
Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss organischer Schwefelverbindungen auf die
Regulation von Zellzyklus und Apoptose in
Tumorzellen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2008

vorgelegt von

Corinna Busch

geboren am 5. April 1981 in Neunkirchen/Saar



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
1.1 Einfluss organischer Schwefelverbindungen auf die Regulation von Zellzyklus und Apoptose in Tumorzellen	1
1.2 Influence of organosulfur compounds on cell cycle and apoptosis regulation in tumor cells	3
2. Einleitung	5
2.1 Zellzyklus und Zellzyklusregulation	6
2.2 Die Proteinphosphatase cdc25C	9
2.3 Einführung in die Apoptose	11
2.4 Das Wachstumssuppressorprotein p53	12
2.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	14
2.6 Organische Schwefelverbindungen aus Naturprodukten	15
2.7 Fragestellung der Arbeit	16
3. Material und Chemikalien	17
3.1 Materialien und Geräte	17
3.2 Chemikalien und Zusammensetzungen verwendeter Lösungen	18
3.3 Verwendete Antikörper	22
4. Methoden	24
4.1 Zellbiologische Methoden	24
4.1.1 Verwendete Zelllinien	24
4.1.2 Kultivierung von Säugerzellen	25
4.1.3 Passagieren von Säugerzellen	26
4.1.4 Einfrieren von Säugerzellen	26
4.1.5 Tauen von Säugerzellen	26
4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen	27
4.1.7 Behandlung der Zellen mit Diallylsulfiden und ihren Analoga	27
4.1.8 Ermittlung der Lebendzellzahl	28

4.1.9	Ermittlung des Anteils metabolisch aktiver Zellen	28
4.1.10	Ernten von Zellen	29
4.1.11	DAPI-Färbung	30
4.2	Proteinchemische Arbeitsmethoden	31
4.2.1	Herstellung von Zellextrakten	31
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	31
4.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
4.2.3.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	32
4.2.3.2	Durchführung einer SDS-PAGE	33
4.2.4	Western Blot-Analyse	34
4.2.4.1	Western Blot	34
4.2.4.2	Immunodetektion von Proteinen	35
4.3	Methoden zur Charakterisierung von Apoptose	35
4.3.1	Spaltung der Procaspase-3	35
4.3.2	Spaltung von Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP-Spaltung)	36
4.4	Nachweis der Cdc25C-Aktivität	36
4.4.1	Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose	37
4.4.2	Bestimmung der cdc25C-Aktivität mittels FDP-Phosphataseassay	38
4.5	Durchflusscytometrische Methoden	39
4.5.1	FACS-Analyse	39
4.5.2	Färbung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	40
5.	Ergebnisse	42
5.1	Einfluss von Diallylsulfiden auf die Lebensfähigkeit von HCT116-Zellen	42
5.1.1	Diallylsulfide hemmen das Wachstum von HCT116p53wt-Zellen in Abhängigkeit von der Schwefelkettenlänge	42
5.1.2	Die Abnahme der Lebensfähigkeit beruht nicht auf einer Wechselwirkung von Diallylsulfiden mit MTT	45
5.1.3	Diallyltetrasulfid hemmt das Zellwachstum in HCT116p53wt-Zellen bereits in geringen Dosen	46
5.1.4	Die Schwefelatome sind für die Effekte der Diallylsulfide essentiell	47
5.1.5	Die wachstumsinhibierende Wirkung der Diallylsulfide wird von den Doppelbindungen nicht bzw. kaum beeinflusst	49
5.2	Einfluss von Diallyltetrasulfid auf die Zellzyklusphasenverteilung	51

5.3	Induktion von Apoptose durch Diallylsulfide	53
5.3.1	Diallyltetrasulfid-Behandlung bewirkt morphologische Veränderungen in HCT116p53wt-Zellen	53
5.3.2	Diallylsulfide bewirken die Spaltung der Procaspase 3	54
5.3.3	Diallylsulfid-Behandlung führt zur PARP-Spaltung	56
5.4	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Diallyltetrasulfid	57
5.4.1	Messung von Sauerstoffradikalen mittels H2DCFDA	58
5.4.2	Antioxidantien können die Diallyltetrasulfid-bedingte Wachstumsinhibition aufheben	60
5.5	Abhängigkeit der Wirkung der Diallylsulfide von p53	62
5.5.1	Reduktion des Zellwachstums und Induktion von PARP-Spaltung durch Diallylsulfide findet auch in HCT116p53 ^{-/-} -Zellen statt	62
5.5.2	Diallylsulfide bewirken in HCT116p53wt-Zellen eine Zunahme von p53 auf Proteinebene	66
5.6	Der Effekt von Diallyltetrasulfid auf die Proteinkinase CK2	67
5.7	Einfluss von Diallylsulfiden auf die zellzyklusregulierende Proteinphosphatase cdc25C	69
5.7.1	Die Menge der Proteinphosphatase cdc25C nimmt unter Diallylsulfid-Behandlung der HCT116-Zellen ab	70
5.7.2	Ein Einfluss von Diallylsulfiden auf die cdc25C-Aktivität ist nicht messbar	72
5.7.3	Eine cdc25C-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Saostp53 138-8-Zellen	73
5.8	Einfluss von Diallylsulfiden auf die Lebensfähigkeit anderer Zelllinien	75
5.8.1	Verschiedene Tumorzelllinien werden durch Diallylsulfide in ihrem Wachstum inhibiert	75
5.8.2	Primäre Mausembryofibroblasten können von Diallylsulfiden ebenfalls inhibiert werden	77
6.	Diskussion	80
7.	Literaturverzeichnis	98
8.	Publikationen	108
	Danksagung	109
	Lebenslauf	110

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Asc	Ascorbinsäure
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin
cdc(25C)	cell division cycle (25C)
CDK	cyclin-dependent kinase
CK2	Proteinkinase CK2
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D ₂ S	Diallylmonosulfid
D ₂ S ₂	Diallyldisulfid
D ₂ S ₃	Diallyltrisulfid
D ₂ S ₄	Diallyltetrasulfid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
Deca	1,9-Decadien
deion.	deionisiert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPS	Dipropylmonosulfid
DPS ₄	Dipropyltetrasulfid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FDP	Fluoresceindiphosphat
G ₁ -Phase	erste Gap-Phase des Zellzyklus
G ₂ -Phase	zweite Gap-Phase des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde
H ₂ DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
HCl	Salzsäure
Hepta	1,6-Heptadien
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitat
kDa	Kilodalton
μ	micro
MeOH	Methanol
min	Minute
MPF	maturation-promoting factor; M-phase promoting factor
M-Phase	Mitose-Phase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NES	Kernexportsequenz
NLS	Kernimportsequenz
N-Terminus	Amino-Terminus
p53	Wachstumssuppressorprotein p53
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS(-PAGE)	Sodiumdodecylsulfat(-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus

SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VP	Vorpräzipitat
WT	Wildtyp
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1 Zusammenfassung

1.1 Einfluss organischer Schwefelverbindungen auf die Regulation von Zellzyklus und Apoptose in Tumorzellen

Für Pflanzen der Gattung *Allium* konnten bereits neben antibakteriellen, lipidsenkenden und antithrombotischen Fähigkeiten auch zytotoxische und Anti-Tumor-Wirkungen nachgewiesen werden. Diese Effekte werden organischen Schwefelverbindungen zugeschrieben. Zu den in Knoblauch vorkommenden organischen Schwefelverbindungen gehören verschiedene Diallylsulfide wie Diallylmono-, Diallyldi-, Diallyltri- und Diallyltetrasulfid. In kultivierten Zellen aus unterschiedlichen Tumoren konnte für verschiedene Diallylsulfide die Induktion von Zellzyklusarrest und / oder Apoptose nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war zu zeigen, ob synthetische Diallylsulfide das Wachstum von HCT116-Kolonkarzinom-Zellen inhibieren können, inwiefern die Struktur der Verbindungen dabei eine Rolle spielt, welche Signalwege durch Diallylsulfide in Gang gesetzt werden und ob eine Spezifität der Substanzen für Tumorzellen besteht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen in Abhängigkeit von der Schwefelkettenlänge der Diallylsulfide reduziert wird und dass die Schwefelatome essentiell für diese Effekte sind, während die Doppelbindungen nicht notwendig zu sein scheinen. Das bisher kaum untersuchte Diallyltetrasulfid zeigte bereits in geringen Dosen einen inhibitorischen Effekt, wobei eine dosisabhängige Zunahme seiner Wirkung nicht zu beobachten war. Nachdem die FACS-Analyse sowohl eine Zunahme der SubG₁-Zellpopulation als auch der Zellen in der G₂/M-Phase nach Diallyltetrasulfid-Behandlung aufwies, wurden sowohl apoptotische als auch zellzyklusabhängige Mechanismen untersucht. Dabei konnten für Apoptose charakteristische Veränderungen der Zellmorphologie sowie die typische Spaltung von Proteinen wie Caspase-3 und Poly-ADP-Ribosepolymerase nachgewiesen werden. Eine Vermittlung dieser Apoptose durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies scheint ebenfalls wahrscheinlich. Die Untersuchung der p53-negativen HCT116p53^{-/-}-Zellen zeigte, dass deren Lebensfähigkeit von Diallylsulfiden ebenso gehemmt wurde

wie die Viabilität von HCT116p53wt-Zellen und die Diallylsulfid-Effekte somit unabhängig vom Wachstumssuppressorprotein p53 zu sein scheinen. HCT116p53wt-Zellen wiesen jedoch eine erhöhte p53-Proteinmenge nach Diallylsulfid-Behandlung auf, was auf die Existenz alternativer Signalwege zur Induktion von Apoptose durch Diallylsulfide hinweist. Eine Beteiligung der Proteinkinase CK2 an der Induktion der Apoptose konnte nicht gezeigt werden. Da die Proteinmenge der Proteinphosphatase cdc25C durch Diallylsulfide abnahm, scheint die Induktion eines G₂/M-Arrestes durch Diallylsulfide wahrscheinlich, auch wenn keine Inhibition der cdc25C-Aktivität nachgewiesen werden konnte und eine Überexpression von cdc25C in Saostp53 138-8-Zellen keinen Rückgang der Effekte von Diallyltetrasulfid bewirken konnte. Eine Beschränkung der wachstumshemmenden Wirkung der Diallylsulfide auf HCT116-Zellen scheint nicht der Fall zu sein, da auch HT29-Kolonkarzinom-Zellen und OvBH1-Ovariakarzinom-Zellen gehemmt werden konnten. Die Lebensfähigkeit der primären Prostata-Zellen EPN und primärer Maus-Embryo-Fibroblasten wurde ebenfalls reduziert, allerdings in geringerem Ausmaß als die Viabilität der Tumorzellen. Die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose macht Diallylsulfide, vor allem Diallyltetrasulfid, zu möglichen zukünftigen Therapeutika gegen Tumorkrankheiten.

1.2 Influence of organosulfur compounds on cell cycle and apoptosis regulation in tumor cells

It has been shown that plants of the genus *Allium* provide anti-bacterial, lipid-lowering, and antithrombotic abilities as well as cytotoxic and anti-tumor effects. These effects are supposed to be due to organosulfur compounds. Among the garlic-derived organosulfur compounds there are different diallyl sulfides, as diallyl monosulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, and diallyl tetrasulfide. In cultured cells derived from different tumors, the induction of cell cycle arrest and / or apoptosis by different diallyl sulfides has been proven. The purpose of this work was to analyse whether synthetic diallyl sulfides can inhibit the growth of HCT116 colon carcinoma cells, how the structure of the compounds influences their effects, which pathways are induced by diallyl sulfides, and if a specificity of the substances for tumor cells exists. It could be shown that the viability of HCT116p53wt cells was reduced depending on the length of the sulfur chains and that the sulfur atoms were essential to induce these effects, while the double bonds did not seem to be necessary. Diallyl tetrasulfide, which has scarcely been examined until now, showed an inhibitory effect even in low doses. A dose dependent increase of this effect could not be overseen. Since FACS analysis showed an increase of subG₁ cell population as well as an increased amount of cells in G₂/M phase after diallyl tetrasulfide treatment, both apoptotic and cell cycle dependent mechanisms were investigated. Characteristic features of apoptotic cells as changes in cell morphology or the typical cleavage of proteins as caspase-3 and poly-ADP-ribosepolymerase could be demonstrated. It also seems likely that this apoptosis was mediated by the formation of reactive oxygen species. Investigation of p53 negative HCT116p53^{-/-} cells gave the same results on the inhibition of viability as the examination of HCT116p53wt cells. Therefore, the diallyl sulfide effects might be independent of the growth suppressor protein p53. HCT116p53wt cells showed an increase in p53 protein amount after diallyl sulfide treatment, suggesting the existence of alternative pathways for the induction of apoptosis by diallyl sulfides. There was no evidence for an involvement of protein kinase CK2. Because of the reduction of the protein amount of protein phosphatase cdc25C, an induction of G₂/M arrest seems likely, although there was no inhibition of cdc25C activity and an overexpression of cdc25C in Saostsp53 138-8 cells could not reduce the effects of diallyl tetrasulfide. The growth inhibition by diallyl sulfides was not restricted to HCT116 cells, since the

viability of HT29 colon carcinoma cells and OvBH1 ovarian carcinoma cells was also inhibited. The viability of the primary prostate cell line EPN and primary mouse embryo fibroblasts was also reduced, although to a lesser extent than the viability of tumor cells. The induction of cell cycle arrest and apoptosis makes diallyl sulfides, especially diallyl tetrasulfide, putative future treatments of tumor diseases.

2 Einleitung

Die Entstehung von Organismen und Geweben aus sich teilenden Zellen wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts von Schwann und Schleiden entdeckt, worauf die von Virchow später entwickelte Zelltheorie basiert (Darnell et al., 1993). Diese Zellteilung unterliegt einem strengen Regulationsmechanismus, dem so genannten Zellzyklus. Gerät dieser Mechanismus aus den Fugen und es kommt zur Neubildung von Gewebe durch unkontrolliertes Zellwachstum, so spricht man von „Krebs“. Dabei kann es zum einen zu einer Fehlregulation der Zellproliferation, zum anderen aber auch zu einer verringerten Apoptose („programmierter Zelltod“) kommen. Es existieren zahlreiche Proteine, die in die hochkomplexe Regulation der Zellteilung eingebunden sind und deren Fehlregulation zur Entstehung von Tumoren führen kann. Diese Zellzyklus-regulierenden Proteine kann man grundsätzlich in Wachstumssuppressorproteine und Proto-Onkogene unterteilen. Wachstumssuppressorproteine hemmen in gesunden Zellen das Wachstum. Wenn es zum Ausfall ihrer Funktion kommt, kann dies zur Entstehung von Tumoren führen. Proto-Onkogene dagegen fördern das Zellwachstum und weisen in Krebszellen oft eine verstärkte Funktion auf. Da es sich bei der Regulation des Zellzyklus um einen hochkomplizierten Prozess handelt, sind auch die molekularen Veränderungen, die zur Entstehung von Krebs führen, sehr zahlreich. Deshalb ist das Verständnis der zellulären Vorgänge in einem Tumor Grundvoraussetzung für die Entwicklung geeigneter Zytostatika. Solche Therapeutika sollten im Idealfall spezifisch Tumorzellen angreifen, ihr Wachstum inhibieren und sie in die Apoptose treiben, während gesunde Zellen unbeeinflusst bleiben. Ein weiterer Vorteil wäre eine einfache Aufnahme der Medikamente wie z. B. über die Nahrung. Deshalb ist die Untersuchung natürlicher Lebensmittel, nach deren Aufnahme ein Rückgang der Tumorsterblichkeit gezeigt werden konnte, von besonderem Interesse. So konnte z. B. für Knoblauch nachgewiesen werden, dass er neben antibakteriellen, lipidsenkenden und antithrombotischen Fähigkeiten auch eine zytotoxische und Anti-Tumor-Wirkung zeigt (Agarwal, 1996; Dausch und Nixon, 1990). Eine Isolierung der für diese Effekte verantwortlichen Wirkstoffe und das Verständnis ihrer Wirkweise könnten zur Entwicklung von Zytostatika für die Behandlung von Tumoren führen.

2.1 Zellzyklus und Zellzyklusregulation

Die Entstehung jedes mehrzelligen Organismus beruht auf dem Prinzip der Zellteilung. Dabei entwickeln sich alle Zellen ausgehend von einer einzelnen Zelle, der befruchteten Eizelle, in einem sich ständig wiederholenden Kreislauf, dem Zellzyklus (Murray und Hunt, 1993; Nurse et al., 1998). Um den korrekten Ablauf dieses Zyklus zu gewährleisten, existiert ein hochkomplexes Kontrollsystem, das die einzelnen Prozesse des Zellzyklus steuert. Dieser lässt sich grundsätzlich in vier Phasen unterteilen: G₁-, S-, G₂- und M-Phase. Eine schematische Darstellung der Abläufe des Zellzyklus ist in Abbildung 1 dargestellt.

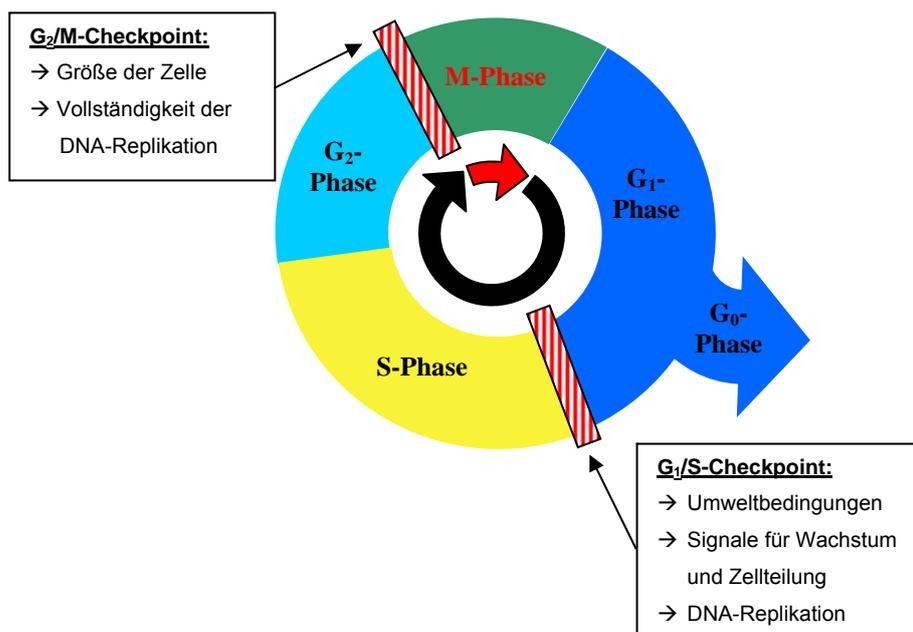


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Zellzyklusphasen mit den wichtigsten Kontrollpunkten (rot-weiße Balken). Die in schwarz dargestellten Phasen gehören zur Interphase, die Mitose ist rot dargestellt.

Die G₁-Phase (G für gap = engl. Lücke) beinhaltet das Wachstum der Zelle bis zu einer gewissen Größe sowie die Synthese von Proteinen, Lipiden, RNA und anderen

Bausteinen. Besonders solche Moleküle, die für die Replikation der DNA benötigt werden, müssen in der G_1 -Phase verstärkt synthetisiert werden. In der S-Phase (S für Synthese) erfolgt dann die DNA-Replikation. Die zweite Gap-Phase, G_2 , dient zum einen der Überprüfung der DNA-Replikation auf ihre Vollständigkeit und zum anderen der Vorbereitung auf die eigentliche Zellteilung, die dann in der M-Phase (M für Mitose) stattfindet, welche neben der Teilung der DNA auch die als Cytokinese bezeichnete Teilung des Cytoplasmas beinhaltet. Der Mitose als Phase der eigentlichen Zellteilung stehen G_1 -, S-, G_2 -Phase gegenüber, die sich zur so genannten Interphase zusammenfassen lassen. Nach der M-Phase treten die Tochterzellen entweder sofort wieder in die G_1 -Phase und damit in einen erneuten Zellzyklus ein, oder verbleiben in der so genannten G_0 -Phase. Bei dieser Ruhephase handelt es sich um eine Variante der G_1 -Phase, die unter restriktiven Wachstumsbedingungen erreicht wird. Durch Stimulation können diese Zellen wieder in den Zellzyklus zurückkehren. Die einzelnen Zellzyklusphasen müssen exakten Regulationsmechanismen unterliegen, um eine Entartung der Zellen und somit die Entstehung von Tumoren zu verhindern. Da eine Zelle, die einmal in den Zellzyklus eingetreten ist, unwiderruflich darauf programmiert ist, ihn zu durchlaufen, existieren verschiedene Restriktionspunkte innerhalb des Zellzyklus. An diesen „Checkpoints“ (Cortez und Elledge, 2000; Donzelli und Draetta, 2003; Johnson und Walker, 1999) wägt die Zelle ab, ob die entsprechenden Bedingungen für eine Fortführung des Zellzyklus gegeben sind. Wichtige Checkpoints liegen am Übergang von G_1 - in die S-Phase (G_1/S) sowie am Übergang von G_2 - in die M-Phase (G_2/M). Am G_1/S -Übergang kontrolliert die Zelle, ob die Umweltbedingungen für einen erneuten Zellzyklus günstig sind (Vorhandensein von Nährstoffen etc.), ob es Signale für Wachstum und Teilung gibt und ob die Aufteilung der DNA aus den Tochterzellen korrekt abgelaufen ist. Sind alle Voraussetzungen für eine DNA-Replikation gegeben, tritt die Zelle in die S-Phase ein und beginnt mit der Duplikation des gesamten Erbmateri als. Nach Durchlaufen der G_2 -Phase wird vor dem Eintritt in die Mitose am G_2/M -Übergang erneut eine wichtige Kontrolle der abgelaufenen Prozesse durchgeführt. Neben einer ausreichenden Größe der sich teilenden Zellen und entsprechenden Umweltbedingungen ist vor allem die korrekte und vollständige Replikation der DNA Grundvoraussetzung für den Eintritt der Zelle in die M-Phase. Liegt geschädigte oder unvollständige DNA vor, so verbleibt die Zelle im G_2/M -Arrest, bis der Schaden repariert ist oder wird der Apoptose zugeführt, um so die Weitergabe falscher Informationen an die Tochterzellen zu verhindern und die genetische Stabilität

des Gesamtorganismus zu sichern. Hat eine Zelle diesen Übergang einmal überschritten, so wird die Mitose irreversibel durchgeführt. Diese Übergänge im Zellzyklus werden von einer Familie von Proteinkinasen, den Cyclin-abhängigen Kinasen oder CDKs (cyclin dependent kinases) reguliert (Pines, 1995). CDKs stellen dabei die katalytische Untereinheit der CDK/Cyclin-Komplexe dar, die erst nach Bindung an ihre regulatorischen Untereinheiten, die Cycline, aktiv sind. Die Komplexe phosphorylieren eine Vielzahl von Proteinen und beeinflussen so deren Aktivität, Funktion, subzelluläre Lokalisation oder Stabilität. Bisher wurden in Säugern 11 verschiedene CDKs (CDK1 – CDK11) und 29 Cycline gefunden (Malumbres und Barbacid, 2005). Diese Komplexe und damit die Zellzyklusregulation sind einem Zusammenspiel komplexer Mechanismen unterworfen. Dabei spielen neben zellzyklusabhängiger Synthese und Abbau der Cycline, subzellulärer Lokalisation und Inaktivierung durch Inhibitoren vor allem aktivierende bzw. inhibierende Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine wichtige Rolle. Der G₂/M-Übergang wird beispielsweise von Typ B-Cyclinen im Komplex mit CDK1 reguliert. CDK1/Cyclin B wird auch als „maturation-promoting factor“ oder „M-phase promoting factor“ (MPF) bezeichnet (Dunphy et al., 1988; Masui und Markert, 1971; Murray und Kirschner, 1989). Dieser Komplex beeinflusst u. a. die Chromosomenkondensation, die Bildung der Mitosespindel, die Zerlegung der Kernmembran, die Inhibition des Transports zwischen den Golgi-Zisternenstapeln und die Membranfusion. CDK1 besitzt 3 bekannte Phosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierungszustand die Aktivität des Komplexes direkt beeinflusst. Dabei wirkt eine Phosphorylierung an Threonin 161 durch die „cdk activating kinase“ (CAK) aktivierend (Morgan, 1995), während Threonin 14 und Tyrosin 15 in der inaktiven CDK1 in phosphorylierter Form vorliegen. Diese inaktivierenden Phosphorylierungen werden von der Wee1- sowie der Myt1-Kinase vorgenommen (Li et al., 1995; Lundgren et al., 1991; Parker und Piwnicka-Worms, 1992). Zum Ende der G₂-Phase werden Threonin 14 und Tyrosin 15 dephosphoryliert und somit aktiviert. Diese Dephosphorylierungen, die der Zelle den Eintritt in die Mitose ermöglichen, werden von der Proteinphosphatase cdc25C katalysiert.

2.2 Die Proteinphosphatase cdc25C

Die Proteinphosphatase cdc25C (cell division cycle 25C) hat ein Molekulargewicht von 56 kDa und ist eine dualspezifische Phosphatase, die also sowohl Serin-/Threonin- als auch Tyrosin-Reste dephosphorylieren kann (Dunphy und Kumagai, 1991). In Säugern existieren drei Phosphatasen, die die Proteinfamilie der cdc25-Phosphatasen bilden (Nagata et al., 1991; Sadhu et al., 1990). Alle cdc25-Phosphatasen bestehen aus einer C-terminalen Domäne, welche die katalytische Aktivität der Phosphatase beinhaltet und in allen cdc25-Phosphatasen eine ähnliche Aminosäuresequenz aufweist, und einer regulatorischen N-terminalen Domäne, deren Sequenzhomologie unter 25% liegt (Draetta und Eckstein, 1997). Aufgrund dieser Differenzen im N-Terminus weisen die cdc25-Varianten eine unterschiedliche Regulation innerhalb des Zellzyklus auf. Cdc25A ist hauptsächlich am G₁/S-Übergang aktiv und phosphoryliert dort den CDK2/Cyclin A- sowie den CDK2/Cyclin E-Komplex (Hoffmann et al., 1994; Jinno et al., 1994). Cdc25B ist dagegen am G₂/M-Übergang aktiv und phosphoryliert den CDK1/Cyclin B-Komplex. Dies trifft auch auf cdc25C zu, welches jedoch zu einem späteren Zeitpunkt aktiv ist (Karlsson et al., 1999). Während cdc25A im Zellkern lokalisiert ist (Hoffmann et al., 1994; Molinari et al., 2000), konnte für cdc25B eine cytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden (Gabrielli et al., 1996). Für cdc25C konnten sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation gezeigt werden (Graves et al., 2001; Heald et al., 1993; Millar et al., 1991). Die cdc25C-Lokalisation wird beeinflusst von Kernlokalisations- (NLS) und Kernexportsequenzen (NES), Protein-Protein-Wechselwirkungen, dem Phosphorylierungsstatus und der Zellzyklusphase. So führt eine Phosphorylierung von Serin 216 dazu, dass es zur Bindung von 14-3-3-Proteinen kommt, wodurch cdc25C im Cytoplasma zurückgehalten wird (Kumagai et al., 1998; Dalal et al., 1999). Diese Phosphorylierung kann unter anderem von den „Checkpoint“-Kinasen chk1 und chk2 katalysiert werden (Matsuoka et al., 1998; Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997), die nach DNA-Schädigung aktiviert werden. Serin 216 liegt während der Interphase dauerhaft phosphoryliert vor. Da das gebundene 14-3-3-Protein die NLS maskiert, kann es nicht zum Kernimport kommen. Obwohl cdc25C über den gesamten Zellzyklusverlauf in der Zelle zu finden ist (Gabrielli et al., 1997; Girard et al., 1992; Villa-Moruzzi, 1993), kann eine Phosphataseaktivität nur am Ende der G₂- und am Anfang der M-Phase gemessen werden (Gabrielli et al., 1997; Jessup und Beach, 1992; Villa-Moruzzi,

1993), d. h. nach Dephosphorylierung von S216 und Kernimport. Auf diese Weise wird die Aktivität von cdc25C über die Lokalisation des Enzyms reguliert. Das bislang einzige bekannte Substrat von cdc25C, CDK1/Cyclin B, wird nicht nur selbst von cdc25C dephosphoryliert, sondern kann cdc25C durch Phosphorylierung z. B. an Serin 214 aktivieren. Somit aktivieren sich CDK1/Cyclin B und cdc25C gegenseitig in einem positiven Rückkopplungsmechanismus (Hoffmann et al., 1993; Izumi und Maller, 1993; Strausfeld et al., 1994), der in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist.

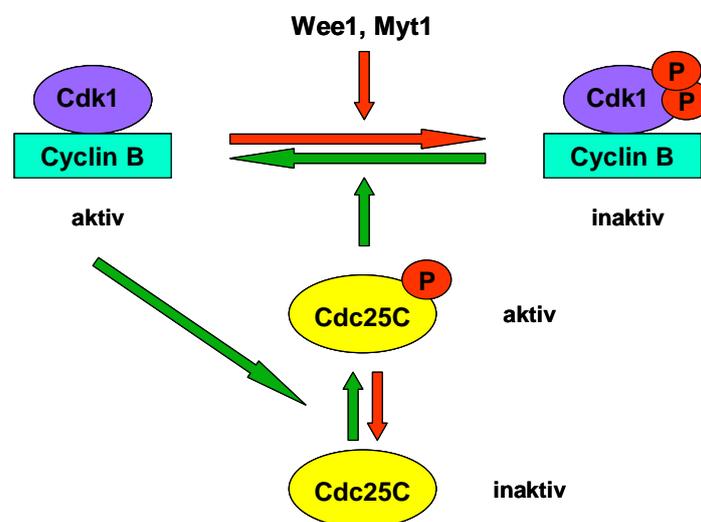


Abbildung 2: Schematische Darstellung des positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen CDK1/Cyclin B und cdc25C. Prozesse, die in der Interphase ablaufen bzw. zum G₂/M-Arrest führen, sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet; Reaktionen, die zum Eintritt der Zelle in die Mitose führen, sind mit grünen Pfeilen dargestellt.

Die Phosphorylierung von cdc25C an Serin 216 und somit die Inaktivierung von cdc25C und CDK1/Cyclin B bleibt erhalten, wenn es zu einer Schädigung der DNA kommt oder Bedingungen gegeben sind, unter denen die Mitose nicht korrekt ablaufen kann (s.o.). Dieser G₂/M-Arrest ist eine Möglichkeit, um die Weitergabe fehlerhafter genetischer Information zu verhindern. Eine weitere Alternative, mit der die Zelle auf Schädigung oder Stress reagieren kann, ist die Initiation von Apoptose oder dem programmierten Zelltod.

2.3 Einführung in die Apoptose

Unter Apoptose versteht man den regulierten oder programmierten Zelltod, der es der Zelle ermöglicht, auf den Einfluss bestimmter Faktoren wie DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Stress ihren Tod herbeizuführen. Auf diese Weise können zum einen Zellen mit fehlerhaftem Genom eliminiert werden, bevor sich der Schaden auf den Organismus auswirkt, zum andern kann der Körper die Anzahl der Zellen und die Größe der Gewebe regulieren (Hengartner, 2000). Apoptose wurde 1972 erstmals von Kerr und Mitarbeitern beschrieben (Kerr et al., 1972) und kann in zwei grundsätzliche Wege unterteilt werden: den rezeptorvermittelten oder extrinsischen Weg und den mitochondrialen oder intrinsischen Weg (Igney und Kramer 2002). Eine Übersicht über beide Wege ist in Abbildung 3 dargestellt.

