr muss der Kälteeinfluss selbst bzw. die erfolgte starke Temperaturänderung während der

Wiedererwärmungsphase zur Apoptose-Induktion beigetragen oder sie ausgelöst haben. Dazu seien auch noch einmal die Adaptationsschwierigkeiten der WEHI-R Zellen bei der Kultivierung nach Kryokonservierung erwähnt.

Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich in der unstimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe ein kontinuierlicher Rückgang des Anteils apoptotischer WEHI-R Zellen um einen Faktor 2-3 bis Versuchsende nach 24h. Der Anteil apoptotischer Zellen unter TNF- α -Stimulierung unterlag dem gegenüber bis zur zehnten Inkubationsstunde lediglich einem sehr retardierten Rückgang, mit einer maximalen Abweichung von 29% von der anfänglichen Apoptose-Induktion, und wies zu Versuchsende einen erneuten Anstieg auf. Für die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie kann daher sowohl unter Apoptose-induzierenden als auch unter unstimulierten Bedingungen von einer massiven Zelltod-Induktion, verursacht durch den hypothermen Einfluss, ausgegangen werden, so dass die Kälteapplikation bei TNF- α -Resistenz keinen Schutz vor TNF- α -induzierter Apoptose bietet. Dabei kann die Induktion der apoptotischen Merkmale ohne TNF- α -Stimulierung, die im zeitlichen Verlauf durch die Inkubation bei „physiologischer“ Temperatur relativiert wurde, ausschließlich auf den Einfluss der Temperatur bzw. Temperaturänderung zurückgeführt werden. Die Induktion von apoptotischem Zelltod durch hypotherme Temperatureinwirkung wurde schon mehrmals beschrieben. Als Apoptose-induzierende Prinzipien der Hypothermie werden Zellstress (KATSEN und RICKBERG, 1991), insbesondere oxidativer Stress und ROS-Generierung (RAUEN et al., 1999, 2000; VAIRETTI et al., 2001), Beteiligung des mitochondrialen 'Pathways' (DISWORTH et al., 2003; EBERSPACHER et al., 2003), Modulation des Energiehaushaltes (NING et al., 1998), DNA-'Damage' (MI et al., 2003) und eine Vermittlung durch Caspase-8 Aktivierung (DISWORTH et al., 2003) diskutiert.

Die TNF- α -Stimulierung konnte bei den resistenten WEHI-R in einem Zeitraum von 1 bis 2 Stunden nach hypothermer Inkubation zu keiner morphologisch sichtbaren additiven Apoptose-Induktion beitragen. Die induzierten Apoptosemerkmale scheinen in dieser Phase vorrangig über den Kälteeinfluss vermittelt zu sein. Erst ab der dritten Stunde der Wiedererwärmung kann auf eine zusätzliche Apoptose-Vermittlung durch TNF- α geschlossen werden, durch die sich die beiden Versuchsgruppen bei Versuchsende nach 24h auch mit statistischer Signifikanz unterschieden.

Neben des konträren zeitlichen Verlaufs und der unterschiedlichen Ausprägung der apoptotischen Merkmale in den verschiedenen Versuchsgruppen, konnten auch Unterschiede in der detaillierten Analyse der apoptotischen Kernmorphologie der beiden WEHI Zelllinien beobachtet werden. So wurden für die 37°C inkubierte TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie ohne TNF- α -Stimulierung bis zu Versuchsende weder Anzeichen von Apoptose-Stadien bzw. nekrotischem Zelltod, noch ein 'detachment' der Zellen evaluiert. Die korrespondierenden WEHI-S Zellen hingegen wiesen schon ab der vierten Inkubationsstunde einen geringen Prozentsatz an kondensierten Kernstadien auf, die durch die Spaltung von Kernlaminae verursacht sind (LEIST und JÄÄTTELÄ, 2001). Der ermittelte Anteil des fortgeschrittenen Apoptosestadiums der sekundären Nekrosen von ca. 6% zum Versuchsende steht in Konsens mit der Ermittlung membrangeschädigter WEHI-S Zellen über die Trypanblau-Färbung. Zu-

sammen mit dem beobachteten 'detachment' weisen diese Indizien auf ein reduziertes Vermögen der WEHI-S Zellen zur Langzeitkultivierung hin. Das Ablösen der Zellen von der Kulturgefäßoberfläche kann aufgrund proliferativer (Mitosen) oder zellschädigender Ereignisse (Apoptosen, Nekrosen) stattfinden. Das ermittelte 'detachment' der WEHI-S Zellen nach 24-stündiger Inkubation unter „physiologischen“ Bedingungen von ca. 25% ist aufgrund der Analysen durch einen Anteil von ca. 5% mitotischen Zellen und ca. 9% apoptotischen Zellen verursacht; für den restlichen Anteil der abgelösten Zellen ist davon auszugehen, dass es sich um vitale Suspensionszellen handelt. Die Apoptose-Induktion der WEHI-S Zellen unter „physiologischen“ Bedingungen kann dabei u. a. auf die Zellablösung selbst zurückgeführt werden, da schon gezeigt wurde, dass ein Zell-'Detachment' zu einer Apoptose-Induktion führt (GROSSMANN, 2002; MICHEL, 2003; ZHAN et al., 2004). Ein weiterer Auslöser für apoptotischen Zelltod unter physiologischen Zellkulturbedingungen stellt die Depletion von Nährstoffen dar. Die ermittelten Generationszeiten der beiden Zelllinien indizieren ein schnelleres Wachstum der WEHI-S Zellen, das aufgrund eines gesteigerten Metabolismus nach der 24-stündigen Inkubation ein Nährstoffdefizit ausgelöst haben kann.

Die TNF- α -Stimulierung führte bei den WEHI-R unter permanenter 37°C Inkubation schon nach vierstündiger TNF- α -Einwirkung zur Ausbildung primärer kondensierter Apoptose-Stadien und zu einer sehr schnellen Generierung sekundärer Nekrosen, was auf eine Beeinträchtigung der Membranintegrität unter TNF- α -Stimulierung dieser Zellen hinweist. Im Gegensatz zur WEHI-S Zelllinie bildeten die WEHI-R Zellen auch das Primär-Apoptosestadium der Kernfragmentierung aus. Der Anteil aller apoptotischen Kernstadien war jedoch nach siebenstündiger TNF- α -Stimulierung bereits wieder rückläufig. Die WEHI-S Zellen der gleichen Versuchsgruppe bildeten die sekundäre Nekrose-Stadien im Vergleich zu den WEHI-R Zellen mit zeitlicher Retardierung aus, zeigten aber nie das primär apoptotische Kernfragmentierungsstadium. Primär nekrotischer Zelltod war für beide Zelllinien nicht zu verzeichnen (ca. 2% nach 24 Stunden). Auch unter TNF- α -Stimulierung unterschieden sich die beiden warminkubierten Zelllinien in ihrem Adhärenzverhalten, so unterlagen ca. 28% der WEHI-R Zellen und ca. 62% der WEHI-S Zellen bei Versuchsende einem 'detachment', das auf die zuvor genannten Ursachen zurückgeführt werden kann und zusätzlich auf eine hohe Sensitivität der WEHI-S Zellen gegenüber TNF- α -induziertem 'detachment' hindeutet.

Die kälteapplizierten WEHI-R Zellen entwickelten mit und ohne TNF- α -Stimulierung nach einer Stunde Wiedererwärmung einen fulminanten Anteil primärer kondensierter als auch fragmentierter Kernapoptosen, deren Anzahl sich bis Versuchsende stark verminderte und gegen Null konvergierte. Sekundäre Nekrose-Stadien entwickelten sich in den kälteapplizierten Versuchsgruppen in der Anfangsphase langsamer als während der permanenten 37°C Inkubation. Ab der siebten Inkubationsstunde, also nach dreistündiger Wiedererwärmung, war für beide Versuchsgruppen ein Wechsel zu einem schnellen Übergang in das fortgeschrittene Apoptosestadium zu beobachten. Im Vergleich zur warmen Inkubation wirkte sich demnach die Kälte unter TNF- α -Stimulierung, wie auch bei den WEHI-S Zellen, hemmend auf den Übergang vom primären zum sekundären Apoptose-Stadium aus, was zur An-

nahme führt, dass die Kälte an einem Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität dieser Zellen mitbeteiligt ist oder sogar selbst membranstabilisierende Wirkung aufweist. Das anfänglich stark induzierte Stadium der Kernfragmentierung reduzierte sich im Zeitverlauf und war zum Versuchsende nicht mehr aufzufinden. Diese Beobachtung deutet auf eine rein kälteinduzierte nukleäre Schädigung durch beispielsweise Endonukleasen hin, die sich durch die Äquilibration der Temperatur auf das „physiologische“ Niveau verminderte. Der Anteil primär nekrotischer Zellen war in beiden Versuchsgruppen gering ($\leq 1\%$), betrug aber zu Versuchsende ca. 5-6%. Somit unterlagen die kälteapplizierten WEHI-R Zellen zu einem geringfügig höheren Anteil als die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen einem nekrotischen Zelltod.

Die erzielten Befunde indizieren, dass sich die Entwicklung verschiedener Apoptosestadien und die Ausprägung der apoptotischen Merkmale sowohl zwischen der beiden Zelllinien als auch innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen prinzipiell unterscheiden und auf unterschiedliche apoptotische 'Pathways' hindeuten.

Induzierte 'Pathways' der Apoptose unter Kälteeinfluss

Internukleosomale DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserin-Translokation:

Bei den weiteren Untersuchungen zur Klärung des apoptotischen Prozesses der WEHI-R Zellen, die prinzipiell nach vierstündiger Kälteeinwirkung bei 4°C und einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C durchgeführt wurden, ergab die Ermittlung der apoptotischen Sub-2n-Population für die TNF- α -stimulierten 37°C-inkubierten und die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen eine fast übereinstimmende Generierung internukleosomaler DNA-Fragmente. Während die Caspase-3 Aktivierung und die Generierung der Sub-2n-Population bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen streng korrelierten und auf einen Caspase-3-abhängigen CAD-induzierten DNA-Fragmentierungsmechanismus zurückgeführt wurden, standen die ermittelte Caspase-3 Aktivierung und die internukleosomale DNA-Fragmentierung der WEHI-R Zellen nicht in Relation. Die Ergebnisse indizieren, dass die WEHI-R Zellen unter hypothermem Einfluss anderen Mechanismen der DNA-Fragmentierung unterliegen und die aktivierte Caspase-3 in geringerem Ausmaß über die CAD-abhängige DNA-Fragmentierung an der Generierung der Sub-2n-Population beteiligt ist. Da die kälteapplizierten WEHI-R Zellen, TNF- α -unabhängig, gegenüber den warminkubierten TNF- α -stimulierten Zellen eine stärkere Caspase-3 Aktivierung bei gleicher Ausprägung der Sub-2n-Generierung aufwiesen, kann auf eine Inhibierung der Caspase-3-abhängigen CAD-induzierten DNA-Fragmentierung infolge der hypothermen Einwirkung geschlossen werden, die zum einen die Caspase-3-vermittelte Aktivierung der CAD-Nuklease oder aber auch die Enzymaktivität der DNase selbst betreffen kann. Des Weiteren wäre auch für die TNF- α -Stimulierung unter warmer Inkubation ein zusätzlicher Caspase-3-unabhängiger Mechanismus der DNA-Fragmentierung, beispielweise über AIF, denkbar. Auch DAUGAS et al. (2000) sowie LEIST und JÄÄTTELÄ (2001) führten die Generierung der Sub-2n-Population u. a. auf die mitochondriale Freisetzung Nuklease-aktivierender Proteine, wie z. B. AIF zurück. Da in der TNF- α -stimulierten 37°C inkubierten

Versuchsgruppe der WEHI-R Zellen die morphologischen Apoptosemerkmale im Gegensatz zu den hypotherm inkubierten Zellen schon nach 4 Stunden detektiert wurden, ist zudem denkbar, dass das gleichwertige Generierungsausmaß der Sub-2n-Population bei geringerer Caspase-3 Aktivität auf einen additiven Effekt über die Zeit zurückzuführen ist.

Während für die verschiedenen Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen die ermittelten morphologischen Apoptosemerkmale, Caspase-3 Aktivierung, Generierung der Sub-2n-Population und der PS-Translokation in Korrelation standen, ergab sich für die WEHI-R Zellen eine weitere Diskrepanz bei der Ermittlung der PS-Translokation. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Parametern war der größte Anteil Annexin-V-positiver Zellen in der 37°C inkubierten TNF- α -stimulierten Versuchsgruppe aufzufinden und stand nicht in Relation zur ermittelten Caspase-3 Aktivität. Als dominanter 'early' Indikator ist die Translokation von Phosphatidylserin in vielen Modellen auch unabhängig von Caspase-Aktivierung (VANAGS et al., 1996; HIRT et al., 2000; JÄÄTTELÄ und TSCHOPP, 2003) und muss daher nicht zwingend mit der Caspase-3 Aktivierung einhergehen. WILSON und BROWNING (2002) zeigten, dass neben der Phosphatidylserin-Translokation auch verschiedene andere Apoptose-induzierte Merkmale, wie z. B. die Chromatin-Kondensation bzw. -Margination sowie das Chromatin-'Cleavage' in große 50kb-Fragmente unabhängig von der Caspase-3 Aktivierung sein können. Die Expression aktivierter Caspase-3 der WEHI-R Zellen in den eigenen Versuchen muss daher weder mit der über die 7-AAD-Methode ermittelten Sub-2n-Population, noch mit der Phosphatidylserin-Translokation korreliert sein. Eine plausible Erklärung wäre, dass die ATP-abhängige PS-Translokation aufgrund eines ATP-Defizits in den kälteapplizierten Versuchsgruppen nicht so schnell in Gang gesetzt werden konnte. So kann die ermittelte geringe PARP-1-Spaltung der WEHI-R Zellen zusammen mit der Kälteapplikation in einem suffizienten ATP-Mangel resultiert haben, der die PS-Translokation inhibierte. Auch die simultane starke Caspase-3 Aktivierung der WEHI-R Zellen während der Wiedererwärmungsphase, die wahrscheinlich durch einen intrinsischen 'Pathway' vermittelt wurde, kann einen zusätzlichen ATP-Verlust bewirkt haben, der zur Hemmung der PS-Translokation beigetragen haben kann. Ein Mangel an Energieäquivalenten könnte auch mit der Inhibierung der Caspase-3-abhängigen CAD-induzierten DNA-Fragmentierung in Zusammenhang stehen.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass das Versuchsende nach der fünfstündigen Inkubation für die WEHI-R Zellen einen sehr kritischen Zeitpunkt einer höchst vulnerablen Phase darstellte, da sich für die 37°C inkubierten TNF- α -stimulierten Zellen schon zwischen 4 und 5h der absolute Apoptose-Gipfel abzeichnete, während für die kälteapplizierten Zellen, unabhängig von der TNF- α -Stimulierung, nach 4h noch keine apoptotischen Merkmale detektiert werden konnten, jedoch während der einstündigen Wiedererwärmungsphase ein fulminanter Anstieg apoptoseinduzierter Zellen aufzufinden war (siehe vor allem die morphologische Kernbeurteilung, Abb. 7). Als frühes Apoptose-Merkmal steigt das Level der PS-Translokation zwar schon nach ca. 60min nach erfolgter Apoptose-Induktion an, erreicht aber das Maximum erst nach 120 bis 180 min (VANAGS et al., 1996). So ist denkbar,

dass bei den kälteapplizierten WEHI-R Zellen nach einer Stunde Wiedererwärmung die PS-Translokation noch nicht vollständig ausgeprägt war.

Die Caspasen-Kaskade und TNF-Rezeptoren:

Um die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zu verfolgen, wurden wie zuvor für die WEHI-S Zellen, neben der Haupt-Exekutionsprotease Caspase-3, Markercaspasen des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Pathways' und zur Überprüfung der Caspasenaktivität die Generierung von PARP-1-Spaltprodukten untersucht. Während die Ermittlung der Caspase-3 Aktivierung der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen mittels Western-Blot-Analyse und immunzytochemischer Färbung analoge Ergebnisse zu der durchflusszytometrischen Analyse lieferte, wurde für die WEHI-R Zellen über die immunzytochemische Erhebung ein divergentes Expressionsmuster der Caspase-3 Aktivierung evaluiert, das für die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen und die warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen eine gleichstarke Ausprägung der Generierung Caspase-3 aktivierter Zellen suggerierte. Da die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen infolge der Kälteapplikation nach einer Stunde Wiedererwärmung einem drastischen Zell-'detachment' (ca. 30%) unterlagen und sich in der Regel die apoptotische Zellpopulation von der Gefäßoberfläche ablöste, ging ein Anteil Caspase-3 aktivierter Zellen nicht in die immunzytochemische Beurteilung der ausschließlich adhärennten Zellen ein und verfälschte das Ergebnis zugunsten vitaler nicht Caspase-3-aktivierter Zellen. Nachdem das Ausmaß der morphologischen Apoptose-Merkmale unter Kälteapplikation die Caspase-3 Aktivierung bei weitem übertraf, kann der kälteinduzierte Zelltod der WEHI-R Zellen nicht alleine auf eine Caspase-3-abhängige Exekution zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu war die Caspase-3 Aktivierung der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen gegenüber der Induktion der morphologischen Apoptosemerkmale wesentlich stärker ausgeprägt und steht mit der Beobachtung in Einklang, dass die Aktivierung der Caspase-3 der Manifestation der morphologischen Degradierungsprozesse vorausgeht.

Die Expression der Initiator-Caspase-8 ergab für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen sowohl eine TNF- α -induzierte als auch eine kälteinduzierte Steigerung, wobei sich beide Effekte additiv überlagerten. Die Expression aktivierter Caspase-9 Spaltprodukte zeigte ebenfalls sowohl eine TNF- α -induzierte, als auch eine kälteinduzierte gesteigerte Caspase-9 Aktivierung, die unter dem alleinigen Einfluss der Kälte sogar am stärksten ausgeprägt war. Eine Induktion der PARP-1-Spaltung war bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen nur in den beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen zu verzeichnen. Die PARP-1-Spaltung der WEHI-R Zellen war jedoch im Vergleich zur induzierten PARP-1-Spaltung der WEHI-S Zellen sehr gering ausgeprägt und stand in keiner Relation zu der stark induzierten Aktivierung der Caspase-3.

Das Reparaturenzym Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 ist neben p53 an der Induktion der Zellzyklusarretierung und erforderlicher Reparaturmechanismen beteiligt. Unter Zellstress bzw. bei DNA-Schaden wird PARP-1 schnell hochreguliert und katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Poly(ADP-ribose) Polymeren, um DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose einzuleiten (D'AMOURS

et al., 1999). Die Poly(ADP-ribose) Polymere binden an verschiedene Kernproteine, wie beispielsweise Histone und Reparaturenzyme und schaffen dadurch elektrostatische Bedingungen, die den Zugang der Reparaturenzyme zu DNA-Strangbrüchen erleichtern (WIELER et al., 2003). Obwohl PARP-1 ursprünglich in DNA-Reparaturmechanismen involviert ist, kann eine extensive PARP-1 Aktivierung, infolge des resultierenden großen Energieverlustes und der Freisetzung von 'apoptosis-inducing factor', auch zum nekrotischen oder apoptotischen Zelltod führen (HA und SNYDER, 1999; YU et al., 2002). DNA-Schaden, PARP-1 Aktivierung und erniedrigte ATP-Konzentration bzw. Energie-Depletion bilden zusammen einen gemeinsamen Weg der Zellschädigung (HA und SNYDER, 2000).

Die geringfügige PARP-1-Spaltung der WEHI-R Zellen steht in keiner Relation zum Ausmaß der evaluierten Caspase-3 Aktivierung. PARP-1 'Cleavage' durch Caspase-3 und andere Enzyme während der Apoptose verhindert, neben der Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen, die PARP-1 Aktivierung und den resultierenden ATP-Verlust (OLIVER et al., 1998). Nach HERCEG und WANG (1999) führt eine Verhinderung der PARP-1-Spaltung während der Apoptose, sofort nach Beginn der DNA-Fragmentierung zur drastischen Aktivierung des Enzyms und damit zum zellulären Energie-Defizit, was die Ausführung der Apoptose unmöglich machen und die Zelle in den nekrotischen Tod treiben sollte. In den eigenen Untersuchungen der WEHI-R Zellen konnten jedoch keine Anzeichen für nekrotischen Zelltod evaluiert werden, lediglich nach 24h wurden in den beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen 5 bis 6% primäre Nekrosen detektiert. Dagegen ist durch die geringe bzw. ausbleibende PARP-1 Spaltung der WEHI-R Zellen ein resultierendes Energiedefizit dieser Zellen indiziert. Unter Einbeziehung der Beobachtungen von ROKHLIN et al. (2000), die zeigten, dass eine gesteigerte Resistenz gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose neben einer Inaktivierung von p53 mit einer verzögerten PARP-1 Spaltung assoziiert war, wäre denkbar, dass die PARP-1 Spaltung bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen zeitverzögert erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet.

Aufgrund der Indizien kann bei den kälteapplizierten WEHI-R Zellen zu dem kälteinduzierten ATP-Mangel infolge des reduzierten Metabolismus und dem Verlust von Energieäquivalenten durch die drastische, wahrscheinlich intrinsisch ATP-abhängig-vermittelte Caspase-3 Aktivierung, auf eine weitere Reduzierung zur Verfügung stehender Energieäquivalente durch die inhibierte PARP-1 Spaltung geschlossen werden. Auch die Beeinträchtigung des im Nukleus befindlichen ATP-abhängigen GSH Sequestrationssystems, das den Redoxstatus von SH-Proteinen und die strukturelle Organisation des Chromatins moduliert (VAIRETTI et al., 2001), könnte infolge des ATP-Mangels die kälteinduzierte Degradierung von Enzymen und Proteinen sowie eine Amplifizierung des DNA-Schadens unterstützt haben. Aufgrund der ausbleibenden PARP-1 Spaltung müsste auch für die warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen über die PARP-1 Aktivierung ein ATP-Defizit resultiert haben. Da jedoch das Ausmaß des DNA-Schadens nach der morphologischen Erhebung wesentlich geringer war, ist denkbar, dass infolge dessen auch weniger PARP-1-Enzym aktiviert wurde. Aufgrund der ausbleibenden Spaltung kann PARP-1 die Reparatur der geschädigten DNA aufgenommen und einen protek-

tiven Effekt ausgeübt haben. Diese Hypothese steht im Einklang mit dem zeitlichen Verlauf der Entwicklung der morphologischen Apoptose-Merkmale.

