

Wirkung von Curcumin und Licht auf Haut- und Tumorzellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
in den Naturwissenschaften**



vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Jadranka Dujic
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main 2008

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. V. Müller

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. Bernd

Datum der Disputation: 16.02.2009

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von
Herrn Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, Arbeitskreis Kinematische Zellforschung,

extern im Biochemischen Labor des Zentrums der
Dermatologie und Venerologie
am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bernd durchgeführt.

für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. APOPTOSE	1
1.1.1. MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ZELLE	2
1.1.2. SIGNALTRANSDUKTION UND CASPASEN	3
1.1.3. EXTRINSISCHE APOPTOSEKASKADE	5
1.1.4. INTRINSISCHE APOPTOSEKASKADE	6
1.2. SIGNALTRANSDUKTION DER KINSAEN	8
1.2.1. EGF-REZEPTOR	8
1.2.2. PROTEINKINASE B (PKB/AKT)	10
1.2.3. DIE PROTEINKINASE C	12
1.2.4. MAP-KINASEN	14
1.2.5. NF-κB	17
1.3. DER WIRKSTOFF CURCUMIN	18
1.3.1. CURCUMIN-INDUZIERT EFFEKTE <i>IN VITRO</i>	20
1.3.2. BIOLOGISCHE VERFÜGBARKEIT VON CURCUMIN <i>IN VIVO</i>	21
1.4. FRAGESTELLUNG	23
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. ZELLKULTUR	26
2.1.1. MATERIALIEN, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN	26
2.1.2. STERILES ARBEITEN	27
2.1.3. PRIMÄRE KERATINOZYTEN	27
2.1.4. HACAT-KERATINOZYTEN	28
2.1.5. A431-ZELLEN	29
2.1.6. KULTURMEDIUM UND SUPPLEMENTE	29
2.1.7. KULTURBEDINGUNGEN	29
2.1.8. MEDIUMWECHSEL UND PASSAGIEREN VON ZELLEN	30
2.1.9. ZELLAUSSAAT	30

2.2. AUFNAHMEKINETIK VON CURCUMIN	31
2.3. KONFOKALE LASERSCAN-MIKROSKOPIE	32
2.4. BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT CURCUMIN UND LICHT	33
2.5. BRDU-EINBAU	34
2.6. LDH-TEST	35
2.7. ANTIOXIDATIONSTEST	36
2.8. APOPTOSE-ELISA	36
2.9. HOECHSTFÄRBUNG	37
2.10. IMMUNHISTOCHEMISCHE KI-67-FÄRBUNG	39
2.11. CYTOCHROM C-FREISETZUNG	41
2.11.1.DIGITONIN-PERMEABILISIERUNG	41
2.11.2.CYTOCHROM C-IMMUNOASSAY	42
2.12. NF-κB Luciferase Assay	43
2.12.1.PLASMIDISOLIERUNG	43
2.12.2.LIPOFECTAMIN-TRANSFEKTION	44
2.12.3.DUAL-LUCIFERASE ASSAY	45
2.13. WESTERN BLOT	46
2.13.1.ABARBEITUNG DER PROBEN	46
2.13.2.SDS-GELELEKTROPHORESE	47
2.13.3.PROTEINTRANSFER UND IMMUNNACHWEIS	50
2.14. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	52
2.14.1.ISOLIERUNG NUKLEÄRER EXTRAKTE	52
2.14.2.EMSA	54
2.15. XENOGRAFT-TUMORMODELL	56
2.15.1.NMRI- MÄUSE UND DEREN HALTUNGSBEDINNGUNGEN	56
2.15.2.TUMORIMOLANTATION UND –MESSUNG	57
2.15.3.BEHANDLUNG DER TIERE	57
2.15.4.TÖTUNG DER TIERE	58
2.16. SONSTIGE GERÄTE, MATERIALIEN UND TESTS	59

3. ERGEBNISSE	60
3.1. ZELLULÄRE AUFNAHME UND VERTEILUNG VON CURCUMIN	60
3.1.1. CURCUMINAUFNAHME IN DIE ZELLE	60
3.1.2. CURCUMINVERTEILUNG IN DER ZELLE	61
3.1.3. FLUORESZENZSPEKTRUM VON CURCUMIN IN DER ZELLE	63
3.2. DIE WIRKUNG VON CURCUMIN UND LICHT AUF DIE ZELLPROLIFERATION VON KERATINOZYTEN	65
3.2.1. CURCUMIN IM VERGLEICH ZUM EXTRAKT ZCL	65
3.2.2. CURCUMIN IN ZUSAMMENWIRKUNG MIT SICHTBAREM LICHT	68
3.2.3. BEHANDLUNGSVARIANTEN	70
3.3. BILDUNG FREIER RADIKALE DURCH CURCUMIN IM VERGLEICH ZU PSORALEN	74
3.4. APOPTOSEINDUKTION DURCH CURCUMIN/LICHT	77
3.4.1. ZELLTÖXIZITÄT	77
3.4.2. ZELLKERNFRAGMENTIERUNG	78
3.4.3. CYTOCHROM C-FREISETZUNG	80
3.4.4. CASPASEN	81
3.5. WIRKUNG VON CURCUMIN/LICHT AUF DIE SIGNAL-TRANSDUKTION	84
3.5.1. KINASEN	84
3.5.2. EGF-REZEPTOR	88
3.5.3. NF- κ B	89
3.5.4. UNTERSCHIEDE IN DER WIRKUNG DES ZCL-EXTRAKTS IM VERGLEICH ZUM CURCUMIN	92
3.6. WIRKUNG VON CURCUMIN/LICHT IM XENOGRAFT-TUMORMODELL	94
3.6.1. VORVERSUCHE AN A431-ZELLEN	94
3.6.2. TUMORWACHSTUM	97
3.6.3. KI-67-EXPRESSION	99
3.6.4. ZELLKERNFRAGMENTIERUNG	99
3.6.5. CASPASEN	102
3.6.6. AKT, ERK1/2 UND EGF-R	103
4. DISKUSSION	105
4.1. ZELLULÄRE AUFNAHME UND VERTEILUNG VON CURCUMIN	106

4.2. PHOTOAKTIVIERBARKEIT VON ZCL UND CURCUMIN	109
4.3. ANTIOXIDATIVE EIGENSCHAFTEN VON CURCUMIN	111
4.4. CURCUMIN/LICHT INDUZIERT EINE MITOCHONDRIAL VERMITTELTE APOPTOSE	112
4.5. CURCUMIN/LICHT HEMMT DIE PROLIFERATIONS-ASSOZIIERTE SIGNALTRANSDUKTION	115
4.6. CURCUMIN/LICHT HEMMT DAS TUMORWACHSTUM IM XENOGRAFT-TUMORMODELL UND INDUZIERT APOPTOSE	122
4.7. AUSBLICK	125
5. ZUSAMMENFASSUNG	128
6. LITERATURVERZEICHNIS	131
7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	144
7.1. PUBLIKATIONEN	144
7.2. POSTER/ABSTRACTS	144
7.3. VORTRÄGE	145
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	146
9. DANKSAGUNG	150
10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	152
11. CURRICULUM VITAE	153

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ZELLE BEI APOPTOSE UND NEKROSE	2
Abb. 1.2:	INTRINSISCHE UND EXTRINSISCHE APOPTOSEKASKADEN	5
Abb. 1.3:	SCHEMA DER EGF-R-VERMITTELTEN SIGNALWEGE	9
Abb. 1.4:	SCHEMA DER PI3K/AKT-SIGNALKASKADE	11
Abb. 1.5:	SCHEMA DER PKC-SIGNALKASKADE	13
Abb. 1.6:	SCHEMA DER MAP-SIGNALKASKADE	15
Abb. 1.7:	STRUKTURFORMEL VON CURCUMIN	18
Abb. 1.8:	A: <i>CURCUMA LONGA</i> PFLANZE, B: RHIZOM, C: CURCUMIN	19
Abb. 3.1.1:	AUFNAHMEKINETIK VON CURCUMIN	61
Abb. 3.1.2:	ZELLULÄRE VERTEILUNG VON CURCUMIN	62
Abb. 3.1.3:	FLUORESCENZSPEKTRUM	64
Abb. 3.2.1:	PROLIFERATIONSRATE NACH ZCL/UVA-BEHANDLUNG	66
Abb. 3.2.2:	PROLIFERATIONSRATE NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG	67
Abb. 3.2.3:	PROLIFERATIONSRATE NACH CURCUMIN/SICHTBARES LICHT-BEHANDLUNG	69
Abb. 3.2.4:	PROLIFERATIONSRATE NACH VERSCHIEDENEN CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNGEN	71
Abb. 3.3.1:	FREIE RADIKALBILDUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG	74
Abb. 3.3.2:	FREIE RADIKALBILDUNG NACH CURCUMIN- ODER PSORALEN- UND UVA-BEHANDLUNG	75
Abb. 3.3.3:	FREIE RADIKALBILDUNG NACH UVA-BESTRAHLUNG	76
Abb. 3.4.1:	LDH-FREISETZUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG	78
Abb. 3.4.2:	ZELLKERNFÄRBUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG:	79
Abb. 3.4.3:	CYTOCHROM C-FREISETZUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	81
Abb. 3.4.4:	CASPASENAKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	82
Abb. 3.4.5:	CASPASENAKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG	83
Abb. 3.5.1:	AKT-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	85

Abb. 3.5.2:	Erk1/2-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	86
Abb. 3.5.3:	p38-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	87
Abb. 3.5.4:	PKC-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG	88
Abb. 3.5.5:	EGF-Rezeptor-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	89
Abb. 3.5.6:	NF- κ B-AKTIVITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG I	90
Abb. 3.5.7:	NF- κ B-AKTIVITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG II	91
Abb. 3.5.8:	PTEN-PHOSPHORYLIERUNG NACH ZCL- ODER CURCUMIN- UND UVA-BEHANDLUNG	92
Abb. 3.5.9:	JNK-PHOSPHORYLIERUNG NACH ZCL ODER CURCUMIN UND UVA-BEHANDLUNG	93
Abb. 3.6.1:	PROLIFERATION, APOPTOSE UND TOXIZITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG	96
Abb. 3.6.2:	TUMORWACHSTUM NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG	98
Abb. 3.6.3:	KI-67-FÄRBUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG	100
Abb. 3.6.4:	ZELLKERNFÄRBUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT –BEHANDLUNG	101
Abb. 3.6.5:	CASPASEN-AKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG	103
Abb. 3.6.7:	Kinasen-AKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG	104
Abb. 5.1:	SCHEMA DER WIRKUNGSWEISE VON CURCUMIN UND MÖGLICHE ANGRIFFSPUNKTE	130

1. EINLEITUNG

Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit stand die Erkenntnis, dass der Extrakt ZCL (Fa. A.S.A.C. Pharmaceutical International) aus der *Curcuma longa* Pflanze in Zusammenarbeit mit UVA-Licht die Proliferation in HaCaT wie auch in primären Keratinozyten hemmt. Im Rahmen meiner vorangegangenen Diplomarbeit konnte ich in diesem Zusammenhang zeigen, dass diese Behandlung in HaCaT-Zellen Apoptose induziert. In dieser Arbeit werden nun die Effekte des Wirkstoffs Curcumin, einem Bestandteil des ZCL Extrakts, und einer zusätzlichen Bestrahlung mit UVA oder sichtbarem Licht auf die Apoptose sowie verschiedene wachstumsassoziierte Kinasen vorgestellt. Im Einleitungsteil werden daher zunächst die Grundlagen der *in vitro* und *in vivo* untersuchten Targets und deren Signaltransduktion erläutert. Im Anschluss wird näher auf die Substanz Curcumin eingegangen um letztendlich die Fragestellung der Arbeit zu formulieren.

1.1. APOPTOSE

Apoptose ist ein physiologischer Prozess des Zellsterbens, an dem die Zelle aktiv teilnimmt und der daher auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1984). Apoptose befähigt den Organismus zusammen mit der Zellproliferation und -differenzierung zur Zellhomöostase in regenerativen Geweben. Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle. So erfolgt während der Entwicklung des Embryos die Formgebung von Körper und Organen durch die Induktion des programmierten Zelltods. Beispielsweise wird die Haut zwischen Zehen und Fingern in der menschlichen Embryonalentwicklung auf diese Weise entfernt (zusammengefasst in Jacobson et al., 1997). Gerät der Apoptosemechanismus aus dem Gleichgewicht, so

kommt es zur Ausbildung von Krankheiten. Ein „Zuviel“ an Apoptose prägt z.B. die HIV-Erkrankung (Terai et al., 1991) oder neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson (Loo et al., 1993; Takashima et al., 1993), ein „Zuwenig“ vor allem die Entstehung von Tumoren (Strasser et al., 1990).

1.1.1. MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ZELLE

Die Apoptose ist durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert. Zunächst schrumpft die Zelle aufgrund von Wasserverlust. Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte gehen verloren (Bortner et al., 2000), wobei sich die Zelle abrundet und aus dem Gewebeverband löst. Dabei bleiben die Plasmamembran und die einzelnen Zellorganellen intakt. Das Chromatin kondensiert zunächst am Rande des Zellkerns, dann wird die DNA durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten (Wyllie et al., 1984).

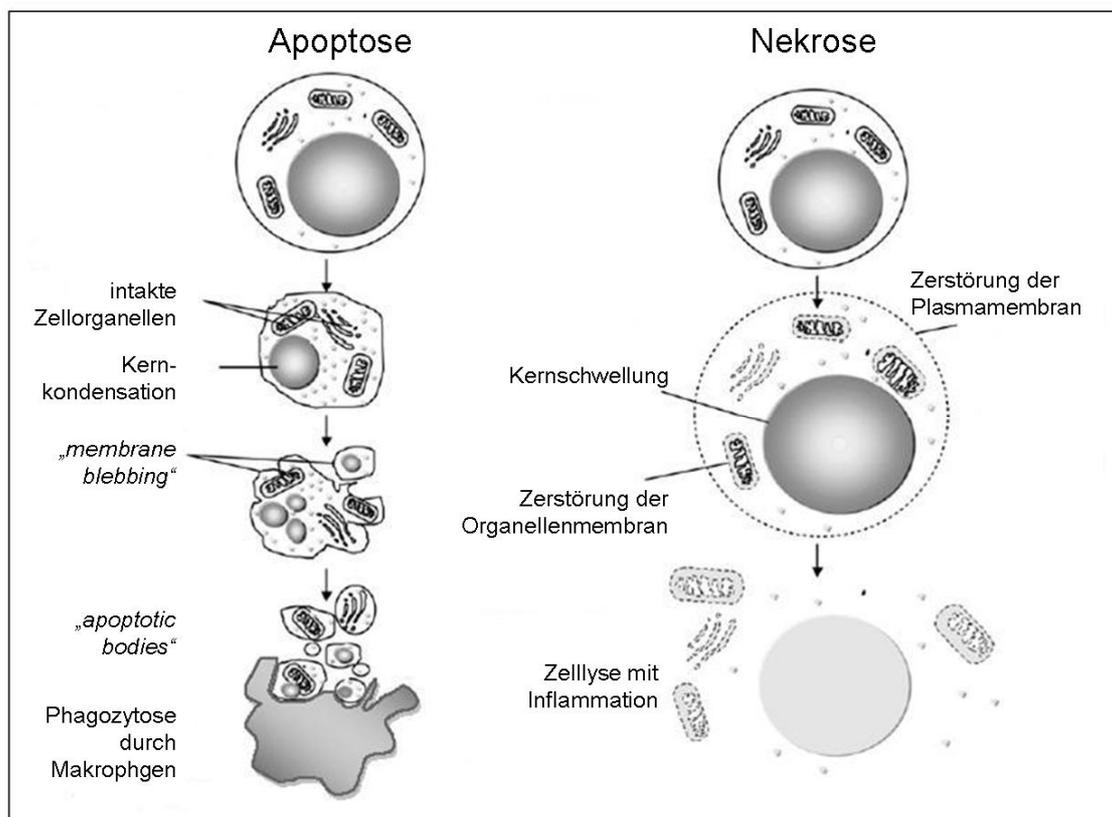


Abb. 1.1: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ZELLE BEI APOPTOSE UND NEKROSE (modifiziert nach Bohm et al., 2006)

Im späteren Verlauf kommt es durch den Abbau des Zytoskeletts zu einer weiteren Volumenreduktion und zu dem sog. „membrane blebbing“, jedoch zu keinem Verlust der Membranintegrität (Kanduc et al., 2002). Letztendlich werden die Zellbestandteile in apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) durch Abschnürungen der Zellmembran verpackt (Holmgren et al., 1999). Diese werden nach Umlagerung von Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite markiert (Denecker et al., 2000) und so von Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt und phagozytiert (Savill et al., 2000). (s. Abb. 1.1)

Der Tod der Zelle hinterlässt praktisch keine Spuren der einmal vorhandenen Zelle. Es kommt zu keiner inflammatorischen Reaktion wie bei der Nekrose. Diese ist eine passive Art des Zellsterbens und führt, ausgelöst durch schwere und plötzliche Schädigung, zum Anschwellen und Platzen der Zelle. Sie ist pathologischer Natur, da aufgrund der Freisetzung des Zellinhalts in den Intrazellularraum eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.

Im Gegensatz zu Zellen in Kultur, lassen sich im Organismus beim Zellsterben oft keine klaren Unterscheidungen zwischen diesen beiden Prozessen machen. Aufgrund dessen wurde die Aktivierung der Caspasen, wie sie im nächsten Kapitel beschrieben wird, als das Merkmal der Apoptose definiert (zusammengefasst in Blagosklonny et al., 2000).

1.1.2. SIGNALTRANSDUKTION UND CASPASEN

Eine faszinierende Erkenntnis der Apoptoseforschung ist, dass jede Zelle zeit ihres Lebens ein jederzeit abrufbares Programm zu ihrer eigenen Zerstörung enthält. So existieren zahlreiche Vorläuferformen von zu aktivierenden Enzymen, eine ganze Reihe pro- und antiapoptotischer Faktoren, die sich im „Normalzustand“ der Zelle in einem Gleichgewicht befinden. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt zur Apoptoseinduktion.

Im Zentrum des Apoptoseapparats stehen die Caspasen. Diese Enzyme tragen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten Proteine nach einem Aspartat;

daher der Name: „cysteiny aspartate-specific proteinase“ (Nicholson et al., 1997). Caspasen werden als inaktive Enzymvorstufen sog. Procaspasen synthetisiert. Zur Aktivierung der Caspasen, werden diese von Adaptermolekülen rekrutiert, wobei sie sich durch kurze Oligomerisierung autokatalytisch in aktive Untereinheiten spalten (Macfarlane et al., 1997). Sog. Initiator- oder „upstream“- Caspasen (-8, -9, -10 und -12) werden durch proapoptotische Signale aktiviert und spalten die sog. Effektor- oder „downstream“- Caspasen. Letztendlich sind es die Effektorcaspasen (-3, -6 und -7), die zur Eliminierung der Zelle führen. Sie bewirken durch gezielte Proteolyse die Zerstörung der Zell-Zell-Interaktionen und des Zytoskeletts, die Fragmentierung der DNA und schließlich die Abschnürung der „apoptotic bodies“ (zusammengefasst in Fischer et al., 2003).

Die Aktivierung der Caspasen geht mit einer komplexen Signaltransduktionskaskade einher. Es konkurrieren zahlreiche, sowohl mit dem Tod als auch mit dem Überleben der Zelle assoziierte, Proteine miteinander. Letztendlich bestimmt deren Balance das Schicksal der Zelle. Dabei können die Mechanismen der Apoptose über die extrinsische bzw. intrinsische Signalkaskade vermittelt ablaufen (s. Abb. 1.2).

(„Fas associated protein with death domain“), welche ebenfalls eine Todesdomäne besitzen, an den Rezeptor-Liganden-Komplex gebunden (Chinnaiyan et al., 1995). Durch Bildung dieses Todessignalkomplexes (DISC, „death inducing signaling complex“) werden die Caspasen autoproteolytisch aktiviert und somit der Apoptoseapparat gestartet. (Ashkenazi et al., 1998; Baker und Reddy, 1998)

1.1.4. INTRINSISCHE APOPTOSEKASKADE

Im Gegensatz zur spezifischen Liganden-vermittelten Aktivierung, können verschiedene Arten von Stress, wie z.B. Toxine, reaktive Sauerstoffspezies, Strahlung oder Energiedysbalance, intrinsisch Apoptose induzieren. In diesem Zusammenhang wurde die Mitochondrien-vermittelte Apoptose zuerst beschrieben und untersucht. Hierbei wurde die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol aufgrund einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran beobachtet. Das Cytochrom c rekrutiert über das Adapterprotein Apaf-1 („apoptosis protease activating factor“) die Procaspase-9 (Pan et al., 1998). Letztere Bindung wird über die Wechselwirkung der CARD-Domäne („caspase recruitment domain“) vermittelt. Bei dem entstandenen Komplex handelt es sich um das Apoptosom, in welchem die Procaspasen autoproteolytisch prozessiert und somit aktiviert werden. Bei der intrinsischen Apoptosekaskade spielt die Balance von Proteinen der Bcl-2-Familie eine wesentliche Rolle. Bis heute wurden 25 Proteine dieser Familie gefunden, die anti- oder proapoptotische Effekte ausüben (zusammengefasst in Gross, 2005). Die verschiedenen Bcl-2-Proteine können miteinander interagieren, wobei beispielsweise die antiapoptotischen Mitglieder wie Bcl-2 („B-cell lymphoma“) und Bcl-xL („long form of Bcl-x“) in der Lage sind, proapoptotisch wirkende Bcl-2-Proteine wie Bad („Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotor“) und Bax („Bcl-2 associated x protein“) zu inhibieren (Oltvai 1993). So verhindern sie die Oligomerisation von Bak („Bcl-2 antagonist/killer“) oder Bax zu Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran und somit die Freisetzung von Cytochrom c (Shimizu et al., 1999).

Eine neue Entdeckung ist, dass Apoptose ebenfalls am Endoplasmatischem Reticulum (ER) induziert werden kann. Hierbei handelt es sich wie bei der mitochondrialen Apoptose um eine intrinsisch- und stressvermittelte Kaskade. Kommt es durch Hypoxie, virale Infekte oder Proteinüberladung zu einer Störung der eigentlichen Aufgabe des ER, nämlich der Faltung unterschiedlicher Proteine, häufen sich ungefaltete Proteinmoleküle an; die sog. „ER stress response“ (Pahl und Baeuerle, 1995) hemmt die Translationsrate weiterer Proteine. Ist dieser Prozess jedoch gestört, wird unweigerlich Apoptose induziert. Vermutlich ist ein initialer Ca^{++} -Ausstrom aus dem ER die Ursache, wobei der genaue Ablauf bisher noch nicht vollständig bekannt ist. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass eine Verschiebung des Verhältnisses von Bcl-2 zu Bax den Cytochrom c-Ausstrom am Mitochondrium auslöst (zusammengefasst in Szegezdi et al., 2006). Ein anderer Ansatz belegt, dass die Caspase-9 über Calpain und die in dem Zusammenhang gefundene Caspase-12 aktiviert wird (Nakagawa et al., 2000).

Endstrecke aller beschriebenen Apoptosekaskaden stellt die Aktivierung der Effektorcaspasen (-3, -6 und -7) dar, welche wie schon beschrieben zur letztendlichen Eliminierung der Zelle führen. Die Apoptose wird gerne in die beiden beschriebenen Apoptosekaskaden (intrinsisch, extrinsisch) unterteilt; jedoch darf man sich nicht vorstellen, dass beide Kaskaden völlig unabhängig voneinander ablaufen. So aktiviert beispielsweise die Caspase-8 (Initiatorcaspase der extrinsischen Apoptosekaskade) das proapoptotische Bcl-2-Protein BID („BH-3-interacting domain“) und dieses wiederum aktiviert Bax und Bak, welche die Cytochrom c-Freisetzung stimulieren (Li et al., 1998). Es ist anzunehmen, dass nach Apoptoseinduktion, gleich durch welchen „pathway“, letztendlich alle Caspasen und die meisten proapoptotischen Faktoren in der sterbenden Zelle aktiv sind. Außerdem haben, wie in Abb. 1.2. gezeigt, auch wachstumsassoziierte Signaltransduktionsmechanismen Einfluss auf die Apoptose. Wie genau diese Kaskaden ablaufen und an die Apoptose gekoppelt sind, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

1.2. SIGNALTRANSDUKTION DER KINASEN

Wie am Beispiel der Apoptose gezeigt wurde, können verschiedene Signale die Balance von antagonistischen Faktoren stören und in der Zelle den programmierten Zelltod auslösen. So gibt es auch Signale, welche die Zelle zur Proliferation, zum Wachstum oder zur Differenzierung stimulieren. Um auf diese Signale möglichst schnell zu reagieren, haben Eukaryoten verschiedene Proteinkinasen entwickelt. Vor allem bei der Regulation von Wachstums- und Differenzierungsreaktionen verläuft die Transduktion über hintereinander geschaltete Kinasen. Dabei werden die Proteinkinasen durch Phosphorylierung an bestimmten Aminosäuren aktiviert. Bei den im folgenden beschriebenen Kinasen Proteinkinase B und C, MAP-Kinasen sowie der Rezeptortyrosinkinase EGF-R, handelt es sich um die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Targets. Diese Signaltransduktoren werden von Onkogenen kodiert. Kommt es zu einer Überexpression dieser Proteine ist häufig eine unkontrollierte Proliferation und Krebsentstehung die Folge.

1.2.1. EGF-REZEPTOR

Erstmals beschrieben wurde der „epidermal growth factor receptor“ (EGF-R, HER1, ErbB-1) von Ullrich et al. (1984). Seit dieser Zeit sind drei weitere Subtypen der EGF-R-Familie gefunden worden: HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB 3) und HER4 (ErbB4). Der EGF-Rezeptor ist aus drei funktionellen Einheiten, einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer transmembranen Verankerungsdomäne sowie einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne aufgebaut. Die Aktivierung des Rezeptors folgt nach Bindung von Liganden wie beispielsweise EGF, TGF- α („transforming growth factor-alpha“) oder HB-EGF („heparin-binding EGF“) (zusammengefasst in Wells et al., 1999). Dabei kommt es zu einer Homodimerisation zweier EGF-Rezeptoren oder einer Heterodimerisierung innerhalb der EGF-R-Familie (Lemmon und Schlessinger, 1994). Durch die darauf folgende Autophosphorylierung der rezeptoreigenen Tyrosinkinase reguliert EGF-R über Adapterproteine ein ganzes Netzwerk von Signalwegen, wie die Ras/MAPK- („mitogen-activated protein kinases“), die

PLC/PKC- (Phospholipase C/Proteinkinase C) oder die PI3K/PKB- (Phosphatidylinositol-3-kinase/Proteinkinase B) Kaskade. Die Induktion dieser Signalwege mündet in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und greift so in die Regulation einer Vielzahl von Zellvorgängen wie Zellüberleben, -wachstum und -proliferation ein (s. Abb. 1.3).

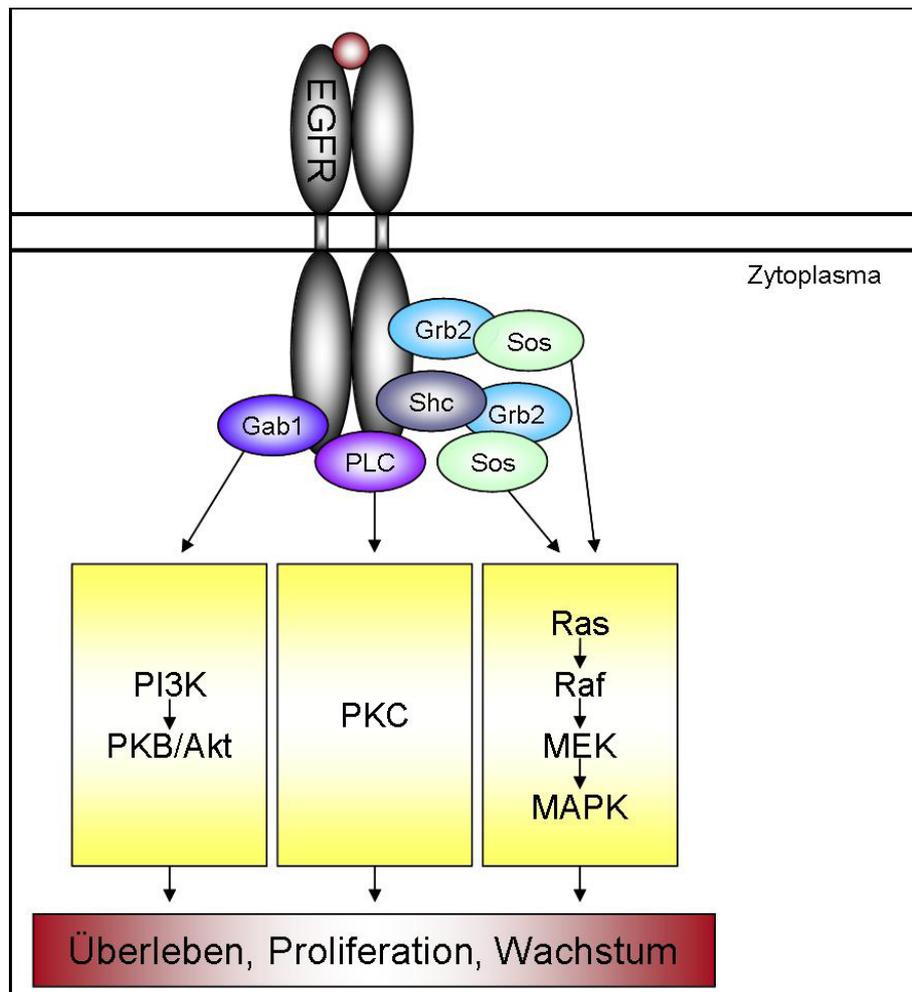


Abb. 1.3: SCHEMA DER EGF-R-VERMITTELTEN SIGNALWEGE

Eine gesteigerte EGF-R-vermittelte Signaltransduktion wurde in zahlreichen Tumoren wie z.B. dem Lungen-, Brust-, Magen-, Dickdarm-, Ovarial-, Plattenepithelial-, Prostatakarzinom (zusammengefasst in Salomon et al., 1995) gefunden und trägt zur Tumorpromotion und Malignität dieser Tumore bei. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Überexpression des Rezeptors bzw. seines Liganden oder aber die Expression mutierter Rezeptormoleküle mit veränderter intrinsischer Kinaseaktivität und dadurch bedingter konstitutiver

Rezeptoraktivierung bedeutsam, die eine Autostimulation des Tumorwachstums ermöglichen.

Daher stellt die EGF-R-vermittelte Signaltransduktion ein attraktives Target für die Entwicklung neuer antineoplastischer Substanzen dar. In der klinischen Erprobung finden sich eine Reihe von Inhibitoren der ErbB-Membranrezeptor-vermittelten Signaltransduktion. Dazu zählen Antikörper wie IMC-225 (Cetuximab), das gegen die Ligandenbindungsdomäne oder das OSI-774 (Tarceva), das gegen die Tyrosinkinase-Domäne gerichtet ist (zusammengefasst in Ciardiello und Tortora, 2002)

1.2.2. PROTEINKINASE B (PKB/AKT)

Das Prototyp-*AKT*-Gen *AKT1* wurde 1991 bei der Suche nach zellulären Kinasen, die den Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) ähnlich sind, mittels homologer Klonierung identifiziert und folglich als Proteinkinase B (PKB) oder Proteinkinase – „related to PKA and PKB“ (RAK) bezeichnet (Jones et al., 1991; Coffey und Woodgett, 1991). Wenig später wurden die weiteren Isoformen Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ) gefunden. Bei allen Isoformen handelt es sich um hochgradig konservierte Serin/Threonin-Kinasen, die eine N-terminale „Pleckstrin-Homologie“- (PH-) Domäne, eine katalytische Domäne und eine c-terminale hydrophobe Domäne aufweisen. PKB/Akt wird typischerweise über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie zum Beispiel den EGF-R aktiviert. Dabei führt die RTK-Stimulierung zur Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), diese wiederum generiert den sekundären Botenstoff PI(3, 4, 5)P₃ (PIP₃) an der Plasmamembran. Die PH-Domäne der Akt-Kinase besitzt eine hohe Affinität zu diesem Peptid und vermittelt die Translokation der Kinase zur Membran. Die letztendliche Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung am Threonin 308 sowie Serin 473. Die Threonin-Phosphorylierungsstelle ist in der Kinase-Domäne lokalisiert und wird durch PDK1 („pyruvate dehydrogenase kinase 1“), welche ebenfalls über eine PH-Domäne an der Plasmamembran lokalisiert ist, phosphoryliert (Andjelkovic et al., 1997). Die Identität der Serin 473-Kinase ist bislang noch nicht endgültig geklärt.

Ein Gegenspieler von PI3K/Akt ist der Tumorsuppressor PTEN („phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten“), der durch Dephosphorylierung von PIP3 die Rekrutierung von Akt an die Zellmembran verhindert (Li et al., 1997; Steck et al., 1997).

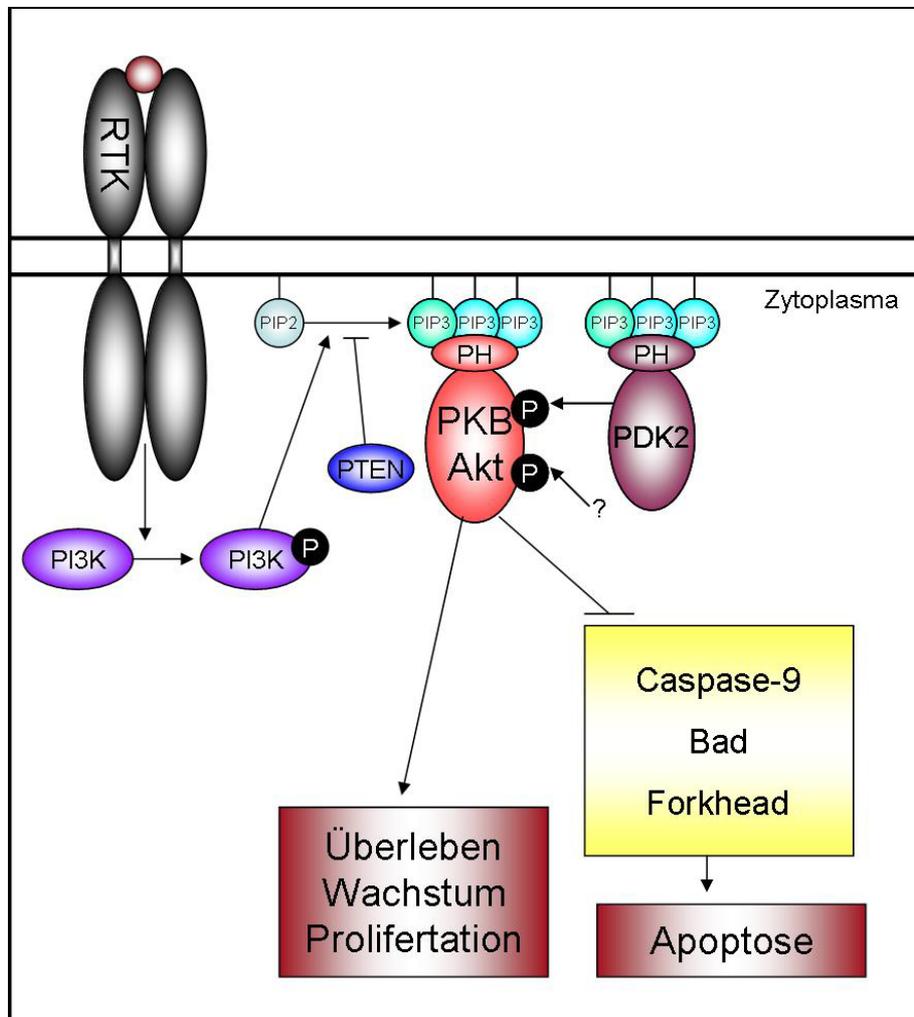


Abb. 1.4: SCHEMA DER PI3K/AKT-SIGNALKASKADE

Akt phosphoryliert eine Reihe von Substraten, die das Zellwachstum, den Zellstoffwechsel und die Zellproliferation begünstigen. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass Akt auch direkt Einfluss auf die negative Regulierung der Apoptose nehmen kann. So konnte beispielweise eine Phosphorylierung und somit eine Inhibierung der Caspase-9 durch Akt gezeigt werden (Cardone et al., 1998). Ein weiteres Substrat dieser Kinase ist das proapoptotische Bcl-2-Protein Bad (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997), welches durch Phosphorylierung aus dem proapoptotischen Komplex mit Bcl-XL dissoziiert; Bcl-XL kann dadurch antiapoptotisch wirken (zusammengefasst

in Datta et al., 1999). Akt kann auch indirekt auf transkriptioneller Ebene antiapoptotische Signale induzieren. So verhindert die Phosphorylierung des „forkhead-related transcription factor“ FKHRL1 dessen Translokation in den Nukleus und damit die Transkription proapoptotischer Faktoren wie FasL und Bim (Brunet et al., 1999).

1.2.3. DIE PROTEINKINASE C

Die Proteinkinase C (PKC), erstmals beschrieben von Inoue et al. (1977), wurde zunächst als Phospholipid und Ca^{2+} -abhängige Kinase charakterisiert (Ogawa et al., 1981). PKC ist eine Familie von Serin-/Threoninkinasen und umfasst mindestens 11 Isoformen, die sich in Struktur und enzymatischer Aktivität unterscheiden. Funktionell bestehen sie aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne. Eingeteilt werden die Isoformen in drei Gruppen. Die erste Gruppe der klassischen PKC-Isoformen (cPKC: PKC α , β I, β II, γ), umfasst die durch Ca^{2+} , Phosphatidylserin und DAG (Diacylglycerin) aktivierbaren. Die zweite Gruppe, die neuen PKC-Isoformen (nPKC: PKC δ , ϵ , η , θ), beinhaltet die durch Phosphatidylserin und DAG aber nicht durch Ca^{2+} aktivierbaren und die dritte Gruppe, die atypischen PKC-Isoformen (aPKC: PLC λ /I, ζ), die nur durch Phosphatidylserin, nicht aber durch Ca^{2+} und DAG, aktivierbaren (Newton, 2001). Die Vielzahl der Liganden wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, die zu einer PKC-Aktivierung führen (Nishizuka et al., 2003), zeigen an, dass die PKC-Familie in unterschiedlichste Reaktionen involviert ist. Dabei erfolgt die Aktivierung der PKC über zwei zentrale Signalwege: Bei der RTK- (z.B: EGF-R-) vermittelten Induktion wird zunächst die PLC γ aktiviert. Wird hingegen ein aktivierendes Signal von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren in Richtung PKC ausgesandt, dann geschieht dies über eine Aktivierung der PLC β . PLC hydrolysiert das Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat (PIP₂) in DAG und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). Letzteres diffundiert frei im Zytosol und bindet an Rezeptoren auf der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, was zum Ca^{2+} -Ausstrom führt. Die PKC wird über die Bindung von intrazellulärem Ca^{2+} zur Membran rekrutiert und an dieser über DAG sowie Phosphatidylserin verankert. Ca^{2+} ,

DAG und Phosphatidylserin gelten darüber hinaus auch als aktivierende Kofaktoren, die durch die Bindung wahrscheinlich eine Struktur der Proteinkinase C stabilisieren, in der das aktive Zentrum für Substratproteine zugänglich wird. Die PKC besitzt ebenfalls eine hohe Affinität für den Tumorpromotor TPA (13-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) und wird durch diesen direkt aktiviert (Castagna et al., 1982). PKC wird durch Phosphorylierung reguliert, dabei legen Untersuchungen nahe, dass PKC phosphoryliert wird, um für die genannten „second messenger“ aktivierbar zu sein (Keranen et al., 1995).

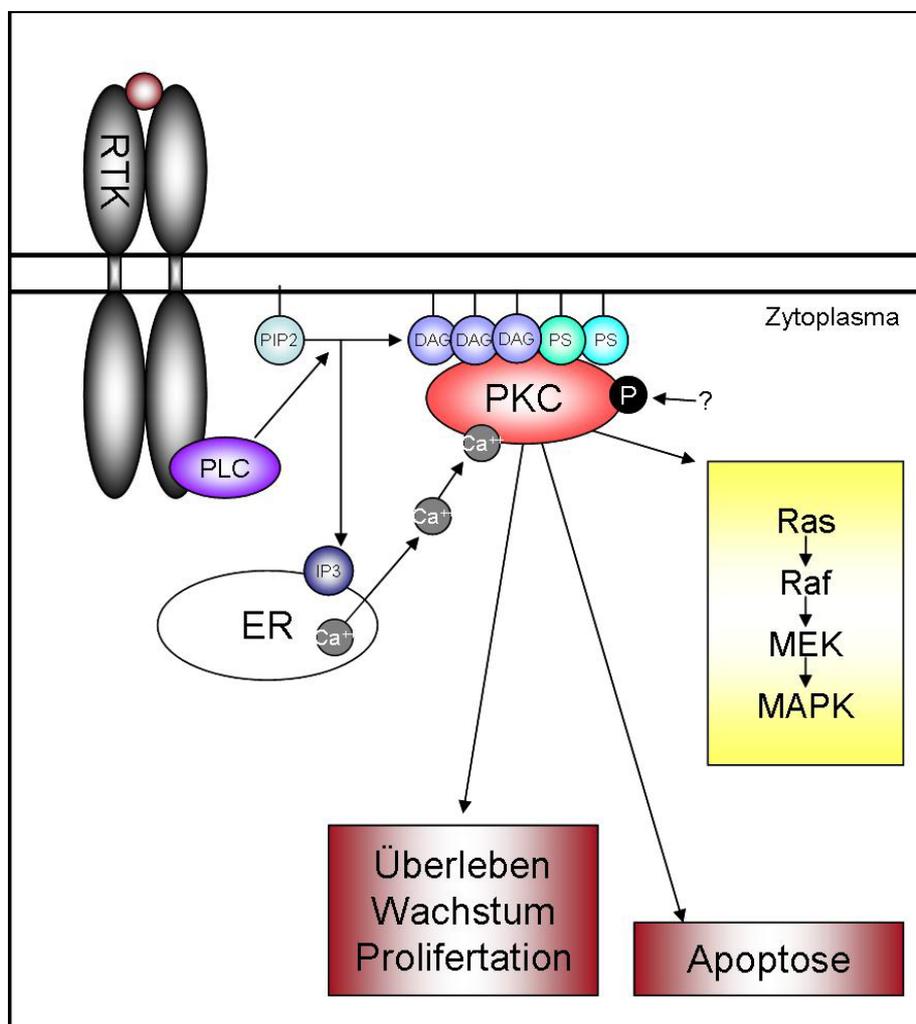


Abb. 1.5: SCHEMA DER PKC-SIGNALKASKADE

Zu den PKC-Substraten gehören Strukturproteine, Enzyme und viele signalübertragenden Proteine (Violin und Newton, 2003) wie das Ras-Protein und die MAPKK-Kinase der Erk1/2-Kaskade (s. Kap. 1.2.4). Die Isoenzym-Spezifität der Substratphosphorylierung kommt wahrscheinlich überwiegend

durch regulierte subzelluläre Kollokalisierung von PKC-Isoenzym und Substrat zustande.