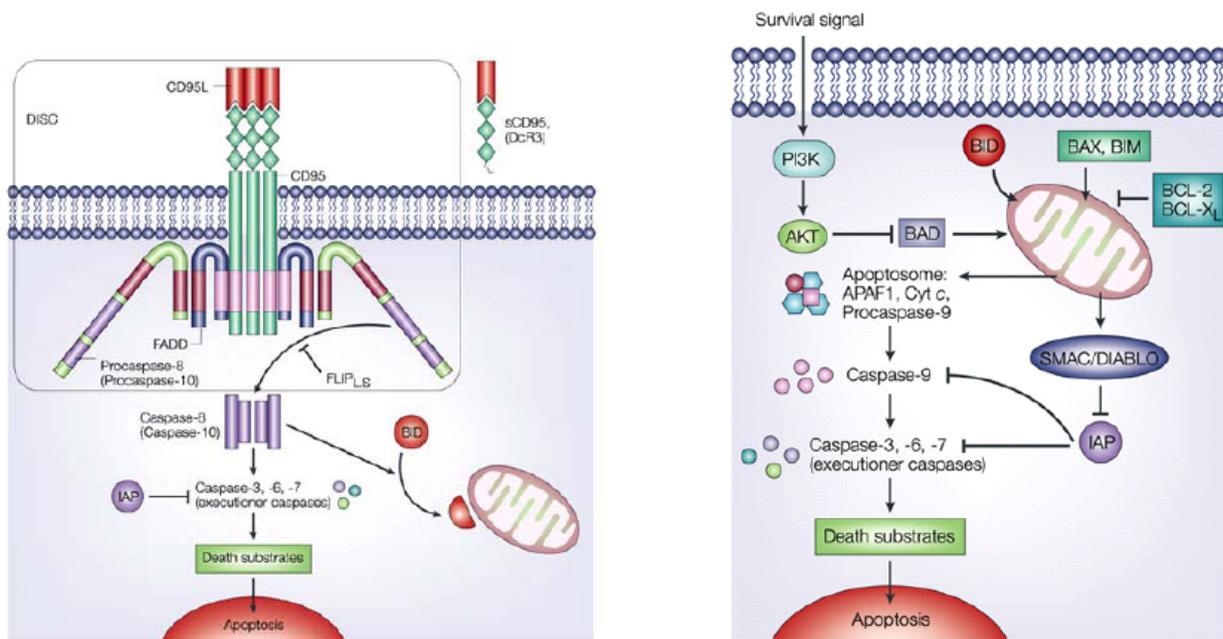


Abbildung 3: Die Wege der Apoptoseinduktion: extrinsischer Weg (links) und intrinsischer Weg (rechts) der Apoptoseinduktion (Igney und Kramer, 2002)

Schlüsselproteine in beiden Wegen sind die Cystein-Aspartat-Proteasen oder Caspasen, die ihre zellulären Substrate spalten und somit die für die Apoptose charakteristischen morphologischen und biochemischen Schäden verursachen. Man unterscheidet Initiations- und Exekutionscaspasen, wobei die Initiationscaspasen die

proteolytische Spaltung der Exekutions-Procaspasen durchführen, wodurch diese in ihre aktive Form überführt werden und als Exekutionscaspasen ihre zellulären Substrate spalten. Der extrinsische Apoptoseweg wird über so genannte Todesrezeptoren vermittelt, die zur Superfamilie der Tumor-Nekrosefaktoren (TNF) gehören und eine intrazelluläre Todesdomäne besitzen (Krammer, 1999; Schmitz et al., 2000). Nach Aktivierung der Rezeptoren durch spezifische Liganden wird das intrazelluläre Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) rekrutiert, welches seinerseits die inaktiven Procaspasen-8 und -10 rekrutiert. Durch diesen „death-inducing signaling complex“ (DISC) kommt es zur Spaltung und Aktivierung der Initiationscaspasen-8 und -10 (Kischkel et al., 1995; Sprick et al., 2000). Auf dem intrinsischen Apoptoseweg setzen die Mitochondrien durch den Einfluss proapoptotischer Stimuli Cytochrom C und andere apoptotische Faktoren frei (Martinou und Green, 2001; Zamzami und Kroemer, 2001). Dies wird unter anderem durch Mitglieder der bcl2-Familie reguliert. Im Cytoplasma bilden Cytochrom C, APAF1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Procaspase-9 das so genannte Apoptosom. In diesem Komplex wird Caspase-9 aktiviert, so dass die aktivierten Initiationscaspasen nun die Exekutionscaspasen-3, -6 und -7 spalten können. Diese werden sowohl auf dem extrinsischen als auch auf dem intrinsischen Weg aktiviert und amplifizieren ihre Aktivität gegenseitig. Die so in Gang gesetzte Caspase-Kaskade sorgt für die Spaltung der zellulären Substrate, was dann zum Tod der Zelle führt (Rathmell und Thompson, 1999). Ein solches zelluläres Substrat ist die Poly-ADP-Ribosepolymerase oder PARP (Lazebnik et al., 1994). Neben der Spaltung der DNA wird auch z. B. Aktin gespalten. Dies führt zum Abbau des Cytoskeletts, was sich durch morphologische Veränderungen der Zelle wie dem „Blebbing“ erkennbar macht.

2.4 Das Wachstumssuppressorprotein p53

Das Wachstumssuppressorprotein p53 wurde vor über 25 Jahren entdeckt und zunächst für ein Onkogen gehalten, bis Levine und Mitarbeiter seine wirkliche physiologische Funktion als Tumorsuppressor beschrieben (Finlay et al., 1989). Mutierte Formen von p53 zeigen oft onkogene Aktivität und wurden mittlerweile in vielen verschiedenen Tumoren gefunden. Heute ist bekannt, dass inaktive Mutanten

und / oder Deletionen von p53 in vielen Tumoren vorkommen und diese mutanten Formen die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor oft nicht mehr ausüben können (Gomez-Lazaro et al., 2004). Als Transkriptionsfaktor aktiviert und reprimiert p53 Zielgene, die seine Wachstumssuppressorfunktion vermitteln und in Wachstumsarrest, Apoptose, Signaltransduktion, Proteindegradation und die Reaktion auf oxidativen Stress involviert sind (Gomez-Lazaro et al., 2004). Aufgrund dieser Funktionen, die bei der Antwort auf zelluläre Schäden und Genommutationen essentiell sind, wird p53 als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Das Protein setzt sich zusammen aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-bindenden Kerndomäne und einer C-terminalen Domäne, die unter anderem für die Oligomerisierung zu aktiven p53-Tetrameren und posttranslationale Modifikationen zuständig ist. p53 wird stark über seinen Proteingehalt reguliert, in dem die normalerweise niedrige Halbwertszeit von 5 – 20 min durch Stresssignale wie Strahlung, Carcinogene und cytotoxische Medikamente, Hypoxie und onkogene Aktivierung von Signalkaskaden drastisch erhöht werden kann. Diese Stabilisierung findet hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene statt, z. B. durch Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Acetylierung oder indirekt durch eine Änderung des Redoxstatus. Phosphorylierungen können dabei z. B. von den Kinasen chk1, chk2, ATM und ATR durchgeführt werden (Gomez-Lazaro et al., 2004). Ein solcher Anstieg resultiert entweder in einem Zellzyklusarrest oder in Apoptose (Abb. 4). Bei einem G₁-Arrest werden Gene wie p21, Retinoblastom oder E2F induziert, wodurch die Zelle arretiert und einen eventuellen DNA-Schaden reparieren kann. Ist dies nicht möglich, so wird Apoptose über p53-Zielgene wie Mitglieder der bcl2-Familie (PUMA, NOXA, bax), p53-induzierte Gene (PIG) oder Todesrezeptoren (CD95, DR5, PIDD) eingeleitet. Jedoch ist p53 nicht nur als Transkriptionsfaktor, sondern auch mittels Interaktion und Modifikation der Funktionen anderer Proteine an der Apoptose beteiligt (Gomez-Lazaro et al., 2004). Das p53-induzierte Gen PIG3 ist zudem in die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eingebunden, welche wichtige Mediatoren der p53-induzierten Apoptose sind (Polyak et al., 1997).

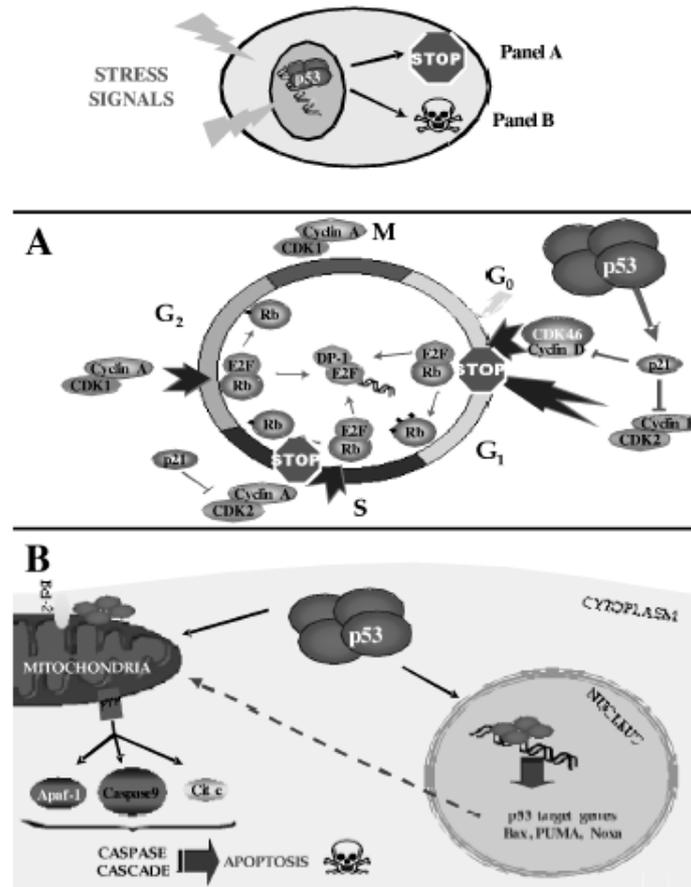


Abbildung 4: Funktionen von p53 in Folge von Stresssignalen. **A.** Zellzyklusarrest **B.** Apoptose (Gomez-Lazaro et al., 2004)

2.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies ist ein Sammelbegriff für reaktive Formen des Sauerstoffs, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören zum einen freie Radikale wie das Hydroxylradikal (OH^\cdot), das Perhydroxylradikal (OOH^\cdot) und das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), aber auch stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit (NO_3^-). Im Organismus können solche Verbindungen in der Atmungskette oder durch Einfluss von Cytochrom P450, Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen und weiteren entstehen. Umweltbedingte Ursachen für die Entstehung von ROS sind z. B. Zigarettenrauch, unausgewogene Ernährung oder radioaktive und UV-Strahlung. Reaktiven Sauerstoffspezies muss im Körper entgegengewirkt werden, da sie das Redoxgleichgewicht stören, welches bei der

Regulation von z. B. Kinase- und Phosphataseaktivität sowie Genexpression von Bedeutung ist. Deshalb existieren enzymatische Systeme, die ROS abbauen und das Redoxgleichgewicht aufrechterhalten. So wandelt die Superoxiddismutase (SOD) $O_2^{\cdot-}$ -Radikale in H_2O_2 um, aus welchem dann unter Mitwirkung der Katalase H_2O entsteht (Fruehauf und Meyskens, 2007). Können die ROS nicht ausreichend beseitigt werden, so kommt es zu Schädigungen durch Lipidperoxidation und Oxidation von DNA und Proteinen (Dröge und Schipper, 2007). Da reaktive Sauerstoffspezies Vermittler der Apoptose sind (Buttke und Sandstrom, 1994), könnten Substanzen, die die Entstehung von ROS fördern, eventuell als Medikamente dienen, welche Apoptose in Tumorzellen induzieren.

2.6 Organische Schwefelverbindungen aus Naturprodukten

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Einnahme von Knoblauch und verwandten Gemüsearten (*Allium spec.*) das Risiko für die Entwicklung verschiedener Tumorkrankheiten senkt (Challier et al., 1998; Gao et al., 1999; Hsing et al., 2002; You et al., 1989). Diese anticarcinogene Wirkung wird hauptsächlich organischen Schwefelverbindungen zugeschrieben, die nach Prozessierung (Schneiden oder Kauen) dieser Gemüsearten gebildet werden (Block, 1992; Milner, 2001). Zu diesen Substanzen gehören Diallylmonosulfid (D_2S), Diallyldisulfid (D_2S_2), Diallyltrisulfid (D_2S_3) und Diallyltetrasulfid (D_2S_4). In verschiedenen Tiermodellen haben Diallylsulfide einen signifikanten Schutz gegen verschiedene Carcinogene wie Benzo[α]pyren (Sparnins et al., 1988), N-Nitrosomethylbenzylamin (Wargovich et al., 1988) und 1,2-Dimethylhydrazin (Sumiyoshi and Wargovich, 1990) gezeigt. Neuere Studien konnten nachweisen, dass organische Schwefelverbindungen die Proliferation kultivierter Zellen durch Zellzyklusarrest und / oder Apoptose inhibieren können (Knowles und Milner, 1998/2000; Sundaram und Milner, 1996; Kwon et al., 2002; Xiao et al., 2004/2005).

2.7 Fragestellung der Arbeit

Verschiedenen Pflanzen der Gattung *Allium* konnte eine anticancerogene Wirkung nachgewiesen werden, welche hauptsächlich den organischen Schwefelverbindungen zugeschrieben wird. Zu diesen Verbindungen gehören die im Knoblauch vorkommenden Diallylsulfide. Besonders für Diallyldi- und Diallyltrisulfid konnte gezeigt werden, dass sie in Zellkulturen Zellzyklusarrest und / oder Apoptose bewirken können. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob synthetische Diallylsulfide das Wachstum von HCT116-Kolonkarzinom-Zellen inhibieren können, inwiefern die Struktur der Verbindungen dabei eine Rolle spielt, welche Signalwege durch Diallylsulfide in Gang gesetzt werden und ob eine Spezifität der Substanzen für Tumorzellen besteht. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem bisher wenig untersuchten Diallyltetrasulfid. Aufgrund des höheren Reinheitsgrades wurden synthetische Substanzen eingesetzt. Des Weiteren soll mittels der schwefelfreien Kohlenstoffanaloge bzw. der gesättigten Dipropylanaloga die Rolle der Diallylsulfidstruktur betrachtet werden, da sowohl die Schwefelkette als auch die beiden Doppelbindungen theoretisch als reaktive Gruppen wirken könnten. Eine mögliche Induktion von Apoptose soll mittels charakteristischer morphologischer Veränderungen und der Spaltung spezifischer zellulärer Substrate nachgewiesen werden, während die Frage, ob es zu einem Zellzyklusarrest kommt, durch Untersuchung der Proteinphosphatase cdc25C geklärt werden soll. Des Weiteren werden eine Beteiligung des Wachstumssuppressorproteins p53 und der Proteinkinase CK2 näher betrachtet. Als möglicher Mediator Diallylsulfid-induzierter Effekte kämen reaktive Sauerstoffspezies in Frage, weshalb eine Entstehung solcher Moleküle ebenfalls untersucht werden soll. Zum Abschluss stellt sich die Frage, inwiefern die in HCT116-Zellen untersuchten Effekte auch in andere Zellen auftreten, wobei zum einen andere Tumorzellen, zum andern aber auch primäre Zellen untersucht werden sollen, da eine eventuelle Resistenz von gesunden Zellen und damit eine spezifische Wirkung von Diallylsulfiden auf Tumorzellen von besonderer Bedeutung für den Einsatz dieser Substanzen als Tumorthapeutika wäre.

3 Material und Chemikalien

3.1 Materialien und Geräte

15 ml / 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Platten für Phosphatase-Assay	Nunc, Wiesbaden
Kulturschalen 100 mm / 60 mm	Greiner, Nürtingen
24-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
6-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACScan	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer Mighty Small™ SE250	Serva (Hoefer)
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Filterpapier 3 mm	Whatman, Maidstone, England
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
GENios Spectra Fluor Plus	Tecan Deutschland, Crailsheim
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma, München
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Meter: pH537	WTW, Weilheim
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
Röntgenfilme AGFA Cronex5	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Transonic 460	Elma, Singen/Htw.
Umkehrmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena
UV-Vis-Spektralphotometer Ultrospec® 2100 pro	Amersham Biosciences, Cambridge (UK)

3.2 Chemikalien und Zusammensetzungen verwendeter Lösungen

Acrylamid-Stammlösung: rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom KG, Berlin
APS	Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	PAA laboratories GmbH, Pasching
Complete™, Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DAPI	Roche, Mannheim
DMAT	Calbiochem® Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
DMEM	GIBCO BRL, life technologies
DMEM/Ham's F12	PromoCell, Heidelberg
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DTT	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
EGF	Calbiochem® Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
FCS	GIBCO BRL, life technologies
FDP	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
G418 (Geneticin)	PAA Laboratorien, Linz, Österreich
H ₂ DCFDA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Hydrocortison	Sigma, München
Hygromycin-B	Clontech, Palo Alto, USA
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ImmunoPure® Immobilized Protein A	Pierce, Rockford, IL
Insulin	Sigma, München
„Lumi-Light“-Detektionslösung	Roche, Mannheim
MTT	Sigma, München

McCoy's 5A	PromoCell, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Polyvinylalkohol MW 72 000	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Prestained SDS-Molekulargewichtstandard	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Propidiumiodid	Sigma, München
Protein Assay (Bradford-Assay)	Bio-Rad, München
RNaseA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sepharose™ CL4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
TEMED	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
TritonX-100	Fluka, Neu-Ulm
Tween20	Fluka, Neu-Ulm

Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)

30% (w/v) Acrylamid

0.8% (w/v) Bisacrylamid

DAPI-Stammlösung

5 µg/ml in PBS

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8.8

0.2 M Glycin

0,5% (w/v) SDS

FDP-Lösung

20 µM FDP

in Waschpuffer (Phosphatase-Assay)

Gellösungen für SDS-Gelelektrophorese

Pufferlösung B (Trenngelpuffer)

375 mM Tris-HCl, pH 8.8

Pufferlösung C (Sammelgelpuffer)

125 mM Tris-HCl, pH 6.8

Mounting Medium

5% (v/v) Polyvinylalkohol MW 72 000

10% Glycerin (v/v)

in PBS

MTT-Lösung

5 mg/ml in PBS

PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Propidiumiodidlösung

400 µg Propidiumiodid / ml H₂O_{deion.}

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

150 mM NaCl

0.5% Natriumdesoxycholat

1% Triton X-100

0.1% SDS

Complete™ 1:25 nach Angaben des Herstellers

SDS-Probenpuffer

- 4% (w/v) SDS
- 200 mM DTT
- 120 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 10 mM β -Mercaptoethanol
- 20% (v/v) Glycerin
- 0.02% Bromphenolblau

Solubilisierungslösung (MTT-Assay)

- 10% SDS
- 0.01 M HCl

Transferpuffer (Western Blot)

- 20 mM Tris-HCl, pH 8.3
- 150 mM Glycin

Trypsin/EDTA-Lösung

- 0.25% (w/v) Trypsin
- 0.1% (w/v) EDTA

Waschpuffer (Phosphatase-Assay)

- 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 1 mM DTT

Waschpuffer (Western Blot)

- 0.1% (v/v) Tween20
- 1% bzw. 5% (w/v) Trockenmilch in PBS, pH 7.4

3.3 Verwendete Antikörper

cdc25C-Antikörper

Zum Nachweis von cdc25C werden verschiedene Antikörper verwendet. **Cdc25C H6** (Santa Cruz) ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der durch Immunisierung mit den Aminosäuren 1-150 des menschlichen cdc25C entstanden ist. Des Weiteren wird das polyklonale Kaninchen-Antikörperserum **NT** eingesetzt, welches gegen eine Peptidsequenz aus den Aminosäuren 134-210 am N-Terminus von cdc25C von Dr. W. Nastainczyk hergestellt wurde.

GAPDH-Antikörper

Bei der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) handelt es sich um ein Enzym der Glycolyse, welches in der Zelle konstitutiv exprimiert wird. Daher kann das etwa 36 kDa große Protein im Western Blot zur Kontrolle der im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragenen Proteinkonzentrationen verwendet werden. Dazu wird der polyklonale Kaninchen-Antikörper FL-335 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) eingesetzt.

p53-Antikörper

Zur Detektion von p53 wird das polyklonale Serum α -p53 eingesetzt, das durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem in der Arbeitsgruppe über His-Tag gereinigten p53-Protein hergestellt wurde.

PARP-Antikörper

Bei dem PARP-Antikörper von Cell Signaling Technology handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper, zu dessen Herstellung mit einem der Caspase-Cleavage-Site entsprechenden synthetischen Peptid immunisiert wurde. Der Antikörper erkennt sowohl das Vollängenprotein als auch die apoptotischen Spaltprodukte der PARP.

Peptidseren gegen CK2

Die Untereinheiten der Proteinkinase CK2 werden mittels spezifischer polyklonaler Kaninchenserum nachgewiesen, die jeweils Epitope im C-terminalen Bereich der jeweiligen Untereinheiten erkennen: Serum **#212** ist

gegen die Aminosäuren 360 - 371 der α -Untereinheit der CK2 gerichtet, Serum **#30** gegen die Aminosäuren 330 - 349 der α' -Untereinheit und Serum **#269** gegen die Aminosäuren 206 - 215 der β -Untereinheit (Faust et al., 1999).

Procaspase-3-Antikörper

Die Detektion von Procaspase-3 erfolgt mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper 8G10 der Firma Cell Signaling.

α -Tubulin-Antikörper

α -Tubulin wird mit dem monoklonalen Mausantikörper DM 1A (Sigma) nachgewiesen und dient wie GAPDH als Ladekontrolle.

Sekundärantikörper

Zur Bindung an die Primärantikörper im Western Blot wird je nach Spezies ein Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Myelomprotein-Peroxidase-Antikörper bzw. ein Ziege-anti-Maus-Ig-Myelomprotein-Peroxidase-Antikörper (beide Dianova, Hamburg) eingesetzt. Die Konjugate lagen in einer Konzentration von 0.8 mg/ml vor. Der Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Antikörper wurde 1:30000 verdünnt und somit in einer Endkonzentration von 0.026 ng/ μ l eingesetzt, während der Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper durch 1:10000-Verdünnung in der Konzentration 0.08 ng/ μ l verwendet wurde.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Verwendete Zelllinien

Zur Durchführung der verschiedenen Versuche wurden die im Folgenden beschriebenen Zelllinien eingesetzt.

EPN

Diese differenzierten und nicht transformierten epithelialen Prostata-Zellen wurden uns von Prof. Tramontano (Benevento, Italien) zur Verfügung gestellt (Sinisi et al., 2002).

HCT116p53wt und HCT116p53^{-/-}

HCT116 sind epitheliale Colonkarzinom-Zellen, die in der Arbeitsgruppe von B. Vogelstein hergestellt wurden (Bunz et al., 1998). Es existieren verschiedene Zelllinien, die sich lediglich in der Expression einzelner Proteine unterscheiden. Hier wurden zum einen die Wildtyp-Form (HCT116p53wt) und zum andern die p53-knockout-Zelllinie (HCT116p53^{-/-}) eingesetzt.

HT29

Auch HT29 sind adherente epitheliale Zellen, die aus einem colorectalen Adenokarzinom entstammen. ATCC-Nr.: HTB-38

MEF

Diese epithelialen Maus-Fibroblasten, die als Beispiel für eine primäre Zelllinie eingesetzt wurden, wurden von Deng et al. (1995) beschrieben.

OvBH1

OvBH1 sind temperatur-sensitive Ovarialkarzinom-Zellen, die Wildtyp-p53 exprimieren (Bar et al., 2002).

Saos-2

Es handelt sich hierbei um eine menschliche Osteosarkom-Zelllinie ohne endogenes p53. Die epithelialen Zellen wachsen als Monolayer. ATCC-Nr.: HTB-85

Saostsp53 138-8+pcDNA und Saostsp53 138-8+cdc25Cwt

Saostsp53 138-8 sind durch stabile Transfektion eines mutanten p53 (Austausch von Alanin 138 zu Valin unter Kontrolle eines CMV-Promotors) in Saos-2 entstanden. Das mutante p53 besitzt bei einer Temperatur von 31°C Wildtyp-Eigenschaften und löst einen Wachstumsarrest aus. Die Zellen wurden der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Römer (Homburg) zur Verfügung gestellt. Aus diesen Zellen wurden von Dr. Sandra Schwindling Saostsp53 138-8+pcDNA und Saostsp53 138-8+cdc25Cwt durch stabile Transfektion des Eukaryonten-Expressionsvektors pcDNA3.1/Hygro(-) unter Kontrolle eines CMV-Promotors ohne bzw. mit cdc25Cwt hergestellt.

4.1.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die hier eingesetzten Zelllinien werden in 100 mm-Kulturschalen (Greiner) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium für die HCT116-Zelllinien dient McCoy's 5A (PromoCell, Heidelberg) mit 10% FCS. HT29, MEF, OvBH1 und Saos-2 werden unter DMEM (GIBCO) mit 10% FCS gehalten. Dies trifft auch auf die Saostsp53 138-8-Zelllinien zu, denen jedoch zusätzlich 200 µg/ml G418 und 50 µg/ml Hygromycin-B zugegeben werden. Das Kulturmedium für EPN besteht aus DMEM/HAM's F12 (PromoCell, Heidelberg) mit 3% FCS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml Insulin und 10 µg/ml Hydrocortison.

4.1.3 Passagieren von Säugerzellen

Zur Überführung adherenter Zellen auf neue Kulturschalen wird nach Absaugen des Zellkulturmediums 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA) zugegeben. Das Trypsin wird kurz danach wieder abgesaugt. Sobald sich die Zellen vom Plattenboden gelöst haben, werden diese in frischem Medium aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wird auf einer neuen Kulturschale verteilt, in die bereits 4 ml Kulturmedium mit den entsprechenden Zusätzen und Antibiotika vorgelegt worden sind.

4.1.4 Einfrieren von Säugerzellen

Zur Lagerung von Säugerzellen über längere Zeiträume können diese in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Dazu werden die Zellen, wie unter 4.1.3 beschrieben, abtrypsiniert, in Kulturmedium aufgenommen und in einem sterilen Röhrchen 7 min bei 4°C und 250xg zentrifugiert. Nach Resuspendierung des Zellsedimentes in 0.5 ml Kulturmedium mit 40% FCS werden unter ständigem Schütteln tropfenweise 0.5 ml Kulturmedium mit 20% DMSO zugegeben. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen überführt und 2 Stunden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wird.

4.1.5 Tauen von Säugerzellen

Die gefrorene Zellsuspension wird möglichst schnell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in ein steriles Röhrchen überführt und durch langsame Zugabe des zehnfachen Volumens an Zellkulturmedium verdünnt. Nach Zentrifugation für 7 min bei 4°C und 250xg wird das Sediment in frischem Kulturmedium mit 10% FCS sowie den für die entsprechende Zelllinie benötigten Zusätzen resuspendiert und in eine frische Kulturschale überführt.

4.1.6 Beseitigung von Kontaminationen

Bei bakteriellen Kontaminationen werden nach Wechsel des Mediums 10 μl Penicillin/Streptomycin (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium zugegeben. Zur Beseitigung stärkerer Kontaminationen werden die Zellen wie beschrieben trypsiniert, bei 4°C und 250xg für 7 min zentrifugiert und das Sediment wird in frischem, mit Antibiotika versetzten Medium aufgenommen und auf eine neue Kulturschale ausgesät.

Hefe- und Pilzkontaminationen werden mit 10 μl Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$; Biochrom, Berlin) pro ml Zellkulturmedium behandelt.

4.1.7 Behandlung der Zellen mit Diallylsulfiden und ihren Analoga

Die hier eingesetzten Diallylsulfide, also Diallylmono-, -di-, -tri- und -tetrasulfid, die dem Mono- und Tetrasulfid entsprechenden Propyl-Analoga sowie die schwefelfreien Kohlenstoff-Analoga Heptadien und Decadien wurden uns von der Arbeitsgruppe von Dr. Jacob für Bioorganische Chemie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die Verbindungen liegen in reiner Form vor und werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Es wird eine Stocklösung mit einer Konzentration von 80 mM hergestellt, welche im Verhältnis 1:2000 in das jeweilige Kulturmedium der zu behandelnden Zellen gegeben wird, so dass eine Endkonzentration von 40 μM erreicht wird. Diese Suspension wird nach Absaugen des alten Mediums zu subkonfluenten Zellen gegeben, die am Vortag ausgesät wurden und am Boden der Kulturschale angewachsen sind. Als Lösemittelkontrolle werden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration an DMSO (0.05%) in gleicher Weise behandelt. Zur Untersuchung höherer Diallylsulfidkonzentrationen werden entsprechend konzentriertere Stammlösungen verwendet, für geringere Konzentrationen wird die Stammlösung entsprechend verdünnt. Um die Stabilität der Diallylsulfide zu sichern, wurden die Stammlösungen höchstens 2 – 3 Tage bei -20°C aufbewahrt.

4.1.8 Ermittlung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl der lebenden Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wird eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Dazu werden die Zellen wie beschrieben durch Trypsinieren vom Schalenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Von dieser Lösung werden 10 – 20 µl mit dem gleichen Volumen Trypanblau zur Anfärbung toter Zellen vermischt. Diese Suspension wird bis zum Rand in die beiden Kammern der Neubauer-Zählkammer gefüllt. Beträgt nach Auszählen der 4 äußeren Großquadrate des Rasters die Abweichung zwischen den beiden Kammern weniger als 15%, wird der Durchschnittswert der insgesamt acht Quadrate ermittelt, wobei die 1:1-Verdünnung durch Trypanblau berücksichtigt werden muss. Da das Volumen jedes Großquadrates 0.1 µl beträgt, kann durch Multiplikation des errechneten Mittelwertes mit 10^4 die Zahl der Zellen pro ml ermittelt werden.

4.1.9 Ermittlung des Anteils metabolisch aktiver Zellen

Zur Bestimmung des Anteils metabolisch aktiver Zellen wird ein MTT-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid; Sigma) in ein violettes Formazan unter Oxidation von NADH und NADPH (Abbildung 5), wozu nur lebende Zellen in der Lage sind. Die Reaktion läuft zellzyklusunabhängig in den Mitochondrien ab und wird von der Succinatdehydrogenase katalysiert. Nach Solubilisierung der entstandenen Formazankristalle kann die Absorption der Lösung im ELISA-Reader (BioRad) bestimmt werden. Die Intensität der Färbung kann somit als relatives Maß für den Anteil metabolisch aktiver Zellen herangezogen werden.

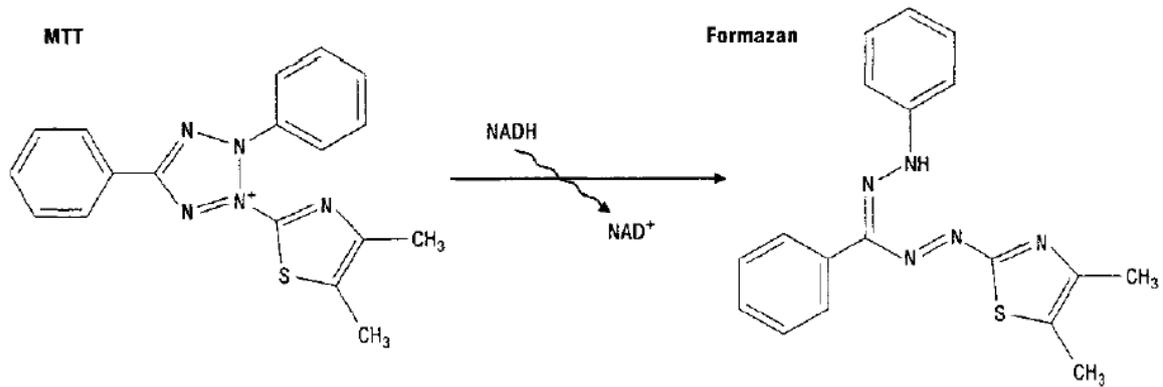


Abbildung 5: Reduktion von MTT zu Formazan durch die Succinat-Dehydrogenase [Roche molecular biochemicals: Apoptosis and cell proliferation, 2nd edition].

Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wie unter 4.1.8 beschrieben werden pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte 1×10^3 Zellen in 500 μl Medium ausgesät und am nächsten Tag wie unter 4.1.7 beschrieben mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Vier Stunden vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten werden 50 μl MTT (5 mg/ml) zugegeben. Die Inkubation wird durch Zugabe von 500 μl Solubilisierungslösung (10% SDS, 0.01 M HCl) beendet, welche die Zellen bei 37°C über Nacht lysiert. Am nächsten Tag werden 3 x 200 μl pro Vertiefung entnommen und in 96-Loch-Platten überführt. Der Mittelwert der 3 Messungen für jede Probe bildet die Grundlage zur Berechnung der relativen Lebensfähigkeit der Zellen. Die Absorption wird im ELISA-Reader bei 595 nm bestimmt. Zur Ermittlung des Anteils metabolisierender Zellen wird die Absorption der mit DMSO als Lösemittel behandelten Zellen gleich 100% lebende Zellen gesetzt.

4.1.10 Ernten von Zellen

Die hier verwendeten Zellen werden mit dem Medium geerntet, da auch apoptotische Zellen, die sich vom Schalenboden gelöst haben, aufgenommen werden sollen. Dazu wird das Medium in ein 15 ml-Röhrchen überführt und auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 1 – 2 ml kaltem PBS (pH 7.4) werden die Zellen mit einem Schaber abgelöst und die Zellsuspension wird zu dem abgenommenen Medium gegeben. Dieser Schritt wird wiederholt. Alternativ können die Zellen auch abtrypsiniert werden, wobei diese Zellen ebenfalls durch zweimalige Zugabe von PBS aufgefangen und in das 15 ml-Röhrchen überführt werden. Nach Zentrifugation der Zellen für 7 min bei 4°C und 250xg wird der

Überstand verworfen und die Zellen durch erneute Resuspendierung des Sedimentes in PBS sowie anschließende Zentrifugation gewaschen. Das nun erhaltene Sediment kann entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

4.1.11 DAPI-Färbung

Durch das Fluorochrom DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) wird DNA spezifisch angefärbt. Eine solche Färbung ermöglicht die Unterscheidung des Zellkerns von anderen zellulären Strukturen. Auf diese Weise können morphologische Veränderungen des Zellkerns durch Diallylsulfid-Behandlung im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden, wobei auch die Gesamtzelle mittels Durchlichtmikroskopie untersucht werden kann.