Der Befund, dass die membranständigen TNF-Rezeptoren unter warmer Inkubation und TNF- α -Stimulierung bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen nicht bzw. kaum stimulierbar waren, indiziert erneut divergente Regulationsmechanismen im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen. Weder die Expression des TNF-R1 Rezeptors, noch die Expressionsstärke des TNF-R2 Rezeptors sprechen bei den WEHI-R Zellen für eine TNF-R1-Vermittlung bzw. für eine Verstärkung einer TNF-R1-vermittelten Apoptose durch die TNF-R2-abhängige Induktion von endogenem TNF- α . Für die beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen könnte der apoptotische 'Pathway' primär über einen kälteinduzierten ROS-abhängigen Mechanismus unter Mitochondrien-Beteiligung prozessiert sein. Die Aktivierung des intrinsischen 'Pathways' kann durch die Generierung von oxidativem Stress (RAUEN et al., 1999; 2000; VAIRETTI et al., 2001), der primär über die Kälte selbst oder TNF- α -vermittelt sein kann, erfolgen. Aufgrund der geringen Expression und Stimulierbarkeit der TNF-Rezeptoren der WEHI-R Zellen kann das Ausmaß der Expression bzw. Aktivierung der Caspasen nicht primär mit dem extrinsischen rezeptorvermittelten 'Pathway' in Verbindung gebracht werden. Insbesondere die Expressionsstärke der Caspase-8 steht in keinem Verhältnis zur evaluierten Rezeptorexpression. Bemerkenswert erscheint vor allem die starke Caspase-8 Expression unter TNF- α -Stimulierung und Kälteapplikation. Der Caspase-8 Promotor ist noch nicht identifiziert, gezeigt wurde aber schon, dass die Transkriptionsregulierung der Caspase-8 Expression unter IFN γ -Stimulierung in den Stat1('Signal transducers and activators of transcription')-'Pathway' involviert ist (GRENET et al., 1999; FULDA und DEBATIN, 2002). Eine Aktivierung der Caspase-8 in den eigenen Versuchen kann infolge ihres hohen Expressionslevels über Autoaktivierung erfolgt sein (MONROE et al., 2002). Des Weiteren ist auch eine Aktivierung über die stark induzierten Caspase-3 Spaltprodukte plausibel (ENGELS et al., 2000; TANG et al., 2000; WIEDER et al., 2001).

Ein Indiz für eine Beteiligung des intrinsischen mitochondrienvermittelten 'Pathways' ist die Aktivierung der Caspase-9, deren Ausmaß jedoch, im Gegensatz zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, nicht in Relation zur ermittelten Caspase-8 Aktivierung stand. Besonders auffällig war die starke Expression aktiver Caspase-9 Spaltprodukte in der unstimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe. Caspase-9 aktiviert über die Ausbildung des Apoptosoms die Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 (SLEE et al., 1999) und kann des Weiteren durch die Inaktivierung von Reparatursystemen (STROH und SCHULZE-OSTHOFF, 1998) zur Exekution des apoptotischen Zelltodes führen. Die Kombination von hohen Konzentrationen an Ca²⁺, oxidativem Stress, NO und anderer Faktoren wie z. B. ATP-Depletion führen über die Aktivierung der PTP und Cytochrom c 'Release' zum apoptotischen Zelltod (LEMASTERS et al., 1998; HALESTRAP, 1999; KROEMER, 1999). Da die Caspase-9 Aktivierung über Caspase-8 Vermittlung einen ATP-abhängigen Vorgang darstellt, bei dem Cytochrom c in Gegenwart von ATP Konformationsänderungen im Adaptermolekül Apaf-1 induziert, die die Aktivierung der Caspase-9 auslösen, kann die Hypothese eines Defizits an Energieäquivalenten,

der sich schon allein durch die Inhibierung der PARP-1 Spaltung manifestierte, für die TNF- α -resistente WEHI-R Zelllinie weiter aufrechterhalten werden. Nachdem die Caspase-3 Aktivierung der WEHI-R Zellen über den rezeptorvermittelten 'Pathway' weitgehend ausgeschlossen werden konnte, ist eine vorrangige Beteiligung des mitochondrialen 'Pathways' indiziert.

Die Aktivierung der Caspase-3 unter hypothermem Einfluss kann jedoch nicht ausschließlich über die mitochondriale Vermittlung erfolgt sein und es stellte sich die Frage, welche zusätzlichen Effektoren die Aktivierung bewirkten. Da schon die morphologische Beurteilung der beiden kälteapplizierten WEHI-R Versuchsgruppen auf eine rein kälteinduzierte Ausprägung der apoptotischen Merkmale hinwies, muss von einer zusätzlichen Aktivierung der Caspase-3 über kältevermittelte Mechanismen ausgegangen werden. Es wurde schon gezeigt, dass Hypothermie die Generierung von oxidativem Stress auslöst (RAUEN et al., 1999; 2000; VAIRETTI et al., 2001) und dass die Aktivierung der Caspase-3 selbst durch niedrige Level von ROS induziert sein kann (BONFOCO et al., 1995). Des weiteren könnte auch die indizierte ATP-Depletion eine Rolle spielen, die in Kombination mit anderen Stress-Stimuli über die Aktivierung der PTP eine Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung der Caspase-3 bewirken kann (LEMASTERS et al., 1998; HALESTRAP, 1999; KROEMER, 1999). Daneben könnte auch der intrazellulären Protonenkonzentration bei der Aktivierung der Caspase-3 eine Bedeutung zukommen, da eine zytosolische Ansäuerung die Cytochrom c Freisetzung initiieren kann und der zytosolische pH-Wert an der Regulierung der Caspasen-Aktivierung beteiligt ist (MAT-SUYAMA et al., 2000).

Alle bei der Untersuchung der WEHI-R Zellen erzielten Befunde sprechen dafür, dass sowohl der TNF- α -vermittelten als auch der kälteinduzierten Apoptose, im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, eine Prozessierung über unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegt, die auf eine nicht rezeptorvermittelte Wirkungsweise von TNF- α hindeuten.

Der TNF- α -induzierte 'Pathway' über den TNF-R1 Rezeptor ist hinreichend bekannt, die 'downstream events' hingegen zwischen initialer Rezeptor-Bindung und finalen apoptotischen Prozessen sind nicht genau geklärt. Neben dem ROS-vermittelten mitochondrialen 'Pathway' kann auch der lysosomale 'Pathway' an der TNF- α -induzierten Apoptose beteiligt sein. So sprechen viele Indizien dafür, dass der Sphingomyelin 'Pathway' und die Produktion von Ceramiden bei den Ereignissen 'downstream' des TNF-Rezeptors involviert sind (GULBINS und GRASSME, 2002). Ceramide, die eine wichtige Rolle innerhalb der Signaltransduktionswege spielen, werden hauptsächlich über Hydrolyse von Sphingomyelin (SM) durch Sphingomyelinasen generiert. Es existieren zwei Klassen von Sphingomyelinasen, die sauren (A-SMase) und die neutralen Sphingomyelinasen (N-SMase), die über die Spaltung von Sphingolipiden zur Bildung von Ceramiden führen. Die Ceramide werden im Anschluss durch Ceramidasen zu Sphingosinen metabolisiert, die die Permeabilisierung von Lysosomen bewirken können (OHANIAN und OHANIAN, 2001). Verschiedene Rezeptormoleküle, darunter auch der TNF-R1 Rezeptor, sind in der Lage, A-SMase zu aktivieren. A-SMase und Ceramide vermitteln ihre biologischen Effekte durch die Aktivierung von verschiedenen Signalmolekülen, wie z. B. Ca-

thepsin D, Phospholipase A2 oder dem Kinase-Suppressor von Ras (GULBINS und GRASSME, 2002). Einige Autoren beschreiben eine schnelle und vorübergehende Ceramid-Response innerhalb weniger Minuten nach Apoptose-Induktion, in die die A-SMase involviert ist (GULBINS et al., 1995), während andere Autoren von einer späten längeranhaltenden Antwort berichten, die auf eine neutrale, Magnesium-abhängige SMase zurückzuführen ist (TEPPER et al., 1997). Für die Regulation der Ceramid-Bildung wurde die Vermittlung von ROS und p53 vorgeschlagen. So zeigten DBAIBO et al. (1998), dass p53 in der Lage ist, die Ceramid-Akkumulation in apoptotischen 'Pathways', die durch genotoxischen Stress induziert wurde, zu regulieren. SAWADA et al. (2004) hingegen fanden, dass TNF- α (in p53 Wild-Typ Gliomazellen) die Bildung von Ceramiden, unabhängig vom p53-Status, über die Aktivierung von neutralen und sauren Sphingomyelinasen, induziert. Die Ceramidbildung war begleitet von einer Produktion des Superoxid-Anions, induzierter mitochondrialer Depolarisierung und Cytochrom c Freisetzung. p53-defiziente Zellen waren teilweise TNF- α -resistent und wiesen keine Generierung des Superoxid-Anions und keine Aktivierung der neutralen SMase auf. Caspase-8 wurde in beiden Systemen unabhängig vom p53-Status prozessiert. Die Autoren zeigten somit zwei unterschiedliche Signal-Kaskaden auf, eine p53-vermittelte ROS-abhängige und eine ROS-unabhängige, die beide durch die Aktivierung von Caspase-8 initiiert wurden und eine Beteiligung der Ceramid-Bildung in TNF- α -induzierter Apoptose aufwiesen. Auch SAWADA et al. (2002) beschrieben eine Apoptose-induzierte Ceramidproduktion als Funktion einer Caspase-8-abhängigen Aktivierung der A-SMase. Überdies wird der Caspase-8 auch eine Rolle in der Destabilisierung des lysosomalen Kompartiments zugewiesen (GUICCIARDI et al., 2000).

Neben den Caspasen und Ceramiden sind auch saure Nicht-Caspase-Proteasen, die Cathepsine, als Mediatoren von apoptotischen Prozessen identifiziert und TNF- α -induzierte Apoptose wird mit diesen Mediatoren aus sauren Vesikeln in Verbindung gebracht (DEISS et al., 1996; GUICCIARDI et al., 2000; FOGHSGAARD et al., 2001; 2002; WERNEBURG et al., 2002; JOHANSSON et al., 2003; HEINRICH et al., 2004, WERNEBURG et al., 2004). Cathepsine werden als Proenzyme synthetisiert und in die Lysosomen transportiert, wo sie nach Induktion durch lysosomale Proteasen oder durch Autoaktivierung prozessiert und aktiviert werden. Wahrscheinlich existieren für die Lysosomen ähnliche Poren-Öffnungsmechanismen wie für die Mitochondrien, die eine selektive oder semiselektive Freisetzung während der Apoptose gewährleisten (VANCOMPERNOLLE et al., 1998; GUICCIARDI et al., 2000). Aber auch eine Sphingosin-vermittelte lysosomale Permeabilisierung während TNF- α -induzierter Apoptose ist beschrieben worden (WERNEBURG et al., 2002).

Abgesehen vom rezeptorvermittelten TNF- α -'Pathway' existieren also alternative 'Pathways' der TNF- α -induzierten Apoptose, die an das Vorhandensein saurer zytoplasmatischer Vesikel gebunden sind. Das Apoptose-induzierende TNF- α -'Signaling' steht dabei mit der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase in Verbindung. TNF- α kann über Aktivierung saurer Sphingomyelinase die Freisetzung von 'lipid second messengers', den Ceramiden, bewirken, die direkt oder über die Vermittlung von Cathepsin D apoptotische Prozesse auszulösen vermögen. Cathepsin D kann dabei über Bid die

Beteiligung des intrinsischen mitochondrienvermittelten 'Pathways' initiieren (GUICCIARDI et al., 2000; JOHANSSON et al., 2003). HEINRICH et al. (2004) zeigten, dass TNF- α -induzierte Cathepsin D Aktivierung von einer funktionalen sauren Sphingomyelinase (A-SMase) Expression abhängig ist und dass die endolysosomale Aspartat-Protease Cathepsin D ein Target für pro-apoptotische Lipid-Ceramide darstellt. Daneben identifizierte diese Arbeitsgruppe Bid als 'downstream' Target von Cathepsin D und zeigte, dass Caspase-9 und Caspase-3 Aktivierung von der A-SMase und Cathepsin D Expression abhängig ist.

Nachdem für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen in den eigenen Versuchen nicht von einer rezeptorvermittelten Apoptose ausgegangen werden konnte, kann unter Einbeziehung der genannten Erkenntnisse und der selbst ermittelten Expression und Aktivierung der Caspasen, neben einer Vermittlung von ROS, auf eine Mitbeteiligung des A-SMase/Ceramid- und/oder Cathepsin-'Pathways' am apoptotischen Prozess geschlossen werden. Nach WERNEBURG et al. (2004) ist die Permeabilisierung von Lysosomen und die Freisetzung der lysosomalen Protease Cathepsin B in den TNF- α -Signal-'Pathway' involviert und Caspase-8/Bid-abhängig, und eine Sphingosin/Cathepsin B Interaktion ist verantwortlich für die Induktion der lysosomalen Destabilisierung (WERNEBURG et al., 2002). Die starke Expression der Caspase-8 in den eigenen Versuchen kann über die direkte Freisetzung von sauren Cathepsinen ins Zytosol zu einer Bid-vermittelten mitochondrialen Cytochrom c Freisetzung geführt haben, die über die Generierung des Apoptosoms eine Aktivierung der Caspase-9 und nachfolgend der Caspase-3 bewirkt hat. Selbst in WEHI-S Zellen wurde schon eine TNF- α -vermittelte Cathepsin B Beteiligung am apoptotischen Zelltod gezeigt (FOGHSGAARD et al., 2001), so dass sogar für die Apoptose der WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen auf eine Mitbeteiligung dieses Mechanismus geschlossen werden kann. Für den Fas-induzierten Apoptose-'Pathway', der abgesehen von der initialen Aktivierung dem TNF- α -induzierten 'Pathway' entspricht, ist bekannt, dass über Caspase-8 Expression und Aktivierung eine direkte oder indirekte Stimulierung der A-SMase erfolgen kann, die über Freisetzung von Ceramiden eine Aktivierung der Caspase-3 bewirkt und keine Beteiligung von p53 oder ROS benötigt. p53-abhängige Apoptose induzierte eine Ceramid-Generierung über die Aktivierung von neutraler SMase (SAWADA et al., 2002).

Die TNF- α -Resistenz der WEHI-R Zellen, die durch TNF- α -Selektionsdruck generiert wurde, ist wahrscheinlich durch Mutation entstanden, die in den Ablauf und die Ausprägung apoptotischer 'Pathways' oder Überlebensmechanismen involviert ist und den Zellen unter TNF- α -Stimulierung einen Überlebensvorteil verleiht. Die bei den WEHI-R Zellen stattgefundenene Mutation muss die Regulierung der TNF-Rezeptoren betreffen, da weder TNF-R1 noch TNF-R2 unter TNF- α -Stimulierung exprimiert wurden. Daher kommt für die Induktion von Apoptose unter warmen Bedingungen vor allem ein ROS-vermittelter mitochondrialer Mechanismus und die Aktivierung des lysosomalen 'Pathways' in Betracht. Die hohe Caspase-8 Expression kann zum einen direkt auf das lysosomale Kompartiment eingewirkt haben und eine Destabilisierung bzw. Permeabilisierung der Membran mit nachfolgender Cathepsin-Freisetzung ausgelöst haben. Daneben kann die Caspase-8 über die Aktivierung von

Sphingomyelinasen die Generierung von Ceramiden bewirkt haben, die zum einen selbst oder über die Einwirkung auf Cathepsine apoptotische Prozesse auslösen können. Dabei können die Cathepsine über die Vermittlung von Bid den mitochondrialen 'Pathway' aktivieren und über die Freisetzung von Cytochrom c die Aktivierung von Caspase-9 induziert haben. Die ermittelte Caspase-3 Aktivierung kann dann nachfolgend, also 'downstream' der Mitochondrien und auch durch direkten Cathepsin-Einfluss über die Aktivierung von Caspase-8 stattgefunden haben.

Unter Kälteeinwirkung mit TNF- α -Stimulierung zeigten die WEHI-R Zellen prinzipiell das gleiche Caspasen-Expressions- und Aktivierungsmuster wie die warminkubierte stimulierte Versuchsgruppe, allerdings in verstärkter Ausprägung. Unter der Annahme, dass bei den WEHI-R Zellen vorrangig der lysosomale Apoptose-'Pathway' eingeschlagen wurde, könnte das stärkere Ausmaß der Caspasen-Aktivierung in den kältebehandelten Gruppen zudem auf einer physikalischen Kälteeinwirkung beruhen. Da eine Zelle zu einem Großteil aus Wasser besteht und Wasser bei 4°C seine geringste Ausdehnung besitzt, ist es denkbar, dass die Volumenkompression zu einer Destabilisierung der Lysosomenmembran geführt und eine verstärkte Freisetzung lysosomaler Inhaltsstoffe bewirkt haben kann. Das Caspasenaktivierungsmuster der unstimulierten kältebehandelten WEHI-R Zellen unterschied sich vom TNF- α -stimulierten Parallelansatz durch eine geringere Ausprägung der Caspase-8 Expression, die somit auf den Einfluss von TNF- α zurückgeführt werden kann. Daneben war in der unstimulierten kälteapplizierten Versuchsgruppe eine höhere Caspase-9 Aktivierung zu verzeichnen, was auf eine vermehrte Mitwirkung von ROS hindeutet.

Das Tumor-Suppressor-Protein p53:

Die Ermittlung der Expression des Tumor-Suppressor-Proteins p53 ergab für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen lediglich eine geringe TNF- α -unabhängige Induktion unter Kälteeinwirkung. Die Expression des Tumor-Suppressor-Proteins war unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation gegenüber den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen um ca. einen Faktor 2 reduziert und unterschied sich nicht von der Expression des unstimulierten Korrespondenten. Dieser Befund könnte, in Kombination mit der nicht induzierten PARP-1 Spaltung, mit der TNF- α -Resistenz der WEHI-R Zellen in Zusammenhang stehen. ROKHLIN et al. (2000) fanden, dass eine gesteigerte Resistenz für TNF- α -induzierte Apoptose mit einer Inaktivierung von p53 und einer verzögerten PARP-1 Spaltung assoziiert sind. Da nach CHEN et al. (1996) die zelluläre Antwort vom p53 Protein-'Level' abhängt und nur höhere p53 Konzentrationen über posttranslationelle Mechanismen Apoptose bewirken können, kann für die WEHI-R Zellen nur eingeschränkt auf eine Mitbeteiligung eines p53-abhängigen Apoptose-'Pathways' geschlossen werden. Eine Diskrepanz ergibt sich aber durch die Tatsache, dass die über Evaluierung der Sub-2n-Population und morphologische Begutachtung ermittelte nukleäre Schädigung in keiner Relation zu der geringen p53-Induktion steht. Neben einer geringen Induktion kann das ermittelte p53 Protein-'Level' auch auf einer verstärkten Degradierung über proteolytischen Abbau durch die aktivierte Caspase-3 beruhen. Nach WANG und FRIEDMAN (2000) kann eine Aktivierung der

Stress-aktivierten Protein-Kinase 'c-jun N-terminal Kinase 1' (JNK1) zur 'downregulation' des Tumor-Suppressor-Proteins p53 führen. JNK1 bindet an p53 und die Menge an JNK1-gebundenem p53 reflektiert genau die Menge des gesamten zellulären p53-Proteins. Nach Aktivierung phosphoryliert JNK1 sein gebundenes p53 und konvertiert p53 in ein apoptotisches Target für aktivierte Caspase-3. Die erhöhte Caspase-3 Aktivierung der WEHI-R Zellen in den eigenen Versuchen, könnte daher, wie auch schon für die TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen ohne Kälteapplikation angenommen, auf einen proteolytischen Abbau von p53 hinweisen. Einen inhibierenden Effekt der Hypothermie auf die p53-Induktion unter TNF- α -Stimulierung konnte für die WEHI-R, im Gegensatz zu den WEHI-S Zellen, nicht festgestellt werden. Unabhängig von der TNF- α -Stimulierung wurde p53 infolge der Kälteapplikation geringfügig induziert.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B:

Die über Western-Blot-Analyse ermittelte NF κ B Expression, durch die lediglich eine Aussage über die Quantität der zyto- bzw. karyoplasmatisch aktivierten p65 Untereinheit getroffen werden kann, die aber dennoch auf eine potentielle Transaktivierung der NF κ B-Target-Gene schließen lässt, ergab für die WEHI-R Zellen eine ausschließliche, wenn auch geringe Induktion unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation. Im Hinblick auf die Expression der TNF-Rezeptoren, kann die NF κ B-Aktivierung nicht auf eine Rezeptor-Vermittlung zurückgeführt werden. Die Aktivierung könnte hingegen auf einer ROS-Vermittlung beruhen, da schon neben der Aktivierung über TNF- α -induziertes 'Signaling' eine ROS-induzierte NF κ B-Aktivierung nachgewiesen wurde (SCHRECK und BAEUERLE, 1991; SCHRECK et al., 1991).

Da die TNF- α -stimulierten warminkubierten WEHI-R Zellen gegenüber den kälteapplizierten Zellen durch eine geringere Induktion der morphologischen Apoptose-Merkmale sowie auch eine geringere Expression bzw. Aktivierung aller untersuchten Caspasen charakterisiert waren, kann auf eine transkriptionelle Aktivierung anti-apoptotischer NF κ B-Target-Gene unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation geschlossen werden, die sich vor allem im zeitlichen Verlauf protektiv auf die Entwicklung der morphologischen Apoptose-Merkmale ausgewirkt hat. Auch der lysosomale 'Pathway', der für den apoptotischen Zelltod der WEHI-R Zellen mit in Betracht gezogen wurde, kann durch die Aktivierung von NF κ B inhibiert werden. Über die Expression des Cathespin B-Inhibitors Spi2A ('serine protease inhibitor 2A') blockiert NF κ B den TNF- α -induzierten lysosomalen 'Pathway' (LIU et al., 2003).

Genetische Kontrolle von Caspase-3 und p53:

Zur Klärung, ob die Apoptose-involvierten Proteine Caspase-3 und p53 unter den gewählten Versuchsbedingungen, transkriptionell oder transkriptionsunabhängig reguliert sind und welchen Einfluss die Kälteapplikation auf die Gen-Regulation hat, wurde die mRNA Expression der beiden Apoptoseparameter mithilfe der semiquantitativen RT-PCR überprüft.

Die Caspase-3 mRNA Expression unterschied sich in allen Versuchsgruppen der WEHI-R Zellen im gewählten Zeitfenster nur geringfügig und nicht statistisch signifikant. Es deutete sich lediglich die Tendenz einer geringen mRNA Induktion, sowohl unter TNF- α -Stimulierung als auch infolge der Kälteapplikation, an. Wie für die WEHI-S Zellen kann auch für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen unter TNF- α -Stimulierung und Kälteeinfluss primär auf eine posttranskriptionelle Regulierung der Caspase-3 Aktivität auf Proteinebene geschlossen werden. Im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wiesen die WEHI-R Zellen eine höhere mRNA Basisexpression auf, die sich auch auf Proteinebene über Western-Blotting, Durchflusszytometrie und immunzytochemischer Färbung durch eine stärker induzierte Caspase-3 Aktivierung der unstimulierten Kontrolle evaluieren ließ. Wie bei den WEHI-S Zellen übertraf auch bei den WEHI-R Zellen das Ausmaß der exprimierten p53 mRNA Level die Caspase-3 mRNA Expression. Sowohl die TNF- α -Stimulierung als auch der Kälteeinfluss induzierten die Expression der p53 mRNA, die unter der TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation am stärksten ausgeprägt war. Die Induktion der p53-Genexpression steht nicht mit der ermittelten geringen p53-Proteinexpression in Relation. Eine Erklärung kann die schon beschriebene JNK1-vermittelten Phosphorylierung und Konvertierung von p53 in ein direktes Target-Protein für aktivierte Caspase-3 (WANG und FRIEDMAN, 2000) liefern. Die Autoren zeigten, dass das proteolytische p53-’Breakdown’ mit der Caspase-3 Aktivität korrelierte und durch einen Caspase-3-Inhibitor dosisabhängig zu hemmen war. So ist für die eigenen Versuche denkbar, dass die ermittelte starke Aktivierung der Caspase-3 einer frühen p53-Protein-Akkumulierung durch proteolytischen Abbau entgegenwirkte. Für die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen kann, aufgrund der ermittelten mRNA Level, sowohl auf eine TNF- α -induzierte als auch eine Kälte-induzierte p53-Gen-Expression geschlossen werden. Für die WEHI-S Zellen hingegen konnte nur eine nicht signifikante tendenzielle p53-Gen-Expression unter TNF- α -Stimulierung evaluiert werden. Eine Erklärung könnte das höhere konstitutive p53 mRNA Basisexpressionslevel der WEHI-S Zellen bieten.