Je nach Zell- und Gewebetyp beobachtet man eine unterschiedliche Expression der einzelnen Isoformen. In humanen und murinen Keratinozyten ist der Nachweis von PKC α , δ , ϵ , η , ζ schon oft belegt worden; weiterhin wurden andere PKC-Isoformen (PKC β , γ und μ) in verschiedenen Keratinozyten gefunden. Die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT zeigt ein sehr ähnliches PKC-System (zusammengefasst in Papp et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise gezeigt werden, dass PKC δ und η das Zellwachstum hemmen und die Differenzierung induzieren (Ohba et al., 1998; Li et al., 1999), in deren Regulierung die PKC α impliziert ist (Lee et al., 1997).

1.2.4. MAP-KINASEN

MAP-Kinasen („mitogen-activated protein kinases“) haben ihren Namen aufgrund der beobachteten Aktivierung durch extrazelluläre mitogene (zellteilungsfördernde) Liganden erhalten und gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Die MAP-Kinasen (MAPK) stehen am unteren Ende der Signalübertragung der MAPK-Kaskade und haben weitere Proteinkinasen vorgeschaltet. Die MAPK empfangen das Signal in Form einer Phosphorylierung durch eine vorgeschaltete Proteinkinase, die als MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) bezeichnet wird. Die MAPKK-Proteine wiederum sind Substrat für einen weiteren Typ von ihrerseits vorgeschalteten Proteinkinasen, die MAPKK-Kinasen (Lewis et al., 1998; Cobb et al., 1999; Garrington und Johnson, 1999) (s. Abb. 1.5).

Die verschiedenen MAP-Kinasen werden durch unterschiedliche Faktoren stimuliert und haben somit, wie im Folgenden beschrieben, unterschiedliche Zellantworten zur Folge.

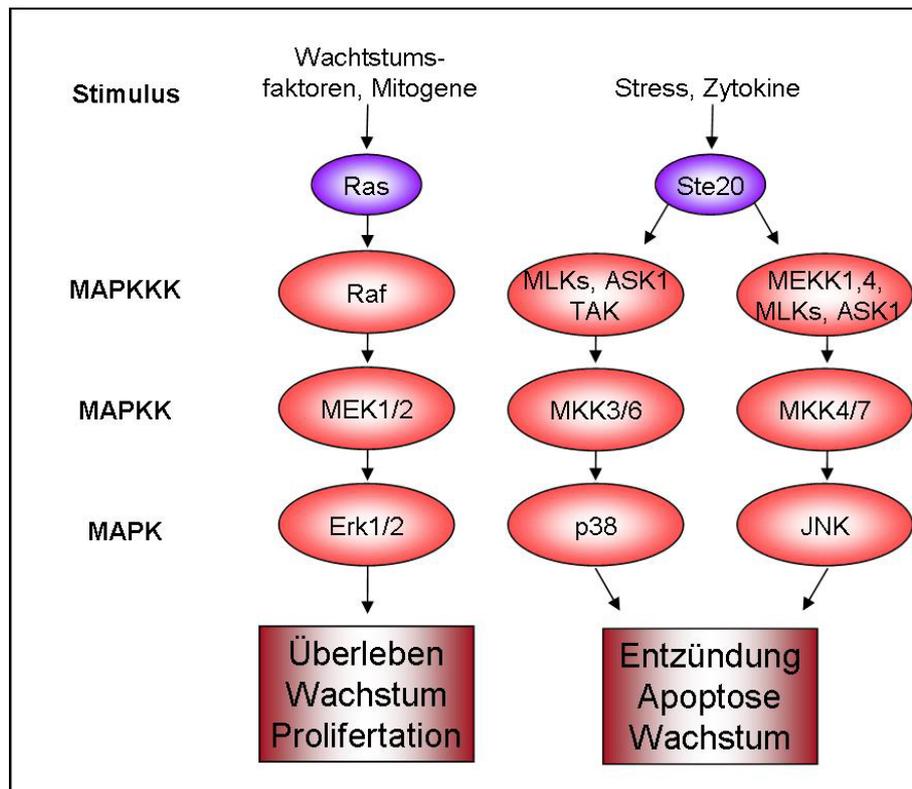


Abb. 1.6: SCHEMA DER MAP-SIGNALKASKADE

ERK1/2

Die MAPK Erk1/2 („extracellular-signal regulated kinase 1/2“, auch unter dem Namen p44/42 bekannt) wird vor allem durch Wachstumsfaktoren aktiviert und fördert in der Zelle das Wachstum, die Differenzierung und die Entwicklung (Lewis et al., 1998; Cobb et al., 1999). Die nacheinander geschalteten Kinasen der Erk-Aktivierung sind Raf (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK) und Erk1/2 (MAPK). Raf ist eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, die MEK1/2 (MAPK/Erk Kinase) an einem dieser beiden Reste phosphoryliert (Kyriakis et al., 1992). MEK1/2 überträgt wiederum im nächsten Schritt jeweils einen Phosphatrest auf Threonin- und Tyrosinreste von Erk1/2 (Dhanasekaran und Premkumar Reddy, 1998). Eine klassische Induktion dieses Moduls findet über Wachstumsrezeptoren wie bereits am Beispiel des EGF-Rezeptors gezeigt (s. Abb 1.3), statt. Die über Adapterproteine an den Rezeptor rekrutierten GEFs („Guanin-nukleotid exchange factor“), wie z.B. SOS („son of sevenless“), katalysieren in dem kleinen G-Protein Ras den Austausch von GDP zu GTP. In dieser Form kann Raf an Ras binden und wird so zur Aktivierung an die Membran transloziert. Der genaue Mechanismus der zur Aktivierung von Raf

führt ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Eine Ras-vermittelte Aktivierung der Erk-Kaskade über die PKC (s. Kap 1.2.3) ist ebenfalls möglich (Marais et al., 1998). Erk1/2 reguliert letztendlich durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus (Schenk und Snaar-Jagalskar, 1999) die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle. Letzteres wird beispielsweise durch die Aktivierung der p90RSK („90 kDa ribosomal S6 kinases“) gewährleistet (Blenis, 1993), welche durch verschiedene Mechanismen die Apoptoseinduktion verhindert. So aktiviert beispielsweise p90RSK durch Phosphorylierung den Überlebensfaktor CREB („cAMP-response element-binding protein“) (Bonni et al., 1999) und hemmt das proapoptotische Bad (Tan et al., 1999; Lizcano et al., 2000). Auch wird die schon beschriebene antiapoptotische Signalkaskade von PKB/Akt durch die MAPKKK Ras des Erk1/2 induziert (Gire et al., 2000).

P38 UND SAPK/JNK

Die MAP-Kinasen p38 MAPK und SAPK/JNK („stress-activated protein kinase/c-jun NH₂-terminal kinase“) werden zusammenfassend als Stresskinasen bezeichnet, da sie z.B. durch UV-Bestrahlung, Chemikalien, Osmo-, Hitzestress, Zytokine oder TNF- α aktiviert werden. Sie können in der Zelle Entzündungsreaktionen, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung induzieren (Ichijo, 1999; Kyriakis und Avrud, 2001). Auch diese MAPK sind wie schon beschrieben in einem kaskadenartigen Modell mit dem gleichen Grundmodul organisiert. Die SAPK/JNK wird durch MKK (MAP-Kinase-Kinase) 4/7 phosphoryliert, während p38 durch MKK3/6 aktiviert wird. Aktivatoren von MKK4/7 sind z.B. MEKK1/4. Die Phosphorylierung und Aktivierung von MKK4/7 kann aber auch durch zahlreiche andere Kinasen erfolgen, die gleichzeitig auch MKK3/6 phosphorylieren, wie z.B. die MLKs („mixed lineage kinase“) oder ASK1 („apoptosis signal-regulated kinase“). Dabei kann das schon im Zusammenhang mit Erk1/2 beschriebene Ras-Protein die Kaskaden der Stresskinasen induzieren. Die MAPKKK können wiederum durch eine noch größere Zahl von Proteinen, die zu der „sterile 20 kinase family“ (Ste20) gehören, aktiviert werden (Tibbles und Woodgett, 1999).

1.2.5. NF- κ B

Wie an den beschriebenen Signaltransduktionswegen gezeigt wurde, dienen diese dazu externe Signale z.B. in Form eines Liganden über Rezeptoren, aber auch interne Signale in der Zelle weiterzuleiten. Durch „second messenger“ und Kinasen wird das Signal weiter transduziert und gleichzeitig amplifiziert. Dieser Prozess hat letztendlich eine veränderte Genexpression zur Folge. So steht am Ende der Signaltransduktion die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die durch DNA-Interaktion die Expression von Genen beeinflussen. Bei NF- κ B („nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B-cells“) handelt es sich um einen ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor der mehr als 200 Gene reguliert. Es existieren fünf NF- κ B-Untereinheiten: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100 (zusammengefasst in Ghosh et al., 1998). Diese Untereinheiten besitzen alle N-terminal eine 300 Aminosäuren lange Rel-Homologie-Domäne, die für die DNA Bindung, die Bindung des NF- κ B Inhibitors I κ B und die Dimerisierung der Untereinheiten zuständig ist. Der aktive Transkriptionsfaktor liegt als Homo- oder Heterodimer vor, wobei die Kombination aus p50/p65 in Säugetieren am häufigsten ist. NF- κ B liegt im „Normalzustand“ der Zelle durch Komplexbildung mit dem Inhibitor I κ B in inaktiver Form im Zytosol vor (Baeuerle et al., 1988; Beg et al., 1993). Die Phosphorylierung von I κ B durch IKK (I κ B-Kinase) bewirkt dessen Ubiquitinierung und Degradierung. Die Freisetzung von NF- κ B von seinem inhibitorischen Protein führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern, wo er an das NF- κ B-Kontrollelement in der Promoterregion der abhängigen Gene binden kann (zusammengefasst in Karin, 1999). Dieser Prozess wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine begünstigt und dient zum Überleben der Zelle („survival pathway“) (Brockman et al., 1995; Traenckner et al., 1995). So stimulieren beispielsweise PKB/Akt (Sizemore et al., 1999; Madrid et al., 2001) (s.Abb 1.2.2) und die MAPKKs NIK („NF- κ B inducing kinase“) (Woronicz et al. 1997), MEKK1 (Lee et al., 1998) sowie MEKK3 (Yang et al., 2001) den NF- κ B-Signalweg indem sie die IKK aktivieren. Die NF- κ B-Signalkaskade übt einen antiapoptotischen Effekt aus, indem das NF- κ B die Transkription von IAP („inhibitor of apoptosis protein“) stimuliert, welches die Effektorcaspasen und Caspase-9 blockt (Datta et al., 1999). Die ersten Hinweise einer Beteiligung von

NF-κB beim Schutz vor Zelltod und Apoptose ergaben sich bei „Knockout“-Mäusen. Diese starben pränatal und zeigten eine massive apoptotische Degeneration der Leberzellen (Beg et al., 1995).

1.3. Der Wirkstoff Curcumin

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) ist ein phenolischer Bestandteil des alkoholischen Extrakts aus dem Rhizom der *Curcuma longa* Pflanze.

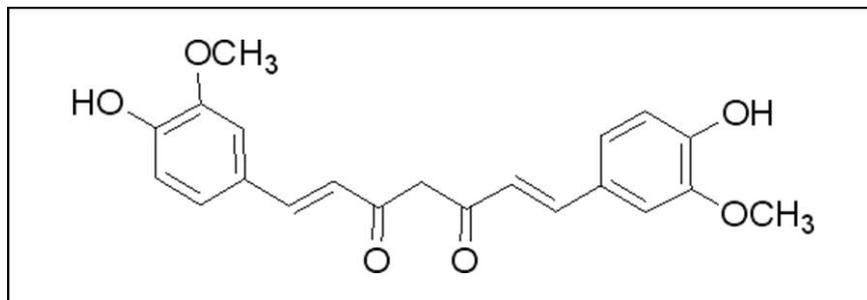


Abb. 1.7: STRUKTURFORMEL VON CURCUMIN

Curcuma longa, auch Gelber Ingwer, Safran-, Gelb- oder Gilbwurz(el) genannt, ist eine aus Südasien stammende Pflanzenart aus der Familie der Ingwergewächse (Zingiberaceae). Sie wird in den Tropen vielfach kultiviert. Das Rhizom ähnelt stark dem des Ingwers, hat jedoch intensiv gelbes Fleisch, das frisch oder getrocknet als Gewürz und Farbstoff verwendet wird. Das Pflanzenpulver Turmeric dieser Pflanze wird schon lange in der asiatischen Medizin gegen eine Vielzahl von Beschwerden eingesetzt (zusammengefasst in Aggarwal et al., 2007). Die intensive Forschung der letzten Jahrzehnte konnte zeigen, dass die mit dem Pulver assoziierte Wirkung auf die enthaltene Substanz, das Curcumin, zurückzuführen ist. In der Industrie findet Curcumin, welches für die typisch gelbe Färbung von Curry oder Senf verantwortlich ist, unter der EWG-Nummer E 100 als Lebensmittelfarbstoff Verwendung.

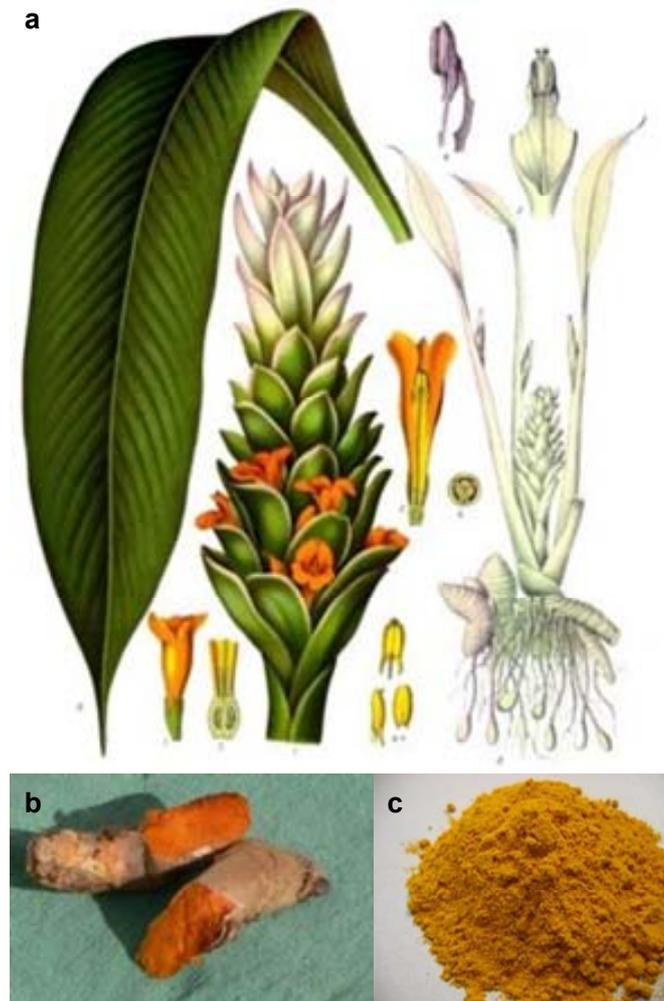


Abb. 1.8: a: *CURCUMA LONGA* PFLANZE, b: RHIZOM, c: CURCUMIN

Es wurden mehr und mehr Eigenschaften des Curcumin gefunden, die diesen Wirkstoff für therapeutische Zwecke interessant machen. So wurde schon früh erkannt, dass Curcumin antioxidativ (Ruby et al., 1995; Xu et al., 1997) und antiinflammatorisch (Ruby et al., 1995; Joe et al., 1997; Lodha et al., 2000) wirkt. Spätere Studien zeigten, dass der Wirkstoff in den verschiedensten Zellen darüber hinaus die Zellproliferation hemmt und Apoptose induziert. Auf genau diese Wirkungen des Curcumin wird im folgenden näherer eingegangen, da apoptose- sowie wachstumsassoziierte Targets in der vorliegenden Arbeit im Fokus der Untersuchungen stehen. Desweiteren sind vor allem auch die *in vivo*-Beobachtungen zur Bioverfügbarkeit des Curcumin für einen therapeutischen Einsatz von besonderem Interesse.

1.3.1. CURCUMIN-INDUZIERTE EFFEKTE *IN VITRO*

Eine Reihe von Studien haben belegt, dass Curcumin in den verschiedensten Zellen Apoptose induziert (zusammengefasst in Aggarwal et al., 2007), wobei der dabei induzierte Apoptosesignalweg vermutlich von der Zell- und/oder Gewebeart abhängig zu sein scheint. So wurde in menschlichen Melanomzellen die FasL-Rezeptoraggregation sowie die Aktivierung der rezeptorvermittelten Caspase-8 gezeigt, aber keine Aktivierung der intrinsischen Caspase-9 (Bush et al., 2001). Gleichermäßen belegt Moragoda et al. (2001) in Magen- und Darmkrebszellen ein Einschalten des extrinsischen Apoptoseapparates durch die Aktivierung der Caspase-8. In Burkitts Lymphomzellen konnte darüber hinaus bei der Curcumin-induzierten Apoptose eine Hochregulierung der FasL-Rezeptorexpression beobachtet werden (Wu et al., 2002). Diesen Ergebnissen zur extrinsisch vermittelten Apoptose stehen jedoch zahlreiche Arbeiten gegenüber, welche die Induktion des intrinsischen Apoptosesignalwegs nach Curcuminbehandlung belegen. So bewirkt Curcumin in ovariellen Krebszellen eine Herabregulierung des antiapoptotischen Bcl-2 und Bcl-XL, während der proapoptotische Gegenspieler Bax hochreguliert wird (Shi et al., 2006). Ähnlicher regulierender Effekt auf weitere pro- oder antiapoptische Proteine der Bcl-2 Familie konnte an einer Reihe von Zellen wie epithelialen Brustzellen (Kim et al., 2001; Choudhuri et al., 2002), Lungenkrebszellen (Radhakrishna Pillai et al., 2004) oder Darmadenokarzinomzellen (Song et al., 2005) gezeigt werden. Eine Folge dieser Regulierung und Merkmal der intrinsischen Apoptose ist die Cytochrom c-Freisetzung, welche durch Curcumin in z.B. HL-60 (Bielak-Mijewska et al., 2004) und K-562 Zellen (Chakraborty et al., 2006) gezeigt werden konnte. Die Aktivierung der nachgeschalteten Caspase-9 durch Curcumin wurde ebenfalls in Arbeiten von Rashmi et al (2003, 2005) dokumentiert.

Wie in Kapitel 1.2. durch verschiedene Beispiele beschrieben, sind die Apoptosesignalwege auch an andere, insbesondere wachstumsassoziierte Signalkaskaden, gekoppelt. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die PKB/Akt, ein entscheidender Überlebensfaktor der Zelle, durch Curcumin in humanen Prostatakrebszellen (Chaudhary and Hruska, 2003) sowie in

humanen HBL100 und MDA-MB-468 Brustzelllinien (Squires et al., 2003) gehemmt wird. Curcumin übt ebenfalls, einen inhibierenden Effekt auf die MAP-Kinasen Erk1/2 und SAPK/JNK in den oben genannten Brustzelllinien (Squires et al., 2003) wie auch in pankreatischen Stellatezellen (Masamune et al., 2006) aus. Im Gegensatz dazu beschreiben Collett und Campbell (2004), dass humane HCT116 Darmkrebszellen durch SAPK/JNK Aktivierung auf Curcumin reagieren, wobei Erk1/2 in diesen Zellen durch Curcumin nicht reguliert wird. Ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse von Curcumin auf die Wirkung der PKC wurden gefunden. Während frühe Arbeiten Curcumin als einen PKC-Inhibitor *in vitro* (Liu et al., 1993) ebenso wie *in vivo* (Reddy und Aggarwal, 1994) definieren, zeigen neuere Arbeiten, dass Curcumin in beispielsweise menschlichen Monozyten die PKC insbesondere die PKC δ durch Phosphorylierung stimuliert (Rushworth et al., 2006). Bei der Suche von Targets des Curcumin, die weit oben in den Signalkaskaden stehen, konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor in seiner Aktivität (Korutla und Kumar 1994; Squires et al., 2003; Kim et al., 2006) sowie in der Expression (Chen et al., 2005) gehemmt wird.

Die Regulierung der verschiedenen Kinasesignalkaskaden legt nahe, dass Curcumin zumindest indirekt auf „downstream“-liegende Transkriptionsfaktoren Einfluss nimmt. Tatsächlich wurde in einer Vielzahl von Veröffentlichungen eine inhibitorische Regulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Curcumin in verschiedenen Zellen belegt (Singh and Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999; Bharti et al., 2003; Aggarwal und Shishodia 2004)

Zusammengefasst induziert Curcumin antiproliferative wie auch proapoptotische Effekte in verschiedenen Zellspezies, wobei die Wirkungsweise vom Zelltyp abhängig zu sein scheint.

1.3.2. BIOLOGISCHE VERFÜGBARKEIT VON CURCUMIN *IN VIVO*

Die zellwachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Eigenschaften machen Curcumin für einen therapeutischen Einsatz, insbesondere gegen

Krebs interessant. Tatsächlich verhinderte eine topische Applikation von Curcumin bei Mäusen eine durch chemische Karzinogene induzierte Tumorpromotion in der Haut (Azuine and Bhide, 1992; Huang et al., 1997). Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass oral verabreichtes Curcumin die Tumorpromotion im Mund (Tanaka et al., 1994; Li et al., 2002) in der Speiseröhre (Ushida et al., 2000), im Magen (Azuine and Bhide, 1992; Huang et al., 1994; Singh et al., 1998), im Zwölffingerdarm (Huang et al., 1994) und im Darm (Huang et al., 1994; Rao et al., 1995 Pereira et al., 1996) im Tiermodell hemmt. Bei Patienten mit familiärer adenomatösen Polyposis, einer Erbkrankheit bei der sich Hunderte von Polypen im Darm bilden, ging die Zahl der Polypen durch die Einnahme von Curcumin um 60% zurück. Die Größe der verbliebenen Polypen reduzierte sich im Schnitt um 50% (Cruz–Correa et al., 2006).

Im Gegensatz dazu ergab sich, dass die orale Verabreichung von Curcumin keinen Einfluss auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum in Brust (Pereira et al., 1996; Huang et al., 1997), Leber, Niere (Frank et al., 2003), Lunge (Huang et al., 1997; Hecht et al., 1999) oder Prostata (Imaida et al., 2001) hat. Diese Ergebnisse lassen sich auf pharmakokinetische Beobachtungen zurückführen, die belegen, dass die Bioverfügbarkeit von Curcumin nach oraler Einnahme durch eine sehr geringe Resorptionsrate aus dem Magen-Darm-Trakt in das Blutkreislaufsystem, eingeschränkt ist. So wurde schon bei ersten Versuchen mit Ratten beschrieben, dass 75% des verabreichten Curcumins ausgeschieden werden (Wahlstrom und Blennow 1978). Weiterhin konnte an Ratten gezeigt werden, dass nach oraler Verabreichung von 400 mg Curcumin weniger als 5 µg/ml im Blut und 20 µg in Leber und Niere nachgewiesen werden konnten (Ravindranath und Chandrasekhara, 1980). Bei menschlichen Probanden waren nach der Einnahme von 2 g Curcumin lediglich Spuren im Plasma (Shoba et al., 1998) zu finden. Garcea et al. (2004) beschreibt darüber hinaus, dass nur Curcuminmetabolite aber kein Curcumin selbst in der menschlichen Leber zu finden waren. Aus diesen Gründen sind Strategien die die Bioverfügbarkeit von Curcumin erhöhen von besonderem Interesse.

1.4. Fragestellung

Aufgrund des enormen Spektrums an biologischen Wirkungen ist Curcumin in den letzten Jahrzehnten Gegenstand hunderter Publikationen geworden, wobei besonders die antikarzinogenen Eigenschaften in den Fokus der Forschung gerückt sind. Der therapeutische Einsatz von Curcumin bei Krebserkrankungen scheint jedoch aufgrund der geringen Absorption in das Blut-Kreislauf-System nach oraler Einnahme erschwert. Angeregt durch die Studie von Dahl et al. (1989), in der gezeigt wurde, dass Curcumin mit Licht (UVA) eine toxische Wirkung auf Bakterien ausübt, wurde von uns die Idee entwickelt den ZCL-Extrakt (Fa. A.S.A.C.) oder Curcumin in Kombination mit Licht in humanen Hautzellen auf eine Wirkung hin zu überprüfen. So könnte durch eine kombinierte Therapie mit Licht die schlechte Bioverfügbarkeit von Curcumin kompensiert werden.

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden die Ergebnisse, die im Rahmen meiner Diplomarbeit belegten, dass ZCL in geringen Konzentrationen zusammen mit UVA-Licht, eine Proliferationshemmung zur Folge hatten. Die verwendeten Konzentrationen zeigten ohne zusätzliche Bestrahlung keine Wirkung auf die Proliferation. Die nahe liegende Annahme, dass Curcumin die Substanz ist, die diesen Effekt vermittelt, sollte zunächst überprüft werden. Dabei wurde auch die Einsetzbarkeit von sichtbarem Licht anstatt UVA überprüft. Diese Versuche, sowie Tests zur Optimierung der Curcumin/Licht-Behandlung, konnten durch die Bestimmung der Proliferationshemmung mittels BrdU-Einbaurrate bewerkstelligt werden.

Vorab galt es jedoch zu klären, wie sich Curcumin in der Zelle verteilt. Dieser grundlegenden Frage wurde durch Mikroskopie am CLSM durch Zugabe von Curcumin zu adhärennten intakten Zellen nachgegangen. Die Eigenfluoreszenz des Curcumins erlaubte es dieses in der Zelle zu lokalisieren und konnte darüber hinaus für spektralphotometrische Analysen genutzt werden.

Die Befunde der Curcumin/Licht-Wirkung auf die Proliferation, erinnern an die photosensibilisierenden Eigenschaften des Psoralen. Bei der sog. PUVA

(Psoralen plus UVA)-Therapie werden phototoxische Eigenschaften, verursacht durch die Entstehung von freien Radikalen, genutzt. Um zu untersuchen, ob Curcumin einen radikalbildenden Effekt hat, wurde die Methode der Dihydrorhodamin-123-Umwandlung gewählt.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es dann, den Einfluss von Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht, zum einen auf die Apoptose und zum anderen auf wachstumsassoziierte Kinasen zu untersuchen. Diese Ergebnisse sollen zu einem verbesserten Verständnis der Wirkungsweise des Curcumins führen. Dabei war interessant herauszufinden, ob die Curcumin/Licht-induzierte Apoptose intrinsisch oder extrinsisch transduziert wird. Zudem könnte bei den untersuchten Kinasen ein frühes, möglicherweise erstes, Target der Signalkaskaden von Curcumin/Licht identifiziert werden.

Bei einer Apoptoseinduktion durch Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht, sollte zunächst durch Messung der LDH-Freisetzung ein toxischer Effekt auszuschließen sein. Apoptotische Zellen wurden durch Bisbenzimidfärbung aufgrund der veränderten Zellkernmorphologie quantifiziert. Zur genaueren Prüfung der Curcumin/Licht-vermittelten Apoptose wurde die Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung, als Merkmal der mitochondrialen intrinsischen Kaskade, bestimmt. Die chronologische Aktivierung der Caspasen sollte diese Befunde untermauern. Für diese Untersuchungen wurden ELISAs oder Western Blot-Analysen durchgeführt.

Wie in Kapitel 1.2. beschrieben, sind die Apoptosesignalwege auch an andere, insbesondere an wachstumsassoziierte, Signalkaskaden gekoppelt. Auch ist von Curcumin bekannt, dass es eine inhibierende Wirkung auf beispielsweise PKB/Akt oder Erk1/2 (Squires et al., 2003) oder den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Singh and Aggarwal, 1995) ausübt. Bei wiederum anderen Kinasen wurden unterschiedliche Effekte des Curcumins beschrieben. Um die Wirkung von Curcumin in Kombination mit Licht auf solche Targets in HaCaT-Zellen zu bestimmen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Als Zielproteine dieser Untersuchungen standen die Proteinkinasen A und C, die MAP-Kinasen (Erk1/2, p38) sowie der EGF-Rezeptor im Vordergrund des Interesses. Die

Wirkung von Curcumin/Licht auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde durch Luciferase-Assays und EMSAs bestimmt.

Die Erkenntnisse der *in vitro*-Befunde sollten im Anschluss dazu genutzt werden, um erste Untersuchungen in einem Mausmodell durchzuführen. Es wurde an ausgewählten Targets überprüft, ob sich die Wirkung von Curcumin/Licht *in vivo* reproduzieren lässt und die Behandlung Einfluss auf das Tumorstadium hat. Hierfür bot sich das Xenograft-Tumormodell an. Dabei handelt es sich um NMRI-Nacktmäuse, denen A431-Zellen subkutan (s.c.) in die Flanke implantiert wurden. Dieses Modell zeigte sich als geeignet, da die dünne fellose Haut der Tiere ein Durchdringen des Lichts erlaubte. Neben der regelmäßigen Tumorstadiummessung wurden immunhistochemische Nachweismethoden angewendet. Dabei wurde an Gewebeproben des Tumors Apoptose durch Zellkern- sowie Proliferation durch Ki-67-Färbungen quantifiziert. Gesondert davon wurden Proben für molekularbiologische Methoden entnommen und proteinchemisch aufgearbeitet. So konnten auch mit Tumorstadiumproben Western Blot-Analysen zur Aktivitätsbestimmung von PKB/Akt, Erk1/2, EGF-R sowie den Caspasen-8 und -9 durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. ZELLKULTUR

2.1.1. MATERIALIEN, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

MATERIALIEN UND REAGENZIEN:

4-WELL-LABTEK	Fa. Nunc, Wiesbaden
6-WELL-MULTISCHALEN	Fa. Nunc, Wiesbaden
24-WELL-MULTISCHALEN	Fa. Nunc, Wiesbaden
96-WELL-MULTISCHALEN	Fa. Nunc, Wiesbaden
A431-ZELLEN	Fa. American Type Culture Collection
AMPHOTERICIN	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
AUOKLAV	Fa. WEBECO, Ober-Ramstadt
AQUA AD INIECTABILIA	Fa. Braun, Melsungen
BEGASBARE BRUTSCHRÄNKE	Fa. Nunc, Wiesbaden
	Fa. Heraeus, Hanau
	Fa. Gibco, Karlsruhe
DMEM	
(„DULBECCO´S MODIFIED EAGLE´S MEDIUM“)	
EDTA-DISODIUM	Fa. Gerbru, Gailbach
EINMALSPRITZEN	Fa. Braun, Melsungen
FKS	Fa. PAA Laboratories, Cölbe
GENTAMYCIN	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach
HACAT-KERATINOZYTEN	Prof. Dr. N. Fusenig, DKFZ, Heidelberg
HANKS-SALZLÖSUNG (HBSS) OHNE NAHCO ₃	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
KGM-2-MEDIUM	Fa. Clonetics, Walkersville, MD, USA
L-GLUTAMIN (100X)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
MEM ESSENTIELLE AMINOSÄUREN	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
MEM NICHT-ESSENTIELLE AMINOSÄUREN	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
MEM VITAMINE (100X)	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
NATRIUMBICARBONAT (7,5%)	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
TRYPsin	Fa. Boehringer, Mannheim
PENICILLIN/STREPTOMYCIN	Fa. Biochrom KG Seromed, Berlin
PUMPE	Fa. Mikrogon, Laguna Hills, USA
STERILE WERKBANK	Fa. Heraeus, Hanau
	Fa. Slee, Mainz
STERILFILTER	Fa. Millipore, Bedford, Ma, USA
STERILISATOR	Fa. Heraeus, Hanau
ZÄHLKAMMER NACH NEUBAUER	Fa. Brand, Wertheim
ZELLKULTURFLASCHEN (75 CM ²)	Fa. Greiner, Frickenhausen
ZELLKULTURFLASCHEN (150 CM ²)	Fa. BD, Franklin Lakes, NJ, USA

LÖSUNGEN:

EDTA-LÖSUNG:

0,2%	EDTA	2 g / 1 L PBS
	steril filtrieren	
	bei -20°C lagern	

TRYPsin/EDTA-LÖSUNG:

0,125%	Trypsin	50 ml 2,5% / 1 L PBS
0,1%	EDTA	50 ml 2% / 1 L PBS
	pH 7,1	
	steril filtrieren	
	bei -20°C lagern	

2.1.2. STERILES ARBEITEN

Im Umgang mit den Zellen musste stets steril gearbeitet werden, um eine Kontamination durch Bakterien und Pilze zu verhindern. Dazu wurden alle Glasgeräte im Heißluftsterilisator über Nacht bei 180°C trockensterilisiert, Laborgeräte aus Kunststoff im Autoklaven für 45 min unter Wasserdruck auf 121°C dampfsterilisiert und Flüssigkeiten mit Hilfe einer Peristaltikpumpe oder Spritze über einen Filter steril filtriert. Die Arbeitsschritte mit den Zellen wurden ausschließlich unter der sterilen Werkbank ausgeführt.

2.1.3. PRIMÄRE KERATINOZYTEN

LÖSUNGEN:

TRANSPORTMEDIUM:

	DMEM
1%	Amphotericin-Lösung
1%	Penicillin/ Streptomycin-Lösung
1%	Gentamycin-Lösung

HBSS/TRYPsin-LÖSUNG:

	HBSS	76 ml
0,25%	Trypsin	10 ml (2,5%)
0,02%	EDTA	10 ml (0,2%)
40 mM	Hepes	4 ml (1 M)
	steril filtrieren	
	bei -20°C lagern	

Die Präparation von primären Keratinozyten erfolgte aus Hautpräparaten, welche von der Klinik für Plastische und Rekonstruktive Chirurgie (Diakonie

Krankenhaus, Bad Kreuznach) zur Verfügung gestellt wurden. Die Hautpräparate wurden in einem sog. Transportmedium in das Labor überführt. Nach der Entfernung des subkutanen Fettgewebes wurde die Haut mit Kanülen straff auf eine Wachsplatte gespannt, um mit einem Hornhauthobel Hautstücke abzuhobeln. Diese Hautstücke wurden in PBS überführt und weiter mit einem Skalpell zerkleinert. Es folgte eine sog. Kalttrypsinierung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Hautstücke in DMEM + 20% FKS überführt und die Epidermis wurde mit einer Pinzette von der Dermis getrennt. Die Epidermisstücke wurden wieder in die Trypsinlösung überführt und suspendiert. Aus der Suspension konnten nach Filtration über eine sterile Gaze und anschließender Zentrifugation (259 g; 10 min) des Filtrats die Keratinozyten gewonnen werden. Das Zellpellet wurde in KGM-2-Medium suspendiert und kultiviert.

2.1.4. HaCaT-KERATINOZYTEN

In den Versuchen wurden HaCaT-Keratinozyten („human adult low calcium high temperature“) der Passagen 30 bis 60 verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um spontan in Kultur immortalisierte menschliche Keratinozyten, die bei der Entfernung eines Melanoms bei einem 62-jährigen Patienten aus dem umgebenden Hautgewebe gewonnen wurden. Wie aus dem Namen hervorgeht, zeigen die Zellen ein Wachstumsmaximum bei niedrigen Calciumionen-Konzentrationen (0,2 nM) und relativ hohen Temperaturen (38,5°C). Diese Zellen eignen sich optimal zur Untersuchung zellbiologischer Vorgänge, da sie zum einen die Fähigkeit zur epidermalen Differenzierung besitzen und zum anderen keine individuellen Unterschiede, wie sie bei primären Keratinozyten zu finden sind, aufweisen. Auch lassen sich die Zellen problemlos vermehren. Die HaCaT-Zellen wurden unserem Labor von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.5. A431-ZELLEN

Bei der Zelllinie A431 handelt es sich um eine humane invasive Tumorzelllinie, welche aus einem Vulvakarzinom einer 85-jährigen Patientin entstammt. Die Zelllinie wurde in den Tierversuchen eingesetzt. Giard et al. (1973) beschrieb und etablierte A431-Zellen erstmals.

2.1.6. KULTURMEDIUM UND SUPPLEMENTE

Zur Kultivierung der HaCaT-Keratinocyten wurde Hanks-Medium unter Zusatz von 5% FKS, 1% Gentamycin- sowie 1% L-Glutamin-Lösung verwendet.

HANKS-MEDIUM:	400 ml	Hanks-Salzlösung (HBSS) ohne NaHCO ₃
(5 LITER)	160 ml	100x MEM-Vitamine
	318 ml	essentielle MEM-Aminosäuren
	160 ml	100x nicht-essentielle Aminosäuren
	166 ml	7,5% Natrium-Bicarbonat
	3600 ml	Aqua ad iniectabilia

pH 6,8-7,2

Medium wird steril (500 ml pro Flasche) abgefüllt

A431-Zellen wurden in „Dulbecco´s modified Eagle´s“-Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% FKS und 1% Gentamycin-Lösung kultiviert.

Primäre Keratinocyten wurden in KGM-2-Medium („keratinocyte growth medium“) gehalten. Dieses Medium setzt sich aus dem Basalmedium (KBM-2) und mitgelieferten Zusätzen (BPE, hEGF, bovines Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Transferin sowie GA-1000), die kurz vor Gebrauch zugesetzt wurden, zusammen.

2.1.7. KULTURBEDINGUNGEN

HaCaT-Zellen sowie primäre Keratinocyten wurden in Kulturflaschen (150 cm²) mit 50 ml des oben beschriebenen Mediums, mit locker aufgeschraubtem

Deckel im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. A431-Zellen wurden in gleicher Weise, jedoch bei 7,5% CO₂-Begasung, kultiviert.

2.1.8. MEDIUMWECHSEL UND PASSAGIEREN VON ZELLEN

Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt bzw. die Zellen beim Erreichen der Subkonfluenz gesplittet. Da die Zellen adhärent sind, mussten sie beim Passagieren wie auch vor dem Aussäen vom Boden gelöst werden. Dazu wurden folgende Schritte durchgeführt:

Das alte Medium wurde abgegossen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml 0,2%iger EDTA-Lösung für 5 bis 10 min bei 37°C inkubiert. EDTA, als extrazellulärer Calcium- und Magnesiumchelator, fängt die für die Catherine und Integrine vermittelte Zelladhäsion benötigten Ionen ab. Nach der Inkubation mit EDTA erfolgte eine 5- bis 10-minütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Trypsin, als Endopeptidase, spaltet ausschließlich Peptidbindungen und löst somit bei kurzer Inkubation die Haftverbindungen der Zelle. Durch Zugabe von 3 ml Hanks-Medium wurde diese Reaktion gestoppt und die Zellen suspendiert. Die Zellsuspension konnte in gleichen Mengen auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Die Zellen wurden dann mit 25 ml Hanks-Medium bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert.

2.1.9. ZELLAUSSAAT

Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl und einem definierten Volumen ausgesät:

Zelldichte pro Well:	
4-Well-LabTek	1,4 x 10 ⁴ Zellen / 750 µl
6-Well-Multischale	1,5-2 x 10 ⁶ Zellen / 4 ml
24-Well-Multischale	4 x 10 ⁵ Zellen / 1 ml
96-Well-Multischale	2 x 10 ⁴ Zellen / 100 µl

Um die Zellen aus der Kulturflasche zu lösen, wurde wie beim Passagieren der Zellen beschrieben (s. Kap. 2.1.8.) vorgegangen. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an Medium wurde die Suspension auf die gewünschte Zelldichte verdünnt, um dann die einzelnen Wells mit entsprechendem Volumen zu befüllen. Die Zellen wurden dann bei 37°C und entsprechender Begasung über Nacht inkubiert.

2.2. AUFNAHMEKINETIK VON CURCUMIN

Zur Bestimmung der Curcuminaufnahme wurden Zellen bis zu sechs Stunden mit Curcumin inkubiert und dieses dann mittels Methanol nach Dahl et al. (1994) extrahiert. Durch Messung der optischen Dichte des Extrakts konnte eine Aufnahmeurve erstellt werden.

MATERIAL:

CURCUMIN
ELISA-READER MR 5000
METHANOL

Fa. Sigma, Taufkirchen
Fa. Dynatech, Guernsey Channel Islands
Fa. Riedel de Hæn AG, Seelze

LÖSUNGEN:

CURCUMIN-LÖSUNG:

Stocklösung (30 mg/ml): 30 mg/1 ml DMSO
Zwischenverdünnung: 3 µl/ 3 ml Hanks ohne Phenolrot
Gebrauchsverdünnung (0,5 µg/ml): 667 µg/40 ml Hanks ohne Phenolrot

DURCHFÜHRUNG:

Für die Aufnahmekinetik wurden HaCaT-Zellen in 6-Well-Multischalen ausgesät und mit 5 µg/ml Curcumin in Hanks-Medium ohne Phenolrot für 0-6 h inkubiert. Das Medium wurde zum gewünschten Bestimmungszeitpunkt abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 500 µl Methanol zugegeben und über den Monolayer geschwenkt. Von den Methanolextrakten wurde die optische Dichte (OD) bei 415 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.3. KONFOKALE LASERSCAN-MIKROSKOPIE

Im konfokalen Laserscan-Mikroskop (CLSM, „confocal laser scanning microscope“) wird die Probe mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Durch punktförmige Beleuchtung und Detektion kann nur Licht aus der Fokusebene zum Detektor gelangen. So werden optische Schnitte erzeugt, die jeweils nur die scharfen Objektdetails enthalten.

Mit einem konfokalen Mikroskop ist es möglich, eine Serie aufeinander folgender optischer Schnitte durch ein Präparat hindurch aufzunehmen und diese entweder einzeln zu betrachten, oder eine dreidimensionale Rekonstruktion des Präparates anzufertigen. Um dabei die Auflösung des konfokalen Mikroskops zu verbessern, bzw. die Genauigkeit nahe der Auflösungsgrenze des Mikroskops zu optimieren, wird eine Dekonvolution durchgeführt. Diese Methode ermöglicht mit Hilfe mathematischer Algorithmen die Bestimmung einer Abbildungsfunktion, die die Aberrationen des optischen Detektionssystems des Mikroskops beschreibt und die Hintergrundfluoreszenz eines Präparates reduziert. Diese Informationen werden anschließend in den originalen Bildstapel eingerechnet und die durch das Mikroskop eingebrachten Fehler dadurch reduziert.