Dazu werden die Zellen zunächst auf Deckgläsern in 60 mm-Kulturschalen so ausgesät, dass sie beim Fixieren zu 80% konfluent sind. Die Behandlung der Zellen mit Diallylsulfiden wird wie unter 4.1.7 beschrieben durchgeführt. Es wird eine feuchte Kammer hergestellt, indem feuchtes Filterpapier in eine 145 mm-Kulturschale gelegt und mit Parafilm bedeckt wird. Nach dreimaligem Spülen der Zellen mit PBS durch leichtes Schwenken der Schalen werden die Deckgläser mit der Zellseite nach oben in die feuchte Kammer gelegt. Auf jedes Deckglas werden 50 μl DAPI in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Methanol pipettiert und 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Auf einen separaten Fixationsschritt kann verzichtet werden, da Methanol nicht nur als Lösemittel von DAPI dient, sondern die Zellen auch auf den Deckgläsern fixiert. Die Zellen werden im Anschluss 3 x 5 min mit PBS sowie 2 x 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Eindecken der Zellen mit Mounting Medium auf Objektträgern können die Zellen nach etwa einer halben Stunde Trockenzeit im Mikroskop „Axioskop“ der Firma Zeiss betrachtet werden oder für wenige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur längeren Lagerung sollten die Ränder der Deckgläser mit Nagellack abgedichtet werden, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern.

4.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

4.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Alle Vorgänge zur Herstellung von Zellextrakten laufen unter Kühlung auf Eis ab. Die Zellen werden wie unter Punkt 4.1.10 beschrieben geerntet und das erhaltene Sediment aus den Zellen einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte wird je nach Dichte in 50 – 100 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) mit Proteaseinhibitor (Complete™, 1:25) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wird die Suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 3 x 1 min im Eisbad sonifiziert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 16000xg für 30 min. Zur Weiterverarbeitung wird der die Proteine enthaltende Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte können kurzfristig bei -20°C sowie über längere Zeiträume bei -80°C gelagert werden.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes einer Proteinlösung werden meist Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien herangezogen. Da die Konzentration der reagierenden Gruppen proportional zur Intensität des Farbstoffes ist, kann diese photometrisch anhand einer Eichgeraden nachgewiesen werden. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford werden dazu blaue Säurefarbstoffe wie Coomassie-Brilliantblau G250 eingesetzt, welches in saurem Milieu und in Anwesenheit von Proteinen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm erfährt. Dies kommt vermutlich aufgrund einer Stabilisierung des Farbstoffes durch Komplexbildung mit dem Protein zustande.

Die Proteinbestimmung eines Zellextrakts erfolgt mit dem Proteinassay Kit von Bio-Rad. Dazu wird 1 µl des Lysats mit 800 µl destilliertem Wasser und 200 µl Bio-Rad-Protein Assay-Reaktionsreagenz vermischt. Nach 5 min Reaktionszeit wird die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert aus destilliertem Wasser und Bradfordreagenz im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand

einer Eichgeraden aus Rinderserumalbumin (BSA) abgelesen und in [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] angegeben.

4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine eines Gesamtzellextraktes werden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese beruht darauf, dass sich Moleküle im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Ladung und ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch eine Gelmatrix bewegen. Diese Gelmatrix entsteht bei einem Polyacrylamidgel durch die Polymerisation von Acrylsäureamid. Zur Erhöhung der mechanischen Stabilität wird N,N'-Methylenbisacrylamid zugegeben, wodurch eine Quervernetzung der Polyacrylamidketten stattfindet. Je höher der Anteil an N,N'-Methylenbisacrylamid, desto geringer ist die Porengröße des Gels. Die Polymerisationsreaktion wird durch APS gestartet, das in Wasser freie Radikale bildet. Als Katalysator wird TEMED zugegeben, welches in wässriger Lösung Radikale stabilisieren kann. Es wird eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, bei welcher zwei Gele unterschiedlicher Dichte übereinander geschichtet werden: ein engporiges Trenngel zur Auftrennung der Proteine sowie darüber ein weitporiges Sammelgel zur Fokussierung der Proteingemische an der Sammelgel/Trenngel-Grenze. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS auf 95°C erhitzt, so dass Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe von β -Mercaptoethanol aufgespalten. Durch Bindung von SDS an die Proteine überdeckt die negative Ladung des SDS die Nettoladungen der Proteine, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel allein von der Molekülgröße der Proteine sowie der Porengröße des Gels abhängt.

4.2.3.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen erfolgt in einem vertikalen Gießstand, in dem bis zu 5 Gele gleichzeitig gegossen werden können. Vor dem Zusammenbauen

der Kammer werden die Glasplatten, Kämme und Abstandshalter mit Ethanol entfettet. Danach wird das Trenngel, bestehend aus einer 30% (w/v) Acrylamid / 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid- Stammlösung (Roth, Lösung A), dem Trenngelpuffer (Lösung B), Wasser, 0.1% (w/v) APS und 0.2% (v/v) TEMED je nach gewünschter Acrylamidkonzentration zusammengemischt und in den Gießstand gegossen, so dass dieser zu etwa $\frac{3}{4}$ gefüllt ist. Etwaige Luftblasen werden durch Aufklopfen des Gießstandes entfernt und die Oberfläche der Gele wird mit Isopropanol beschichtet. Um ein Zusammenziehen des Geles zu vermeiden, werden die Kämme eingesteckt. Ist das Trenngel auspolymerisiert, wird der Gießstand bis zum oberen Rand mit Sammelgel aus Lösung A, Sammelgelpuffer (Lösung C), 0.05% (w/v) APS und 0.06% (v/v) TEMED aufgefüllt und die Kämme werden eingesteckt. Die auspolymerisierten Gele können in feuchtes Papier eingeschlagen bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Die genauen Zusammensetzungen der Trenngele verschiedener Konzentrationen sowie der 4.3%igen Sammelgele ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: A. Zusammensetzungen von 7.5%igen und 12.5%igen Trenngelen. B. Zusammensetzung des 4.3%igen Sammelgels

A

Trenngel	7.5%	12.5%
Lösung A [ml]	9	15
Lösung B [ml]	9	9
Wasser [ml]	18	12
APS [μ l]	200	200
TEMED [μ l]	20	20

B

Sammelgel	4.3%
Lösung A [ml]	2.2
Lösung C [ml]	3.8
Wasser [ml]	9
APS [μ l]	100
TEMED [μ l]	40

4.2.3.2 Durchführung einer SDS-PAGE

Die Gelelektrophorese wird in einer mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.2 M Glycin, 0.5% (w/v) SDS) gefüllten Minigelapparatur durchgeführt. Das der

jeweiligen Proteinmenge entsprechende Volumen des Zellextraktes wird mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Als Größenmarker wird der gefärbte Molekulargewichtstandard "Prestained Molecular Weight Marker" der Firma Fermentas eingesetzt, welcher die folgenden Proteine enthält: β -Galactosidase (117 kDa), bovines Serumalbumin (85 kDa), Ovalbumin (48 kDa), Carboanhydrase (34 kDa), β -Lactoglobulin (26 kDa) und Lysozym (19 kDa). Marker und Proben werden auf der Kathodenseite in die Geltaschen pipettiert. Aufgetrennt werden die Proteine bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Wenn die Bromphenolfront des SDS-Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht, wird die Elektrophorese beendet. Zum Nachweis einzelner Proteinbanden in den verschiedenen Spuren wird das Gel in einen Western Blot (s. 4.2.4) eingesetzt.

4.2.4 Western Blot-Analyse

Der eigentliche Western Blot bezeichnet die Übertragung der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran, hier eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Boehringer, Mannheim), mittels eines elektrischen Feldes. Die durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haftenden Proteine können mittels Immunodetektion spezifisch nachgewiesen werden.

4.2.4.1 Western Blot

Die Übertragung der Proteine erfolgt über Nacht bei 120 mA in einem mit Transferpuffer aus 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 und 150 mM Glycin gefüllten vertikalen Puffertank, an dessen Seitenwänden die Elektroden angebracht sind. Das Gel und die durch kurzes Schwenken in Methanol benetzbar gemachte Membran werden „sandwichartig“ zwischen Filterpapier, Schwämme und 2 Gitterplatten gepresst und senkrecht in den Puffertank gestellt, wobei darauf zu achten ist, dass die Membran zur Anodenseite zeigt.

4.2.4.2 Immunodetektion von Proteinen

Die indirekte immunologische Detektion von Proteinen basiert auf der Bindung spezifischer Primärantikörper an die jeweils gewünschten Proteine, während die eigentliche Detektion mit Sekundärantikörpern erfolgt, die speziesspezifisch an die F_c-Region der jeweiligen Primärantikörper binden. Diese Sekundärantikörper sind Peroxidase-konjugiert. Durch Einsatz des Substrates „Lumi-Light“ der Firma Roche ist ein Nachweis der Chemilumineszenz der geblotteten Proteine möglich. Zur Immunfärbung wird die Membran nach Beendigung des Transfers mindestens 1 h in Waschpuffer mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver zur Verminderung unspezifischer Bindungen an die Membran inkubiert. Im Anschluss werden die jeweiligen monoklonalen Maus- oder Kaninchen-Antikörper in geeigneter Verdünnung zu Waschpuffer mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver gegeben und die Membran wird je nach Sensitivität des Antikörpers für 1 h bis über Nacht darin geschwenkt. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wird die Membran 2 x 5 min in Waschpuffer inkubiert und danach in einer entsprechenden Verdünnung von sekundärem Antikörper (anti-Maus-Antikörper: 1:10000 bzw. anti-Kaninchen-Antikörper: 1:30000) in Waschpuffer mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver 1 Stunde geschwenkt. Nach erneutem Waschen der Membran mit Waschpuffer wird sie mit „Lumi-Light“-Detektionslösung (Roche) gemäß den Herstellerangaben entwickelt. Bei Bedarf kann dieser Vorgang – auch mit anderen Antikörpern – wiederholt werden. Dazu wird die Membran kurz in Methanol geschwenkt und zwischen zwei Filterpapieren im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

4.3 Methoden zur Charakterisierung von Apoptose

4.3.1 Spaltung der Procaspase-3

Die Cystein-Aspartat-Proteasen oder Caspasen sind Schlüsselproteine aller apoptotischen Vorgänge. Sie liegen in nicht-apoptotischen Zellen als inaktive Zymogene vor, welche durch Spaltung in aktive Caspasen überführt werden. Somit lässt eine Abnahme der so genannten Procaspase auf eine Zunahme des

entsprechenden aktiven Proteins schließen. In diesem Fall wird mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper 8G10 (cell signaling) ein spezifischer Antikörper gegen Procaspase-3 im Western Blot eingesetzt.

Dazu werden SDS-PAGE und Western Blot wie unter 4.2.3 bzw. 4.2.4 beschrieben durchgeführt, wobei der Antikörper 8G10 in Waschpuffer mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver 1:1000 verdünnt wird und die Membran über Nacht mit der Antikörperlösung inkubiert wird. Der Sekundärantikörper wird in einer Verdünnung von 1:3000 in Waschpuffer mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver für 1 h bei RT eingesetzt.

4.3.2 Spaltung von Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP-Spaltung)

Die Poly-ADP-Ribosepolymerase ist ein Substrat der Caspase-3, welche das 113 kDa große Vollängenprotein in Fragmente von 89 und 24 kDa spaltet. Da es sich bei Caspase-3 um eine Exekutionscaspase handelt, ist die PARP-Spaltung ein spätes Ereignis innerhalb der apoptotischen Vorgänge. Dadurch ist gewährleistet, dass Zellen, die eine PARP-Spaltung aufweisen, auf jeden Fall der Apoptose unterzogen werden.

Der Nachweis erfolgt mittels der in 4.2.3 beschriebenen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 7.5%igen Polyacrylamid-Gel und einer anschließenden Western Blot-Analyse (4.2.4). Zur Immunodetektion wird ein Anti-PARP-Antikörper der Firma Cell Signaling 1:1000 in PBS mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Auf diese Weise sind sowohl das Vollängenprotein und das 89 kDa-Spaltprodukt nachweisbar.

4.4 Nachweis der cdc25C-Aktivität

Zum Nachweis der cdc25C-Aktivität muss die Phosphatase zunächst aus einem Zellextrakt isoliert werden, bevor sie einem luminometrischen Phosphataseassay

unterzogen werden kann. Die Isolierung erfolgt durch Immunpräzipitation mit Hilfe von Protein A-Sepharose.

4.4.1 Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Reinigung von Molekülen aus einem Gemisch durch die Immobilisierung spezifischer Antikörper an einer Matrix. In diesem Fall liegt an Sepharose gebundenes Protein A vor, an welches Antikörper mit ihrem F_c-Teil binden. Die somit fixierten Antikörper fangen die bindenden Proteine ab, da der Komplex sedimentiert und unspezifische Moleküle im Überstand verbleiben. In mehreren Vorpräzipitationsschritten werden zunächst unspezifisch an Protein A-Sepharose bindende Substanzen aus dem Gemisch entfernt, bevor dieses auf Protein A-Sepharose gegeben wird, an welcher die Antikörper bereits vorgebunden wurden. Bei den hier eingesetzten Substanzgemischen handelt es sich um nach 4.2.1 hergestellte Zellextrakte.

Zur Immunpräzipitation werden für jeden Inkubationsschritt je 30 µl Protein A-Sepharose (Bettvolumen) eingesetzt. Die Protein A-Sepharose wird hergestellt aus einer 50%igen Stammlösung von Sepharose™ CL4B (Pharmacia, Biotech) in 20% Ethanol und einer 50%igen Agarose ImmunoPure® Immobilized Protein A (Pierce, Rockford, IL), welche im Verhältnis 3:1 gemischt und dreimal in PBS gewaschen werden. Dazu wird das gleiche Volumen PBS zugegeben und die Suspension wird 2 Minuten bei etwa 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils verworfen. Auf 30 µl Protein A-Sepharose werden 100 µl Zellextrakt mit einem Proteingehalt von 500 µg gegeben und das Gemisch wird 90 min bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Danach wird die Protein A-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wird verworfen, der Überstand wird auf ein frisches Aliquot Protein A-Sepharose überführt, welche mit 10% BSA in PBS zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen 90 min bei 4°C vorbehandelt worden war. Dieser Ansatz wird ebenfalls 90 min bei 4°C inkubiert. Diese beiden Schritte, die Vorpräzipitate (VPs), dienen der Eliminierung unspezifisch an die Protein A-Sepharose bindender Proteine. Nach dem Zentrifugationsschritt wird der Überstand des zweiten VPs auf Protein A-Sepharose überführt, um die eigentliche Immunpräzipitation durchzuführen. Die Protein A-

Sepharose für dieses Immunpräzipitat (IP) wurde zuvor je 90 min bei 4°C mit 10% BSA in PBS sowie dem präzipitierenden Antikörper NT (10 µl Antikörperlösung in 100 µl PBS) vorinkubiert. Auf die Protein A-Sepharose des zweiten VPs werden 100 µl RIPA-Puffer gegeben. Nach erneuten 90 min bei 4°C werden das zweite Vor- sowie das Immunpräzipitat dreimal mit 200 µl RIPA-Puffer gewaschen.

Sollen Immunpräzipitate von cdc25C im Anschluss in einem Phosphatase-Assay eingesetzt werden, so wird die Präzipitation in einem dreifachen Ansatz durchgeführt, welcher nach dem letzten Waschschrift in gleiche Aliquots aufgeteilt wird, so dass eine Dreifachbestimmung im Phosphatase-Assay durchgeführt werden kann. Immunpräzipitate könnten aber auch durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und 5minütiger Denaturierung bei 95°C eluiert werden. Der Überstand der abzentrifugierten Präzipitate wird dann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgt im Western Blot, wobei darauf zu achten ist, dass der zur Detektion verwendete Antikörper aus einer anderen Spezies stammt als der präzipitierende Antikörper, da sonst der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper an beide Primärantikörper bindet. Dies spielt vor allem beim Nachweis von cdc25C unter denaturierenden Bedingungen eine Rolle, da dieses durch sein Molekulargewicht von 55 kDa auf derselben Höhe im Gel zu erwarten ist wie die schweren Ketten der Antikörper.

4.4.2 Bestimmung der cdc25C-Aktivität mittels FDP-Phosphataseassay

Die Aktivität von Phosphatasen kann anhand des Substrates Fluoresceindiphosphat (FDP), dessen Struktur in Abbildung 6 dargestellt ist, bestimmt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass FDP durch Dephosphorylierung in das schwach fluoreszierende Fluoresceinmonophosphat bzw. das stark fluoreszierende Fluorescein übergeht. Durch Anregung der Fluoreszenz bei 485 nm ist bei 535 nm eine Emission messbar, die proportional zur Aktivität der eingesetzten Phosphatase ist (Rice et al., 1997). Da diese Reaktion nicht für bestimmte Phosphatasen spezifisch ist, können nur isolierte Proteine eingesetzt werden.

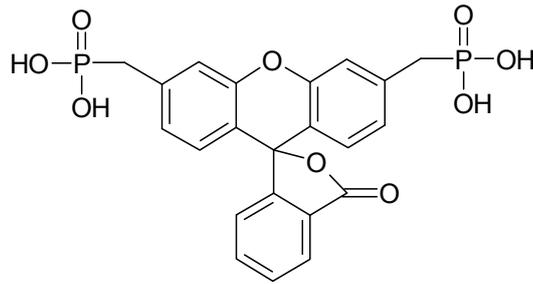


Abbildung 6: Struktur von Fluoresceindiphosphat

In diesem Fall wird daher cdc25C wie in 4.4.1 beschrieben immungereinigt und aufgeteilt, so dass eine Dreifachbestimmung der Aktivität durchgeführt werden kann. Nach dem dritten Waschschrift der Immunpräzipitate mit RIPA-Puffer werden diese in Waschpuffer für Phosphatase-Assay überführt und erneut gewaschen. Als Kontrolle wird das 2. Vorpräzipitat zu jedem IP mitgeführt und ebenso behandelt wie das IP. Die Proben werden in je 150 µl FDP-Lösung aufgenommen, in 96-Lochplatten pipettiert und in einem „Fluorescence-Reader“ (GENios Spectra Fluor Plus, Tecan) bei 32°C vermessen. Es wird eine Kinetik aufgenommen, in dem über einen Verlauf von 2 h alle 10 min die Fluoreszenz gemessen wird. Nach Abzug der Fluoreszenz der VPs wird die Fluoreszenzintensität der IPs gegen die Zeit aufgetragen, so dass sich eine Ausgleichsgerade ergibt, deren Steigung als Maß für die relative Aktivität von cdc25C in behandelten Zellen herangezogen wird. Dazu wird die Aktivität von cdc25C in Kontrollzellen gleich 100% gesetzt und mit der Aktivität in behandelten Zellen verglichen.

4.5 Durchflusscytometrische Methoden

4.5.1 FACS-Analyse

Die Durchflusscytometrie ermöglicht die optische Messung einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel. Sie beruht auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, also der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten

Fluorochromen [Genzlinger, 1998]. Bei der hier durchgeführten fluoreszenzaktivierten Zelltrennung (fluorescence activated cell sorting, FACS) wird die DNA der einzelnen Zellen einer Zellpopulation mit Propidiumiodid angefärbt. Auf diese Weise wird der DNA-Gehalt der verschiedenen Zellen bestimmt, wodurch diese den unterschiedlichen Zellzyklusphasen zugeordnet werden können. Ebenso sind apoptotische Zellen nachweisbar, da diese einem DNA-Gehalt von weniger als $n = 2$ aufweisen und somit von den Zellzyklusphasen unterscheidbar sind.

Subkonfluente Zellkulturen werden wie unter 4.1.10 beschrieben durch Trypsinierung geerntet. Nach Zentrifugation (7 min, 250 x g, 4°C) wird das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen werden 2 ml eiskaltes 70%iges Ethanol unter Schütteln tropfenweise zugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. An diesem Punkt kann der Arbeitsvorgang unterbrochen werden und die Zellen können bei -20°C gelagert werden. Die fixierten Zellen werden erneut zentrifugiert und das Pellet in 800 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl RNaseA (1 mg/ml, Roth) und 100 µl Propidiumiodid (400 µg/ml; Sigma) erfolgt eine 30minütige Inkubation bei 37°C. Da Propidiumiodid sich als interkalierender Farbstoff sowohl in doppelsträngige RNA als auch in DNA einlagern kann, muss durch Verdau mittels RNaseA der Abbau der doppelsträngigen RNA gewährleistet werden, um ein Verfälschen des Ergebnisses zu verhindern. Propidiumiodid wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und fluoresziert bei 630 nm. Durch die Messung dieser Fluoreszenz kann die Verteilung des DNA-Gehaltes innerhalb der Zellpopulation bestimmt werden. Pro Zellpopulation werden 20 000 Zellen mit einer Rate von ca. 100 – 200 Zellen pro Sekunde mit dem Durchflusscytometer FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson) gezählt. Mit Hilfe der zugehörigen Auswertungssoftware werden die einzelnen Zellzyklusanteile errechnet und in einem Histogramm dargestellt.

4.5.2 Färbung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Existenz von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle kann durch Messung des Fluorochroms 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) nachgewiesen werden. Dieser Farbstoff wurde ursprünglich zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid in wässrigen Lösungen eingesetzt (Cathcart et al., 1983; Keston et

al., 1965). Für den Nachweis von ROS wurde die Methode als zuverlässig, sensitiv und spezifisch beschrieben (LeBel et al., 1992). Bei H₂DCFDA handelt es sich um die chemisch reduzierte und acetylierte Form des 2',7'-Dichlorofluoresceins (DCF), die erst nach Entfernung der Acetylgruppen durch intrazelluläre Esterasen und Oxidation fluoresziert. Auf diese Weise können H₂O₂, [•]OOH und NO₃⁻ detektiert werden. Die Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffes ist in Abbildung 7 dargestellt.

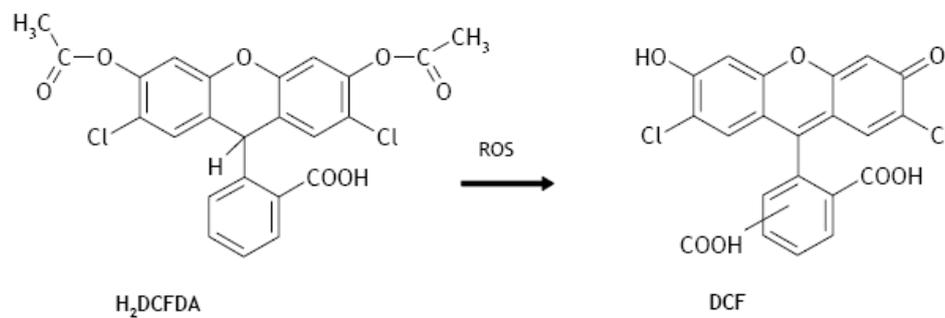


Abb. 7: Reaktion von H₂DCFDA zu DCF durch ROS (Knerr, 2006)

Die Zellen werden, wie bereits beschrieben, ausgesät und behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wird das Kulturmedium entfernt und die Zellen werden in frischem Medium (RT) ohne FCS gewaschen und im Anschluss abtrypsiniert. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml FCS-freiem Medium werden die Zellen in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µM H₂DCFDA 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 1000 rpm inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wird der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird ebenfalls in frischem Medium aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgt am Durchflusscytometer FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson) mit dem Programm CellQuest und der entsprechenden Auswertungssoftware.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von Diallylsulfiden auf die Lebensfähigkeit von HCT116-Zellen

Diallylsulfide dienen den *Allium*-Arten, in denen sie natürlicherweise vorkommen, als Abwehrmechanismus. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Stoffe eine toxische Wirkung auf die Zellen der Fressfeinde, also auch Säugerzellen, haben. So wurde in verschiedenen Untersuchungen für Diallyldisulfid, aber auch für Diallylmono- und Diallyltrisulfid ein negativer Einfluss auf die Lebensfähigkeit verschiedener Zellsysteme beobachtet (Hong et al., 2000; Hosono et al., 2005; Kwon et al., 2002; Sundaram und Milner, 1996). Dabei ist ein eindeutiger Trend erkennbar, demzufolge die Anzahl der Schwefelatome in direktem Verhältnis zu der wachstumshemmenden Potenz des jeweiligen Stoffes steht. Hier soll nun die Wirkung der Diallylsulfide auf HCT116-Kolonkarzinom-Zellen untersucht werden. Diese Zellen wurden ausgewählt, da zu diesem System neben den Wildtyp- Zellen verschiedene Varianten existieren, die sich in der Expression bestimmter Proteine unterscheiden (Bunz et al., 1998). So wurden hier für das Tumorsuppressorprotein p53wt positive (HCT116p53wt) sowie negative Zellen (HCT116p53^{-/-}) vor ansonsten identischem zellulärem Hintergrund eingesetzt, wodurch der Einfluss von p53 auf die durch Diallylsulfide initiierten Vorgänge in der Zelle untersucht werden konnte.

5.1.1 Diallylsulfide hemmen das Wachstum von HCT116p53wt-Zellen in Abhängigkeit von der Schwefelkettenlänge

Bei den hier untersuchten Diallylsulfiden handelt es sich um die Pflanzeninhaltsstoffe Diallylmono- (D₂S), Diallyldi- (D₂S₂) und Diallyltrisulfid (D₂S₃) sowie das bisher nicht auf seine wachstumshemmende Wirkung untersuchte Diallyltetrasulfid (D₂S₄) (Abb. 8). Alle Stoffe lagen in synthetischer Form vor und wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. C. Jacob für Bioorganische Chemie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die Verwendung synthetischer Verbindungen hat

den Vorteil, dass diese durch mehrere Reinigungsschritte einen höheren Reinheitsgrad aufweisen als aus Pflanzen isolierte Substanzen.

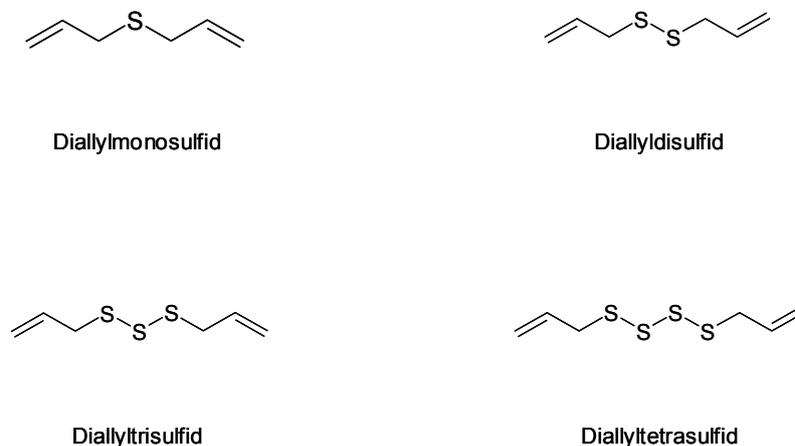


Abbildung 8: Struktur der Diallylsulfide

Die verschiedenen Verbindungen wurden zunächst auf ihren wachstumshemmenden Effekt in HCT116p53wt-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen 8, 24 bzw. 48 h mit Diallylsulfiden in Konzentrationen von je 40 μ M in 0.05% DMSO sowie 0.05% DMSO als Lösemittelkontrolle behandelt und im Anschluss einem MTT-Assay zur Überprüfung des Anteils lebender Zellen unterzogen. Dieser Assay beruht auf der Umwandlung des gelben 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) zu violetterm Formazan, welche nur an den Mitochondrien lebender Zellen stattfinden kann und photometrisch nachweisbar ist. Die in 24-Loch-Platten ausgesäten und mit Diallylsulfiden behandelten Zellen wurden 4 h vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit mit MTT versetzt und nach der Inkubation lysiert, wodurch das Formazan solubilisiert wurde. Danach wurde die Absorption vermessen und die Werte der mit Diallylsulfiden behandelten Proben wurden ins Verhältnis zur Absorption der Lösemittelkontrolle gesetzt, woran die relative Lebensfähigkeit der Zellen abgelesen werden konnte. Der Einfluss der vier untersuchten Diallylsulfide auf HCT116p53wt ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei ändert sich die Lebensfähigkeit der Diallylsulfid-behandelten Zellen nach 8 h Inkubationszeit nicht signifikant, während

nach 24 bzw. 48 h eine deutliche Reduktion des Anteils lebender Zellen nach Diallyldi-, -tri- und -tetrasulfid-Behandlung auftritt. Während nach 24 bzw. 48 h Diallyldisulfid-Behandlung noch 85% bzw. 72% der Zellen einen Stoffwechsel aufweisen, verringert Diallyltrisulfid diesen Anteil auf 71% bzw. 44% und Diallyltetrasulfid sogar auf 65% bzw. 38%. Da die Lebensfähigkeit der Zellen durch Diallylmonosulfid kaum beeinflusst wird, bestätigt sich auch in HCT116p53wt-Zellen die Tendenz, dass sich die Länge der Schwefelkette verstärkend auf die Wachstumshemmung durch Diallylsulfide auswirkt.

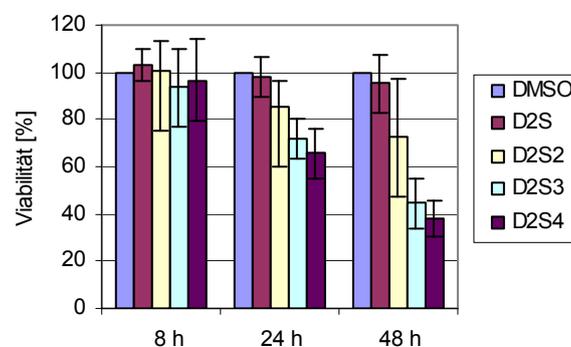


Abbildung 9: Die Reduktion der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen durch Diallylsulfide ist abhängig von der Anzahl der Schwefelatome. HCT116p53wt wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 8 h, 24 h sowie 48 h mit 0.05% DMSO (DMSO), 40 μ M Diallylmono- (D_2S), -di- (D_2S_2), -tri- (D_2S_3) bzw. -tetrasulfid (D_2S_4) behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde mit 100% Viabilität gleichgesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die im MTT-Assay gemessene Reduktion der Absorption wäre jedoch auch durch eine unerwünschte Interaktion zwischen den eingesetzten Diallylsulfiden und MTT erklärbar. Um zu bestätigen, dass diese Abnahme auf einem verringerten Stoffwechsel der behandelten Zellen beruht, muss der direkte Effekt von MTT auf die Diallylsulfide untersucht werden.

5.1.2 Die Abnahme der Lebensfähigkeit beruht nicht auf einer Wechselwirkung von Diallylsulfiden mit MTT

Um eine Wechselwirkung der Diallylsulfide mit dem zum Nachweis der Lebensfähigkeit verwendeten Farbstoff MTT auszuschließen, welche die Ergebnisse verfälschen könnte, wurden 0.05% DMSO und 40 μM Diallylmono-, Diallyldi-, Diallyltri- bzw. Diallyltetrasulfid je 8, 24 sowie 48 h in Zellkulturmedium, aber ohne Zellen in 24-Loch-Platten inkubiert und in einem MTT-Assay untersucht. Abbildung 10 zeigt, dass es ohne das Vorhandensein von Zellen nicht zu einer Abnahme der Absorption kommt. Die für Diallyltetrasulfid gemessenen Absorptionen liegen sogar um etwa 10% höher als die Werte der DMSO-Kontrolle, jedoch sind diese Unterschiede im Vergleich zu den in Zellen gefundenen Effekten nicht signifikant. Eine direkte Wechselwirkung zwischen den verwendeten Substanzen und MTT, die den Assay stören würde, ist somit nicht nachzuweisen.