6.2.2 Auswirkung von Kälte auf die Induktion von Zellstress

6.2.2.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen

Oxidativer Stress (ROS-Produktion)

Um die direkte Einwirkung der Hypothermie und die Auswirkung der nachfolgenden Wiedererwärmung zu evaluieren, wurden die Untersuchungen zur Ermittlung verschiedener Stressparameter in der Regel nach vier- und fünfstündiger Inkubation durchgeführt. Die Überprüfung von ROS-vermitteltem Stress wurde durchflusszytometrisch mithilfe des Fluoreszenzindikators DCFH-DA (Dichlorofluoreszein-Diazetat) realisiert, der die Bildung intrazellulärer ROS indiziert, indem das durch endogene Esterasen reduzierte nicht fluoreszierende Dichlorofluoreszin (DCFH) in Anwesenheit von ROS schnell zu grünfluoreszierendem Dichlorofluoreszein (DCF) oxidiert wird.

Die TNF- α -Stimulierung induzierte bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen nach vier Stunden eine mäßige ROS-Generierung; die Kälteapplikation verstärkte die ROS-Bildung unter TNF- α -Stimulierung sehr geringfügig und bewirkte in der unstimulierten Versuchsgruppe sogar die stärkste Induktion reaktiver Sauerstoffspezies. Die Relativierung der induzierten ROS-Bildung in den kälteapplizierten Versuchsgruppen nach einer Stunde Wiedererwärmung indiziert eine Hypothermie-abhängige Induktion von oxidativem Stress, die sich unter physiologischer Temperierung in Richtung des Kontrollniveaus adaptiert. Die ROS-Generierung unter TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen hielt sich auch nach der fünften Inkubationsstunde auf gleichem Level und ist auf die Einwirkung des Zytokins zurückzuführen.

Eine vermehrte ROS-Produktion nach Stress-Stimulierung ist an der Induktion und Verstärkung von apoptotischen Prozessen beteiligt. TNF- α kann die Generierung von intrazellulären freien Radikalen auslösen, die eine wichtige Rolle in der TNF- α -induzierten Signal-Transduktion und NF κ B-Aktivierung spielen (YAMAUCHI et al., 1989; SCHRECK et al., 1991). Das Mitochondrium scheint die Hauptquelle von TNF- α -induzierten ROS zu sein und unterliegt kritischen Veränderungen, die eine degradative Phase auslösen. Diese Veränderungen beinhalten den Kollaps des inneren Transmembranpotentials, die Störung bzw. Unterbrechung des Elektronentransports und der ATP-Produktion, zusätzliche ROS-Generierung, Öffnung der Permeabilitäts-Transition-Poren (PTP) sowie mitochondriales Anschwellen mit Ruptur der äußeren Membran und induzieren die Freisetzung von Caspasen-Aktivatoren ins Zytosol (GREEN und REED, 1998; REED, 1997a). Das Öffnen der mitochondrialen PTP kann beispielsweise über die porenformende Eigenschaften von bax erfolgen, kann aber auch durch hypotherme Einwirkung ausgelöst werden und führt zur nicht-spezifischen Passage von Ionen und kleineren Molekülen sowie zur Äquilibration der Ionen zwischen der Mitochondrien-Matrix und Intermembran. Dies resultiert in der Zerstörung des elektrochemischen Gradienten und in der Abkoppelung der respiratorischen Atmungskette und bewirkt die reduzierte ATP-Generierung und den Produktionsanstieg an freien Radikalen (SALAHUDEEN et al., 2003). Die Tatsache, dass die Blockierung der TNF- α -induzierten ROS-Produktion die TNF- α -vermittelte Zytotoxizität inhibiert und die TNF- α -vermittelte NF κ B-Aktivierung reduziert, lässt die Hypothese zu, dass freie Radikale als Mediatoren des apoptotischen Prozesses agieren und nicht nur Nebenprodukt sind (ZIMMERMAN et al., 1989; GOOSSENS et al., 1995; SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992).

ROS sind hoch toxisch und attackieren zelluläre Membrane sowie chromosomale DNA. Die Sauerstoffradikale reagieren dabei mit Strukturen des Chromatins, zum einen mit DNA direkt, was zur Oxidation der Nukleinbasen und zu DNA-Strangbrüchen führt, zum anderen mit den, die DNA zu Nukleosomen organisierenden Histonen, die die DNA vor oxidativen Schäden schützen (FREEMAN und CRAPO, 1982; KROEMER et al., 1995). Über die Neutralisierung von ROS in der reduzierenden Umgebung der Mitochondrien fungiert Glutathion (GSH) als Haupt-ROS-Puffersystem der Zelle (ZIMMERMAN et al., 1989; GOOSSENS et al., 1995). Die Mangan-Superoxid-Oxidase (MnSOD), ein mitochondriales Matrixprotein, ist unter TNF- α -Stimulierung in vielen Zelltypen hochreguliert

und weist den Superoxid-Anionen, die lokal im Mitochondrium gebildet werden, im TNF- α -induzierten Apoptose-’Pathway’ eine Rolle zu (JONES et al., 1997). Neben ROS können auch andere Effektoren, wie z. B. Ca^{2+} , bax oder Ceramide, Veränderungen der mitochondrialen Integrität initiieren, die zu Cytochrom c Freisetzung und Caspase-9 Aktivierung führen (HIGUCHI et al., 1997; HIGUCHI et al., 1998; STRIDH et al., 1998).

Die starke Apoptose-Induktion der WEHI-S Zellen nach TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation in den eigenen Versuchen konnte in erster Linie auf die Beteiligung des TNF-R1-rezeptorvermittelten ’Pathways’ und der Amplifikationschleife über Ausbildung des Apoptosoms zurückgeführt werden. Daneben ist eine Verstärkung durch endogenes TNF- α über die Vermittlung des TNF-R2 Rezeptors indiziert. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Mitbeteiligung von oxidativem Stress weisen zudem auf eine TNF- α -induzierte mitochondriale ROS-Generierung, die über die Freisetzung von Cytochrom c zu einer zusätzlichen Aktivierung der Caspase-9 und nachfolgend der Caspase-3 beigetragen haben kann. Dabei kann p53 an der Produktion der ROS beteiligt sein, da schon gezeigt wurde, dass ein direkter Import von p53 in die Mitochondrien-Matrix die Generierung von ROS auslösen kann (MARSCHENKO et al., 2000). Der unmittelbare Einfluss der Kälte verstärkte die TNF- α -induzierte ROS-Produktion geringfügig und kann mit einer kälteinduzierten Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Poren in Zusammenhang gesehen werden. Die Induktion der ROS-Generierung der kälteapplizierten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen schwächte sich während der Wiedererwärmungsphase ab und indiziert neben der TNF- α -Abhängigkeit eine Kälteabhängigkeit der ROS-Induktion, währenddessen die warminkubierten Korrespondenten das Niveau der ROS-Produktion weiter aufrecht erhielten und auf eine rein Zytokin-abhängige ROS-Generierung schließen lassen. Auch die unstimulierten WEHI-S Zellen reagierten unter der hypothermen Einwirkung mit der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies, wobei das Ausmaß der ROS-Induktion die ROS-Generierung unter TNF- α -Stimulierung übertraf und auf die kälteinduzierte Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Poren zurückgeführt wird. Da sich aufgrund der reduzierten PARP-1 Spaltung der unstimulierten kälteapplizierten WEHI-S Zellen ein resultierender ATP-Mangel indizierte, kann eine zusätzliche Beeinflussung ATP-abhängiger Mechanismen in Betracht gezogen werden. So kann neben der kälteinduzierten Öffnung der mitochondrialen PTP auch die Beeinflussung des ATP-abhängigen nukleären und mitochondrialen Glutathion-(GSH)-Sequestrationssystems, das den Redoxzustand von SH-Proteinen und die strukturelle Chromatinorganisation moduliert (VAIRETTI et al., 2001), zu der Induktion von ROS ohne TNF- α -Stimulierung unter Kälte beigetragen haben. RAUEN et al. (1999, 2000) bzw. BARTELS-STRINGER et al. (2003) konnten nachweisen, dass Antioxidantien und Eisenchelatoren die kälteinduzierte Apoptose inhibieren und dass reaktive Sauerstoffspezies Schlüsselmediatoren kälteinduzierter Apoptose darstellen. Eine weitere Ursache einer kälteinduzierten ROS-Generierung könnte auch ein Mangel an Wachstumsfaktoren darstellen, der sich aufgrund metabolischer Retardierung während der Kälteapplikation eingestellt haben kann, und der nach RAFF (1992 und 1998) zur Induktion einer ROS-Synthese und Apoptose führen kann.

Für die TNF- α -sensible WEHI-S Zelllinie wurde in den eigenen Versuchen eine TNF- α -induzierte sowie kälteinduzierte ROS-Generierung nachgewiesen, die mit zur Induktion und Verstärkung der Apoptose beigetragen hat. Die ausgeprägte ROS-Induktion unter Kälteapplikation ohne TNF- α -Stimulierung kann vor allem für die Initiierung der TNF- α -unabhängigen Apoptose mitverantwortlich sein. Da das Ausmaß der rein kälteinduzierten Apoptose der WEHI-S Zellen nicht sehr stark war, könnte sogar die starke ROS-Generierung an einer Inhibierung der Caspasen-Aktivität partizipiert haben, da schon gezeigt wurde, dass eine hohe ROS-Konzentration das Cystein im aktiven Zentrum der Caspasen zu oxidieren bzw. zu blockieren vermag (HAMPTON und ORRENIUS, 1998; UDEA et al., 1998).

Extra- und Intrazellulärer pH

Als weitere Stressparameter wurden die extra- und intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentrationen (pHe, pH_i) der verschiedenen Versuchsgruppen nach 4 und 5h potentiometrisch mithilfe eines Blutgasanalysators im Kulturüberstand bzw. durchflusszytometrisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF überprüft.

Bei der Ermittlung des pHe wurden, im Gegensatz zu allen anderen Methoden, Messungen im extrazellulären Milieu durchgeführt. Dabei konnten nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen erwartet werden, da die Mengen an Ionen aus zellulärem Geschehen, im Vergleich zum großen Volumen des Überstandes, verschwindend gering sind und demnach in entsprechend hoher Verdünnung vorliegen. Überraschend war daher die relativ große Änderung der H⁺-Ionenkonzentration in den Kulturüberständen der beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen mit einer Verschiebung um ca. 0,5 pH-Einheiten ins saure Milieu, die jedoch schon nach einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C keinen pH-Unterschied gegenüber der warminkubierten Kontrolle aufwiesen. Der pH-Abfall unter Kälteapplikation kann nicht durch die Ausschleusung saurer Metabolite verursacht sein. Durch die Temperaturniedrigung werden infolge der Herabsetzung der Enzymaktivitäten die zellulären Stoffwechselprozesse herunterreguliert und es fallen weniger saure Stoffwechselprodukte an. Zudem können unter der Kälte weniger Energieäquivalente generiert werden und es steht weniger ATP zum Metabolit-Export zur Verfügung. Die Ansäuerung des Mediums muss daher in erster Linie in rein physikalischen Ursachen begründet sein. Die Messung der Protonenkonzentration über potentiometrische Verfahren ist abhängig von der Temperatur. Ein neutraler pH ist in der Kälte größer als 7 (McCONNELL et al., 1975) und es müsste demzufolge in der Kälte ein geringfügiger temperaturabhängiger 'Shift' ins alkalische Milieu resultieren. Zur Kontrolle des ermittelten sauren pH-Wertes, wurde die Protonenkonzentration daher mit Indikatorpapier überprüft und bestätigt. Die ausgeprägte pH-Erniedrigung muss primär auf das Lösungsvolumen von CO₂ im gekühlten Kulturmedium zurückgeführt werden, da die Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeit mit sinkender Temperatur zunimmt. Das gelöste CO₂ reagiert als Säureanhydrid mit H₂O zu Kohlensäure (H₂CO₃), die im wässrigen Milieu zu Bicarbonat (HCO₃⁻) und H⁺ dissoziiert. Die zusätzlichen Protonen erhöhen die H⁺-Ionenkonzentration und verursachen eine Ansäuerung des Mediums. Auch die ermittelten CO₂-Partialdrücke der Kulturüberstände, die nach der Kälteinkubation um einen Faktor 3, gegenüber den warminkubierten Ansätzen erhöht waren, bestätigen diese These. Die Tatsache, dass

sich die Protonenkonzentration nach der Wiedererwärmungsphase bei Erreichung der Inkubationstemperatur von 37°C wieder auf den Kontroll-Level äquilibrierte, unterstützt diese Feststellung weiterhin. Somit gilt für die kälteapplizierten Ansätze das Faktum, dass die zellulären Prozesse transient durch ein extrazelluläres, physikalisch bedingtes saures Milieu beeinflusst wurden.

Die TNF- α -Stimulierung unter warmer Inkubation blieb ohne Auswirkung auf die extrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration, beeinflusste jedoch die intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration in Form einer Absenkung des pHi-Wertes. Unter physiologischen Bedingungen liegt der intrazelluläre pH nahe dem Neutralpunkt von Wasser und ist niedriger als der leicht alkalische extrazelluläre pH. Bei idealem neutralen pH werden die Metabolite, aufgrund ihrer pH-abhängigen Ionisierung, in der Zelle zurückgehalten und können nur in geringem Ausmaß über die Zellmembran entkommen; zur Eliminierung saurer Metabolite und CO₂, muss daher ein beachtlicher H⁺-Gradient, der über Protonenpumpen generiert wird, vorherrschen (HAUGE und KOFSTAD, 1995). Protonenpumpen und pH-Regulierung spielen eine wichtige Rolle in Apoptose-’Pathways’ (GOTTLIEB et al., 1996; LONG et al., 1998; KARWATOWSKA-PROKOPCZUK et al., 1998). Die Ausschleusung von Protonen aus der Zelle wird im wesentlichen durch die kombinierte Aktion dreier Ionen-spezifischer Membrantransporter, dem Na⁺/H⁺-Exchanger, dem Na⁺/HCO₃⁻-Co-Transporter und der vakuolären Protonen-ATPase, bewerkstelligt (LAZDUNSKI et al., 1985; LAGADIC-GOSSMANN et al., 1992; KARWATOWSKA-PROKOPCZUK et al., 1998). Die Aktivierung bzw. Inhibierung dieser Ionen-Pumpen regulieren die intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration. Azidose ist ein Hauptauslöser von Apoptose (GOTTLIEB et al., 1996; CZENE et al., 1997; LEMASTERS et al., 1998; THATTE et al. 2004). Die intrazelluläre Ansäuerung der TNF- α -stimulierten warminkubierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen kann auf die TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose zurückgeführt werden, die über H₂O₂-Produktion eine intrazelluläre Ansäuerung, Cytochrom c Freisetzung und Caspase-Aktivierung induzieren kann (GOTTLIEB et al., 1996; HIRPARA et al., 2001). Die H₂O₂-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung ist dabei zum Teil durch die Inhibierung des Na⁺/H⁺-Exchanger verursacht (HU et al., 1998a). Saure pH-Werte führen zu einer Inhibierung der Leitfähigkeit der PTP, die eine Depolarisation der Mitochondrienmembran bewirkt (HALESTRAP, 1999; LEMASTERS et al., 1998). Erhöhte intrazelluläre H⁺-Konzentrationen führen als Ergebnis der Aktivierung des Na⁺/H⁺-Antiporters zur Akkumulierung von Na⁺ und in der Folge durch den Austausch von Na⁺ gegen Ca²⁺ über den Na⁺/Ca²⁺ Exchanger zur Ca²⁺-Akkumulierung (HALESTRAP, 1999). Die nachfolgende Sequestration des Überschusses an Ca²⁺ durch das Mitochondrium führt zur Stimulierung der PTP der mitochondrialen Membranen, die eine Herabsetzung des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma bewirkt (HALESTRAP, 1999; LEMASTERS et al., 1998). Daneben können auch pH-abhängige Endonukleasen und durch saure Membran-Degradierung freigesetzte Sphingomyelinasen zum Azidose-induzierten Zelltod beitragen (CZENE et al., 1997). Desoxyribonuklease II (DNase II) ist eine Endonuklease, die schon bei leicht saurem pH aktiviert wird und bei Azidose-induzierter Apoptose zur DNA-Fragmentierung führt (BARRY und EASTMAN, 1993). Verstärkte Azidose kann

darüber hinaus zur Beschleunigung der Produktion von freien Radikalen über H^+ -abhängige Reaktionen führen (SIESJO et al., 1996).

Auch die kälteapplizierte TNF- α -stimulierte Versuchsgruppe zeigte direkt nach der Kälteeinwirkung einen geringfügigen Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration, nach einer Stunde Wiedererwärmung war jedoch eine deutliche Alkalisierung zu beobachten. Die kälteapplizierten unstimulierten Zellen reagierten schon direkt nach der Kälteinkubation mit einem alkalischen intrazellulären pH-Wert, der sich nach der Wiedererwärmungsphase weiter in Richtung Alkalisierung entwickelte. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die Kälteeinwirkung bei den WEHI-S Zellen eine Alkalisierung des inneren Milieus auslöst, während die TNF- α -Stimulierung zu einer leichten Ansäuerung führt, die der kälteinduzierten Alkalisierung entgegenwirkt. DING et al. (2000a) bzw. LAP-TOOK et al. (1995) zeigten, dass Hypothermie vor Azidose-induziertem Zelltod schützt, bzw. dass Hypothermie ischämischen Schaden durch Verhinderung von Azidose abzuschwächen vermag. PEREZ-SALA et al. (1995) beschrieben sogar eine Inhibierung des Apoptose-induzierten Zelltodes durch intrazelluläre Alkalisierung infolge der Inaktivierung pH-abhängiger Endonukleasen. Der protektive Einfluss der Kälte auf die WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung könnte daher auch auf eine Mitwirkung der pH-Regulierung in Richtung einer Alkalisierung des intrazellulären Milieus zurückgeführt werden, während - nach der Theorie von DING et al. (2000a) - bei den warminkubierten WEHI-S Zellen der Azidose-induzierte Schaden durch die zusätzliche Generierung reaktiver Sauerstoffspezies verstärkt sein kann. Eine spekulative Erklärung für die eingetretene Alkalisierung des intrazellulären Milieus der WEHI-S Zellen könnte die Aktivierung des Na^+/H^+ -Antiporters unter hypothermer Temperatureinwirkung darstellen.

Die Stress-induzierbaren Proteine HIF-1 α und iNOS

Als Indikatoren der zellulären Stressantwort wurde die Expression der induzierbaren Proteine HIF-1 α , iNOS, HO-1 und HSP70 durchflusszytometrisch bestimmt. Die HIF-1 α Expression der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen wies unter Kälteapplikation bei TNF- α -Stimulierung die größte Ausprägung auf. Die Induktion unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation sowie in der Kälte ohne TNF- α -Stimulierung war geringer. Die ermittelten Unterschiede, die eine Tendenz zur kälteabhängige HIF-1 α -Induktion andeuteten, waren jedoch geringfügig und im Gegensatz zu den Ergebnissen der WEHI-R Zellen statistisch nicht signifikant. Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1, ein Schlüsselregulator für die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel, kann auch durch den Einfluss von Zytokinen, Hormonen und genetischen Veränderungen moduliert werden. Obwohl das HIF-1 Protein unter hypoxischen Bedingungen durch Sauerstoff-abhängige Proteolyse seiner HIF-1 α -Untereinheit reguliert ist, die unter normoxischen Bedingungen über den Ubiquitin-Protease-’Pathway’ degradiert wird, haben verschiedene Autoren (HADDAD und LAND, 2001; STROKA et al., 2001; MATEO et al., 2003) gezeigt, dass HIF-1 α auch unter normoxischen Bedingungen exprimiert sein kann. ALBINA et al. (2001) demonstrierten, dass TNF- α die HIF-1 α Protein-Expression in frischen nicht hypoxischen

Wunden zu induzieren vermag, und dass HIF-1 α an der Regulierung von iNOS beteiligt ist. Daneben beschrieben auch HADDAD und LAND (2001) eine TNF- α -abhängige HIF-1 α -Regulierung unter Einfluss eines normoxischen, ROS-sensitiven 'Pathways'. Auch in verschiedenen kultivierten Zellen wurde schon eine HIF-1 α Aktivierung durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine, darunter TNF- α , demonstriert (HELLWIG-BÜRGELE et al., 1999; THORNTON et al., 2000). Die HIF-1 α Expression der WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen war jedoch durch die Kälteeinwirkung stärker induziert als durch die TNF- α -Stimulierung und lässt auf eine kälteabhängige Induktion, wahrscheinlich ausgelöst durch die Generierung von ROS, schließen. CHANDEL et al. (2000) sowie SANDAU et al. (2001) wiesen die Suffizienz mitochondrialer ROS-Produktion zur Initiierung einer HIF-1 α Stabilisierung, Translokation und Aktivierung nach. Während in den eigenen Versuchen die HIF-1 α Expression unter Kälteeinfluss ohne TNF- α -Stimulierung auf die ermittelte starke kälteinduzierte ROS-Generierung zurückgeführt werden kann, war die ROS-Produktion der beiden TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen geringer ausgeprägt, so dass die HIF-1 α Expression dieser beiden Versuchsgruppen auf dem zusätzlichen Support der TNF- α -Stimulierung beruhen muss.

Neben ROS können auch reaktive Stickstoffspezies (RNS) als 'Signaling messengers' in der Regulation der HIF-Gen-Transkription involviert sein (HADDAD, 2003). Schon mehrfach wurde gezeigt, dass unter normoxischen Bedingungen RNS, insbesondere Stickstoffmonoxid (NO), die Stabilität und Aktivierung von HIF-1 α , wahrscheinlich über Nitrosylierung von Thiolgruppen, regulieren können und dass die Expression der induzierbaren NO-Synthase eine HIF-1 α Akkumulation induziert, was die Rolle von NO als intrazellulärer Aktivator des Transkriptionsfaktors HIF-1 unterstreicht (SANDAU et al., 2000 und 2001; PALMER et al., 2000; SEMENZA, 2001; MATEO et al., 2003).