MATERIAL:

CLSM LEICA TCS SP5
IMARIS SOFTWARE
AUTODEBLUX SOFTWARE

Fa. Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Fa. Bitplane AG, Zürich
Fa. ADAC Laboratories, Milpitas, CA, USA

LÖSUNGEN:

CURCUMIN-LÖSUNG:
Stocklösung (30 mg/ml): 30 mg/1 ml DMSO
Zwischenverdünnung: 3 µl/ 3 ml PBS⁺⁺

DURCHFÜHRUNG:

Untersucht wurde die Verteilung von Curcumin an vitalen adhärennten HaCaT-Zellen. Hierzu wurden diese auf runden Deckgläschen so ausgesät, dass am folgenden Tag eine Dichte von 70% erreicht war. Die Deckgläschen wurden in sog. Rose-Kammern eingesetzt und die Zellen mit PBS⁺⁺ überschichtet. Die Vorrichtung am CLSM ermöglichte eine permanente Begasung sowie

Umgebungstemperatur von 37°C. Nachdem alle notwendigen Einstellungen getroffen wurden, erfolgte die Zugabe der Curcumin-Lösung zur Erreichung einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Nun konnten bei einer Anregung von ca. 420 nm Bilderserien der verschiedenen Ebenen aufgenommen werden. Bei der Rekonstruktion eines 3D-Bildes wurden diese entsprechend dekonvoluiert.

2.4. BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT CURCUMIN UND LICHT

In diesem Versuchsunterkapitel wird die optimierte Durchführung der Curcumin/Licht-Behandlung der Zellen beschrieben. Die Zellen wurden mit Curcumin (0,05-1 µg/ml) eine Stunde vorinkubiert und im Anschluss in Anwesenheit von Curcumin mit 1 J/cm² UVA- oder 5 min mit 5500 lx sichtbarem Licht (Abstand: 45 cm) stimuliert. Das Emissionsspektrum der UVA-Lampe lag bei 315-400 nm mit einem Maximum bei 365 nm. Bei den Röhren zur Erzeugung des sichtbaren Lichts handelte es sich um 10 x 40 W Lampen. Für Versuche, bei denen die Wirkung von Curcumin mit der des Extrakts ZCL verglichen werden sollte, wurde die Behandlung mit ZCL in gleicher Weise durchgeführt. Da der Extrakt 10% Curcuminoide enthielt wurde die 10-fache Konzentration eingesetzt.

MATERIAL:

CURCUMIN	Fa. Sigma, Taufkirchen
DMSO	Fa. Merck, Darmstadt
TAGESLICHTRÖHREN	Fa. Philips GmbH, Hamburg
UV 801 AL (UVA-LAMPE)	Fa. Waldmann, Villingen-Schwenningen
UV-METER	Fa. Kurt Migge Laborbedarf, Heidelberg
ZCL	Fa. ASAC, Alicante, Spanien

LÖSUNGEN:

CURCUMIN-LÖSUNG:

Stocklösung (30 mg/ml) 30 mg/1 ml DMSO

ZCL-LÖSUNG:

Stocklösung (15 mg/ml): 15 mg/500 µl PBS + 500 µl Ethanol
 5 min rollern
 5 min ultraschallen
 100 µl aliquotieren
 bei -20°C lagern

DURCHFÜHRUNG:

Etwa 24 h nach Aussaat erfolgte die Behandlung der Zellen. Dazu wurden die entsprechenden Curcumin- oder ZCL-Konzentrationen durch Verdünnung, zum einen in Medium, zum anderen in PBS⁺⁺, hergestellt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Begasung mit diesen Verdünnungen in Medium vorinkubiert. Zur Bestrahlung der Zellen, wurden die Mediumlösungen durch die Verdünnungen in PBS⁺⁺ ersetzt, um eine Lichtabsorption durch das Lösungsmittel auszuschließen. Auch war es wichtig PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ zu verwenden, so dass die Zellen sich nicht vom Untergrund ablösen. Direkt nach dieser Zugabe wurden die Zellen dann mit UVA oder sichtbarem Licht bestrahlt. Bei der UV-Bestrahlung wurde die Strahlungsintensität der Lampe vorher gemessen. Auf diese Weise konnte die gewünschte Dosis durch Berechnung der Bestrahlungsdauer erzielt werden. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen im entsprechenden Medium unter den üblichen Bedingungen inkubiert.

2.5. BRDU-EINBAU

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Basenanalogue und wird bei der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. So entspricht die BrdU-Einbaurate der DNA-Syntheserate und ist in der Regel proportional zur Proliferation. In diesem Test wird sie kolorimetrisch durch die Reduktion eines Substrates durch eine an den BrdU-Antikörper gekoppelte Peroxidase bestimmt.

MATERIAL:

CELL PROLIFERATION ELISA BRDU
ELISA-READER MR 5000
SCHWEFELSAURE H₂SO₄ (1 N)
WELLWASH 4 Mk 2

Fa. Roche, Mannheim
Fa. Dynatech, Guernsey Channel Islands
Fa. AppliChem, Darmstadt
Fa. LabSystems, Helsinki, Finnland

DURCHFÜHRUNG:

Für diesen Test wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Nach der Behandlung wurden 10 µl BrdU-Label (1:100) pro Well zugegeben. Nach ca. 24 h wurden die Zellen fixiert (30 min) und der im Kit enthaltene Peroxidase-gekoppelte BrdU-Antikörper (100 µl/Well; 1:100) wurde hinzu gegeben. Nach

einstündiger Inkubation wurden die Wells dreimal gewaschen und das Substrat wurde zupipettiert. Durch die Reduktion des Substrats fand eine blaue Farbreaktion statt, welche nach Erreichen der gewünschten Intensität mit 50 µl 1 N H₂SO₄ abgestoppt wurde. Jetzt konnte die optische Dichte bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt werden.

2.6. LDH-TEST

Der LDH-Test ist ein sehr häufig angewendeter Zytotoxizitätstest, dessen Prinzip auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), die aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird, beruht. Die LDH-Aktivität wird mit Hilfe eines enzymatischen Tests bestimmt, wobei im ersten Schritt Laktat durch die Oxidoreduktase, LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Koenzym NAD⁺ durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu NADH/H⁺ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert ein Katalysator Wasserstoff vom entstandenen NADH/H⁺ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz, welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird. Diese Farbstoffbildung kann kolorimetrisch gemessen werden.

MATERIAL

CYTOTOXICITY DETECTION KIT
ELISA-READER MR 5000

Fa. Roche, Mannheim
Fa. Dynatech, Guernsey Channel Islands

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Test wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Ca. 24 h nach Behandlung wurden diese bei 250 g für 10 min zentrifugiert und die zellfreien Überstände überführt. Durch Zugabe von 100 µl Reaktionslösung, bestehend aus Katalysatoren und Dye-Solution im Verhältnis 1:45 wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Farbtintensität wurde alle 10 min am ELISA-Reader bei 490 nm gemessen, bis eine OD von 1,6-1,8 erreicht wurde.

2.7. ANTIOXIDATIONSTEST

Die Bildung von Sauerstoffradikalen in der Zelle lässt sich anhand der Umwandlung von Dihydrorhodamin-123 (DHR-123) in das fluoreszierende Rhodamin-123 (RH-123) durch gebildete Sauerstoffspezies wie Superoxide (Henderson und Chappell, 1993) oder Hydrogenperoxide (Royall und Ischiropoulos, 1993) nachweisen.

MATERIAL

DHR-123	Fa. Sigma, Taufkirchen
CYTO FLUOR MULTI WELL PLATE READER 2000	Fa. PerSeptive Biosystem GmbH, Freiburg
SCHWARZE 96-WELL-PLATTEN	Fa. Nunc, Wiesbaden

PUFFER UND LÖSUNGEN

DHR-123:
Gebrauchsverdünnung (100 µM): 10 mg/1,5 ml Ethanol
+ 28,9 ml PBS
1 ml Aliquots bei -20°C

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Test wurden die Zellen in schwarzen 96-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 10 µl DHR-123 für eine Stunde (mit den Substanzen Curcumin oder Psoralen) vorinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, bestrahlt und direkt nach der Bestrahlung wurde die Fluoreszenz von RH-123 im CytoFluor bei einer Extinktion von 485 nm und Emission von 530 nm alle 10 min gemessen, bis keine kinetische Änderung mehr erfolgte. Dies war in der Regel nach 90 min der Fall.

2.8. APOPTOSE-ELISA

Der „Cell Death Detection“-ELISA beruht auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip, bei dem monoklonale Mausantikörper gegen Histone und DNA verwendet werden. Dadurch können zytoplasmatische Histon-assoziierte DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen) spezifisch

bestimmt werden, die während der Apoptose durch eine internukleosomale spaltende Endonuklease entstehen.

MATERIAL

CELL DEATH DETECTION ELISA
ELISA-READER MR 5000

Fa. Roche, Mannheim
Fa. Dynatech, Guernsey Channel Islands

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Test wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Ca. 24 h nach Behandlung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer und 30-minütiger Inkubation lysiert. Nachdem sie für 10 min bei 259 g zentrifugiert wurden, um Zellkerne und -fragmente zu entfernen, wurden 20 µl des Zelllysats (zytoplasmatische Fraktion) in Streptavidin-beschichtete Wells überführt. Anschließend wurde mit 75 µl Immunoreagenz, bestehend aus dem Inkubationspuffer, 5% Anti-Histon-Biotin und 5% Anti-DNA-Peroxidase (POD), für 2 h auf einem Schüttler inkubiert. Während der Inkubation bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der Nukleosomen und gleichzeitig durch Biotinylierung an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. So konnte die Apoptoserate kolorimetrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 530 nm im ELISA-Reader bestimmt werden.

2.9. HOECHSTFÄRBUNG

Bei dem Hoechstfarbstoff Bisbenzimid, handelt es sich um eine Substanz, die an adenin- und thymidinreiche Sequenzen doppelsträngiger DNA bindet und somit spezifisch den Zellkern anfärbt. Der Farbstoff besitzt die Eigenschaft bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 360 nm blau (460 nm) zu fluoreszieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Färbemethode angewendet, um apoptotische Zellkerne nachzuweisen. Diese besitzen eine fragmentierte und kondensierte DNA, die in sog. „apoptotic bodies“, Zellkernabschnürungen vorliegt (Wyllie et al., 1984).

MATERIAL

ACETON	Fa. Riedel de Häen AG, Seelze
AXIOSKOP (FLUORESZENZMIKROSKOP)	Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
BISBENZIMID H 33342 FLUOROCHROM	Fa. Riedel de Häen AG, Seelze
DIGITALKAMERA UND ADAPTERRING	Fa. Sony, Japan
METHANOL	Fa. Riedel de Häen AG, Seelze
MOUNTING FLUID	Fa. Syva, Auckland, Neuseeland
PBS MIT Ca^{2+} UND Mg^{2+}	Fa. Invitrogen, Karlsruhe

PUFFER UND LÖSUNGEN

BISMENZIMID H 33342:

Stammlösung (1 mg/ml): 10 mg/10 ml aqua
1 ml Aliquots bei -20°CGebrauchsverdünnung (1 µg/ml): 100 µl Stammlösung/10 ml PBS⁺⁺

METHANOL/ACETON-GEMISCH: (1:1)

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 4-Well-LabTeks ausgesät. Zum gewünschten Zeitpunkt nach Behandlung wurden die Wells mit PBS⁺⁺ gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese dann mit 750 µl/Well eiskaltem Methanol/Aceton für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Nach der Fixierung war es möglich die Proben bei 4°C im Dunkeln zu lagern. Zum Färben der Zellen wurde das PBS⁺⁺ abgesaugt und mit 750 µl/Well Bisbenzimid-Gebrauchsverdünnung für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Entfernung der Farbstofflösung wurden die Proben dann erneut dreimal mit PBS gewaschen. Nun konnte der Rahmen der LabTeks entfernt werden. Der so entstandene Objektträger wurde mit einem Papiertuch abgetupft, mit zwei Tropfen Mounting Fluid versetzt und mit Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckelt.

Bei der Färbung von Tumorschnitten, wurden die Tumore fixiert, entwässert, eingebettet, geschnitten, entparaffiniert und demaskiert. Die Färbung erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit der auf die Schnitte geträufelte Bisbenzimid-Gebrauchsverdünnung in der sog. feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 2 min) mit PBS wurden die Schnitte ebenfalls eingedeckelt.

Zur Auswertung der Färbung wurden zufällig ausgewählte Bildausschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Fotos wurden vom Mikrochip der Kamera auf den PC übertragen und konnten dann in einem beliebigen Bildbearbeitungsprogramm angeschaut und ausgezählt werden. Bei der Auszählung wurde zunächst die gesamte Zellzahl

des Bildausschnittes und in Bezug dazu der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt.

2.10. IMMUNHISTOCHEMISCHE KI-67-FÄRBUNG

In der Immunhistochemie (IHC) nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt, also direkt im Gewebe, sichtbar zu machen. Während der Erstantikörper spezifisch an das gewünschte Antigen bindet, ist der gegen den Erstantikörper gerichtete Zweitantikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt. In dieser Arbeit geschah die Detektion mit der ABC- (Avidin-Biotin-Komplex) Methode:

(Unkonjugierter) Primärantikörper + biotinmarkierter (=biotinylierter) Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkonjugat + Substrat/Chromogen --> Farbe.

Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass nach der Bindung von Avidin an (das am Sekundärantikörper gekoppelte) Biotin, das Avidin seinerseits drei weitere Biotinbindungsstellen besitzt. So erzielt man durch die Zugabe von Biotin-Peroxidase-Konjugaten eine Vervielfältigung des Signals, nach Zugabe des entsprechenden Substrats. Bei dem verwendeten Kit, wurde das Substrat AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) durch die Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“; HRP) umgesetzt und ergab dabei eine Rotfärbung.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde mittels IHC das Ki-67-Antigen in Maustumoren angefärbt. Ki-67 ist ein Proliferationsmarker. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki-67-Antigen nicht.

MATERIAL

AQUATEX-EINBETTMEDIUM	Fa. Merk, Darmstadt
CITRATPUFFER	Fa. Dako Cytomation, Hamburg
FORMALDEHYD	Fa. Roth, Karlsruhe
GEWEBE-EINBETT-STATION	Fa. Vogel, Gießen
LEICA RM2125 ROTATIONSMIKROTOM	Fa. Leica Microsystems, Wetzlar
METHANOL	Fa. Fluka, Seelze
MEYER'S HÄMATOXYLIN	Fa. AppliChem, Darmstadt

NIKON COOLPIX
OBJEKTTRÄGER/DECKGLÄSER
OLYMPUS BX5
SHANDON HYPERCENTER XP
SONY CYBER SHOT 3.3
ULTRATECH HRP (AEC) KIT
WASSERPEROXID (30%)
ZEISS AXIOSKOP
PARAFFIN
XYLOL
ISOPROPANOL
KI-67-ANTIKÖRPER

Fa. Nikon Deutschland, Düsseldorf
Fa. Marienfeld. Lauda
Fa. Olympus, Hamburg
Fa. Thermo Fisher, Langenselbold
Fa. Sony Deutschland, Köln
Fa. Beckman Coulter, Krefeld
Fa. AppliChem, Darmstadt
Fa. Zeiss, Oberkochen
Fa. Micron international GmbH, Walldorf
Unikliniksapotheke, Frankfurt/Main
Unikliniksapotheke, Frankfurt/Main
Fa. Dako Cytomation, Hamburg

DURCHFÜHRUNG

Tumorproben, die immunhistochemisch gefärbt wurden, mussten direkt nach der Entnahme für mindestens 12 h in 4%igem Formaldehyd fixiert werden. Im nächsten Schritt wurden die Tumore in Einbettkassetten überführt und im Shandon Hypercenter über Nacht entwässert. Die Proben konnten dann anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet werden und waren so über Monate/Jahre haltbar. Für die Färbung wurden die Proben mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms in dünne Gewebeschnitte von 4 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Bevor die Färbung durchgeführt werden konnte, wurden die Schnitte für jeweils 5 min in Xylol (4x), Isopropanol (2x), 95%igem (2x) und 70%igem Ethanol (2x) entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Tumorschnitte in Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, bei der die Schnitte in einer mit Citratpuffer gefüllten Plastikkuvette in der Mikrowelle 6-mal für 3 min aufgekocht wurden. Dabei war zu beachten, dass die verdampfte Flüssigkeit nach jedem Aufkochen mit Aqua dest. aufgefüllt wurde. Nach dem Abkühlen der Schnitte (ca. 20 min) wurden diese dreimal für 2 min in PBS gewaschen. Die folgenden Färbeschritte erfolgten in einer sog. feuchten Kammer, um das Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern. So wurde der Erstantikörper (Verdünnung 1:50) direkt auf die Schnitte geträufelt und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (je 2 min) erfolgte die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers für 30 min. Nach erneutem Waschen in PBS (3 x 2 min) wurden die Schnitte 45 min mit alkalischem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat behandelt und anschließend wie zuvor gewaschen. Nach Aufbringen der AEC-Färbelösung wurde die Farbreaktion beobachtet und zum gewünschten Zeitpunkt durch Überführen der Schnitte in Aqua dest. gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Proben 4-7 min in Hämatoxylin inkubiert und

anschließend in Leitungswasser gebläut. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Aquatex-Einbettmedium beträufelt und mit Deckgläschen versehen.

Zur Auswertung der Färbung wurden zufällig ausgewählte Bildausschnitte unter dem Mikroskop mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Fotos wurden vom Mikrochip der Kamera auf den PC übertragen und konnten dann in einem beliebigen Bildbearbeitungsprogramm angeschaut und ausgezählt werden. Bei der Auszählung wurde zunächst die gesamte Zellzahl des Bildausschnittes und in Bezug dazu der prozentuale Anteil an Ki-67 positiven Zellen bestimmt.

2.11. CYTOCHROM C-FREISETZUNG

2.11.1. DIGITONIN-PERMEABILISIERUNG

Bei Digitonin handelt es sich um ein Detergens, das bei entsprechender Konzentration und Einwirkzeit die Zellmembran lediglich permeabilisiert und nicht völlig zerstört (Jiang et al., 1999). Auf diese Weise kann der zytosolische Extrakt gewonnen werden, ohne Membranen der Zellorganellen zu beschädigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Digitonin-Permeabilisierung angewandt, um zytosolisches Cytochrom c zu extrahieren.

MATERIAL

DIGITONIN	Fa. Fluka, Chemie AG, Buchs, CH
EDTA-DISODIUM	Fa. Gerbru, Gailbach
PBS	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
SUCROSE	Fa. Roth, Karlsruhe
TRYPsin	Fa. Boehringer, Mannheim

PUFFER UND LÖSUNGEN

DIGITONIN-LÖSUNGEN:

Stocklösung (10 mg/ml): 20 mg/2 ml aqua
vortexen
30 min bei 95°C
(immer frisch ansetzen)

Gebrauchsverdünnung (80 µg/ml): 2 µl Stocklösung/250 µl Sucrose-Lösung

500 mM SUCROSE-LÖSUNG: 1,71 g/10 ml aqua

EDTA-LÖSUNG: (s. Kap. 2.1.1.)

TRYPsin/EDTA-LÖSUNG: (s. Kap. 2.1.1.)

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 6-Well-Multischalen ausgesät und wie beschrieben mit Curcumin und Licht behandelt. Am darauf folgenden Tag wurden dann die Zellen zunächst vom Well-Boden abgelöst. Dabei wurde ähnlich wie unter Punkt 2.1.6. verfahren. Das Medium wurde abpipettiert und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, welches anschließend auch in das dem Well entsprechende Röhrchen überführt wurde. Folgende Lösungen wurden nach der Inkubation mit den Zellen in den entsprechenden Röhrchen gesammelt: 1 ml/Well EDTA-Lösung (10 min) und 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (10 min). Nach dem Lösen der Zellen wurden diese dann mit 1 ml Medium in den Wells suspendiert und ebenfalls in das entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 259 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 µl PBS gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl Digitonin/Sucrose-Gebrauchslösung wurde die Zellmembran permeabilisiert. Nach 30-sekündiger Inkubation wurden die Proben kurz gevortext und gleich auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 18000 g und 4°C. Der Überstand mit dem gewünschten zytosolischen Extrakt wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinbestimmung (DC Protein Assay, Fa. BioRad) konnten die Proben bei -80°C gelagert werden.

2.11.2. CYTOCHROM C-IMMUNOASSAY

Dieser Assay der Firma R&D Systems, der im Kit geliefert wird, beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Testprinzip. Das zu detektierende Cytochrom c wird zunächst an der mit Cytochrom c-Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte gebunden. Ein Enzym-gebundener Antikörper, der ebenfalls spezifisch gegen Cytochrom c gerichtet ist, wird hinzugegeben. Das an dem Antikörper gebundene Enzym katalysiert nach Zugabe einer

Substratlösung eine Farbreaktion. Durch die Messung der optischen Dichte kann dann die Cytochrom c-Menge bestimmt werden, die proportional zur Farbreaktionsintensität ist. Dieser Test wurde eingesetzt, um die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien zu bestimmen.

MATERIAL

HUMAN CYTOCHROM C IMMUNOASSAY KIT
ELISA-READER MR 5000
WELLWASH 4 Mk 2

Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Fa. Dynatech, Guernsey Channel Islands
Fa. LabSystems, Helsinki, Finnland

DURCHFÜHRUNG

Die aus der Digitonin-Permeabilisierung gewonnenen zytosolischen Zellextrakte wurden mit gleichen Proteinnengen (nach einer Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay, Fa. BioRad) eingesetzt. Der Immunoassay wurde ausschließlich nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optische Dichte wurde im ELISA-Reader MR 5000 gemessen.

2.12. NF- κ B Luciferase Assay

2.12.1. PLASMIDISOLIERUNG

Zur Plasmidisolierung wurde das „Plasmid Purification Maxi Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Das Verfahren basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, wobei die Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden wird. Andere Zellbestandteile, wie z.B. Proteine, Membranfragmente oder RNA werden mittels niedrigkonzentrierter Salzlösung aus der Säule gewaschen. Die Plasmid-DNA wird nach diesen Waschschritten schließlich durch hochkonzentrierte Salzlösung eluiert. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde dieses Verfahren angewendet, um SV40- und NF- κ B-Vektoren aus *E. coli*-Kulturen zu isolieren.

MATERIAL

ETHANOL (70%)
HISPEED PLASMID PURIFICATION MAXI KIT

Fa. AppliChem, Darmstadt
Fa. Qiagen, Hilden

ISOPROPANOL (70%)
 ULTROSPEC 2000

Fa. Riedel de Häen AG, Seelze
 Fa. Pharmacia, Little Chalfont, UK

DURCHFÜHRUNG

Die Plasmidisolierung wurde ausschließlich nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Verifizierung des Reinheitsgrades erfolgte im Anschluss an die Isolierung eine Messung im UV-Photometer (Ultrospec 2000) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Hierbei konnte der Quotient aus den beiden gemessenen OD-Werten bestimmt werden, welcher wiederum eine Aussage über die Reinheit der DNA erlaubte. Die OD-Konzentrationsangabe der jeweiligen DNA-Probe erfolgte in µg/ml. DNA mit einem Reinheitsfaktor zwischen 1,8 und 2,0 wurde für die anschließende Transfektion verwendet.

2.12.2. LIPOFECTAMIN-TRANSFEKTION

Die Transfektion mit dem kationischen Lipid Lipofectamin, hat sich wie bei vielen eukaryotischen Zellen, so auch bei HaCaT-Keratinocyten als besonders effizient erwiesen. Die kationische Gruppe des Lipofectamins bildet Komplexe mit der zu transfizierenden DNA, während der Lipidanteil mit der Zellmembran in Kontakt tritt und fusioniert. So gelangt die DNA durch Membranabschnürungen in sog. Liposomen in die Zelle. Wie letztendlich die Plasmide in den Zellkern gelangen ist unbekannt. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden HaCaT-Keratinocyten mit dem SV40- und NF-κB-Vektor kotransfiziert, um später die NF-κB-Aktivität in einem Dual-Luciferase Assay bestimmen zu können.

MATERIAL

LIPOFECTAMIN™ 2000 (LF2000)
 OPTIMEM MEDIUM

Fa. Invitrogen, Karlsruhe
 Fa. Invitrogen, Karlsruhe

PUFFER UND LÖSUNGEN

LÖSUNG A:	1 µg Plasmid	+ 50 µl Optimem	/Well
LÖSUNG B:	1,5 µl LF2000	+ 50 µl Optimem	/Well

DURCHFÜHRUNG

Für die Transfektion wurden die Zellen am Tag zuvor in 24-Well-Multischalen ausgesät. Durch Bestimmung des DNA-Gehalts nach der Plasmidisolierung wurden die für die Transfektion benötigten Lösungen A und B (s.o.) mit der entsprechenden DNA-Menge angesetzt. Lösung B wurde vorerst 5-30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen bevor sie dann mit Lösung A gemischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl/Well dieses Gemisches sowie die Inkubation über Nacht bei 38°C und 5% CO₂. Am nächsten Tag wurde die Lipofektamin-Lösung gegen Hanks-Medium ausgetauscht und die Zellen wurden der üblichen Curcumin/Licht-Stimulierung ausgesetzt.

2.12.3. DUAL-LUCIFERASE ASSAY

In einem Dual-Reporter-Assay lässt sich die Expression zweier individueller Reporterenzyme, in einem System messen. In dem Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit der Firma Promega kann die Expression der beiden Reportergene Renilla und Firefly Luciferase gemessen werden. Die Luciferasen katalysieren Biolumineszenz-Reaktionen, die in einem Bioluminometer messbar sind. Die im Kit enthaltenen Substrate beider Reaktionen werden nacheinander dazu gegeben, so dass die Biolumineszenzen beider Luciferasereaktionen getrennt gemessen werden können. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde mittels dieses Verfahrens die NF-κB-Aktivität bestimmt. Zuvor wurden die Zellen mit einem NF-κB- und SV40-Vektor transfiziert. Der NF-κB-Vektor trägt das Firefly Luciferase Reportergen mit einem vorgeschalteten Promotor, der eine NF-κB Bindedomäne enthält. Bei einer Stimulierung des Faktors ist dessen Freisetzung aus einem Inhibitor-Komplex und eine Transkription des Reportergens zu erwarten. Als Referenz, d.h. zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, diente der SV40-Vektor, der einen konstitutiv-aktiven Promotor vor dem Reportergen (Renilla Luciferase) trägt. So ist es möglich durch Bildung des Quotienten der beiden Biolumineszenzwerte eine Aussage über die NF-κB-Aktivität zu machen.

MATERIAL

DUAL-LUCIFERASE REPORTER ASSAY SYSTEM KIT Fa. Promega, Madison, USA
LUMAT LB 9507, BIOLUMINOMETER Fa. Berthold, Bad Wildbach
PLASTIKRÖHRCHEN Fa. Starstedt, Nümbrecht

DURCHFÜHRUNG

24 h nach Behandlung der transfizierten Zellen mit Curcumin/Licht wurde die NF- κ B-Aktivität bestimmt. Die Zelllyse und der Dual-Luciferase Reporter Assay wurden ausschließlich nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.13. WESTERN BLOT

2.13.1. ABARBEITUNG DER PROBEN

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteine mit 3x SDS-Sample-Puffer abgearbeitet. Das darin enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark negativ geladenes Detergens, das zunächst die Zellen lysiert. Darüber hinaus zerstört SDS alle nicht-kovalenten Bindungen in Proteinen und bindet an hydrophobe Bereiche. Da sich die negativen Ladungen der gebundenen SDS-Moleküle gegenseitig abstoßen, dissoziieren alle Proteine in ihre Untereinheiten, und die einzelnen Polypeptidketten entfalten sich vollständig. Die linearen Polypeptidketten zeigen alle nahezu gleiche Ladungs-/Masse-Verhältnisse. Eine weitere Abarbeitungsmethode ist in Kap. 2.14.1. beschrieben. Diese Abarbeitung ist notwendig, wenn zytosolische und nukleäre Extrakte getrennt gewonnen werden sollen, um beispielsweise eine Translokation, wie im Fall von NF- κ B, nachweisen zu können.

MATERIAL

BROMPHENOLBLAU Fa. Merck, Darmstadt
CELLSCRAPER Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz
DTT (DITHIOTHREITOL) Fa. Sigma, Taufkirchen
GLYCEROL Fa. Roth, Karlsruhe
PBS Fa. Invitrogen, Karlsruhe
SDS Fa. ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
TRIS Fa. USB, Cleveland, OH, USA

PUFFER UND LÖSUNGEN

3x SDS-SAMPLE-PUFFER:

187,5 mM	Tris	2,27 g / 100 ml
6%	SDS	6 g / 100 ml
30%	Glycerol	30 ml / 100 ml
150 mM	DTT	2,3 g / 100 ml
0,3%	Bromphenolblau	0,3 g / 100 ml

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 6-Well-Multischalen ausgesät und wie beschrieben mit Curcumin und Licht behandelt. Zum gewünschten Abarbeitungszeitpunkt wurden die Zellen auf Eis gestellt und alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe und 5-minütige Inkubation von 80 µl 3x SDS-Sample-Puffer pro Well. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und anschließend 4-mal für kurze Zeit ultrabeschallt. Nach diesem Schritt war es möglich die Proben bei -80°C zu lagern. Vor der Auftragung der Proben auf das Gel mussten diese für 5 min bei 95°C erhitzt werden.

2.13.2. SDS-GELELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese ist ein Verfahren nach Laemmli (1970), mit dem ein Gemisch von Molekülen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes getrennt wird. Dabei bestimmt die Masse, die proportional zur Ladung der mit SDS behandelten Proteine ist, deren Wandergeschwindigkeit zur Anode. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem Polyacrylamid-Gel. Das Gel wird aus Acrylamid-Monomeren hergestellt, wobei die Porengröße durch die Zugabe der Menge an Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt werden kann.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Auftrennung von Proteinen der Größe 35-180 kDa in einem 10-15%igen Gel durchgeführt. Über dem eigentlichen Trenngel wurde ein weiteres sog. Sammelgel gegossen. Das Sammelgel enthält nur geringe Mengen Acrylamid und dient dazu die Proteine zunächst an der Sammelgel/Trenngel-Grenzfläche zu sammeln, um anschließend bei höherer Spannung einen gleichzeitigen Übergang der

Proteine in das Trenngel zu gewährleisten. Die Proteine wurden aufgetrennt, um sie dann mittels Western Blot-Analyse detektieren zu können.

MATERIAL

ACRYAMID/BISACRYLAMID	Fa. Roth, Karlsruhe
APS	Fa. Roth, Karlsruhe
GEL CASTING SYSTEM JOEY™	Fa. BioRad, München
GLASPLATTEN, SPACER U. KÄMME	Fa. Peqlab, Erlangen
GLYCEROL	Fa. Roth, Karlsruhe
METHANOL	Fa. Riedel de Häen, Seelze
PENGUIN™	Fa. BioRad, München
PERFEKT BLUE™	Fa. Peqlab, Erlangen
POWER PAC 200	Fa. BioRad, München
PRESTAINED SDS PAGE STANDARDS	Fa. BioRad, München
SDS	Fa. ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
TEMED	Fa. Merck, Darmstadt
TRIS	Fa. USB, Cleveland, OH, USA

PUFFER UND LÖSUNGEN

APS-LÖSUNG:

10% APS	1 g / 10 ml
bei 4°C lagern	

5X LAEMMLI:

25 mM Tris	15,1 g / 1 L
250 mM Glycin	94 g / 1 L
0,1% SDS	5 g / 1 L
pH 8,3 einstellen	

4X TRIS-HCL PH 6.8:

0,5 M Tris	6,05 g / 100 ml
0,4% SDS	0,4 g / 100 ml
pH 6,8 einstellen	
bei 4°C lagern	

4X TRIS-HCL PH 8.8:

1,5 M Tris	18 g / 100 ml
0,4% SDS	0,4 g / 100 ml
pH 8,8 einstellen	
bei 4°C lagern	

DURCHFÜHRUNG

Zunächst wurden die aus einer Sammel- und Trenngelschicht bestehenden Gele gegossen.

	10%iges Trenngel	12%iges Trenngel	15%iges Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/ Bisacrylamid	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml	1,3 ml
4x Tris/HCl pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	--
4x Tris/HCl pH 6,8	--	--	--	2,5 ml
Aqua ad iniectabilia	6,25 ml	5,25 ml	3,75 ml	6,1 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Dazu wurden zwei zusammengehörige Platten durch zwei am Rand gelegte Spacer getrennt, in eine sog. Geltasche gesteckt und in einem Gelgießstand eingespannt. Die oben aufgeführten Sammel- und Trenngel-Lösungen wurden bis auf die Zugabe der APS-Lösung in je einem 50 ml Zentrifugenröhrchen angesetzt. Zunächst wurde der Sockel gegossen. Dazu wurden 2 ml Trenngel-Lösung mit 200 µl APS-Lösung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und jeweils 1 ml zwischen die Glasplatten pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl APS-Lösung zur restlichen Trenngel-Lösung, wurden 4 ml von dieser über den Sockel pipettiert. Zur Verdrängung von Luftblasen wurde das gegessene Trenngel mit Ethanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war (ca. 30 min), wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel nach Zugabe von 100 µl APS-Lösung über das Trenngel pipettiert. Zur Aussparung von Taschen (zur Beladung) wurde ein sog. Kamm zwischen die Platten in das Sammelgel eingeführt. Nachdem auch diese Gelschicht polymerisiert war, konnten die Glasplatten mit dem Gel aus den Geltaschen genommen und in die Gelelektrophorese-Vorrichtung eingespannt werden. Diese wurde bis zu den Markierungen mit Lämmli-Puffer aufgefüllt und das Gel mit den Proben (10-15 µl/Tasche) beladen. Zusätzlich wurde pro Gel ein Proteinmarker aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt bis die Proteine zur Sammelgel-/Trenngel-Grenzfläche gewandert waren. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die gefärbte Lauffront den Sockel erreicht hatte.

2.13.3. PROTEINTRANSFER UND IMMUNNACHWEIS

Beim Western Blot handelt es sich um ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Proteinnachweis. Zunächst werden die Proteine mittels der SDS-Gelelektrophorese getrennt und dann durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Membran (hier PVDF-Membran) transferiert. Im nächsten Schritt wird die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Zur Detektion des nun an der Membran gebundenen Primärantikörpers wird ein enzymmarkierter Zweitantikörper eingesetzt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Western Blot-Technik zur Detektion von verschiedenen Proteinen eingesetzt. Der entsprechende Zweitantikörper war mit HRP gekoppelt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde der Entwickler LumiGlo verwendet, der durch die enzymatische Wirkung von HRP unter Austritt von Licht zersetzt wird. Diese Reaktion ließ sich auf einem Röntgenfilm als schwarzes Signal festhalten.

MATERIAL

BSA	Fa. Roth, Karlsruhe
GLYCEROL	Fa. Roth, Karlsruhe
HYPERFILM ECL	Fa. Amersham Pharm., Little Chalfont, UK
IMMOBILOM™-P (MEMBRAN)	Fa. Millipore, Bedford, Ma, USA
LUMIGLO (20X) REAGENT A	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PEROXIDE (20X) REAGENT B	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
MAGERMILCH	im Supermarkt erhältlich
METHANOL	Fa. Riedel-de Häen, Seelze
MINI TRANS BLOT CELL	Fa. BioRad, München
NACL	Fa. Merk, Darmstadt
POWER PAC 200	Fa. BioRad, München
TRIS	Fa. USB, Cleveland, OH, USA
TWEEN-20	Fa. BioRad, München

ANTIKÖRPER UND VERDÜNNUNGEN

AKT	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
ANTI-MOUSE IGG	(1:3000)	Fa. Amersham Pharm., Little Chalfont, UK
ANTI-RABBIT IGG	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
β-ACTIN	(1:1000)	Fa. Sigma, Taufkirchen
CASPASE-8	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
CASPASE-9	(1:3000)	Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden
CLEAVED CASPASE-8	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
CLEAVED CASPASE-9	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
ERK1/2	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
IκB-α	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
JNK	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
NF-κB	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main

P38	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-AKT (SER473)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-AKT-(THR308)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-ERK1/2 (THR202/TYR204)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-JNK (THR183/TYR185)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-P38 (THR180/TYR182)	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-PKC (PAN)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-PKC α/β (THR638/641)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-PKC δ (THR505)	(1:3000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPHO-PTEN (SER380/THR382/383)	(1:5000)	Fa. Cell Signaling, Frankfurt/Main
PHOSPO-EGF-R	(1:3000)	Fa. Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
SP1	(1:1000)	Fa. Santa Cruz, Heidelberg

PUFFER UND LÖSUNGEN

BLOCKING-PUFFER:

5% BSA/ 10 g / 200 ml TBS-T
Milchpulver
bei 4°C lagern

TOWBIN:

25 mM Tris 12,11 g / 4 L
192 mM Glycin 57,65 g / 4 L
10% Methanol 400 ml / 4 L
pH 8,3 einstellen

10x TBS:

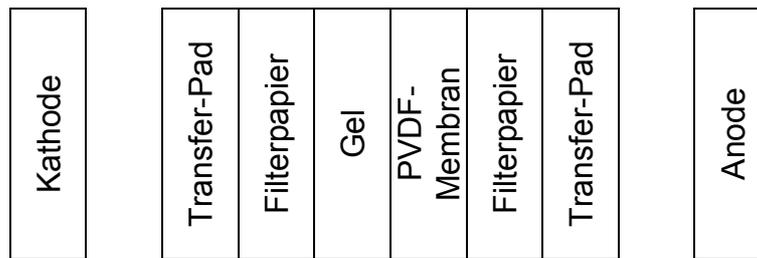
0,2 M Tris 24,2 g / 1 L
1,37 M NaCl 80 g / 1 L
pH 7,6 einstellen

TBS-T:

0,1% Tween 1 ml / 1 L 1x TBS

DURCHFÜHRUNG

Zur Vorbereitung des Western Blots wurden zunächst Membran und Filterpapier auf die ungefähre Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Methanol getränkt und anschließend in eine Wanne mit Towbin gelegt. Die Transfer-Pads wurden ebenfalls in Towbin inkubiert. Nachdem die Gelelektrophorese abgeschlossen war, wurde das Gel herausgenommen und ebenfalls in Towbin-Puffer gelegt. Ein sog. Transfer-Sandwich wurde dann nach folgender Abfolge zusammengefügt und in die Blotting-Vorrichtung eingesetzt:



Die Blotting-Kammer wurde mit Towbin aufgefüllt und es wurde eine Spannung von 50 V angelegt. Nach 45 min wurde dann die Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben, in eine Wanne gelegt und für 1 h mit Blocking-Puffer inkubiert. Danach wurde der Blocking-Puffer gegen die Erstantikörper-Verdünnung ausgetauscht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung abgekippt und die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper, danach wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Entwicklung der Proteinbanden wurde die Membran dann für 1-2 min mit LumiGlo inkubiert. Nach Entfernen des Entwicklers konnte die Membran auf einem Röntgenfilm exponiert und dieser anschließend entwickelt werden.

2.14. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.14.1. ISOLIERUNG NUKLEÄRER EXTRAKTE

Mit der Methode von Dignam et al. (1983) ist es möglich zytosolische, sowie die für den EMSA benötigten nukleären Proteinextrakte nacheinander zu isolieren. Durch den Einsatz des Detergenz Triton-x im Puffer A wird zunächst die Zellmembran lysiert, um die zytosolische Fraktion zu gewinnen. Die weitere Behandlung des Pellets mit dem sog. Puffer C führt zur Lyse der Zellkerne.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die nukleären Extrakte zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivität im EMSA, sowie zum Translokationsnachweis in den Zellkern mit Hilfe der Western Blot-Analyse, eingesetzt. Die zytosolischen Proteinextrakte wurden gegen I κ B geblottet.

MATERIAL

GLYCEROL	Fa. Roth, Karlsruhe
CELLSCRAPER	Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz
COMPLETE MINI PROTEASE INHIBITOR TABLETTE	Fa. Roche, Mannheim
PBS	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Fa. AppliChem, Darmstadt
MgCl ₂	Fa. Merck, Darmstadt
KCL	Fa. Merck, Darmstadt
NACL	Fa. Riedelde Häen, Seelze
EDTA (0,5 M; PH 8)	Fa. Gibco, Karlsruhe

PUFFER UND LÖSUNGEN

PUFFER A :

10 mM Hepes	0,5 ml (1 M) / 50 ml
1,5 mM MgCl ₂	75 ml (1 M) / 50 ml
10 mM KCl	0,5 ml (1 M) / 50 ml

bei 4°C lagern

+1 Inhibitortablette / 10 ml Puffer A
2 Wochen haltbar

PUFFER A + :

0,1% Triton-x	10 µl 10% / 1 ml Puffer A
---------------	---------------------------

Zugabe kurz vor Gebrauch

PUFFER C :

20 mM Hepes	1 ml (1 M) / 50 ml
25% Glycerol	12,5 ml / 50 ml
420 mM NaCl	4,2 ml (5 M) / 50 ml
1,5 mM MgCl ₂	75 µl (1 M) / 50 ml
0,2 mM EDTA	20 µl (0,5 M) / 50 ml

bei 4°C lagern

DURCHFÜHRUNG

Für diesen Versuch wurden die Zellen in 6-Well-Multischalen ausgesät und wie beschrieben mit Curcumin und Licht behandelt. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Zellen auf Eis überführt und alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Der Zellmonolayer wurde zunächst mit 1 ml PBS und dann mit 500 µl Puffer A gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Puffer A+ und eine 10-minütige Inkubation auf der Wippe. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 g, 4°C) konnte der zytosolische Proteinextrakt als Überstand gewonnen werden. Anschließend wurden die Pellets in 50 µl Puffer C resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 18000 g für 10 min und 4°C wurde der, die nukleären Proteine enthaltende

Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Beide Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.14.2. EMSA

Mit Hilfe dieser Methode können Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA, in der Regel zwischen Transkriptionsfaktoren und Promotorsequenzen, untersucht werden. Um das Maß der Bindungsaktivität sichtbar zu machen, werden doppelsträngige Oligonukleotide, die die spezifische Bindestelle enthalten, radioaktiv markiert. Nachdem der Transkriptionsfaktor an diese Oligonukleotide bindet, werden die Protein/Oligonukleotidkomplexe und freien Oligonukleotide in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wandert der Komplex langsamer als ungebundene DNA, was einen „shift“ des Radioaktivitätssignals zur Folge hat. Die Stärke dieses „geshifteten“ Signals ist dabei proportional zur DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors. Ein sog. Supershift wird durch den Einsatz von Antikörpern erzielt, die gebundenes Protein erkennen.