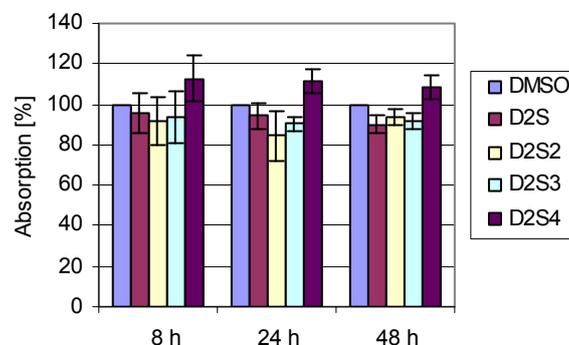


Abbildung 10: Der wachstumshemmende Effekt von Diallylsulfiden wird nicht durch eine Wechselwirkung mit MTT beeinflusst. 0.05% DMSO sowie je 40 μM D₂S, D₂S₂, D₂S₃ bzw. D₂S₄ in Zellkulturmedium wurden 8, 24 bzw. 48 h in 24-Loch-Platten inkubiert und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100% Viabilität gesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.1.3 Diallyltetrasulfid hemmt das Zellwachstum in HCT116p53wt-Zellen bereits in geringen Dosen

Da Diallyltetrasulfid zum einen kaum untersucht ist und zum andern die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt am effektivsten reduzieren kann, steht dieses Diallylsulfid im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen. Nachdem in Abschnitt 5.1.1 gezeigt werden konnte, dass die Wirkung von Diallyltetrasulfid auf die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt zeitabhängig zunimmt, wurden die Zellen nun auf eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes hin untersucht. Dazu erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Diallyltetrasulfid wie oben beschrieben, und zwar in Konzentrationen von 0, 10, 20, 40, 80 und 160 μM . Nach 48 h erfolgte wiederum ein MTT-Assay. Bereits 10 μM Diallyltetrasulfid reichen aus, um den Anteil lebender Zellen auf 39% zu reduzieren (Abb. 11). Bei Behandlung von HCT116p53wt mit Diallyltetrasulfid in den übrigen getesteten Konzentrationen bewegt sich der Anteil lebender Zellen im Bereich von 38 bis 42%, lediglich eine Behandlung mit 160 μM Diallyltetrasulfid reduziert die Zahl der lebenden Zellen auf 33%. Insgesamt ist keine signifikante Verstärkung des Effektes durch höhere Dosen des auslösenden Agens festzustellen. Zumindest bei den getesteten Konzentrationen liegt keine Dosisabhängigkeit vor. Dieser Versuch hat gezeigt, dass die Zellen bereits gegenüber einer relativ geringen Konzentration von 10 μM Diallyltetrasulfid eine hohe Sensibilität aufweisen und die Lebensfähigkeit dieser Zellen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle sprunghaft sinkt.

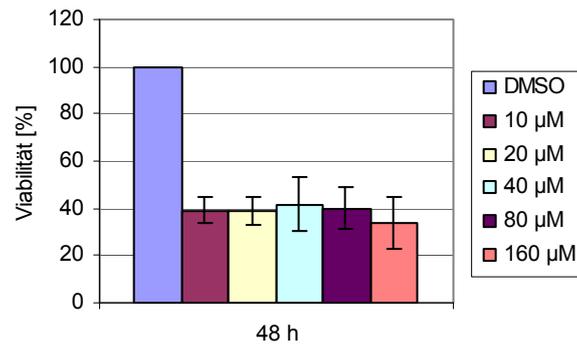
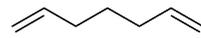


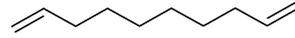
Abbildung 11: Die Reduktion der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen wird bereits von Diallyltetrasulfid in geringen Konzentrationen ausgelöst. HCT116p53wt wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 48 h mit 0.05% DMSO sowie 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM bzw. 160 µM D_2S_4 behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde mit 100% Viabilität gleichgesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 7 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.1.4 Die Schwefelatome sind für die Effekte der Diallylsulfide essentiell

Um die Wirkungsweise chemischer Verbindungen wie Diallylsulfide auf lebende Zellen verstehen zu können, muss vor allem die Struktur in Betracht gezogen werden. In diesem Fall kann vermutet werden, dass die Schwefelatome für die Reaktivität der Verbindungen verantwortlich sind, da auch bereits gezeigt wurde, dass mit steigender Anzahl an Schwefelatomen die Sensibilität der Zellen gegenüber der jeweiligen Substanz zunimmt. Dennoch liegen in Diallylsulfiden zwei Doppelbindungen vor, die eine weitere reaktive Komponente darstellen könnten. Um zu untersuchen, ob auch schwefelfreie Diallyl-Verbindungen die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt beeinträchtigen, wurden die Zellen mit Heptadien bzw. Decadien behandelt, welche in der Struktur Diallylmono- bzw. Diallyltetrasulfid entsprechen, wobei anstelle der jeweiligen Schwefelatome jedoch Kohlenstoffatome vorliegen (Abb. 12). Diese Substanzen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Dr. Jacob bereitgestellt.



1,6-Heptadien



1,9-Decadien

Abbildung 12: Struktur von Heptadien und Decadien

Um die Bedeutung des Schwefels erfassen zu können, wurden HCT116p53wt-Zellen mit 0.05% DMSO als Kontrolle und je 40 μ M Heptadien und Decadien sowie Diallylmono- und -tetrasulfid zum Vergleich für 8, 24 bzw. 48 h behandelt und einem MTT-Assay unterzogen. Nach Behandlung mit Heptadien sowie seinem schwefelhaltigen Analogon Diallylmonosulfid für 24 bzw. 48 h weisen noch 97 und 95% bzw. 97 und 93% (Abb. 13) einen Stoffwechsel auf. Auch Decadien zeigt mit einer Abnahme der lebenden Zellen auf 96 und 86% keinen signifikanten Effekt, während Diallyltetrasulfid mit einem Anteil lebender Zellen von 72% nach 24 h sowie 38% nach 48 h die zuvor gemachten Beobachtungen bestätigt. Hier kommt es also zu einer deutlichen Abnahme der Lebensfähigkeit, die mit dem Kohlenstoff-Analogon Decadien nicht erreicht werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Schwefelatome für die beobachteten Effekte essentiell sind.

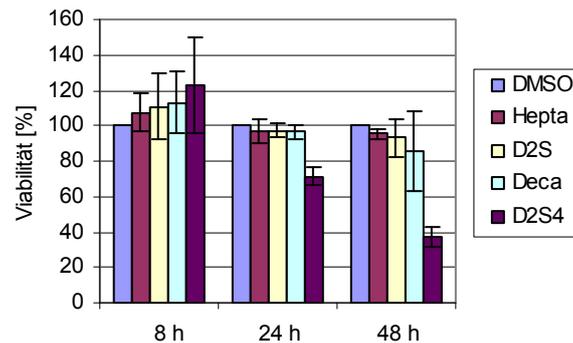


Abbildung 13: Für die Reduktion der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen sind die Schwefelatome der Diallylsulfide essentiell. HCT116p53wt wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 8, 24 sowie 48 h mit 0.05% DMSO, sowie 40 μ M Heptadien (Hepta), D_2S , Decadien (Deca) bzw. D_2S_4 behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde mit 100% Viabilität gleichgesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.1.5 Die wachstumsinhibierende Wirkung der Diallylsulfide wird von den Doppelbindungen nicht bzw. kaum beeinflusst

Wie unter 5.1.4 gezeigt wurde, sind die Schwefelatome essentiell erforderlich, um eine Reduktion der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt auszulösen. Daher stellt sich nun die Frage, ob durch die Existenz der Doppelbindungen eine synergistische Wirkung erzielt wird und der Effekt durch das Zusammenwirken der beiden reaktiven Gruppen verstärkt wird, oder ob von den Doppelbindungen in diesem Kontext keine Wirkung ausgeht. Daher wurden Dipropylmono- (DPS) sowie Dipropyltetrasulfid (DPS_4) untersucht, welche die Alkylanaloga zu Diallylmono- und -tetrasulfid darstellen (Abb. 14).



Abbildung 14: Struktur von Dipropylmono- und Dipropyltetrasulfid

Auch diese Verbindungen stammen aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jacob und wurden in einer Konzentration von 40 μM in einem MTT-Assay eingesetzt. Dieser wurde wie zuvor für Diallylsulfide und ihre Kohlenstoffanaloge gezeigt durchgeführt. In Abbildung 15 ist die Auswirkung der einzelnen Substanzen auf die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt dargestellt. Im Gegensatz zu den mit Kohlenstoffanaloge behandelten Zellen kommt es nach Dipropyltetrasulfid-Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der Lebensfähigkeit, die in ihrem Ausmaß in etwa der von Diallyltetrasulfid ausgelösten Wirkung entspricht. So bewirkt Dipropyltetrasulfid einen Rückgang des Anteils metabolisierender Zellen auf 55 bzw. 31% nach 24 bzw. 48 h. Dipropylmonosulfid dagegen zeigt mit 98 sowie 95% lebenden Zellen keine signifikante Wachstumshemmung, jedoch trifft dies ja auch auf Diallylmonosulfid zu und kann somit nicht eindeutig auf das Fehlen der Doppelbindung zurückgeführt werden. Die Effekte des Diallyltetrasulfids jedoch beruhen offenbar hauptsächlich auf den chemischen Eigenschaften der Sulfidkette und bleiben von der Reaktivität der Doppelbindungen unbeeinflusst.

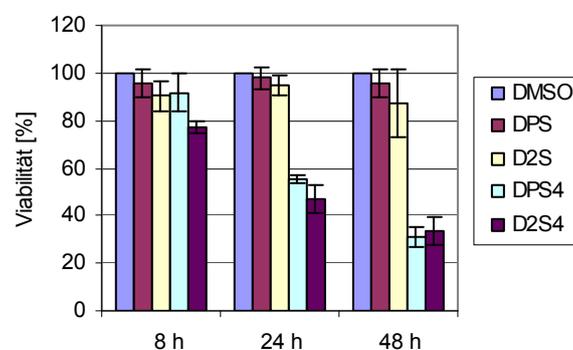
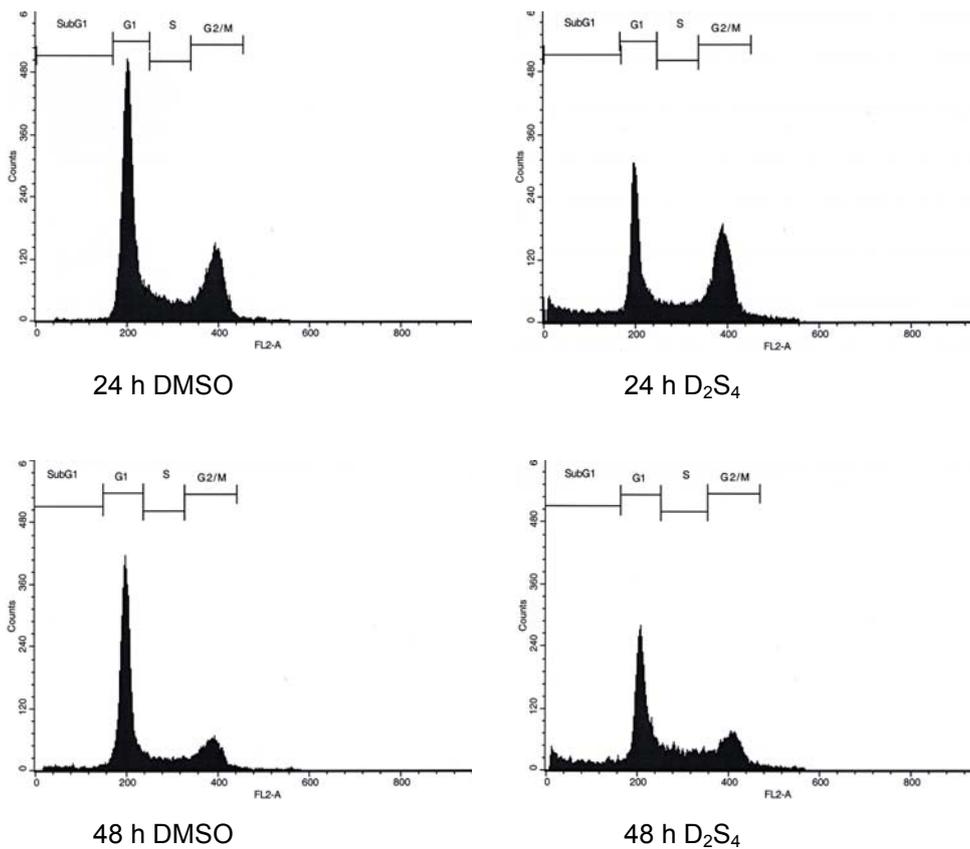


Abbildung 15: Die Doppelbindungen scheinen nicht für die Reduktion der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen durch Diallylsulfide verantwortlich zu sein. HCT116p53wt wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 8, 24 sowie 48 h mit 0.05% DMSO, sowie 40 μM Dipropylmonosulfid (DPS), D_2S , Dipropyltetrasulfid (DPS_4) bzw. D_2S_4 behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde mit 100% Viabilität gleichgesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

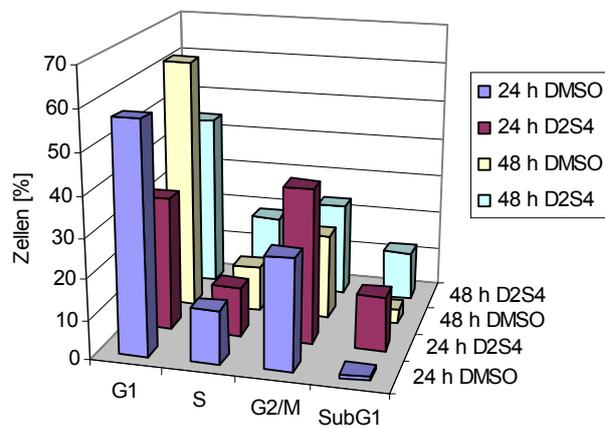
5.2 Einfluss von Diallyltetrasulfid auf die Zellzyklusphasenverteilung

Durch einen MTT-Assay kann zwar eine Veränderung des Anteils von Zellen mit einem aktiven Stoffwechsel an einer Gesamtpopulation gezeigt werden, jedoch bleibt die Ursache für diese Differenz unklar. Sowohl ein Absterben der Zellen z. B. durch Apoptose, als auch ein Zellzyklusarrest an Checkpoints wie G_1/S oder G_2/M sind denkbar. Mittels einer FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) kann die Verteilung einer definierten Anzahl von Zellen aus einer Population in die einzelnen Zellzyklusphasen nachgewiesen werden. Möglich wird diese Zuordnung, indem die DNA der Zellen mit Propidiumiodid angefärbt wird und über die Fluoreszenzintensität jeder Zelle deren DNA-Gehalt bestimmt wird. In einem Histogramm lassen sich somit anhand der DNA-Menge verschiedene Zellzyklusphasen unterscheiden. G_1 -Phase-Zellen weisen einen DNA-Gehalt von $n=2$ auf, während sich Zellen mit einer DNA-Menge von $n=4$ in der G_2/M -Phase befinden. S-Phase-Zellen liegen zwischen $n=2$ und $n=4$. Ist der Anteil der Zellen in einer bestimmten Phase bei den behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht, so spricht dies für einen Arrest in dieser Phase. Jedoch ist nicht nur ein Zellzyklusarrest durch eine solche Durchflusscytometrie nachweisbar. Eine Zunahme des sogenannten Sub G_1 -Peaks stellt einen Hinweis auf Apoptose dar, da die darin dargestellten Zellen einen DNA-Gehalt von weniger als $n=2$ aufweisen. Dieser kommt durch die Fragmentierung der DNA zustande, welche für Apoptose charakteristisch ist. Durch Behandlung mit $40 \mu\text{M}$ Diallyltetrasulfid kommt es sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zu einer Zunahme des Sub G_1 -Peaks um etwa 12 bzw. 9% (Abb. 16). Dies deutet auf die Induktion von Apoptosemechanismen hin, wobei jedoch auch ein Zellzyklusarrest im G_2/M -Übergang nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, da diese Population nach 24 h und 48 h um 11 sowie 2% wächst. Aufgrund der deutlichen Abnahme von G_1 -Zellen ist unwahrscheinlich, dass es zu einem G_1/S -Arrest kommt.

A



B



C

	G ₁	S	G ₂ /M	SubG ₁
24 h DMSO	57.39%	13.33%	27.82%	1.04%
24 h D ₂ S ₄	33.43%	12.36%	38.63%	13.56%
48 h DMSO	63.04%	11.4%	21.33%	3.48%
48 h D ₂ S ₄	43.87%	18.7%	23.51%	12.3%

Abbildung 16: Der Einfluss von Diallylsulfiden auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen. Für 24 bzw. 48 h mit 0.05% DMSO bzw. 40 µM Diallyltetrasulfid behandelte HCT116p53wt-Zellen wurden einer Durchflusscytometrie unterzogen. **A.** FACS-Analysen der behandelten Zellen **B.** Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung **C.** Prozentuale Werte zu B.

Da sowohl Hinweise auf die Induktion von Apoptose als auch das Auslösen eines G2/M-Arrestes durch Diallyltetrasulfid vorliegen, müssen beide Mechanismen in nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

5.3 Induktion von Apoptose durch Diallylsulfide

Der Anstieg der SubG₁-Fraktion in der Durchflusscytometrie deutet auf eine zunehmende Fragmentierung der DNA hin. Diese muss jedoch nicht zwangsweise auf Apoptose zurückgehen. Somit kann auf diese Weise nicht eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den in der SubG₁-Fraktion befindlichen Zellen um apoptotische Zellen handelt. Um zu untersuchen, ob der Rückgang stoffwechselaktiver Zellen auf Apoptose beruht, werden verschiedene Charakteristika apoptotischer Zellen betrachtet.

5.3.1 Diallyltetrasulfid-Behandlung bewirkt morphologische Veränderungen in HCT116p53wt-Zellen

Nach der Induktion von Apoptose kommt es zu Veränderungen in der Morphologie der Zelle. So ist z. B. das so genannte „Blebbing“ ein typisches Merkmal apoptotischer Zellen (Mills et al., 1999). Zur Untersuchung der Zellmorphologie wurden HCT116p53wt-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, wie beschrieben am nächsten Tag mit DMSO oder Diallyltetrasulfid behandelt und im Anschluss mit dem Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) inkubiert. Diese Färbung stellte auch gleichzeitig eine Fixierung dar, da DAPI in Methanol gelöst vorlag. Nachdem die Zellen eingedeckt wurden, konnten sie im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. In Abbildung 17 sind sowohl die mittels DAPI angefärbten Zellkerne als auch die Gesamtzellen in der Durchlichtmikroskopie dargestellt. Beide Darstellungsweisen machen deutlich, dass Diallyltetrasulfid-behandelte Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen deutlich verändert sind. Die mit roten Pfeilen gekennzeichneten Zellen weisen deutliche „Blebbs“ auf, die nur nach Diallyltetrasulfid-Behandlung nachweisbar sind. Auch insgesamt weisen die DMSO-Kontrollzellen eine intakte, klar abgegrenzte Struktur auf,

die bei Diallyltetrasulfid-behandelten Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt ist. Somit unterstützt die Betrachtung der Morphologie der Zellen die These, dass die Abnahme der Lebensfähigkeit durch Diallyltetrasulfid auf Apoptose-Induktion zurückzuführen ist.

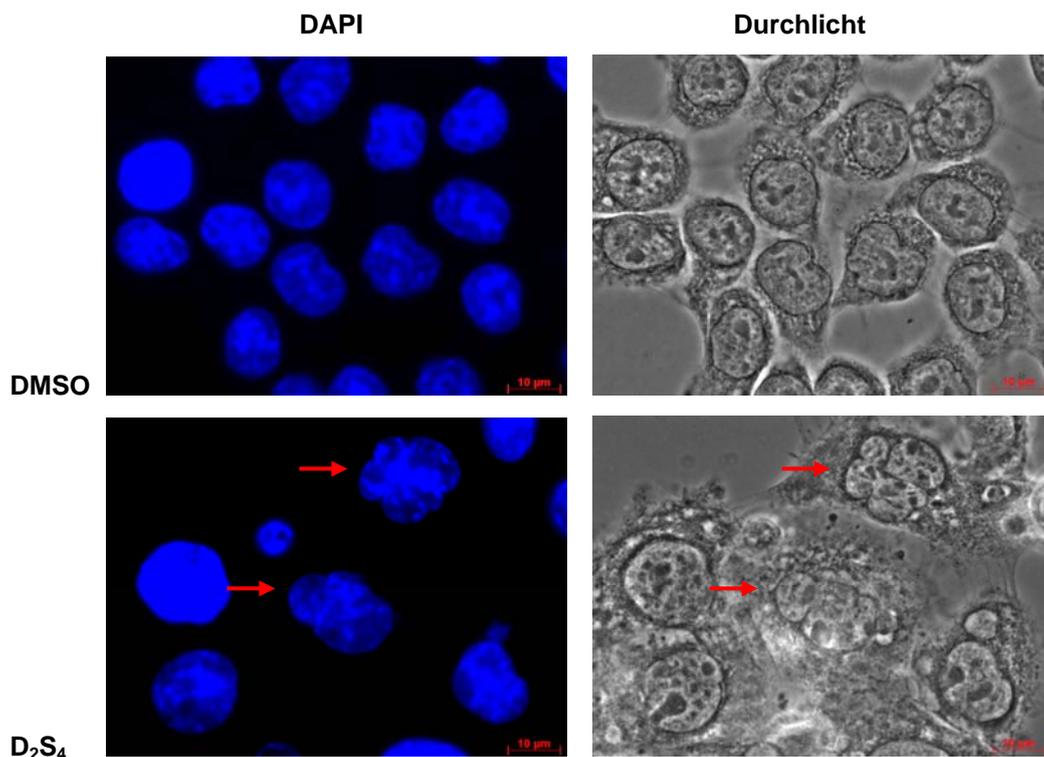


Abbildung 17: Morphologische Veränderung von HCT116p53wt durch Diallyltetrasulfid. Untersuchung von 48 h mit 0.05% DMSO bzw. 40 µM Diallyltetrasulfid behandelten HCT116p53wt-Zellen mittels DAPI-Färbung und Durchlichtmikroskopie. Vergrößerung: 1000x

5.3.2 Diallylsulfide bewirken die Spaltung der Procaspase-3

Im Verlauf der durch einen apoptotischen Stimulus ausgelösten Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Caspasen, indem deren inaktive Proformen proteolytisch gespalten werden (Alnemri et al., 1996; Nicholson et al., 1995). Bei Caspase-3 handelt es sich um eine Exekutionscaspase, die sowohl von Initiationscaspasen des intrinsischen als auch des extrinsischen Weges aktiviert werden kann und die dann ihrerseits weitere zelluläre Substrate spaltet. Eine Abnahme der inaktiven Procaspase-3 auf Proteinebene weist auf deren Spaltung und somit Aktivierung hin. Daher soll nun

mit einem spezifischen Antikörper gegen Procaspase-3 deren Gehalt in Diallylsulfid-behandelten Zellen bestimmt werden. HCT116p53wt-Zellen wurden mit DMSO oder den verschiedenen Diallylsulfiden für 24 bzw. 48 h behandelt. Aus den geernteten Zellen wurden Zellextrakte hergestellt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit dem Antikörper 8G10 (cell signaling) auf Procaspase-3 untersucht. Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren des Geles zu gewährleisten, wurde ein Nachweis von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Während sich der Procaspase-3-Gehalt in Diallylmono- bzw. Diallyldisulfid-behandelten Zellen kaum verändert, kommt es durch Diallyltri- und Diallyltetrasulfid-Behandlung vor allem nach 48 h zu einer deutlichen Abnahme an Procaspase-3 (Abb. 18). Diese lässt auf die Entstehung aktiver Caspase-3 und somit auf die Durchführung eines apoptotischen Programmes schließen.

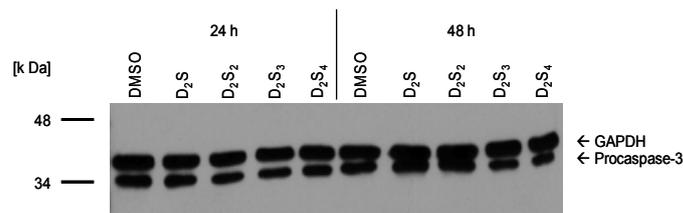


Abbildung 18: Der Procaspase-3-Proteingehalt nimmt in HCT116p53wt-Zellen nach Behandlung mit Diallylsulfiden ab. HCT116p53wt-Zellen wurden für 24 bzw. 48 h mit 0.05% DMSO sowie je 40 μ M D₂S, D₂S₂, D₂S₃ bzw. D₂S₄ behandelt und nach Herstellung von Zellextrakten in SDS-PAGE und Western Blot auf ihren Procaspase-3-Gehalt untersucht. 75 μ g Protein wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit dem Kaninchen-Antikörper 8G10 gegen Procaspase-3 detektiert. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:1000 in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver inkubiert und über Nacht mit der Membran inkubiert. Als Ladekontrolle wurde eine Detektion von GAPDH durchgeführt. [kDa]: Molekulargewichtstandard

Durch Nachweis einer Spaltung von Procaspase-3 kann gezeigt werden, dass die übergeordneten Initiationscaspasen in aktivem Zustand vorliegen. Ob die gespaltene Procaspase selbst ebenfalls aktiv ist, kann die Untersuchung von Substraten dieser Protease zeigen.

5.3.3 Diallylsulfid-Behandlung führt zur PARP-Spaltung

Ein zelluläres Substrat, das im Verlauf der durch die Aktivierung von Caspasen ausgelösten Caspase-Kaskade gespalten wird, ist die Poly-ADP-Ribosepolymerase oder PARP (Lazebnik et al., 1994). Dieses 113 kDa große Protein wird durch die Exekutionscaspasen 3 und 7 in zwei 89 bzw. 27 kDa große Fragmente gespalten. In apoptotischen Zellen kann somit neben dem Vollängenprotein auch das 89 kDa-Spaltprodukt nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden, ebenso wie für den Procaspase-3-Nachweis beschrieben, behandelte Zellen im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Auf diese Weise wurden die Auswirkungen der verschiedenen Diallylsulfide, der Diallyltetrasulfid-Konzentration sowie der Kohlenstoff- und Dipropylanaloga zu Diallylmono- und -tetrasulfid auf die PARP-Spaltung in HCT116p53wt untersucht (Abb. 19). Während Diallyltri- und -tetrasulfid sowohl nach 24 als auch 48 h eine PARP-Spaltung auslösen, scheinen Diallylmono- und -disulfid, zumindest unter den untersuchten Inkubationszeiten und Konzentrationen, dazu nicht in der Lage zu sein (Abb. 19 A). Ebenso führt eine gesteigerte Diallyltetrasulfid-Konzentration zu verstärkter PARP-Spaltung, wobei hier im Gegensatz zum MTT-Assay ein Dosiseffekt erkennbar ist (Abb. 19 B). Die Kohlenstoffanaloga zu Diallylmono- und -tetrasulfid, Heptadien und Decadien, bewirken keine PARP-Spaltung (Abb. 19 C). Dagegen löst Dipropyltetrasulfid wie Diallyltetrasulfid PARP-Spaltung aus, Dipropylmonosulfid jedoch nicht (Abb. 19 D). Diese Ergebnisse stimmen mit Ausnahme des erwähnten Dosiseffektes im Wesentlichen mit den Erkenntnissen aus den MTT-Assays überein. In Zellen, in denen es zu einer deutlichen Reduktion der Lebensfähigkeit kam, kann auch eine Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase nachgewiesen werden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die beobachtete Reduktion zumindest teilweise auf Apoptose zurückzuführen ist.

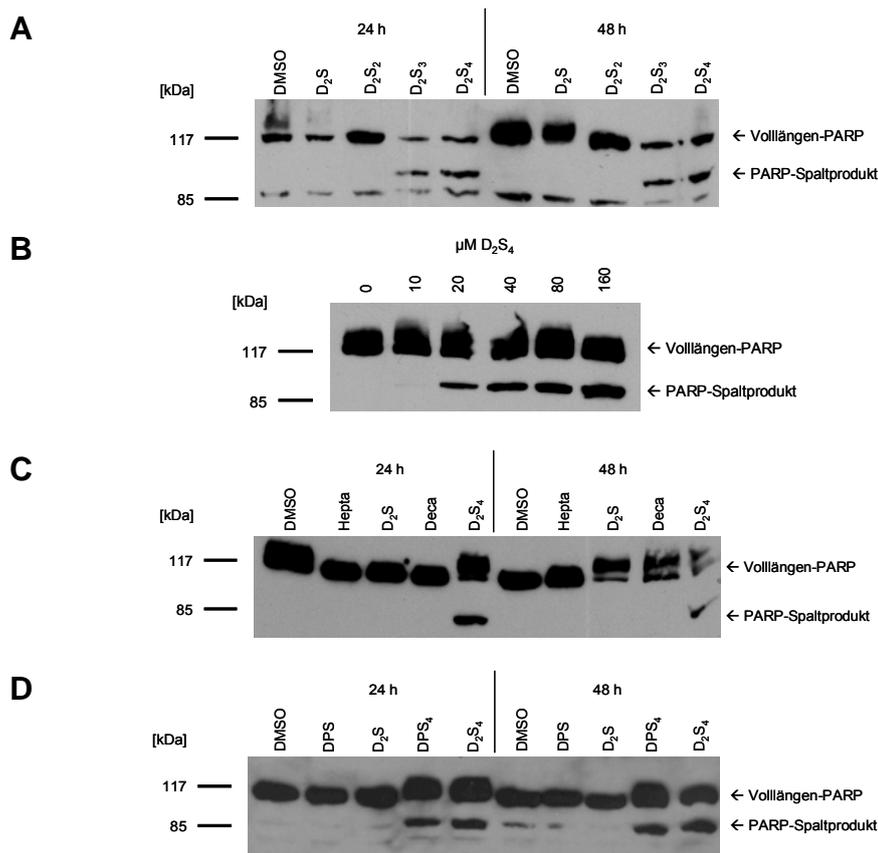


Abbildung 19: Der Einfluss von Diallylsulfiden auf die PARP-Spaltung in HCT116p53wt-Zellen. Mit Diallylsulfiden bzw. ihren Analoga behandelte HCT116p53wt-Zellen wurden mittels Western Blot auf eine mögliche Spaltung der PARP untersucht. 100 µg Protein wurden auf einem 7.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem PARP-Antikörper detektiert. **A.** Behandlung von HCT116p53wt mit verschiedenen Diallylsulfiden. **B.** Behandlung von HCT116p53wt mit Diallyltetrasulfid in verschiedenen Konzentrationen. **C.** Behandlung von HCT116p53wt mit Kohlenstoff-Analoga. **D.** Behandlung von HCT116p53wt mit Dipropylsulfiden. [kDa]: Molekulargewichtstandard

5.4 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Diallyltetrasulfid

Nachdem die zuvor gezeigten Ergebnisse eine Beteiligung von Apoptose an den von Diallylsulfiden initiierten Vorgängen wahrscheinlich machen, stellt sich nun die Frage nach den molekularen Hintergründen dieser Apoptoseinduktion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ein Vermittler von Apoptose ist (Buttke und Sandstrom, 1994). Aufgrund der chemischen Struktur der Schwefelgruppen von Diallyltetrasulfid wäre denkbar, dass dieses freie Radikale bildet und über einen ROS-gekoppelten Mechanismus Apoptose induziert.

5.4.1 Messung von Sauerstoffradikalen mittels H₂DCFDA

Um ROS in einer Zellpopulation nachzuweisen, werden erneut durchflusscytometrische Methoden angewandt. Wie bei der FACS-Analyse werden die Zellen mit einem Fluorochrom angefärbt. Dabei handelt es sich hier um 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA), dessen Maximum im Histogramm durch die Anwesenheit freier Radikale verschoben wird, indem es zur Deacetylierung und zur Bildung des fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluoresceins (DCF) kommt. Dieser „Shift“ dient als Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Dazu wurden HCT116p53wt-Zellen mit DMSO, Decadien oder Diallyltetrasulfid für 24 oder 48 h behandelt, durch Trypsinieren geerntet, mit H₂DCFDA angefärbt und die Fluoreszenz wurde im Cytofluorimeter durch Anregung bei 488 nm gemessen. Unbehandelte HCT116p53wt-Zellen wurden als Kontrolle für die Färbung herangezogen, indem eine Zellpopulation angefärbt wurde, während die andere ungefärbt blieb (Abb. 20 A). Die gefärbten Zellen zeigen die erwartete deutliche Zunahme in der Fluoreszenzintensität. Als Positivkontrolle für den „Shift“ wurde eine weitere Zellpopulation 2 h mit 1 mM H₂O₂ behandelt. Diese zeigt im Vergleich zu unbehandelten gefärbten Zellen eine sichtbare Verschiebung des Histogrammes nach rechts. Die DMSO-behandelten Zellen (Abb. 20 B, C) zeigen sowohl nach 24 als auch nach 48 h eine leichte Verschiebung. Während jedoch eine Behandlung mit Decadien keine weitere Verschiebung auslösen kann, bewirkt Diallyltetrasulfid, zumindest nach 48stündiger Behandlung, einen solchen Effekt. Die erhaltenen Daten weisen auf eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an den beobachteten Effekten hin.