Die TNF- α -induzierte iNOS Expression in den eigenen Versuchen kann daher den zusätzlichen Support bei der HIF-1 α Expression der beiden TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen geleistet haben. Die TNF- α -induzierte iNOS Expression erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (HEBA et al., 2001), die für die beiden TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen der WEHI-S Zellen induziert war. Die induzierbare NO-Synthase katalysiert die Generierung von NO aus L-Arginin (FEINSTEIN et al., 1994). NO ist ein wichtiges physiologisches Messenger- und Effektor-Molekül in vielen biologischen Systemen und hat zellspezifisch sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkung. In Abhängigkeit von der lokalen Konzentration und des umgebenden Redox-Milieus kann NO Apoptose induzieren oder inhibieren (KOGLIN et al., 1999). So vermag NO beispielsweise direkten DNA-Schaden zu induzieren. Der NO-vermittelte DNA-Schaden kann die Induktion des Tumor-Suppressorgens p53 initiieren (MESSMER et al., 1994; FORRESTER et al., 1996). p53 Akkumulation in Antwort auf NO kann zu einer Störung der Zellzyklus-Progression führen und Apoptose auslösen (BRÜNE et al., 2001). Darüber hinaus kann NO mit ROS reagieren und zur Bildung von hochreaktiven Nitrit-Superoxid-Radikalen führen, die in der Lage sind, durch Nitrosylierung von Sulfhydryl-Gruppen die Proteinfunktion zu modulieren (MANNICK und SCHONHOFF, 2002). Die Kombination

von hohen Konzentrationen an NO, Ca²⁺, oxidativem Stress und anderer Faktoren wie z. B. ATP-Depletion führen über die Aktivierung der PTP und Cytochrom c 'Release' zum apoptotischen Zelltod (HALESTRAP, 1999; LEMASTERS et al., 1998; KROEMER, 1999). Durch die Blockierung TNF- α -induzierter Apoptose über die Nitrosylierung des katalytischen Zentrums der Caspase-3 (MANNICK et al., 1999) hat NO auch einen protektiven Effekt. Zudem kann die NO-Generierung die Expression von protektiven Proteinen wie HSP70 und HO-1 induzieren (BRÜNE et al., 1998). So wiesen beispielsweise AMON et al. (2003) Metaboliten des NOS- und HO-'Pathways' die Vermittlung des 'cooling'-assoziierten Schutzes gegen TNF- α -induzierten Zelltod in entzündeten Geweben zu.

NO-induzierter Stress kann die p53 Expression induzieren und indirekt die Aktivität bzw. Stabilität von HIF-1 und p53 oder seines Inhibitors NF κ B modulieren (KRONCKE, 2003). Unter physiologischen Bedingungen inhibiert NO die Cytochrom c Oxidase und kann so über die Hemmung der mitochondrialen Respiration die HIF-1 Aktivität beeinflussen (MURPHY, 2003). Der Einfluss von HIF-1 α ist zelltypspezifisch und u. a. abhängig von der Konzentration an Wachstumsfaktoren, H⁺-Ionen, Glukose und der Zelldichte. Über Interaktion mit p53 und ROS ist HIF-1 α in apoptotische Prozesse involviert (BRÜNE et al., 2001; SWINSON et al., 2004). Daneben kann aktiviertes HIF-1 α beispielsweise über die Inhibition von bcl-2 Apoptose induzieren (CARMELIET et al., 1998). Darüber hinaus initiiert HIF-1 α Expression auch anti-apoptotische Prozesse, da eine HIF-1 α Inhibition p53-unabhängige Apoptose auszulösen vermag (DAI et al., 2003).

Die iNOS Expression der WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen erfolgte in einer TNF- α -induzierten Abhängigkeit ohne Temperatureinfluss und indiziert zusätzlich zur ROS-abhängigen Induktion, eine iNOS-abhängige HIF-1 α -Induktion der beiden TNF- α -stimulierten Versuchsgruppen. Die TNF- α -abhängige Induktion von iNOS kann über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B erfolgt sein. Unter dem Kälteeinfluss wurde iNOS nicht induziert und auch unter TNF- α -Stimulierung hatte die Kälteapplikation keinen Einfluss auf die iNOS Expression. Viele Autoren wiesen hingegen auf, dass milde intraschämische Hypothermie vor NF κ B Aktivierung bzw. iNOS Expression schützt (HAN et al., 2002; HASSOUN et al., 2002; SCUMPIA et al., 2002; KARABIYIKOGLU et al., 2003; GIBBONS et al., 2003). Dies steht im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen, nach denen die 4°C Kälte keinen Einfluss auf die TNF- α -induzierte iNOS Expression hatte. Dies könnte auf andere Regulierungsmechanismen der 4°C Inkubation gegenüber der milden Hypothermie hinweisen, da auch NF κ B in den eigenen Versuchen geringfügig aktiviert war. Nachdem schon gezeigt wurde, dass eine HIF-1 α Aktivierung die Expression von iNOS induzieren kann (SEMENZA, 2002), wäre denkbar, dass die unter hypothermem Einfluss stärker induzierte HIF-1 α Expression der kälteinduzierten iNOS-Inhibition entgegengewirkt haben kann.

Die 'Heatshock' Proteine HO-1 (HSP32) und HSP70

Die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen zeigten ein kälteinduziertes TNF- α -unabhängiges Expressionsmuster der beiden 'Heatshock' Proteine, wobei die Unterschiede im Gegensatz zu den WEHI-R Zel-

len, sehr gering und statistisch nicht signifikant waren. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf die Expression der 'Heatshock' Proteine.

Als Antwort auf Stress durch toxische Chemikalien, suboptimale Temperaturen und verschiedene andere Umgebungsstressfaktoren reagieren die meisten Zellen mit einer schnellen Expression induzierbarer, evolutionär hochkonservierter 'Heatshock' Proteine, die der Zelle eine Stressresistenz verleihen (LINDQUIST und CRAIG, 1988; SCHLESINGER, 1990; JÄÄTTELÄ und WISSING, 1992a). Hämoxygenase (HO-1), auch bekannt als 'Heatshock' Protein 32 (HSP32), wird unter Stressbedingungen hochreguliert und schützt die Zelle bei Bildung von ROS vor oxidativem Stress und apoptotischem Zellschaden (HASSOUN et al., 2002; DORMAN et al., 2004). Die HO-1 Expression kann durch ROS, insbesondere durch Peroxid-Verbindungen, induziert werden (CHANG et al., 2003) und schützt über die Inhibierung der Caspase-3 Aktivierung vor TNF- α -vermitteltem apoptotischen Zelltod (DORMAN et al., 2004). Nach JÄÄTTELÄ et al. (1998) besitzt auch HSP70 eine Kontrollfunktion und programmierter Zelltod (PCD) kann durch HSP70 inhibiert werden (NYLANDSTED et al., 2000a,b). HSP70 fungiert als molekulares Chaperon, das mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert und durch die Erleichterung von Konformationsänderungen, deren Funktion zu modifizieren vermag (SCHLESINGER, 1990; HIGHTOWER, 1991). So bindet HSP70 beispielsweise verschiedene Komponenten des mitochondrialen Apoptose-'Pathways' (GARRIDO et al., 2001) und ist ein effektiver Apoptose-Inhibitor, dessen Expressionslevel mit dem Zell-'Survival' nach TNF- α -Behandlung korreliert und WEHI-S Zellen vor TNF- α -vermittelter Zytotoxizität zu schützen vermag (JÄÄTTELÄ et al., 1992b; JÄÄTTELÄ und WISSING, 1993; JÄÄTTELÄ et al., 1998). Auch VAN MOLLE et al. (2002) beschrieben eine HSP70-abhängige Protektion gegen TNF- α -induzierte Letalität. HSP70 inhibiert späte Caspasen-abhängige Ereignisse, wie beispielsweise die Aktivierung von zytosolischer Phospholipase A2 und Veränderungen der nukleären Morphologie und liefert einen signifikanten Schutz gegen Caspase-3-induzierten Zelltod (JÄÄTTELÄ et al., 1998). Daneben inhibiert HSP70 die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol (KLEIN und BRÜNE, 2002) sowie anderer destruktiver Apoptose-involvierter Enzyme (SCHETT et al., 1999) und interagiert mit mitochondrialem p53 (MARCHENKO et al., 2000). Auch gegen ROS-induzierten Schaden wirkt HSP70 protektiv, denn HSP70-Überexpression führt zur teilweisen Resistenz gegen H₂O₂-vermittelten oxidativen Stress (JÄÄTTELÄ und WISSING, 1993). Durch die Regulierung von GSH und ROS inhibiert HSP70 den mitochondrialen Schaden (SREEDHAR et al., 2002). Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, dass TNF- α die HSP70 Stressantwort transient herunterreguliert, was zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber apoptotischem Zelltod zur Folge hat (SCHETT et al., 2003).

Die Apoptose-Protektion der WEHI-S Zellen unter TNF- α -Stimulierung und Kälteeinfluss in den eigenen Versuchen kann auf die Mitwirkung einer kälteinduzierten 'Heatshock' Protein-Expression zurückgeführt werden. Neben einer hyperthermen 'Heatshock'-induzierten Apoptose-Inhibierung (NYLANDSTED et al. 2000a,b) wurde auch schon ein Zusammenhang zwischen Hypothermie und der 'Heatshock' Protein-Expression beschrieben. So berichteten NING et al. (2002) über eine Kälte-

stress-induzierte HSP70-Gen-Expression. MOTOYOSHI et al. (2001) beobachteten eine verstärkte Produktion von 'Heatshock' Proteinen in motorischen Neuronen nach Ischämie/Reperfusion (I/R) infolge einer lokalen Hypothermie-Einwirkung. Auch QING et al. (2002) fanden eine Hypothermie-abhängig erhöhte Synthese des HSP70-Proteins. Während AMON et al. (2003) zeigten, dass neben NOS auch HO-1 an der Vermittlung des Hypothermie-assoziierten Schutzes vor TNF- α -induziertem Schaden beteiligt ist, wiesen ATTUWAYBI et al. (2003, 2004) nach, dass intraischämische Hypothermie die I/R-induzierte HO-1-Expression verstärkte.

Die erhöhte 'Heatshock' Protein-Expression der kälteapplizierten TNF- α -stimulierten und unstimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen kann somit auf eine Kältestress-Induktion zurückgeführt werden. Während die kälteinduzierte 'Heatshock' Protein-Expression unter TNF- α -Stimulierung die Inhibition der TNF- α -induzierten Apoptose unterstützt, trägt sie bei den unstimulierten Zellen, deren ROS-Generierung am stärksten ausgeprägt war, zur Protektion vor oxidativem Stress bei. Dabei können sogar die reaktiven Sauerstoffspezies selbst die Induktion der 'Heatshock'-Proteine ausgelöst haben (SCHOENINGER et al., 1994; GORMAN et al., 1999). Die protektive Wirkung der Kälte auf das TNF- α -stimulierte System kann durch die HSP-Induktion als eine Prä-Konditionierung zum transienten Schutz vor der nachfolgenden TNF- α -Zytotoxizität unter warmen Bedingungen verstanden werden. Bei den warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-S Zellen hingegen, deren Apoptose-'Pathway' auf die Mitwirkung von TNF-R1/R2 rezeptorvermittelter Induktion zurückzuführen war, konnte infolge der ausbleibenden Proteinexpression keine 'Heatshock' Protein-induzierte Apoptose-Inhibition stattfinden. Für die Aktivierung des Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose-'Pathways' wurde sogar schon eine Inhibition der induzierbaren HSP70 Expression mit verstärkter Apoptose beschrieben, während eine induzierte HSP70 Expression eine Apoptose-Protektion bewirkte (SCHETT et al., 1999). Auch die Protein-Akkumulation von p53 kann bei den TNF- α -stimulierten warminkubierten WEHI-S Zellen zu einer Hemmung der HSP70 Expression beigetragen haben, da schon gezeigt wurde, dass p53 die Aktivität des HSP70 Promotors inhibiert.

6.2.2.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen

Oxidativer Stress (ROS-Produktion)

Das Grundlevel der ROS-Generierung der unstimulierten WEHI-R Zellen bei physiologischer Temperierung war gegenüber den korrespondierenden WEHI-S Zellen fast um die Hälfte erniedrigt. Dieser Befund deutet auf eine verminderte mitochondriale ROS-Generierung der WEHI-R Zellen hin und könnte in Zusammenhang mit ihrer TNF- α -Resistenz stehen, da schon gezeigt wurde, dass respirationsdefiziente mitochondriale DNA-minus L929 Zellen sehr resistent sind gegen TNF- α -induzierte Zytotoxizität (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1993). Die TNF- α -Stimulierung induzierte bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, wie auch bei den WEHI-S Zellen, nach vier Stunden eine mäßige ROS-Generierung; die Kälteapplikation verstärkte jedoch bei den WEHI-R Zellen die ROS-Bildung unter TNF- α -Stimulierung drastisch, wohingegen sie in der unstimulierten Versuchsgruppe, im Gegensatz

zu den WEHI-S Zellen, nur eine mäßige ROS-Induktion bewirkte. Nach einer Stunde Wiedererwärmung schwächte sich die Hypothermie-abhängige ROS-Induktion in Richtung des Kontrollniveaus ab, währenddessen sich die ROS-Generierung unter TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen auch nach der fünften Inkubationsstunde auf gleichem Level hielt und, wie schon bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, auf die Einwirkung des Zytokins zurückzuführen ist.

Die Beteiligung von ROS bei der Induktion und Verstärkung von apoptotischen Prozessen liefert für die kälteapplizierten TNF- α -stimulierten WEHI-R Zellen eine hinreichende Erklärung für die schnelle starke Apoptose-Induktion. Neben einer TNF- α -induzierten mitochondrialen ROS-Generierung kann durch die Kälteeinwirkung selbst das Öffnen der mitochondrialen PTP ausgelöst werden, was in einer Zerstörung des elektrochemischen Gradienten und einem Produktionsanstieg an freien Radikalen resultiert (SALAHUDEEN et al., 2003). Die mäßige ROS-Generierung in der TNF- α -stimulierten warmen Versuchsgruppe der WEHI-R Zellen steht im Einklang mit ihrer mäßigen Apoptose-Induktion. Die starke Ausprägung der evaluierten morphologischen Apoptose-Merkmale und Caspase-3 Aktivierung der unstimulierten WEHI-R Zellen kann jedoch nicht auf das Ausmaß der kälteinduzierten ROS-Generierung zurückgeführt werden und indiziert die Einwirkung zusätzlicher Effektoren. So können beispielsweise Ceramide, deren Mitbeteiligung an der Apoptose-Induktion der WEHI-R Zellen in Betracht gezogen werden mussten, Veränderungen der mitochondrialen Integrität initiieren, die zur Cytochrom c Freisetzung und nachfolgenden Aktivierung der Caspasen-Kaskade führen (HIGUCHI et al., 1997; 1998). Daneben kann auch eine Modulation der intrazellulären H⁺-Ionenkonzentration zur Induktion von Apoptose beitragen.

Extra- und Intrazellulärer pH

Wie bei den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, wurde auch im Kulturüberstand der beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen der WEHI-R Zellen ein Anstieg der extrazellulären H⁺-Ionenkonzentration mit einem 'Shift' um ca. 0,5 pH-Einheiten ins saure Milieu gegenüber der unstimulierten warmen Kontrolle evaluiert, der sich nach einer Stunde Wiedererwärmung bei 37°C an die H⁺-Ionenkonzentration der Kontrolle anglich und die zuvor getroffene These der rein physikalischen, temperaturabhängigen Löslichkeit von CO₂ als Ursache der Ansäuerung des extrazellulären Milieus unterstützt. Während bei den WEHI-R Zellen die TNF- α -Stimulierung unter warmer Inkubation ohne Auswirkung auf die extra- und intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration blieb, bewirkte der Kälteeinfluss, auch ohne TNF- α -Stimulierung, ganz im Gegensatz zu den WEHI-S Zellen eine Ansäuerung des intrazellulären Milieus. Azidose ist ein Hauptauslöser von Apoptose und eine direkte Korrelation zwischen einem niedrigen pH-Wert und der Induktion von Apoptose wurde schon mehrfach gezeigt (GOTTLIEB et al., 1996; CZENE et al., 1997; LEMASTERS et al., 1998; THATTE et al., 2004). Die schnelle und starke Induktion der morphologischen Apoptose-Merkmale der kälteapplizierten WEHI-R Zellen, die direkt nach der einstündigen Wiedererwärmungsphase am stärksten ausgeprägt und vor allem durch die verstärkte Induktion des Kernfragmentierungsstadiums charakterisiert waren, kann in Zusammenhang mit

der kälteinduzierten intrazellulären Protonenkonzentration gesehen werden und indiziert eine Aktivierung von pH-abhängigen Endonukleasen. Daneben kann auch eine saure Membran-Degradierung über Freisetzung von Sphingomyelinasen den apoptotischen Ceramid/Cathepsin- β -Pathway induziert haben oder aber der Ceramid/Cathepsin- β -Pathway kann über die Degradierung saurer Vesikel an der Initiierung der intrazellulären Azidose partizipiert haben. Der saure intrazelluläre pH-Wert kann auch über die Beeinflussung des Elektrolythaushaltes zur Apoptose-Induktion beigetragen haben. Erhöhte intrazelluläre H^+ -Konzentrationen führen als Ergebnis der Aktivierung des Na^+/H^+ -Antiporters zur Akkumulierung von intrazellulärem Na^+ und durch den Austausch von Na^+ gegen Ca^{2+} über den Na^+/Ca^{2+} -Exchanger zur anschließenden Ca^{2+} -Akkumulierung (HALESTRAP, 1999). Die nachfolgende Sequestration des Überschusses an Ca^{2+} durch das Mitochondrium führt zur Stimulierung der PTP der mitochondrialen Membranen, die eine Herabsetzung des Transmembranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma mit nachfolgender Aktivierung der Caspasen-Kaskade bewirkt (LEMASTERS et al., 1998; HALESTRAP, 1999). Eine Mitochondrien-induzierte Ansäuerung des Zytosols kann ein wichtiger und früher Auslöser zur Regulierung der Caspasen-Aktivierung sein (MATSUYAMA et al., 2000). Mitochondrien-abhängige Apoptosestimuli können eine schnelle mitochondriale Alkalisierung und zytosolische Ansäuerung mit nachfolgender Cytochrom c Freisetzung auslösen. Die zytosolische Ansäuerung kann dabei zur Modulierung der Caspasen-Aktivität führen. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung zytosolischer Caspasen durch Cytochrom c bei neutralem pH minimal ist, während sie sich bei saurem pH maximal auswirkt (MATSUYAMA et al., 2000).

Die erzielten Ergebnisse der eigenen Versuche indizieren für die WEHI-R Zellen eine kälteinduzierte Apoptose, die ganz im Gegensatz zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S, zu einem großen Anteil auf eine intrazelluläre Ansäuerung zurückzuführen und vor allem durch die induzierte Kernfragmentierung und Caspase-3 Aktivierung zu belegen ist. Daneben ist eine zusätzliche Verstärkung des Azidose-induzierten Schadens durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies indiziert.

Trotz vergleichbarer prozentualer Induktion der ROS-Generierung der warminkubierten TNF- α -stimulierten WEHI-R und WEHI-S Zellen gegenüber den korrespondierenden unstimulierten Kontrollen, lösten die ROS bei den WEHI-R Zellen, im Gegensatz zu den WEHI-S Zellen, keine intrazelluläre Ansäuerung aus. Die intrazelluläre Ansäuerung der TNF- α -stimulierten warminkubierten WEHI-S Zellen wurde auf eine TNF-Rezeptor-vermittelte, TNF- α -abhängige Generierung von ROS zurückgeführt. Da in der korrespondierenden Versuchsgruppe der WEHI-R Zellen nicht auf eine TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose geschlossen werden kann, ist die ROS-Generierung wahrscheinlich TNF- α -unabhängig und muss nicht zwingend mit einer Ansäuerung einhergehen.

Die Stress-induzierbaren Proteine HIF-1 α und iNOS

Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen in Analogie zur 'Heatshock' Protein-Induktion ein kälteinduziertes HIF-1 α und iNOS-Expressionsmuster auf, wobei selbst die sehr geringe iNOS-Induktion durch statistisch signifikante Unterschiede zu den warminkubierten Korrespondenten gekenn-

zeichnet war. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der 'Heatshock' Protein-Expression war auch für diese beiden induzierbaren Proteine ein geringeres Grundlevel, im Vergleich zu den WEHI-S Zellen, zu verzeichnen. TNF- α ist in der Lage, die HIF-1 α Protein-Expression unter normoxischen Bedingungen zu induzieren (HELLWIG-BÜRCEL et al., 1999; THORNTON et al., 2000; ALBINA et al., 2001; HADDAD und LAND, 2001). Wie schon für die WEHI-S Zellen, wurde auch für die WEHI-R Zellen eine wesentlich geringere Expression des Transkriptionsfaktors unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation evaluiert, während die Kälteinkubation TNF- α -unabhängig eine starke HIF-1 α -Induktion bewirkte. Die kälteabhängige Induktion kann unter TNF- α -Stimulierung vorrangig auf die starke ROS-Generierung zurückgeführt werden. Die stärker induzierte HIF-1 α Expression der kälteapplizierten unstimulierten WEHI-R Zellen gegenüber der TNF- α -Stimulierung und warmen Bedingungen, bei vergleichbarer ROS-Produktion, indiziert die Mitwirkung zusätzlicher Effektoren an der HIF-1 α Induktion unter Kälte. Aufgrund der geringen, aber dennoch statistisch signifikanten Expression der induzierbaren NO-Synthase unter hypothermen Bedingungen, kann auf eine begrenzte Mitwirkung von iNOS bzw. NO bei der Induktion, Stabilität und Aktivierung von HIF-1 α geschlossen werden. Auch die erhöhte intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration könnte dabei eine Rolle spielen.

Die 'Heatshock' Proteine HO-1 (HSP32) und HSP70

Wie die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen, zeigten auch die WEHI-R Zellen ein kälteinduziertes TNF- α -unabhängiges Expressionsmuster beider 'Heatshock' Proteine, wobei jedoch die Induktion in den WEHI-R Zellen gegenüber den warminkubierten Korrespondenten von stärkerem Ausmaß und signifikant unterschiedlich war. Sowohl für HO-1 als auch für HSP70 fiel die verhältnismäßig hohe Expression der unstimulierten kältebehandelten WEHI-R Zellen auf. Die TNF- α -Stimulierung unter warmen Bedingungen hatte bei den WEHI-R Zellen keinen Einfluss auf die Expression der 'Heatshock' Proteine. Wie bei den WEHI-S Zellen kann die erhöhte 'Heatshock' Protein-Expression der kälteapplizierten TNF- α -stimulierten und unstimulierten WEHI-R vorrangig auf eine Kältestress-Induktion zurückgeführt werden. Daneben kann auch die kälteinduzierte iNOS Expression über die Generierung von NO zur Induktion von HSP70 beigetragen haben (KIM et al., 1997).

Auch bei den kälteapplizierten WEHI-R Zellen kann von einer protektiven Wirkung der exprimierten 'Heatshock' Proteine auf die induzierte Apoptose ausgegangen werden, die nach der ersten Stunde der Wiedererwärmung ihre größte Ausprägung aufwies. Obwohl der zeitliche Verlauf der 'Heatshock' Proteine nicht untersucht wurde, indiziert die erhöhte Expression zu diesem Zeitpunkt eine Einflussnahme auf den weiteren Verlauf des apoptotischen Prozesses. Während sich die Reduktion der morphologischen Apoptose-Merkmale unter Hypothermie ohne TNF- α -Stimulierung nach 6 Stunden der Wiedererwärmungsphase auf 66% belief und mit einer stärkeren Induktion beider 'Heatshock' Proteine einhergeht, war unter TNF- α -Stimulierung lediglich eine Verminderung der morphologischen Apoptose-Merkmale um 17% zu verzeichnen, die auf die niedrigere 'Heatshock' Protein-Expression und die Einwirkung des Zytokins zurückgeführt werden muss. Da die p53 mRNA Expres-

sion unter TNF- α -Stimulierung und Kälteapplikation am stärksten induziert war, ist auch eine p53-abhängige HSP70-Inhibierung denkbar.