MATERIAL

ACRYLAMID 4K-LÖSUNG (40%)	Fa. AppliChem, Darmstadt
APS	Fa. Roth, Karlsruhe
BIO MAX MR FILM KODAL	Fa. Sigma, Taufkirchen
BSA	Fa. Roth, Karlsruhe
DTT (DITHIOTHREITOL)	Fa. Sigma, Taufkirchen
EDTA (0,5 M; PH 8)	Fa. Gibco, Karlsruhe
GEL DRYER MODEL 583	Fa. Biorad, München
GEL ELECTROPHORESIS APPARATUS V15.17	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
GLASPLATTEN, SPACER, KLAMMERN, KAMM	Fa. Biorad, München
GLYCEROL	Fa. Roth, Karlsruhe
KCL	Fa. Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Fa. Merck, Darmstadt
NF-KB-ANTIKÖRPER	Fa. Santa Cruz, Heidelberg
NF-KB DS-OLIGUNKLOTID	Fa. Biospring, Braunschweig
POLY DI:DC	Fa. Amersham Pharm., Little Chalfont, UK
POWER PAC 1000	Fa. BioRad, München
TEMED	Fa. Merck, Darmstadt
TRIS-GLYCIN-PUFFER (10X)	Fa. AppliChem, Darmstadt
WHATMANN PAPER 3MM	Fa. Merck, Darmstadt

Bindungsreaktion:		
nukleäre Proteine	8 µg	
³² P-markierte Sonde	10 ⁵ cpm	
BSA (5 µg/µl)	1 µl	
Poly dI-dC (2 µg/µl)	1 µl	
(optimal: Antikörper	1 µl)	Supershift
(optimal: kalte Sonde	5 µl)	Kompetitionsassay
4x Binding Buffer	5 µl	
Aqua ad injectabilia	ad. 20 µl	

Die Bindungsreaktion von DNA und Protein erfolgte in einem Volumen von 20 µl (siehe oben) für 20-30 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde z.T. ergänzt durch die Zugabe von spezifischem NF-κB-Antikörper oder kalter (unmarkierter) Sonde. Anschließend wurden die Proben auf dem Polyamidacrylgel bei 120 V und 4°C für 2,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde auf Whatmann 3MM Papier übertragen, getrocknet und auf einem Film exponiert.

2.15. Xenograft-Tumormodell

Beim Xenograft-Tumormodell, handelt es sich um immunsupprimierte NMRI-Nacktmäuse, denen A431-Xenografts subkutan (s.c.) in die Flanken injiziert werden.

2.15.1. NMRI-MÄUSE UND DEREN HALTUNGSBEDINGUNGEN

Bei den im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Tieren handelte es sich um immunodefiziente Nacktmäuse („Naval Medical Research Institute-nude/nude“, NMRI-nu/nu) aus Auszuchtstämmen. Es wurde ausschließlich mit weiblichen Tieren gearbeitet, da diese ein geringeres Aggressionspotenzial zeigen. Die Tiere wurden im Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht zwischen 20 und 22 g in die Versuche eingebracht. Die Haltung der Tiere erfolgte in Marcolon Typ 3-Käfigen, welche mit Filterhauben versehen waren, um das Infektionsrisiko der immunsupprimierten Tiere zu reduzieren. Zweimal

pro Woche wurden Futter, Wasser und Streu im Käfig gewechselt. Futter und Wasser erhielten die Mäuse ad libitum.

2.15.2. TUMORIMPLANTATION UND -MESSUNG

A431 Zellen wurden, wie in Kap. 2.1.8. beschrieben, aus Kulturflaschen mittels Trypsinbehandlung abgelöst und anschließend in PBS suspendiert, so dass die Zelldichte $5 \times 10^6/200 \mu\text{l}$ betrug. Diese Menge wurde einer Maus nach Inhalationsbetäubung mit Isofluran in die Flanke s.c. injiziert. Ca. 10-14 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die wachsenden Tumore unter der Haut sichtbar und ließen sich mit einem Lineal vermessen. Das Tumolvolumen wurde aus den Werten a (Länge) und b (Breite) mit folgender Formel berechnet:

$$V = \pi/6 \times a \times b^2$$

Dabei wurde der kleinere Wert als Breite (b) aber auch als Wert der Tiefe verwendet. Die Tumorgrößenbestimmung erfolgte zweimal pro Woche, wobei die Tiere mit Isofluran betäubt wurden.

2.15.3. BEHANDLUNG DER TIERE

MATERIAL

CURCUMIN
METHYLCELLULOSE
TAGESLICHTRÖHREN

Fa. Sigma, Taufkirchen
Fa. Sigma, Taufkirchen
Fa. Philips GmbH, Hamburg

LÖSUNGEN

CURCUMIN-LÖSUNG:

Gebrauchsverdünnung ca. 2,5 mg/ml 5 mg/50 μl Ethanol
+ 2 ml 1% Methylcellulose tröpfchenweise
beim Vortexen zupipetieren

DURCHFÜHRUNG

Die Mäuse wurden nach Injektion der Tumorzellen zufällig in vier Gruppen von 6 Tieren eingeteilt. Am gleichen Tag wurde auch mit der Behandlung der Tiere gestartet. Die Tiere wurden zweimal täglich wie folgt behandelt:

	Curcumin	Bestrahlung
Gruppe 1	-	-
Gruppe 2	-	+
Gruppe 3	+	-
Gruppe 4	+	+

Bei der Curcuminbehandlung handelte es sich um eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 200 µl der Curcuminlösung, was einer injizierten Curcuminmenge von 500 µg/Behandlung entsprach. Die Kontrollgruppen (Gruppe 1 und 2) wurden mit der gleichen Menge des Lösungsmittels Methylcellulose gespritzt, um alle Tiere den gleichen Stressbedingungen auszusetzen. Die Bestrahlung der Tiere erfolgte direkt nach der Injektion für 20 min mit Tageslichtröhren (Lichtintensität wie in Kap. 2.4. beschrieben). Nicht bestrahlte Tiere wurden nach der Injektion mit einem Tuch für ca. eine Stunde abgedunkelt. Die Tumormessung erfolgte wie oben beschrieben regelmäßig während des Tumorwachstums. Am Ende des Versuchs, nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von ca. 120 mm³, wurden die Tiere ein letztes Mal behandelt und die Tumore nach 0,5, 1; oder 24 h gewonnen. Dazu wurden die Tiere, wie im folgenden Kapitel (2.15.4.) beschrieben, getötet. Die Tumore wurden herausgeschnitten, halbiert und von Haut und nekrotischem Gewebe befreit. Eine Hälfte wurde für immunhistologische Untersuchungen fixiert, die andere Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnte so für Western Blot-Analysen weiter verarbeitet werden.

2.15.4. TÖTUNG DER TIERE

Nach Beendigung der experimentellen Tierversuche sind die Versuchstiere entsprechend § 9 Abs. 2.8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG), „unverzüglich schmerzlos zu töten“. Die Tötung der mit Isoflouran anästhesierten Nacktmäuse

erfolgte ausschließlich durch cervikale Dislokation, wobei den Tieren eine geschlossene Schere bzw. ein anderer fester länglicher Gegenstand in den Nacken gelegt und das Tier dadurch fixiert wurde. Anschließend wurde die Wirbelsäule des Tieres durch das Ziehen des Schwanzes überdehnt und das Tier dadurch getötet.

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche an lebenden Wirbeltieren wurden gemäß §8 des TierSchG (Fassung vom 25. Mai 1998) durch die zuständige Aufsichtsbehörde (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt: Genehmigungsnummern F79/34.

2.16. SONSTIGE GERÄTE, MATERIALIEN UND TESTS

AQUA AD INIECTABILIA	Fa. Braun, Melsungen
CENTRIFUGE 5417R	Fa. Eppendorf, Hamburg
DC PROTEIN ASSAY	Fa. BioRad, München
EINMALPIPETTEN(5/10/25 ML)	Fa. Corning, Wiesbaden
REAKTIONSGEFÄßE (1,5/2 ML)	Fa. Eppendorf, Hamburg
GLASPIPETTEN	Fa. Brandt, Wertheim
MINIFUGE GL	Fa. Heraeus, Hanau
MULTIPETTE	Fa. Eppendorf, Hamburg
PASTEURPIPETTEN	Fa. Brandt, Wertheim
PIPETTEN (0,5-1000 µL)	Fa. Eppendorf, Hamburg
ZENTRIFUGATIONSGEFÄßE (15/50 ML)	Fa. Starstedt, Nürtingen
PIPETTENSPIZEN (0,5-1000 µL)	Fa. Sarstedt, Nürtingen
PBS OHNE Ca^{2+} UND Mg^{2+} (PBS)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
PBS MIT Ca^{2+} UND Mg^{2+} (PBS ⁺⁺)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
PASTEURPIPETTEN	Fa. Brandt, Wertheim
MULTIPETTENSPIZEN (COMBITIPS)	Fa. Eppendorf, Hamburg
MIKROSCHRAUBRÖHRCHEN (1,5/2 ML)	Fa. Sarstedt, Nürtingen
MEHRKANALPIPETTE	Fa. Eppendorf, Hamburg
ETHANOL 70%	Fa. Riedel de Häen, Seelze
BIOFUGE FRESCO	Fa. Heraeus, Hanau
AXIOVERT, MIKROSKOP	Fa. Zeiss, Oberkochen

3. ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil ist in sechs Kapitel gegliedert, wobei die Ergebnisse nicht strikt chronologisch, sondern nach ihrer thematischen Zuordnung aufgeführt sind. Nachdem zunächst auf grundlegende Fragen, wie die Verteilung von Curcumin in der Zelle, verschiedene Optimierungsversuche sowie die Klärung zur Bildung freier Radikale eingegangen wird, wird dann die Wirkung von Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht auf die Signaltransduktion vorgestellt. Wie schon beschrieben sind hier die Apoptose sowie verschiedene proliferationsassoziierte Targets von besonderem Interesse. Da die Behandlung mit sichtbarem Licht zu einem späteren Zeitpunkt der Doktorarbeit eingeführt wurde, sind bei diesen Arbeiten einige wichtige Versuche exemplarisch mit dieser Bestrahlungsart wiederholt worden. Das letzte Kapitel beschreibt die *in vivo*-Ergebnisse der Wirkung von Curcumin in Zusammenarbeit mit Licht im Xenograft-Tumormodell

3.1. ZELLULÄRE AUFNAHME UND VERTEILUNG VON CURCUMIN

Zunächst war es interessant zu beobachten, in welchem Zeitraum Curcumin in die Zelle aufgenommen wird und wie es sich dort verteilt. Dabei konnte die Eigenschaft der Eigenfluoreszenz des Curcumins methodisch gut genutzt werden.

3.1.1. CURCUMINAUFNAHME IN DIE ZELLE

Zur Erstellung einer Aufnahmekinetik von Curcumin wurde die Methode nach Dahl et al. (1994; s. Kap. 2.2.) angewandt. Bei diesem Versuch wurden HaCaT-

Zellen mit 5 µg/ml Curcumin zwischen 0 und 6 h inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde das Curcumin extrahiert und die Menge quantifiziert.

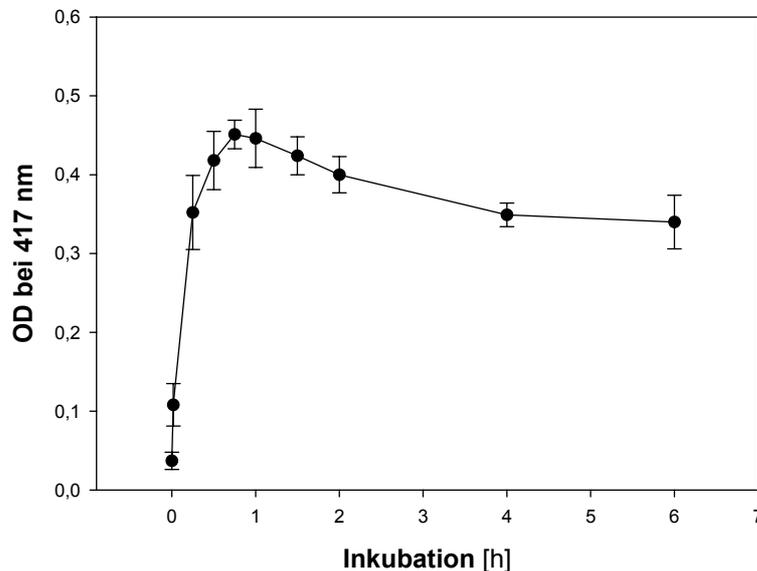


Abb. 3.1.1: AUFNAHMEKINETIK VON CURCUMIN: HaCaT-Zellen wurden mit Curcumin 0-6 h inkubiert. Dargestellt ist die OD der methanolischen Zellextrakte. Jeder Wert zeigt den Mittelwert eines 3-fachen Ansatzes mit Standardabweichung.

In Abb. 3.1.1 ist zu erkennen, dass Curcumin in kürzester Zeit in die Zelle eindringt, bereits nach 15 min sind signifikante Mengen innerhalb der Zelle zu finden. Die Aufnahmekurve zeigt nach 45-60 min eine maximale zelluläre Curcuminmenge an. Danach erfolgt eine leichte und langsame Abnahme; zwischen 2 und 6 h waren nach wie vor hohe Mengen nachweisbar.

3.1.2. CURCUMINVERTEILUNG IN DER ZELLE

Nachdem gezeigt wurde, dass Curcumin schnell in die Zelle aufgenommen wird, war es interessant zu beobachten wie es sich in der Zelle verteilt. Hierzu wurde Fluoreszenzmikroskopie am CLSM durchgeführt und es wurden Bildserien aufgenommen. Curcumin wurde zu vitalen, adhären Zellen pipettiert und bei entsprechender Anregungswellenlänge (ca. 420 nm) und einer 63-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Innerhalb von Sekunden war die Fluoreszenz in der Zelle zu erkennen. Auffällig war zunächst,

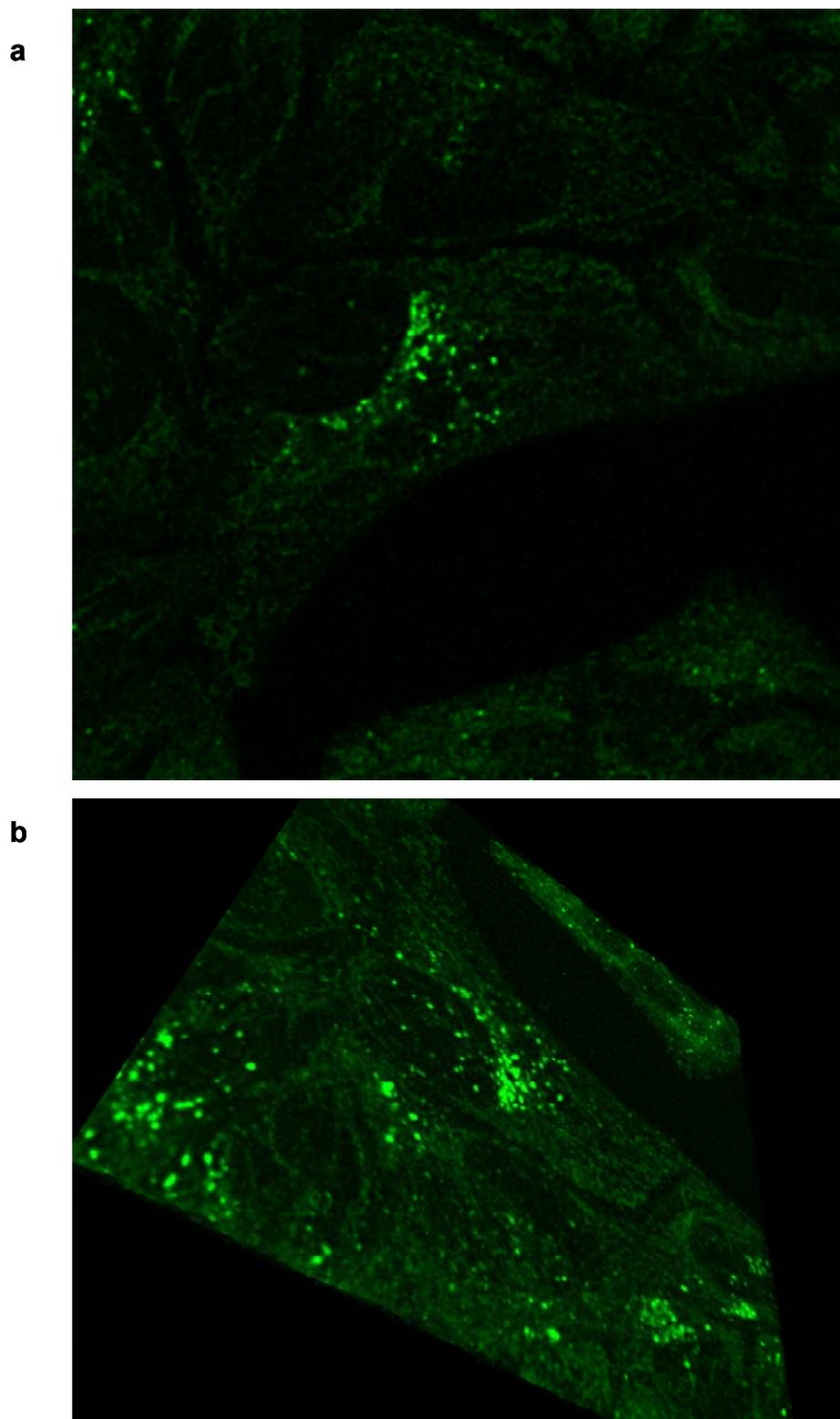


Abb. 3.1.2: ZELLULÄRE VERTEILUNG VON CURCUMIN: HaCaT-Zellen wurden mit Curcumin inkubiert. Dargestellt ist die zelluläre Verteilung am CLSM mit einer 63-fachen Vergrößerung in (a) einem einfachen 2D-Bild und (b) einem dekonvolierten 3D-Bild.

dass der Zellkern von dieser Fluoreszenz ausgespart blieb. Dies legt die Annahme nahe, dass das Curcumin oder fluoreszierende Metabolite nicht mit der DNA interagiert. Bei der Verteilung war zudem besonders auffällig, dass die Fluoreszenz vesikelartig und nicht diffus vorlag. Die fluoreszierenden Vesikel zeigten zudem eine perlenkettenartige Anordnung, welche vermuten lässt, dass die Substanz sich in Organellen ansammelt. Dafür kommen Organellen wie Endosomen oder Lysosomen aber auch das Endoplasmatische Reticulum (ER) in Frage.

3.1.3. FLUORESZENZSPEKTRUM VON CURCUMIN IN DER ZELLE

Es ist bekannt, dass Lösungsmittel einen starken Einfluss auf spektrale und photochemische Eigenschaften von Curcumin haben. So sind insbesondere die Emissionsmaxima von Curcumin in beispielsweise Acetonitril (524 nm) oder Ethanol (549 nm) sehr unterschiedlich (Chignell et al., 1994). Bei den Untersuchungen am CLSM war es möglich, die Emissionsintensität von Curcumin in der Zelle bei verschiedenen Wellenlängen zu quantifizieren, um so möglicherweise die Umgebung des Curcumin genauer bestimmen zu können. Hierzu wurde an den mikroskopierten, mit Curcumin versetzten HaCaT-Zellen, ein Fluoreszenzspektrum von 470–600 nm bei gleich bleibender Anregung von ca. 420 nm erstellt (s. Abb. 3.3.3 a). Zu beobachten war eine starke Fluoreszenzverschiebung mit einem Maximum bei 494 nm, wie sie bei einer Bindung von Curcumin an Proteine auftritt, wie von Barik et al. (2003) beschrieben wurde. In dieser Studie wurde das Bindeverhalten von Curcumin mit Rinderserum (BSA, „bovine serum albumin“) näher untersucht. Um die relevanten Ergebnisse hier zu veranschaulichen, wurde das Fluoreszenzspektrum von Curcumin und BSA alleine und zusammen gemessen (s. Abb. 3.3.3 b). Die Fluoreszenz des Gemisches von BSA und Curcumin war so stark, dass es 1:4 verdünnt werden musste, um es mit den beiden anderen Spektren abbilden zu können. Die dabei erhaltene Fluoreszenzverschiebung entspricht der in der Zelle gezeigten und lässt vermuten, dass Curcumin in der Zelle an Proteine gebunden ist (Barik et al., 2003). Darüber hinaus ist bei dem Gemisch von BSA und Curcumin eine enorme Zunahme der

Fluoreszenzintensität zu erkennen, was dadurch zu erklären ist, dass Curcumin in gebundener Form starrer ist und besser fluoreszieren kann.

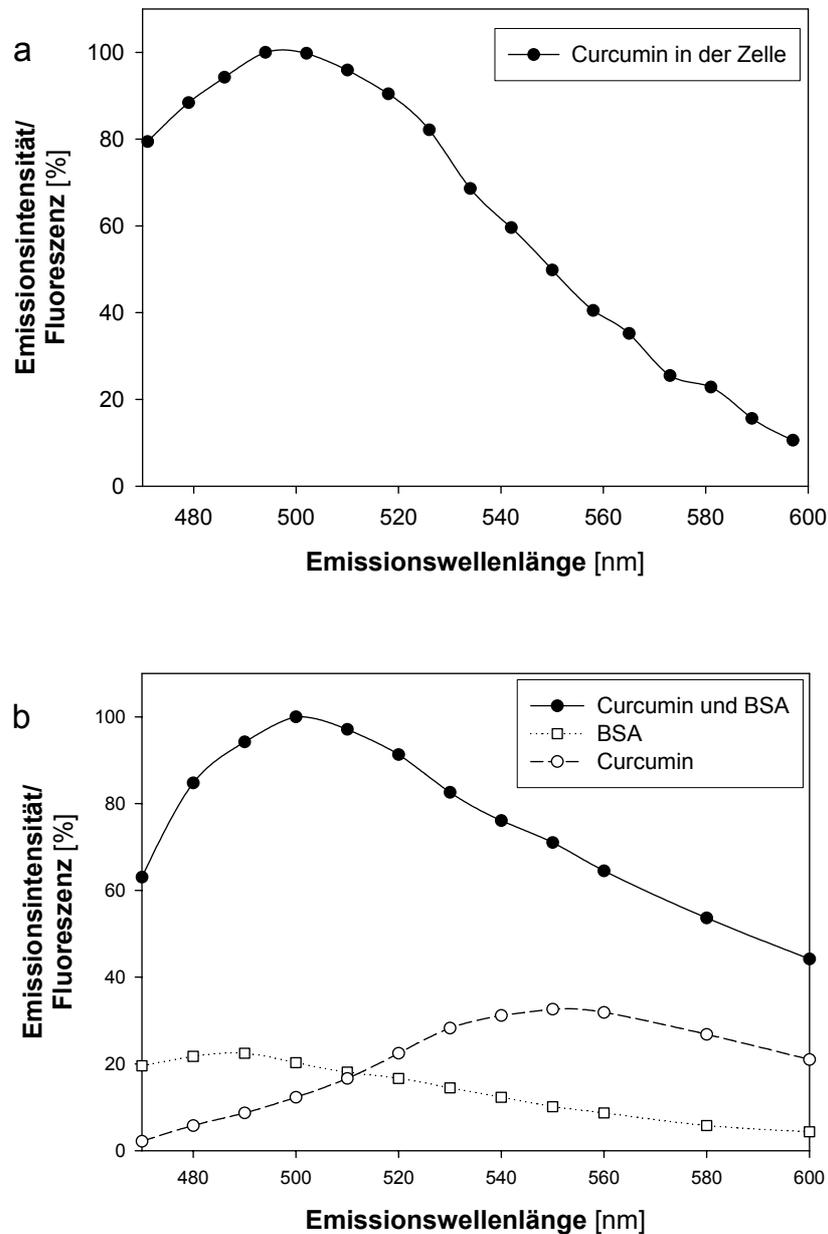


Abb. 3.1.3: FLUORESZENZSPEKTRUM: von (a) Curcumin in der Zelle; (bestimmt am CLSM) und (b) Curcumin (○), BSA (□) oder Curcumin und BSA zusammen (●). Dargestellt ist das Fluoreszenzspektrum von 470-600 nm bei einer Anregung von ca. 420 nm. Die Maxima wurden auf 100% gesetzt.

3.2. DIE WIRKUNG VON CURCUMIN UND LICHT AUF DIE ZELLPROLIFERATION VON KERATINOZYTEN

Wie im Einleitungsteil beschrieben wurden die ersten Arbeiten in unserem Labor nicht mit reinem Curcumin, sondern einem Extrakt der *Curcuma longa* Pflanze, dem ZCL-Extrakt (Fa. A.S.A.C.) durchgeführt. Am Anfang der Studie stand die Erkenntnis, dass der Extrakt zusammen mit UVA-Licht die Zellproliferation in Keratinozyten hemmt. Im folgenden Kapitel wurden diese Ergebnisse aufgegriffen, um sie mit weiteren Studien mit Curcumin und sichtbarem Licht zu vergleichen. Desweiteren wird die Optimierung der Behandlung durch Untersuchung verschiedener Behandlungsvarianten vorgestellt. Bei allen Versuchen wurde der BrdU-ELISA, zur Bestimmung der Zellproliferation angewandt.

3.2.1. CURCUMIN IM VERGLEICH ZUM EXTRAKT ZCL

Wie oben angedeutet konnte in anfänglichen Studien gezeigt werden, dass eine einstündige Inkubation mit dem Extrakt ZCL und eine anschließende Bestrahlung mit UVA in Anwesenheit des Extrakts zur Proliferationshemmung führen (Abb. 3.2.1). Bei diesen Versuchen wurden HaCaT sowie primäre Keratinozyten mit 2-10 µg/ml ZCL und 1 J/cm² UVA behandelt. Die Behandlung mit ZCL in diesen Konzentrationen zeigte ohne zusätzliche Bestrahlung keine Wirkung.

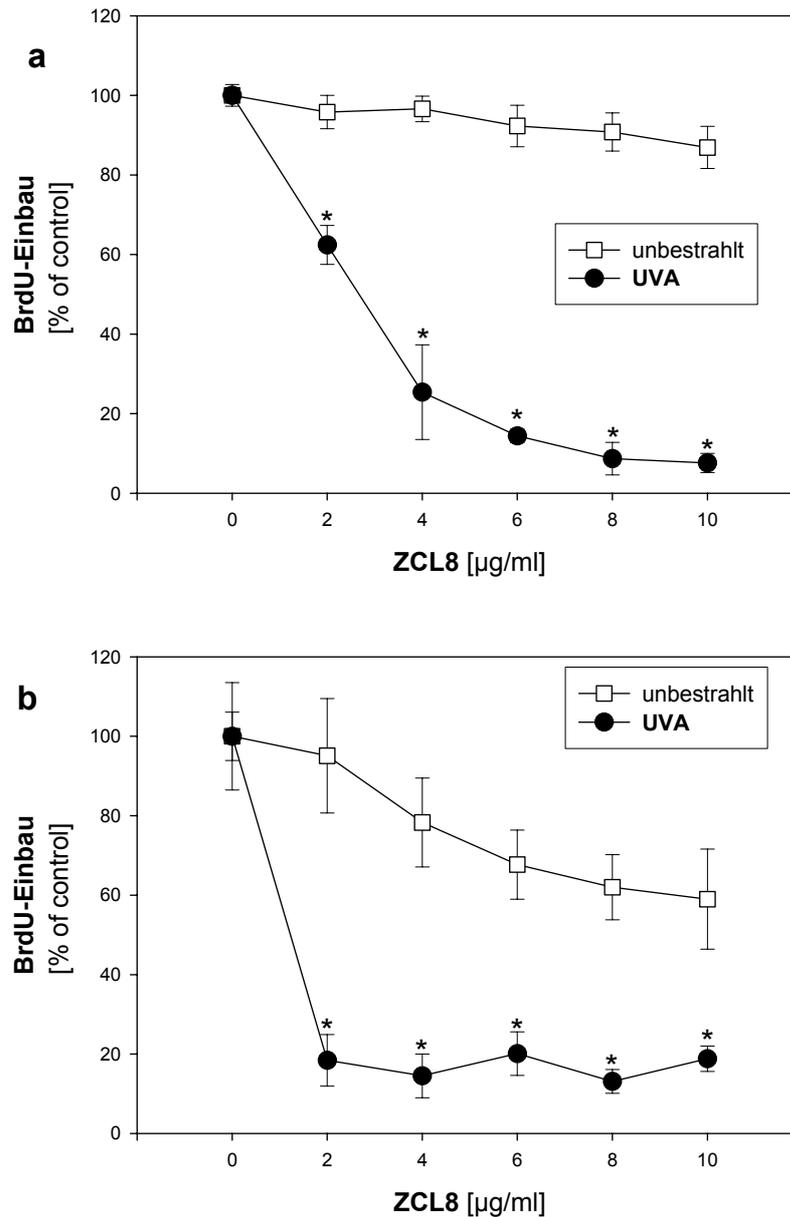


Abb. 3.2.1: PROLIFERATIONSRATE NACH ZCL/UVA-BEHANDLUNG: (a) HaCaT-Zellen sowie (b) primäre Keratinozyten wurden mit ZCL und 1 J/cm^2 UVA (●) behandelt oder unbestrahlt (□) belassen. Dargestellt ist der BrdU-Einbau nach ca. 24 h, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

Der verwendete Extrakt enthält 10% der biologisch aktiven Curcuminoiden, auf die die gezeigte Wirkung möglicherweise zurückzuführen ist. Um diese Annahme zu untermauern, wurden die gleichen Versuche mit Curcumin durchgeführt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,2-1 $\mu\text{g/ml}$ Curcumin eingesetzt, um die im Extrakt enthaltene Curcuminoidmenge von 10% zu erhalten. HaCaT sowie primäre Keratinozyten wurden eine Stunde mit

Curcumin inkubiert und in Anwesenheit von Curcumin wie in Kap. 2.5. beschrieben mit UVA bestrahlt.

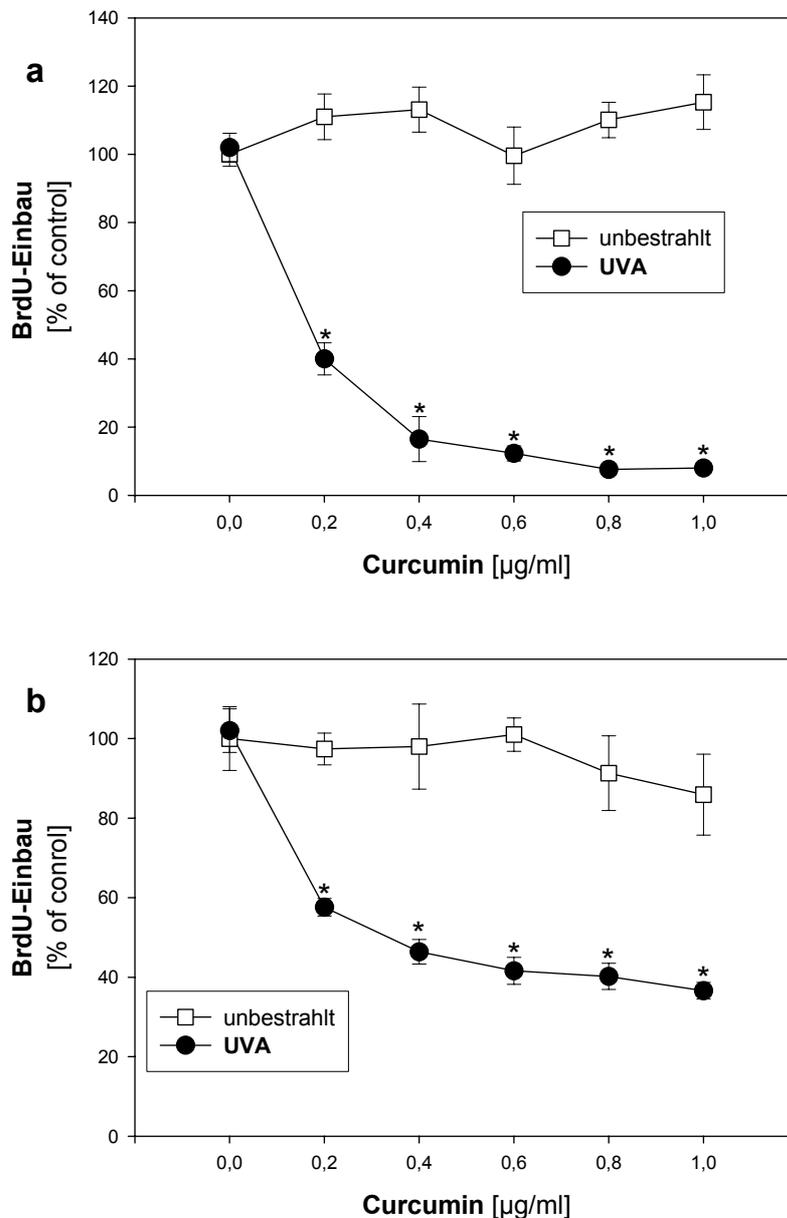


Abb. 3.2.2: PROLIFERATIONSRATE NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: (a) HaCaT-Zellen sowie (b) primäre Kerationozyten wurden Curcumin und 1 J/cm^2 UVA (●) behandelt oder unbestrahlt (□) belassen. Dargestellt ist der BrdU-Einbau nach ca. 24 h, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigten (Abb. 3.2.2) ebenso wie die mit dem Extrakt durchgeführten Versuche, dass nur ein Effekt erreicht wird, wenn eine zusätzliche UVA-Bestrahlung erfolgt. Mengen von 2-10 $\mu\text{g/ml}$ ZCL oder 0,2-1 $\mu\text{g/ml}$ Curcumin alleine induzieren keine Proliferationshemmung. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit 1 J/cm^2 UVA wurde eine ZCL-, Curcumin-

konzentrationsabhängige Proliferationshemmung beobachtet. Dabei wurde ein BrdU-Einbau von bis zu 8% bei HaCaT-Zellen und 20% bei primären Kerationzyten im Vergleich zur Kontrolle (100%) gemessen. Dieser Unterschied hier ist auf die Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Zellen zurückzuführen. Primäre Kulturen wachsen in der Regel langsamer als Zelllinien. So bot die Kontrolle der primären Kerationzyten einen geringeren BrdU-Einbau als Bezugswert zur gezeigten Hemmung. Die Ergebnisse zeigten auch in Hinsicht auf die angepassten Konzentrationen, dass Curcumin/Curcuminoide möglicherweise ausschließlich auf den Effekt bei der Behandlung mit dem Extrakt zurückzuführen ist. In den weiteren Versuchen wurde die Reinsubstanz verwendet.

3.2.2. CURCUMIN IN ZUSAMMENWIRKUNG MIT SICHTBAREM LICHT

Curcumin besitzt ein Anregungsmaximum von 420 nm in wässriger Lösung. Unter der nahe liegenden Annahme, dass die gezeigte Photoaktivierbarkeit des Curcumin mit der Anregung der Substanz zusammenhängt, wurde anstatt der Bestrahlung mit UVA (315-400 nm), eine Bestrahlung mit sichtbarem Licht durchgeführt, da dessen Spektrum (380-780 nm) das Anregungsmaximum von Curcumin abdeckt. Hierzu wurden HaCaT sowie primäre Keratinozyten mit Curcumin (0,2-1 µg/ml) vorinkubiert und in Anwesenheit von Curcumin 5 min mit sichtbarem Licht (5500 lx, Abstand 45 cm) bestrahlt. Die Ergebnisse der Zellproliferation (Abb. 3.2.3) zeigten nahezu den gleichen Effekt, wie bei der Bestrahlung mit UVA. Weitere Untersuchungen mit längerer Bestrahlungsdauer (15–30 min) ergaben keinen zusätzlichen oder stärkeren Effekt (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die Proliferationshemmung ähnlich stark wie bei der UVA-Bestrahlung war, wurde die Bestrahlungsdauer von 5 min für alle weiteren Versuche eingesetzt.

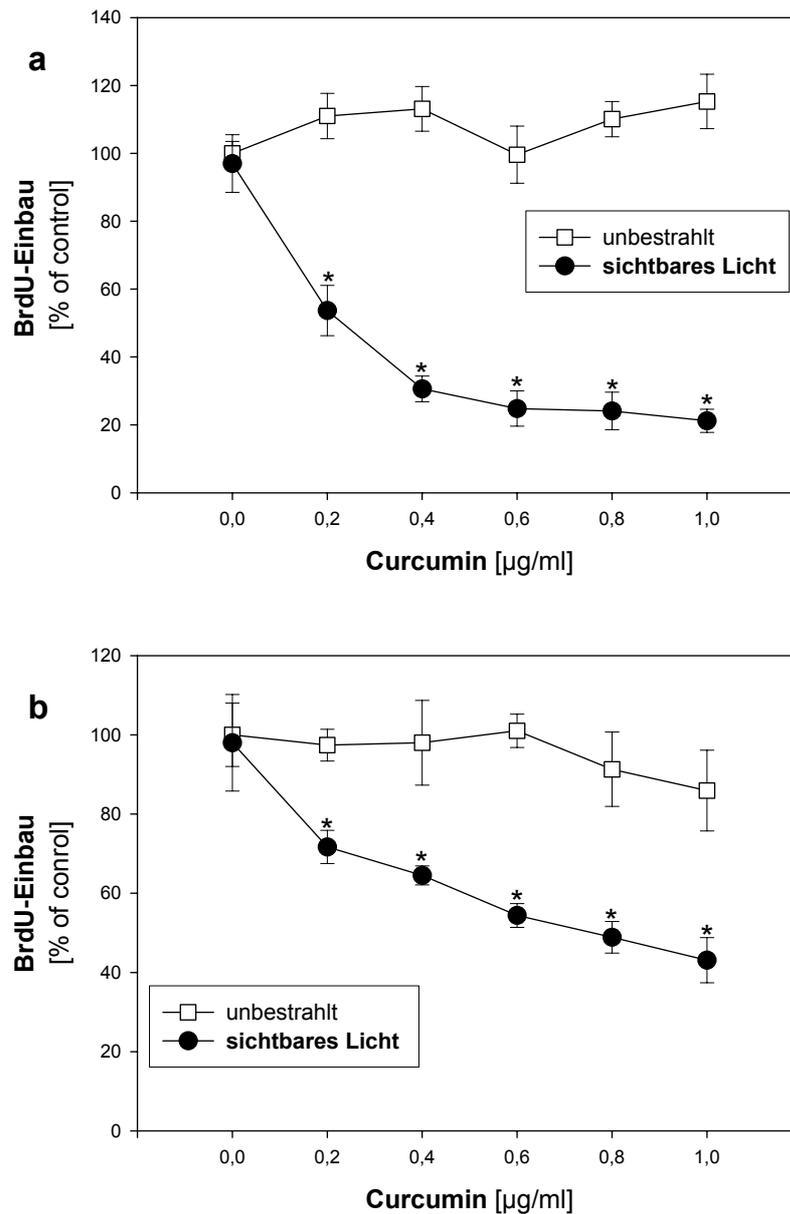


Abb. 3.2.3: PROLIFERATIONSRATE NACH CURCUMIN/SICHTBARES LICHT-BEHANDLUNG: (a) HaCaT-Zellen sowie (b) primäre Kerationozyten wurden Curcumin und sichtbarem Licht (●) behandelt oder unbestrahlt (□) belassen. Dargestellt ist der BrdU-Einbau nach ca. 24 h, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

Eine weitere Bestrahlungsart, und zwar die mit UVB bis zu 200 mJ/cm^2 , wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Curcumin getestet. Dabei zeigte sich kein Effekt auf die BrdU-Einbaurrate (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies bestätigt die Theorie, dass die Bestrahlung im Wellenbereich des Anregungsspektrums von Curcumin erfolgen muss, um es zu aktivieren. Die Wellenlänge von UVB ist mit 280–315 nm hierfür zu kurz.

3.2.3. BEHANDLUNGSVARIANTEN

Es wurde gezeigt, dass Curcumin und Licht zur Proliferationshemmung der Keratinozyten führen. In diesen Experimenten wurden die Zellen wie auch im Kap. 2.3 beschrieben eine Stunde mit Curcumin vorinkubiert und in Anwesenheit von Curcumin bestrahlt. In vorwegnehmender Weise wurde die als optimal gefundene Behandlung durchgeführt. Im folgenden Kapitel soll nun nachträglich die Optimierung der Behandlung gezeigt werden. HaCaT-Keratinozyten wurden in 7 Ansätzen wie in Tab. 3.1 aufgelistet behandelt. Die Vorinkubation fand 1 h mit, in Medium verdünntem, Curcumin (0,5 und 1 µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ statt. Bei der Bestrahlung mit 1 J/cm² UVA in Anwesenheit von Curcumin, wurde in PBS angesetztes Curcumin verwendet. Bei der Nachinkubation wurden die Zellen in der Curcumin/Mediumlösung unter den üblichen Kultivierungsbedingungen über Nacht gehalten. Am nächsten Tag erfolgte die Durchführung des BrdU-ELISAs. In Abb. 3.2.4 ist die Auswertung aller Variantenansätze zusammengefasst, wobei sich die Werte auf die unbehandelte, auf 100% gesetzte, Kontrolle (selbst nicht gezeigt) des jeweiligen Ansatzes beziehen. Die Nummerierung der Varianten in der Tabelle findet sich in der Legende der Abbildung wieder.

Im Ansatz 1 ist die Wirkung bei alleiniger Vorinkubation, also einer einstündigen Curcuminbehandlung, dargestellt. Es zeigte sich mit Werten von 96,9% und 90,8% keine deutliche Proliferationshemmung. Diese Behandlung entspricht, der schon vorher gezeigten (Abb. 3.2.2, weiße Quadrate) Curcumin-behandelten aber unbestrahlten Reihe. Dieser Ansatz verdeutlicht nochmals, dass Curcumin in den von uns verwendeten geringen Mengen nur einen Effekt bei zusätzlicher Bestrahlung hat.