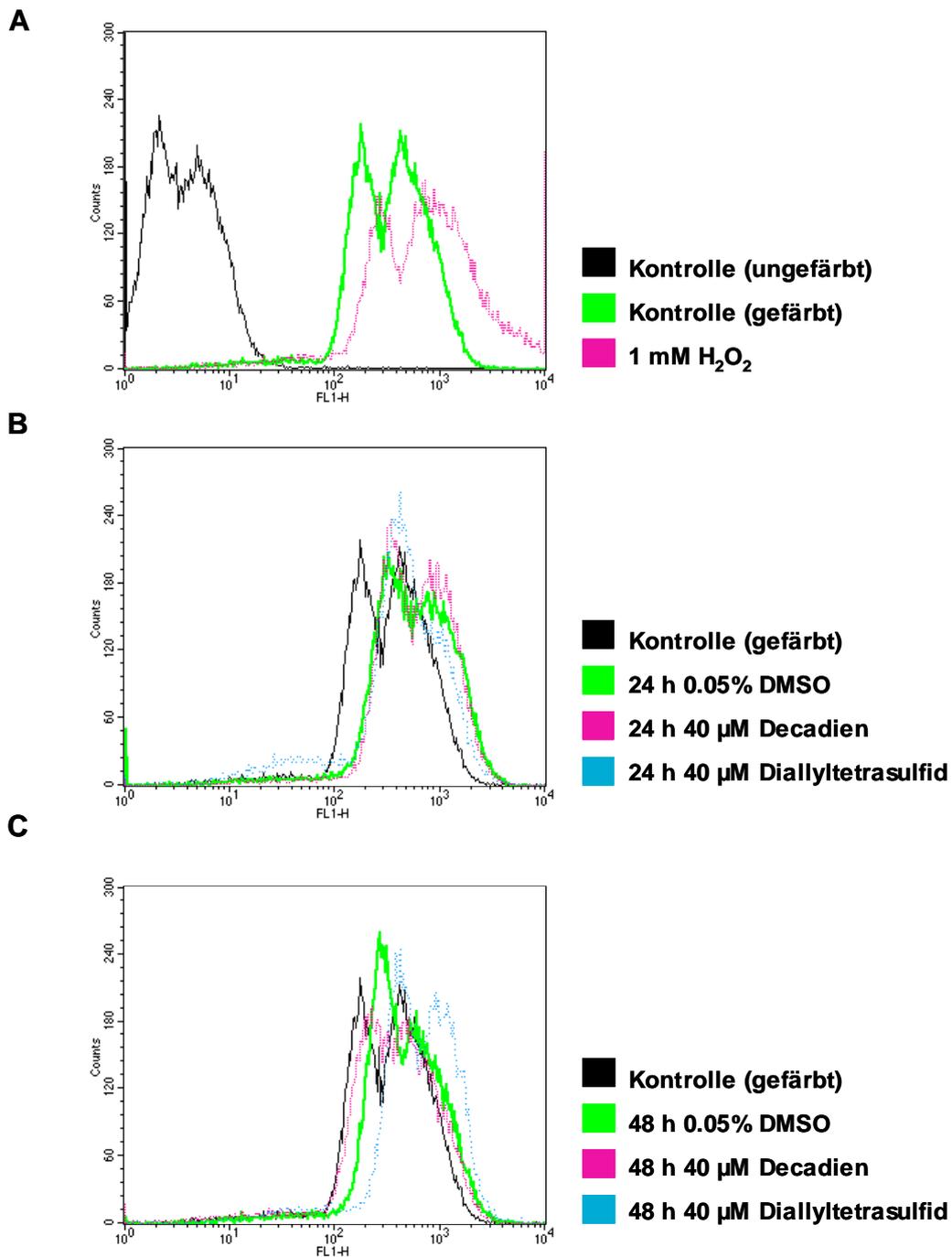


Abbildung 20: Messung freier Radikale mittels H₂DCFDA-Färbung. HCT116p53wt wurden mit 0.05% DMSO sowie je 40 μM Decadien oder Diallyltetrasulfid für 24 bzw. 48 h behandelt, trypsiniert, mit H₂DCFDA gefärbt und im Durchflusscytometer gemessen. Ebenso wurden unbehandelte/ungefärbte, unbehandelte/gefärbte sowie 2 h mit 1 mM H₂O₂ behandelte/gefärbte Zellen als Kontrollen gemessen. **A.** Histogramm der Kontrollen. **B.** Histogramm der 24 h behandelten Zellen. **C.** Histogramm der 48 h behandelten Zellen.

5.4.2 Antioxidantien können die Diallyltetrasulfid-bedingte Wachstumsinhibition aufheben

Nachdem die Messung reaktiver Sauerstoffspezies mittels H₂DCFDA Hinweise auf eine Beteiligung von ROS an der Apoptoseinduktion durch Diallylsulfide lieferte, soll diese nun mit Hilfe von Antioxidantien nachgewiesen werden. Ascorbinsäure und N-Acetylcystein oder NAC (Abb. 21) sind in der Lage, freie Radikale zu beseitigen (De Vries und De Flora, 1993; Rose und Bode, 1993).

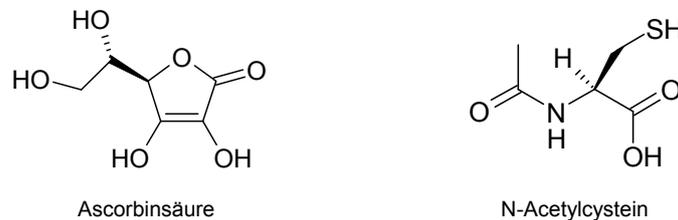


Abbildung 21: Struktur von Ascorbinsäure und N-Acetylcystein

Sind solche Radikale für die Apoptoseinduktion verantwortlich, so sollte ein durch Diallylsulfide ausgelöster Effekt durch Zugabe von Ascorbinsäure oder NAC aufgehoben werden. Deshalb wurden HCT116p53wt-Zellen mit DMSO, Ascorbinsäure bzw. NAC, Diallyltetrasulfid sowie Ascorbinsäure bzw. NAC und Diallyltetrasulfid gemeinsam behandelt und auf PARP-Spaltung untersucht. Auf diese Weise mit NAC behandelte Zellen wurden zusätzlich einem MTT-Assay unterzogen. Die Behandlung erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei die Antioxidantien bereits 1 h vor Zugabe von Diallyltetrasulfid auf die Zellen gegeben wurden. Der Nachweis der PARP-Spaltung wurde ebenfalls wie unter 5.3.3 angegeben durchgeführt. In Ascorbinsäure-behandelten Zellen kommt es ebenso wie bei der DMSO-Kontrolle nicht zu einer PARP-Spaltung (Abb. 22 A). Diallyltetrasulfid-behandelte Zellen zeigen diese Spaltung sowohl nach 24 als auch nach 48 h deutlich, jedoch nur, wenn keine Vorbehandlung mit Ascorbinsäure erfolgte. Diese hebt die Nachweisbarkeit der PARP-Spaltung im Western Blot vollständig auf. Einen ähnlichen Effekt kann auch eine Vorbehandlung der Zellen mit NAC bewirken (Abb. 22 B). Die Untersuchung NAC-behandelter

HCT116p53wt im MTT-Assay kann diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen (Abb. 22 C). Hier kann NAC die durch Diallyltetrasulfid ausgelöste Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen nicht aufheben. Allerdings sind die Resultate des MTT-Assays nach NAC-Behandlung nicht ganz zuverlässig, da es sich bei NAC um eine Säure handelt, die den MTT-Assay stören kann. Betrachtet man die Ergebnisse der H2DCFDA-Messung sowie die Wirkung der Antioxidantien Ascorbinsäure und NAC auf die durch Diallyltetrasulfid ausgelöste PARP-Spaltung, so erscheint eine Apoptoseinduktion durch Diallyltetrasulfid über einen ROS-gekoppelten Mechanismus wahrscheinlich.

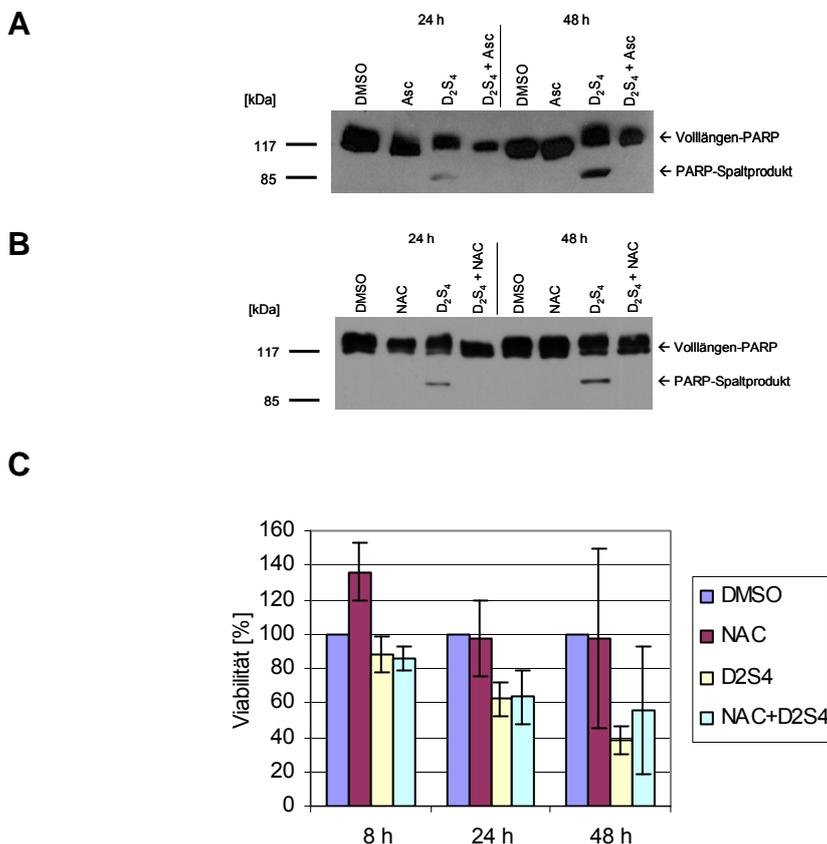


Abbildung 22: Die durch Diallyltetrasulfid bewirkte PARP-Spaltung in HCT116p53wt-Zellen wird durch Antioxidantien revidiert. A. Mit 0.05% DMSO, 100 μ M Ascorbinsäure (Asc), 40 μ M D_2S_4 sowie der Kombination aus Asc und D_2S_4 behandelte HCT116p53wt-Zellen wurden mittels Western Blot auf eine mögliche Spaltung der PARP untersucht. 100 μ g Protein wurden auf einem 7.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem PARP-Antikörper detektiert. **B.** Wie A., nur Behandlung mit 5 mM NAC statt 100 μ M Asc. **C.** MTT-Assay mit DMSO, NAC, D_2S_4 bzw. NAC + D_2S_4 behandelten HCT116p53wt. Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. [kDa]: Molekulargewichtstandard

5.5 Abhängigkeit der Wirkung der Diallylsulfide von p53

Der Transkriptionsfaktor p53 stimuliert die Expression pro-apoptotischer Proteine und reprimiert die Expression anti-apoptotischer Proteine (Fridman and Lowe, 2003). Die gezeigte Induktion von Apoptose durch Diallylsulfide könnte daher unter Beteiligung von p53 ablaufen. Ebenso kann die Apoptose von p53 auf transkriptionsunabhängigem Wege vermittelt werden (Chipuk et al., 2003; Chipuk et al., 2004; Mihara et al., 2003). Deshalb soll untersucht werden, inwiefern sich die Expression von p53 auf die Effekte der Diallylsulfide auswirkt.

5.5.1 Reduktion des Zellwachstums und Induktion von PARP-Spaltung durch Diallylsulfide finden auch in HCT116p53^{-/-}-Zellen statt

Um einen eventuellen p53-Einfluss zu untersuchen, wurden HCT116p53^{-/-}-Zellen eingesetzt (Bunz et al., 1998). Diese Zellen besitzen kein p53, entsprechen ansonsten aber vollständig den bisher verwendeten HCT116p53wt-Zellen. Auch in diesen Zellen wurde der Einfluss der verschiedenen Diallylsulfide, der Diallyltetrasulfid-Dosis sowie der Kohlenstoff- und Dipropyl-Analoga untersucht. Wie für die HCT116p53wt-Zellen beschrieben, wurde der MTT-Assay zur Untersuchung der Lebensfähigkeit sowie die Detektion von PARP-Spaltung zum Nachweis von Apoptose im Western Blot durchgeführt. Der Einfluss von Diallylsulfiden auf p53-negative HCT116-Zellen ist in Abbildung 23 dargestellt. Auch in diesen Zellen kommt es zu einer zeitabhängigen Abnahme der Lebensfähigkeit nach Diallylsulfid-Behandlung (Abb. 23 A). Während Diallylmonosulfid keine Wachstumshemmung zu bewirken scheint, kommt es durch Diallyldisulfid zu einer Reduktion der Anzahl lebender Zellen auf 85 und 80% nach 24 bzw. 48 h, durch Diallyltri- und -tetrasulfid auf 70 und 35% sowie 71 und 38%. Obwohl hier Diallyltrisulfid einen geringfügig stärkeren Effekt als Diallyltetrasulfid aufweist, ist auch in HCT116p53^{-/-}-Zellen eine Abnahme der Lebensfähigkeit feststellbar, die tendenziell mit steigender Schwefelkettenlänge verstärkt wird. Ebenso wie in HCT116p53wt führt Diallyltetrasulfid bereits in einer Konzentration von 10 µM zu einer Reduktion der lebenden Zellen auf 40%, welche durch steigende Dosen nur noch leicht weiter auf bis zu 32% bei einem Einsatz von 160 µM verstärkt werden kann (Abb. 23 B). Die Kohlenstoff-Analoga von Diallylmono- und -tetrasulfid, Heptadien und

Decadien, sind nicht in der Lage, den Anteil der lebenden Zellen auf weniger als 86% zu verringern, während durch Diallyltetrasulfid Werte von 71 und 38% erreicht werden, was dem Verhalten der HCT116p53wt-Zellen entspricht (Abb. 23 C). Bei Einsatz der entsprechenden Dipropylanaloga dagegen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Diallylsulfiden (Abb. 23 D): Während bei Dipropylmonosulfid-Behandlung noch 97 sowie 93% der Zellen nach 24 sowie 48 h leben, reduziert Dipropyltetrasulfid die Zahl stoffwechselaktiver Zellen auf 62 und 26%. Diese Ergebnisse in HCT116p53^{-/-}-Zellen bestätigen die in HCT116p53wt gemessenen Werte und zeigen somit, dass auch in p53-negativen Zellen eine Wachstumshemmung mittels Diallylsulfiden erreicht werden kann.

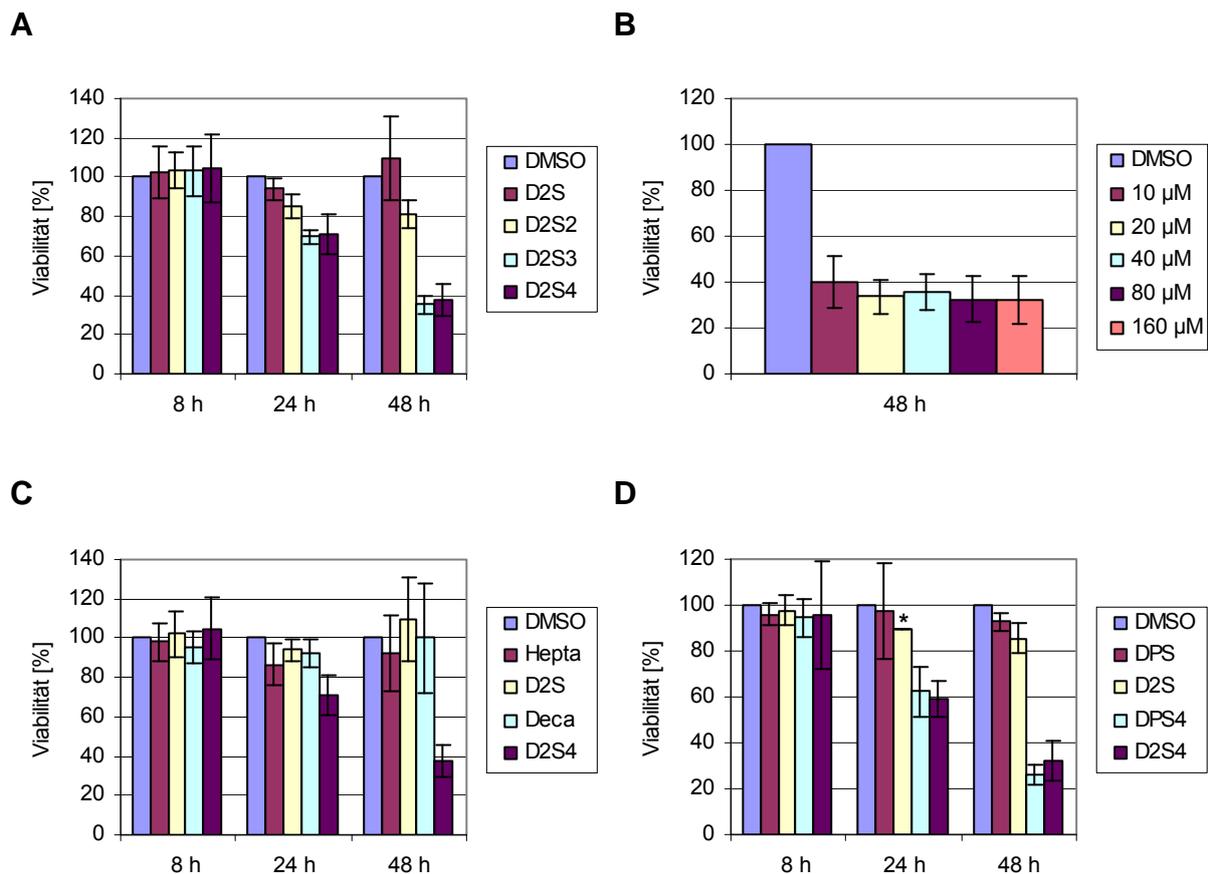


Abbildung 23: Der wachstumshemmende Effekt von Diallylsulfiden auf HCT116-Zellen ist p53-unabhängig. HCT116p53^{-/-}-Zellen wurden mit den entsprechenden Diallylsulfiden bzw. ihren Analoga in 24-Loch-Platten behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100% Viabilität gesetzt. **A.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **B.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Diallyltetrasulfid in verschiedenen Konzentrationen. Die Grafik zeigt das Mittel von 7 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **C.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Kohlenstoff-Analoga. Die Grafik zeigt das Mittel von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **D.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Dipropylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. *: Standardabweichung = 0.19 (in der Grafik nicht darstellbar)

Die Detektion von PARP-Spaltprodukten im Western Blot bestätigt ebenfalls die Resultate aus den HCT116p53wt-Zellen (Abb. 24). Auch hier kommt es nur durch Diallyltri- und -tetrasulfid zu einer deutlichen PARP-Spaltung (Abb. 24 A), wobei Diallyltetrasulfid wie in HCT116p53wt einen Dosisseffekt zeigt (Abb. 24 B), der mittels MTT-Assay nicht nachzuweisen war. Die Kohlenstoff- bzw. Dipropylanaloga zu Diallylsulfid, Heptadien und Dipropylmonosulfid, waren ebenso wie dieses selbst nicht in der Lage, eine Spaltung der PARP auszulösen (Abb. 24 C, D). Dagegen bewirkt

Dipropyltetrasulfid wie Diallyltetrasulfid eine PARP-Spaltung, das schwefelfreie Decadien jedoch nicht.

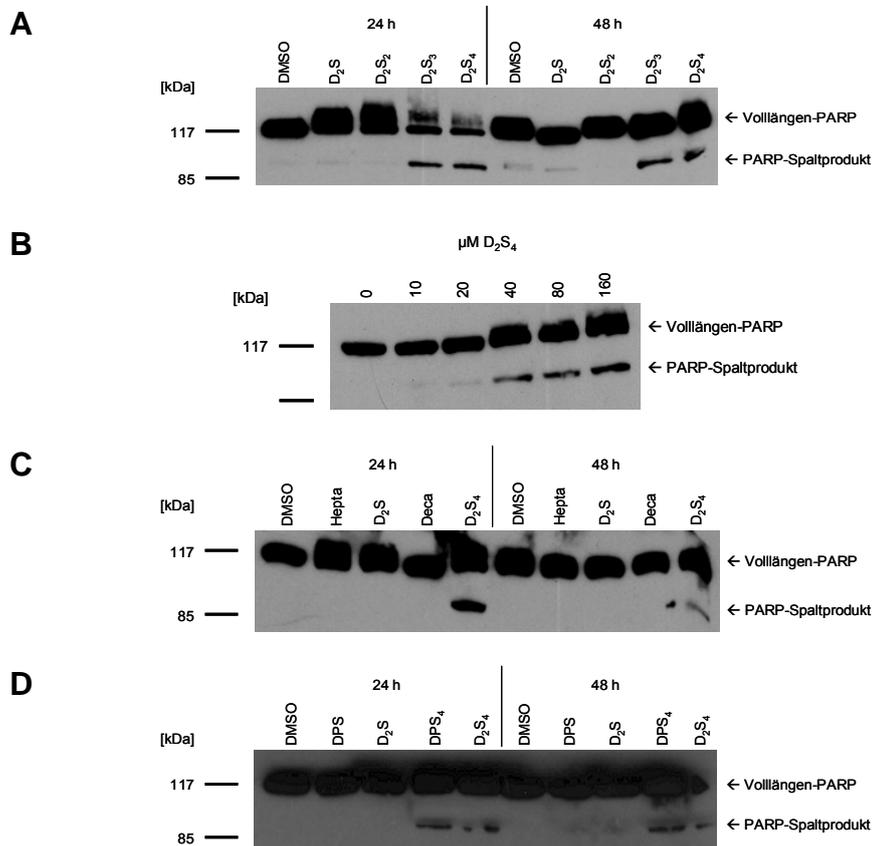


Abbildung 24: Die Effekte der Diallylsulfide auf die PARP-Spaltung in HCT116p53wt-Zellen sind auch in HCT116p53^{-/-}-Zellen nachweisbar. Mit Diallylsulfiden bzw. ihren Analoga behandelte HCT116p53^{-/-}-Zellen wurden mittels Western Blot auf eine mögliche Spaltung der PARP untersucht. 100 µg Protein wurden auf einem 7.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem PARP-Antikörper detektiert. **A.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. **B.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Diallyltetrasulfid in verschiedenen Konzentrationen. **C.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Kohlenstoff-Analoga. **D.** Behandlung von HCT116p53^{-/-}-Zellen mit Dipropylsulfiden. [kDa]: Molekulargewichtstandard

Wie MTT-Assay und PARP-Spaltung zeigen, muss die Apoptose in diesen Zellen über einen p53-unabhängigen Weg initiiert werden. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Diallylsulfide Apoptose mittels verschiedener Signalwege auslösen können. Während in p53-negativen Zellen also eine p53-unabhängige Induktion von Apoptose stattfindet, könnte p53 in p53-positiven Zellen an den apoptotischen Prozessen

beteiligt sein. Daher stellt sich nun die Frage, ob p53 in HCT116p53wt durch Diallylsulfide beeinflusst wird.

5.5.2 Diallylsulfide bewirken in HCT116p53wt-Zellen eine Zunahme von p53 auf Proteinebene

Obwohl auch p53-freie Zellen dieselben Effekte zeigen wie p53wt-Zellen, besteht die Möglichkeit einer p53-Beteiligung an der Reaktion auf Diallyldisulfide in HCT116p53wt-Zellen. Einen Hinweis auf eine solche Beteiligung nach Diallylsulfid-Einfluss würde ein Anstieg von p53 auf Proteinebene geben, was auf eine verstärkte Aktivität des Wachstumssuppressors schließen ließe. Daher wurden wie bereits beschrieben HCT116p53wt-Zellen 24 bzw. 48 h mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Aus diesen Zellen wurden mittels Ultraschallaufschluss Gesamtzellextrakte gewonnen, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Im Western-Blot wurden die Proteinbanden auf einer PVDF-Membran fixiert, so dass der p53-Gehalt der einzelnen Zellextrakte mittels Immunodetektion mit einem p53-spezifischen Antikörper, dem polyklonalen Serum α -p53, ermittelt werden konnte. Auf diese Weise wurden der Einfluss der verschiedenen Diallylsulfide (Abb. 25 A), der Diallyltetrasulfid-Konzentration (Abb. 25 B) sowie der Kohlenstoff- (Abb. 25 C) und Dipropylsulfid-Analoga untersucht (Abb. 25 D). In Zellen, die mit Diallyltri- oder Diallyltetrasulfid behandelt wurden, kommt es zu einer Zunahme von p53 auf Proteinebene gegenüber der DMSO-Kontrolle, die in Diallylmonosulfid- oder Diallyldisulfid-behandelten Zellen nicht nachweisbar ist. Ebenso führt Diallyltetrasulfid in steigender Dosis zu verstärkter p53-Expression. Kohlenstoffanaloga zeigen keinen Einfluss auf den p53-Gehalt von HCT116p53wt-Zellen, Dipropyltetrasulfid dagegen führt zur Steigerung der p53-Menge. Obwohl p53 nicht essentiell für eine Induktion von Apoptose zu sein scheint, da auch p53-negative Zellen eine Reduktion der Lebensfähigkeit sowie eine Zunahme der PARP-Spaltung zeigen, ist eine Veränderung von p53 auf Proteinebene in HCT116p53wt-Zellen nachweisbar. Es ist also möglich, dass in HCT116p53^{-/-}-Zellen ein alternativer Weg der Apoptoseinduktion existiert.

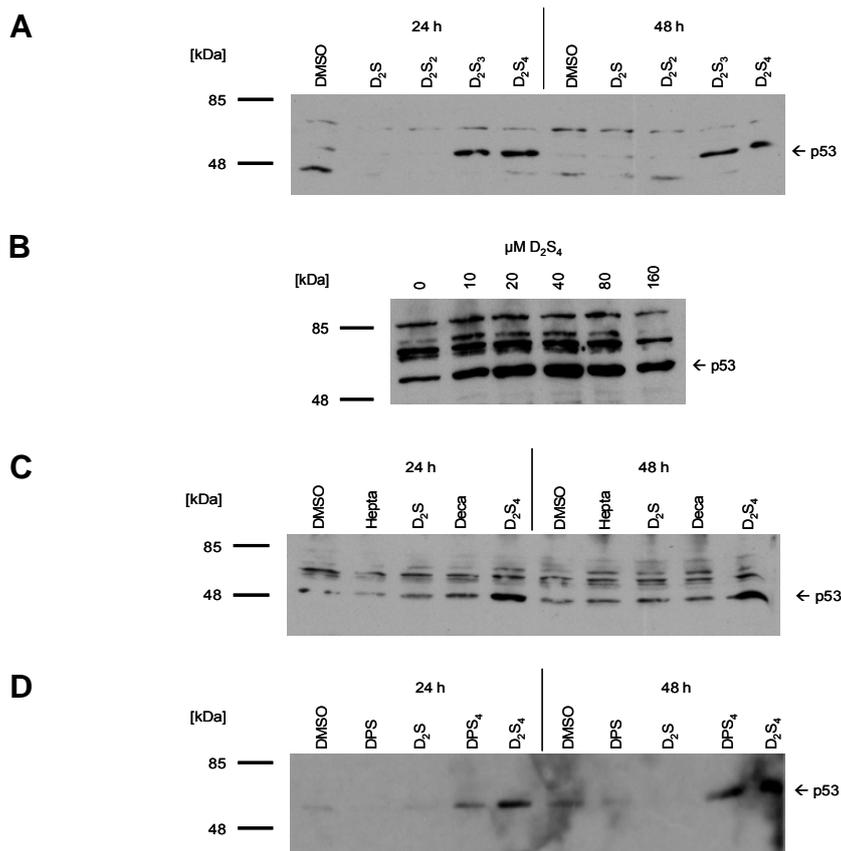


Abbildung 25: Der Einfluss von Diallylsulfiden auf die p53-Expression in HCT116p53wt-Zellen. Mit Diallylsulfiden bzw. ihren Analoga behandelte HCT116p53wt-Zellen wurden mittels Western Blot auf ihren p53-Gehalt untersucht. 50 μg Protein wurden auf einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Antikörper α-p53 detektiert. **A.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. **B.** Behandlung von HCT116p53wt mit Diallyltetrasulfid in verschiedenen Konzentrationen. **C.** Behandlung von HCT116p53wt mit Kohlenstoff-Analoga. **D.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen mit Dipropylsulfiden. [kDa]: Molekulargewichtstandard

5.6 Der Effekt von Diallyltetrasulfid auf die Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2 ist eine hochkonservierte, ubiquitär vorkommende Serin/Threonin-Kinase, die an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, darunter auch Zellproliferation und Apoptose (Ahmed et al., 2002). Es existieren zwei katalytische Untereinheiten, α und α', sowie eine regulatorische β-Untereinheit. Diese liegen entweder in freier Form oder als tetrameres Holoenzym aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten vor. Die von CK2 durchgeführten Phosphorylierungen führen insgesamt dazu, dass das Überleben der Zelle gesichert

wird. So konnte in Prostatakarzinom-Zellen gezeigt werden, dass eine Überexpression der CK2 die Zellen vor Apoptose schützt (Guo et al., 2001). Eine Apoptoseinduktion, wie sie von Diallylsulfiden ausgelöst wird, könnte daher im Umkehrschluss zu einer Hemmung der CK2 führen. Zunächst wurden HCT116p53wt-Zellen mit dem CK2-spezifischen Inhibitor 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-bezimidazol oder DMAT (Pagano et al., 2004) behandelt und im Western Blot auf PARP-Spaltung untersucht. Dieser Vorversuch wurde durchgeführt, da DMAT wie Diallyltetrasulfid die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bewirkt (Schneider, 2007). Dies legt nahe, dass die induzierten Apoptosemechanismen ebenfalls einige Parallelen aufweisen. Wie aus Abbildung 26 A ersichtlich wird, kommt es nach Behandlung von HCT116p53wt-Zellen für 24 bzw. 48 h mit 30 μ M DMAT zu einer PARP-Spaltung. In diesem Fall wird also durch CK2-Inhibition Apoptose ausgelöst. Daher wurden nun mit den verschiedenen Diallylsulfiden behandelte Zellen extrahiert und die Zellextrakte in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit gegen die CK2-Untereinheiten gerichteten polyklonalen Kaninchenseren auf ihren CK2-Gehalt untersucht. Eine Abnahme der Proteinmenge konnte für keine Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 26 B). Ebenso zeigte eine Untersuchung der CK2-Aktivität nicht den erwarteten Aktivitätsverlust durch Diallylsulfide (nicht gezeigt). Somit scheint die durch Diallylsulfide ausgelöste Apoptose nicht mit einer Abnahme der CK2-Menge und CK2-Aktivität einherzugehen.

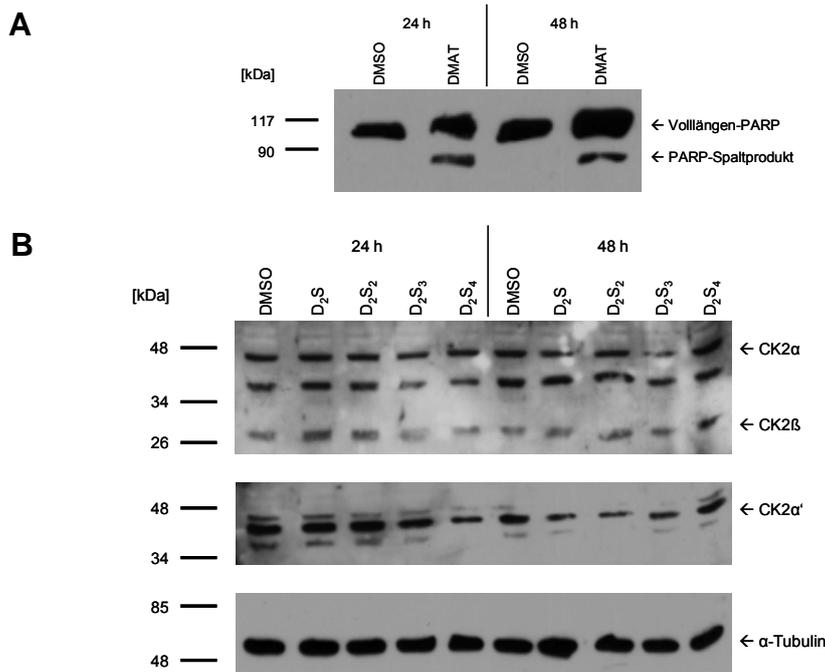


Abbildung 26: Die CK2-Expression wird von Diallylsulfiden nicht beeinflusst. A. Mit 0.05% DMSO bzw. 30 μ M DMAT behandelte HCT116p53wt-Zellen wurden mittels Western Blot auf PARP-Spaltung untersucht. 100 μ g Protein wurden auf einem 7.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem PARP-Antikörper detektiert. **B.** Untersuchung von mit je 40 μ M der verschiedenen Diallylsulfide behandelten HCT116p53wt auf CK2-Expression. Je 25 μ g der Zellextrakte wurden auf einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit den polyklonalen Kaninchenseren #212 (gegen CK2 α), #30 (gegen CK2 α') und #269 (CK2 β) detektiert. [kDa]: Molekulargewichtstandard

5.7 Einfluss von Diallylsulfiden auf die zellzyklusregulierende Proteinphosphatase cdc25C

Neben der bereits nachgewiesenen Apoptose-Induktion ist es auch möglich, dass Diallylsulfide einen Zellzyklusarrest auslösen können. Ein solcher Arrest würde den Zellen nach dem durch die Diallylsulfide ausgelösten Sauerstoffstress ermöglichen, eventuelle DNA-Schäden zu reparieren. Ebenso könnte die Apoptose jedoch aus einem Zellzyklusarrest heraus induziert werden. Die Proteinphosphatase cdc25C stellt durch ihre Fähigkeit, den Cdk1/Cyclin B-Komplex in einem positiven Feedback-Loop an Thr14 und Tyr15 der Cdk1 zu dephosphorylieren und damit zu aktivieren, ein entscheidendes Schlüsselenzym beim Übergang aus der G₂-Phase in die Mitose dar (Hoffmann et al., 1993). Eine Abnahme der Menge dieses Proteins bzw. seiner

Aktivität wären Hinweise auf einen möglichen Zellzyklusarrest am G₂/M-Übergang, der die mittels Durchflusscytometrie gemachten Beobachtungen bestätigen könnte.