Neben der verminderten endogenen ROS-Produktion gegenüber den WEHI-S Zellen, wiesen die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen auch ein 20 bis 30% geringeres Grundlevel der beiden 'Heatshock' Proteine auf, das sich jedoch gegenüber den WEHI-S Zellen um einen Faktor 2-3 stärker induzieren ließ. Nach JÄÄTTELÄ et al. (1998) korreliert die HSP70 Expression mit dem tumorinduzierenden Potential, indem sie durch die Inhibition von Apoptose die Tumorgenese zu verstärken vermag. Daraus wäre zu folgern, dass die nativen WEHI-R Zellen gegenüber den WEHI-S Zellen ein niedrigeres Tumorpotential besitzen. Das geringere endogene Grundlevel an 'Heatshock' Proteinen kann daneben auch eine Rolle für die eingeschränkte Temperaturtoleranz der WEHI-R Zellen spielen. WISSING und JÄÄTTELÄ (1996) demonstrierten, dass eine verminderte HSP70 Expression eine erhöhte Temperatursensibilität zur Folge hat und dass die HSP70 Expression mit der Entwicklung von Thermotoleranz korreliert. So kann die starke Apoptose-Induktion der WEHI-R Zellen nach der Kälteapplikation mit der niedrigen Grundexpression der 'Heatshock' Proteine in Zusammenhang stehen, die jedoch nach ihrer Induktion inhibierend auf den Apoptose-Verlauf eingewirkt haben.

6.2.3 Auswirkung von Kälte auf die Proliferation

6.2.3.1 TNF- α -sensible WEHI-S Zellen

Der Proliferationsstatus kann durch die Analyse der DNA-Synthese, der Verteilung der Zellzyklusphasen und durch die Expression von Proliferationsmarkern wie z. B. Cycline, PCNA und Ki67 beschrieben werden. Daneben sind auch indirekte Methoden, wie z. B. die Erfassung der metabolischen Aktivität anerkannt.

Die metabolische Aktivität (WST-1)

Mithilfe des WST-1-Tests wurde die Zellproliferation indirekt über die Anzahl metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Sowohl die TNF- α -Stimulierung als auch die Kälteapplikation reduzierten die metabolische Aktivität der WEHI-S Zellen bis zu 4 Stunden nach Versuchsende. Die Kälte erniedrigte die Stoffwechselaktivität erwartungsgemäß aufgrund herabgesetzter temperaturabhängiger Reaktionsgeschwindigkeiten und Enzymaktivitäten, und retardierte die metabolische Aktivitätsrate jedoch auch weiterhin während der fünfständigen Wiedererwärmungsphase. Die TNF- α -Einwirkung verstärkte die hypotherme Stoffwechsel-Inhibition und verursachte im zeitlichen Verlauf die geringste Zuwachsrate an metabolischer Aktivität. Auch unter warmer Inkubation löste die TNF- α -Stimulierung der WEHI-S Zellen eine metabolische Retardierung aus.

TNF- α kann sowohl eine proliferative als auch eine anti-proliferative Antwort induzieren, die von der Zytokinkonzentration und von der Sensitivität der Zellen abhängig ist. So zeigten LEWIS et al. (1987), dass TNF- α dosisabhängig auf die Modulation des Zellwachstums TNF- α -sensibler Zellen wirkt und dass höhere Konzentrationen (>50U/ml) die Proliferation inhibieren, während niedrige Kon-

zentrationen (<10U/ml) das Zellwachstum zu stimulieren vermögen. Die in den eigenen Versuchen eingesetzte TNF- α -Konzentration von 200U/ml wirkte sich auf die Proliferation der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen inhibierend aus.

Die DNA-Synthese (BrdU)

Zur direkten Ermittlung proliferierender S-Phase-Zellen, wurde das Basenanalogon BrdU in Konkurrenz mit Thymidin während der DNA-Synthese-Phase in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Während die Mitoserate (\cong BrdU-Einbau nach 30min) unter Kälteapplikation unabhängig von der TNF- α -Stimulierung unbeeinflusst blieb, wirkte sich die TNF- α -Stimulierung unter warmer Inkubation inhibierend auf die Mitoserate der WEHI-S Zellen aus. Nach der vierstündigen BrdU-Inkorporationsphase war die proliferative Zuwachsrate unter TNF- α -Stimulierung vergleichbar mit der der beiden hypotherm inkubierten Versuchsgruppen auf ca. die Hälfte der Kontrollzuwachsrate reduziert. Die indizierte Proliferationshemmung steht in Einklang mit den erzielten Ergebnissen der metabolischen Aktivität und ist auf die anti-proliferative Wirkung der gewählten TNF- α -Konzentration bzw. den inhibierenden Einfluss der Kälteapplikation zurückzuführen. Zusätzlich zu der divergenten dosisabhängigen Modulation des Zellwachstums zeigten LEWIS et al. (1987), dass der TNF- α -vermittelte Wachstumseinfluss unabhängig von der zytotoxischen Antwort sein kann und nicht mit der Anzahl der TNF- α -Bindungsstellen in Relation stehen muss. Auch SUGARMAN et al. (1985 und 1987) bestätigten, dass die proliferative Antwort auf TNF- α zelltypspezifisch ist und fanden beispielsweise, dass TNF- α bei WEHI-164 Zellen eine anti-proliferative Antwort induzierte. Die TNF- α -induzierte Proliferationsantwort erfolgte auch hier nicht in Abhängigkeit der Anzahl der TNF- α -Rezeptoren oder deren TNF- α -Affinität. Auch in den eigenen Versuchen stand die Expression der induzierten TNF-Rezeptoren der WEHI-S Zellen nicht mit der ausgelösten Proliferationsantwort in Relation.

Während der Kälteapplikation sollte die DNA-Synthese bzw. der BrdU-Einbau erniedrigt sein und während der Wiedererwärmungsphase eine ansteigende Tendenz aufweisen (LEE et al., 2002). Diese Beobachtungen konnten bei den WEHI-S Zellen nicht nachvollzogen werden, da der BrdU-Einbau nicht direkt während oder unmittelbar nach der Kälteapplikation erfolgte, sondern sich erst nach einer Stunde Wiedererwärmung anschloss. Nach einer 30-minütigen BrdU-Inkorporation zeigten die beiden kältebehandelten Versuchsgruppen keinen Unterschied zur unstimulierten Kontrollgruppe, wohingegen im zeitlichen Verlauf ein retardierter BrdU-Einbau infolge der Kälteapplikation zu verzeichnen war. Eine Erklärung könnte sein, dass BrdU nicht nur während der DNA-Replikation inkorporiert, sondern auch während des DNA-'Repairs' eingebaut wird und somit eine erhöhte Reparaturaktivität geschädigter Zellen reflektieren kann (DOLBEARE, 1996). Der BrdU-Einbau der kälteapplizierten WEHI-S Zellen nach 30-minütiger Inkorporation kann daher aus einer Überlagerung von replikativen und reparativen Prozessen resultieren, auf die schon aufgrund der p53 Expression geschlossen wurde. Zudem ist auch ein zusätzlicher BrdU-Einbau in apoptotisch geschädigte DNA denkbar, da PANDEY und WANG (1995) zeigten, dass sich auch geschädigte Zellen mit DNA-Frag-

mentierung BrdU-positiv darstellen können. Die Retardierung des BrdU-Einbaus im zeitlichen Verlauf der beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen, als auch der TNF- α -stimulierten warminkubierten Zellen indiziert daher, neben einer echten Proliferationsinhibition durch die Einwirkung des TNF- α -vermittelten sowie Kälte-induzierten apoptotischen Prozesses, einen Überlagerungseffekt mit den genannten Mechanismen.

Die proliferationsassoziierten Moleküle PCNA und Ki67

Als weitere Parameter der Proliferation wurde die Expression der Zellzyklus-abhängigen Proteine PCNA und Ki67 durchflusszytometrisch untersucht. PCNA ('proliferating cell nuclear antigen') ist ein 36 kD schweres nukleäres Protein und wird als Co-Faktor der DNA-Polymerase- δ während der DNA-Synthese und DNA-Reparatur exprimiert (ALISON, 1995). Obwohl PCNA während der Synthese-Phase hochreguliert wird, ist das Protein aufgrund der langen Halbwertszeit bis über die M-Phase hinaus stabil und tritt während des gesamten Zellzyklus in Erscheinung. Die höchste Konzentration findet sich jedoch in der S-Phase. Die genaue Funktion von PCNA während der Zellzyklusprogression ist unklar (YU et al., 1992). Das nukleäre Protein Ki67 wird während des gesamten Zellzyklus, nicht aber in ruhenden G0-Zellen exprimiert (GERDES et al., 1984; MacCALLUM und HALL, 2000b).

Die PCNA Expression der WEHI-S Zellen unterschied sich in den vier Versuchsgruppen nur unmaßgeblich; lediglich unter Kälteapplikation war eine tendenziell erniedrigte Expression gegenüber den warminkubierten Korrespondenten auszumachen, die auf eine verminderte kälteinduzierte Transition in die Synthese-Phase hindeutet. Die Ki67 Expression der beiden kälteapplizierten Versuchsgruppen hingegen wies eine signifikant erniedrigte Ausprägung gegenüber den warminkubierten Korrespondenten auf. Zudem induzierte TNF- α die Ki67 Expression unter physiologischer Temperierung. Die Ki67 Expression unter TNF- α -Stimulierung und Kälteapplikation kann somit als Ergebnis der Induktion durch TNF- α und der Inhibition durch die Kälte verstanden werden. Da Ki67 nicht in ruhenden G0-Zellen exprimiert wird, könnte die verminderte Expression unter hypothermer Applikation auf einen vermehrten Anteil von G0 Zellen unter Kälteeinfluss hinweisen. Daneben kann auch ein kälteinduzierter Nährstoffmangel die verminderte Ki67 Expression bewirkt haben, da VERHEIJEN et al. (1989) einen Verlust von Ki67 nach Entzug von Nährstoffen in Zellkultur demonstrierten, obwohl sich die untersuchten Zellen nachweislich in der S-, G2- bzw. M-Phase befanden.

Vieles deutet auf eine Verbindung zwischen proliferativen und apoptotischen Signaltransduktions-'Pathways' und weiterhin auf eine Beteiligung von Ki67 an diesen Geschehen hin (COATES et al., 1996; MacCALLUM und HALL, 2000b; BAISCH, 2001; 2002). Das nukleäre Phosphoprotein Ki67 wird weitverbreitet in der Tumordiagnostik als Marker für Zellproliferation eingesetzt, aber über seine Funktion und biochemischen Eigenschaften ist noch immer wenig bekannt (SCHOLZEN und GERDES, 2000). MacCALLUM und HALL (2000b) zeigten, dass Ki67 höhergeordnete Komplexe bildet, DNA-Bindungsaktivität aufweist, vornehmlich an AT-reiche DNA-Regionen bindet und so die Chromatin-Struktur beeinflussen kann. Aufgrund seiner molekularen Größe (395kD) werden Ki67

auch architektonische oder strukturelle Funktionen zugeordnet (MacCALLUM und HALL, 2000a). Daneben sind Interaktionen mit RNA und zellulären Proteinen, wie z. B. Elementen des proteolytischen Ubiquitin-’Pathways’ bekannt und es wird vermutet, dass Ki67 an der Ribosomen-Biogenese während der Zellteilung beteiligt ist (MacCALLUM und HALL, 2000a). BAISCH (2002) demonstrierte, dass TNF- α -induzierte Apoptose das Level des Proliferationsmarkers Ki67 in abgelösten apoptotischen Zellen gegenüber vitalen adhärenen Kontrollzellen erhöht und dass eine strenge Korrelation zwischen der Ki67 Expression und dem Ausmaß der induzierten Apoptose besteht. TNF- α induziert Zell’detachment’ und die abgelösten Zellen in Monolayer-Kulturen sind im Allgemeinen sterbende bzw. tote oder aber auch mitotische Zellen. Ein großer Anteil der abgelösten Zellen weisen nach BAISCH (2002) eine Depolarisierung der Mitochondrienmembran und ein PARP-’cleavage’ durch Caspase-3 und/oder Caspase-7 auf. Auch HOSHI et al. (1998) zeigten in einer immunhistochemischen Studie, dass Caspase-3 positive Zellen in der Regel auch Ki67 positiv waren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von BAISCH (2002) und HOSHI et al. (1998) wurde auch in den eigenen Versuchen in der TNF- α -stimulierten warminkubierten Versuchsgruppe der WEHI-S Zellen die höchste Anzahl apoptotischer Zellen und die höchste Ki67 Expression aufgefunden. Dabei könnte die erhöhte Ki67 Expression selbst zur Apoptose-Induktion mitbeigetragen haben, da schon gezeigt wurde, dass Ki67-Überexpression zu Chromatinschädigung und Apoptose führen kann (MacCALLUM und HALL, 2000b). Eine weitere Übereinstimmung zu den Ergebnissen von BAISCH (2002) ergibt sich aus der Tatsache, dass trotz der erhöhten TNF- α -induzierten Ki67 Expression die Proliferation inhibierend beeinflusst wurde (s. WST-1-Proliferationstest und BrdU-Einbau). Die Ergebnisse von BAISCH (2001), nach denen TNF- α über den verringerten BrdU-Einbau den Transit durch alle Zellzyklusphasen verlangsamt und gleichzeitig einen Anstieg der Ki67 Expression und der Anzahl apoptotischer Zellen induziert, konnte in den eigenen Versuchen mit der TNF- α -sensiblen WEHI-S Zelllinie bestätigt werden.

Der Zellzyklus

Der Kälteeinfluss induzierte bei den WEHI-S Zellen TNF- α -unabhängig einen Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase und einen erhöhten Anteil an polyploiden Zellen (8n). Der beobachtete G2/M-Arrest kann über den erfolgten DNA-Schaden durch p53 initiiert, oder durch die Kälte selbst ausgelöst sein. DNA-’Damage’ induziert verschiedene zelluläre Antworten zur Beseitigung des Schadens und Wiederherstellung der Kontinuität der DNA-Duplex. Dazu gehören die Aktivierung von DNA-’Damage Checkpoints’ zur Arretierung der Zellzyklusprogression und Initiierung von Reparaturmechanismen, die transkriptionelle Antwort zur Unterstützung des Zell-’Survivals’ oder die Induktion von Apoptose zur Eliminierung zu stark geschädigter Zellen. Bei niedrigem bzw. reparablem DNA-Schaden vermittelt p53 eine Verzögerung oder eine Arretierung des Zellzyklus an verschiedenen ’Checkpoints’, die für die DNA-Replikation (G1/S), prämitotische Chromosomenkondensation (G2) und Chromosomentrennung (Spindel-’Checkpoint’) vorrangig sind (MORGAN und KASTAN, 1997; SCHWARTZ und

ROTTER, 1998). Die 'Checkpoints' erlauben DNA-'Damage'-Sensorproteinen den Schaden zu detektieren und entsprechende Signaltransduktionskaskaden zu initiieren. Die Signal-'transducer' aktivieren p53 und inaktivieren im Gegenzug Cyclin-abhängige Kinasen, um die Zellzyklus-Progression zu inhibieren (SANCAR et al., 2004). Wenn geschädigte Zellen in der G1 oder S-Phase nicht oder nur insufficient repariert und auch nicht durch Apoptose eliminiert wurden, wird in der G2-Phase die Entscheidung über Leben oder Tod getroffen. Zellen mit exzessiven Chromosomenläsionen können den G2/M-'Checkpoint' nicht passieren und starten aus dem G2-Arrest Endozyklen oder werden durch Detektion über den Spindel-'Checkpoint' dem mitotischen Tod zugeführt. Der mitotische Zelltod, auch als mitotische Katastrophe bezeichnet, manifestiert sich in einem Mitose-Abbruch durch Apoptose aus der Metaphase und ist mit der Aktivierung von Caspase-3 assoziiert (ERENPREISA und CRAGG, 2001; CASTEDO et al., 2004a,b). Auch ein Mangel an Wachstumsfaktoren, der sich in den eigenen Versuchen u. U. während der Wiedererwärmungsphase einstellte, kann in verschiedenen Zelltypen in vitro und in vivo eine abortive Zellzyklusprogression und Apoptose verursachen (COLOMBEL et al., 1992; BATISTATOU und GREENE, 1993). Die endozyklischen Zellen hingegen haben eine weitere Möglichkeit, die geschädigte DNA zu reparieren (ERENPREISA und CRAGG, 2001). Durch die induzierten Endozyklen können vermehrt polyploide Zellen entstehen, die auch in den eigenen Versuchen der kälteapplizierten WEHI-S Zellen beobachtet wurden und ein weiteres Indiz der Initiierung von Reparaturmechanismen unter Kälteeinfluss liefern. Die kälteinduzierte Polyploidie (8n-Population) der WEHI-S Zellen spricht für den Verlust eines oder mehrerer Zellzyklus-'Checkpoints'. Vor allem verantwortlich für das Auftreten solcher hyperploiden Formationen sind Störungen am Spindel-'Checkpoint'. Zellen, die einem transienten G2/M-Arrest unterliegen, können nach Austreten aus dem mitotischen Arrest nach erfolgter Mitose und ausbleibender Zytokinese die Ausbildung hyperploider Stadien aufweisen.

Der beobachtete G2/M-Arrest der WEHI-S Zellen nach Kälteapplikation könnte, wie schon erwähnt, aufgrund der schon ursprünglich niedrigeren p53 Expression in den beiden kälteapplizierten WEHI-S Versuchsgruppen, über transkriptionelle Aktivität zum Zellzyklusarrest über den G2-'Checkpoint' geführt haben, um nach erfolgtem DNA-Schaden, der durch die ermittelte DNA-Fragmentierung indiziert ist, Gelegenheit zur Reparatur zu geben. Der beobachtete Arrest in der G2/M-Phase kann aber auch, unabhängig von p53, allein auf die Temperatureinwirkung zurückzuführen sein. So wurde schon gezeigt, dass sowohl 'Heatshock' (GERULLIS et al., 2003; KOMATA et al., 2004) als auch Kälte-Expositionen einen G2/M-Zellzyklusarrest induzieren kann. Nach RIEDER und COLE (2002) ist die Zellzyklusprogression temperatursensibel und schon eine kurze Exposition von einer Stunde bei 4-10°C kann eine Synchronisierung in die G2/M-Phase auslösen. So kann der protektive Effekt der Kälte gegen TNF- α -induzierte Apoptose bei den WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen auf die Mitwirkung des kälteinduzierten G2/M-Arrest zurückgeführt werden. Auch MATIJASEVIC (2002) beschrieb einen protektiven Effekt gegenüber zytotoxischen Substanzen durch einen kälteinduzierten Zellzyklusarrest. Umgekehrt kann aber auch die kälteinduzierte Apoptose der unstimulierten

WEHI-S Zellen mit dem ausgelösten G2/M-Arrest in Zusammenhang stehen, da REN et al. (2003) eine geringe Cytochrom c Freisetzung in wachstumsarretierten Zellen, nicht aber in proliferierenden Zellen evaluierten. Somit wäre denkbar, dass der kälteinduzierte G2/M-Arrest der unstimulierten WEHI-S Zellen in den eigenen Versuchen über eine zellzyklusabhängige mitochondriale Cytochrom c Freisetzung die kälteinduzierten Apoptose unterstützte. Auch die eruierte Hemmung der Proliferation über die metabolische Aktivität und den BrdU-Einbau der kälteapplizierten WEHI-S Zellen über einen Zeitraum von fünf Stunden nach erfolgter Kühlung findet in dem induzierten G2/M-Arrest eine Erklärung. Darüber hinaus kann auch die über die PCNA Expression verminderte kälteinduzierte Transition in die Synthese-Phase in Zusammenhang mit der induzierten G2/M-Arretierung stehen.

Abweichend zu den Ergebnissen des BrdU-Einbaus lieferte die Zellzyklus-Analyse geringere Anteile an proliferierenden S-Phase-Zellen, was sich am anschaulichsten durch eine Verfälschung der Ergebnisse des BrdU-Einbaus durch Inkorporation des Basenalogons nicht nur während der DNA-Replikation, sondern zusätzlich auch während der DNA-Reparatur sowie apoptotischen Prozessen erklären lässt. Übereinstimmend wurde jedoch für die unstimulierten warminkubierten WEHI-S Kontrollzellen über den BrdU-Einbau als auch über die Zellzyklus-Analyse der größte Anteil an S-Phase Zellen im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen evaluiert. Nach SHIH und STUTMAN (1996) kann TNF- α die DNA-Synthese in WEHI 164/2F Zellen schon nach einer Stunde Einwirkdauer, proportional zum Ausmaß der induzierten Apoptose, inhibieren. Die Ergebnisse der eigenen Versuche bestätigen diesen Befund und indizieren zudem, dass auch die Kälteapplikation eine Inhibition der DNA-Synthese bewirkt hat, die sich über die PCNA Expression als verminderte kälteinduzierte Transition in die Synthese-Phase andeutete.

Unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation unterlagen G0/G1- und S-phasische WEHI-S Zellen der größten Reduktion der Zellzahl und indizierten dadurch die Exekution des TNF- α -induzierten Zelltodes aus der G0/G1- bzw. S-Phase. Diese Beobachtung ist kompatibel mit den Ergebnissen von SHIH und STUTMAN (1996), die eine Verbindung TNF- α -induzierter Apoptose von WEHI 164/2F Zellen und Zellzyklus in derart aufwiesen, dass diese Zellen hauptsächlich im Übergang von G1/S- bzw. S-Phase bis zur späten S-Phase dem TNF- α -prozessierten Zelltod unterliegen. Auch IATROPOULOS und WILLIAMS (1996) berichteten, dass die proliferierende Zelle am Ende der G1-Phase die größte Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen hat. Daneben wurde aber auch schon ein Absterben eines Anteils an Zellen in jeder Zellzyklusphase durch TNF- α nachgewiesen (LATTIME und STUTMAN, 1992; LATTIME et al., 1986). Nach SHIH und STUTMAN (1996) könnte die fehlende Komplementierung der DNA-Replikation der Hauptaktivator des TNF- α -induzierten apoptotischen Signals bei TNF- α -sensiblen WEHI Zellen sein. Die biologische Aktivität von TNF- α wird initiiert über die beiden TNF-Rezeptoren, die sowohl proliferative als auch zytotoxische Signale vermitteln. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Expressionsstärke der TNF-Rezeptoren nicht mit der TNF- α -Zytotoxizität korrelieren muss (BEUTLER und CERAMI, 1989;

FIERS, 1991; SHIH und STUTMAN, 1996) und es ist möglich, dass die Bindung von TNF- α an die Rezeptoren, in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium, unterschiedliche Auswirkung haben kann.

Die Reduktion der S-Phase-Zellen unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation in den eigenen Versuchen lässt sich als Überlagerung der inhibitorischen TNF- α -Einwirkung auf die DNA-Synthese und dem Zellverlust apoptotischer Zellen verstehen, während die Reduktion an G0/G1 Zellen auf einen echten Zellverlust apoptotischer Zellen hinweist. Aufgrund des induzierten G2/M-Arrestes unter Kälteapplikation, kann über die Apoptose-auslösende Zellzyklusphase der kälteapplizierten WEHI-S Zellen nur schwer eine Aussage getroffen werden. Auch unter der hypothermen Einwirkung war übereinstimmend TNF- α -unabhängig in der G0/G1-Phase und noch eindeutiger in der S-Phase die stärkste Zellzahlreduktion zu verzeichnen, so dass die Vermutung nahe liegt, dass bei den WEHI-S Zellen auch unter dem Einfluss der Kälte vorrangig G0/G1- und S-phasische Zellen dem apoptotischen Zelltod unterlagen. Die Verminderung dieser Zellen muss jedoch zudem in Zusammenhang mit der Arretierung in der G2/M-Phase gesehen werden.