Ansatz	Curcumininkubationen		
	Vorinkubation (1 h)	während der Bestrahlung	Nachinkubation (24 h)
1	+	-	-
2	-	-	+
3	+	- B	-
4	-	+ B	-
5	-	+ B	+
6	+	+ B	-
7	+	+ B	+

TAB. 3.1: BEHANDLUNGSVARIANTEN MIT CURCUMIN UND UVA. (B=Bestrahlung wurde durchgeführt)

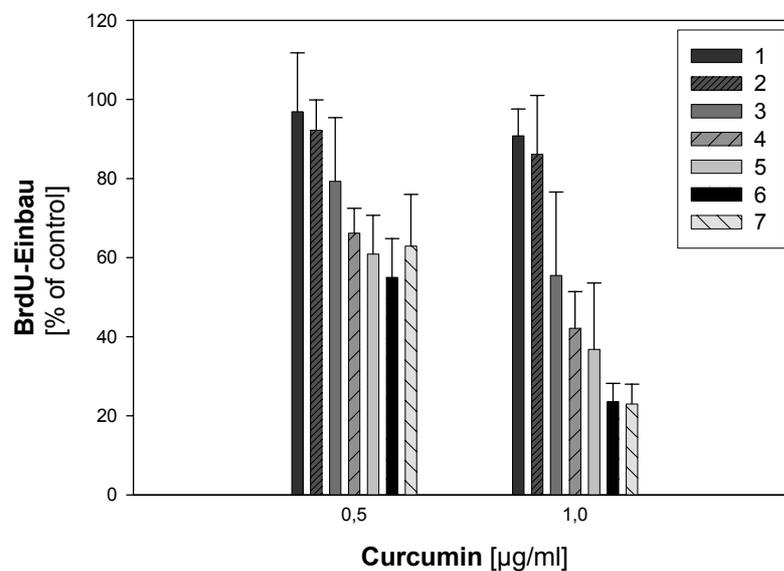


Abb. 3.2.4: PROLIFERATIONSRATE NACH VERSCHIEDENEN CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNGEN: HaCaT-Zellen wurden wie in Tab. 3.1 zusammengefasst mit Curcumin und UVA behandelt (Nummern in der Legende entsprechen dem Behandlungsansatz in der Tabelle). Dargestellt ist der BrdU-Einbau nach ca. 24 h, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde eine Curcumininkubation von 24 h durchgeführt. Der dazu entsprechende Ansatz 2 zeigte ebenfalls keine signifikante Proliferationshemmung. Als nächstes wurde getestet welchen Effekt eine Curcuminvorbehandlung mit anschließender Bestrahlung, jedoch ohne die Anwesenheit von Curcumin hat. Die im Ansatz 3 beobachteten Ergebnisse zeigten eine geringere BrdU-Einbaurrate von nämlich 55% bei 1 µg/ml, jedoch mit starken Standardabweichungen. Interessant war es weiter zu schauen, wie stark die Proliferationshemmung bei Bestrahlung in Anwesenheit von Curcumin ohne Vorinkubation ausfällt. Tatsächlich zeigte sich in Ansatz 4 eine noch

geringere Proliferation von nämlich 66,2% bzw. 42,1%. Eine zusätzliche anschließende Nachinkubation konnte den Effekt nicht verstärken (Ansatz 5). Wurden die Zellen nun vor der Bestrahlung (in Anwesenheit von Curcumin), mit Curcumin inkubiert (Ansatz 6) unter der Annahme, dass Curcumin erst in die Zelle aufgenommen werden muss, zeigte sich eine verstärkte Hemmung der Proliferation. Bei dieser Behandlung konnte der BrdU-Einbau mit der hohen Curcuminkonzentration (1 µg/ml) um ca. 77% reduziert werden. Eine anschließende Nachinkubation (Ansatz 7) zeigte keinen zusätzlichen Effekt.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Eine Curcuminwirkung in den verwendeten Konzentrationen wurde nur in Kombination mit zusätzlicher Bestrahlung erzielt und durch die Anwesenheit von Curcumin während der Bestrahlung verstärkt. Optimiert wird die Behandlung durch eine Vorinkubation von einer Stunde. Diese Zeit wurde in anfänglichen Untersuchungen in unserem Labor, vor Beginn meiner Arbeit, als optimal ermittelt und entspricht den Beobachtungen zur Aufnahmekinetik (Abb. 3.1.1). Eine zusätzliche Nachinkubation bringt keine weiteren Effekte mit sich, was bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Bestrahlung die für die Proliferationshemmung verantwortlichen Mechanismen in der Zelle induziert werden. So wurde der Ansatz 6 als die optimale Behandlung in den weiteren Versuchen angewandt.

Im Rahmen der Optimierung der Curcumin/Licht-Behandlung wurden nach den gewonnen Erkenntnissen nun weitere Varianten der Behandlung durchgeführt, um die Wirkungsweise des Curcumin noch besser verstehen zu können. Es erschien interessant zu untersuchen, ob der Effekt auf eine Photoinduzierbarkeit der Zelle selbst zurückzuführen ist. Dazu wurden die Zellen ohne jegliche Curcuminbehandlung wie üblich mit UVA bestrahlt und das Curcumin wurde im Anschluss zugegeben. Ein anderer Ansatz sollte zeigen, ob es ausreicht, wenn das Curcumin selbst zunächst bestrahlt wird und dann zu den Zellen gegeben wird. Beide Ansätze zeigten keinen Effekt auf den BrdU-Einbau (Ergebnisse nicht gezeigt). Letzterer Ansatz wurde insofern noch erweitert, dass, unter der Annahme, dass Zellbestandteile oder Proteine zur Curcumin/Licht-Induzierbarkeit notwendig sind, Curcumin zusammen mit Zelllysaten bestrahlt und auf adhärente intakte Zellen aufgetragen wurde. Die

Lyse der Zellen geschah hier mittels Ultraschall, um den Einsatz von Detergenzien zu vermeiden. Auch hier zeigte sich kein Effekt auf die Zellproliferation (Ergebnisse nicht gezeigt). Wie schon durch die Spektren des UVA und sichtbaren Lichts geschlussfolgert wurde, ist das Curcumin durch seine Anregbarkeit auch photoaktivierbar. Im Rahmen der Behandlungsvarianten sollte dies noch einmal untermauert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Stocklösung Curcumin über mehrere Tage dem üblichen Tageslicht ausgesetzt. Die Fluoreszenz wurde regelmäßig bei Anregung von 420 nm gemessen. Als die Lösung keine Emission mehr aufzeigte, wurde das Curcumin wie üblich (s. Ansatz 6) zur Zellbehandlung eingesetzt. Es zeigte sich, dass „ausgebleichtes“ Curcumin keinen Effekt auf die Proliferationshemmung mehr ausüben kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass für die Proliferationshemmung das fluoreszente Curcumin notwendig ist.

3.3. BILDUNG FREIER RADIKALE DURCH CURCUMIN IM VERGLEICH ZU PSORALEN

Die Fähigkeit des Curcumin in Zusammenarbeit mit UVA die Proliferation der Zellen zu hemmen, erinnert an die photosensibilisierende Eigenschaft des Psoralen. Psoralen wird gemeinsam mit UV-Licht ("Psoralen plus UVA", abgekürzt PUVA) als eine Form der photoaktivierten Chemotherapie zur Behandlung von Psoriasis (Wolff et al., 1975), Vitiligo, Mastozytose, Lichen ruber planus und anderen Erkrankungen verwendet (Adrian et al., 1981). Dabei werden phototoxische Eigenschaften, verursacht durch die Entstehung von freien Radikalen, in der Therapie genutzt. Um zu untersuchen, ob Curcumin in Zusammenarbeit mit UVA-Licht ebenfalls einen ähnlichen phototoxischen Effekt hat, wurde mittels DHR-123 untersucht, ob freie Radikale in Form von Superoxiden und Hydrogenperoxiden freigesetzt werden (siehe Kap. 2.7.). Bei der Behandlung von HaCaT-Zellen mit Curcumin (0,2-1 $\mu\text{g/ml}$) und 1 J/cm^2 UVA zeigte sich keine signifikante Änderung der Radikalentstehung in den behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.3.1).

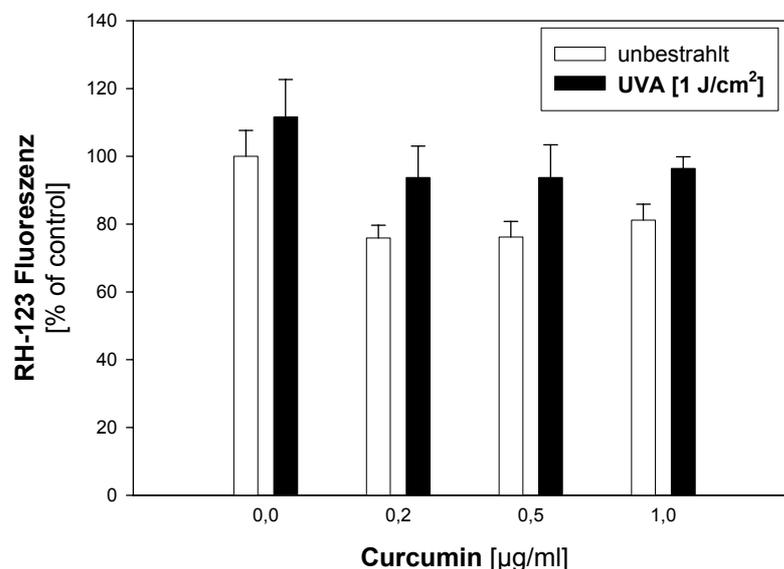


Abb. 3.3.1: FREIE RADIKALBILDUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Zellen wurden mit Curcumin und 1 J/cm^2 UVA (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Dargestellt ist die RH-123 Fluoreszenz nach 90 min, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde die Behandlung mit einer höheren UVA-Dosis von 20 J/cm² durchgeführt. Diese Untersuchungen belegten, dass Curcumin eine UVA-induzierte Radikalbildung sogar reduziert (Abb. 3.3.2 a).

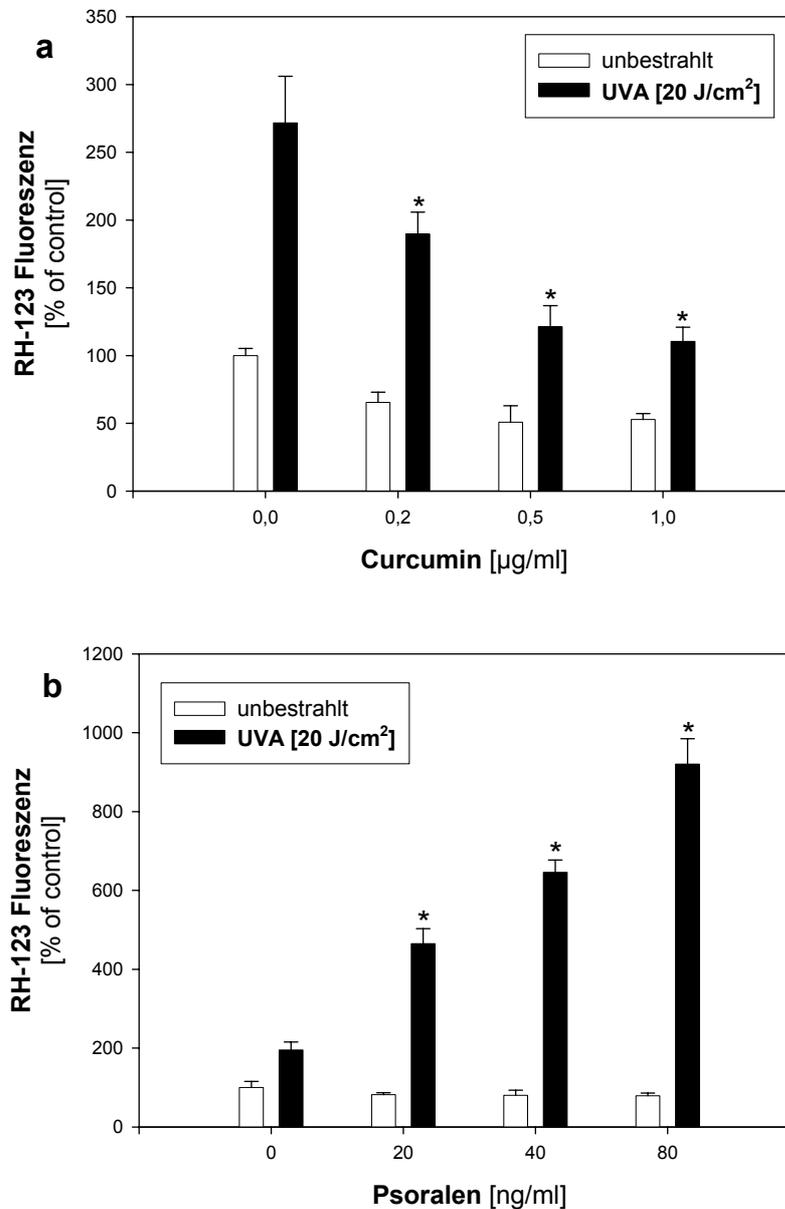


Abb. 3.3.2: FREIE RADIKALBILDUNG NACH CURCUMIN- ODER PSORALEN- UND UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Zellen wurden mit (a) Curcumin oder (b) Psoralen behandelt und 20 J/cm² UVA (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Dargestellt ist die RH-123 Fluoreszenz nach 90 min, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle.

Die Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA hatte eine um das 2,7-fach erhöhte Radikalfreisetzung zur Folge. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Curcumin, zeigte sich schon bei der geringen Curcuminmenge von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ eine

signifikante Reduktion der Bildung freier Radikale. Die Radikalbildung nahm Curcumin-konzentrationsabhängig weiter bis zu einem der Kontrolle vergleichbarem Wert ab.

Zum besseren Vergleich wurde parallel der gleiche Versuch mit Psoralen (20–80 ng/ml) durchgeführt (Abb. 3.3.2 b). Hier wurde die zu erwartende phototoxische Eigenschaft des Psoralen deutlich. Die durch das UVA vermittelte Radikalbildung wurde durch Psoralen konzentrationsabhängig bis auf ca. das 9-fache erhöht.

Die Methode zur freien Radikalbestimmung durch DHR-123 wurde ebenfalls angewendet, um die Wirkung von UVA-Licht allein bei verschiedenen Dosen auf die Bildung freier Radikale zu testen. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die für die Curcuminbehandlung gewählte Dosis von 1 J/cm^2 keine Radikalbildung induziert; dies war ab 5 J/cm^2 erst der Fall (Abb. 3.3.3).

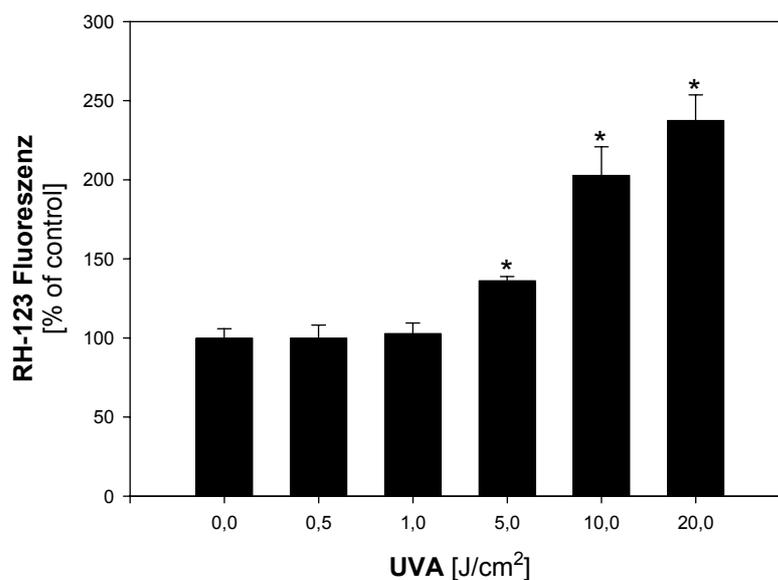


Abb. 3.3.3: FREIE RADIKALBILDUNG NACH UVA-BESTRAHLUNG: HaCaT-Zellen wurden mit UVA (0,5–20 J/cm^2) bestrahlt. Dargestellt ist die RH-123 Fluoreszenz nach 90 min, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.4. APOPTOSEINDUKTION DURCH CURCUMIN/LICHT

Nachdem gezeigt wurde, dass Curcumin/Licht die Zellproliferation hemmt, bleibt die Frage offen, welcher Mechanismus diesem Effekt zu Grunde liegt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Curcumin in einer Reihe von Zellen Apoptose induziert (zusammengefasst in Aggarwal et al., 2007). So liegt es nahe zu untersuchen, ob bei der hier verwendeten Behandlung mit geringen Curcuminmengen in Kombination mit UVA oder sichtbarem Licht in HaCaT-Keratinocyten, ebenfalls Apoptose induziert wird. Zunächst wurde ein LDH-Test durchgeführt, um die Toxizität dieser Behandlung in Hinblick auf eine nekrotische Wirkung zu untersuchen. Im Anschluss wurden zum Nachweis der Apoptoseinduktion mittels Hoechstfärbung apoptotische Zellkerne quantifiziert. Desweiteren wurde die Cytochrom c-Freisetzung gemessen und die Aktivität der Caspase-8 und -9 ermittelt.

3.4.1. ZELLTOXIZITÄT

Wie im Einleitungskapitel erläutert, wurde als Voraussetzung für eine ausführlichere Untersuchung der Apoptose zunächst die LDH-Freisetzung gemessen, um eine toxische Wirkung des Curcumins auszuschließen. Überstände von HaCaT-Zellen wurden 24 h nach Behandlung mit 0,05 bis 1 µg/ml Curcumin und UVA (1 J/cm²) oder ohne Bestrahlung, überführt und der LDH-Gehalt (s. Kap. 2.6.) wurde bestimmt. Weder die bestrahlten noch die unbestrahlten Zellen zeigten eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte LDH-Freisetzung (Abb. 3.4.1). Dies lässt auf eine intakte Zellmembran schließen, was bedeutet, dass weder Curcumin/UVA noch Curcumin alleine eine toxische Wirkung auf die Zellen haben und die beobachtete Inhibierung der Zellproliferation nicht auf einer Nekrose beruht. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit dem Detergenz Triton-x (1%) behandelt wurden.

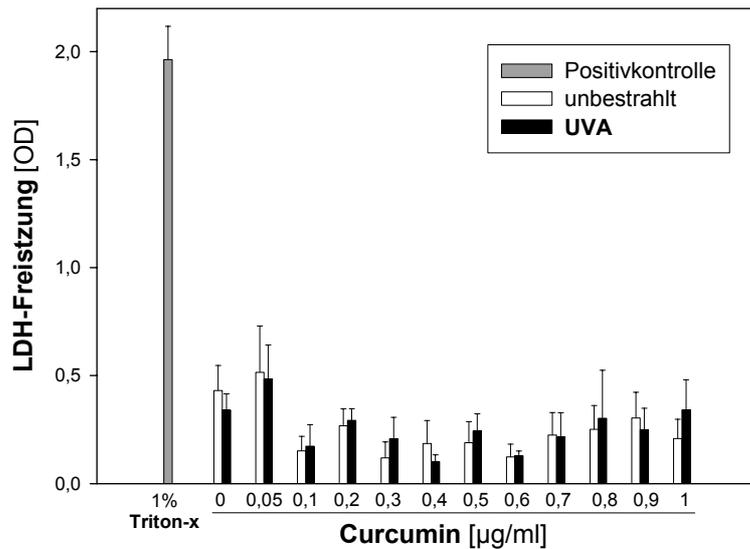


Abb. 3.4.1: LDH-FREISETZUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin und UVA (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Der graue Balken zeigt die Positivkontrolle (1% Triton-x). Dargestellt sind die Werte der OD, die proportional zur Menge an freigesetztem LDH sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung.

3.4.2. ZELLKERNFRAGMENTIERUNG

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde zunächst eine Zellkernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechstfärbung) durchgeführt. Hierfür wurden HaCaT-Zellen 24 h nach Behandlung mit 0,2, 0,5 und 1 µg/ml Curcumin und UVA (1 J/cm²) fixiert und gefärbt. Eine Kontrollreihe blieb unbestrahlt. Apoptotische Zellkerne liegen im Gegensatz zu intakten Zellkernen fragmentiert vor und weisen aufgrund der kondensierten DNA eine stärkere Fluoreszenz in Form von sog. „apoptotic bodies“ (Wyllie et al., 1984) auf. Durch die Hoechstfärbung ließ sich eindeutig erkennen, dass die beschriebenen fragmentierten Nuklei lediglich in den Curcumin/UVA behandelten Proben vermehrt zu sehen waren (Abb. 3.4.2 a; weiße Pfeile). Zur exemplarischen Darstellung wurden die Abbildungen der höchsten Curcuminkonzentration von 1 µg/ml ausgewählt.

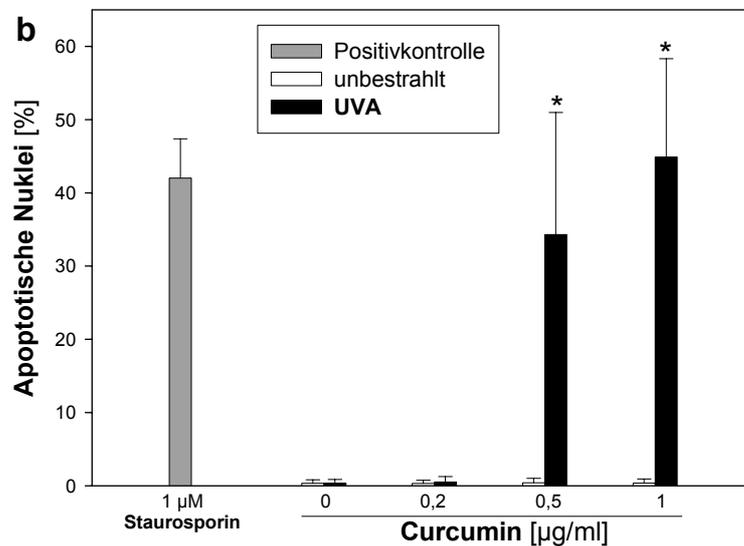
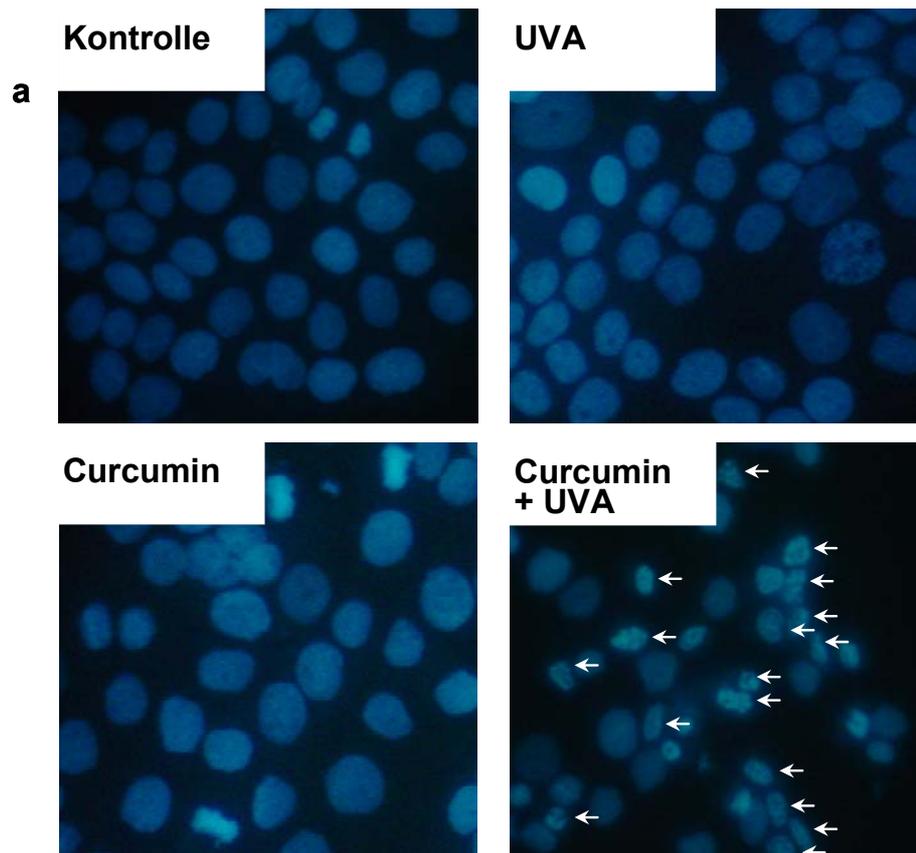


Abb. 3.4.2: ZELLKERNFÄRBUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: (a) HaCaT-Keratinocyten wurden mit UVA, Curcumin oder Curcumin und UVA behandelt oder unbehandelt belassen. Dargestellt ist die Hoechst-Zellkernfärbung nach 24 h bei 40-facher Vergrößerung. Apoptotische Nuklei sind mit Pfeilen markiert. (b) Die Quantifizierung der Hoechstfärbung erfolgte durch Auszählung von Curcumin und UVA (schwarze Balken) behandelten oder unbestrahlt belassenen (weiße Balken) Zellen. Der graue Balken zeigt die Positivkontrolle (1 µM Staurosporin). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen zur Gesamtzellzahl. Jeder Balken zeigt den Mittelwert von 4 Werten/ausgezählten Gesichtsfeldern mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Auswertung der Hoechstfärbung wurden von jedem Ansatz vier zufällig ausgewählte Bildausschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgezählt. Dabei wurde zunächst die gesamte Zellzahl bestimmt und im Verhältnis dazu der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen berechnet (Abb. 3.4.2 b).

Deutlich zu erkennen ist, dass Curcumin nur in Kombination mit UVA Apoptose induziert. So ließen sich kaum apoptotische Zellkerne bei den unbestrahlten Zellen finden; die Apoptoserate lag bei maximal 1%. Im Gegensatz dazu, war eine deutliche Erhöhung an apoptotischen Zellkernen bei den bestrahlten Proben, abhängig von der Curcuminkonzentration, zu finden. 34,3% der mit 0,5 µg/ml und 44,9% der mit 1 µg/ml Curcumin und UVA stimulierten Zellen wiesen apoptotische Zellkerne auf. Die Curcuminkonzentration von 0,2 µg/ml hatte keinen apoptotischen Effekt. Die Positivkontrolle wurde mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin (1 µM) behandelt.

3.4.3. CYTOCHROM C-FREISETZUNG

Da bekannt ist, dass Curcumin in die Zelle gelangt, liegt bei der Induktion der Apoptose nahe, dass der intrinsische Apoptoseapparat aktiviert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien mittels eines Immunoassays bestimmt. Hierfür wurden HaCaT-Keratinocyten mit 0,2, 0,5 und 1 µg/ml Curcumin behandelt und mit 1 J/cm² UVA oder 5500 lx sichtbarem Licht (5 min) bestrahlt. Ein Ansatz blieb unbestrahlt. Für die Positivkontrolle wurde wieder 1 µM Staurosporin als Apoptoseinduktor verwendet. Die Cytochrom c-Freisetzung wurde nach 24 h bestimmt (s. Abb. 3.4.3).

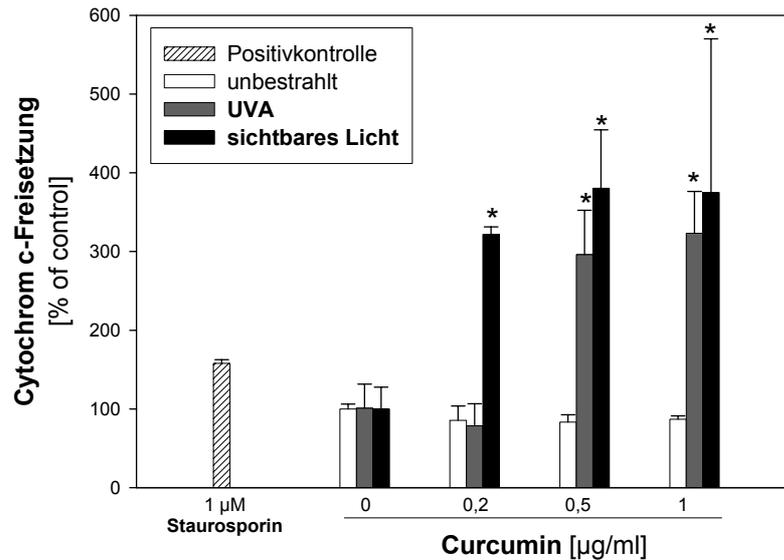


Abb. 3.4.3: CYTOCHROM C-FREISETZUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin und UVA (graue Balken), sichtbarem Licht (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Der gestreifte Balken zeigt die Positivkontrolle (1 µM Staurosporin). Dargestellt ist die Menge an freigesetztem Cytochrom c nach 24 h, wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

Die lichtgeschützte Kontrollreihe wies ebenso wie die Proben ohne Curcumin eine geringe, als Basiswert zu definierende, Cytochrom c-Menge im Zytoplasma auf. Während bei den bestrahlten Zellen die 0,2 µg/ml-Probe mit UVA keinen Effekt zeigte, war schon eine deutlich erhöhte Cytochrom c-Freisetzung in Kombination mit sichtbarem Licht detektierbar. Bei den 0,5 und 1 µg/ml-Proben war ein über 300% liegender Effekt mit beiden Bestrahlungsarten zu erkennen. Dieser war größer als der der Positivkontrolle.

3.4.4. CASPASEN

Im Folgenden sollten die Caspase-9 (intrinsische Initiatorcaspase) und -8 (extrinsische Initiatorcaspase) mittels Western Blot-Analyse auf ihre Aktivität hin überprüft werden. Die dazu verwendeten Antikörper waren sowohl gegen das inaktive Proenzym wie auch dessen aktive Spaltprodukte, die sog. „cleaved“ Caspasen, gerichtet. Wie in den vorherigen Versuchen wurden HaCaT-

Keratinocyten mit Curcumin (0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$) und UVA oder sichtbarem Licht behandelt. Die Abarbeitung fand 8 h nach Stimulierung statt. Eine deutliche Aktivierung der Caspase-8 sowie -9 war nach Behandlung mit Curcumin und UVA wie auch mit sichtbarem Licht zu erkennen (Abb. 3.4.4). Dabei zeigte sich eine Abnahme der Procaspase bei gleichzeitiger Zunahme der aktiven Caspase. Das Fehlen der Spaltprodukte bei der höheren Curcuminkonzentration (1 $\mu\text{g/ml}$) und beiden Bestrahlungsarten lässt sich auf eine fortgeschrittene Apoptose zurückführen, da die Mengen der Procaspase ebenfalls gering sind. Tatsächlich findet die Caspasenaktivierung, wie im Folgenden noch gezeigt wird, zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt statt.

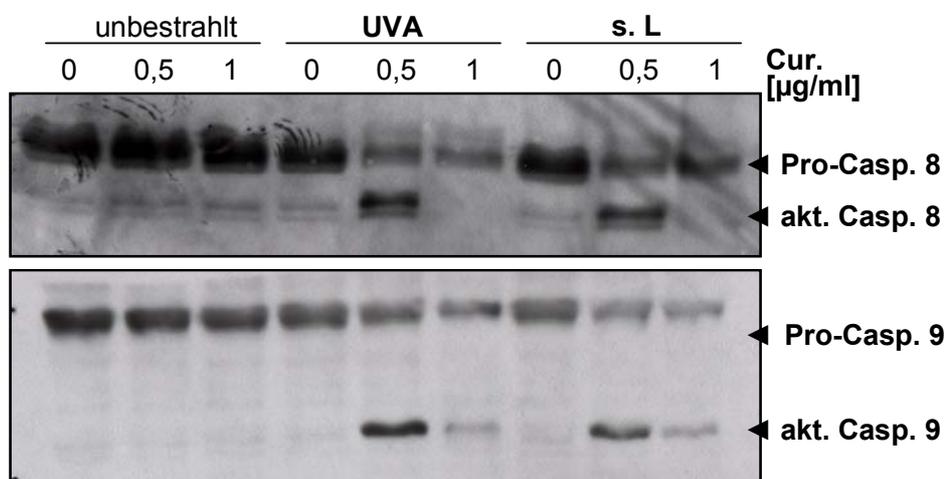


Abb. 3.4.4: CASPASENAKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin (Cur.) und UVA (Banden 4-6), sichtbarem Licht (s.L.; Banden 7-9) behandelt oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden Caspase-8 (oben) und Caspase-9 (unten) nach 8 h detektiert. Dabei wird zwischen der Procaspase und den aktiven (akt.) Spaltprodukten unterschieden.

Die Caspase-9 wird in der Regel bei der intrinsischen Apoptosekaskade aufgrund der Cytochrom c-Freisetzung aktiviert. So sollte, aufgrund der gezeigten Curcumin/Licht-induzierten Cytochrom c-Freisetzung, der Annahme einer intrinsisch vermittelten Apoptose nachgegangen werden. Hierfür bot sich an, den zeitlichen Verlauf der Aktivierung beider Initiatorcaspasen zu verfolgen. Wie in Abb. 3.4.5 zu erkennen ist, zeigte sich bei Caspase-9 (linke Blots) eine frühere Aktivierung als bei Caspase-8 (rechte Blots). Bereits nach 1,5 h (obere Blots) waren bei den Curcumin und UVA behandelten Proben die sog. „cleaved“

Fragmente der Caspase-9 zu erkennen. Bei Caspase-8 war dies erst nach 2 h der Fall.

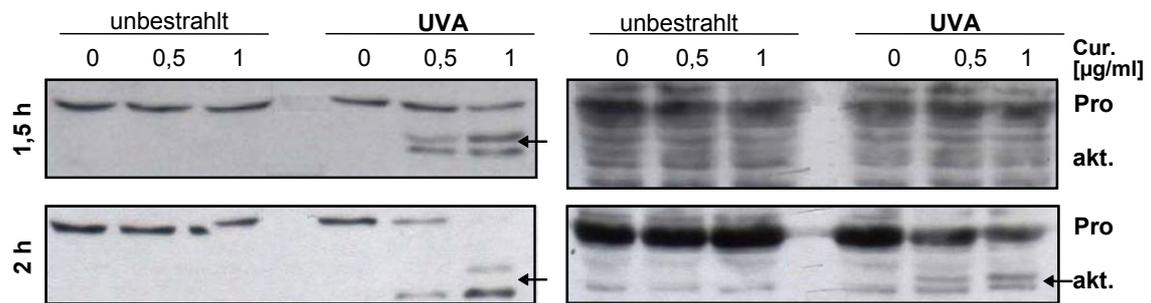


Abb. 3.4.5: CASPASEAKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin (Cur.) und UVA (jeweils Banden 4-6) behandelt oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden Caspase-9 (links) und Caspase-8 (rechts) nach 1,5 h (oben) oder 2 h (unten) detektiert. Dabei wird zwischen der Procaspase (Pro) und den mit Pfeilen markierten aktiven (akt.) Spaltprodukten unterschieden.

3.5. WIRKUNG VON CURCUMIN/LICHT AUF DIE SIGNAL-TRANSDUKTION

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Curcumin/Licht in HaCaT-Zellen die Proliferation hemmt und Apoptose induziert, ist es interessant zu untersuchen, ob die Behandlung einen Effekt auf proliferationsassoziierte Faktoren hat. Dabei standen Targets, deren Signalwege an die Apoptose gekoppelt sind, im Vordergrund. So wurde im Folgenden die Wirkung von Curcumin/Licht auf die Kinasen PKB/Akt, Erk1/2, p38, PKC, SAPK/JNK, PTEN, den EGF-Rezeptor sowie den Transkriptionsfaktor NF- κ B ermittelt.

3.5.1. KINASEN

Zunächst wurde der Einfluss von Curcumin und Licht auf die Proteinkinase A (PKB/Akt) und B (PKB) sowie die MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 untersucht.

PKB/AKT

Akt ist eine proliferationsassoziierte Kinase, die anti-apoptotisch wirkt, indem sie beispielsweise Caspase-9 und Bad durch Phosphorylierung inhibiert. HaCaT-Keratinocyten wurden mit 0, 0,5 und 1 μ g/ml Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht behandelt, 15 min nach Stimulierung abgearbeitet und im Western Blot eingesetzt. Zur Untersuchung von Akt wurden der nicht-phosphospezifische, sowie die gegen Serin 473 und Threonin 308 phosphospezifischen Antikörper eingesetzt. Beide Stellen müssen zum Aktivitätsnachweis phosphoryliert vorliegen (Alessi et al., 1996). Bei diesen Untersuchungen wurden HaCaT-Keratinocyten mit Curcumin (0, 0,5 und 1 μ g/ml) und UVA oder sichtbarem Licht in den beschriebenen Dosen behandelt. Ein Ansatz blieb unbestrahlt. Es zeigte sich zunächst nach 15 und 30 min ein kaum detektierbares sehr schwaches Signal bei allen Proben (Ergebnisse nicht gezeigt). Da aufgrund der Eigenschaften von Akt und der bisherigen Ergebnisse eine Inhibierung der Kinase zu erwarten ist, wurde im nächsten Schritt, neben

der Curcumin/Licht-Behandlung, eine zusätzliche Stimulierung mit TGF- α durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigten eine Hemmung der Phosphorylierung bei den Curcumin/Licht-behandelten Proben (Abb. 3.5.1).

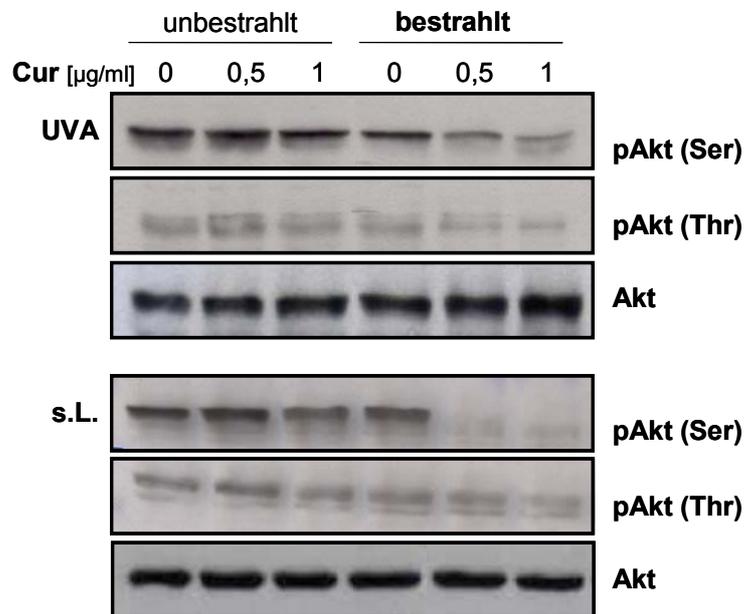


Abb. 3.5.1: AKT-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit TGF- α und Curcumin (Cur) behandelt und mit UVA (oben) oder sichtbarem Licht (s.L.; unten) bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)Akt (Ser), pAkt (Thr) und Akt gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

Dies war bei beiden Bestrahlungsarten der Fall und die Inhibierung erfolgte ähnlich wie bei den Apoptoseergebnissen Curcumin-konzentrationsabhängig. Bei den lichtgeschützten Zellen war ein solcher Effekt nicht zu erkennen. Die Detektion des gesamten Akt-Proteins diente zum Ladungsnachweis.

ERK1/2

Die MAP-Kinase Erk1/2 fördert in der Zelle vor allem das Wachstum, die Differenzierung und die Entwicklung. Auch an dieser Kinase wurde die Wirkung von Curcumin/Licht untersucht. Dieselben Proteinextrakte, die bereits gegen Akt geblottet wurden, wurden in einem neuen Western Blot gegen das phosphospezifische Erk1/2 eingesetzt. Dabei konnte ebenfalls ein inhibierender Effekt von Erk1/2 durch Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht bei zusätzlicher Stimulierung mit TGF- α gezeigt werden (Abb. 3.5.2). Die

Behandlung mit der höchsten Curcuminkonzentration und zusätzlicher Bestrahlung führte sogar zum völligen Verschwinden der Bande. Der Antikörper gegen das gesamte Erk1/2 diente zum Ladungsnachweis.

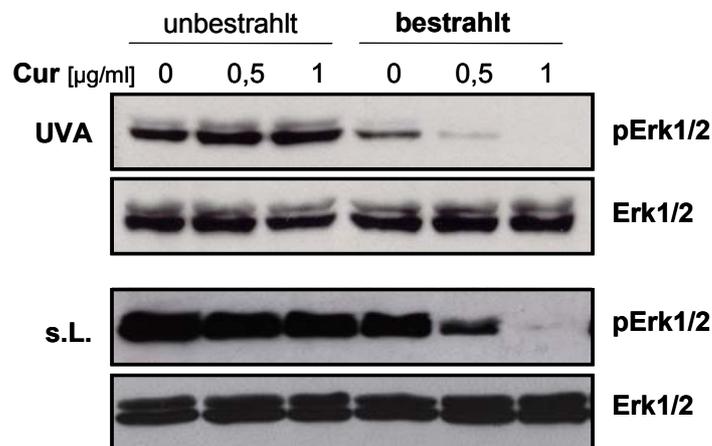


Abb.3.5.2: Erk1/2-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit TGF- α und Curcumin (Cur) behandelt und mit UVA (oben) oder sichtbarem Licht (s.L.; unten) bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)Erk1/2 und Erk1/2 gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

P38

Die Kinase p38 gehört ebenfalls zu den MAP-Kinasen und wird als Stresskinase bezeichnet. Sie reagiert auf verschiedenste Stressreize, indem sie in der Zelle Entzündungsreaktionen, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung induziert. HaCaT-Keratinocyten wurden wieder mit 0, 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Curcumin und UVA oder sichtbarem Licht behandelt, 15 min nach Stimulierung abgearbeitet und im Western Blot eingesetzt. Diesmal wurde der gegen Threonin 180 und Tyrosin 182 phosphospezifische, sowie der nicht-phosphospezifische p38-Antikörper verwendet. In Abb. 3.5.3 zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung von p38 in allen mit Curcumin und Licht behandelten Proben. Es war auch ein leichter Effekt der UVA-Bestrahlung (Bande 4, oben), sowie der Inkubation mit der höchsten Curcuminmenge ohne Bestrahlung (Bande 3, oben) zu beobachten.

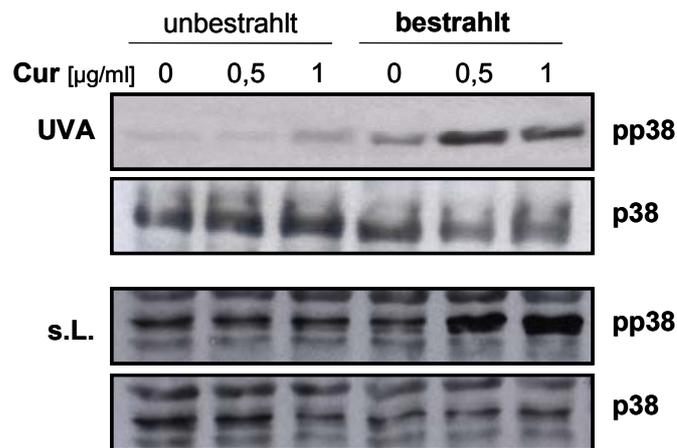


Abb. 3.5.3: p38-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin (Cur) behandelt und mit UVA (oben) oder sichtbarem Licht (s.L.; unten) bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)p38 und p38 gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

PKC

Die PKC-Familie besitzt viele Isoformen und ist somit auch in unterschiedlichste Reaktionen involviert. So wurde beispielsweise in Keratinocyten vor allem die Beteiligung der PKC α und δ an Differenzierungsprozessen belegt. PKC wird durch Phosphorylierung reguliert, dabei legen Untersuchungen nahe, dass PKC phosphoryliert vorliegen muss, um aktivierbar zu sein (Keranen et al., 1995). Zur Untersuchung der PKC wurden HaCaT-Keratinocyten mit 0, 0,2, 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Curcumin und UVA behandelt, 15 min nach Stimulierung abgearbeitet und im Western Blot eingesetzt. Auch hier war, um ein inhibierendes Signal zu untersuchen, eine zusätzliche Stimulierung, in diesem Fall mit TPA (13-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat, Castagna et al., 1982), notwendig. Eingesetzt wurde zunächst ein phosphospezifischer PKC(pan)-Antikörper, der gegen alle Isoformen der PKC gerichtet ist. Dabei zeigte sich eine Dephosphorylierung der Curcumin/UVA-behandelten Proben (Abb.3.5.4 oben). Um Diese auf bestimmte Isoformen einzugrenzen, wurden die Proben ebenfalls gegen die entsprechenden phosphospezifischen Antikörper von PKC α , β und δ geblottet. Die δ -Isoform blieb durch Curcumin/UVA dephosphoryliert, während diese Behandlung keinen Einfluss auf die PKC α und β hatte.