5.7.1 Die Menge der Proteinphosphatase cdc25C nimmt unter Diallylsulfid-Behandlung der HCT116-Zellen ab

Um cdc25C auf Proteinebene zu untersuchen, wurden HCT116p53wt-Zellen wiederum mit den verschiedenen Diallylsulfiden (Abb. 27 A), unterschiedlichen Diallyltetrasulfid-Dosen (Abb. 27 B) sowie den Kohlenstoff- (Abb. 27 C) und Dipropylsulfid-Analoga (Abb. 27 D) behandelt. Da bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass cdc25C von p53 reprimiert wird (Krause et al., 2001; LeGac et al., 2006; St. Clair et al., 2004), könnte die unter 5.5.2 gezeigte Zunahme von p53 auf Proteinebene Einfluss auf die cdc25C-Expression nach Diallylsulfid-Behandlung nehmen. Zur Untersuchung des p53-Effektes wurden daher HCT116p53^{-/-}-Zellen auf dieselbe Weise untersucht (Abb. 27 E – H). Es wurden Zellextrakte aus Diallylsulfid-behandelten Zellen hergestellt, in einem 12.5%igen SDS-Poylacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot auf cdc25C untersucht. Vor allem Diallyltri- und -tetrasulfid führen zu einer deutlichen Abnahme des cdc25C-Gehalts auf Proteinebene, während Hepta- und Decadien keine Veränderungen der Proteinkonzentration bewirken. Dipropyltetrasulfid führt dagegen zur Reduktion der cdc25C-Expression. Die Abnahme von cdc25C durch Diallyltetrasulfid-Einfluss erfolgt dosisabhängig. Auch cdc25C scheint unabhängig von p53 reguliert zu werden, da kein Unterschied zwischen HCT116p53wt- und HCT116p53^{-/-}-Zellen feststellbar ist.

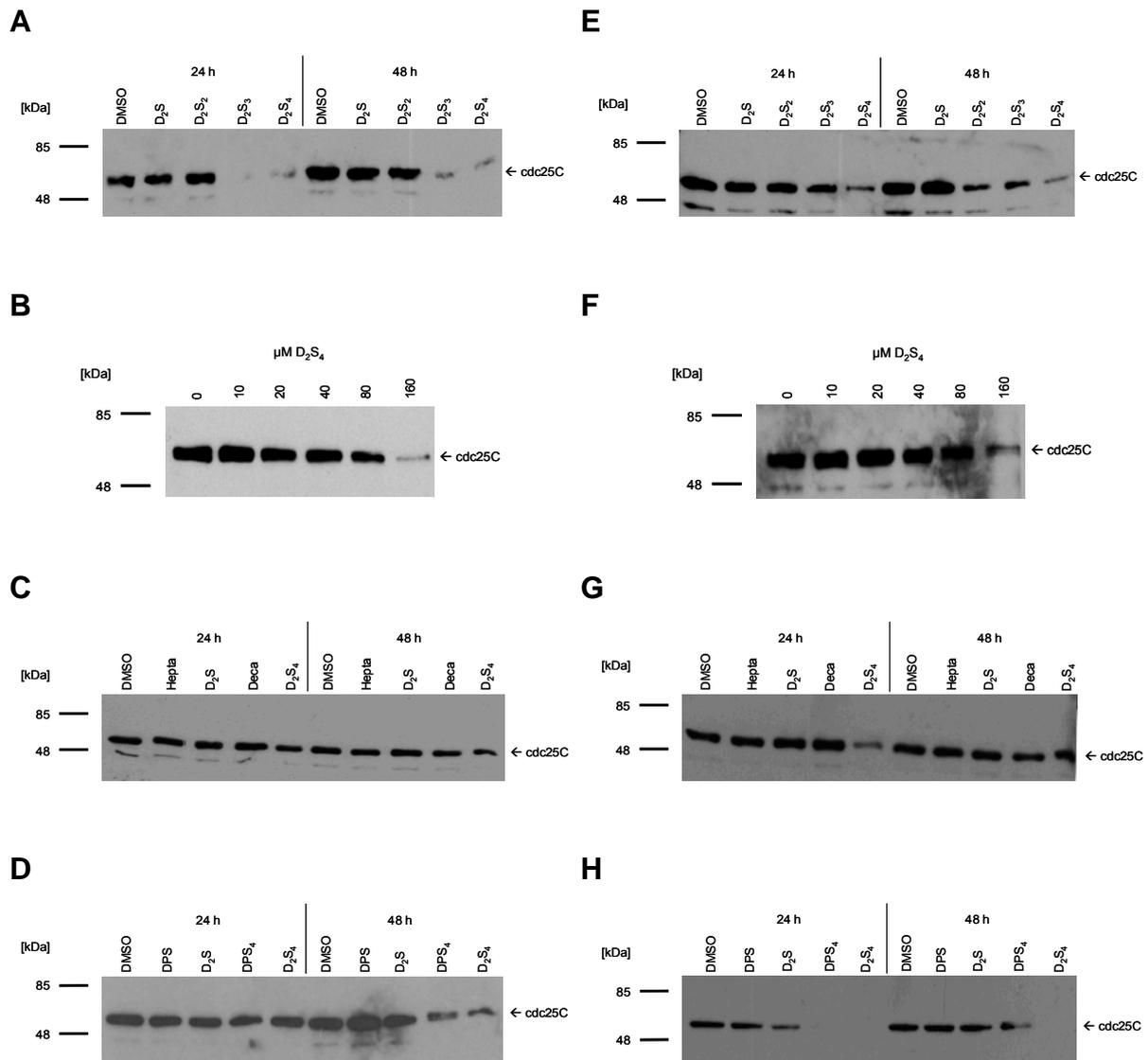


Abbildung 27: Das cdc25C-Protein nimmt insbesondere nach Diallyltri- und -tetrasulfid-Behandlung von HCT116p53wt- bzw. HCT116p53^{-/-}-Zellen ab. Mit Diallylsulfiden bzw. ihren Analoga behandelte HCT116p53wt- und HCT116p53^{-/-}-Zellen wurden im Western Blot auf cdc25C untersucht. 50 μg Protein wurden auf einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit dem cdc25C-spezifischen Antikörper H6 (Santa Cruz) detektiert. **A, B.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen (A) bzw. HCT116p53^{-/-}-Zellen (B) mit verschiedenen Diallylsulfiden. **C, D.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen (C) bzw. HCT116p53^{-/-}-Zellen (D) mit Diallyltetrasulfid in verschiedenen Konzentrationen. **E, F.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen (E) bzw. HCT116p53^{-/-}-Zellen (F) mit Kohlenstoff-Analoga. **G, H.** Behandlung von HCT116p53wt-Zellen (G) bzw. HCT116p53^{-/-}-Zellen (H) mit Dipropylsulfiden. [kDa]: Molekulargewichtstandard

5.7.2 Ein Einfluss von Diallylsulfiden auf die cdc25C-Aktivität ist nicht messbar

Da cdc25C durch Diallyltetrasulfideinfluss auf Proteinebene abnimmt, sollte auch eine deutliche Reduktion der Aktivität zu messen sein. Diese wurde mittels eines FDP-Assays untersucht, wobei zunächst cdc25C durch eine Immunpräzipitation aus Zellextrakten von DMSO- bzw. Diallyltetrasulfid-behandelten HCT116p53wt-Zellen isoliert wurde. Das Immunpräzipitat wurde in mehrere Aliquots aufgeteilt, so dass im folgenden Aktivitätstest eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden konnte. Es wurden pro Aliquot 500 µg Protein in die Immunpräzipitation eingesetzt. Der an Protein-A-Sepharose gebundenen aufgereinigten Phosphatase wurde im Anschluss das Substrat Fluoresceindiphosphat angeboten, welches sie zu schwach fluoreszierendem Fluoresceinmonophosphat und stark fluoreszierendem Fluorescein dephosphorylieren kann (Rice et al., 1997). Diese Fluoreszenz ist mittels eines Fluorimeters messbar und korreliert mit der Phosphataseaktivität. Durch Gleichsetzung der Fluoreszenzintensität der cdc25C-IPs aus DMSO-behandelten HCT116p53wt mit 100% kann die Aktivität von cdc25C aus Diallyltetrasulfid-behandelten Zellen anhand der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Die erwartete Reduktion der cdc25C-Aktivität nach Diallyltetrasulfid-Behandlung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Tatsächlich nimmt die Aktivität nach 24 h sogar schwach zu und sinkt auch nach 48 h nur auf 80% (Abb. 28), wobei in den 5 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen eine hohe Standardabweichung festzustellen ist. Da sich die Normierung der Proteinmenge auf das Gesamtprotein der Zelle bezieht und nicht ausschließlich auf cdc25C, ist sogar von einer Zunahme von cdc25C auszugehen. Auch wenn dieser Assay somit keine Reduktion der cdc25C-Aktivität zeigen konnte, existieren aufgrund der Abnahme des cdc25C- Proteins dennoch Hinweise auf einen G₂/M-Arrest.

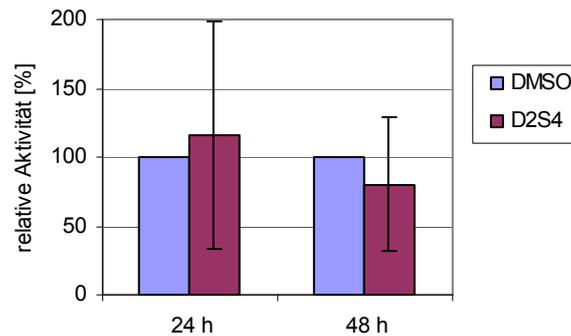


Abbildung 28: Die *cdc25C*-Aktivität wird durch Diallyltetrasulfid nur geringfügig inhibiert. HCT116p53wt-Zellen wurden mit 0.05% DMSO bzw. 40 μ M Diallyltetrasulfid für 24 bzw. 48 h behandelt, geerntet und es wurden Zellextrakte hergestellt. Aus diesen wurde mit dem polyklonalen Kaninchenserum NT *cdc25C* mittels Immunpräzipitation isoliert und in einen FDP-Assay eingesetzt. Die Grafik zeigt das Mittel von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.7.3 Eine *cdc25C*-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Saostp53 138-8-Zellen

Wenn *cdc25C* in die Abnahme der stoffwechselaktiven Zellen durch Diallylsulfideinfluss involviert wäre, so sollte diese durch Überexpression von *cdc25C* aufgehoben werden. Zu diesem Zweck wurden Saostp53 138-8+*cdc25C*wt-Zellen eingesetzt, die *cdc25C* überexprimieren. Die Saostp53 138-8-Zellen wurden der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Römer (Homburg) zur Verfügung gestellt und von Dr. Sandra Schwindling mit *cdc25C*wt in dem Eukaryonten-Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro(-) unter Kontrolle eines CMV-Promotors stabil transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen eingesetzt, die mit dem Leervektor pcDNA transfiziert worden waren. Dieses System hat den Vorteil, dass der Einfluss der Überexpression unter ansonsten identischen Bedingungen untersucht werden kann. Da für HCT116-Zellen kein p53-Einfluss auf die Effekte von Diallylsulfiden festgestellt werden konnte, wurde dieses System dennoch zur Untersuchung der *cdc25C*-Überexpression eingesetzt. Die Zellen wurden jeweils mit den bereits beschriebenen steigenden Dosen von Diallyltetrasulfid für 48 h behandelt und einem MTT-Assay unterzogen. Diallylsulfide bewirken allerdings weder in Saostp53 138-8+*cdc25C*wt (Abb. 29 A) noch in Saostp53 138-8+pcDNA (Abb. 29 B) eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit. In beiden Zelllinien sinkt selbst nach Behandlung mit 160 μ M Diallyltetrasulfid die Stoffwechselaktivität nur auf 80%. Bemerkenswert ist dabei, dass dieser Wert sowohl

in *cdc25C*-überexprimierenden als auch in nicht-überexprimierenden Zellen erreicht wird. Beide Zelllinien reagieren also im Mittel gleichermaßen auf die Behandlung mit Diallyltetrasulfid. Allerdings scheinen Saostsp53 138-8+*cdc25Cwt* bei den voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen etwas größeren Schwankungen zu unterliegen, was die Standardabweichung zeigt.

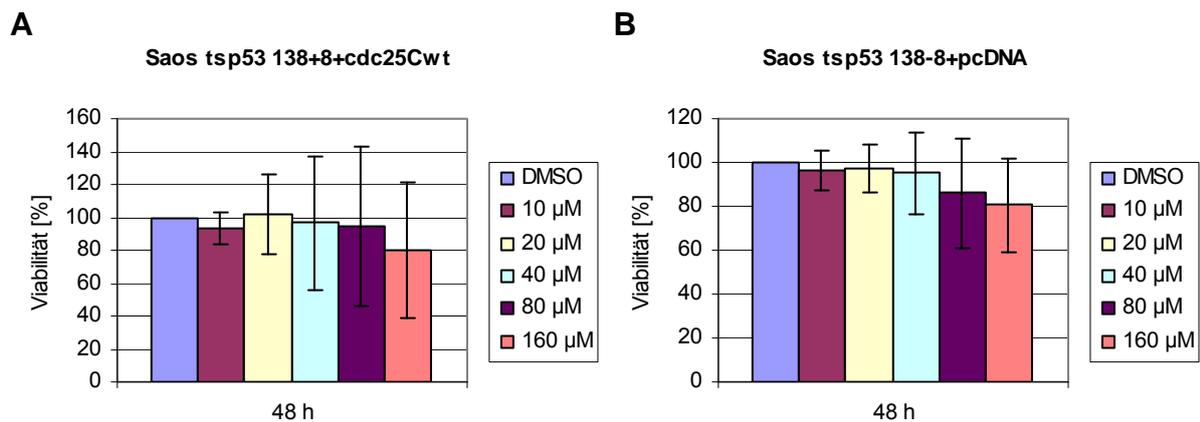


Abbildung 29: Saos tsp53 138-8-Zellen werden durch Diallyltetrasulfid unabhängig von einer *cdc25C*-Überexpression kaum in ihrer Lebensfähigkeit gehemmt. Saos tsp53 138-8+*cdc25Cwt* bzw. Saos tsp53 138-8+pcDNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen Diallyltetrasulfid in 24-Loch-Platten für 48 h behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100% Viabilität gesetzt. **A.** Behandlung von Saos tsp53 138-8+*cdc25Cwt*. Die Grafik zeigt das Mittel von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **B.** Behandlung von Saos tsp53 138-8+pcDNA. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Obwohl ein *cdc25C*-Aktivitätsverlust nicht eindeutig nachweisbar war und eine Reduktion der Effekte durch *cdc25C*-Überexpression nicht gezeigt werden konnte, stellt die deutliche Abnahme des *cdc25C*-Proteins einen Hinweis auf eine Beteiligung von *cdc25C* an den durch Diallyltetrasulfid ausgelösten Prozessen dar.

5.8 Einfluss von Diallylsulfiden auf die Lebensfähigkeit anderer Zelllinien

Nachdem Saos ts p53 138-8 nicht wie HCT116 auf Diallylsulfide zu reagieren scheinen, wurden weitere Zelllinien untersucht, um auszuschließen, dass es sich um einen für HCT116 spezifischen Effekt handelt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien wie HT29, Saos-2, OvBH1 und EPN untersucht, aber auch primäre Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF). Primärzellen sind von besonderem Interesse zur Untersuchung einer möglichen Selektivität der Diallylsulfide gegenüber Tumorzellen, welche einen großen Vorteil für eine Verwendung der Diallylsulfide als Therapeutikum liefern würde.

5.8.1 Verschiedene Tumorzelllinien werden durch Diallylsulfide in ihrem Wachstum inhibiert

Um festzustellen, ob die von Diallylsulfiden bewirkte Reduktion der Lebensfähigkeit in verschiedenen Zellen auftritt oder ein HCT116-spezifischer Effekt ist, wurden die Zelllinien HT29, Saos-2, OvBH1 und EPN mit den Diallylsulfiden behandelt und im MTT-Assay untersucht. HT29 ist wie HCT116 eine Colonkarzinom-Zelllinie, die aber ein mutantes p53 exprimiert. Dagegen handelt es sich bei Saos-2 um Osteosarkom-Zellen, aus denen Saostsp53 138-8 hergestellt wurden. Saos-2 besitzen kein endogenes p53. OvBH1 entstammen einem Ovarialkarzinom und exprimieren die Wildtyp-Form von p53 (Bar et al., 2002), die jedoch immunologische Merkwürdigkeiten aufweist. Neben diesen Tumorzellen wurden auch EPN untersucht, bei denen es sich um epitheliale Prostata-Zellen handeln soll (Sinisi et al., 2002). HT29-Zellen zeigen mit einer Abnahme auf 57 bzw. 52% nach 24 bzw. 48 h unter Diallyltrisulfid-Einfluss sowie auf 45 bzw. 42% durch Diallyltetrasulfid eine ähnlich starke Reaktion wie HCT116-Zellen (Abb. 30 A). Dagegen sinkt die Lebendzellzahl in Saos-2 nach 24 h durch alle Diallylsulfide nur auf etwa 80%, und erst nach 48 h wird eine Reduktion auf 61% durch Diallyltrisulfid und 66% durch Diallyltetrasulfid erreicht (Abb. 30 B). OvBH1 wiederum weist nach 24 bzw. 48 h noch 51 bzw. 46% lebende Zellen durch Diallyltrisulfid- sowie 51 bzw. 40% durch Diallyltetrasulfid-Behandlung auf (Abb. 30 C). Diese Ovarialkarzinom-Zellen sind also ähnlich wie Kolonkarzinom-Zellen durch Diallyltri- und Diallyltetrasulfid inhibierbar, während Osteosarkom-Zellen nur einen schwachen Effekt zeigen. Diallylmono- und Diallyldisulfid können in keiner Zelllinie eine Reduktion

auf weniger als 80% bewirken. Primäre Prostata-Zellen zeigen einen Rückgang der Lebensfähigkeit durch Diallyltri- oder Diallyltetrasulfid auf etwa 60% nach 24 h und etwa 70% nach 48 h (Abb. 30 D). Jedoch ist dieser deutlich schwächer ausgeprägt als der in Kolon- oder Ovarialkarzinom-Zellen nachgewiesene Effekt. Zudem tritt eine beträchtliche Standardabweichung auf. Um die Wirkung von Diallylsulfiden auf Primärzellen genauer zu untersuchen, sollen im Folgenden primäre Maus-Embryo-Fibroblasten untersucht werden.

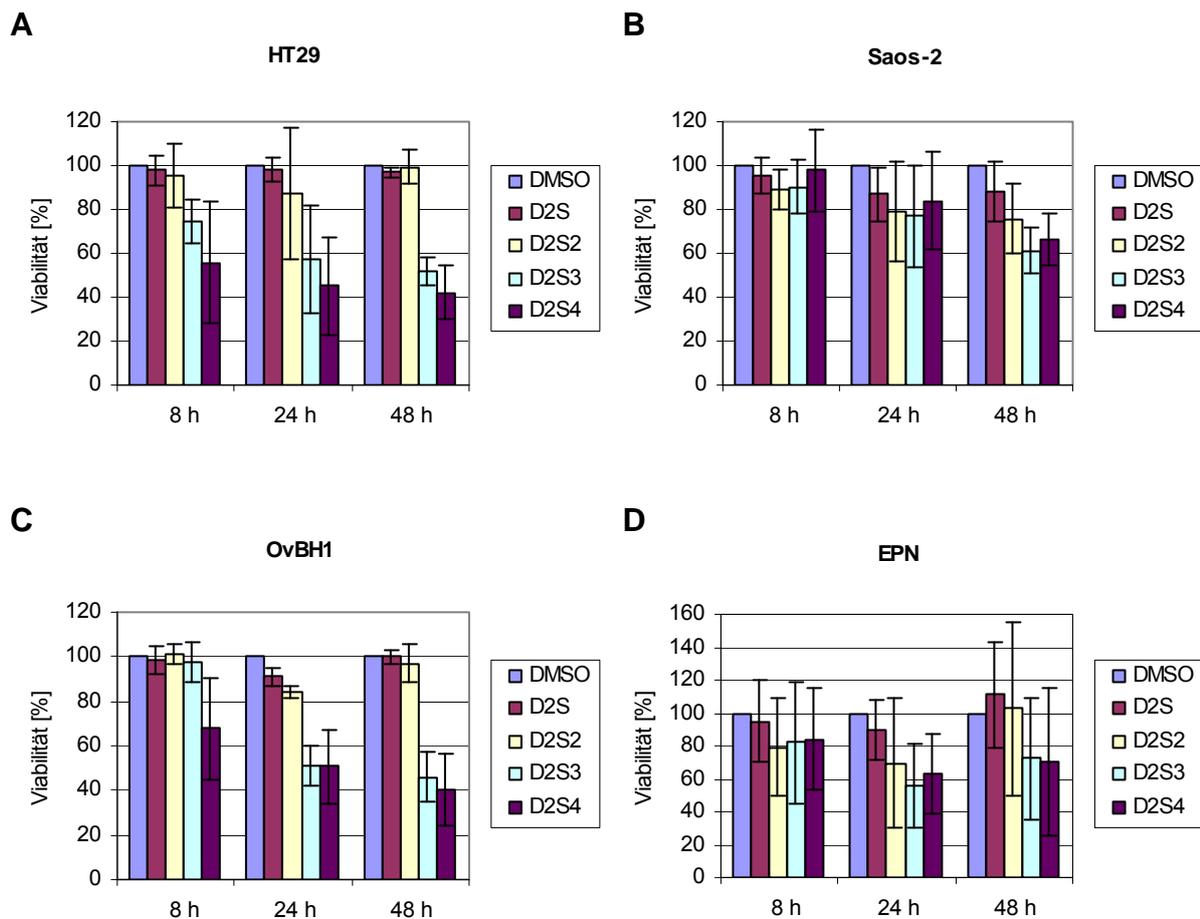


Abbildung 30: Der wachstumshemmende Effekt von Diallylsulfiden ist nicht auf HCT116-Zellen beschränkt. Verschiedene Zelllinien wurden mit den entsprechenden Diallylsulfiden in 24-Loch-Platten behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100% Viabilität gesetzt. **A.** Behandlung von HT29-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **B.** Behandlung von Saos-2-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **C.** Behandlung von OvBH1-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **D.** Behandlung von EPN-Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.8.2 Primäre Maus-Embryo-Fibroblasten können von Diallylsulfiden ebenfalls inhibiert werden

An primären Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) soll wie an EPN untersucht werden, ob Diallylsulfide eine Spezifität für Tumorzellen aufweisen. Diese Primärzellen wurden, wie bereits für andere Zellen beschrieben, im MTT-Assay auf die Effekte der verschiedenen Diallylsulfide, der Diallyltetrasulfid-Konzentration, der Kohlenstoff- sowie der Dipropylsulfid-Analoga untersucht. Diallylmono- und Diallyldisulfid zeigen

auch hier nur geringe Effekte, während Diallyltri- und Diallyltetrasulfid die Lebensfähigkeit von MEF nach 24 bzw. 48 h auf 68 bzw. 55% sowie 61 bzw. 52% senken (Abb. 31 A). Die Diallyltetrasulfid-Wirkung scheint in MEF stärker dosisabhängig zu sein als in HCT116p53wt, da 40 μ M Diallyltetrasulfid einen Rückgang des Anteils stoffwechselaktiver Zellen auf 53% bewirken, während nach Behandlung mit 160 μ M nur noch 21% der Zellen leben (Abb. 31 B). Die Kohlenstoff-Verbindungen Heptadien und Decadien lösen im Gegensatz zu Diallyltetrasulfid keine Wachstumshemmung in MEF aus (Abb. 31 C). Dipropyltetrasulfid-behandelte Zellen weisen nach 24 sowie 48 h noch ein Wachstum von 75 sowie 55% auf, was einen leicht geringeren Effekt darstellt als die von Diallyltetrasulfid bewirkten 61 sowie 38% (Abb. 31 D). Dennoch ist diese Reaktion deutlich stärker als nach Diallyl- und Dipropylmonosulfid-Behandlung sowie nach Inkubation mit den Kohlenstoff-Analoga. Insgesamt stimmen die Ergebnisse in MEF tendenziell mit denen in HCT116 überein, wenn auch die Effekte etwas schwächer ausgeprägt sind. Dennoch scheint eine Resistenz von Primärzellen bzw. eine Selektivität von Diallylsulfiden gegenüber Tumorzellen nicht gegeben zu sein.

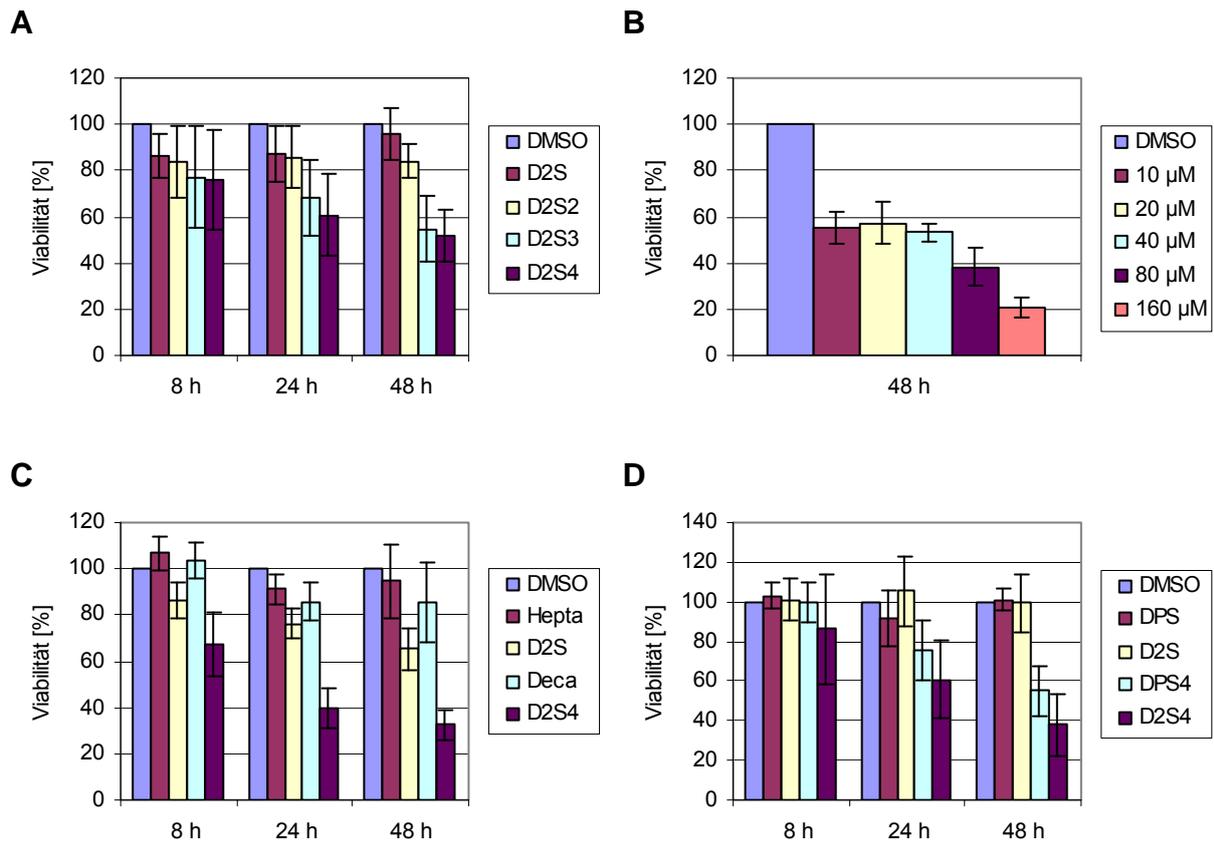


Abbildung 31: Auch die Lebensfähigkeit primärer Zellen nimmt nach Diallylsulfid-Behandlung ab. Primäre Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) wurden mit den entsprechenden Diallylsulfiden sowie ihren Analoga in 24-Loch-Platten behandelt und mittels MTT-Assay auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Die Absorption wurde jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert der jeweiligen Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100% Viabilität gesetzt. **A.** Behandlung von MEF mit verschiedenen Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **B.** Behandlung von MEF mit verschiedenen Diallyltetrasulfid-Konzentrationen. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **C.** Behandlung von MEF mit Kohlenstoff-Analoga zu Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. **D.** Behandlung von MEF mit Dipropyl-Analoga zu Diallylsulfiden. Die Grafik zeigt das Mittel von 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

6 Diskussion

Diallylsulfide wie Diallylmono-, Diallyldi-, Diallyltri- und Diallyltetrasulfid sind organische Schwefelverbindungen, die natürlicherweise in Pflanzen der Gattung *Allium*, wie z. B. Knoblauch, vorkommen. Für Knoblauch konnte bereits gezeigt werden, dass er antibakterielle, lipidsenkende sowie antithrombotische Fähigkeiten hat und zytotoxische und Anti-Tumor-Wirkungen zeigt (Agarwal, 1996; Dausch und Nixon, 1990). Das Risiko von Tumorkrankheiten wie Brust-, Speiseröhren-, Magen- und Prostatakrebs wird durch Knoblauch reduziert (Challier et al., 1998; Gao et al., 1999; Hsing et al., 2002; You et al., 1989). Die anti-cancerogene Wirkung des Knoblauchs wird dabei hauptsächlich auf organische Schwefelverbindungen zurückgeführt, die erst nach Prozessierung durch Kauen oder Schneiden der Pflanze entstehen, wenn entsprechende Enzyme nach Zerstörung der Membranen mit den jeweiligen Vorläufersubstanzen in Kontakt kommen. Diallylsulfide sind Abbauprodukte des reaktiven und instabilen Thiosulfinats Allicin und weisen überraschenderweise gegen viele Organismen wie *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und andere eine höhere Aktivität auf als Allicin (Münchberg et al., 2007). Dabei sind Diallyltri- und Diallyltetrasulfid deutlich aktiver als Diallylmono- und Diallyldisulfid. Hauptbestandteil der Knoblauchextrakte ist Diallyldisulfid, welches in manchen Präparationen 60% des Gesamtextraktes ausmacht (Dausch und Nixon, 1990). Die Zusammensetzungen können jedoch stark variieren (Münchberg et al., 2007). Auch für Diallylmono- und Diallyltrisulfid konnte bereits eine inhibierende Wirkung auf Tumorzellen gezeigt werden (Karmakar et al., 2007; Xiao et al., 2004/2005). Dabei konnten sowohl eine Induktion von Apoptose als auch ein Arrest der Zellen im G₂/M-Übergang nachgewiesen werden. Diallyltetrasulfid wurde bisher kaum betrachtet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Diallylsulfide für den Einsatz als Tumorthapeutika eignen. Dazu wurden HCT116-Kolonkarzinom-Zellen eingesetzt. Dieses Zellsystem bietet den Vorteil, dass neben p53-positiven HCT116p53wt-Zellen auch p53-negative HCT116p53^{-/-}-Zellen verfügbar sind (Bunz et al., 1998), wodurch der Nachweis eines eventuellen p53-Effektes ermöglicht wird. Für die Untersuchungen wurden synthetische Substanzen eingesetzt,

da sie eine höhere Reinheit aufweisen als aus Knoblauch isolierte Verbindungen. Anhand der HCT116-Zellen sollte gezeigt werden, ob und wenn ja über welche Signalwege eine Hemmung des Zellwachstums durch Diallylsulfide induziert werden kann. Besonderes Augenmerk lag dabei auch auf der Frage, inwiefern die chemische Struktur der Verbindungen eine Inhibition der Zellviabilität beeinflusst, da zum einen die Sulfidkette, zum anderen aber auch Doppelbindungen als putative reaktive Gruppen vorliegen. Ebenso stellte sich die Frage, ob eine mögliche hemmende Wirkung auf Tumorzellen beschränkt ist. Eine solche Spezifität würde einen großen Vorteil für die Verwendung von Diallylsulfiden als Therapeutika bieten, da die gesunden Zellen nicht beeinflusst würden und so die Nebenwirkungen einer Diallylsulfid-Behandlung eingeschränkt wären.