6.2.3.2 TNF- α -resistente WEHI-R Zellen

Die metabolische Aktivität (WST-1)

Die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wiesen im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen eine niedrigere Stoffwechselaktivität und eine reduzierte Aktivitätsrate auf. Die TNF- α -Stimulierung wirkte sich positiv auf die Stoffwechselaktivität aus, die Kälteapplikation hingegen verursachte eine initiale Inhibierung der Stoffwechselaktivität. Die Stoffwechselaktivitätsrate (Zuwachs der Stoffwechselaktivität zwischen 0,5 und 4h) erfuhr durch die TNF- α -Stimulierung eine geringe und durch den hypothermen Einfluss eine stärkere Beschleunigung. Die unstimulierten 37°C Kontrollzellen zeigten die geringste Stoffwechselaktivitätsrate.

Wie bei den WEHI-S Zellen reduzierte der Kälteeinfluss auch bei den WEHI-R Zellen die Stoffwechselaktivität initial aufgrund herabgesetzter temperaturabhängiger Reaktionsgeschwindigkeiten und Enzymaktivitäten. Im Gegensatz zu den WEHI-S Zellen war jedoch die Aktivitätsrate der kälteapplizierten WEHI-R Zellen gegenüber den warminkubierten Korrespondenten nicht erniedrigt. Ein Erklärungsansatz für diesen Befund könnte der kälteinduzierte G2/M-Arrest der WEHI-S Zellen bieten, der für die WEHI-R Zellen höchstens tendenziell auszumachen war. Darüber hinaus wiesen die kälteapplizierten WEHI-R Zellen sogar eine Steigerung der Stoffwechselaktivitätsrate gegenüber den warminkubierten Korrespondenten auf, die darauf hinweist, dass sich nach der kälteinduzierten metabolischen Retardierung nach längerer Wiedererwärmung ein kälteinduzierter Support auf die Stoffwechselaktivität auswirkt. MORGAN et al. (2004) zeigten, dass schon kurze saure Exposition in vivo und in vitro die Zellproliferation erhöht und führen als beteiligte Mechanismen Veränderungen der Na⁺/H⁺-Exchanger Aktivität und die Beteiligung des MAPK-Signal-Pathways an. So wäre auch für die kälteapplizierten WEHI-R Zellen in den eigenen Versuchen eine Mitbeteiligung der intrazellulären kälteinduzierten Ansäuerung an der Steigerung der Proliferationsrate

denkbar. Auch die TNF- α -Stimulierung führte bei den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen mit und ohne Kälteapplikation zu einer geringen Aktivierung des Metabolismus und indiziert die Induktion von Zellwachstum und 'Survival', wahrscheinlich über TRAF-induzierte NF κ B-Aktivierung. Eine zelltypspezifische proliferationsstimulierende Wirkung von TNF- α wurde schon vielfach belegt (LEWIS et al., 1987; SENO et al., 2002; PETERSEN et al., 2004). So kann TNF- α neben einer anti-proliferativen auch eine proliferative Antwort induzieren, die von der Zytokinkonzentration und von der Sensitivität der Zellen abhängig ist. LEWIS et al. (1987) zeigten, dass TNF- α -Stimulierung bei TNF- α -resistenten Zellen eine konzentrationsunabhängige Proliferationsstimulierung auslöst, während die Zellproliferation TNF- α -sensibler Zellen in Abhängigkeit von der TNF- α -Konzentration einer Stimulierung oder Inhibierung unterliegen kann.

Die DNA-Synthese (BrdU)

In Analogie zu den Ergebnissen der Stoffwechselaktivität wiesen die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen einen geringeren Anteil replikativer Zellen bzgl. der WEHI-S Zelllinie auf. Obwohl die initiale Mitoseraten aller Versuchsgruppen vergleichbare Daten lieferten (37 bis 43%), war eine signifikante Hemmung der DNA-Synthese, sowohl nach Kälteapplikation als auch TNF- α -Stimulierung, zu verzeichnen. Nach vierstündigem BrdU-Einbau hingegen aktivierten beide Behandlungen die DNA-Synthese, so dass unter TNF- α -Stimulierung eine Proliferationszuwachsrate von 54 bis 59% und unter Kälteapplikation ohne TNF- α -Stimulierung sogar ein Zuwachs von 76% zu ermitteln war. Die unstimulierten Kontrollzellen wiesen nach der vierstündigen BrdU-Inkorporation eine auffallend geringe Proliferationsrate von ca. 15% auf.

Die eingesetzte TNF- α -Konzentration von 200U/ml wirkte sich auch auf die Proliferation der TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen, wie schon über die metabolische Aktivität gezeigt, nach initialer Inhibierung, stimulierend aus. Schon vielfach wurde belegt, dass die TNF- α -Zytotoxizität nicht an die TNF- α -vermittelte Wachstumsstimulierung und die Anzahl der TNF-Rezeptoren oder ihre Ligandenaффinität gebunden sein muss (LEWIS et al., 1987; SUGARMAN et al., 1985 und 1987; KULL et al., 1985; BAGLIONI et al., 1985). Das Faktum, dass in den eigenen Versuchen die Expression der beiden TNF-Rezeptoren der WEHI-R Zellen nur unmaßgeblich unter Kälteeinwirkung induziert wurde, sich hingegen ein massiver zytotoxischer, apoptoseinduzierender Effekt neben einer Stimulierung der Zellproliferation manifestierte, steht in Einklang mit den Beobachtungen dieser Autoren. Nach KULL et al. (1985) und BAGLIONI et al. (1985) erscheint die TNF- α -Resistenz bei einigen Zelllinien zwar auf einer Verminderung an membranständiger TNF- α -Bindungsstellen zu beruhen, dennoch müssen noch zusätzliche Mechanismen existieren, die eine TNF- α -Resistenz bewirken. URBAN et al. (1986) prognostizierten molekulare und genetische Grundlagen als Ursache der TNF- α -Resistenz.

Während der Kälteapplikation sollte die DNA-Synthese bzw. der BrdU-Einbau erniedrigt sein und während der Wiedererwärmungsphase eine ansteigende Tendenz aufweisen (LEE et al., 2002). Im Gegensatz zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen konnte bei den WEHI-R Zellen nach der ein-

stündigen Wiedererwärmungsphase noch eine geringe, jedoch signifikant unterschiedliche Inhibierung der DNA-Synthese nach Kälteeinwirkung beobachtet werden. Nach vierstündiger BrdU-Inkorporation in der Wärmephase war hingegen mit und ohne TNF- α -Stimulierung eine massive Aktivierung der DNA-Synthese zu evaluieren. Jedoch muss auch bei den Ergebnissen der WEHI-R Zellen der Tatsache Rechnung getragen werden, dass BrdU nicht nur während der DNA-Replikation inkorporiert, sondern auch während des DNA-'Repairs' und apoptotischer DNA-Fragmentierungsprozessen eingebaut wird. Da die Induktion der morphologischen Apoptosemerkmale der kälteapplizierten WEHI-R Zellen sehr massiv einsetzte (Faktor 3 vermehrt gegenüber WEHI-S) und insbesondere auch durch das Fragmentierungsstadium charakterisiert war, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse des BrdU-Einbaus in stärkerem Ausmaß aus einer Überlagerung der replikativen mit apoptotischen Prozessen resultieren als bei den WEHI-S Zellen. Auf reparative Prozesse deutet bei den WEHI-R Zellen lediglich die ausbleibende PARP-1-Spaltung hin. Dennoch weisen die Ergebnisse, unter Einbeziehung der metabolischen Zuwachsraten, auf eine Stimulierung der Proliferationsrate der WEHI-R Zellen unter Kälteeinfluss und TNF- α -Stimulierung hin.

Die proliferationsassoziierten Moleküle PCNA und Ki67

Die WEHI-R Zellen exprimierten im Vergleich zu den TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen ein geringeres PCNA und Ki67 Basislevel. Unter TNF- α -Stimulierung bzw. Kälteapplikation war die PCNA Expression der WEHI-R Zellen geringfügig, jedoch statistisch signifikant induziert und weist auf eine leicht beschleunigte sowohl TNF- α - als auch kälteinduzierte Transition der Zellen in die Synthesephase. Die Ki67 Expression war nur infolge der Kälteapplikation TNF- α -unabhängig induziert und signalisiert einen verminderten Anteil der WEHI-R Zellen in der G0-Phase, so dass sich gegenüber den warminkubierten Korrespondenten ein größerer Anteil der kälteapplizierten Zellen in der proliferativen Phase befinden müssten. Diese Annahme steht in Einklang mit den erzielten Ergebnissen der Zuwachsraten der metabolischen Aktivität und der BrdU-Inkorporation. Aufgrund der Beteiligung von Ki67 sowohl in proliferative als auch in apoptotische Signaltransduktion (COATES et al., 1996; Mac CALLUM und HALL, 2000b; BAISCH, 2002) kann die vermehrte Ki67 Expression jedoch auch in Zusammenhang mit der stark induzierten kälteabhängigen Apoptose stehen. So zeigte BAISCH (2002), dass das Ausmaß TNF- α -induzierter Apoptose und der Ki67 Expression streng korreliert. Diese Korrelation kann u. U. auch auf die kälteinduzierte Apoptose übertragen werden. Die Tatsache, dass sich die Ki67 Expression unter TNF- α -Stimulierung nicht induzieren ließ, muss im Zusammenhang mit der TNF- α -Resistenz der WEHI-R Zellen gesehen werden. Die TNF- α -sensiblen WEHI-S Zellen reagierten hingegen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BAISCH (2002) mit einer TNF- α -induzierten Ki67 Expression, die mit dem Ausmaß der induzierten Apoptose korrespondierte.

Der Zellzyklus

Wie schon über die BrdU-Inkorporation ermittelt, wiesen die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen auch in der Zellzyklusanalyse gegenüber ihrer TNF- α -sensiblen Parentalzelllinie eine geringere Anzahl sich in der Synthese-Phase befindlicher Zellen auf. In Analogie zu den Ergebnissen der WEHI-S Zellen war auch für die WEHI-R Zellen der Anteil der zellzyklusanalytisch ermittelten S-Phase-Zellen geringer als der über BrdU-Einbau evaluierte Anteil. Die Divergenz der Ergebnisse kann auch hier auf den zusätzlichen Einbau des Nukleinbasenanalogs während der DNA-Reparatur bzw. während apoptotischen DNA-Fragmentierungsprozessen zurückgeführt werden.

Auffallend war die hohe Anzahl an G0/G1-Phase-Zellen der WEHI-R Zelllinie, vor allem unter warmer Inkubation, die nicht mit der Ki67 Expression korreliert und daher, in Einklang mit den Ergebnissen der Stoffwechselaktivität und der DNA-Synthese, nicht auf ruhende G0-Zellen zurückgeführt werden kann. Der hohe Anteil der G0/G1-Population könnte im Zusammenhang mit der TNF- α -Resistenz der WEHI-R Zellen stehen, da schon gezeigt wurde, dass eine Inhibition der G1-Progression die TNF- α -Resistenz steigert (BELIZARIO und DINARELLO, 1991). Die verminderte Zellzahl in der G0/G1-Phase nach Kälteapplikation weist auf einen TNF- α -unabhängigen kälteinduzierten Verlust apoptotischer Zellen in dieser Zellzyklusphase hin, während unter TNF- α -Stimulierung und warmer Inkubation die TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen wohl vornehmlich in der G2/M-Phase in Apoptose übergingen. Eine kälteinduzierte Induktion einer polyploiden Population war für die WEHI-R Zellen nicht zu detektieren. Auch für die WEHI-R Zellen deutete sich ein kälteinduzierter G2/M-Arrest an. Der Zuwachs an G2/M-Phase-Zellen war jedoch gering und zudem nicht statistisch signifikant. Aufgrund des nur tendenziell beobachteten G2/M-Arrests unter Kälteapplikation, kann für die WEHI-R Zellen geschlossen werden, dass der fulminante kälteinduzierte DNA-Schaden zu stark war, um Reparaturmechanismen auszulösen und stattdessen die Eliminierung der geschädigten Zellen durch Apoptose schon früh in der G0/G1-Phase initiiert wurde. Auch die nicht existente Induktion einer polyploiden Subpopulation indiziert die ausbleibende Aktivierung des G2/M-’Checkpoints’ und deutet auf eine Apoptose-Exekution in der frühen Zellzyklusprogression hin.

Die ermittelten Unterschiede der Zellzyklusprogression zwischen den TNF- α -resistenten WEHI-R Zellen und ihrer TNF- α -sensiblen Parentalzelllinie könnten auf einen divergenten p53-Status hinweisen. Die Tatsache, dass nach MATIJASEVIC (2002) p53-Wild-Typ Zellen unter Hypothermie höhere Dosen zytotoxischer Substanzen überleben und sie, im Gegensatz zu p53-defizienten Zellen, die Zellzyklusprogression arretieren und Reparaturmechanismen initiieren, könnte den WEHI-S Zellen einen p53-Wildtyp-Status und den WEHI-R Zellen eine p53-Defizienz zuweisen.

6.2.4 Schlussfolgerung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass 4°C Hypothermie in TNF- α -sensiblen Zellen vermehrt Apoptose induziert, jedoch eine über TNF- α induzierte Apoptose signifikant reduziert. Diese konträre Wirkungsweise der Hypothermie beruht darauf, dass sie selbst die Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert, dabei aber im Sinne einer Protektion den TNF- α -vermittelten extrinsischen Signalweg durch Blockierung der TNF-Rezeptorexpression inhibiert. Resistenz gegen TNF- α vermindert, aufgrund fehlender Rezeptorstimulierbarkeit, den durch dieses Zytokin induzierten apoptotischen Zelltod. Hypothermie bewirkt in TNF- α -resistenten Zellen jedoch keine zusätzliche Protektion, sondern führt über eine vermehrte Stimulierung des intrinsischen Signalwegs unabhängig von der Zytokin-Exposition zu einer fulminanten Apoptose.

Dies lässt im Rahmen der Evolution aufgrund der frequenten Exposition niedriger Temperaturen auf einen Selektionsvorteil TNF- α sensibler Zellen schließen. Umgekehrt geben die vorliegenden Ergebnisse Anhalt, dass bei entzündlichen Erkrankungen in Organismen mit TNF- α -sensiblen Zellen die Hypothermie als therapeutische Konditionierungsstrategie zur Verhinderung TNF- α -induzierter Gewebeschädigung von größtem Interesse sein könnte. Des Weiteren bleibt in künftigen Studien zu klären, inwieweit 4°C Hypothermie ein neuer Therapieansatz zur adjuvanten Behandlung TNF- α -resistenter Tumoren sein könnte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamse SL, van Runnard Heimeel P, Hartman RJ, Chamuleau RA, van Gulik TM:** Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions. *Cell Transplant.* 2003; 12: 59-68
- Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN:** Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 686-691
- Aggarwal BB, Aiyer RA, Pennica D, Gray PW, Goeddel DV:** Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found Symp.* 1987; 131: 39-51
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD:** *Molekularbiologie der Zelle.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2. Auflage 1990
- Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL JR, Reichner JS:** HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 281: C1971-C1977
- Alison MR:** Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum. Exp Toxicol.* 1995; 14: 935-944
- Alnemri ES:** Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997; 64: 33-42
- Amon A:** The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9: 69-75
- Amon M, Menger MD, Vollmar B:** Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF- α -induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB J.* 2003; 17(2): 175-185
- Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB:** Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 1998; 12: 2821-2830
- Ashkenazi A, Dixit VM:** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308
- Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW, Moore FA:** Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J. Surg. Res.* 2003; 115: 48-55
- Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW, Moore FA:** Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 2004; 118: 53-57
- Austgulen R, Kildahl-Andersen O, Espevik T:** Monocyte-mediated drug-dependent cellular cytotoxicity: effects on different WEHI 164 target cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 1986; 22: 176-180
- Baeuerle PA:** Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr. Biol.* 1998; 8: R19-22
- Baeuerle PA, Baltimore D:** NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87(1): 13-20
- Baglioni C, McCandless S, Tavernier J, Fiers W:** Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 13395-13397
- Baisch H:** Relationship between cell kinetics and apoptotic effects in TNF-alpha and IFN-gamma-treated human tumour cell lines. *Eur. Cytokine Netw.* 2001; 12: 604-613
- Baisch H:** Elevated Ki-67 expression is correlated with TNF α - and IFN γ -induced apoptosis in tumour cells. *Cell Prolif.* 2002; 35: 333-342
- Baldwin AS Jr:** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 649-683
- Bargonetti J, Manfredi JJ:** Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.* 2002; 14: 86-91
- Barry MA, Eastman A:** Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 300: 440-450
- Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, de Groot H, Rauen U:** Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology* 2003; 47: 82-91
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M:** Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 1983; 130: 1910-1917

- Batistatou A, Greene LA:** Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J. Cell Biol.* 1993; 122: 523-532
- Baud V, Karin M:** Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biol.* 2001; 11: 372-377
- Baust JM, Van Buskirk, Baust JG:** Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2000; 36: 262-270
- Bazan JF:** Emerging families of cytokines and receptors. *Curr. Biol.* 1993; 3: 603-606
- Belizario JE, Dinarello CA:** Interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor β increase cell resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity by growth arrest in G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 1991; 51: 2379-2385
- Bennett M, MacDonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P:** Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290-293
- Ben-Sasson SA, Sherman Y, Gavrieli Y:** Identification of dying cells - in situ staining. *Methods Cell Biol.* 1995; 46:29-39
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M:** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(5): 2934-2939
- Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L:** The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* 1998; 8: 273-281
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A:** Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; 316: 552-554
- Beutler B, Cerami A:** The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7: 625-655
- Beutler BA:** The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J. Rheumatol. Suppl.* 1999; 57: 16-21
- Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S:** A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 60: 1143-1151
- Birnie GD:** The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer Suppl.* 1988; 9: 41-45
- Blumberg DD:** Creating a ribonuclease-free environment. *Methods Enzymol.* 1987; 152: 20-24
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D:** Self-association of the 'death domains' of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 387-391
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D:** Involvement of MACH1, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815
- Bolt MW, Mahoney PA:** High efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1997; 247: 185-192
- Bonavida B:** Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor. *Biotherapy* 1991; 3: 127-133
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA:** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7162-7166
- Borriello A, Roberto R, Della Ragione F, Iolascon A:** Proliferate and survive: cell division cycle and apoptosis in human neuroblastoma. *Haematologica* 2002; 87: 196-214
- Bounds JV, Wiebers DO, Whisnant JP, Okazaki H:** Mechanisms and timing of deaths from cerebral infarction. *Stroke* 1981; 12: 474-477
- Boveris A, Chance B:** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973; 134: 707-716
- Brekke OL, Sagen E, Bjerve KS:** Specificity of endogenous fatty acid release during tumor necrosis factor-induced apoptosis in WEHI 164 fibrosarcoma cells. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 2223-2233
- Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W:** Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. *Immunobiology* 1993; 187: 317-329

- Bruccoleri A, Gallucci R, Germolec DR, Blackshear P, Simeonova P, Thurman RG, Luster MI:** Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor α contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 1997; 25: 133-141
- Brüne B, von Knethen A, Sandau KB:** Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 351: 261-272
- Brüne B, von Knethen A, Sandau KB:** Transcription factors p53 and HIF-1 α as targets of nitric oxide. *Cell Signal.* 2001; 13: 525-533
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B:** Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501
- Burnette, WN:** 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 1981; 112: 195-203
- Burns TF, El-Deiry WS:** The p53 pathway and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 1999; 181: 231-239
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R:** Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1992; 13: 245-251
- Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, Gaarde WA, Holbrook NJ, Shiloh Y, Ronai Z:** Jun NH₂-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21: 2743-2754
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD:** Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1987; 7: 729-738
- Caelles C, Helmborg A, Karin M:** p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994; 370: 220-223
- Carli F, Emery PW, Freemantle CA:** Effect of perioperative normothermia on postoperative protein metabolism in elderly patients undergoing hip arthroplasty. *Br. J. Anaesth.* 1989; 63: 276-282
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E:** Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490
- Carpentier I, Declercq W, Malinin NL, Wallach D, Fiers W, Beyaert R:** TRAF2 plays a dual role in NF- κ B-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and I κ B kinase pathways. *FEBS Lett.* 1998; 425: 195-198
- Carpentier I, Beyaert R:** TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 1999; 460: 246-250
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B:** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 3666-3670
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G:** Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004a; 23: 2825-2837
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Yakushijin K, Horne D, Medema R, Kroemer G:** The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* 2004b; 23: 4353-4361
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG:** Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997; 138: 1379-1394
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y:** Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406: 855-862
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT:** Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia. A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 25130-25138
- Chandra D, Choy G, Deng X, Bhatia B, Daniel P, Tang DG:** Association of active Caspase 8 with the mitochondrial membrane during apoptosis: potential roles in cleaving BAP31 and Caspase 3 and mediating mitochondrion-endoplasmic reticulum cross talk in Etoposide-induced cell death. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 6592-6607

- Chang NS:** A potential role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2002; 9: 19-24
- Chang SH, Garcia J, Melendez JA, Kilberg MS, Agarwal A:** Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *Biochem. J.* 2003; 371: 877-885
- Chen CJ, Makino S:** Murine coronavirus-induced apoptosis in 17Cl-1 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and bid cleavage. *Virology* 2002; 302: 321-332
- Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J:** Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 50761-50767
- Chen RH, Fuggle SV:** In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am J. Pathol.* 1993; 143: 1527-1534
- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C:** p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 1996; 10: 2438-2451
- Childs EW, Udobi KF, Hunter FA:** Hypothermia reduces microvascular permeability and reactive oxygen species expression after hemorrhagic shock. *J. Trauma* 2005; 58: 271-277
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM:** FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996a; 271: 4961-4965
- Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM:** Molecular ordering of the cell death pathway. *J. Biol. Chem.* 1996b; 271: 4573-4576
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ:** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP:** Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-355
- Cho S, Liu D, Gonzales C, Zaleska MM, Wood A:** Temporal assessment of caspase activation in experimental models of focal and global ischemia. *Brain Research* 2003; 982: 146-155
- Chomczynski P, Sacchi N:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162: 156-159
- Chomczynski P:** A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-534
- Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW:** Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 10057-10062
- Ciechanover A:** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994; 79: 13-21
- Coates PJ, Hales SA, Hall PA:** The association between cell proliferation and apoptosis: studies using the cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J. Pathol.* 1996; 178: 71-77
- Cohen GM:** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997; 326: 1-16
- Coimbra C, Drake M, Boris-Moller F, Wieloch T:** Long-lasting neuroprotective effect of postischemic hypothermia and treatment with an anti-inflammatory/antipyretic drug. Evidence for chronic encephalopathic processes following ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1578-1585
- Colofiore JR, Stolfi RL, Nord LD, Martin DS:** Biochemical modulation of tumor cell energy. IV. Evidence for the contribution of adenosine triphosphate (ATP) depletion to chemotherapeutically-induced tumor regression. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50: 1943-1948
- Colombel M, Olsson CA, Ng PY, Buttyan R:** Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res.* 1992; 52: 4313-4319
- Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Eckhoff DE:** Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 2004; 136: 390-400
- Cooper WA, Duarte IG, Thourani VH, Nakamura M, Wang NP, Brown WM 3rd, Gott JP, Vinten-Johansen J, Guyton RA:** Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 696-703