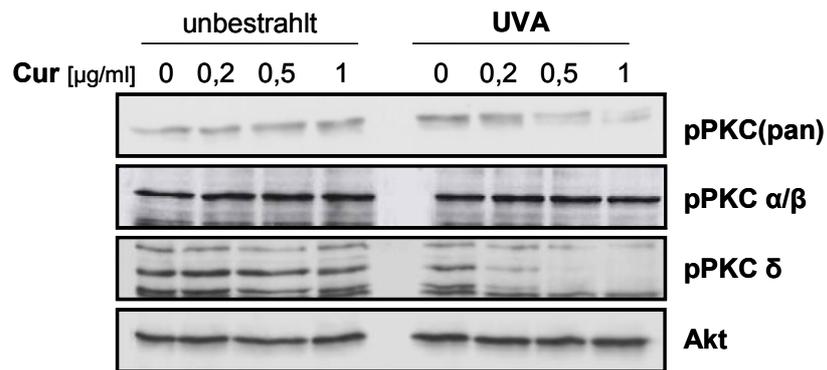


Abb. 3.5.4: PKC-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit TPA, Curcumin (Cur) und UVA (jeweils Banden 5-8) behandelt oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-4) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)PKC(pan); pPKC α/β (Thr), pPKC δ (Thr) und Akt gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

3.5.2. EGF-REZEPTOR

Die Signaltransduktionskaskaden der untersuchten MAP-Kinasen, der PKB/Akt sowie der PKC werden in der Regel durch sog. Rezeptortyrosinkinasen aktiviert (s. Kap 1.2.). Beim EGF-Rezeptor handelt es sich um eine solche RTK. Aufgrund dessen wurde im Folgenden getestet, ob Curcumin und UVA oder sichtbares Licht ebenfalls eine hemmende Wirkung auf diesen Rezeptor ausüben. Die Curcumin/Licht und TGF- α stimulierten Proben der vorherigen Versuche wurden gegen eine aktivierte Rezeptorform geblottet. Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige Hemmung des Rezeptors, die durch beide Curcuminkonzentrationen und Licht zum fast völligen Verschwinden der Banden führte (Abb. 3.5.5).

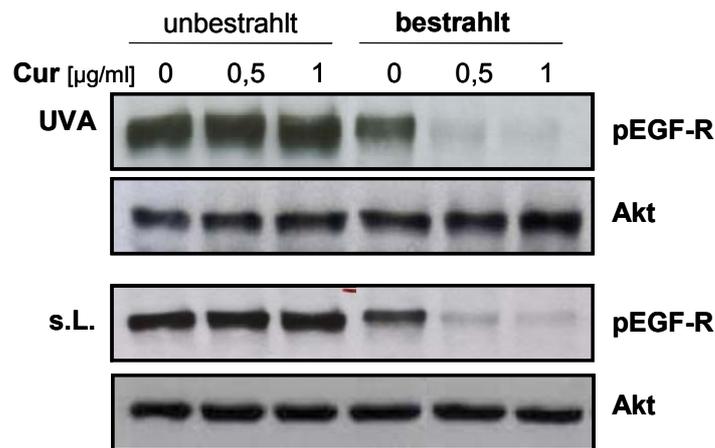


Abb. 3.5.5: EGF-Rezeptor-PHOSPHORYLIERUNG NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit TGF- α , Curcumin (Cur) behandelt und mit UVA (oben) oder sichtbarem Licht (s.L.; unten) bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)EGF-R und Akt gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

3.5.3. NF- κ B

Der NF- κ B „survival pathway“ ist in einer hemmenden Eigenschaft an den intrinsischen Apoptosesignalweg gekoppelt. Es ist bekannt, dass Curcumin in den Konzentrationen von 50-150 μ g/ml den Transkriptionsfaktor in verschiedenen Zellen hemmt (Singh und Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999). Im Folgenden wurde untersucht, ob Curcumin in den verwendeten „geringen“ Konzentrationen in Zusammenarbeit mit Licht die gleiche hemmende Eigenschaft zeigt. Durch den Dual-Luciferase Reporter Assay (s. Kap. 2.10.) lässt sich, anhand des „Anschaltens“ eines Promotors mit NF- κ B-Bindedomäne, die Menge an aktivem NF- κ B bestimmen. HaCaT-Zellen wurden hierfür mit dem NF- κ B- und SV40-Vektor kotransfiziert. Die Zellen wurden mit 0, 0,2, 0,5 und 1 μ g/ml Curcumin behandelt und mit UVA oder sichtbarem Licht bestrahlt. Die Positivkontrolle wurde mit 20 ng/ml TNF- α inkubiert. Die Abarbeitung fand 24 h nach Stimulierung statt.

Die Untersuchungen zeigten eine eindeutige Curcumin-konzentrationsabhängige Inhibierung des NF- κ B sowohl der mit UVA als auch der mit sichtbarem Licht zusätzlich bestrahlten Zellen (Abb 3.5.6). Bei der maximalen Konzentration mit 1 μ g/ml erfolgte eine Hemmung um ca. 70%. Die

unbestrahlten Kontrollen zeigten nahezu konstante Werte, vergleichbar der unbehandelten Probe.

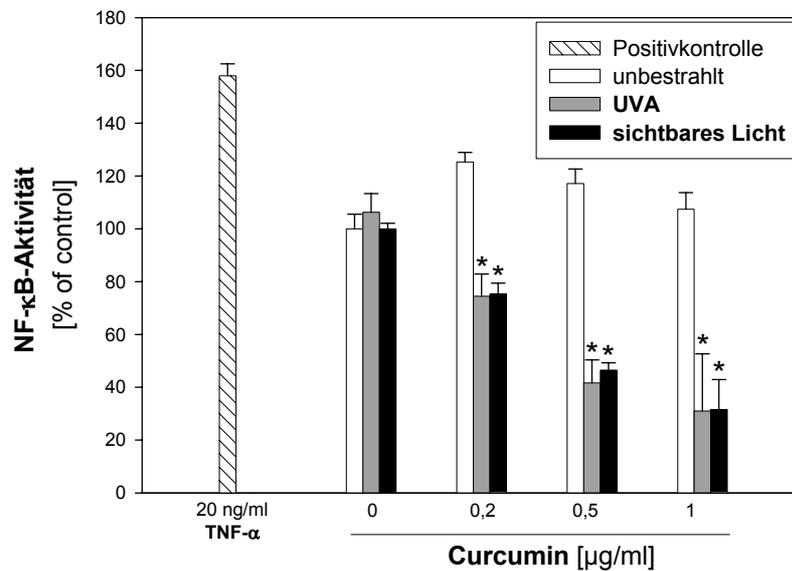


Abb. 3.5.6: NF- κ B-AKTIVITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Curcumin und UVA (graue Balken), sichtbarem Licht (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Der gestreifte Balken zeigt die Positivkontrolle (20 nM TNF- α). Dargestellt ist die Luciferasemessung nach 24 h, deren Menge proportional zur NF- κ B-Aktivität ist; die Werte sind auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 4-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde zusätzlich ein EMSA durchgeführt, bei welchem die Aktivität direkt durch die Bindung des NF- κ B-Faktors an ein entsprechendes DNA-Bindemotiv gezeigt werden kann. Hierzu wurden nukleäre Extrakte 30 min nach Behandlung mit Curcumin (0,2-1 μ g/ml) und UVA im EMSA eingesetzt. Diese Proben wurden zusätzlich mit TNF- α behandelt, um den erwarteten inhibierenden Effekt besser veranschaulichen zu können. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, durch Abnahme beziehungsweise völliges Verschwinden des „geschifteten“ radioaktiven Signals, eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität der Curcumin/UVA-behandelten Zellen, (Abb 3.5.7 a). Die Binde- sowie NF- κ B-Spezifität wurden durch die „Competitions“- bzw. „Supershift“-Ansätze belegt.

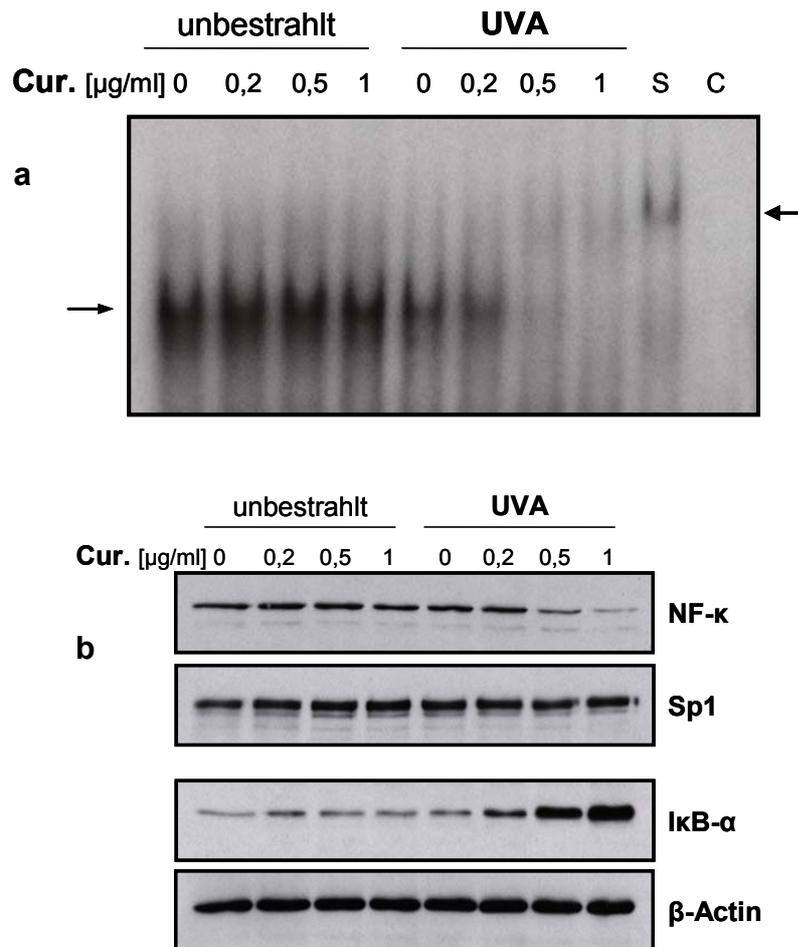


Abb. 3.5.7: NF-κB-AKTIVITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinozyten wurden mit TNF- α , Curcumin (Cur.) und UVA (jeweils Banden 5-8) behandelt oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-4) belassen. **(a):** Dargestellt ist der EMSA von nukleären Extrakten nach 30 min und ^{32}P -markierter doppelsträngiger NF-κB Konsensus-DNA. Bande 9 und 10 zeigen die Supershift- (S) und Competitions- (C) Kontrolle. **(b):** Mittels Western Blot wurden NF-κB und Sp1 (Ladungskontrolle) in nukleären (oben) sowie IκB- α und β -Actin (Ladungskontrolle) in zytosolischen Extrakten (unten) detektiert.

Die NF-κB-Aktivierung erfolgt in der Regel durch die Freisetzung des NF-κB aus einem Komplex mit IκB (Baeuerle et al., 1988; Beg et al., 1993). Das dadurch aktivierte NF-κB kann dann in den Zellkern einwandern. Um auch die Regulierung durch Curcumin/UVA an dieser Stelle zu belegen, wurden die nukleären Extrakten gegen NF-κB und die zytosolischen der gleichen Abarbeitung gegen IκB im Western Blot eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten bei Curcumin/UVA-Behandlung eine deutliche Zunahme an zytosolischem IκB, während die TNF- α -induzierte NF-κB-Translokation in den Zellkern durch diese Behandlung unterdrückt blieb. Zur Ladungskontrolle dienten die Sp-1- bzw. β -Actin-Antikörper.

3.5.4. UNTERSCHIEDE IN DER WIRKUNG DES ZCL-EXTRAKTS IM VERGLEICH ZUM CURCUMIN

Wie im Einleitungsteil beschrieben, wurden die anfänglichen Versuche mit dem Extrakt der *Curcuma longa*-Pflanze ZCL und UVA durchgeführt. Das darauf folgende Arbeiten mit Curcumin ergab die gleichen Effekte auf die Proliferation sowie Apoptoseinduktion, wobei sich aber Unterschiede bei der Signaltransduktion zeigten. Im Folgenden werden diese dargestellt.

PTEN

PTEN ist ein Antagonist der PI3-Kinase. Da gezeigt werden konnte, dass in dieser Signalkaskade sowohl EGF-R als auch Akt dephosphoryliert werden, wurde untersucht, ob PTEN aktiviert wird. Hierfür wurden HaCaT-Zellen mit 0, 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Curcumin oder 0, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ ZCL-Extrakt und UVA behandelt, 15 min nach Stimulierung abgearbeitet und im Western Blot eingesetzt. PTEN liegt im Gegensatz zu den vorher gezeigten Kinasen, dann in aktiver Form vor, wenn es dephosphoryliert ist. Deshalb mussten auch in diesem Versuch alle Ansätze zusätzlich mit TGF- α stimuliert werden. Bei dem Phosphorylierungsmuster von PTEN zeigte sich, dass nur bei der Behandlung mit dem Extrakt und UVA eine Dephosphorylierung, also Aktivierung stattfindet (Abb. 3.5.8 oben).

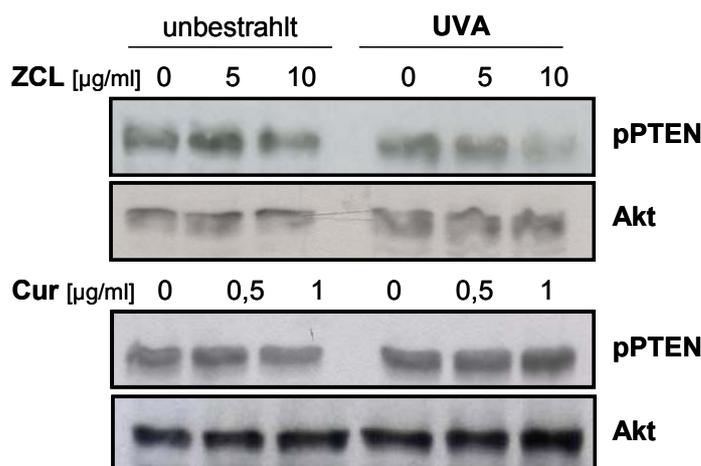


Abb. 3.5.8: PTEN-PHOSPHORYLIERUNG NACH ZCL- ODER CURCUMIN- UND UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit TGF- α , ZCL (oben) oder Curcumin (Cur, unten) behandelt und mit UVA bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)PTEN und Akt gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

Bei dem mit Curcumin inkubierten Ansatz blieb dieser Effekt aus (Abb. 3.5.8 unten). Er konnte auch nach kürzeren (5 min) oder längeren (30 min) Abarbeitungszeiten nicht erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

SAPK/JNK

Da gezeigt werden konnte, dass p38 durch Curcumin und Licht aktiviert wird, war es interessant eine weitere als Stresskinase definierte MAPK, die SAPK/JNK, zu untersuchen. Anfängliche Versuche mit Curcumin oder ZCL und UVA, zeigten wie bei den Ergebnissen der TGF- α -stimulierbaren Kinasen zunächst keine oder sehr schwache Signale (Ergebnisse nicht gezeigt). Um auch hier eine Inaktivierung der Kinase zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen, zusätzlich zur Behandlung mit Curcumin (0, 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$) oder ZCL-Extrakt (0, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$) und UVA, mit Osmostress stimuliert. 600 mM Sorbitol wurden hierfür zugegeben. In Abb. 3.5.9 sieht man eindeutig, dass der Extrakt in Zusammenarbeit mit UVA die osmostressvermittelte Phosphorylierung hemmt, wohingegen die Behandlung mit Curcumin und UVA diesen Effekt nicht zur Folge hat.

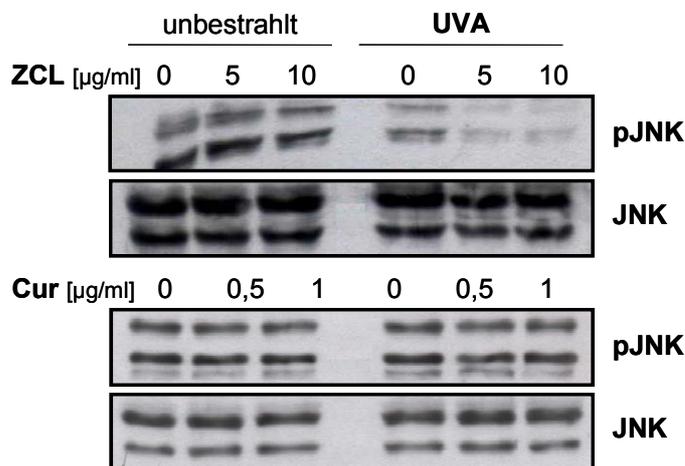


Abb. 3.5.9: JNK-PHOSPHORYLIERUNG NACH ZCL ODER CURCUMIN UND UVA-BEHANDLUNG: HaCaT-Keratinocyten wurden mit Sorbitol, ZCL (oben) oder Curcumin (Cur, unten) behandelt und mit UVA bestrahlt (jeweils Banden 4-6) oder unbestrahlt (jeweils Banden 1-3) belassen. Mittels Western Blot wurden p(phospho)JNK und JNK gesamt (Ladungskontrolle) nach 15 min detektiert.

3.6. WIRKUNG VON CURCUMIN/LICHT IM XENOGRAFT-TUMORMODELL

Die beobachteten Wirkungen von Curcumin/Licht auf die Apoptoseinduktion und die Hemmung der Zellproliferation, machen die Substanz für den therapeutischen Einsatz bei hyperproliferativen Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs, interessant. Als nächstes sollte gezeigt werden, ob die *in vitro* beobachteten Wirkungen *in vivo* gleichermaßen induziert werden. Als Untersuchungsmodell bot sich das in unserer Forschungseinrichtung von Hofmann et al. (2006) etablierte Xenograft-Tumor-Mausmodell an. Hierzu wurden homozygote NMRI-Nacktmäuse verwendet, die aufgrund einer Thymusaplasie immundefizient sind und sich somit für Xenotransplantate eignen. Desweiteren sind diese Tiere haarlos und bieten durch ihre dünne aus 2-3 Zellschichten bestehende Epidermis gute Bedingungen für das Durchdringen von Licht auf subkutan befindliche Tumore. Im Folgenden wurde zunächst als Voraussetzung für die Nutzung dieses Modells die Curcumin/Licht-Wirkung an A431-Zellen *in vitro* getestet, da sich diese Zellen als geeignet zur Xenograftverpflanzung (Tei et al. 2002, Hofmann et al. 2006) herausgestellt haben. *In vivo* sollte dann das Tumorwachstum bei Behandlung mit Curcumin und Licht beobachtet und quantifiziert werden. Für die Bestrahlung wurde nur das sichtbare Licht gewählt, da bei diesem eine Augenreizung bei den Versuchstieren verhindert wird. Weitere „Targets“, die mittels histochemischer oder Western Blot-Analysen untersucht wurden, waren Ki-67, die Zellkernfragmentierung, Caspase-8 und -9, PKB/Akt, Erk1/2 und der EGF-R.

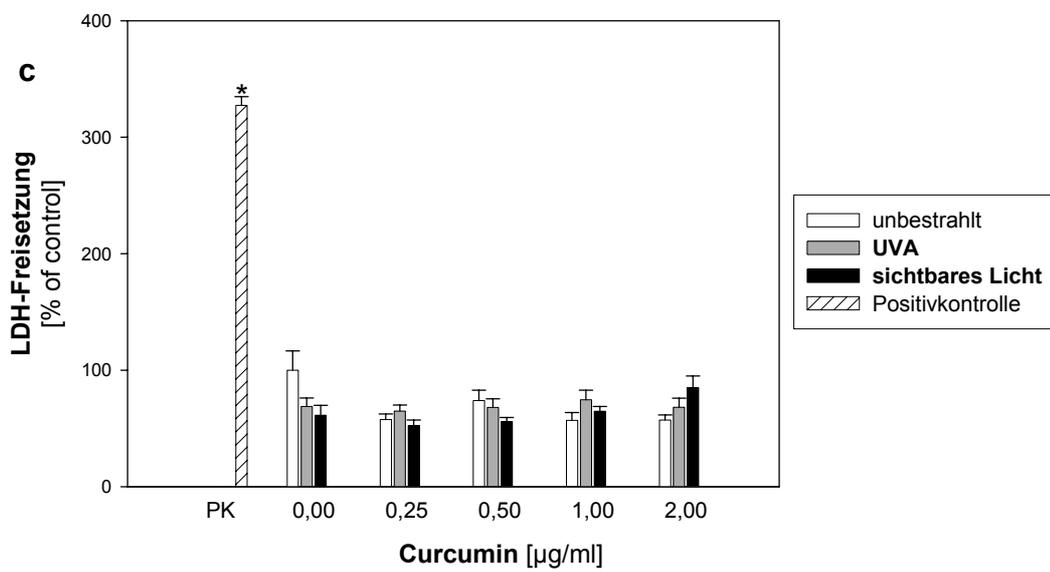
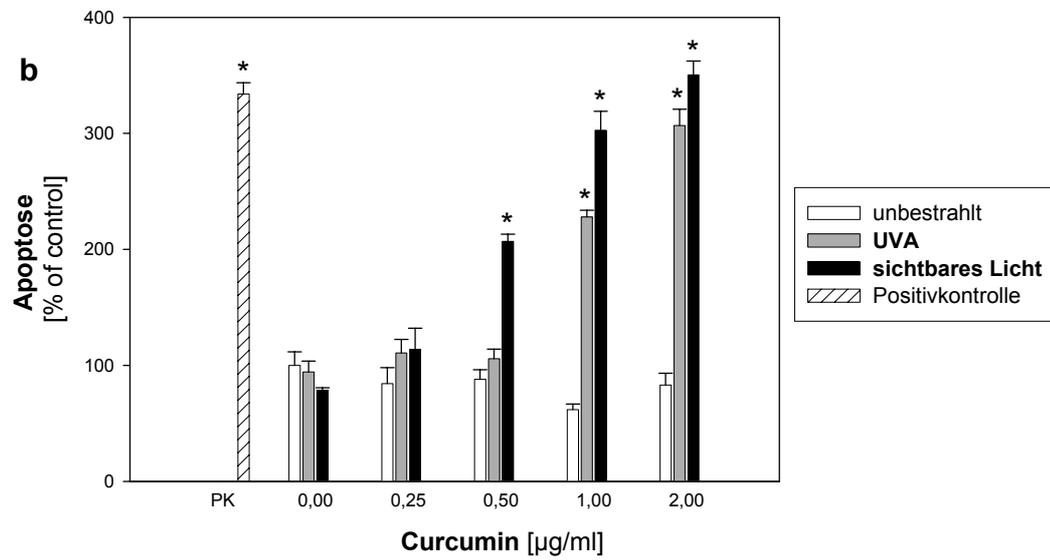
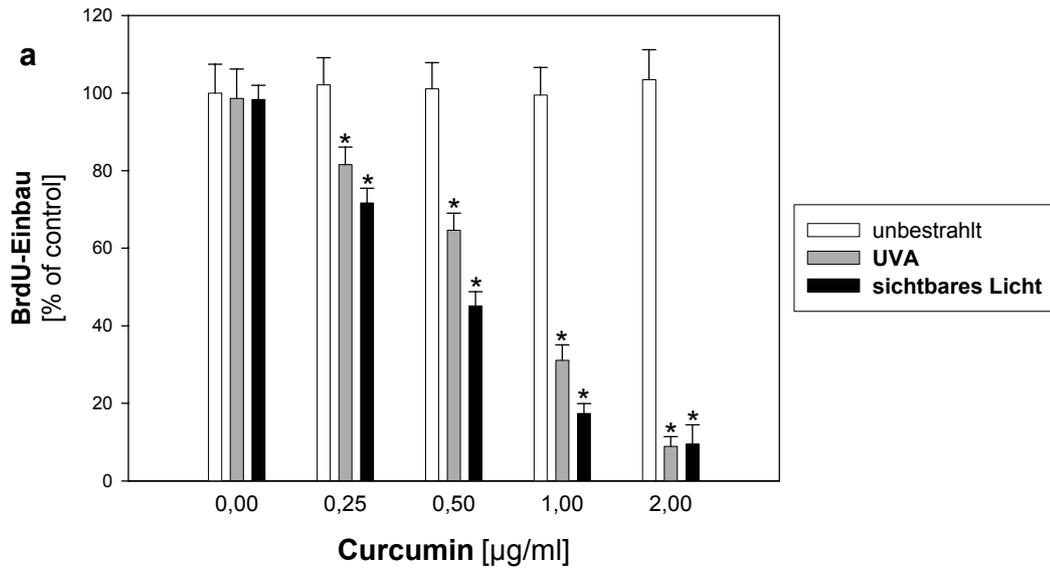
3.6.1. VORVERSUCHE AN A431-ZELLEN

Wie oben beschrieben wurde als Voraussetzung zur Nutzung des Xenograft-Tumormodells zunächst die Wirkung von Curcumin/Licht an A431-Zellen getestet, um diese dann im Modell als Xenografts einsetzen zu können. Hierzu wurden diese Zellen mit 0,25, 0,5, 1 und 2 µg/ml Curcumin behandelt und UVA oder 5500 sichtbarem Licht (wie bisher) bestrahlt. Ein Ansatz blieb unbestrahlt.

Nach 24 h wurden die Zellproliferation mittels BrdU-ELISA, die Apoptoserate mittels eines „cell death detection Kits“ und die LDH-Freisetzung bestimmt. Es zeigte sich, wie bei den Ergebnissen mit HaCaT und primären Kerationzyten, eine Curcumin-konzentrationsabhängige Proliferationshemmung bei den bestrahlten Kulturen (Abb. 3.6.1 a). Die unbestrahlten Curcumin-behandelten Proben wiesen keinen Effekt auf. Wie zu erwarten war, wurde auch die Apoptose in den Curcumin/Licht-behandelten Zellen ausgelöst (Abb. 3.6.1 b). Die höchste Curcuminkonzentration induzierte in Zusammenarbeit mit der Bestrahlung eine der Positivkontrolle vergleichbare Apoptoserate. Bei beiden Versuchen schien die Bestrahlung mit sichtbarem Licht einen etwas stärkeren Effekt im Vergleich zu UVA zu erzielen. Es wurde eine Proliferationshemmung sowie Apoptose induziert ohne messbare Toxizität; wie der LDH-Test belegt (Abb. 3.6.1 c). Weder die bestrahlten noch die unbestrahlten Curcumin-behandelten Zellen zeigten eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte LDH-Freisetzung. Als Positivkontrolle hierfür dienten Zellen, die mit dem Detergenz Triton-x (1%) versetzt wurden.

nächste Seite:

Abb. 3.6.1: PROLIFERATION, APOPTOSE UND TOXIZITÄT NACH CURCUMIN/LICHT-BEHANDLUNG: A431-Zellen wurden mit Curcumin und UVA (graue Balken), sichtbarem Licht (schwarze Balken) behandelt oder unbestrahlt (weiße Balken) belassen. Der graue Balken zeigt die Positivkontrolle (PK). Dargestellt sind der BrdU-Einbau (**a**), die Apoptoserate (**b**) sowie die LDH-Freisetzung (**c**) wobei die Werte auf die (auf 100% gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Jeder Balken zeigt den Mittelwert eines 4- bzw. 8-fachen Ansatzes mit Standardabweichung. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.



3.6.2. TUMORWACHSTUM

Die Wirkung einer regelmäßigen Curcumin/Licht-Behandlung sollte zunächst durch Beobachtung des Tumorwachstums ermittelt werden. Dazu wurden NMRI-Nacktmäuse mit A431-Zellen subkutan injiziert und wie in Kap. 2.13.2 beschrieben mit Curcumin und sichtbarem Licht zweimal täglich behandelt. Mit der Behandlung wurde am Tag der Tumorzellinjektion begonnen. Jede der in der Tabelle aufgeführten Tiergruppen umfasste jeweils 6 Tiere mit je zwei Tumoren.

	Curcumin	Bestrahlung
Gruppe 1	-	-
Gruppe 2	-	+
Gruppe 3	+	-
Gruppe 4	+	+

TAB. 3.2: BEHANDLUNGSGRUPPEN DER XENOGRAFT-TUMORMODELLE

Die i.p. verabreichte Curcuminmenge betrug 500 µg (/200 µl) pro Behandlung. Den Gruppen 1 und 2 wurde die gleiche Menge des Lösungsmittels Methylcellulose gespritzt, um zu gewährleisten, dass alle Tiere den gleichen Stressbedingungen ausgesetzt sind. Die Bestrahlung erfolgte direkt im Anschluss an die Injektion für eine Dauer von 20 min (Tageslichtintensität wie in Kap. 2.4. angegeben). Nicht bestrahlte Tiere wurden nach der Injektion mit einem Tuch für ca. eine Stunde abgedeckt. Als nach ca. 10 Tagen die Tumore auf eine messbare Größe angewachsen waren, wurden deren Volumina wie in Kap 2.13.2. beschrieben zweimal wöchentlich ermittelt. Die Quantifizierung dieser Daten zeigte, dass lediglich die mit Curcumin und sichtbarem Licht behandelte Gruppe eine signifikante Inhibierung des Tumorwachstums aufwies (Abb. 3.6.2). Das durchschnittliche Tumolvolumen von $83 \pm 7 \text{ mm}^3$ dieser Gruppe war am Tag 12 um ca. 70% kleiner als das der Kontrolle mit $285 \pm 28 \text{ mm}^3$. Die scheinbare Tumorwachstumshemmung der nur mit Curcumin behandelten Gruppe war nicht signifikant ($p=0,16$ gegen die Kontrolle). Wohingegen die Curcumin/Licht-Gruppe auch signifikante Effekte gegenüber dieser Gruppe zeigte. Die gleichen Verhältnisse konnten auch bei späteren Messungen wie beispielsweise für Tag 17 gezeigt (Abb. 3.6.2 b), beobachtet

werden. In der Boxplot-Darstellung ist sehr gut zu erkennen, dass die Tumore der Gruppen 1, 2 und 3 im Vergleich zur Gruppe 4 (Curcumin/Licht) eine starke Streuung der Tumorumfängen aufwiesen.

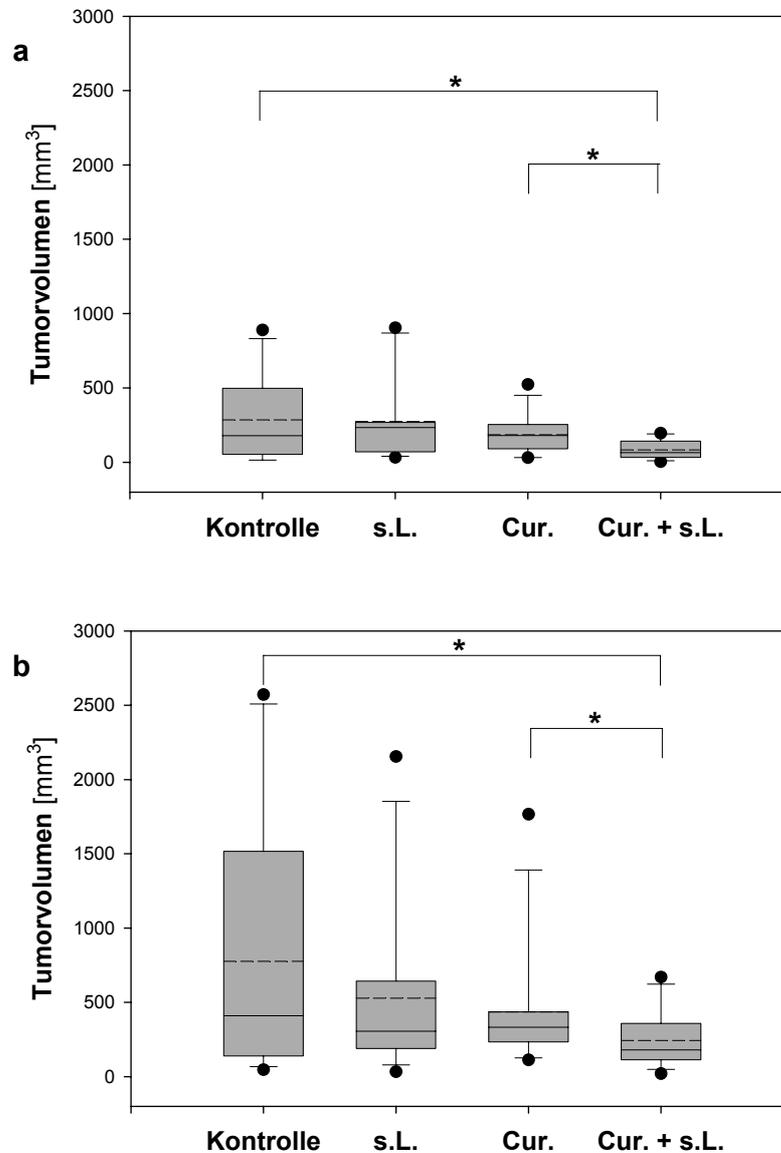


Abb. 3.6.2: TUMORWACHSTUM NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG: A431-Xenograft-Tumormäuse wurden mit Methylcellulose (Kontrolle), Methylcellulose/sichtbarem Licht (s.L.) Curcumin (Cur.) oder Cur./s. L. behandelt. Dargestellt sind die Tumorumfänge nach 12 (**a**) bzw. 17 Tagen (**b**) in Boxplot-Darstellungen. Jede Box umfasst 12 Werte, mit Median (durchgezogene Linie) und Mittelwert (unterbrochene Linie). Die Signifikanz * ist $p < 0,05$.

3.6.3. KI-67-EXPRESSION

Inwiefern der beobachteten Hemmung des Tumorwachstums eine Proliferationsinhibierung, wie sie schon *in vitro* gezeigt wurde, zu Grunde liegt, wurde im Folgenden ermittelt. Hierzu bot sich die immunhistochemische Untersuchung des klassischen Proliferationsmarkers Ki-67 an. Dazu wurden die Tumore 24 h nach entsprechender Behandlung (s Tab. 3.2.) exzidiert und in Parafin aufgenommen. Die Färbung wurde wie in Kap. 2.10. beschrieben durchgeführt; dabei erscheinen Ki-67 positive Zellen rötlichbraun. Zu erkennen war eine gleichmäßig intensive Färbung der Tumore von Gruppe 1 (Methylcellulose), 2 (Methylcellulose/Licht) und 3 (Curcumin), während in der Curcumin/Licht-Gruppe weniger Ki-67 positive Zellen zu finden waren (Abb. 3.6.3 a). Zur Quantifizierung dieser Untersuchung wurden von jedem Ansatz fünf zufällig ausgewählte Bildausschnitte unter dem Mikroskop fotografiert und ausgezählt. Dabei wurde zunächst die gesamte Zellzahl bestimmt und im Verhältnis dazu der prozentuale Anteil an Ki-67 positiven Zellen (s. Abb. 3.6.3 b). Hierdurch konnten die Beobachtungen der verminderten Ki-67-Expression bei Curcuminbehandlung und Bestrahlung mit sichtbarem Licht bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ki-67-Rate um 70%.

3.6.4. ZELLKERNFRAGMENTIERUNG

Nachdem auch *in vivo* eine verminderte Zellproliferation nach Curcumin/Licht-Behandlung nachgewiesen werden konnte, bleibt zu untersuchen, ob diese Behandlung in den Tumoren Apoptose, wie bei HaCaT- und A431-Zellen in Kultur, induziert. Hierzu wurden ebenfalls Tumore 24 h nach Behandlung exzidiert. Angewandt wurde, wie schon bei den *in vitro*-Versuchen, die Hoechst-Zellkernfärbung. Bei dieser Färbung können wie beschrieben apoptotische Zellkerne auf Grund ihrer veränderten Morphologie unterschieden werden. Es zeigte sich auch hier nur ein Effekt, wenn den Tiere Curcumin injiziert wurde und diese dann bestrahlt wurden (Abb. 6.3.4 a). Tumore dieser Gruppe wiesen vermehrt apoptotische Zellen auf, während die Tumore der anderen Gruppen (Kontroll-, Curcumin- und bestrahlte Gruppe) nur vereinzelte apoptotische

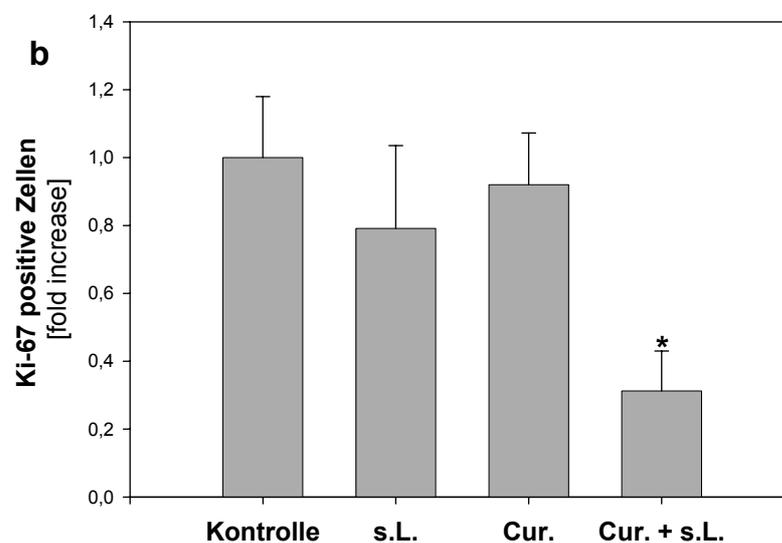
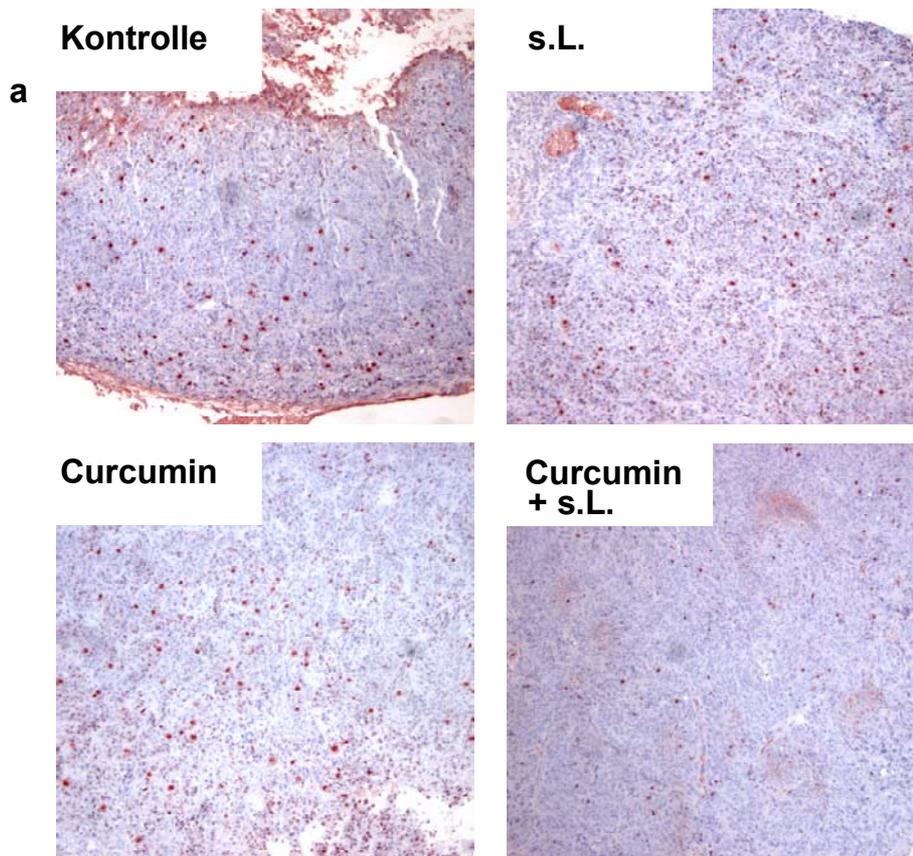


Abb. 3.6.3: Ki-67-FÄRBUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG: A431-Xenograft-Tumormäuse wurden mit, Methylcellulose (Kontrolle), Methylcellulose/sichtbarem Licht (s.L.) Curcumin (Cur.) oder Cur./s.L. behandelt. **(a):** Dargestellt ist die Ki-67-Färbung der Tumore nach 24 h bei 10-facher Vergrößerung. **(b):** Quantifizierung der Färbung erfolgte durch Auszählung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Ki-67-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl. Jeder Balken zeigt den Mittelwert von 5 Werten bzw. ausgezählten Gesichtsfeldern mit Standardabweichung die Werte auf die (auf 1 gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Die Signifikanz * ist $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle.