Die Untersuchung des Einflusses von Diallylsulfiden auf die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen im MTT-Assay ergab eine unveränderte Zahl der stoffwechselaktiven Zellen nach 8 h Behandlung mit Diallylmono-, Diallyldi-, Diallyltri- oder Diallyltetrasulfid im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Diallylmonosulfid zeigte auch nach 24 h keinen Effekt, während Diallyldi-, Diallyltri- und Diallyltetrasulfid eine deutliche Hemmung der Lebensfähigkeit bewirkten, und zwar je länger die Schwefelkette der eingesetzten Verbindung, desto stärker war auch ihre inhibitorische Wirkung. Nach 48 h bestätigten sich diese Beobachtungen, wobei die Effekte noch verstärkter auftraten. Damit konnte die hemmende Wirkung von Diallylsulfiden auf HCT116p53wt-Zellen sowohl in Abhängigkeit von der Zeit, als auch vor allem in Abhängigkeit von der Schwefelkettenlänge der jeweiligen Verbindung nachgewiesen werden. Die Zeitabhängigkeit der cytotoxischen Wirkung konnte für Diallyldisulfid bereits in A549-Lungenkrebs-Zellen gezeigt werden (Wu et al., 2005), was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Ebenso konnte für Diallylmono-, Diallyldi- und Diallyltrisulfid eine Zunahme des wachstumshemmenden Effektes bei zunehmender Schwefelkettenlänge bereits in verschiedenen Zellen wie den p53-positiven H460- und den p53-negativen H1299-Lungenkarzinom-Zellen (Hong et al., 2000) sowie den Kolonkarzinom-Zellen HCT-15 und DLD-1 (Hosono et al., 2005) nachgewiesen werden. Diallyltetrasulfid, für das bisher noch keine diesbezüglichen Daten existieren, zeigte in dieser Arbeit die stärkste cytotoxische Wirkung und bestätigt so die bisherigen Beobachtungen. Zumindest bis zu Diallyltetrasulfid ist also ein Zusammenhang zwischen der inhibitorischen Wirkung und der Zahl der

Schwefelatome gegeben, wobei eine zunehmende Aktivität bei länger-kettigen Molekülen aufgrund ihrer abnehmenden Stabilität fraglich ist.

Die Beobachtungen bezüglich der Reduktion der Stoffwechselaktivität wurden mittels eines MTT-Assays gemacht. Da dieser Assay auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses MTT zu violetter Formazan und somit auf einem Redoxprozess beruht, muss berücksichtigt werden, dass eine Interaktion von Diallylsulfiden mit MTT das Ergebnis verfälschen könnte. Die Diallylsulfide könnten aufgrund ihrer chemischen Strukturen in den Redoxprozess eingreifen, ohne dass es zu einer Reduktion des Stoffwechsels der untersuchten Zellen kommt. Deshalb wurde ein MTT-Assay in Abwesenheit von Zellen bei ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei kam es nicht zu einer Abnahme der Absorption durch Diallylsulfid-Einfluss, sondern im Gegenteil sogar zu einer leichten Zunahme durch Diallyltetrasulfid. Da diese Steigerung im Vergleich zur Abnahme der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen durch Diallyltetrasulfid um ein Mehrfaches kleiner ist, ist sie vernachlässigbar, lässt jedoch den Schluss zu, dass die tatsächliche Effektivität des Diallyltetrasulfids noch höher ist als die im MTT-Assay gemessene. Die übrigen Diallylsulfide senkten die Absorption im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nur geringfügig. Eine Messung der Lebensfähigkeit behandelter Zellen ist damit mit allen vier Diallylsulfiden möglich.

Da sich Diallyltetrasulfid in dem vorangegangenen Experiment zur Beeinflussung der Viabilität als reaktivstes Diallylsulfid herausgestellt hat, wurde dieses nun eingesetzt, um eine Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Diallylsulfid-Dosis zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass eine 48stündige Behandlung mit 10 μM Diallyltetrasulfid bereits ausreicht, um den Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtpopulation deutlich zu senken. Dieser Effekt wurde durch höhere Dosen von bis zu 160 μM nur geringfügig verstärkt, weshalb eine Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis nicht gegeben zu sein scheint. Dies steht im Widerspruch zu den für Diallyltrisulfid von Xiao et al. gemachten Beobachtungen (2005), die in den Prostatakrebs-Zellen PC3 sowohl mittels Trypan Blau-Ausschluss-Assay als auch mittels Sulforhodamin B-Assay im Bereich von 10 bis 80 μM eine deutliche Dosisabhängigkeit des Diallyltrisulfid-Effektes fanden. Auch in den Glioblastom-Zelllinien T98G und U87MG konnte sowohl für Diallylmono- als auch für Diallyldisulfid

eine dosisabhängige Reduktion der Lebensfähigkeit in einem Bereich von 0 bis 500 μM festgestellt werden (Das et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für diese Differenzen wäre, dass sich Diallyltetrasulfid aufgrund zum einen aufgrund seiner höheren Reaktivität und zum andern aufgrund eines höheren Reinheitsgrades in den eingesetzten Konzentrationen bereits im Sättigungsbereich befindet. Ebenso könnte ein gewebespezifischer Effekt vorliegen und die Aufnahme der Substanzen in verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich sein.

Nachdem eine Beeinflussung der Lebensfähigkeit von HCT116p53wt-Zellen durch Diallylsulfide eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss der chemischen Struktur der Substanzen auf die Hemmung der Viabilität untersucht. Da die Effektivität der Diallylsulfide mit steigender Schwefelkettenlänge zunimmt, ist es wahrscheinlich, dass die Schwefelatome essentiell für die wachstumsinhibierende Wirkung sind. Dennoch besteht auch die Möglichkeit, dass die Molekülgröße an sich bereits die unterschiedliche Wirksamkeit der Substanzen verursacht. Deshalb wurden schwefelfreie Kohlenstoffanaloga eingesetzt. 1,6-Heptadien unterscheidet sich von Diallylmonosulfid dadurch, dass die Schwefelatome durch Kohlenstoffatome ersetzt wurden. 1,9-Decadien stellt das Analogon zu Diallyltetrasulfid dar. Diese beiden Verbindungen wurden neben Diallylmono- und Diallyltetrasulfid zur Behandlung von HCT116p53wt und in einen anschließenden MTT-Assay eingesetzt, so dass sowohl die Kettenlänge als auch die Bedeutung der Schwefelatome direkt vergleichbar waren. Eine Reduktion der Lebensfähigkeit war nur unter Einfluss von Diallyltetrasulfid erkennbar. Sowohl Hepta- als auch Decadien konnten die Stoffwechselaktivität von HCT116p53wt nicht signifikant reduzieren. Daraus lässt sich schließen, dass die Molekülgröße der Substanzen für ihre wachstumsinhibierenden Effekte unerheblich ist. Lediglich die Anzahl der Schwefelatome ist für die Reaktivität der Substanzen von Bedeutung. Ebenso zeigt dieses Experiment, dass die beiden Doppelbindungen, die ebenfalls in Diallylsulfiden vorkommen, nicht in der Lage sind, die Cytotoxizität der Verbindungen in Abwesenheit des Schwefels zu vermitteln.

Dadurch ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Doppelbindungen eine Reaktivität vermitteln, die einen synergistischen Effekt auf die Aktivität des Schwefels ausübt. Um eine solche Wirkung zu untersuchen, wurden neben Diallylmono- und Diallyltetrasulfid auch Dipropylmono- und Dipropylyltetrasulfid verwendet, die die gesättigten Analoga zu

Diallylmono- und Diallyltetrasulfid darstellen. Dabei konnten sowohl Dipropylmono- als auch Diallylmonosulfid die Lebensfähigkeit der Zellen nicht reduzieren. Dipropyltetrasulfid dagegen senkte den Anteil lebender Zellen zeitabhängig und etwa im gleichen Maße wie Diallyltetrasulfid. Nach 48 h war sogar eine geringfügig höhere Wirkung des Dipropyltetrasulfids als des Diallyltetrasulfids feststellbar. Somit scheint von den Doppelbindungen der Diallylsulfide keine Reaktivität auszugehen, die die cytotoxische Wirkung auf HCT116p53wt beeinflusst. Hosono und Mitarbeiter (2008) haben dagegen bei der Untersuchung von Trisulfiden in HT-29-Zellen gegensätzliche Beobachtungen gemacht. Dipropyltrisulfid wies eindeutig eine geringere wachstumsinhibierende Wirkung auf als Diallyltrisulfid. Im Vergleich verschiedener Alkyl- und Alkenyltrisulfide zeigten Alkenyltrisulfide eine Zerstörung des Mikrotubulinnetzwerks von HT-29-Zellen und eine Induktion des G₂/M-Arrestes, die von Alkyltrisulfiden nicht in diesem Maße bewirkt werden konnten. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf einer Spezifität der unterschiedlichen Zelllinien beruhen. Auch wenn es sich sowohl bei HCT116p53wt- als auch bei HT-29-Zellen um Kolonkarzinom-Zellen handelt, so entstammen sie doch aus verschiedenen Tumoren und weisen einen unterschiedlichen zellulären Hintergrund auf.

Die Bestimmung der Viabilität von Zellen im MTT-Assay gibt nur Aufschluss über eine Veränderung des Anteils metabolisierender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollpopulation, nicht jedoch über die Ursache einer solchen Veränderung. So kann sowohl durch eine Verringerung der Zellzahl als auch durch einen Wachstumsarrest eine Abnahme der gemessenen Absorption erreicht werden. Wie bereits beschrieben, konnten sowohl die Induktion von Apoptose als auch das Auslösen eines G₂/M-Arrestes in kultivierten Zellen durch Diallylsulfide in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Knowles und Milner, 1998/2000; Sundaram und Milner, 1996; Kwon et al., 2002; Xiao et al., 2004/2005). Daher wurde die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Diallyltetrasulfid-Behandlung in HCT116p53wt untersucht. Dies erfolgte mit einer FACS-Analyse, in der die DNA der Zellen angefärbt wurde und die Zellen daraufhin anhand ihres DNA-Gehaltes bestimmten Zellzyklusphasen zugeordnet werden konnten. Dabei führte Diallyltetrasulfid zu einer deutlichen Zunahme der SubG₁-Fraktion, die die apoptotischen Zellen beinhaltet. Ebenso befanden sich nach Behandlung mehr Zellen in der G₂/M-Phase, wobei nach 24 h Inkubation eine deutliche Differenz, nach 48 h aber nur ein geringfügiger Unterschied

messbar war. Eine mögliche Erklärung für den Rückgang dieser Differenz wäre, dass die Zellen zunächst einen Zellzyklusarrest einleiten. Ist eine Reparatur der durch Diallyltetrasulfid ausgelösten Schäden nicht möglich, so wird aus dem Arrest heraus Apoptose induziert. Somit befänden sich die zunächst arretierten Zellen nach 48 h bereits in einem apoptotischen Prozess. Ob diese Zunahmen tatsächlich auf Apoptose bzw. G₂/M-Arrest zurückzuführen sind, kann an dieser Stelle jedoch nicht eindeutig festgestellt werden. Die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen nach Diallyltetrasulfid-Behandlung wurde bisher noch nicht untersucht. Diallylmono- und Diallyldisulfid jedoch bewirken nach Xiao und Mitarbeitern (2005) in PC3-Zellen keine Zunahme der G₂/M-Fraktion, während Diallyltrisulfid zu einer deutlichen Steigerung dieser Fraktion führt. Der Anteil der SubG₁-Fraktion nimmt von Diallylmono- bis Diallyltrisulfid kontinuierlich zu. Geht man davon aus, dass Diallyltetrasulfid auf ähnliche oder gleiche Weise wirkt wie Diallyltrisulfid, so bestätigt diese Studie sowohl die Zunahme der SubG₁- als auch der G₂/M-Fraktion durch Diallylsulfid-Behandlung. Die kontinuierliche Steigerung des SubG₁-Anteils mit zunehmender Schwefelkettenlänge, die Xiao und Kollegen zeigen konnten, unterstützt die Vermutung, dass die Reaktivität der Diallylsulfid von der Zahl der Schwefelatome abhängig ist. Hosono und Mitarbeiter (2005) konnten in HCT-15 und DLD-1- Zellen ebenfalls einen Diallyltrisulfid-bedingten Anstieg der G₂/M-Population beobachten. Bemerkenswert dabei ist die Tatsache, dass in beiden Zelllinien nach 12 bzw. 16 h der G₂/M-Anteil am höchsten war. Nach 24 h war keine vergrößerte G₂/M-Fraktion zu beobachten. Auch wenn in den beschriebenen Studien keine Zellen nach 48 h Behandlung untersucht worden sind, so lässt sich auch hier vermuten, dass die Zellen aus einem G₂/M-Arrest heraus in Apoptose gehen, da der G₂/M-Anteil zunächst steigt und dann wieder abnimmt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass in der Studie von Hosono und Kollegen ebenfalls ein Anstieg der SubG₁-Population nachgewiesen werden konnte.

Die Zunahme des SubG₁-Anteils allein ist jedoch kein eindeutiger Nachweis für das Auftreten apoptotischer Zellen, da diese Beobachtung lediglich eine gesteigerte Anzahl von Zellen mit fragmentierter DNA beschreibt. Die Ursache für diese verstärkte DNA-Fragmentierung kann mittels FACS-Analyse nicht nachgewiesen werden. Daher besteht die Notwendigkeit einer näheren Charakterisierung von Apoptose. Ein typisches Merkmal sind hierbei Veränderungen der Zellmorphologie. Das so genannte

„Blebbing“ wurde als Charakteristikum apoptotischer Zellen identifiziert und kommt durch die Spaltung von Aktin zustande, was den Zusammenbruch des Zytoskeletts verursacht (Charras, 2008). Nach Behandlung von HCT116p53wt-Zellen mit DMSO bzw. Diallyltetrasulfid für 48 h zeigen DMSO-behandelte Zellen eine intakte Struktur des Zytoskeletts. Diallyltetrasulfid-behandelte Zellen dagegen zeigen deutliche Deformationen und blasenförmige Veränderungen, das „Blebbing“. Dies konnte auch in den Lebertumor-Zellen J5 durch Diallylmono-, Diallyldi- und Diallyltrisulfid bewirkt werden (Wu et al., 2004), wobei auch hier eine Abhängigkeit von der Schwefelkettenlänge feststellbar war.

Apoptose beruht auf einer Kette von Aktivierungen von Cystein-Aspartat-Proteasen oder Caspasen (Hengartner, 2000). Diese liegen meist in Form von inaktiven Zymogenen, den Procaspasen, vor und werden durch Spaltung aktiviert. Dabei unterscheidet man Initiationscaspasen, die andere Caspasen aktivieren, und Exekutionscaspasen, die zelluläre Substrate spalten. Für die beiden Wege der Apoptoseinduktion existieren unterschiedliche Initiationscaspasen. Auf dem intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion wird Caspase-9 aktiviert, während Caspase-8 und Caspase-10 für den extrinsischen Weg essentiell sind. Ist die Caspase-Kaskade ausgelöst, kommt es auf beiden Wegen zur Aktivierung der gleichen Exekutionscaspasen, zu denen auch Caspase-3 zählt. Somit dient ein Nachweis der Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 als Nachweis sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptoseweges. Die Spaltung der Procaspase und somit ihre Aktivierung wurde hier indirekt untersucht, da der spezifische Antikörper, der zur Detektion der Procaspase im Western Blot eingesetzt wurde, nur das Vollängenprotein detektiert. Daher wurde die Zunahme des aktiven Proteins nicht direkt bestimmt, sondern mit der Abnahme der inaktiven Proform gleichgesetzt. Eine Aktivierung der Caspase-3 war so nur für Diallyltri- und Diallyltetrasulfid-Behandlung nachzuweisen. Vor allem nach 48 h Behandlung bewirkten diese Verbindungen einen deutlichen Rückgang der Procaspase-3-Menge, der für Diallylmono- und Diallyldisulfid nicht eindeutig nachzuweisen war. In anderen Studien, die die Zunahme des Spaltproduktes und seiner Aktivität direkt untersuchten, konnte für Diallylmono- und Diallyldisulfid ein aktivierender Effekt auf Caspase-3 gezeigt werden, sowohl in SH-SY5Y-Glioblastom-Zellen (Karmakar et al., 2007) als auch in HL-60 Leukämie-Zellen (Kwon et al., 2000). Dies widerspricht den in dieser

Arbeit gemachten Beobachtungen. Desweiteren kann Diallyltrisulfid in PC-3-Zellen eine Caspase-3-Aktivierung bewirken (Xiao et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit, die Aktivierung von Caspase-3 nachzuweisen, ist die Untersuchung eines Substrates der Protease auf seine Spaltung.

Ein solches Substrat stellt die Poly-ADP-Ribosepolymerase dar, die von den Exekutionscaspasen im Verlauf der Apoptose gespalten wird. Kommt es zur Spaltung der PARP, so müssen aktive Caspasen in der Zelle vorliegen. Die PARP-Spaltung wurde im Prinzip auf dieselbe Weise untersucht wie die Caspase-3-Spaltung, wobei jedoch in diesem Fall neben dem 113 kDa großen Vollängenprotein auch das 89 kDa große Spaltprodukt im Western Blot nachgewiesen werden kann. Von den untersuchten Diallylsulfiden können in der eingesetzten Dosis von 40 μM nur Diallyltri- und Diallyltetrasulfid eine PARP-Spaltung bewirken. Diallyltetrasulfid zeigt in einer Konzentration von 10 μM keine Wirkung auf HCT116p53wt-Zellen, jedoch nimmt die Spaltung der PARP nach Behandlung mit 20 – 160 μM mit steigender Konzentration kontinuierlich zu. Dieser Dosiseffekt war bei der Untersuchung der Lebensfähigkeit nicht zu beobachten. Dort reichten bereits 10 μM Diallyltetrasulfid aus, um die Viabilität signifikant zu senken, während eine solche Menge nicht genügt, um eine nachweisbare PARP-Spaltung auszulösen. Dies deutet darauf hin, dass der im MTT-Assay beobachtete Effekt des Diallyltetrasulfids das Resultat verschiedener Prozesse in der Zelle ist. Apoptose spielt dabei zwar eine wichtige Rolle, ist aber nicht ausschließlich dafür verantwortlich. Der Einfluss der Diallylsulfidstruktur auf die PARP-Spaltung wurde wie die Lebensfähigkeit mit Kohlenstoff- und Alkylanaloga untersucht. Dabei konnten weder Heptadien, Decadien noch Dipropylmonosulfid eine PARP-Spaltung auslösen, während Dipropyltetrasulfid im selben Maße wie Diallyltetrasulfid dazu in der Lage war. Dies zeigt übereinstimmend mit den Ergebnissen des MTT-Assays, dass die Reaktivität der Schwefelgruppen benötigt wird, um einen apoptotischen Prozess in Gang zu setzen, während die Alkenyl-Gruppen nicht essentiell sind. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen konnte die Spaltung der Poly-ADP-Ribosepolymerase durch Diallyldisulfid in den Leukämie-Zellen HL-60 von Kwon und Kollegen (2002) gezeigt werden. Dabei wurde in HL-60-Zellen nach 4 h die stärkste Spaltung der PARP beobachtet, während der Effekt nach 48 h bereits wieder fast vollständig zurückgegangen war. In HCT116p53wt ist sowohl nach 24 als auch nach 48 h eine deutliche PARP-Spaltung erkennbar. In neuronalen PC12-Zellen kann

Diallyldisulfid ebenfalls bereits nach 2stündiger Behandlung eine PARP-Spaltung auslösen (Koh et al., 2005). Dies deutet auf eine unterschiedliche Sensitivität der betrachteten Leukämie- bzw. neuronalen Zellen gegenüber den in dieser Arbeit untersuchten HCT116p53wt-Kolonkarzinom-Zellen hin, da sie nicht nur zu einem früheren Zeitpunkt einen Effekt zeigen, sondern auch auf Diallyldisulfid reagieren, welches in HCT116p53wt-Zellen keine PARP-Spaltung auslösen konnte. Insgesamt lässt sich nach Untersuchung von Zellmorphologie, Caspase-3-Aktivierung und PARP-Spaltung sagen, dass Diallylsulfide in HCT116p53wt-Zellen Apoptose auslösen. Dabei ist, ebenso wie bei der Reduktion der Viabilität, auch bei der PARP-Spaltung mit steigender Zahl der Schwefelatome ein zunehmender Effekt der jeweiligen Diallylsulfid-Verbindung zu beobachten.

Nachdem die Induktion von Apoptose durch Diallylsulfide nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, welche Mechanismen diesen apoptotischen Prozessen zugrunde liegen. Möglich wäre dabei eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies, die bereits als Vermittler von Apoptose identifiziert werden konnten (Buttke und Sandstrom, 1994). Die Entstehung von oxidativem Stress als Auslöser der Apoptose ist aufgrund der Diallylsulfid-Struktur denkbar, da es sich um schwefelhaltige Redoxsysteme ebenso wie z. B. Glutathion (GSH) handelt. Glutathion ist in reduzierter Form in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu reduzieren und somit abzufangen. In der oxidierten Form, dem Glutathion-Disulfid (GSSG), liegen dagegen ähnlich wie in Diallylsulfiden Schwefelbrücken vor. Diallylsulfide sind in Reinform stabil, da sie auch nach mehreren Monaten Aufbewahrung bei -20°C die beobachteten Wirkungen mit gleich bleibender Effektivität auslösen können. Ein Zerfall der Substanzen findet also nur in der Zelle bzw. im Zellkulturmedium statt. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Diallyldisulfid in A549-Zellen (Wu et al., 2005) sowie Diallylmono- und Diallyldisulfid in T98G- und U87MG-Zellen (Das et al., 2007) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fördern. Im Widerspruch dazu stehen die Aussagen von Prasad und Mitarbeitern (2008), die in Mäusen einen Anstieg der ROS-Produktion durch 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen (DMBA) durch Gabe von Diallylsulfid reduzieren konnten, was auf eine Schutzfunktion von Diallylsulfiden vor reaktiven Sauerstoffspezies hinweist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Diallyltetrasulfid auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in HCT116p53wt untersucht. Dazu wurde die Umwandlung des nicht fluoreszierenden H_2DCFDA in das

fluoreszierende DCF gemessen, die durch ROS vermittelt wird (LeBel et al., 1992). Auf diese Weise sind die reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 , OOH^\cdot und NO_3^- messbar. Nach 24h ist eine ROS-Bildung nicht messbar, jedoch ist nach 48 h ein deutlicher Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies erkennbar, was mit den Erkenntnissen von Das und Mitarbeitern übereinstimmt, die ebenfalls nach bis zu 60 h eine erhöhte ROS-Produktion durch Diallylmono- und Diallyldisulfid zeigen konnten. Auch hier war das Disulfid wesentlich reaktiver als das Monosulfid. Laut Wu und Kollegen ist dagegen bereits nach einer kürzeren Inkubationszeit von etwa 5 h das maximale Maß an reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle erreicht, während diese nach 24 h fast vollständig abgebaut sind. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Die chemischen Hintergründe der Diallylsulfid-Effekte sind noch nicht vollständig aufgeklärt und Erklärungsversuche sind teilweise spekulativ. Für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies wird derzeit angenommen, dass Diallylsulfide mit Thiolen wie Glutathion (GSH) in einer Thiol-Polysulfid-Austauschreaktion reagieren, was zur Bildung gemischter Disulfide wie thiolierte Proteine und reduzierter Formen wie Thiole (RSH) oder Perthiole (RSSH, RSSH etc.) führt (Münchberg et al., 2007). Die Perthiole werden derzeit als die eigentlichen aktiven Formen der Diallylpolysulfide *in vivo* angesehen. Da sie nur aus Schwefelketten mit drei oder mehr Atomen entstehen können, wäre dies eine mögliche Erklärung für die verstärkte Wirkung des Diallyltri- und Diallyltetrasulfids gegenüber Diallylmono- und Diallyldisulfid, welche nicht kontinuierlich, sondern sprunghaft ansteigt. Durch Reaktion der Persulfide mit Oxidantien wie O_2 oder Oxyhämoglobin können dann reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxidanion $\text{O}_2^{\cdot-}$ oder H_2O_2 entstehen, welches mittels H_2DCFDA messbar ist. Jedoch spricht gegen diese Theorie, dass solche Reaktionen reversibel sind und durch reduziertes Glutathion aufgefangen werden sollten, wenn Diallylsulfide in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt werden. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die Vorgänge insgesamt wesentlich komplexer sind und verschiedene Prozesse ablaufen. (Münchberg et al., 2007). Daher müssen die chemischen Hintergründe der Diallylsulfid-Effekte noch genauer untersucht werden.

Werden die von Diallylsulfiden ausgelösten Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt, so sollten Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure oder N-Acetylcystein (NAC) eine Verringerung dieser Effekte bewirken, da sie die oxidative Wirkung der Diallylsulfide inhibieren können. Ascorbinsäure kann dabei aufgrund seines geringen

Reduktionspotentials leicht oxidiert werden (Rose und Bode, 1993). NAC kann zum einen selbst zu Cystin oxidiert werden und ist zum andern auch ein Vorläufer von Glutathion (De Vries und De Flora, 1993). Nachdem bereits gezeigt worden war, dass Diallyltetrasulfid PARP-Spaltung bewirken kann, konnte nun nachgewiesen werden, dass Diallyltetrasulfid nach Vorbehandlung mit Ascorbinsäure bzw. NAC nicht mehr in der Lage ist, diese Spaltung auszulösen. Ebenso wurde ein Effekt von NAC auf die Lebensfähigkeit von HCT116p53wt im MTT-Assay untersucht. Jedoch war es nicht möglich, eine Reduktion der Wachstumsinhibition durch dieses Antioxidans zu zeigen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Säure NAC den MTT-Assay stören kann. Bei einer Zugabe von MTT in NAC-haltiges Zellkulturmedium trat eine intensive Blaufärbung auf, was auf eine stark reduzierende Wirkung von NAC gegenüber MTT hindeutet. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Vorbehandlung mit NAC durchgeführt, so dass es nicht direkt mit MTT in Berührung kam. Dennoch könnten eventuelle Rückstände des NAC-haltigen Mediums die Ergebnisse des MTT-Assays verfälschen. Somit konnte zwar kein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Viabilität und reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden, jedoch scheint die Diallyltetrasulfid-vermittelte Apoptose ROS-abhängig zu sein. Dafür spricht, dass Antioxidantien in der Lage sind, durch Diallyltetrasulfid ausgelöste PARP-Spaltung zu inhibieren. Wu und Kollegen konnten 2005 eine Zunahme apoptotischer Zellen durch Diallyldisulfid zeigen, die unter Einfluss von N-Acetylcystein nicht erreicht wurde. Die protektiven Eigenschaften von Ascorbinsäure gegenüber Diallylmono- und Diallyldisulfid wurden von Das und Mitarbeitern (2007) nachgewiesen. Hier bewirkten die Diallylsulfide eine Phosphorylierung und Aktivierung der p38 MAPK-Kinase, was in der Regel mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht wird. Diese Aktivierung fand nach Behandlung mit Ascorbinsäure nicht mehr statt. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit die Viabilität der Zellen durch N-Acetylcystein nicht positiv beeinflusst werden konnte, so gibt die DCF-Messung in Zusammenhang mit dem Einfluss der Antioxidantien auf die PARP-Spaltung Hinweise auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an den durch Diallyltetrasulfid induzierten Prozessen.

Das Wachstumssuppressorprotein p53 stimuliert als Transkriptionsfaktor die Expression pro-apoptotischer Proteine und reprimiert anti-apoptotische Gene (Fridman and Lowe, 2003). Auch auf transkriptionsunabhängigen Wegen kann p53 Apoptose induzieren, z. B. durch Komplexierung mit Bcl-XL an den Mitochondrien und

Förderung der Cytochrom C-Freisetzung (Mihara et al., 2003) oder durch direkte Aktivierung von Bax (Chipuk et al., 2003/2004). Diallylmonosulfid konnte einen Anstieg der p53-Proteinmenge bei Behandlung DMBA-induzierter Hautpapillome (Khan et al., 2007) sowie bei Behandlung von Mäusen mit DMBA-induzierten Hauttumoren (Arora et al., 2004) bewirken. Dabei kam es erst nach DMBA-Induktion zu einem Diallylmonosulfid-bedingten p53-Anstieg, was auf eine Spezifität dieses Mechanismus für Tumorzellen hindeutet. Diallylmonosulfid kann p53 außerdem auf mRNA-Ebene im Brustgewebe weiblicher Ratten induzieren (Green et al., 2006). Hong und Mitarbeiter (2000) konnten wiederum keinen Effekt von Diallylmonosulfid auf p53 in Lungenkrebszellen H460 feststellen, jedoch konnte Diallyldisulfid die p53-Expression deutlich verstärken. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von p53 für den Einfluss von Diallylsulfiden auf HCT116-Zellen zum einen durch Vergleich der p53-positiven HCT116p53wt-Zellen mit der p53-negativen HCT116p53^{-/-}-Zelllinie in Bezug auf ihre Viabilität sowie die Induktion der PARP-Spaltung und zum anderen durch Betrachtung von p53 aus HCT116p53wt-Zellen im Western Blot untersucht. Dabei zeigten HCT116p53^{-/-}-Zellen wie HCT116p53wt-Zellen nach Diallyltri- und Diallyltetrasulfid-Behandlung eine Abnahme der Lebensfähigkeit sowie eine PARP-Spaltung, die von den Doppelbindungen unbeeinflusst blieben. Diallylmono- und Diallyldisulfid bewirkten eine wesentlich schwächere Reduktion der Viabilität und konnten keine PARP-Spaltung auslösen. Auch in HCT116p53^{-/-}-Zellen sind bereits geringe Konzentrationen an Diallyltetrasulfid ausreichend, um die Stoffwechselaktivität signifikant zu inhibieren. Das Gleiche trifft für die Fähigkeit von HCT116p53^{-/-}-Zellen zu, PARP-Spaltung auszulösen. Das ähnliche Verhalten p53-positiver und p53-negativer Zellen, die ansonsten identisch sind, deutet auf einen p53-unabhängigen Weg der Apoptoseinduktion hin.

Betrachtete man jedoch die p53-Expression in HCT116p53wt nach Diallylsulfid-Behandlung, so führten Diallyltri- und Diallyltetrasulfid zu einer Zunahme der p53-Proteinmenge. Dies steht im Widerspruch zu den oben genannten Studien, die – wenn auch in höheren Konzentrationen als die hier eingesetzten – auch für Diallylmono- und Diallyldisulfid einen Effekt auf p53 feststellen konnten. Diallyltetrasulfid zeigte in der vorliegenden Arbeit zudem eine Dosisabhängigkeit in seiner Fähigkeit, p53 zu induzieren. Diese Abhängigkeit konnte bereits für die Diallyltetrasulfid-bedingte PARP-Spaltung gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine gesteigerte p53-

Expression von Diallyltri- und Diallyltetrasulfid bewirkt wird, während die Reaktivität der übrigen Diallylsulfide nicht ausreichend ist. Hong und Kollegen (2008) konnten dagegen ebenfalls in HCT116-Zellen eine deutliche Zunahme des p53-Proteins feststellen. Ein Knockdown von p53 mit siRNA hatte jedoch keinen Einfluss auf die Diallyldisulfid-bedingten Effekte. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen von HCT116p53^{-/-}-Zellen überein. Dem widersprechen Bottone und Mitarbeiter (2002), die zwar für die p53-Wildtyp-exprimierenden HCT116-Zellen eine Induktion der p53-Expression durch Diallyldisulfid nachweisen konnten, nicht jedoch für HCT-15-Zellen, die eine mutante p53-Form exprimieren, und PC-3-Zellen, die kein p53 besitzen. Daraus leitet sich laut Bottone und Kollegen ein p53-abhängiger Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Diallyldisulfid ab, der in dieser Arbeit so nicht bestätigt werden konnte. Jedoch deuten die Ergebnisse auf die Existenz alternativer Mechanismen hin, so dass bei Abwesenheit eines funktionierenden p53 auf einen p53-unabhängigen Apoptoseweg zurückgegriffen werden kann.