- Cox RF:** Quantitation of elongating from A and B RNA polymerases in chick oviduct nuclei and effects of estradiol. *Cell* 1976; 7: 455-465
- Cox RF:** Quantitation of elongating from A and B RNA polymerases in chick oviduct nuclei and effects of estradiol. *Cell* 1976; 7: 455-465
- Cui YF, Ma M, Wang GY, Han DE, Vollmar B, Menger MD:** Prevention of core cell damage in isolated islets of Langerhans by low temperature preconditioning. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 545-550
- Cummings MC:** Increased p53 mRNA expression in liver and kidney apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1315: 100-104
- Czene S, Tiback M, Harms-Ringdhal M:** pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J* 1997; 323: 337-341
- Dai S, Huang ML, Hsu CY, Chao KS:** Inhibition of hypoxia inducible factor 1alpha causes oxygen-independent cytotoxicity and induces p53 independent apoptosis in glioblastoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003; 55: 1027-1036
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG:** Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 1999; 342: 249-268
- Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB:** Activation of NF- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 7724-7731
- Darnay BG, Aggarwal BB:** Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann. Rheum. Dis.* 1999; 58: I2-I13
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G:** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 2000; 476: 118-123
- Dbaibo GS, Pushkareva MY, Rachid RA, Alter N, Smyth MJ, Obeid LM, Hannun YA:** p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 329-339
- Degen WGJ, Pruijn GJM, Raats JMH, van Venrooij WJ:** Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 616-627
- de Groot H, Brecht M:** Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by O₂/H₂O₂ liberated by sources other than xanthine oxidase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1991; 372: 35-41
- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A:** Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 1996; 15: 3861-3870
- Derkx B, Taminau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S:** Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet.* 1993, 342: 173-174
- Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, Yang SQ, Lin HZ, Brenner DA, Westwick J, Bagby G, Nelson S:** Tumor necrosis factor alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: 552-561
- Diehl AM, Rai RM:** Liver regeneration 3: regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10: 215-227
- Dinarello CA:** Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 118: 503-508
- Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold PJ:** Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 2000a; 162: 1-12
- Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher DE:** Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J. Biol. Chem.* 2000b; 275: 38905-38911
- Ditsworth D, Priestley MA, Loepke AW, Ramamoorthy C, McCann J, Staple L, Kurth D:** Apoptotic neuronal death following deep hypothermic circulatory arrest in piglets. *Anaesthesiology* 2003; 98: 1119-1127
- Dolbeare F:** Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. *Histochem. J.* 1996; 28: 531-575
- Donato NJ, Perez M:** Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 5067-5072
- Donepudi M, Sweeney AM, Briand C, Grütter MG:** Insights into the regulatory mechanism for Caspase-8 activation. *Mol. Cell* 2003; 11: 543-549

- Dorman RB, Bajt ML, Farhood A, Mayes J, Jaeschke H:** Heme oxygenase-1 induction in hepatocytes and non-parenchymal cells protects against liver injury during endotoxemia. *Comp. Hepatol.* 2004; 3: S42
- Eberspacher E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Gelb A, Hutzler P, Henke J, Kochs E:** The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 2003; 15: 200-208
- Eck MJ, Sprang SR:** The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 17595-17605
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B:** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75(4): 817-825
- Ellgaard L:** Catalysis of disulphide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32: 663-667
- Ellis HM, Horvitz HR:** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; 44: 817-829
- Endres M, Kaps M, Moskowitz MA:** Apoptose und ischämischer Infarkt. *Nervenarzt* 1998; 69: 459-464
- Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S:** Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 4563-4573
- Erenpreisa J, Cragg MS:** Mitotic death: a mechanisms of survival? *Cancer Cell Int.* 2001; 1:1(1-7)
- Eskandari MK, Nguyen DT, Kunkel SL, Remick DG:** WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity, and reliability. *Immunol Invest.* 1990; 19: 69-79
- Espevik T, Nissen-Meyer J:** A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Meth.* 1986; 95: 99-105
- Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E:** Apoptosis and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 825-834
- Evan G, Littlewood T:** A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322
- Faraco PR, Ledgerwood EC, Vandenabeele P, Prins JB, Bradley JR:** Tumor necrosis factor induces distinct patterns of Caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 261: 385-392
- Feinstein DL, Galea E, Roberts S, Berquist H, Wang H, Reis DJ:** Induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J. Neurochem.* 1994; 62: 315-321
- Feldenberg LR, Thevananther S, del Rio M, de Leon M, Devarajan P:** Partial ATP depletion induces Fas- and caspase-mediated apoptosis in MDCK cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: F837-846
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN:** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 397-440
- Fiers W:** Tumor necrosis factor. Characterization at molecular, cellular, and in vivo level. *FEBS Lett.* 1991; 285: 199-212
- Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, Denecker G, Depuydt B, De Valck D, De Wilde G, Goossens V, Grooten J, Haegeman G, Heyninck K, Penning L, Plaisance S, Vancompernelle K, Van Criekinge W, Vandenabeele P, Vanden Berghe W, Van de Craen M, Vandevoorde V, Vercammen D:** TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J. Imflamm.* 1995; 47: 67-75
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P:** More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18: 7719-7730
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M:** Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 2001; 153: 999-1009
- Foghsgaard L, Lademann U, Wissing D, Poulsen B, Jäättelä M:** Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells. *J. Cell Biol.* 2002; 277: 39499-39506
- Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR, Harris CC:** Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2442-2447

- Freeman BA, Crapo JD:** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426
- Fulda S, Debatin KM:** INF γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2295-2308
- Garabedian GA, Scott LV:** Plaque assay for herpes simplex virus in L-929 (Earle) mouse fibroblasts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967; 126: 568-571
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G:** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 286: 433-442
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H:** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 1984; 133: 1710-1715
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG:** Cleavage of automodified Poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 28379-28384
- Gerspach J, Götz A, Zimmermann G, Kolle C, Böttinger H, Grell M:** Detection of membrane-bound tumor necrosis factor (TNF): an analysis of TNF-specific reagents. *Microsc. Res. and Tech.* 2000; 50: 243-250
- Gerullis D, Rensing L, Beyersmann D:** Heat shock treatment decreases E2F1-DNA binding and E2F1 levels in human A549 cells. *Biol. Chem.* 2003; 384: 161-167
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB:** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 225-260
- Gibbons H, Sato TA, Dragunow M:** Hypothermia suppresses inducible nitric oxide synthase and stimulates cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide stimulated BV-2 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2003; 100: 63-75
- Gnant MF, Turner EM, Alexander HR Jr:** Effects of hyperthermia and tumour necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulant activity in endothelial cells. *Cytokine* 2000; 12(4): 339-347
- Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W:** Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 8115-8119
- Gorman AM, Heavey B, Creagh E, Cotter TG, Samali A:** Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.* 1999; 445: 98-102
- Gottlieb WH, Watson JM, Rezai A, Johnson M, Martinez-Maza O, Berek JS:** Cytokine-induced modulation of tumor suppressor gene expression in ovarian cancer cells: up-regulation of p53 gene expression and induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994; 170: 1121-1128
- Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM:** Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:654-658
- Gottlieb RA:** Mitochondria: execution central. *FEBS* 2000; 482: 6-12
- Green DR, Reed JC:** Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM:** Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 1994; 77: 551-563
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P:** The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; 83: 793-802
- Grell M:** Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J. Inflamm.* 1996; 47: 8-17
- Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P:** The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 570-575
- Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grünwald U, Huang DCS, Lee YHW, Dürkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A:** Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 1999; 18: 3034-3043
- Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ:** Structure and chromosome localization of the human *CASP8* gene. *Gene* 1999; 226: 225-232

- Grilli M, Chui JJ, Lenardo MJ:** NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.* 1993; 143: 1-62
- Grossmann J:** Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 2002; 7: 247-260
- Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ:** Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 1127-1137
- Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier G, Baier-Bitterlich G, Byrd C, Lang F, Kolesnick R, Altman A, Green DR:** FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* 1995; 2: 341-351
- Gulbins E, Grassme H:** Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys. Acta* 2002, 1585: 139-145
- Ha HC, Snyder SH:** Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 13978-13982
- Ha HC, Snyder SH:** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol. Dis.* 2000; 7: 225-239
- Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R:** 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch. Neurol.* 1996; 53: 309-315
- Haddad JJ, Land SC:** A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett.* 2001; 505: 269-274
- Haddad JJ:** Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1 α . *Crit. Care* 2003; 7: 47-54
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW:** Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998; 94: 339-352
- Halestrap AP:** The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Symp.* 1999; 66: 181-203
- Hampton MB, Orrenius S:** Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors.* 1998; 8: 1-5
- Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA:** Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3921-3928
- Hanai A, Yang WL, Ravikumar TS:** Induction of apoptosis in human colon carcinoma cells HT29 by sublethal cryo-injury: mediation by cytochrome c release. *Int. J. Cancer* 2001; 93: 526-533
- Haridas V, Darnay BG, Natarajan K, Heller R, Aggarwal BB:** Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor- κ B activation and c-Jun kinase activation. *J. Immunol.* 1998; 160: 3152-3162
- Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M:** Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing Ligand-induced NF- κ B activation by inhibition of apical caspases. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 34743-34752
- Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM:** Fas-associated death domain protein and Caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 25534-25541
- Hassoun HT, Kozar RA, Kone BC, Safi HJ, Moore FA:** Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress protein during mesenteric ischemia/reperfusion. *Surgery* 2002; 132: 369-376
- Hauge A, Kofstad J:** Acid-base regulation during hypothermia. a brief review. *Arctic Med. Res.* 1995; 54: 76-82
- Haupt Y, Barak Y, Oren M:** Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J.* 1996; 15: 1596-1606
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M:** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296-299

- Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, Dembinska-Kiec A:** The time course of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *J. Vasc. Res.* 2001; 38: 288-300
- Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S:** Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 550-563
- Hellwig-Bürigel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W:** Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-1567
- Henriksen PA, Newby DE:** Therapeutic inhibition of tumour necrosis factor α in patients with heart failure: cooling an inflamed heart. *Heart* 2003; 89: 14-18
- Herberman RB, Holden HT:** Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* 1978; 27: 305-377
- Herceg Z, Wang ZQ:** Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19: 5124-5133
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B:** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1997; 1: 3-11
- Herrlich P, Ponta H, Rahmsdorf HJ:** DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1992; 119: 187-223
- Herrlich P, Rahmsdorf HJ:** Transcriptional and post-transcriptional responses to DNA-damaging agents. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6: 425-431
- Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ETH:** Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1751-1758
- Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET:** Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17: 2515-2524
- Hirpara JL, Clément MV, Pervaiz S:** Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 514-521
- Hirt UA, Gantner F, Leist M:** Phagocytosis of nonapoptotic cells dying by caspase-independent mechanisms. *J. Immunol.* 2000; 164: 6520-6529
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC:** p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53
- Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H:** Immunohistochemistry of Caspase3/ CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* 1998; 18: 4347-4353
- Hsu HL, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV:** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308
- Hu Q, Xia Y, Corda S, Zweier JL, Ziegelstein RC:** Hydrogen peroxide decreases pH_i in human aortic endothelial cells by inhibiting Na⁺/H⁺ exchange. *Circ. Res.* 1998a; 83: 644-651
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G:** Bel-X₁ interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998b; 95: 4386-4391
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP:** Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucl. Acids Res.* 1993; 21: 3167-3174
- Iatropoulos MJ, Williams GM:** Proliferation markers. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1996; 48: 175-181
- Jäättelä M, Pinola M, Saksela E:** Heat shock inhibits the cytotoxic action of TNF-alpha in tumor cells but does not alter its noncytotoxic actions in endothelial and adrenal cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 1991; 10: 119-125
- Jäättelä M, Wissing D:** Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann. Med.* 1992a; 24: 249-258
- Jäättelä M, Wissing D, Bauer PA, Li GC:** Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 1992b; 11: 3507-3512
- Jäättelä M, Wissing D:** Heat-shock proteins protects cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 231-236

- Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M:** Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998; 17: 6124-6134
- Jäättelä M, Tschopp J:** Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 416-423
- Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG:** Caspase-3 is required for α -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 15540-15545
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS:** Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 73-77
- Jeschke MG, Low JFA, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN, Barrow RE:** Cell proliferation, apoptosis, NF- κ B expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; 280: G1314-G1320
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV:** Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999; 283: 543-546
- Johansson AC, Steen H, Ollinger K, Roberg K:** Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 1253-1259
- Jones PL, Ping D, Boss JM:** Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 β regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP- β and NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 6970-6981
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM:** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549-554
- Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H:** Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J. Chem. Neuroanat.* 2004; 28: 93-100.
- Karabiyikoglu M, Han HS, Yenari MA, Steinberg GK:** Attenuation of nitric oxide synthase isoform expression by mild hypothermia after focal cerebral ischemia: variations depending on timing of cooling. *J. Neurosurg.* 2003, 98: 1271-1276
- Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR:** Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurosurg.* 1994; 80: 112-119
- Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 621-663
- Karwatowska-Prokopczuk E, Nordberg JA, Li HL, Engler RL, Gottlieb RA:** Effect of vacuolar proton ATPase on pHi, Ca²⁺, and apoptosis in neonatal cardiomyocytes during metabolic inhibition/recovery. *Circ. Res.* 1998; 82: 1139-1144
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW:** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991; 51: 6304-6311
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr.:** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; 71: 587-597
- Katsen AD, Rickberg AB:** A method of phase-contrast, fluorescence and scanning electron microscopy of one and the same cultured cells undergoing cryogenic action. *Tsitologija* 1991; 33: 76-81
- Katsen AD, Vollmar B, Mestres-Ventura P, Menger MD:** Cell surface and nuclear changes during TNF- α -induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. *Virchows Arch* 1998; 433: 75-83
- Kawahara A, Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S:** Fas-induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins. *Genes to Cells* 1998; 3: 297-306
- Kayalar C, Örd T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE:** Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2234-2238
- Kaye KM, Devergne O, Harada JN, Izumi KM, Yalamanchili R, Kieff E, Mosialos G:** Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 11085-11090
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR:** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239-257

- Kildahl-Andersen O, Austgulen R, Nissen-Meyer J:** WEHI 164 sarcoma cells rendered resistant to monocyte-released cytotoxin are also resistant to monocyte-induced cytolysis. *Cancer Immunol. Immunother.* 1986 21:77-80
- Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR:** Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1402-1411
- King MA, Radicchi-Mastroianni MA, Wells JV:** There is substantial nuclear and cellular disintegration before detectable phosphatidylserine exposure during the camptothecin-induced apoptosis of HL-60 cells. *Cytometry* 2000; 40: 10-18
- Kischkel, FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita, M, Krammer PH, Peter ME:** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995; 14: 5579-5588
- Klein SD, Brüne B:** Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. *Biochem. J.* 2002; 362: 635-641
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD:** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-1136
- Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, Mudgett JS, Carthy CM, McManus BM, Russell ME:** Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 $-/-$ recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 836-842
- Komata T, Kanzawa T, Nashimoto T, Aoki H, Endo S, Nameta M, Takahashi H, Yamamoto T, Kondo S, Tanaka R:** Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *J. Neurooncol.* 2004; 68: 101-111
- Kovar H, Jug G, Printz D, Bartl S, Schmid G, Wesierska-Gadek J:** Characterization of distinct consecutive phases in non-genotoxic p53-induced apoptosis of Ewing tumor cells and the rate-limiting role of caspase-8. *Oncogene* 2000; 19: 4096-4107
- Krajewski S, Krajewski M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC:** Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 5752-5757
- Krammer PH:** CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 1999; 71: 163-210
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B:** The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 1995; 9: 1277-1287
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA:** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 1997; 18: 44-51
- Kroemer G:** Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem. Soc. Symp.* 1999; 66:1-15
- Kroemer G:** Mitochondrial control of apoptosis. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2001; 185: 1135-1142
- Kroncke KD:** Nitrosative stress and transcription. *Biol. Chem.* 2003; 384: 1365-1377
- Kruidering M, Evan GI:** Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 2000; 50: 85-90
- Kull FC, Jacobs S, Cuatrecasas P:** Cellular receptor for 125 I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labelling, and relationship to sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 5756-5760
- Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R:** Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of wound infection and temperature group. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1209-1215
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE:** The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259
- Laemmli, UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685
- Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD:** Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1992; 458: 361-384
- Lane DP:** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16
- Lanni JS, Jacks T:** Characterization of the p53-dependant postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1055-1064

- Lansiaux A, Facompré M, Wattez N, Hildebrand MP, Bal C, Demarquay D, Lavergne O, Bigg DCH, Bailly C:** Apoptosis induced by the homocamptothecin anticancer drug BN80915 in HL-60 cells. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60: 450-461
- Laptook AR, Corbett RJ, Burns D, Sterett R:** Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke* 1995; 26: 1240-1246
- Lattime EC, Bykowsky MJ, Stutman O:** Susceptibility to lysis by natural killer and cytotoxic cells is independent of the mitotic stage of the target cell cycle. *Cell Immunol.* 1986; 100: 79-88
- Lattime EC, Stutman O:** WEHI-164 clone 2F: *in vitro* antitumor effects of tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Nat. Immun.* 1992; 11: 34-45
- Lazdunski M, Frelin C, Vigne P:** The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1985; 17: 1029-1042
- Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC, Hyman BT, Yuan J, Kuida K, Flavell RA, Moskowitz MA:** Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after *in vivo* cerebral ischemia and *in vitro* oxygen glucose deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 15188-15193
- Lee DHS, Macintyre JP, Taylor GR, Wang E, Plante RK, Tam SSC, Pope BL, Lau CY:** Tepoxalin enhances the activity of an antioxidant, Pyrrolidine Dithiocarbamate, in attenuating tumor necrosis factor α -induced apoptosis in WEHI 164 cells. *J. Pharm. Experim. Therap.* 1999; 289: 1465-1471
- Lee KS, Lim BV, Jang MH, Shin MC, Lee TH, Kim YP, Shin HS, Cho SY, Kim H, Shin MS, Kim EH, Kim CJ:** Hypothermia inhibits cell proliferation and nitric oxide synthase expression in rats. *Neurosci. Lett.* 2002; 329: 53-56
- Leist M, Jäättelä M:** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 589-598
- Lemasters JJ, Qian T, Trost LC, Herman B, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Nieminen AL:** Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic and apoptotic cell death. *Biochem. Soc. Symp.* 1998; 66: 205-222
- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG:** Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 1991; 24: 203-214
- Lewis GD, Aggarwal BB, Eessalu TE, Sugarman BJ, Shepard HM:** Modulation of the growth of transformed cells by human tumor necrosis factor- α and interferon- γ . *Cancer Res.* 1987; 47: 5382-5385
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X:** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC:** Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998a; 396: 580-584
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J:** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998b; 94: 491-501
- Lindquist S, Craig EA:** The heat shock proteins. *Ann. Res. Genet.* 1988; 22: 631-677
- Liu N, Raja SM, Zazzeroni F, Metkar SS, Shah R, Zhang M, Wang Y, Brömme D, Russin WA, Lee JC, Peter ME, Froelich CJ, Franzoso G, Ashton-Rickardt PG:** NF- κ B protects from the lysosomal pathway of cell death. *EMBO J.* 2003; 22: 5313-5322
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X:** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996a; 86: 147-157
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M:** Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 1996b; 87: 565-576
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ:** The TNF and TNF receptor superfamilies integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501
- Long X, Crow MT, Sollott SJ, O'Neill L, Menees DS, Hipolito M, Boluyt MO, Asai T, Lakatta EG:** Enhanced expression of p53 and apoptosis induced by blockade of the vacuolar proton ATPase in cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1453-1461

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G:** Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 516-24
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T:** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-271
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X:** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490
- Ma Y, Hendershot LM:** ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J. Chem. Neuroanat.* 2004; 28: 51-65
- MacCallum DE, Hall PA:** The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J. Pathol.* 2000a; 190: 537-544
- MacCallum DE, Hall PA:** The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J. Pathol.* 2000b; 191: 286-298
- Majno G, Joris I:** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 3-15
- Malumbres M, Ortega S, Barbacid M:** Genetic analysis of mammalian cyclin-dependent kinases and their inhibitors. *Biol. Chem.* 2000; 381: 827-838
- Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS:** Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 24125-24128
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS:** Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999; 284: 651-654
- Mannick JB, Schonhoff CM:** Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem. Biophys.* 2002; 408: 1-6
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM:** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 16202-16212
- Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G:** Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1155-1160
- Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, Wisniewski SR, DeKosky ST:** Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 540-546
- Martin OC, Pagano RE:** Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells. Evidence for a protein-mediated and ATP-dependent process. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 5890-5898
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B:** Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nature Cell Biol.* 2000; 2: E41-E43
- Martinou JC, Green DR:** Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 63-67
- Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernandez C, Mancada S:** Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem. J.* 2003; 376: 537-544
- Matijasevic Z:** Selective protection of non-cancer cells by hypothermia. *Anticancer Res.* 2002; 22: 3267-3272
- Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC:** Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 318-325
- May MJ, Ghosh S:** Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* 1998; 19: 80-88
- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S:** Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; 269: 365-370
- McConnell DH, White F, Nelson RL, Goldstein SM, Maloney JV Jr., DeLand EC, Buckberg GD:** Importance of alklosis in maintenance of "ideal" blood pH during hypothermia. *Surg. Forum* 1975; 26: 263-265
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME:** FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 1997; 16: 2794-2804
- Mercer WE:** Checking on the cell cycle. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1998; 30-31: 50-54

- Merlo GR, Basolo F, Fiore L, Duboc L, Hynes N:** p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *J. Cell Biol.* 1995; 128: 1185-1196
- Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brune B:** p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1994; 355: 23-26
- Mi L, Gong W, Nelson P, Martin L, Sawyer TW:** Hypothermia reduces sulphur mustard toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 193: 73-83
- Michel JB:** Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 2146-2154
- Michelson AD, MacGregor H, Barnard MR, Kestin AS, Rohrer MJ, Valeri CR:** Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro. *Thromb. Haemost.* 1994; 71: 633-640
- Miyashita T, Reed JC:** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ:** The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69: 1237-1245
- Monroe DG, Berger RR, Sanders MM:** Tissue-protective effects of estrogen involve regulation of Caspase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16: 1322-1331
- Morgan C, Alazawi W, Sirieix P, Freeman T, Coleman N, Fitzgerald R:** In vitro acid exposure has a differential effect on apoptotic and proliferating pathways in a Barrett's adenocarcinoma cell line. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99: 218-224
- Morgan SE, Kastan MB:** p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 1997; 71: 1-25
- Motoyoshi N, Sakurai M, Hayashi T, Aoki M, Abe K, Itoyama Y, Tabayashi K:** Establishment of a local cooling model against spinal cord ischemia representing prolonged induction of heat shock protein. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001; 122: 351-357
- Mullis KB:** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin.* 1990; 48: 579-582
- Murphy MP:** Does interplay between nitric oxide and mitochondria affect hypoxia-inducible transcription factor-1 activity? *Biochem. J.* 2003; 376: e5-e6
- Murray A:** Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 1993; 359: 599-604
- Murray A:** Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6: 872-876
- Muzio M:** Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1998a; 28: 141-147
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Savesen GS, Dixit VM:** An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 1998b; 273: 2926-2930
- Nacy CA, Meierovics AI, Belosevic M, Green SJ:** Tumor necrosis factor-alpha: central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities. *Pathobiology* 1991; 59: 182-184
- Nagle WA, Soloff BL, Moss AJ Jr, Henle KJ:** Cultured Chinese hamster cells undergo apoptosis after exposure to cold but nonfreezing temperatures. *Cryobiology* 1990; 27: 439-451
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J:** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- α . *Nature* 2000; 403: 98-103
- Nelson WG, Kastan MB:** DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14: 1815-1823
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA:** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43
- Nicholson DW, Thornberry NA:** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22: 299-306
- Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, Portman MA:** Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 1998; 274: H786-H793
- Ning XH, Chen SH, Xu CS, Li L, Yao LY, Qian K, Krueger JJ, Hyyti OM, Portman MA:** Selected Contribution: Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J. Appl. Physiol.* 2002; 92: 2200-2207

- Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N:** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245
- Nylandsted J, Rhode M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M:** Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000a; 97: 7871-7876
- Nylandsted J, Brand K, Jäättelä M:** Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000b; 926: 122-125
- Ohanian J, Ohanian V:** Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol. Life Sci.* 2001; 58: 2053-2068
- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J:** Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 33533-33539
- Oren M:** Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 36031-36034
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, Radinsky R:** Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell Biol.* 1995; 15: 3032-3040
- Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW:** Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. *Anaesthesist* 2001; 50: 905-920
- Palmer LA, Gaston B, Johns RA:** Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 1197-1203
- Palmiter RD, Christensen AK, Schimke RT:** Organization of polysomes from pre-existing ribosomes in chick oviduct by a secondary administration of either estradiol or progesterone. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 833-845
- Pan G, O'Rourke K, Dixit VM:** Caspase-9, Bcl-X_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 5841-5845
- Pandey S, Wang E:** Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2, and RB phosphorylation, resembling events of early cell-cycle traverse. *J. Cell Biochem.* 1995; 58: 135-150
- Pardee AB:** G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-608
- Pardi G, Ferrari MM, Iorio F, Acocella F, Boero V, Berlanda N, Monaco A, Reato C, Santoro F, Cetin I:** The effect of maternal hypothermic cardiopulmonary bypass on fetal lamp temperature, hemodynamics, oxygenation, and acid-base balance. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; 127: 1728-1734
- Pérez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F:** Intracellular alkalinization suppresses Lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 6235-6242
- Peters SM, Rauen U, Tijssen MJ, Bindels RJ, von Os CH, de Groot H, Wetzels JF:** Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical-mediated cell injury. *Transplantation* 1998; 65: 625-632
- Petersen C, Froysoya B, Soder O:** Endotoxin and proinflammatory cytokines modulate Sertoli cell proliferation in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 2004; 61: 13-30
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B:** A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-305
- Price CM:** Telomeres and telomerase: broad effects on cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999; 9: 218-224
- Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Schumacher K, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B, Minkenbergr R, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC:** Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass increases intramyocardial synthesis of heat shock protein 72. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 124: 724-731
- Raff MC:** Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400
- Raff MC:** Cell suicide for beginners. *Nature* 1998; 396: 119-122
- Ramuz O, Isnardon D, Devillard E, Charafe-Jauffret E, Hassoun J, Birg F, Xerri L:** Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *Int. J. Exp. Path.* 2003; 84: 75-81
- Rappolee DA, Wang A, Mark D, Werb Z:** Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J. Cell Biochem.* 1989; 39: 1-11
- Rath PC, Aggarwal BB:** TNF-induced signaling in apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 1999; 19: 350-364

- Rathmell JC, Thompson CB:** The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 781-828
- Rauen U, Elling B, de Groot H:** Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* 1997a; 23: 392-400
- Rauen U, Reuters I, Fuchs A, de Groot H:** Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology* 1997b; 26: 351-357
- Rauen U, de Groot H:** Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24: 1316-1323
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H:** Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13: 155-168
- Rauen U, Petrat F, Li T, de Groot H:** Hypothermia injury/cold-induced apoptosis - evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂/H₂O₂ formation. *FASEB J.* 2000; 14: 1953-1964
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ:** Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992; 69: 597-604
- Reed RL 2nd, Johnson TD, Hudson JD, Fischer RP:** The disparity between hypothermic coagulopathy and clotting studies. *J. Trauma* 1992; 33: 465-470
- Reed JC:** Cytochrome c: can't live with it - can't without it. *Cell* 1997a; 91: 559-562
- Reed JC:** Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236
- Reed SI:** Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* 1997b; 29: 7-23
- Reed JC, Green DR:** Remodeling for demolition: changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol. Cell* 2002; 9: 1-9
- Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M:** Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell* 1997; 90: 373-383
- Regula KM, Kirshenbaum LA:** p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of *de novo* gene transcription. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2001; 33: 1435-1445
- Ren S, Gao CF, Zhang L, Koike K, Tsuchida N:** PI3K inhibitors changed the p53-induced response of Saos-2 cells from growth arrest to apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 308: 120-125
- Rhind N, Russell P:** Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998; 10: 749-758
- Rieder CL, Cole RW:** Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 2002; 1: 169-175
- Riess ML, Camara AK, Kevin LG, An J, Stowe DF:** Reduced reactive O₂ species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca²⁺] levels during short-term 17 degrees C ischemia in intact hearts. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 580-590
- Rohrer MJ, Natale AM:** Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit. Care Med.* 1992; 20: 1402-1405
- Rokhlin OW, Gudkov AV, Kwek S, Glover RA, Gewies AS, Cohen MB:** p53 is involved in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Oncogene* 2000; 19: 1959-1968
- Rollinghoff M, Warner NL:** Specificity of in vivo tumor rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumor cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973; 144: 813-818
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G:** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 83-93
- Rosette C, Karin M:** Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; 274: 1194-1197
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491
- Sakamuro D, Eviner V, Elliott KJ, Showe L, White E, Prendergast GC:** c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* 1995; 11: 2411-2418

- Salahudeen AK, Huang H, Joshi M, Moore NA, Jenkins JK:** Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am. J. Transplant.* 2003; 3: 273-280
- Salvesen GS, Dixit VM:** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443-446
- Salvesen GS, Dixit VM:** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 10964-10967
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S:** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 39-85.
- Sandau KB, Faus HG, Brüne B:** Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278: 263-267
- Sandau KB, Fandrey J, Brüne B:** Accumulation of HIF-1 α under the influence of nitric oxide. *Blood* 2001; 97: 1009-1015
- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH:** Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chem-biochem.* 2001, 2:20-29
- Sawada M, Nakashima S, Kiyono T, Yamada J, Hara S, Naganawa M, Shinoda J, Sakai N:** Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp. Cell Res.* 2002; 273: 157-168
- Sawada M, Kiyono T, Nakashima S, Shinoda J, Naganawa T, Hara S, Iwama T, Sakai N:** Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced ceramide formation in human glioma cells: p53-mediated oxidant stress-dependent and -independent pathways. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 997-1008
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME:** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17: 1675-1687
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME:** The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 1541-1548
- Schett G, Steiner CW, Gröger M, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G:** Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *FASEB J.* 1999; 13: 833-842
- Schett G, Steiner CW, Xu Q, Smolen JS, Steiner G:** TNF α mediates susceptibility to heat-induced apoptosis by protein phosphatase-mediated inhibition of the HSF1/hsp70 stress response. *Cell Death Diff.* 2003; 10: 1126-1136
- Schlesinger MJ:** Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 12111-12114
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M:** I κ B-independent control of NF κ -B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26: 186-190
- Schoeninger LO, Andreoni KA, Ott GR, Risby TH, Bulkley GB, Udelsman R, Burdick JF, Buchman TG:** Induction of heat-shock gene expression in the postischemic pig liver depends on superoxide generation. *Gastroenterology* 1994; 106: 177-184
- Scholzen T, Gerdes J:** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 2000; 182: 311-322
- Schott H:** Meilensteine der Medizin. Harenberg Verlag 1996; Verlags- und Mediengesellschaft mbH & co. KG, Dortmund
- Schreck R, Baeuerle PA:** A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.* 1991; 1: 39-42
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle P:** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; 10: 2247-2258
- Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR:** p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7337-7342
- Schuler M, Green DR:** Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Transact.* 2001. 29: 684-688
- Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W:** Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 5317-5323
- Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W:** Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* 1993; 12: 3095-3104

- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME:** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998; 254: 439-459
- Schwartz D, Rotter V:** p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin. Cancer Biol.* 1998; 8: 325-336
- Scumpia PO, Sarcia PJ, DeMarco VG, Stevens BR, Skimming JW:** Hypothermia attenuates iNOS, CAT-1, CAT-2, and nitric oxide expression in lungs of endotoxemic rats. *Am. J. Physiol. Lung Mol. Physiol.* 2002; 283: L1231-1238
- Segal MS, Beem E:** Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 281: 1196-1204
- Segers MJ, Diephuis JC, van Kesteren RG, van der Werken C:** Hypothermia in trauma patients. *Unfallchirurg* 1998; 101: 742-749
- Semenza GL:** HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 167-171
- Semenza GL:** Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 64: 993-998
- Sen R, Baltimore D:** Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986a; 46: 705-716
- Sen R, Baltimore D:** Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a post-translational mechanism. *Cell* 1986b; 47: 921-928
- Seno H, Sawada M, Fukuzawa H, Morita-Fujisawa Y, Takaishi S, Hiai H, Chiba T:** Involvement of tumor necrosis factor alpha in intestinal epithelial cell proliferation following Paneth cell destruction. *Scand. J. Gastroenterol.* 2002; 37: 154-160
- Sharpless NE, DePinho RA:** p53: good cop/bad cop. *Cell* 2002; 110: 9-12
- Sheffield CW, Sessler DI, Hunt TK:** Mild hypothermia during isoflurane anesthesia decreases resistance to *E. coli* dermal infection in guinea pigs. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1994; 38: 201-205
- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ:** The unfolded protein response- a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J. Chem. Neuroanat.* 2004; 28: 79-92
- Shen Y, White E:** p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 2001; 82: 55-84
- Shibano T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Shikama H, Hisano K, Hua Y:** Effects of mild and moderate hypothermia on apoptosis in neuronal PC12 cells. *Br. J. Anaesth.* 2002; 89: 301-305
- Shih SC, Stutman O:** Cell cycle-dependent tumor necrosis factor apoptosis. *Cancer Res.* 1996; 56: 1591-1598
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y:** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC *Nature* 1999; 399: 483-487
- Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, Sugimoto T:** Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *J. Neurosurg.* 1993; 79: 363-368
- Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, Cohen J, Lenardo MJ:** Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J. Cell Biol.* 1998; 141: 1243-1253
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ:** Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000; 288: 2354-2357
- Siesjo BK, Katsura KI, Kristan T, Li PA, Siesjo P:** Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 1996; 66: 8-14
- Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D:** Mechanisms by which I κ B proteins control NF- κ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 49-54
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ:** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 1999; 144: 281-292
- Slikker III W, Desai VG, Duhart H, Feuers R, Imam SZ:** Hypothermia enhances *bcl-2* expression and protects against oxidative stress-induced cell death in Chinese hamster ovary cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 405-411

- Smirnov AS, Ruzov AS, Budanov AV, Prokhortchouk AV, Ivanov AV, Prokhortchouk EB:** High constitutive level of NF-kappaB is crucial for viability of adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* 2001; 8: 621-630
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG:** The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76: 959-962
- Sreedhar AS, Pardhasaradhi BVV, Khar A, Srinivas UK:** A cross talk between cellular signaling and cellular redox state during heat-induced apoptosis in a rat histiocytoma. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32: 221-227
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES:** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1998; 1: 949-957
- Staunton MF, Gaffney EF:** Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 103: 300-307
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS:** Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 8359-8362
- Steller H:** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449
- Stridh H, Kimland M, Jones DP, Orrenius S, Hampton MB:** Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1998; 429: 351-355
- Stroh C, Schulze-Osthoff K:** Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 991-1000
- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DAH, Bauer C, Gassmann M, Candinas D:** HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001; 15: 2445-2453
- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM:** Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 943-945
- Sugarman BJ, Lewis GD, Eessalu TE, Aggarwal BB, Shepard HM:** Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer Res.* 1987; 47: 780-786
- Swinson DEB, Jones JL, Cox G, Richardson D, Harris AL, O'Byrne KJ:** Hypoxia-inducible factor-1 α in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int. J. Cancer* 2004; 111: 43-50
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A:** Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad. Sci.* 2003; 1010: 186-194
- Takeuchi M, Rothes M, Goeddel DV:** Anatomy of TRAF2. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 19935-19942
- Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R:** The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* 1989; 245: 173-176
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraichi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y:** A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependant cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000; 404: 42-49
- Tang P, Hung MC, Klostergaard J:** Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996; 35: 8216-8225
- Tang D, Lahti JM, Kidd VJ:** Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 9303-9307
- Tartaglia LA, Goeddel DV:** Tumor necrosis factor receptor signalling. *J. Biol. Chem.* 1992 267: 4304-4307
- Taylor WR, Stark GR:** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20: 18003-1815
- Tepper AD, Boesen-de Cock JG, de Vries E, Borst J, van Blitterswijk WJ:** CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/ CPP32 inhibition. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 24308-24312
- Testoni N, Martinelli G, Farabegoli P, Zaccaria A, Amabile M, Raspadori D, Pelliconi S, Zuffa E, Carboni C, Tura S:** A new method of "in-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction" for the detection of BCR/ABL transcript in chronic myeloid leukaemia patients. *Blood* 1996; 87: 3822-3827
- Thanos D, Maniatis T:** NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532
- Thatte HS, Rhee JH, Zagarins SE, Treanor PR, Birjiniuk V, Crittenden MD, Khuri SF:** Acidosis-induced apoptosis in human and porcine heart. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 77: 1376-1383

- Thompson CB:** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
- Thompson EB:** Special topic: apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998; 60: 525-532
- Thornberry NA, Lazebnik Y:** Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, Mochan E:** Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 2000; 350: 307-312
- Tovey ER, Baldo BA:** Comparison of semi-dry and convenient tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* 1987; 8: 384-387
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4350-4354
- Tschopp J, Martinon F, Hofmann K:** Apoptosis: silencing the death receptors. *Curr. Biol.* 1999; 9: R381-R384
- Tsujimoto Y, Shimizu S:** Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Lett.* 2000; 466: 6-10
- Udea S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J:** Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J. Immunol.* 1998; 161: 6689-6695
- Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ:** Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 5233-5237
- Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, Richelmi P, Freitas I:** Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 954-961
- Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S:** Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 31075-31085
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR:** Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 107-110
- Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenaabeele P, Grooten J:** Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* 1998; 438: 150-158
- Van de Craen M, Van den brande I, Declercq W, Irmeler M, Beyaert R, Tschopp J, Fiers W, Vandenaabeele P:** Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1296-1299
- Vandenaabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W:** Two tumour necrosis factor receptors: Structure and function. *Trends Cell Biol.* 1995a; 5: 392-399
- Vandenaabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W:** Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J. Immunol.* 1995b; 154: 2904-2913
- Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, Sekikawa K, Libert C:** HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 2002; 16: 685-695
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL:** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53
- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC:** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J. Cell Sci.* 1989; 92: 123-130
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S:** Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 1995; 9: 2723-2735
- Verma IM, Stevenson J:** I κ B kinase; Beginning, not the end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 11758-11760
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C:** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 1995; 184: 39-51
- Vogelstein B, Kinzler KW:** p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526
- Von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Starck L, Graupner V, Dörken B, Daniel PT:** Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 4009-4019

- Von Mering M, Wellmer A, Michel U, Bunkowski S, Tlustochowska A, Bruck W, Kuhnt U, Nau R:** Transcriptional regulation of caspases in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol.* 2001; 11: 282-295
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P:** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 45-65
- Walczak H, Krammer PH:** The CD 95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* 2000; 256: 58-66
- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF:** Patterns of cell death. *Meth. Ach. Exp. Pathol.* 1988; 13:18-54
- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA:** The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 1966; 83: 3888-3890
- Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenaebelle P, Fiers W:** Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett.* 1997; 410: 96-106
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP:** Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 331-367
- Wallach D, Arumugam TU, Boldin MP, Cantarella G, Ganesh KA, Goltsev Y, Goncharov TM, Kovalenko AV, Rajput A, Varfolomeev EE, Zhang SQ:** How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF- κ B activation by members of the TNF/NGF receptor family. *Arthritis Res.* 2002; 4: S189-S196
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin Jr AS:** NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683
- Wang J, Friedman E:** Downregulation of p53 by sustained JNK activation during apoptosis. *Mol. Carcinog.* 2000; 29: 179-188
- Wang KK:** Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000; 23: 20-26
- Wang X:** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15: 2922-2933
- Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Müller G, Scheurich P, Wajant H:** Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80 – Requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J. Immunol.* 1997; 158: 2398-2404
- Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W:** Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth. Analg.* 1996; 82: 810-816
- Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Gores GJ:** Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002; 283: G947-956
- Werneburg N, Guicciardi ME, Yin XM, Gores GJ:** TNF- α -mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 287: G436-443
- Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD:** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor- α -induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999; 126: 881-889
- Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dörken B, Daniel PT:** Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 2001; 97: 1378-1387
- Wieler S, Gagne JP, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S:** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G₁ arrest response following ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 18914-18921
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH:** A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41: 7-12
- Wilson CA, Browning JL:** Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 1321-1333
- Winey M:** Keeping the centrosome on track. *Genome stability.* *Curr Biol* 1996; 6: 962-964
- Wissing D, Jäättelä M:** HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 1996; 12: 125-138
- Wood KA, Youle RJ:** The role of free radicals and p53 in Neuron Apoptosis *in vivo*. *J. Neurosci.* 1995; 15: 5851-5857

- Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G, el-Deiry WS:** KILLER/DR5 is a DNA damage inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 1997; 17: 141-143
- Wu GS, Ding Z:** Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 2002; 21: 1-8
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR:** Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J. Pathol.* 1973; 111: 255-261
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR:** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 68: 251-306
- Wyllie AH:** Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *Cell Death and Biol.*, ed. Chapman&Hall 1981; 9: 34
- Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS:** Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci.* 1998; 18: 1363-1373
- Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, Giffard RG:** Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 21-28
- Yang X, Chang HY, Baltimore D:** Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol. Cell* 1998; 1: 319-325
- Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y:** Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 1989; 49: 1671-1675
- Yenari MA, Iwayama S, Cheng D, Sun GH, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH, Steinberg GK:** Mild hypothermia attenuates cytochrome c release but does not alter Bcl-2 expression or caspase activation after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 29-38
- Yu C, Takeda M, Soliven B:** Regulation of cell cycle proteins by TNF-alpha and TGF-beta in cells of oligodendroglial lineage. *J. Neuroimmunol.* 2000; 108: 2-10
- Yu CC, Fletcher CD, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA:** A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.* 1992; 166: 147-152
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL:** Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297: 259-263
- Yuan J:** Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 247-251
- Zachowski A, Henry JP, Devaux PF:** Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature* 1989; 340: 75-76
- Zhan M, Zhao H, Han ZC:** Signalling mechanisms of anoikis. *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 973-983
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith MI, Harris CC, Fornace AJ Jr:** Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999; 18: 2892-2900
- Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA:** Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001; 95: 75-85
- Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C:** A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 2001; 20: 914-923
- Zhou Q, Salvesen GS:** Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem. J.* 1997; 324: 361-364
- Zimmerman RJ, Marafino BJJ, Chan A, Landre P, Winkelhake JL:** The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor *in vivo*. *J. Immunol.* 1989; 142: 11405-1409
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X:** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 11549-11556

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen von Herzen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael D. Menger und Frau Professor Dr. Brigitte Vollmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch ihre persönliche Anleitung, ihre stete Unterstützung und konstruktive Kritik haben beide entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich all meinen lieben Kollegen danken, die mich durch interessierte Diskussionen und vor allem persönliche Anteilnahme bei meiner Arbeit unterstützen. Besonders richtet sich mein Dank an Ruth M. Nickels für die tatkräftige Unterstützung bei den FACS-Analysen und an Christina Marx für ihre Mitwirkung bei der Kultivierung der Zellen und für die Zweitauswertung der Videobänder. Bei Elisabeth Gluding und Janine Becker bedanke ich mich vor allem für die menschliche und moralische Unterstützung in allen Lebenslagen. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Stefan Bauer für die Überlassung der WEHI-R Zelllinie.

9 LEBENS LAUF

Personalien:

Name: Claudia Scheuer
Geburtsdatum: 02.09.1960
Geburtsort: Oberbexbach, jetzt Bexbach
Familienstand: ledig
Eltern: Theo Scheuer und Helga Nieder, verw. Scheuer, geb. Ruffing

Schulische Bildung:

1966-1971 Grundschule, Oberbexbach
1971-1977 Kreisrealschule, Homburg
Abschluss mit dem Zeugnis der Mittleren Reife
1986-1989 Ketteler-Kolleg, Mainz
Abschluss mit dem Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1978-1981 Ausbildung zur Krankenschwester, Marienkrankenhaus, Cochem
1984-1986 Ausbildung zur MTLA, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz

Universitäre Ausbildung:

10/1989-1/1996 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
10/1991 Vordiplom (Prüfungsfächer: Botanik, Zoologie, Chemie, Mathematik)
9/1994-10/1994 mündliche Diplomprüfung (Prüfungsfächer: Botanik, Zoologie, Mikrobiologie, Immunologie)
12/1994-1/1996 Diplomarbeit: „Einfluss von Wasserwerksrückständen auf die Aktivität ausgewählter Bodenenzyme“
1/1996 Diplom

PUBLIKATIONEN:

Walter W, Scheuer C, Lingnau K, Reichert TE, Schmitt E, Loos M, Maeurer MJ: H2-M, a facilitator of MHC class II peptide loading, and its negative modulator H2-O are differentially expressed in response to proinflammatory cytokines. *Immunogenetics* 2000; 51: 794-804

Walter W, Scheuer C, Loos M, Reichert TE, Maeurer MJ: H2-Mbeta 1 and H2-Mbeta 2 heterodimers equally promote clip removal in I-A(q) molecules from autoimmune-prone DBA/1 mice. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 11086-11091

Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL: The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2136-2147

Vollmar B, El-Gibaly AM, Scheuer C, Strik MW, Bruch HP, Menger MD: Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. *Lab. Invest.* 2002; 82: 1063-1071

Schramm R, Scheuer C, Yamauchi J, Vollmar B, Menger MD: Heat shock preconditioning impairs revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Transplantation* 2002; 74: 1544-1550

Schaefer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B: Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J.* 2003; 17: 660-667

El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B: Improvement of rat liver graft quality by Pifithrin- α -mediated inhibition of hepatocyte necroptosis. *Hepatology* 2004; 39: 1553-1562

Samnick S, Scheuer C, Munks S, El-Gibaly AM, Menger MD, Kirsch CM: Technetium-99m labeled 1-(4-fluorobenzyl)-4-(2-mercapto-2-methyl-4-azapentyl)-4-(2-mercapto-2-methylpropylamino)-piperidine and iodine-1-metaiodobenzylguanidine for studying cardiac adrenergic function: a comparison of the uptake characteristics in vascular smooth muscle, cells neonatal cardiac myocytes, and an investigation in rats. *Nucl. Med. Biol.* 2004; 31: 511-522

Harder Y, Amon M, Schramm R, Scheuer C, Rucker M, Georgi M, Banic A, Erni D, Menger MD: Ischemia-induced upregulation of heme oxygenase (HO)-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis. *Lab. Invest.* 2005 (in revision)

Slotta JE, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B: Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) protect against endotoxin-induced liver damage. *J. Hepatol.* 2005 (in revision)

Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK: Macrophage inflammatory protein (MIP)-2 promotes angiogenesis, cell migration and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann. Surg. Oncol* 2005 (submitted)