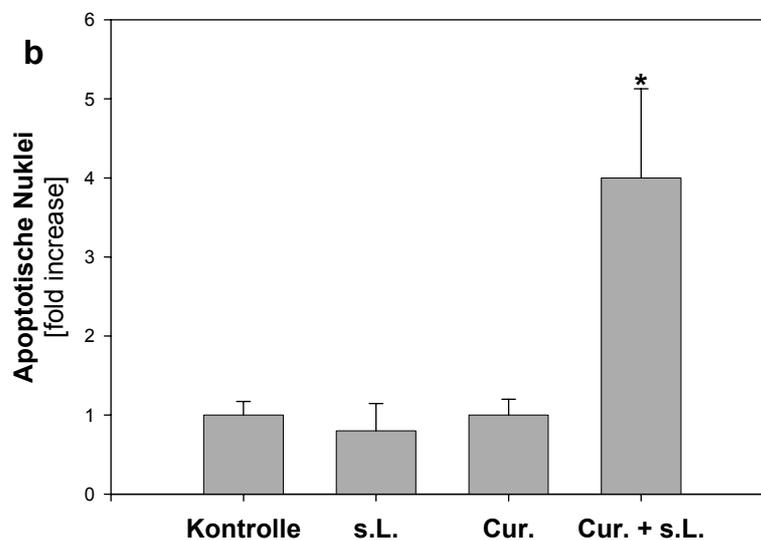
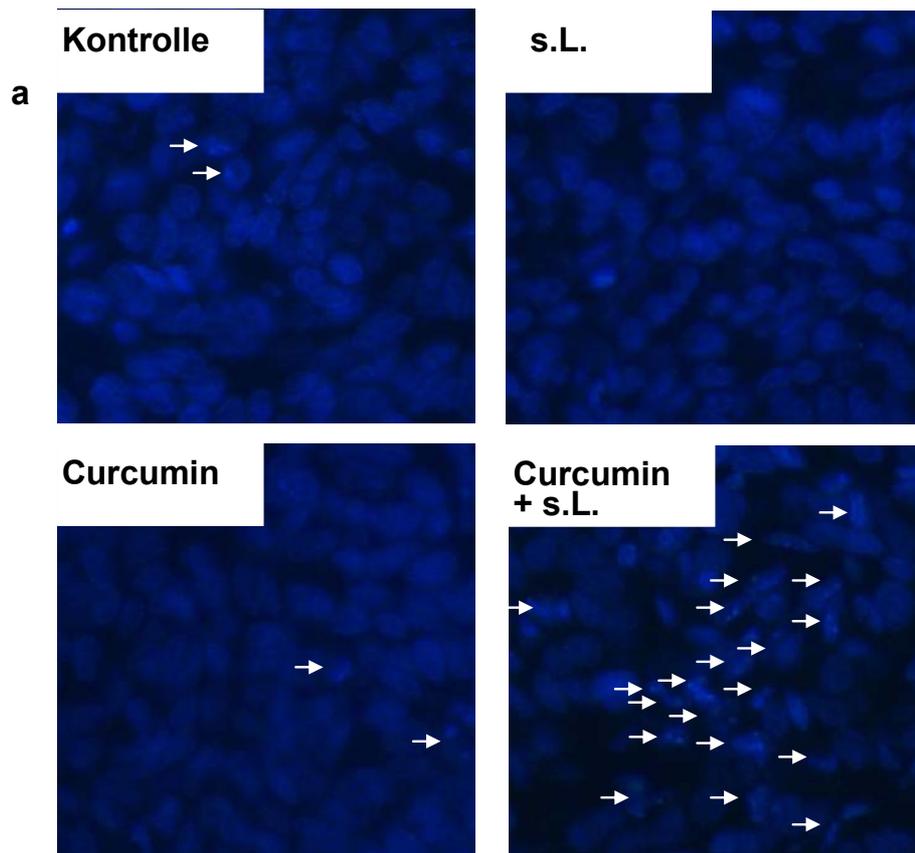


Abb. 3.6.4: ZELLKERNFÄRBUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT -BEHANDLUNG: A431-Xenograft-Tumormäuse wurden mit Methylcellulose (Kontrolle), Methylcellulose/sichtbarem Licht (s.L.), Curcumin (Cur.) oder Cur./s.L.: behandelt. **(a):** Dargestellt ist die Höchst-Zellkernfärbung nach 24 h bei 40-facher Vergrößerung, wobei apoptotische Zellkerne mit Pfeilen markiert sind. **(b):** Quantifizierung der Färbung erfolgte durch Auszählung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Nuklei zur Gesamtzellzahl. Jeder Balken zeigt den Mittelwert von 4 Werten bzw. ausgezählten Gesichtsfeldern mit Standardabweichung die Werte auf die (auf 1 gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Die Signifikanz * ist $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

Zellkerne besaßen. Quantitativ ergab sich bei der Auszählung von 4 zufällig ausgewählten Bildausschnitten, eine um ca. das 4-fache erhöhte Apoptoserate, die signifikant im Vergleich zur Kontrolle war (Abb. 3.6.3 b).

3.6.5. CASPASEN

Die Ergebnisse der Apoptoseinduktion durch Curcumin/sichtbares Licht in den Xenograft-Tumoren *in vivo*, sollten im Folgenden durch die Untersuchung der Caspasenaktivität untermauert werden. Hierzu wurden Tumore 30 min, 1 h und 4 h nach Behandlung mit Methylcellulose, sichtbarem Licht, Curcumin oder Curcumin/sichtbarem Licht entnommen und für Western Blot-Analysen aufgearbeitet. Gleiche Mengen Protein wurden im Western Blot gegen die aktivierte Form („cleaved“) Caspase-8 und -9 eingesetzt. Während die Proben nach 30 und 60 min keine Aktivierung der Caspasen zeigten (Ergebnisse nicht gezeigt), war 4 h nach Behandlung eine eindeutige Aktivierung der Caspase-9 nur nach Curcumin/Licht-Behandlung durch das verstärkte Erscheinen der „cleaved“-Fragmente zu erkennen (Abb. 3.6.5 a, oben). Die quantitativen Analysen von 4 unabhängigen Experimenten belegen eine signifikante um das 3-fache erhöhte Aktivierung dieses Enzyms (Abb.3.6.5 b). Zu diesem Zeitpunkt war keine Aktivierung der Casapse-8 detektierbar, was den *in vitro*-Ergebnissen zur frühen Caspase-9-Aktivierung entspricht. Der Nachweis von Actin diente in diesem Versuch zur Landungskontrolle.

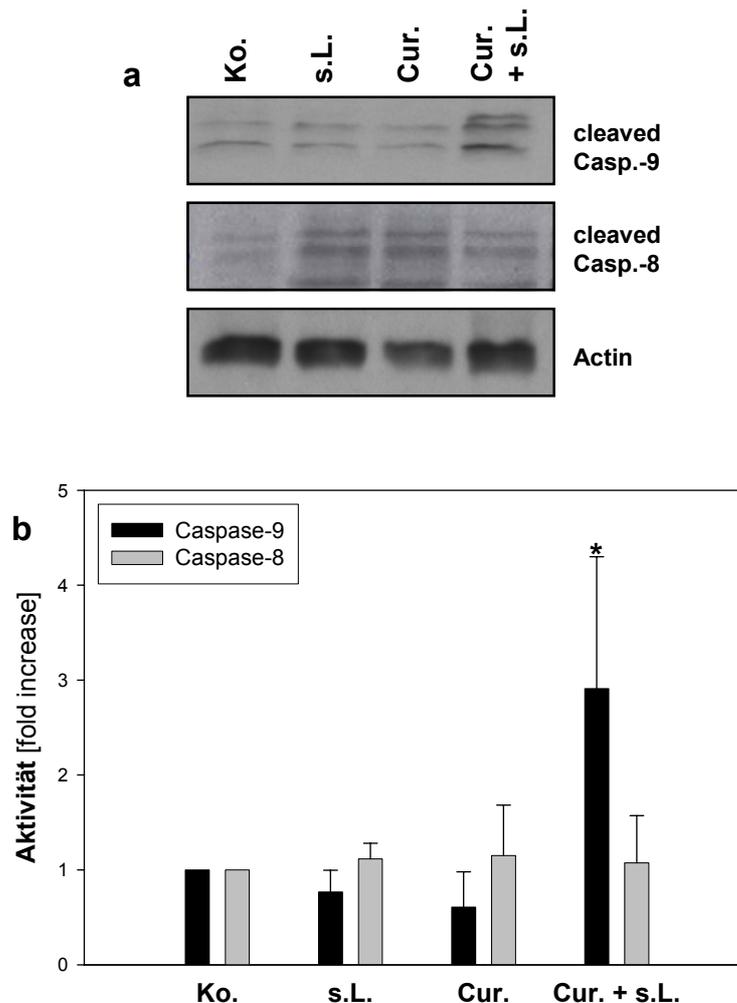


Abb. 3.6.5: CASPASEN-AKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG: A431-Xenograft-Tumormäuse wurden mit Methylcellulose (Kontrolle; Ko.), Methylcellulose/sichtbarem Licht (s.L.), Curcumin (Cur.) oder Cur./s.L.: behandelt. **(a):** Mittels Western Blot wurden cleaved (aktive) Caspase-9 sowie Caspase-8 und Actin (Ladungskontrolle) im Tumorgewebe nach 4 h detektiert. **(b)** Die Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ. Jeder Balken zeigt den Mittelwert von 4 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung, wobei die Werte auf die (auf 1 gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Die Signifikanz * ist $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.6.6. AKT, ERK1/2 UND EGF-R

Abschließend boten sich Western Blot-Untersuchungen weiterer „Targets“, bei denen *in vitro* eine Regulierung durch Curcumin/Licht belegt werden konnte, an. Hierzu wurden die gleichen Proben (siehe oben, nach 30 bzw. 60 min) im Western Blot gegen phospho-Akt, phospho-Erk1/2 und den aktivierten EGF-R eingesetzt. Während sich bei den nach 30 min entnommenen Tumoren kein Effekt zeigte (Ergebnisse nicht gezeigt), konnte 60 min nach Behandlung eine

eindeutige Dephosphorylierung von Erk1/2 sowie EGF-R nur nach Curcumin/Licht-Behandlung beobachtet werden. Die quantitative Analyse von 4 unabhängigen Experimenten belegte eine ca. 40%ige bzw. 60%ige Hemmung der Erk1/2- bzw. EGF-R-Phosphorylierung (Abb. 3.6.6). Auf die Aktivität von Akt ergab sich bei den untersuchten Zeitpunkten kein Effekt durch die beschriebenen Behandlungen. Die Actindetektion diente zur Ladungskontrolle.

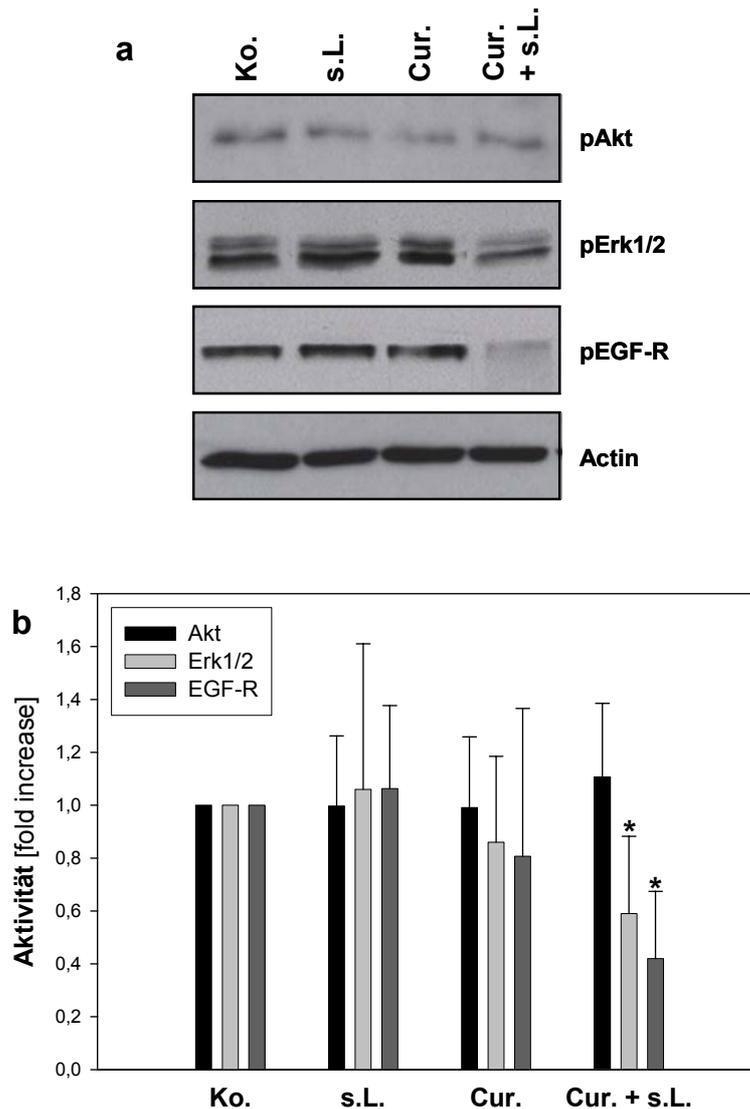


Abb. 3.6.7: Kinasen-AKTIVIERUNG NACH CURCUMIN/SICHTBARER LICHT-BEHANDLUNG: A431-Xenograft-Tumormäuse wurden mit Methylcellulose (Kontrolle; Ko.), Methylcellulose/sichtbarem Licht (s.L.), Curcumin (Cur.) oder Cur./s.L.: behandelt. **(a):** Mittels Western Blot wurden phospho(p)Akt, pErk1/2 pEGF-R und Actin (Ladungskontrolle) im Tumorgewebe nach 4 h detektiert. **(b)** Die Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms ImageJ. Jeder Balken zeigt den Mittelwert von 4 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung, wobei die Werte auf die (auf 1 gesetzte) Kontrolle bezogen sind. Die Signifikanz * ist $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

4. DISKUSSION

Bereits seit Jahrhunderten werden Extrakte der *Curcuma longa*-Pflanze in der traditionellen indischen Medizin aufgrund ihrer antioxidativen (Ruby et al., 1995; Xu et al., 1997) und antiinflammatorischen (Ruby et al., 1995; Joe et al., 1997; Lodha et al., 2000) Eigenschaften gegen eine ganze Reihe von Krankheiten eingesetzt. Seit einigen Jahren wächst auch unter westlichen Medizinern das Interesse an dem in der Pflanze enthaltenden Wirkstoff Curcumin, da es antiproliferative und apoptoseinduzierende Eigenschaften besitzt. Der Einsatz von Curcumin bei hyperproliferativen Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, ist jedoch aufgrund der geringen Resorptionsrate von oral aufgenommen Curcumin aus dem Magen-Darm-Trakt in das Blut-Kreislauf-System erschwert.

Angeregt durch die Studie von Dahl et al. (1989), in der gezeigt wurde, dass Curcumin mit Licht/UVA zur Abtötung von Bakterien führt, wurde die Idee entwickelt, den ZCL-Extrakt (Fa. A.S.A.C.) in humanen Hautzellen auf seine Wirkung zu überprüfen und durch Kombination mit Licht die Wirksamkeit geringer Mengen zu erhöhen. Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden die Ergebnisse, die im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigten, dass ZCL in geringen Konzentrationen nur in Kombination mit UVA-Licht eine Proliferationshemmung zur Folge hatte. ZCL alleine zeigte dabei ohne zusätzliche Bestrahlung keine Effekte. Die Annahme, dass Curcumin die Substanz ist, die diesen Effekt vermittelt, wurde in dieser Arbeit zunächst überprüft. Im Folgenden werden die Wirkungen von „geringen“ Mengen Curcumin (0,2-1 µg/ml) und Licht (UVA und sichtbarem Licht) mit in der Literatur beschriebenen Wirkungen von hohen Curcuminkonzentrationen *in vitro* und *in vivo* verglichen, um eine Aussage über die Wirkungsweise treffen zu können. Zunächst werden die zelluläre Aufnahme bzw. Verteilung sowie die Photoaktivierbarkeit und die antioxidativen Eigenschaften des Curcumins diskutiert.

4.1. ZELLULÄRE AUFNAHME UND VERTEILUNG VON CURCUMIN

Wie bisher beschrieben, wurde in vielen Veröffentlichungen eine Reihe von Wirkungen des Curcumins aufgedeckt, die diese Substanz für therapeutische Anwendungen interessant machen. Im Gegensatz dazu ist wenig über die zelluläre Aufnahme und Verteilung bekannt. In der vorliegenden Arbeit zeigten Untersuchungen zur Aufnahmekinetik sowie mikroskopische Betrachtungen, dass Curcumin schnell in die Zelle gelangt. Bei den Untersuchungen am CLSM war die Fluoreszenz direkt nach dessen Zugabe in der Zelle sichtbar. Die „Uptake“-Kurve zeigte ebenfalls eine rasche Zunahme in Zellextrakten mit einem Maximum nach 45-60 min.

Bei der Verteilung des Curcumins in HaCaT-Keratinocyten war eine vesikelartig angeordnete Fluoreszenz des Curcumins im Intrazellularraum unter Aussparung des Nukleus zu beobachten. Eine jüngere Studie von Kunwar et al. (2008), die ebenfalls durch Mikroskopie die Lokalisation des Curcumins in verschiedenen Zellen beschreibt, zeigte im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, dass Curcumin in der Zellmembran, im Zytoplasma sowie dem Nukleus zu finden war. Die Quantifizierung des Curcumins in verschiedenen Zellfraktionen ergab bei dieser Arbeit, dass das meiste Curcumin in der Zellmembran lokalisiert war. Curcumin ist ein β -Diketon, das zwei Ferulasäuremoleküle enthält, die über eine Methylenbrücke an Carbonatomen der Carboxylgruppe verbunden sind, (Sharma et al., 1976). Aufgrund dieser Struktur ist Curcumin eine lipophile Substanz, weshalb eine Anreicherung in der Membran sehr nahe liegend scheint. Bei den in der vorliegenden Arbeit an HaCaT-Zellen durchgeführten mikroskopischen Betrachtungen konnte nicht, wie von Kunwar et al. (2008) beschrieben, das Curcumin verstärkt in der Membran nachgewiesen werden, jedoch ist aufgrund der beschriebenen Eigenschaften anzunehmen, dass das Curcumin in den beobachteten Vesikeln dort in oder an der Vesikelmembran gebunden vorliegt. Die Messung der Fluoreszenzverschiebung von Curcumin in der Zelle belegt diese Annahme (Abb. 3.1.3 a). Eine Reihe von Publikationen zeigte eine hohe Affinität von Curcumin zu verschiedenen Proteinen wie BSA (Barik et al. 2003), HSA (Pulla

Reddy et al. 1999; Kunwar et al., 2006) und liposomalen Vesikeln (Kunwar et al., 2006) oder TX-Mizellen (Priyadarsini et al., 1997). Bei der Bindung an eben solche wurde ein „Blueshift“ des Emissionsspektrums mit Verschiebung des Maximum von 549 nm (in ethanolischer Lösung) nach 494 nm, wie er auch in dieser Arbeit in HaCaT-Zellen zu beobachten war, beschrieben (Barik et al. 2003). Darüber hinaus ist neben der Fluoreszenzverschiebung auch eine enorme Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen, was dadurch zu erklären ist, dass Curcumin in gebundener Form starrer ist und besser fluoreszieren kann.

Diese Befunde, zusammen mit unseren Beobachtungen, sprechen für die Hypothese, dass Curcumin in HaCaT-Keratinocyten in oder an den Membranen der beobachteten Vesikel angereichert vorliegt. Bei diesen Vesikeln könnte es sich um Organellen wie beispielsweise Endosome oder das Endoplasmatische Retikulum handeln. Wie Kunwar et al. (2008) desweiteren beschreibt, scheint die Aufnahme bei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich zu sein. So ist bei den untersuchten Zelllinien eine bessere Aufnahme von Curcumin in Tumorzellen wie ELA4 und MCF7 im Gegensatz zu Lymphocyten und NIH3T3 Zellen zu beobachten. Auch ist nur in den untersuchten Tumorzellen das Curcumin in der nukleären Fraktion zu finden.

Da bei den vorliegenden Untersuchungen an HaCaT-Zellen, Curcumin trotz seiner lipophilen Eigenschaften nicht vermehrt in der Zellmembran zu beobachten war, bleibt die Frage nach dem genauen Aufnahmemechanismus offen. Möglich ist, dass Curcumin aufgrund seiner hohen Affinität zu Vesikeln, in im Medium entstandene Mizellen aufgenommen wird. Studien belegen eine verbesserte Aufnahme von Curcumin in die Zelle, wenn es an HSA- oder liposomalen Vesikeln gebunden ist (Kunwar et al. 2006). In diesem Fall wäre die Aufnahme endozytotisch. Dennoch wäre das Curcumin nach Zugabe zunächst an der Zellmembran sichtbar, es sei denn der Prozess läuft sehr schnell ab. Desweiteren würde eine solche Aufnahme nur bei in Medium gelöstem Curcumin diesen Vorteil haben. In den Versuchen am CLSM war das Curcumin jedoch in PBS gelöst. Auch wenn der Aufnahmemechanismus nicht geklärt werden kann, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Curcumin, ob

durch einfache Diffusion oder gebunden in Mizellen, in die Zellen gelangt, wo es sich an oder in der Membran von Vesikeln/Organellen anreichert.

Anzumerken bleibt, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenz auch um fluoreszierende Metabolite handeln könnte. Bei der Folgerung, dass Curcumin keine Interaktion mit der DNA eingeht, da es nicht im Zellkern beobachtet werden kann, wird nicht berücksichtigt, dass nicht-fluoreszente Metabolite dort einen Effekt ausüben können. Da jedoch, wie im Folgenden noch beschrieben wird, die Anregbarkeit/Fluoreszenz des Curcumins für seine proliferationshemmende Wirkung notwendig ist, ist zu bezweifeln, dass nicht-fluoreszente Metabolite, insofern sie entstehen, einen Effekt ausüben. Außerdem ist durch die Bindung des Curcumins an die Membran oder Membranproteine und die verstärkte Fluoreszenz (Abb. 3.1.3 a) eher eine Stabilisierung des Curcumins und keine Metabolisierung in dem Zeitraum, in dem die Beobachtungen stattgefunden haben, zu erwarten. So haben Studien von Wang et al. (1997) belegt, dass ein schneller Zerfall von Curcumin in Puffer oder Medium, durch die Zugabe von 10% Serum stark reduziert wird. Der beobachtete Curcuminabbau in dieser Studie betrug in Medium/Serum-Lösung sowie humanem Blut lediglich 20% in den ersten beiden Stunden. In pharmakokinetischen Studien mit Nagetieren wurde eine Curcuminnachweisbarkeit im Plasma innerhalb von 6 h (Pan et al., 1999) bis 24 h (Ravindranath et al., 1980) dokumentiert.

Die Ergebnisse der Spektralverschiebung von Curcumin in der Zelle deuten wie schon diskutiert darauf hin, dass Curcumin gebunden vorliegt. Die ebenfalls beschriebene Bindung von Curcumin an Serumalbumine (Pulla Reddy et al., 1999; Barik et al., 2003; Kunwar et al., 2006) sowie dessen lipophile Eigenschaft lassen schlussfolgern, dass Curcumin möglicherweise eine Affinität zu verschiedenen weiteren Proteinen hat. So ist es möglich, dass Curcumin durch Bindung an regulatorische Proteine, eventuell auch Membranproteine, Signalkaskaden induziert oder hemmt und somit eine antiproliferative Zellantwort auslöst.

4.2. PHOTOAKTIVIERBARKEIT VON ZCL UND CURCUMIN

Vorangegangene Ergebnisse meiner Diplomarbeit zeigten, dass der 10% Curcuminoide enthaltende ZCL-Extrakt in Konzentrationen von 2-10 µg/ml in Kombination mit UVA die Proliferation in Keratinozyten ZCL-konzentrationsabhängig hemmt. Ohne zusätzliche Bestrahlung war keine Proliferationshemmung bei diesen ZCL-Mengen zu beobachten.

Vergleichende Versuche mit reinem Curcumin belegen, dass dieser Effekt in ähnlicher Intensität bei angepasster Curcuminkonzentration (0,2-1 µg/ml, d.h. Curcumin- entspricht Curcuminiodmenge im Extrakt) erreicht wird. So ist zunächst auszuschließen, dass andere Komponenten des Extrakts diesen Effekt vermitteln. Bei den aus *Curcuma longa* extrahierten Curcuminoiden handelt es sich in der Regel um Curcumin (77%), Demethoxycurcumin (17%) und Bisdemethoxycurcumin (6%; zusammengefasst in Huang et al., 1994). Unsere Ergebnisse belegen demnach, dass die verschiedenen Curcuminoide eine vergleichbar starke Wirkung auf die Hemmung der Proliferation haben. Zur Wirksamkeit der drei Analoga sind in der Literatur verschiedene Erkenntnisse beschrieben. In manchen Systemen zeigte sich Curcumin als das potenteste Analogon (Sreejayan und Rao, 1996; Ahsan et al., 1999), während in anderen Systemen Demethoxycurcumin eine höhere Aktivität ausübte (Syu et al., 1998; Thapliyal und Maru, 2001). Es gibt auch Andeutungen, dass erst die Mischung aller einen optimalen Effekt zur Folge hat (Sreejayan und Rao, 1997; Huang et al., 1998)

Bei den Curcuminoiden handelt es sich um konjugierte Diarylheptanoide. Aufgrund ihres konjugierten Doppelbindungssystems können Curcuminoide Licht absorbieren und besitzen eine intensiv gelbe Farbe. Die Fähigkeit der Lichtabsorption bietet den Ansatz zur Erklärung der Photoaktivierbarkeit. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit damit belegt werden, dass nicht-fluoreszentes (ausgebleichtes) Curcumin keinen Effekt bei beschriebener Behandlung hatte. Desweiteren handelt es sich auch bei den verwendeten Lichtquellen, beim UVA (315-400 nm) und sichtbaren Licht (400-550 nm), um Licht, dessen Spektren nahe oder im Absorptionsmaximum des Curcumins (425 nm) liegen. Beim Vergleich der Spektren liegt die Annahme nahe, dass

sichtbares Licht einen besseren bzw. stärkeren Effekt zur Folge hat. Bei der Einführung dieser Bestrahlungsart stand jedoch im Vordergrund, die Dauer mit der durch die Röhren gegebenen Intensität so anzupassen, dass ein ähnlicher Curcumin-konzentrationsabhängiger Effekt, wie mit UVA erreicht wird; die Dosen wurden dabei nicht berücksichtigt. Bei diesen Untersuchungen hat sich eine Bestrahlung von 5 min mit 10 x 40 W (5500 lx) im Abstand von 45 cm als optimal ergeben.

Der Zusammenhang von Photoaktivierbarkeit durch Lichtabsorption wird auch dadurch bewiesen, dass eine Kombination von UVB mit einem Spektrum von 290-320 nm keinen Effekt auf die Proliferation hatte (Dujic et al., 2007).

Dass zum Zeitpunkt der Bestrahlung die für die Proliferationshemmung verantwortlichen Mechanismen in der Zelle induziert werden, belegen die verschiedenen Varianten der Behandlung (s. Abb. 3.2.4). So wurde gezeigt, dass eine Nachinkubation mit Curcumin nach Bestrahlung keine stärkeren Effekte zur Folge hat und die Anwesenheit von Curcumin während der Bestrahlung die Proliferationshemmung verstärkt.

Zusammenfassen lässt sich, dass Curcumin in Konzentrationen von 0,2 -1 µg/ml in Kombination mit UVA oder sichtbarem Licht die Proliferation in HaCaT- sowie primären Keratinozyten hemmt. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als verschiedene *in vitro*-Studien gezeigt haben, dass Mengen von 10 µM bis zu 150 µM (3,7-55 µg/ml) notwendig sind, um pharmakologische Effekte zu erzielen (Choudhuri et al, 2002; Jobin et al, 1999). Die Befunde dieser Arbeit belegen, dass die Problematik der geringen Bioverfügbarkeit im Organismus durch den Einsatz von Licht gelöst werden könnte.

Die bisherige Spekulation bezüglich der Bindung von Curcumin an (womöglich regulatorische) Proteine und die Induktion einer antiproliferativen Zellantwort lässt sich erweitern: Zusätzliche Bestrahlung könnte das an das Curcumin gebundene Protein durch einen Energietransfer des absorbierenden Curcumins zum Zeitpunkt der Bestrahlung inhibieren. Dies würde auch erklären, warum eine, in dieser Arbeit getestete, zusätzliche Nachinkubation von Curcumin nach der Bestrahlung keine weiteren Effekte zur Folge hatte. So ließe sich auch die

Wirksamkeit einer Behandlung mit höheren Konzentrationen an Curcumin (ohne zusätzliche Bestrahlung, wie sie in den meisten Publikationen durchgeführt wurde) erklären, wenn man annimmt, dass das Curcumin lediglich durch Bindung das Protein auf Dauer inhibiert. Bei dieser Theorie hätte die kombinierte Curcumin/Licht-Behandlung nicht nur den Vorteil einer verstärkenden Wirkung bei niedrigen Konzentrationen (aufgrund der schlechten Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt), sondern würde darüber hinaus eine schnellere und kontrollierbarere Induzierbarkeit der Proliferationshemmung ermöglichen.

4.3. ANTIOXIDATIVE EIGENSCHAFTEN VON CURCUMIN

Die angewandte Behandlung mit Curcumin und Licht, insbesondere UVA, und die dadurch induzierte Proliferationshemmung erinnern an die photosensibilisierenden Eigenschaften des Psoralen. Bei der sog. PUVA (Psoralen plus UVA)-Therapie werden phototoxische Eigenschaften des Psoralen, verursacht durch die Entstehung von freien Radikalen, bei hyperproliferativen Hauterkrankungen genutzt. Um zu untersuchen, ob Curcumin einen vergleichbaren radikalbildenden Effekt hat, wurde die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), in dem Fall von Superoxiden und Hydrogenperoxiden, untersucht. Tatsächlich zeigte sich keine durch Curcumin induzierte Bildung dieser Radikale. Im Gegensatz zur PUVA konnte bei einer Bestrahlung mit erhöhter UVA-Dosis (20 J/cm^2) eine UVA-induzierte Radikalbildung durch Curcumin gehemmt werden.

Tatsächlich gilt Curcumin als eine antioxidative Substanz (Ruby et al., 1995; Xu et al., 1997). Antioxidantien besitzen in der Regel eine phenolische funktionelle oder eine β -Diketon-Gruppe. Die einzigartige Struktur des Curcumins weist beides auf und deutet schon damit auf eine starke antioxidative Fähigkeit hin. Dabei stehen sich verschiedene Theorien des radikalfangenden Mechanismus

gegenüber. Während Jovanovic et al. (2001) zum Ergebnis kommen, dass Curcumin ein Proton von der zentralen Methylenbrücke überträgt, beschreiben andere Studien, dass die phenolischen Gruppen für die radikalfangenden Eigenschaften verantwortlich seien (Barclay et al., 2000; Priyarsini et al. 2003). Der antioxidativen Wirkung werden ebenfalls membranschützende Eigenschaften vor peroxidativen Schäden zugesprochen, da diese durch freie Radikale vermittelt werden (zusammengefasst in Priyadarsini et al., 1997).

Die Methodik der ROS-Bestimmung wurde auch dazu genutzt, um den Einfluss verschiedener UVA-Dosen auf die Bildung freier Radikale, zu bestimmen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Dosis von 1 J/cm^2 , wie sie in dieser Arbeit in der mit Curcumin kombinierten Behandlung eingesetzt wurde, keine oxidativen Wirkungen zur Folge hat.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Curcumin in HaCaT-Keratinocyten, ebenso wie es bei anderen Zellen in der Literatur beschrieben wird, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verhindert.

4.4. CURCUMIN/LICHT INDUZIERT EINE MITOCHONDRIAL VERMITTELTE APOPTOSE

Die bisher diskutierten Ergebnisse belegen eine durch Curcumin/Licht gehemmte Proliferation von HaCaT-Keratinocyten, wie sie auch mehrfach in der Literatur bei anderen Zellen unter Verwendung höherer Curcuminkonzentrationen (und ohne zusätzliche Bestrahlung) beschrieben wird. Dabei bleibt die Frage offen, ob bei der Behandlung mit zusätzlicher Bestrahlung dieselben Mechanismen in der Zelle eingeschaltet werden. Da bekannt ist, dass Curcumin apoptotisch wirkt, bot es sich an, zu untersuchen, ob die Behandlung mit geringen Mengen Curcumin und Licht (neben der Proliferationshemmung) auch die Apoptose in gleicher Weise induziert.

Zunächst galt es, eine toxische Wirkung durch die beschriebene Behandlung mittels Messung der LDH im Überstand auszuschließen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass weder Curcumin allein, noch in Kombination mit UVA in den angegebenen Konzentrationen Einfluss auf die Membranintegrität hat. Tatsächlich wurde bei der Verabreichung von Curcumin in klinischen Studien keine dosislimitierende Toxizität beobachtet. So wurde Patienten Curcumin bis zu 12 g/Tag ohne Nebenwirkungen verabreicht (Shoba et al., 1998; Chen et al., 2001; Lao et al., 2006). Diese Erkenntnisse bieten die Grundlage zur Untersuchung der Apoptoseinduktion, da eine nekrotische Wirkung ausgeschlossen werden kann, und machen die Substanz für therapeutische Zwecke umso interessanter.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Curcumin und Licht zur Zellkernfragmentierung, Freisetzung von Cytochrom c und der Aktivierung von Caspase-8 und -9 in HaCaT-Zellen führte. Da Curcumin wie schon gezeigt in die Zelle aufgenommen wird, ist eine intrinsische Induktion der Apoptose nahe liegend. Tatsächlich deuten die Ergebnisse der Cytochrom c-Freisetzung, wie auch die Zeitpunkte der Aktivierung der Initiatorcaspasen beider Apoptose-„pathways“ auf eine mitochondrial vermittelte Apoptose hin. Caspase-9 (intrinsische Initiatorcaspase) lag durch die Behandlung mit Curcumin und Licht, bereits nach 1,5 h in aktiver Form vor, während Caspase-8 (extrinsische Initiatorcaspase) erst nach 2 h aktiviert wurde. Nach einer Cytochrom c-Freisetzung wird die Caspase-9 über Apaf-1 rekrutiert und im sog. Apoptosom autoproteolytisch prozessiert und somit aktiviert (Pan et al., 1998).

Auch in der Literatur liegen, wie schon im Einleitungskapitel beschrieben, einigen wenigen Publikationen zur extrinsischen Apoptoseinduktion durch Curcumin eine große Anzahl an Befunden gegenüber, die eine intrinsisch vermittelte Apoptose belegen. Dabei ist beschrieben, dass durch Curcumin in einer Reihe von Zellen, wie epithelialen Brustzellen (Kim et al., 2001; Choudhuri et al., 2002), Lungenkrebszellen (Radhakrishna et al., 2004) oder Darmadenokarzinomzellen (Song et al., 2005), antiapoptotische Bcl-2-Proteine herunterreguliert, während die proapoptotischen Gegenspieler der Proteinfamilie hochreguliert werden. Die Cytochrom c-Freisetzung und die

Aktivierung der Caspase-9, wie sie in dieser Arbeit nach Curcumin/Licht-Behandlung gezeigt werden konnten, wurden ebenfalls in der Literatur beim Einsatz hoher Curcuminkonzentrationen (ohne zusätzliche Lichtbehandlung) beschrieben (Bielak-Mijewska et al., 2004; Rashmi et al., 2003 und 2005 Chakraborty et al., 2006).

An dieser Stelle wird schon ersichtlich, dass das Wirkprinzip von Curcumin in Kombination mit Licht, der in der Literatur beschriebenen Wirkung von Curcumin allein (in höheren Konzentrationen) entspricht.

Die Tatsache, dass auch einige wenige Publikationen eine extrinsisch vermittelte Apoptose durch beispielsweise FasL-Rezeptoraggregation belegen (Bush et al., 2001), deutet darauf hin, dass die Apoptoseinduktion zell- und/oder gewebsspezifisch unterschiedlich ablaufen könnte. Auch ist an dieser Stelle zu bedenken, dass womöglich ein „upstream“ liegender Angriffspunkt des Curcumins, der eine gegen die Zellproliferation oder das Zellwachstum gerichtete Zellantwort vermittelt, in der Zelle Apoptose induziert. Dabei würden die Zellen art- oder gewebespezifisch ein gleiches Signal unterschiedlich transduzieren.

Die kürzlich entdeckte Apoptoseinduktion durch eine fehlerhafte „ER stress response“ (zusammengefasst in Szegezi et al., 2006), lässt die Spekulation zu, dass im Allgemeinen Fehlregulationen in Organellen durch noch nicht bekannte Kaskaden Apoptose auslösen können. So wurde auch belegt, dass durch eine Permeabilisierung der lysosomalen Membran ebenfalls Apoptose initiiert werden kann (zusammengefasst in Guicciardi et al., 2004). Dabei wird angenommen, dass langsames Auslaufen lysosomaler Inhalte zur Apoptose führt, während eine generelle Lysosomruptur in der Nekrose der Zelle mündet (Kagedal, Zhao et al., 2001).

Die schon diskutierte Anreicherung des Curcumins an der Membran von Organellen könnte dort auf solche Weise eine Dysregulation und somit Apoptoseinitiierung zur Folge haben. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bei der am ER induzierten Apoptose ebenfalls Proteine der Bcl-2 Familie, die durch Curcumin reguliert werden (s.o.), beteiligt sind (zusammengefasst in

Hetz und Glimcher, 2008). Auch wenn die Apoptosemechanismen am ER und den Lysosomen noch nicht völlig aufgeklärt sind, konnte gezeigt werden, dass die dort initiierte Apoptose im weiteren Verlauf über die Mitochondrien transduziert wird (zusammengefasst in Guicciardi et al., 2004; Szegezi et al., 2006).

Zusammenfassen lässt sich, dass Curcumin/Licht in HaCaT-Keratinocyten Apoptose induziert, wobei der mitochondriale Apoptoseapparat eingeschaltet wird. Dies belegen die Cytochrom c-Freisetzung sowie die frühe Aktivierung der Caspase-9. Die Beobachtungen, dass Curcumin in diesen Zellen vesikelartig (also vermutlich in Organellen angereichert) vorliegt, lassen in Anbetracht der kürzlich entdeckten weiteren Apoptose-„pathways“ an Organellen (ER, Lysomen) vermuten, dass dort durch Dysregulation Apoptose initiiert werden kann. Diese würde dann weiter über den mitochondrialen Apoptoseapparat durch Cytochrom c-Freisetzung und Caspase-9-Aktivierung (wie es bei Curcumin/Licht gezeigt wurde) transduziert werden. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Curcumin/Licht-Behandlung direkt auf die mitochondriale Apoptose oder andere Mechanismen, die diese begünstigen, einwirkt. Wie schon im Einleitungsteil beschrieben, können auch wachstumsassoziierte Kinasekaskaden einen Einfluss auf die Apoptose haben. Wie Curcumin/Licht auf solche wirkt, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.5. CURCUMIN/LICHT HEMMT DIE PROLIFERATIONS-ASSOZIIERTE SIGNALTRANSDUKTION

Nachdem dargelegt wurde, dass Curcumin/Licht in HaCaT-Zellen die Proliferation hemmt und Apoptose induziert, war es interessant zu untersuchen, ob die Behandlung einen Effekt auf proliferationsassoziierte Faktoren hat. Von besonderem Interesse war dabei die Untersuchung von „Targets“ deren Signalkaskaden, wie in Kapitel 1.2. beschrieben, an die Apoptosesignalwege gekoppelt sind.

Ein solches „Target“ ist die Proteinkinase PKB/Akt, die als ein entscheidender Überlebensfaktor der Zelle gilt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kinase durch Curcumin in Zusammenarbeit mit UVA oder sichtbarem Licht bereits nach 15 min gehemmt vorlag. Bei dieser sowie allen weiteren Untersuchungen, bei denen eine Hemmung aufgezeigt wurde, war es notwendig, die Zellen zusätzlich positiv zu stimulieren, um die Inhibierung in Form einer Dephosphorylierung sichtbar zu machen. So blieb eine durch TGF- α -induzierte Phosphorylierung nur bei den mit Curcumin und Licht behandelten Proben aus.

PKB/Akt ist eine wachstumsassoziierte Kinase, die antiapoptotisch wirkt, indem sie beispielsweise Bad, ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, durch Phosphorylierung inhibiert (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Die Hemmung dieser Kinase durch Curcumin/Licht könnte somit die Aktivierung von Bad begünstigen. Wie schon im Einleitungskapitel beschrieben löst eine Störung der Balance von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien aus. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung der Caspase-9 (Pan et al., 1998). Die Caspase-9 ist ebenfalls ein Substrat von PKB/Akt, dass durch Phosphorylierung gehemmt wird (Cardone et al., 1998). Die Inhibierung von Akt durch Curcumin/Licht könnte zusätzlich die mitochondriale Apoptose, welche wie gezeigt durch Curcumin (und Licht) induziert wird, durch die Aktivierung der Caspase-9 fördern.

Der hemmende Einfluss von Curcumin auf die PKB/Akt wurde auch an humanen Prostatakrebszellen (Chaudhary and Hruska, 2003), humanen HBL100- und MDA-MB-468-Brustzelllinien (Squires et al., 2003) mit höheren Konzentrationen ohne zusätzliche Bestrahlung beschrieben.

Weitere Untersuchungen der Curcumin/Licht-Wirkung wurden an der MAP-Kinase Erk1/2 durchgeführt. Während andere MAP-Kinasen auf Stress reagieren und Apoptose induzieren können, wird Erk1/2 durch Wachstumsfaktoren aktiviert und fördert in der Zelle das Wachstum, die Differenzierung und die Entwicklung (Lewis et al., 1998; Cobb et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte wie im Fall von PKB/Akt gezeigt

werden, dass Curcumin und UVA oder sichtbares Licht eine TGF- α -vermittelte Aktivierung dieser Kinase schon nach 15 min unterdrücken. Diese Inhibierung kann in ähnlicher Weise wie bei PKB/Akt beschrieben die mitochondriale Apoptose fördern. So gewährleistet Erk1/2 die Aktivierung der p90RSK (Blenis, 1993), welche durch Phosphorylierung ebenfalls das proapoptotische Bad hemmt (Tan et al., 1999; Lizcano et al., 2000).

In der Literatur finden sich Arbeiten, die gleichermaßen eine Inhibierung von Erk1/2 in Brustzelllinien (Squires et al., 2003) wie auch in pankreatischen Stellatezellen (Masamune et al., 2006) bei Behandlung mit höheren Dosen Curcumin dokumentieren. Im Gegensatz dazu beschreiben Collett und Campbell (2004), dass humane HCT116-Darmkrebszellen durch SAPK/JNK-Aktivierung auf Curcumin reagieren, wobei Erk1/2 in diesen Zellen durch Curcumin nicht reguliert wird.

Anders als bei den bisher gezeigten Ergebnissen zur Wirkung von Curcumin/Licht auf Kinasen ergab sich bei der MAP-Kinase p38 nach 15 min eine Aktivierung durch diese Behandlung in HaCaT-Zellen. P38 gilt als Stresskinase, und wird z.B. durch UV-Bestrahlung, Osmo- oder Hitzestress aktiviert. Tatsächlich zeigte sich anders als bei den bisherigen Befunden, dass die Kinase schon durch die Bestrahlung mit 1 J/cm² UVA eine leichte Aktivierung erfährt, welche durch zusätzliche Curcuminbehandlung verstärkt wird. In diesem Fall scheint Curcumin wie ein Photosensitizer auf p38 zu wirken.

Während die MAP-Kinase Erk1/2 aktiv die Apoptose hemmt, ist die Aktivierung der p38-Kinase meistens mit einer Apoptoseinduktion assoziiert (zusammengefasst in Jinlian et al. 2007). Vor allem in Keratinozyten wird p38 in Folge von UVB-Bestrahlung phosphoryliert und bewirkt durch die Translokation von Bax in die Mitochondrienmembran die Freisetzung von Cytochrom c (van Laethem et al., 2004). Eine solche Wirkungsweise zur Induktion der Apoptose ist bei der Behandlung von Curcumin/UVA, vor allem unter dem Aspekt der vermuteten photosensibilisierenden Eigenschaft von Curcumin auf die p38-Kaskade, zunächst gut vorstellbar. Jedoch beschreiben Bachelor und Bowden (2004) in einer Studie zur Wirkung von UVA-Bestrahlung auf Keratinozyten, dass p38 durch posttranskriptionelle Regulation des antiapoptotischen Bcl-XL

das Überleben der Zelle fördert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Befunde zur Wirkung von p38 auf die Apoptoseinduktion in Keratinozyten ist es schwierig die Aktivierung dieser Kinase durch Curcumin und Licht einzuordnen.