Ein weiteres wichtiges Protein, das für das Überleben der Zelle verantwortlich ist, ist die Proteinkinase CK2. Dieses ubiquitär vorkommende Protein wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion durch Diallylsulfide untersucht. Jedoch wurde bereits in Prostatakarzinom-Zellen gezeigt, dass eine CK2-Überexpression einen Apoptoseschutz bietet (Guo et al., 2001), während eine Hemmung der CK2 zur Induktion von Apoptose führt (Hessenauer et al., 2003). Dementsprechend konnte auch hier gezeigt werden, dass die Hemmung der CK2 in HCT116p53wt-Zellen mit dem spezifischen Inhibitor DMAT zur Induktion von PARP-Spaltung führt. Sollten Diallylsulfide über eine CK2-Inhibition wirken, so müsste eine Behandlung mit Diallylsulfiden zu einer Reduktion von CK2 in Proteingehalt und / oder Aktivität führen. Daraufhin wurde im Western Blot untersucht, ob die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Diallylsulfiden eine Abnahme der Proteinmengen der Ck2-Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und CK2 β bewirkt. Die CK2 α -Untereinheit scheint von Diallylsulfiden nicht beeinflusst zu werden, da keine Veränderung der Proteinexpression erkennbar ist. CK2 α' und CK2 β zeigen nach 24 h eine Abnahme der Proteinexpression durch Diallyltri- und Diallyltetrasulfid, die jedoch nach 48stündiger Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Es ist also kein eindeutiger Trend erkennbar, der auf eine Beteiligung von CK2 an den von Diallylsulfiden bewirkten Effekten schließen lässt.

Neben der Induktion von Apoptose konnte auch das Auslösen eines G₂/M-Arrestes durch Diallylsulfide von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Hosono et al., 2005; Xiao et al., 2005). Um den G₂/M-Übergang zu überschreiten, muss der CDK1/Cyclin B-Komplex durch Dephosphorylierung von Threonin 14 und Tyrosin15 aktiviert werden. Diese Dephosphorylierungen werden von der Proteinphosphatase cdc25C durchgeführt (Dunphy und Kumagai, 1991; Russell und Nurse, 1986). Kommt es nun zum G₂/M-Arrest, so bleiben die Phosphorylierungen erhalten. Dementsprechend sollte eine reduzierte Aktivität von cdc25C in der Zelle nachweisbar sein. Diese kann durch eine verminderte Proteinmenge und / oder eine Hemmung der Phosphataseaktivität in vorhandenem Protein zustande kommen. Daher wurde zum einen die Proteinmenge von cdc25C nach Diallylsulfid-Behandlung und zum andern ein Einfluss auf die cdc25C-Aktivität durch Diallyltetrasulfid untersucht. Dabei waren Diallyltri- und Diallyltetrasulfid in der Lage, die Expression von cdc25C deutlich zu verringern, was durch Diallylmonosulfid gar nicht und durch Diallyldisulfid in sehr geringem Maße nach 48stündiger Inkubation erreicht werden konnte. Auch die cdc25C-Expression kann durch Decadien nicht ausgelöst werden, durch Dipropyltetrasulfid aber schon. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur für eine Apoptoseinduktion, sondern auch für einen Diallylsulfid-bedingten Zellzyklusarrest die Sulfidkette essentiell ist, während die Doppelbindungen nicht benötigt werden. Cdc25C wird ebenfalls von Verbindungen mit zunehmenden Schwefelkettenlängen verstärkt in seiner Expression gehemmt. Da sowohl HCT116p53wt-Zellen als auch HCT116p53^{-/-}-Zellen eine Abnahme von cdc25C zeigten, scheint auch hier ein p53-unabhängiger bzw. ein alternativer Signalweg vorzuliegen. In anderen Studien konnte jedoch auch für Diallyldisulfid ein reduzierender Effekt auf die cdc25C-Proteinmenge nachgewiesen werden, und zwar in HCT-15-Zellen (Knowles und Milner, 2000) sowie in MGC803-Magenkrebs-Zellen (Yuan et al., 2004). Dagegen konnte in den p53-negativen PC-3-Zellen übereinstimmend mit dieser Arbeit kein Einfluss von Diallylmono- und Diallyldisulfid, aber eine deutliche Reduktion von cdc25C nach Diallyltrisulfid-Behandlung nachgewiesen werden (Xiao et al., 2005). Zudem zeigte diese Studie eine zunehmende Phosphorylierung von cdc25C an Serin 216 und eine verstärkte Bindung des Proteins an 14-3-3 β , was für eine Inaktivierung von cdc25C spricht. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass die Reduktion der cdc25C-Menge durch Diallyltrisulfid teilweise aufgehoben werden kann, wenn ein Mimetikum von Superoxiddismutase und Katalase zugegeben wird, also wenn

reaktive Sauerstoffspezies beseitigt werden (Antosiewicz et al., 2006). Somit scheint nicht nur Apoptose durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt zu werden, sondern auch ein G₂/M-Arrest. Dieser wird in PC-3-Zellen durch Aktivierung der Chk1-Kinase ausgelöst, was zur Phosphorylierung von Serin 216 führt (Herman-Antosiewicz, 2005).

Der Nachweis der cdc25C-Aktivität nach Diallylsulfid-Behandlung erfolgte bisher auf indirektem Wege über eine Abnahme der cdc25C-Menge oder indem eine inaktivierende Phosphorylierung gezeigt wurde. Deshalb sollte in dieser Arbeit nun mittels des Substrates FDP ein direkter Nachweis der Phosphatase-Aktivität erfolgen. Jedoch war nach 48 h Diallyltetrasulfid-Behandlung nur eine geringfügige Abnahme der Aktivität im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen feststellbar, während es nach 24 h sogar zu einer leichten Zunahme kam. Zudem waren die Ergebnisse der einzelnen Experimente sehr unterschiedlich. Diese Abweichung ist erklärbar mit einer hohen Fehlerbehaftung dieses Assays. Da es sich bei FDP nicht um ein spezifisches Substrat von cdc25C handelt, muss zunächst eine Isolierung des Proteins aus einem Gesamtzellextrakt erfolgen, bevor die cdc25C-Aktivität bestimmt werden kann. Das so aufgereinigte Protein muss daraufhin gleichmäßig auf verschiedene Ansätze verteilt werden. Diese Vorgehensweise birgt eine hohe Gefahr für die Entstehung von Messfehlern. Da jedoch kein adäquaterer Test für die Bestimmung der Phosphataseaktivität zur Verfügung stand, wurde der FDP-Assay eingesetzt. Eine weitere Erklärung wäre, dass es nicht zu einer Abnahme der Aktivität von cdc25C kommt. Allerdings sprechen sowohl die Ergebnisse aus anderen Studien, in denen ja sowohl eine Abnahme der Proteinmenge als auch eine Zunahme der inhibierenden Serin 216-Phosphorylierung gezeigt wurde, für eine Hemmung der Proteinphosphatase cdc25C und einen Arrest des Zellzyklus im G₂/M-Übergang.

Wenn Diallylsulfide zu einem Zellzyklusarrest im G₂/M-Übergang führen, indem sie cdc25C herunterregulieren, so sollte im Umkehrschluss eine Überexpression von cdc25C eine Wachstumsinhibition verhindern. Um den Einfluss einer solchen Überexpression zu untersuchen, wurden Saostsp53 138-8-Osteosarkom-Zellen eingesetzt, die mit cdc25C bzw. dem entsprechenden Leervektor stabil transfiziert worden waren. Dieses System hat den Vorteil, dass sowohl cdc25C normal- als auch überexprimierende Zellen existieren, die ansonsten identisch sind. Jedoch birgt es auch Nachteile. Zum einen handelt es sich um ein völlig anderes Zellsystem als die

bisher verwendeten HCT116-Zellen, und zum andern liegt p53 bei 37°C in mutierter Form vor, was die Resultate ebenfalls beeinträchtigen könnte. Da für HCT116-Zellen kein p53-Einfluss auf die Effekte von Diallylsulfiden festgestellt werden konnte, wurden Saostp53 138-8+cdc25Cwt- bzw. Saostp53 138-8+pcDNA-Zellen dennoch zur Untersuchung der cdc25C-Überexpression eingesetzt. Dazu wurde der Effekt von Diallyltetrasulfid auf die Lebensfähigkeit der Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis untersucht. Sowohl bei cdc25C-überexprimierenden als auch bei nicht-überexprimierenden Zellen konnte die Viabilität auch mit 160 µM Diallyltetrasulfid nur auf etwa 80% gesenkt werden. Cdc25C scheint also in diesem Fall keinen Einfluss auf die Diallyltetrasulfid-Effekte zu haben. Es war jedoch auch nicht zu erwarten, dass die Lebensfähigkeit bei Überexpression von cdc25C vollständig regeneriert werden kann, da die Abnahme der Stoffwechselaktivität nicht nur auf einem Zellzyklusarrest, sondern auch auf Apoptose beruht. Jedoch zeigen Saostp53 138-8 insgesamt nur eine sehr schwache Reaktion auf Diallyltetrasulfid, was darauf hinweist, dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich auf die Substanz reagieren.

Da HCT116- und Saostp53 138-8-Zellen unterschiedlich auf Diallyltetrasulfid reagierten, wurden weitere Zelllinien auf den Einfluss von Diallylsulfiden auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Dazu wurden zum einen verschiedene Tumorzellen, zum andern aber auch Primärzelllinien eingesetzt. Eine Immunität von Primärzellen wäre von Vorteil beim Einsatz von Diallylsulfiden als Therapeutika. HT29-Kolonkarzinom-Zellen wiesen eine deutliche Reduktion der Lebensfähigkeit nach Behandlung mit Diallyltri- und Diallyltetrasulfid auf. Diallylmono- und Diallyldisulfid hatten keinen Effekt. Für Diallyldisulfid konnte jedoch bereits eine reversible Wachstumsverzögerung in HT29-Zellen gezeigt werden (Robert et al., 2001), wenn auch in einer Konzentration von 100 µM, während hier nur 40 µM eingesetzt wurden. Dagegen zeigten Jakubíková und Sedlák (2006), dass Diallylmono-, Diallyldi- und Diallyltrisulfid mit steigender Effektivität Apoptose und G₂/M-Arrest in HT29-Zellen bewirken. Auch Hosono und Mitarbeiter (2008) konnten bereits eine hemmende Wirkung von Diallyltrisulfid auf HT29-Zellen nachweisen. Neben HT29-Zellen wurden in dieser Arbeit auch OvBH1-Ovarialkarzinom-Zellen untersucht, die ebenso wie HT29-Zellen inhibiert wurden. Dass auch hier Zellen mit einem mutanten sowie einem Wildtyp-p53 gleich reagierten, zeigt die Existenz p53-unabhängiger Apoptose- bzw. Zellzyklusarrest-induzierender Signalwege. Bei Saos-2-Osteosarkom-Zellen handelt es sich um die Zellen, aus

denen durch stabile Transfektion mit einem mutanten p53 Saostp53 138-8-Zellen entstanden. Auch in Saos-2-Zellen konnten Diallylsulfide nur eine geringe Reduktion der Lebensfähigkeit bewirken, was auf eine geringe Sensitivität dieser Osteosarkom-Zellen schließen lässt. Da verschiedene Zelllinien und Tumorarten eine unterschiedliche Sensitivität aufwiesen, wurde nun die primäre Prostata-Zelllinie EPN untersucht. Diese Zellen zeigten wie Saos-2-Zellen zwar eine gewisse Abnahme der Lebensfähigkeit nach Diallylsulfid-Behandlung, jedoch war diese deutlich weniger ausgeprägt als in den Kolon- oder Ovarialkarzinom-Zellen. Auch ist die Standardabweichung bei der Untersuchung dieser Zellen im MTT-Assay ebenfalls recht groß. Alle hier untersuchten Zelllinien bestätigen jedoch den Trend, dass die Effektivität der Diallylsulfid-Verbindungen mit steigender Länge der Schwefelketten zunimmt.

Verschiedene Studien konnten eine Spezifität von Diallylsulfiden für Tumorzellen zeigen. So wurde die Lebensfähigkeit von PC-3-Zellen durch 80 μ M Diallyltrisulfid vollständig unterdrückt, während die Viabilität der epithelialen Prostata-Zellen PrEC nicht signifikant beeinträchtigt wurde (Xiao et al., 2005). In primären Neuronen müssen wesentlich höhere Konzentrationen von Diallyldisulfid eingesetzt werden als in malignen SH-SY5Y-Glioblastom-Zellen, um den Anteil lebender Zellen leicht zu reduzieren. Diallylmonosulfid konnte in primären Neuronen keine Reduktion der Viabilität bewirken (Karmakar et al., 2007). Ebenso kommt es bei Behandlung DMBA-induzierter Hautpapillome (Khan et al., 2007) sowie bei Behandlung von Mäusen mit DMBA-induzierten Hauttumoren (Arora et al., 2004) erst nach DMBA-Induktion zu einem Diallylmonosulfid-bedingten p53-Anstieg, was ebenfalls für eine Spezifität dieses Mechanismus für Tumorzellen spricht.

Nachdem der Einfluss von Diallylsulfiden auf EPN nur geringfügig schwächer war als bei Tumorzellen, wurde eine weitere primäre Zelllinie eingesetzt. Primäre Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) wurden ebenfalls im MTT-Assay auf Abhängigkeit der Diallylsulfid-Effekte von der Schwefelkettenlänge, Abhängigkeit der Diallyltetrasulfid-Wirkung von der Dosis sowie den Effekt von Kohlenstoff- und Alkyl-Analoga untersucht. Vorteil dieser Zelllinie ist die für Primärzellen vergleichsweise einfache Zellkulturhaltung, jedoch weisen diese Zellen den Nachteil auf, dass sie einer anderen Spezies als die bisher untersuchten Zellen entstammen. Bei Behandlung mit

verschiedenen Diallylsulfiden zeigten auch MEF eine Hemmung der Stoffwechselaktivität, die mit der Anzahl der Schwefelatome der eingesetzten Verbindung zunahm. Nach 48stündiger Behandlung mit Diallyltetrasulfid lebten noch 52% der MEF-Zellen, während HCT116p53wt-Zellen nur noch einen Anteil von 38% lebender Zellen aufwiesen. Der Effekt ist in den Primärzellen, zwar schwächer ausgeprägt, eine Resistenz liegt jedoch nicht vor. Während die Diallyltetrasulfid-Wirkung in HCT116-Zellen nicht dosisabhängig war, kommt es in MEF zu einer deutlichen Verstärkung der Hemmung der Viabilität nach Behandlung mit 80 sowie 160 μM im Vergleich zu einer Behandlung mit 10 – 40 μM Diallyltetrasulfid. Dies bestätigt eine mögliche Zelllinien-bezogene Spezifität des Effektes. Die Kohlenstoff-Analoga können wie in HCT116 keine Inhibition von MEF bewirken, Dipropyltetrasulfid dagegen schon. Primärzellen wurden also von Diallylsulfiden schwächer gehemmt als Tumorzellen, wiesen aber keine Resistenz auf.

Diallylsulfide sind Verbindungen, die die Lebensfähigkeit von HCT116-Zellen beeinträchtigen können, wobei die Effektivität ausschließlich auf die Funktionen der Schwefelatome zurückzuführen ist und mit zunehmender Anzahl dieser Atome in der Verbindung steigt. Diese Wirkung beruht zum einen auf der Induktion von Apoptose, die von reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt wird, und zum andern auf dem Auslösen eines G₂/M-Arrestes durch Herunterregulierung von cdc25C. Diese Prozesse laufen unabhängig von dem Wachstumssuppressorprotein p53 und der Proteinkinase CK2 ab und finden nicht nur in HCT116, sondern auch in anderen Zellen statt, wobei Tumorzellen stärker gehemmt werden als primäre Zellen. Um die Wirkung der Diallylsulfide besser verstehen zu können, muss untersucht werden, welche Mechanismen Diallylsulfid-bedingter Apoptose und Zellzyklusarrest zugrunde liegen. Eine derartige Hemmung des Tumorwachstums wäre auch aufgrund der leichten Zugänglichkeit der Diallylsulfide über die Nahrung ein viel versprechender Ansatz zur Therapie von Tumorkrankheiten.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C (2002): Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends in Cell Biology* **12**: 226 – 230.
2. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171
3. Agarwal KC (1996): Therapeutic actions of garlic constituents. *Medicinal Research Reviews* **16**: 111 – 124.
4. Antosiewicz J, Herman-Antosiewicz A, Marynowski SW, Singh SV (2006): C-Jun NH(2)-terminal kinase signaling axis regulates diallyl trisulfide-induced generation of reactive oxygen species and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Cancer Research* **66**: 5379 – 5386.
5. Arora A, Siddiqui IA, Shukla Y (2004): Modulation of p53 in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by diallyl sulfide in Swiss albino mice. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**: 1459 – 1466.
6. Bar JK, Harlozinska A, Kartarius S, Montenarh M, Wyrodek E, Parkitna JM, Kochman M, Ozyhar A (2002): Temperature sensitive ovarian carcinoma cell line (OvBH1). *Japanese Journal of Cancer Research* **93**: 976 – 985.
7. Block E (1992): The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition in English* **31**: 1135 – 1178.
8. Bottone FG Jr., Baek J, Nixon JB, Elling TE (2002): Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *The Journal of Nutrition* **132**: 773 – 778.
9. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldmann T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497 – 1501.
10. Buttke TM, Sandstrom PA (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* **15**: 7 – 10.
11. Cathcart R, Schwieters E, Ames BN (1983): Detection of picomole levels of superoxides using a fluorescent dichlorofluorescein Assay. *Analytical Biochemistry* **134**: 111 – 116.

-
12. Challier B, Perarnau JM, Viel JF (1998): Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: a french case-control study. *European Journal of Epidemiology* **14**: 737 – 747.
 13. Charras GT (2008): A short history of blebbing. *Journal of Microscopy* **231**: 466 – 478.
 14. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004): Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010 – 1014.
 15. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M (2003): Pharmacologic activation of p53 elicits bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* **4**: 371 – 381.
 16. Cortez D, Elledge SJ (2000): Conducting the mitotic symphony. *Nature* **406**: 354 – 356.
 17. Dalal SN, Schweitzer CM, Gan J, Decaprio J. (1999): Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 4465 – 4479.
 18. Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1993): Molekulare Zellbiologie. Verlag Walter de Gruyter, Berlin, 2. Auflage.
 19. Das A, Banik NL, Ray SK (2007): Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer* **110**: 1083 – 1095.
 20. Dausch JG, Nixon DW (1990): Garlic: A review of its relationship to malignant disease. *Preventive Medicine* **19**: 346 – 361.
 21. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995): Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control. *Cell* **82**: 675 – 684.
 22. De Vries N, De Flora S (1993): N-acetyl-L-cysteine. *Journal of Cellular Biochemistry* **S17F**: 270 – 277.
 23. Donzelli M, Draetta GF (2003): Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Reports* **4**: 671 – 677.
 24. Draetta G, Eckstein J (1997): Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1332**: 53 - 63
 25. Dröge W, Schipper HM (2007): Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* **6**: 361 – 370.
-

26. Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J (1988): The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54**: 423 – 431.
27. Dunphy WG, Kumagai A (1991): The *cdc25* protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**: 189 – 196.
28. Faust M, Schuster N, Montenarh M (1999): Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Letters* **31**: 941 – 949.
29. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989): The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**: 1083 – 1093.
30. Fridman JS, Lowe SW (2003): Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**: 9030 – 9040.
31. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. (2007): Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research* **13**: 789 – 794.
32. Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA (1996): Cytoplasmic accumulation of *cdc25B* phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *Journal of Cell Science* **109**: 1081 – 1093.
33. Gabrielli BG, Clark JM, McCormack AK, Ellem KA (1997): Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of *Cdc25* regulates activity toward cyclin B1/*Cdc2* but not Cyclin A/*Cdk2*. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 28607 – 28614.
34. Gao CM, Takezaki T, Ding JH, Li MS, Tajima K (1999): Protective effect of *Allium* vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu province, China. *Japanese Journal of Cancer Research* **90**: 614 – 621.
35. Genzlinger A (1998): Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußcytometrie, Agarosegelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α,β ungesättigte Aldehyde und Ketone. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
36. Girard F, Strausfeld U, Cavadore JC, Russell P, Fernandez A, Lamb NJ (1992): *Cdc25* is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* **118**: 785 – 794.
37. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordán J (2004): p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *Journal of Physiology and Biochemistry* **60**: 287 – 308.
38. Graves PR, Lovly CM, Uy GL, Piwnicka-Worms H (2001): Localization of human *Cdc25C* is regulated both by nuclear export and 14-3-3 binding. *Oncogene* **20**: 1839 – 1851.

-
39. Green M, Newell O, Aboyade-Cole A, Darling-Reed S, Thomas RD (2006): Diallyl sulfide induces the expression of nucleotide excision repair enzymes in the breast of female ACI rats. *Toxicology Letters* **168**: 40 – 44.
 40. Guo C, Yu S, Davies AT, Wang H, Green JE, Ahmed K (2001): A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 5992 – 5999.
 41. Heald R, McLoughlin M, McKeon F (1993): Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmic activated cdc2 kinase. *Cell* **74**: 463 – 474.
 42. Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770 – 776.
 43. Herman-Antosiewicz A, Singh SV (2005): Checkpoint kinase 1 regulates diallyl trisulfide-induced mitotic arrest in human prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 28519 – 28528.
 44. Hessenauer A, Goetz C, Montenarh M (2003): Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* **22**: 1263 – 1270.
 45. Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G (1993): Phosphorylation and activation of human cdc25C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *The EMBO Journal* **12**: 53 – 68.
 46. Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E (1994): Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *The EMBO Journal* **13**: 4302 – 4310.
 47. Hong YS, Ham YA, Choi JH, Kim J (2000): Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Experimental and Molecular Medicine* **32**: 127 – 134.
 48. Hosono T, Fukao T, Ogihara J, Ito Y, Shiba H, Seki T (2005): Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of β -tubulin. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 41487 – 41493.
 49. Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Yamada H, Iitsuka Y, Seki T, Hasegawa I, Ariga T (2008): Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells. *Carcinogenesis* **29**: 1400 – 1406.
 50. Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, Fraumeni JF (2002): *Allium* vegetables and risk fo prostate cancer: a population-based study. *Journal of the National Cancer Institute* **94**: 1648 – 1651.
-

-
51. Igney FH, Krammer PH (2002): Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* **2**: 277 – 288.
 52. Izumi T, Maller JL (1993): Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-Phase. *Molecular Biology of the Cell* **4**: 1337 – 1350.
 53. Jessus C, Beach D (1992): Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* **68**: 323 – 332.
 54. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H (1994): Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *The EMBO Journal* **13**: 1549 – 1556.
 55. Jo HJ, Song JD, Kim KM, Cho YH, Kim KH, Park YC (2008): Diallyl disulfide induces reversible G₂/M phase arrest on a p53-independent mechanisms in human colon cancer HCT-116 cells. *Oncology Reports* **19**: 275 – 280.
 56. Johnson DG, Walker L (1999): Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**: 295 – 312.
 57. Karlsson C, Katich S, Hagting A, Hoffmann I, Pines J (1999): Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *The Journal of Cell Biology* **146**: 573 – 584.
 58. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2007): Garlic compounds induced calpain and intrinsic caspase cascade for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Apoptosis* **12**: 671 – 684.
 59. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**: 239 – 257.
 60. Keston AS, Brandt R (1965): The Fluorometric Analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry* **11**: 1 – 5.
 61. Khan A, Shukla Y, Kalra N, Alam M, Ahmad MG, Hakim SR, Owais M (2007): Potential of diallyl sulfide bearing pH-sensitive liposomes in chemoprevention against DMBA-induced skin papilloma. *Molecular Medicine* **13**: 443 – 451.
 62. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* **14**: 5579 – 5588.
 63. Knerr S (2006): Bedeutung von Arylhydrocarbon Rezeptor regulierten Phase I Enzymen für die Kanzerogenität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern.
-

-
64. Knowles LM, Milner JA (1998): Depressed p34cdc2 kinase activity and G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutrition and Cancer* **30**: 169 – 174.
 65. Knowles LM, Milner JA (2000): Diallyl disulfide inhibits p34(cdc2) kinase activity through changes in complex formation and phosphorylation. *Carcinogenesis* **21**: 1129 – 1134.
 66. Koh SH, Kwon HS, Park KH, Ko JK, Kim JH, Hwang MS, Yum YN, Kim OH, Kim J, Kim HT, Do BR, Kim KS, Kim H, Roh H, Yu HJ, Jung HK, Kim SH (2005): Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Molecular Brain Research* **133**: 176 – 186.
 67. Krammer PH (1999): CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Advances in Immunology* **71**: 163 – 210.
 68. Krause K, Haugwitz U, Wasner M, Wiedmann M, Mossner J, Engeland K (2001): Expression of the cell cycle phosphatase cdc25C is down-regulated by the tumor suppressor protein p53 but not by p73. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**: 743 – 750.
 69. Kumagai A, Yakowec PS, Dunphy WG (1998): 14-3-3-proteins act as negative regulators of the mitotic inducer cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Biology of the Cell* **9**: 1067 – 1072.
 70. Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH (2002): Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology* **63**: 41 – 47.
 71. Lane, DP (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15 – 16.
 72. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346 – 347.
 73. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992): Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* **5**: 227 – 231.
 74. LeGac P, Estève PO, Ferec C, Pradhan S (2006): DNA damage-induced downregulation of human cdc25C and cdc2 is mediated by cooperation between p53 and maintenance DNA (cytosine-5) methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 24161 – 24170.
 75. Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1995): Requirement for phosphorylation of cyclin B1 for *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular Biology of the Cell* **6**: 1111 – 1124.
-

-
76. Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D (1991): Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**: 1111 – 1122.
 77. Malumbres M, Barbacid M (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 630 – 641.
 78. Martinou JC, Green DR (2001): Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 63 – 67.
 79. Masui Y, Markert CL (1971): Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology* **177**: 129 – 145.
 80. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998): Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**: 1893 – 1897.
 81. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll U (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* **11**: 577 – 590.
 82. Millar JB, Blevitt J, Gerace L, Sadhu K, Featherstone C, Russell P (1991): p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**: 10500 – 10504.
 83. Mills JC, Stone NL, Pittman RN (1999): Extranuclear Apoptosis: The Role of The Cytoplasm in the Execution Phase. *The Journal of Cell Biology* **146**: 703 – 707.
 84. Milner JA (2001): A historical perspective on garlic and cancer. *The Journal of Nutrition* **131**: 1027 – 1031.
 85. Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, Gaubin F, Draetta GF (2000): Human Cdc25A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Reports* **1**: 71 – 79.
 86. Morgan DO (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131 – 134.
 87. Münchberg U, Anwar A, Mecklenburg S, Jacob C (2007): Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. *Organic and Biomolecular Chemistry* **5**: 1505 – 1518.
 88. Murray A, Hunt T (1993). The cell cycle. *Oxford University Press, New York, Oxford*.
 89. Murray AW, Kirschner MW (1989): Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**: 275 – 280.
-

-
90. Nagata A, Igarashi M, Jinno S, Suto K, Okayama H (1991): An additional homolog of the fission yeast *cdc25+* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *New Biology* **3**: 959 – 968.
 91. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37 – 43.
 92. Nurse P, Masui Y, Hartwell P (1998). Understanding the cell cycle. *Nature Medicine* **4**: 1103 – 1106.
 93. Pagano MA, Meggio F, Ruzzene M, Andrzejewska M, Kazimierczuk Z, Pinna LA (2004): 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**: 1040 – 1044.
 94. Parker LL, Piwnica-Worms H (1992): Inactivation of the p34cdc-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**: 1955 – 1957.
 95. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw A, Piwnica-Worms H (1997): Mitotic- and G2-checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine 216. *Science* **277**: 1501 – 1505.
 96. Pines J (1995): Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal* **308**: 697 – 71.
 97. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997): A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300 – 305.
 98. Prasad S, Kalra N, Srivastava S, Shukla Y (2008): Regulation of oxidative stress-mediated apoptosis by diallyl sulfide in DMBA-exposed swiss mice. *Human and Experimental Toxicology* **27**: 55 – 63.
 99. Rathmell JC, Thompson CB (1999): The central effectors of cell death in the immune system. *Annual Reviews of Immunology* **17**: 781 – 828.
 100. Rice RL, Rusnak JM, Yokokawa F, Yokokawa S, Messner DJ, Boynton AL, Wipf P, Lazo JS (1997): A targeted library of small small-molecule, tyrosin, and dual specificity phosphatase inhibitors derived from rational core design and random side chain variation. *Biochemistry* **36**: 15965 – 15974.
 101. Roche molecular biochemicals: Apoptosis and cell proliferation. **2nd edition**: 72 – 74.
 102. Rose RC, Bode AM (1993): Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *The FASEB Journal* **12**: 1135 – 1142.
 103. Russell P, Nurse P (1986): Cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**: 145 – 153.
-

-
104. Sadhu K, Reed SJ, Richardson H, Russell P (1990): Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**: 5139 – 5143.
 105. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, Elledge SJ (1997): Conservation of the *chk1* checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to *cdk* regulation through *cdc25*. *Science* **277**: 1497 – 1501.
 106. Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH (2000): Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **32**: 1123 – 1136.
 107. Schneider C (2007): CK2 in der Signaltransduktion (Apoptose) des Prostatakarzinoms. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern.
 108. Sinisi AA, Chieffi P, Pasquali D, Kisslinger A, Staibano S, Bellastella A, Tramontano D (2002): EPN: A novel epithelial cell line derived from human prostate tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* **38**: 165 – 172.
 109. Spornins VL, Barany G, Wattenberg LW (1988): Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[*a*]pyrene-induced neoplasia and glutathione-S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* **9**: 131 – 134.
 110. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H (2000): FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**: 599 – 609.
 111. St. Clair S, Giono L, Varmeh-Ziaie S, Resnick-Silverman L, Liu WJ, Padi A, Dastidar J, Da Costa A, Mattia M, Manfredi JJ (2004): DNA damage-induced downregulation of *cdc25C* is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the *cdc25C* promoter. *Molecular Cell* **16**: 725 – 736.
 112. Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, Lamb NJ (1994): Activation of p34*cdc2* protein kinase by microinjection of human *cdc25C* into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of *cdc25C* by p34*cdc2* on sites phosphorylated at mitosis. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 5989 – 6000.
 113. Sumiyoshi H, Wargovich MJ (1990): Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Research* **50**: 5084 – 5087.
 114. Sundaram SG, Milner JA (1996): Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochimica et Biophysica acta* **1315**: 15 – 20.
-

-
115. Villa-Moruzzi E (1993): Activation of the cdc25C phosphatase in mitotic HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **196**: 1248 – 1254.
116. Wargovich MJ, Woods C, Eng VWS, Stephens LC, Gray K (1988): Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Research* **48**: 6872 – 6875.
117. Wu CC, Chung JG, Tsai SJ, Yang JH, Sheen LJ (2004): Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food and Chemical Toxicology* **42**: 1937 – 1947.
118. Wu XJ, Kassie F, Mersch-Sundermann V (2005): The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **579**: 115 – 124.
119. Xiao D, Choi S, Johnson DE, Vogel VG, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Singh SV (2004): Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene* **23**: 5594 – 5606.
120. Xiao D, Herman-Antosiewicz A, Antosiewicz J, Xiao H, Brisson M, Lazo JS, Singh SV (2005): Diallyl trisulfide-induced G₂-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc25C. *Oncogene* **24**: 6256 – 6268.
121. You WC, Blot EJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, Henderson BE, Fraumeni JF, Wang TG (1989): *Allium* vegetables and reduced risk of stomach cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **81**: 162 – 164.
122. Yuan JP, Wang GH, Ling H, Su Q, Yang YH, Song Y, Tang RJ, Liu Y, Huang C (2004): Diallyl disulfide-induced G₂/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways. *World Journal of Gastroenterology* **10**: 2731 – 2734.
123. Zamzami N, Kroemer G (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 67 – 71.

8 Publikationen

Busch C, Barton O, Morgenstern E, Günther J, Noll A, Götz C, Montenarh M (2007): Protein phosphatase cdc25C is located within centrosomes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**: 1707 – 1713.

Busch C, Jacob C, Montenarh M. Garlic-derived organosulfur compounds induce growth arrest and apoptosis.

In Vorbereitung

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Montenarh für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, ebenso wie für seine stete Diskussionsbereitschaft, Anregungen und Kritik.

Herrn Dr. Jacob danke ich für die Übernahme der Zweitberichterstattung zu dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Jacob und seiner Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken für die Bereitstellung der Diallylsulfide und ihrer Analoga sowie die stete Bereitschaft zur Hilfe und Diskussion.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau S. Kartarius, die durch ihre tatkräftige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso möchte ich mich bei Frau Diplom-Biochemikerin O. Barton für ihre Unterstützung bei den FACS-Analysen bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Stefan Lehnert, die mich auf meinem Weg immer unterstützen.

Lebenslauf

Name: Corinna Busch

Adresse: In den Schrebergärten 24
66424 Homburg/Saar

Geburtsdatum: 05. April 1981

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion: Oktober 2005
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Montenarh im Fachbereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg

Studium: 16. September 2005
Abschluss des Studiums als Diplombiologin

2002 – 2005
Hauptstudium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

2000 – 2002
Grundstudium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

Schulbildung: 1991 – 2000
Saarpfalzgymnasium Homburg/Saar

1987 – 1991
Grundschule Kirkel-Altstadt