Möglicherweise spielt die Regulierung der p38 auch gar keine Rolle bei der Curcumin-induzierten Apoptose, worauf gegensätzliche Befunde in der Literatur deuten. So ist beispielsweise die Aktivierung der p38 mit proapoptotischen Effekten an humanen Neutrophilen durch hohe Curcuminkonzentrationen ohne zusätzliche Bestrahlung beschrieben (Hu et al. 2005), während in HT29-Zellen eine solche Behandlung eine Hemmung der p38 zur Folge hat (Moon et al., 2006).

Bei der Untersuchung der Wirkung von Curcumin/UVA auf die Proteinkinase C wurde zunächst ein phosphospezifischer PKC(pan)-Antikörper, der gegen alle Isoformen der PKC gerichtet ist, eingesetzt. Die Ergebnisse wiesen auch hier nur dann eine Dephosphorylierung der PKC auf, wenn die Zellen mit Curcumin und UVA behandelt wurden. Um diese Hemmung auf bestimmte Isoformen eingrenzen zu können, wurden die Proben im Anschluss gegen die phosphospezifische PKC α , β und δ geblottet. Diese sind wie in der Einleitung beschrieben an der Differenzierung der Keratinozyten beteiligt. Während Curcumin und UVA keinen Einfluss auf die PKC α und β ausübten, zeigte sich bei der PKC δ , ein Dephosphorylierungsmuster, wie es mit dem pan-Antikörper PKC der Fall war.

Die Hemmung der PKC kann wie bei der Inhibierung der anderen beschriebenen Kinasen das Gleichgewicht der Zelle insofern stören, als die Zellantwort in Richtung Apoptose abläuft. Bei der PKC kommt die Isoenzym-Spezifität der Substratphosphorylierung wahrscheinlich überwiegend durch regulierte subzelluläre Kolokalisation von PKC-Isoformen und Substraten zustande. Dadurch können die Signaltransduktion ebenso wie die daraus resultierenden Effekte in der Zelle sehr unterschiedlich ausfallen, so dass die Hemmung einer bestimmten Isoform, hier der PKC δ (durch Curcumin/Licht), schwer interpretiert werden kann.

Frühe Arbeiten mit hohen Curcuminkonzentrationen ohne zusätzliche Bestrahlung beschreiben Curcumin als einen PKC-Inhibitor *in vitro* (Liu et al., 1993) ebenso wie *in vivo* (Reddy und Aggarwal, 1994). Dagegen zeigen neuere

Arbeiten, dass Curcumin beispielsweise in menschlichen Monozyten die PKC, insbesondere die PKC δ , durch Phosphorylierung stimuliert (Rushworth et al., 2006).

Die vorgestellten Hemmungen oder (im Fall der p38) die Aktivierung der verschiedenen Kinasen durch Curcumin/Licht wurden in den vorangegangenen Betrachtungen im Hinblick auf eine Beteiligung an der Apoptoseinduktion diskutiert. Die Tatsache jedoch, dass man in der Literatur neben den bestätigenden Befunden auch gegensätzliche Effekte von Curcumin auf diese „Targets“ findet, legt die Vermutung nahe, dass Curcumin zell- und/oder gewebsspezifisch unterschiedlich wirken kann. Auch ist an dieser Stelle zu bedenken, dass es möglicherweise ein „upstream“ gelegenes „Target“ des Curcumins gibt, das eine gegen die Zellproliferation gerichtete und/oder proapoptotische Zellantwort vermittelt. Dabei würden die Zellen gewebe- oder artspezifisch ein gleiches Signal unterschiedlich transduzieren, was die bisherigen gegensätzlichen Befunde in der Literatur erklären könnte.

Unter diesem Aspekt wurde im weiteren Verlauf das Phosphorylierungsmuster des EGF-Rezeptors unter dem Einfluss von Curcumin/Licht untersucht. Wie im Einleitungskapitel beschrieben werden die Signalkaskaden aller untersuchten „Targets“ (PKB/Akt, MAPK und PKC) über den EGF-Rezeptor reguliert. Es stellte sich heraus, dass EGF-R ebenfalls durch die Behandlung mit Curcumin in Kombination mit UVA oder sichtbarem Licht trotz einer positiven Stimulation inaktiv bleibt. Gleichermäßen wurde in einer Reihe von Studien an verschiedenen Zellen gezeigt, dass dieser Rezeptor in seiner Aktivität durch Curcumin in hohen Konzentrationen ohne zusätzliche Behandlung gehemmt wird (Kortula und Kumar 1994; Squires et al., 2003; Kim et al., 2006).

Mit der Hemmung des EGF-R zeigt sich ein frühes, möglicherweise sogar erstes, „Target“ von Curcumin, da es auf Rezeptorebene liegt und eine schnelle Regulation erfährt. Eine Interaktion von Curcumin ist denkbar, da wie schon weiter oben diskutiert eine Anreicherung von Curcumin in der Membran aufgrund der lipophilen Eigenschaften nicht auszuschließen ist. Da Curcumin schnell in die Zelle aufgenommen wird und nicht im Extrazellularraum verbleibt,

wäre eine mögliche Interaktion an der zytosolischen Tyrosinkinase-Domäne vorstellbar. Die Hemmung von PKB/Akt, Erk1/2 und PKC durch Curcumin/Licht lässt sich durch die Inhibierung des EGF-R erklären, da diese Kinasen in aktivierender Weise von diesem reguliert werden. So kann auch schon der Rezeptor über die verschiedenen Kinasen, deren Kaskaden die Apoptose verhindern, bei Hemmung die Apoptose begünstigen oder sogar induzieren. Inwiefern in umgekehrter Weise eine Apoptoseinduktion am Mitochondrium oder, wie ebenfalls angenommen, an Organellen einen Einfluss auf den EGF-R ausüben könnte, ist nicht bekannt. Dass jedoch die Apoptose selbst der Auslöser der EGF-R-Inhibierung ist, lässt sich auszuschließen, da die Dephosphorylierung des EGF-R sehr früh (nach 15 min) erfolgte. Überhaupt sind verschiedene Angriffspunkte des Curcumins (und Licht) vorstellbar, die die Apoptose induzieren und/oder die Proliferation hemmen. Dies würde auch die in der Literatur beschriebene unterschiedliche Regulierung von Kinasen und Caspasen erklären, wenn man bedenkt, dass dennoch in allen Fällen Apoptose und Proliferationshemmung als letztendliche Zellanwort erzielt werden.

Die Annahme, dass die durch Curcumin induzierte Wirkung unterschiedlich transduziert wird, aber am Ende der Kaskade in einer gleichen Zellantwort mündet, belegen auch die folgenden Ergebnisse zur Wirkung von Curcumin und Licht auf NF- κ B. Bei NF- κ B handelt es sich um einen wachstums- und proliferationsassoziierten Transkriptionsfaktor und somit um ein spätes „Target“. Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl im Luciferase-Reporter-Assay wie auch EMSA gezeigt werden, dass durch Curcumin und Licht die Aktivität des Transkriptionsfaktors in HaCaT-Zellen supprimiert wird. Der durch TNF- α stimulierte Kernimport von NF- κ B konnte gleichermaßen durch Curcumin/Licht unterdrückt werden, während das Inhibitorprotein I κ B vermehrt im Zytosol zu finden war. Es ist bekannt, dass Curcumin in den Konzentrationen von 50-150 μ g/ml den Transkriptionsfaktor in verschiedenen Zellen hemmt (Singh and Aggarwal, 1995; Jobin et al., 1999; Bharti et al., 2003; Aggarwal et al., 2004). Da NF- κ B beispielsweise durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird und zum Überleben der Zelle („survival pathway“) beiträgt (Brockman et al., 1995; Traenckner et al., 1995), ist seine Hemmung aufgrund der Inhibierung des EGF-R und der nachgeschalteten Kinasen das erwartete Ergebnis.

Die NF- κ B-Signalkaskade übt des weiteren einen antiapoptotischen Effekt aus, indem das NF- κ B die Transkription von IAP („inhibitor of apoptosis protein“) stimuliert, welches die Effektorcaspasen und Caspase-9 blockiert (Datta et al., 1999). So könnte auch die Suppression des NF- κ B zur mitochondrial vermittelten Apoptose beitragen.

Im Ergebniskapitel zur Wirkung von Curcumin/Licht auf die Signaltransduktion wurden zusätzliche Befunde zur Wirkung von ZCL/Licht im Vergleich zu Curcumin/Licht auf die MAPK JNK sowie PTEN dargestellt. Bei allen anderen untersuchten „Targets“ stellten sich keine Unterschiede in der Wirkung von ZCL zu Curcumin (in Zusammenwirkung mit Licht) heraus. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass JNK durch ZCL/UVA aber nicht durch Curcumin/UVA gehemmt wird. PTEN, ein Gegenspieler von PKB/Akt, lag nach Behandlung von ZCL und UVA in aktivierter, in diesem Fall dephosphorylierter, Form vor, während Curcumin/UVA keinen Einfluss auf PTEN ausübte. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass an der Regulierung der Kinasen andere Curcuminoide oder Komponenten des Extrakts beteiligt sind. Wie schon angeführt gibt es Studien, die belegen, dass Demethoxycurcumin im Allgemeinen eine höhere Aktivität ausübt (Syu et al., 1998; Thapliyal und Maru, 2001) oder erst die Mischung aller Curcuminoide einen optimalen Effekt zur Folge hat (Sreejayan und Rao, 1997; Huang et al., 1998). Dies könnte bei diesen beiden „Targets“ tatsächlich der Fall sein.

Zusammenfassend lässt sich, dass Curcumin/Licht in HaCaT-Keratinocyten antiapoptotische, proliferations- und wachstumsassoziierte Kinasen wie PKB/Akt, Erk1/2 und PKC hemmt, während die an eine Apoptoseinduktion geknüpfte Stresskinase p38 durch diese Behandlung aktiviert wird. EGF-R, ein allen untersuchten Kinasen gemeinsamer Rezeptor und ein mögliches erstes „Target“, bleibt ebenfalls trotz positiver Stimulierung bei einer Curcumin/Licht-Behandlung inaktiv. Inwiefern die Regulation dieser Kinasen direkt auf die Apoptose wirkt, lässt sich aufgrund des erhaltenen inhibierenden Effekts nicht durch die klassischen Methoden untersuchen. Bei Betrachtung der Kopplung der Kinasekaskaden an die Apoptose-„pathways“ wird deutlich, dass eine Hemmung die Balance der Zelle in Richtung Apoptose, vor allem

mitochondrialer Art, steuern kann. So lässt sich auch die Suppression des späten „Targets“ NF- κ B durch Curcumin/Licht aufgrund seiner antiapoptotischen Wirkung in das Schema eingliedern. Wie schon im Zusammenhang der Apoptose diskutiert, weisen die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Befunde auf multiple Angriffspunkte des Curcumins (und Licht) hin, bei denen im Endeffekt immer die Apoptose gefördert und die Proliferation gehemmt werden.

4.6. CURCUMIN/LICHT HEMMT DAS TUMORWACHSTUM IM XENOGRAFT-TUMORMODELL UND INDUZIERT APOPTOSE

Die Apoptoseinduktion und Hemmung der Zellproliferation ohne toxische Nebeneffekte durch Curcumin (und Licht), machen die Substanz für den therapeutischen Einsatz insbesondere bei Krebserkrankungen interessant. Als nächstes sollte gezeigt werden, ob die *in vitro* beobachteten Wirkungen, *in vivo* in einem Xenograft-Tumor-Mausmodell gleichermaßen induziert werden. Da es sich bei den Tumorxenografts in dem untersuchten Modell (s. Kap. 2.15.) um A431-Zellen handelt, wurde zunächst die Wirkung von Curcumin/Licht im Bezug auf Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und toxischer Wirkung an diesen Zellen in Kultur getestet. Die Ergebnisse zeigten ebenso wie bei HaCaT-Keratinozyten, dass Curcumin in Zusammenarbeit mit UVA oder sichtbarem Licht die Proliferation hemmt und Apoptose induziert, ohne dabei die Integrität der Membran zu beeinflussen. So konnte auch an einer weiteren Zellspezies bewiesen werden, dass Curcumin in niedrigen Konzentrationen nur in Zusammenarbeit mit Licht pharmakologische Effekte zur Folge hat.

Unter diesen Voraussetzungen wurde der Einfluss von Curcumin und sichtbarem Licht auf das Tumorwachstum von Xenograft-Tumormäusen untersucht. Für die Behandlung der Tiere wurde nur die Bestrahlung mit sichtbarem Licht ausgewählt, um schädliche Wirkungen durch UVA, insbesondere auf die Augen, zu vermeiden. Die Mäuse wurden zweimal täglich mit Curcumin, welches i.p. verabreicht wurde, und anschließender 20-minütiger

Bestrahlung (wie in Kap. 2.15. beschrieben) behandelt. Die regelmäßige Quantifizierung der Tumorgröße zeigte, dass lediglich die mit Curcumin und sichtbarem Licht behandelte Gruppe eine signifikante Inhibierung des Tumorwachstums aufwies (Abb. 3.6.2). Das durchschnittliche Tumolvolumen war um ca. 70% im Vergleich zur Kontrolle kleiner. Die scheinbare Tumorreduktion der nur mit Curcumin behandelten Gruppe war nicht signifikant ($p = 0,16$ gegen die Kontrolle). Bei der i.p. verabreichten Curcuminmenge lassen sich keine Schlüsse auf die Endkonzentration im Tumor machen. Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse scheint es sich um eine kritische Menge zu handeln, die nur in Zusammenarbeit mit Licht einen antikarzinogenen Effekt ausübt. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass durch Licht die Wirksamkeit von geringen Mengen Curcumin bei einem therapeutischen Einsatz ermöglicht wird. Dass Curcumin im Allgemeinen die Karzinogenese nach oraler Aufnahme im Mund (Tanaka et al., 1994; Li et al., 2002), in der Speiseröhre (Ushida et al., 2000), im Magen (Azuine and Bhide, 1992; Huang et al., 1994; Singh et al., 1998), im Zwölffingerdarm (Huang et al., 1994) und im Darm (Huang et al., 1994; Rao et al., 1995; Pereira et al., 1996) hemmen kann, wurde schon im einleitenden Kap. 1.3.2. zur biologischen Verfügbarkeit zusammengefasst. Dort belegten diese Studien, dass Curcumin lediglich im Gastrointestinaltrakt wirkt.

Die gezeigte Hemmung des Tumorwachstums durch Curcumin/Licht sollte im Folgenden durch Untersuchung von *in vitro* gefundenen Effekte und „Targets“ untermauert werden.

Zunächst wurde mittels immunhistochemischer Methoden die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 im Tumor nach 24 h detektiert. Es zeigte sich wie schon *in vitro* bei HaCaT- sowie A431-Zellen, dass eine verminderte Proliferation hier in Form einer reduzierten Ki-67-Expression nur bei Curcuminbehandlung und zusätzlicher Bestrahlung mit sichtbarem Licht erzielt wurde. Die Ki-67-Rate in Tumoren der Curcumin/Licht-Gruppe war um 70% im Gegensatz zu den anderen Gruppen signifikant reduziert. Entsprechend ergab sich bei der Quantifizierung von apoptotischen Nuklei in den Tumoren auch dann nur ein Effekt, wenn den Tieren Curcumin injiziert wurde und zusätzlich

bestrahlt wurde. Es ergab sich eine 4-fach erhöhte Apoptoserate, die signifikant im Vergleich zur Kontrolle war.

Vergleichende Ergebnisse mit sehr ähnlicher Methodik belegen eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion von PC-3-Prostataxenografts *in vivo* durch i.p. verabreichtes Curcumin (Khor et al. 2006). Dabei wurde allerdings eine Kombinationstherapie von Curcumin und Phenethylisothiocyanate angewandt. Curcumin allein zeigte in dieser Studie, vermutlich aufgrund zu geringer Konzentrationen, nur leichte Effekte.

Im nächsten Schritt wurden Tumorproben nach entsprechender Aufarbeitung im Western Blot gegen bereits *in vitro* untersuchte „Targets“ eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass nur in Tumoren der Curcumin und Licht behandelten Tiere nach 4 h die Caspase-9 verstärkt in aktivierter Form vorlag, während die Caspase-8 in diesem Zeitraum inaktiv blieb. Diese Ergebnisse entsprechen der in dieser Arbeit belegten frühen Aktivierung der Caspase-9 nach Curcumin/Licht-Behandlung bei HaCaT-Zellen *in vitro*. Dadurch lässt sich der diskutierte Einfluss von Curcumin auf die mitochondriale Apoptose ein weiteres Mal belegen.

Ebenfalls mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass Erk1/2 sowie EGF-R 1 h nach Behandlung mit Curcumin und sichtbarem Licht auch im Xenograft-Tumormodell gehemmt werden. Im Gegensatz dazu übte diese Behandlung keinen Effekt auf PKB/Akt in den Tumoren innerhalb von 4 h aus. Der untersuchte Zeitraum erscheint hinreichend, wenn man bedenkt, dass *in vitro* alle drei Kinasen innerhalb der gleichen Zeitspanne (15 min) dephosphoryliert vorlagen. Diese Befunde untermauern die Theorie des EGF-R als ein frühes möglicherweise erstes „Target“ von Curcumin, durch dessen Hemmung die Proliferation inhibiert und Apoptose begünstigt wird. Dass im weiteren Verlauf in A431-Xenografts dadurch Erk1/2 aber nicht PKB/Akt eine Dephosphorylierung erfährt, könnte im Unterschied zu HaCaT-Zellen, an einer anderen zellspezifischen Transduktion liegen. Die Suppression von Erk1/2 *in vivo* beschreiben auch Chun et al. (2003) in Maushaut nach topischer Applikation von Curcumin.

Zusammenfassen lässt sich, dass die *in vitro* gefundenen Effekte von Curcumin in Zusammenarbeit mit Licht in sehr ähnlicher Weise *in vivo* induziert werden. Es zeigte sich, dass diese Behandlung das Tumorstadium hemmt, wobei in diesen Tumoren eine unterdrückte Proliferations- und erhöhte Apoptoserate vorlag. Die Untersuchung spezifischer „Targets“ untermauert diese Ergebnisse durch die Aktivierung der Caspase-9 und die Hemmung von EGF-R sowie Erk1/2. Bei allen Versuchsansätzen zeigte sich, dass die Effekte nur dann erzielt wurden, wenn nach der Curcuminverabreichung eine Bestrahlung mit sichtbarem Licht erfolgte. Dies bestätigt die Hypothese, dass Licht bei einem therapeutischen Einsatz die Wirkung von ansonsten zu geringen Mengen Curcumin, aufgrund der bekannten schlechten Bioverfügbarkeit im Organismus, ermöglicht.

4.7. AUSBLICK

Die Identifizierung klassischer „Targets“, wie PKB/Akt, PKC oder die MAP-Kinasen, von Curcumin (und Licht) in HaCaT-Keratinocyten, ergaben beim Vergleich mit anderen publizierten Arbeiten keinen Aufschluss über ein allgemeines, in allen Zellen gleiches, Wirkprinzip von Curcumin. Auch bei der Unterscheidung zwischen in- und extrinsisch vermittelter Apoptose durch Curcumin (und Licht) findet man neben zahlreichen Arbeiten, die eine mitochondriale Apoptose durch Curcumin beschreiben, einzelne Arbeiten die, die Induktion des extrinsischen „pathways“ darlegen. Alle diese Befunde deuten, wie schon mehrfach diskutiert, darauf hin, dass es womöglich einen „upstream“ gelegenen Angriffspunkt des Curcumins gibt, der eine gegen die Zellproliferation gerichtete Zellantwort vermittelt und/oder Apoptose induziert. Dabei würden die Zellen gewebe- oder artspezifisch ein gleiches Signal unterschiedlich transduzieren. Unter Betracht dieser Hypothese scheinen weitere Untersuchungen zur genaueren zellulären Lokalisation des Curcumins sowie zur spekulierten Apoptoseinduktion an Organellen am interessantesten.

Hierzu bietet es sich an intrazelluläre Strukturen oder Kompartimente zu färben, um durch Kolo-kalisation mit dem fluoreszierenden Curcumin eine genauere Aussage über dessen räumliche Verteilung zu treffen. Zum Anfärben der in Frage kommenden Organellen könnte man eine Transfektion mit Markerproteinen, die an Fluoreszenzproteine gekoppelt sind, durchführen. Dies sind beispielsweise Rab-Proteine der Endosomen oder VLP18 als ER-Marker. Dabei könnten auch Unterschiede zwischen frühen oder späten Endosomen durch den Einsatz von Rab 5 bzw. 7 getroffen werden.

Die mögliche Apoptoseinduktion von Curcumin (und Licht) an Organellen lässt sich unter Berücksichtigung der Entdeckung neuer Mechanismen vor allem am ER oder an den Lysosomen möglicherweise näher eingrenzen. So können Messungen einer Leckage an den Lysosomen Hinweis auf deren Beteiligung geben. Bei der ER-induzierten Apoptose hat sich bei Mäusen bisweilen gezeigt, dass die Caspase-12, die an der zytosolischen Seite des ERs lokalisiert ist, Apoptose verursacht (Nakagawa and Yuan, 2000). In humanen Zellen hingegen wurde die Caspase-4 als Apoptoseauslöser am ER identifiziert (Fischer et al., 2002; Hitomi et al., 2004). Die nähere Untersuchung dieser Caspasen sowie weiterer in diesem Zusammenhang entdeckter Faktoren könnten in nachfolgenden Arbeiten Aufschluss darüber geben, ob und welche Organellen an der Apoptoseinduktion durch Curcumin (und Licht) beteiligt sind.

Bei *in vivo*-Studien während dieser Arbeit zeigte sich, dass i.p. verabreichtes Curcumin nur dann einen Effekt auf die subkutanen Tumore ausübte, wenn im Anschluss eine Bestrahlung erfolgte. Wie schon diskutiert scheint nach einer i.p.-Injektion im Xenograft-Tumormodell eine kritische Endkonzentration von Curcumin in den Tumoren erreicht zu werden. Diese hat nur in Zusammenarbeit mit Licht eine Hemmung des Tumorwachstums zur Folge. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass erst durch Licht bei einem therapeutischen Einsatz die Wirkung von geringen Mengen Curcumin ermöglicht wird. Nicht zuletzt wäre es interessant in diesem Modell zu testen, ob nach oraler Verabreichung von Curcumin und zusätzlicher Bestrahlung die beschriebenen Effekte genauso erreicht werden. Somit könnte zum ersten Mal

eine therapeutische Wirkung von Curcumin außerhalb des Gastrointestinaltrakts nach oraler Verabreichung im Tiermodell gezeigt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass Curcumin in einer Vielzahl verschiedener Zellarten die Proliferation hemmt und Apoptose induziert. In der Literatur werden Konzentrationen von 10 bis 150 μM (3.7-55 $\mu\text{g/ml}$) als dafür notwendig beschrieben. Da Curcumin nach oraler Aufnahme, aufgrund seiner schlechten Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt, eine geringe Bioverfügbarkeit im Organismus aufweist, sind therapeutische Lösungen erforderlich um Curcumin besser nutzen zu können.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung von geringen Mengen Curcumin, die allein keine Effekte zur Folge haben, in Zusammenarbeit mit Licht untersucht. Es wurde gezeigt, dass bereits Konzentrationen von 0,2-1 $\mu\text{g/ml}$ in Keratinozyten die Proliferation hemmen, wenn sie mit UVA- oder sichtbarer Licht-Bestrahlung kombiniert werden. Desweiteren wurde belegt, dass diese Behandlung Apoptose in HaCaT-Zellen induziert, wobei der mitochondriale Apoptoseapparat aktiviert wird. Dies belegen die Freisetzung von Cytochrom c und die frühe Spaltung der Caspase-9 wohingegen Caspase-8 zeitverzögert aktiviert wurde.

Weiterhin wurde dargelegt, dass Erk1/2, PKB/Akt und PKC durch Curcumin/Licht gehemmt werden, wohingegen p38 durch diese Behandlung eine Aktivierung erfährt. Zusätzlich ergab sich ein inhibierender Einfluss auf den EGF-Rezeptor, einem "upstream"-Regulator all dieser Kinasen, und den Transkriptionsfaktor NF- κB .

Bei *in vivo*-Studien an immundefizienten Mäusen mit A431-Xenografts hatte eine Behandlung mit i.p. verabreichtem Curcumin und anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum zur Folge. In diesen Tumoren fand eine Reduktion der Ki-67-Expression sowie eine Induktion von „apoptotic bodies“ statt. Western Blot-Analysen bestätigten die Apoptoseinduktion durch eine verstärkte Aktivierung

der Caspase-9. Zusätzlich zeigte sich auch eine Hemmung von Erk1/2 sowie EGF-R nach beschriebener Behandlung in den Tumoren.

Die Wirkungsweise des Curcumins in Kombination mit Licht *in vitro* wie auch *in vivo* weisen auf einen neuen therapeutischen Ansatz einer photodynamischen Therapie hin. Dabei kann durch die Verwendung von sichtbarem Licht auf den Einsatz der karzinogenen UV-Bestrahlung, wie sie in üblichen Phototherapien angewandt wird, verzichtet werden.

Auch wenn der Wirkmechanismus des Curcumins noch nicht völlig aufgeklärt werden konnte, wurden im Diskussionsteil verschiedene Möglichkeiten eines solchen aufgezeigt. In Abb. 5.1 sind drei Hypothesen zusammengefasst. Zum einen ist der EGF-Rezeptor (Hypothese I) und zum anderen der mitochondriale Apoptoseapparat (Hypothese II) als direkter Angriffspunkt des Curcumins vorstellbar. Innerhalb der Zelle zeigte Curcumin eine vesikelartige Anordnung und eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums. Diese Befunde legen eine Anreicherung in Organellen nahe und deuten somit auf eine mögliche Apoptoseinduktion an diesen hin (Hypothese III), wie sie in der jüngsten Apoptoseforschung, z.B. beim ER oder bei den Lysosomen, beschrieben wird.

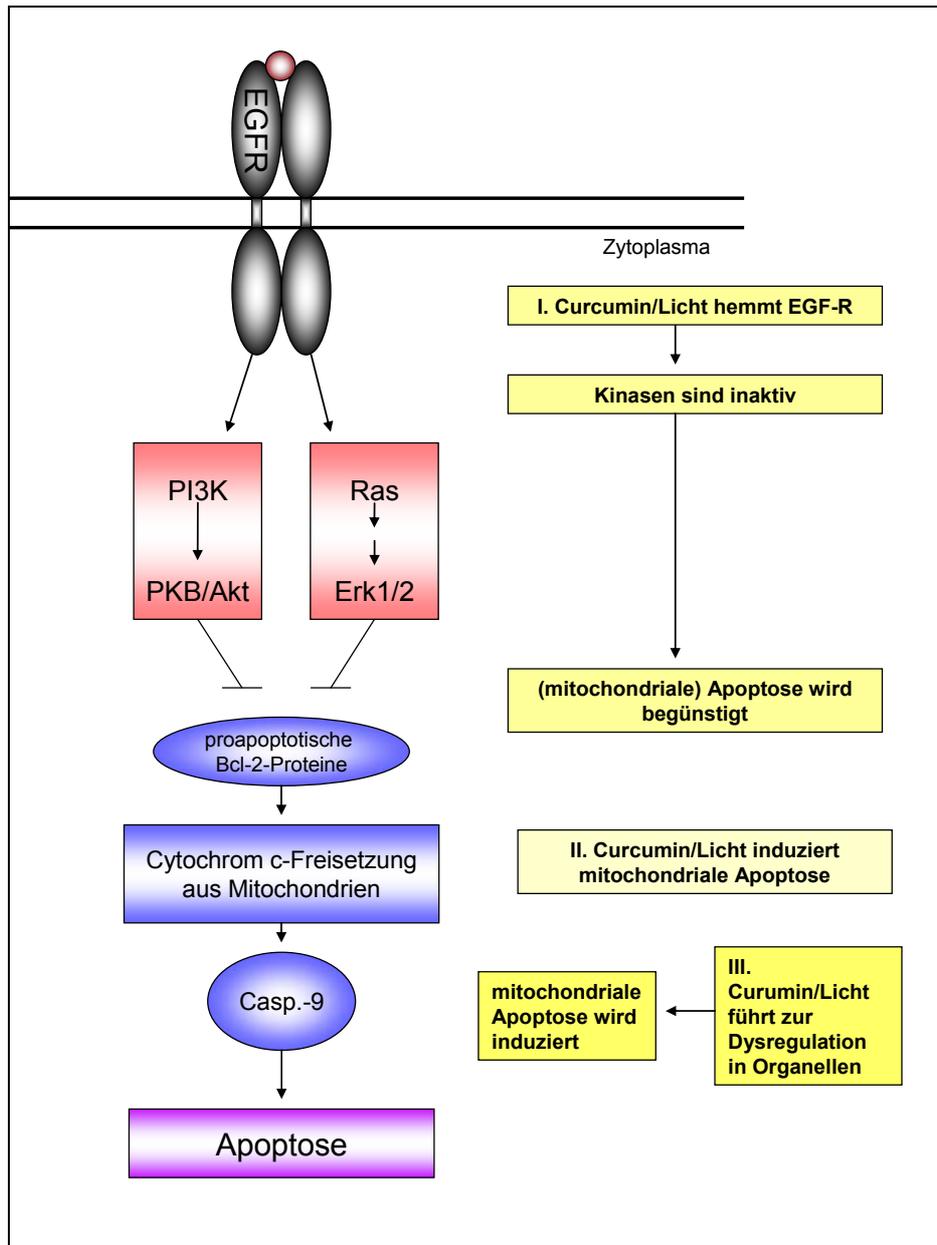


Abb. 5.1: SCHEMA DER WIRKUNGSWEISE VON CURCUMIN (LINKS) UND MÖGLICHE ANGRIFFPUNKTE (RECHTS, HYPOTHESEN I-III)

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adrian, R.M., (1981). 'Photochemotherapy in psoriasis and other skin diseases'. *Am Fam Physician*, 23 (5):95-100.

Aggarwal, B.B. and Shishodia, S., (2004). 'Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning'. *Ann N Y Acad Sci*, 1030:434-441.

Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H., (2007). 'Curcumin: the Indian solid gold'. *Adv Exp Med Biol*, 595:1-75.

Ahsan, H., Parveen, N., Khan, N.U. and Hadi, S.M., (1999). 'Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin'. *Chem Biol Interact*, 121 (2):161-175.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A., (1996). 'Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1'. *Embo J*, 15 (23):6541-6551.

Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M. and Hemmings, B.A., (1997). 'Role of translocation in the activation and function of protein kinase B'. *J Biol Chem*, 272 (50):31515-31524.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M., (1998). 'Death receptors: signaling and modulation'. *Science*, 281 (5381):1305-1308.

Azuine, M.A. and Bhide, S.V., (1992). 'Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice'. *Nutr Cancer*, 17 (1):77-83.

Bachelor, M.A. and Bowden, G.T., (2004). 'Ultraviolet A-induced modulation of Bcl-XL by p38 MAPK in human keratinocytes: post-transcriptional regulation through the 3'-untranslated region'. *J Biol Chem*, 279 (41):42658-42668.

Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., (1988). 'I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor'. *Science*, 242 (4878):540-546.

Baker, S.J. and Reddy, E.P., (1998). 'Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily'. *Oncogene*, 17 (25):3261-3270.

Barclay, L.R., Vinqvist, M.R., Mukai, K., Goto, H., Hashimoto, Y., Tokunaga, A. and Uno, H., (2000). 'On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity'. *Org Lett*, 2 (18):2841-2843.

Barik, A., Priyadarsini, K.I. and Mohan, H., (2003). 'Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumins'. *Photochem Photobiol*, 77 (6):597-603.

Beg, A.A. and Baldwin, A.S., Jr., (1993). 'The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors'. *Genes Dev*, 7 (11):2064-2070.

- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S. and Baltimore, D., (1995). 'Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B'. *Nature*, 376 (6536):167-170.
- Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S. and Aggarwal, B.B., (2003). 'Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis'. *Blood*, 101 (3):1053-1062.
- Bielak-Mijewska, A., Piwocka, K., Magalska, A. and Sikora, E., (2004). 'P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway induced by curcumin in HL-60 cells'. *Cancer Chemother Pharmacol*, 53 (2):179-185.
- Blagosklonny, M.V., (2000). 'Cell death beyond apoptosis'. *Leukemia*, 14 (8):1502-1508.
- Blenis, J., (1993). 'Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (13):5889-5892.
- Bohm, I., Traber, F., Block, W. and Schild, H., (2006). '[Molecular imaging of apoptosis and necrosis -- basic principles of cell biology and use in oncology]'. *Rofo*, 178 (3):263-271.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A. and Greenberg, M.E., (1999). 'Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms'. *Science*, 286 (5443):1358-1362.
- Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A., (2000). 'Volume regulation and ion transport during apoptosis'. *Methods Enzymol*, 322:421-433.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. and Ballard, D.W., (1995). 'Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation'. *Mol Cell Biol*, 15 (5):2809-2818.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E., (1999). 'Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor'. *Cell*, 96 (6):857-868.
- Buchner, K., (2000). 'The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus'. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (1):1-11.
- Bush, J.A., Cheung, K.J., Jr. and Li, G., (2001). 'Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53'. *Exp Cell Res*, 271 (2):305-314.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J.C., (1998). 'Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation'. *Science*, 282 (5392):1318-1321.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y., (1982). 'Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters'. *J Biol Chem*, 257 (13):7847-7851.
- Chakraborty, S., Ghosh, U., Bhattacharyya, N.P., Bhattacharya, R.K. and Roy, M., (2006). 'Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells'. *Mutat Res*, 596 (1-2):81-90.

- Chaudhary, L.R. and Hruska, K.A., (2003). 'Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt by curcumin in human prostate cancer cells'. *J Cell Biochem*, 89 (1):1-5.
- Chen, A. and Xu, J., (2005). 'Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR'. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288 (3):G447-456.
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. and Hsieh, C.Y., (2001). 'Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions'. *Anticancer Res*, 21 (4B):2895-2900.
- Chignell, C.F., Bilski, P., Reszka, K.J., Motten, A.G., Sik, R.H. and Dahl, T.A., (1994). 'Spectral and photochemical properties of curcumin'. *Photochem Photobiol*, 59 (3):295-302.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M., (1995). 'FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis'. *Cell*, 81 (4):505-512.
- Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M.L., Das, T. and Sa, G., (2002). 'Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction'. *FEBS Lett*, 512 (1-3):334-340.
- Chun, K.S., Keum, Y.S., Han, S.S., Song, Y.S., Kim, S.H. and Surh, Y.J., (2003). 'Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation'. *Carcinogenesis*, 24 (9):1515-1524.
- Ciardello, F. and Tortora, G., (2002). 'Anti-epidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy'. *Expert Opin Investig Drugs*, 11 (6):755-768.
- Cobb, M.H., (1999). 'MAP kinase pathways'. *Prog Biophys Mol Biol*, 71 (3-4):479-500.
- Coffer, P.J. and Woodgett, J.R., (1991). 'Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families'. *Eur J Biochem*, 201 (2):475-481.
- Collett, G.P. and Campbell, F.C., (2004). 'Curcumin induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HCT116 human colon cancer cells'. *Carcinogenesis*, 25 (11):2183-2189.
- Cruz-Correa, M., Shoskes, D.A., Sanchez, P., Zhao, R., Hyland, L.M., Wexner, S.D. and Giardiello, F.M., (2006). 'Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis'. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4 (8):1035-1038.
- Dahl, T.A., Bilski, P., Reszka, K.J. and Chignell, C.F., (1994). 'Photocytotoxicity of curcumin'. *Photochem Photobiol*, 59 (3):290-294.
- Dahl, T.A., McGowan, W.M., Shand, M.A. and Srinivasan, V.S., (1989). 'Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin'. *Arch Microbiol*, 151 (2):183-185.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E., (1999). 'Cellular survival: a play in three Akts'. *Genes Dev*, 13 (22):2905-2927.

- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E., (1997). 'Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery'. *Cell*, 91 (2):231-241.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G., (1997). 'Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt'. *Science*, 278 (5338):687-689.
- Denecker, G., Doms, H., Van Loo, G., Vercaemmen, D., Grooten, J., Fiers, W., Declercq, W. and Vandenamele, P., (2000). 'Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential'. *FEBS Lett*, 465 (1):47-52.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E., (1998). 'Signaling by dual specificity kinases'. *Oncogene*, 17 (11 Reviews):1447-1455.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G., (1983). 'Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei'. *Nucleic Acids Res*, 11 (5):1475-1489.
- Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K., (2003). 'Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates'. *Cell Death Differ*, 10 (1):76-100.
- Frank, N., Knauft, J., Amelung, F., Nair, J., Wesch, H. and Bartsch, H., (2003). 'No prevention of liver and kidney tumors in Long-Evans Cinnamon rats by dietary curcumin, but inhibition at other sites and of metastases'. *Mutat Res*, 523-524:127-135.
- Garcea, G., Jones, D.J., Singh, R., Dennison, A.R., Farmer, P.B., Sharma, R.A., Steward, W.P., Gescher, A.J. and Berry, D.P., (2004). 'Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration'. *Br J Cancer*, 90 (5):1011-1015.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L., (1999). 'Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways'. *Curr Opin Cell Biol*, 11 (2):211-218.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B., (1998). 'NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses'. *Annu Rev Immunol*, 16:225-260.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P., (1973). 'In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors'. *J Natl Cancer Inst*, 51 (5):1417-1423.
- Gire, V., Marshall, C. and Wynford-Thomas, D., (2000). 'PI-3-kinase is an essential anti-apoptotic effector in the proliferative response of primary human epithelial cells to mutant RAS'. *Oncogene*, 19 (19):2269-2276.
- Gross, A., (2005). 'Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle?' *J Bioenerg Biomembr*, 37 (3):113-119.
- Guicciardi, M.E., Leist, M. and Gores, G.J., (2004). 'Lysosomes in cell death'. *Oncogene*, 23 (16):2881-2890.
- Hecht, S.S., Kenney, P.M., Wang, M., Trushin, N., Agarwal, S., Rao, A.V. and Upadhyaya, P., (1999). 'Evaluation of butylated hydroxyanisole, myo-inositol, curcumin, esculetin, resveratrol and lycopene as inhibitors of benzo[a]pyrene plus 4-

(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice'. *Cancer Lett*, 137 (2):123-130.

Henderson, L.M. and Chappell, J.B., (1993). 'Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?' *Eur J Biochem*, 217 (3):973-980.

Hetz, C. and Glimcher, L., (2008). 'The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology'. *Trends Cell Biol*, 18 (1):38-44.

Hofmann, M., Guschel, M., Bernd, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Tandi, C., Wiig, H. and Kippenberger, S., (2006). 'Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model'. *Neoplasia*, 8 (2):89-95.

Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I. and Falk, K.I., (1999). 'Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies'. *Blood*, 93 (11):3956-3963.

Hu, M., Du, Q., Vancurova, I., Lin, X., Miller, E.J., Simms, H.H. and Wang, P., (2005). 'Proapoptotic effect of curcumin on human neutrophils: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway'. *Crit Care Med*, 33 (11):2571-2578.

Huang, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Newmark, H.L., Reuhl, K.R. and Conney, A.H., (1994). 'Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice'. *Cancer Res*, 54 (22):5841-5847.

Huang, M.T., Lou, Y.R., Xie, J.G., Ma, W., Lu, Y.P., Yen, P., Zhu, B.T., Newmark, H. and Ho, C.T., (1998). 'Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice'. *Carcinogenesis*, 19 (9):1697-1700.

Huang, M.T., Ma, W., Yen, P., Xie, J.G., Han, J., Frenkel, K., Grunberger, D. and Conney, A.H., (1997a). 'Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis'. *Carcinogenesis*, 18 (1):83-88.

Huang, M.T., Newmark, H.L. and Frenkel, K., (1997b). 'Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice'. *J Cell Biochem Suppl*, 27:26-34.

Ichijo, H., (1999). 'From receptors to stress-activated MAP kinases'. *Oncogene*, 18 (45):6087-6093.

Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H. and Shirai, T., (2001). 'Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis'. *Carcinogenesis*, 22 (3):467-472.

Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y., (1977). 'Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain'. *J Biol Chem*, 252 (21):7610-7616.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S., (1991). 'The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis'. *Cell*, 66 (2):233-243.

- Jacobson, M.D., Weil, M. and Raff, M.C., (1997). 'Programmed cell death in animal development'. *Cell*, 88 (3):347-354.
- Jiang, S., Cai, J., Wallace, D.C. and Jones, D.P., (1999). 'Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved'. *J Biol Chem*, 274 (42):29905-29911.
- Jinlian, L., Yingbin, Z. and Chunbo, W., (2007). 'p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation'. *J Biomed Sci*, 14 (3):303-312.
- Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A. and Sartor, R.B., (1999). 'Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity'. *J Immunol*, 163 (6):3474-3483.
- Joe, B., Rao, U.J. and Lokesh, B.R., (1997). 'Presence of an acidic glycoprotein in the serum of arthritic rats: modulation by capsaicin and curcumin'. *Mol Cell Biochem*, 169 (1-2):125-134.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F. and Hemmings, B.A., (1991). 'Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (10):4171-4175.
- Jovanovic, S.V., Boone, C.W., Steenken, S., Trinoga, M. and Kaskey, R.B., (2001). 'How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants'. *J Am Chem Soc*, 123 (13):3064-3068.
- Kagedal, K., Johansson, U. and Ollinger, K., (2001). 'The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress'. *Faseb J*, 15 (9):1592-1594.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A.A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M.G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R. and Farber, E., (2002). 'Cell death: apoptosis versus necrosis (review)'. *Int J Oncol*, 21 (1):165-170.
- Karin, M., (1999). 'How NF-kappaB is activated: the role of the I-kappaB kinase (IKK) complex'. *Oncogene*, 18 (49):6867-6874.
- Keränen, L.M., Dutil, E.M. and Newton, A.C., (1995). 'Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations'. *Curr Biol*, 5 (12):1394-1403.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., (1972). 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics'. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.
- Khor, T.O., Keum, Y.S., Lin, W., Kim, J.H., Hu, R., Shen, G., Xu, C., Gopalakrishnan, A., Reddy, B., Zheng, X., Conney, A.H. and Kong, A.N., (2006). 'Combined inhibitory effects of curcumin and phenethyl isothiocyanate on the growth of human PC-3 prostate xenografts in immunodeficient mice'. *Cancer Res*, 66 (2):613-621.
- Kim, J.H., Xu, C., Keum, Y.S., Reddy, B., Conney, A. and Kong, A.N., (2006). 'Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with beta-phenylethyl isothiocyanate and curcumin'. *Carcinogenesis*, 27 (3):475-482.

- Kim, M.S., Kang, H.J. and Moon, A., (2001). 'Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells'. *Arch Pharm Res*, 24 (4):349-354.
- Korutla, L. and Kumar, R., (1994). 'Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells'. *Biochim Biophys Acta*, 1224 (3):597-600.
- Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R. and Priyadarsini, K.I., (2008). 'Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells'. *Biochim Biophys Acta*, 1780 (4):673-679.
- Kunwar, A., Barik, A., Pandey, R. and Priyadarsini, K.I., (2006). 'Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study'. *Biochim Biophys Acta*, 1760 (10):1513-1520.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R. and Avruch, J., (1992). 'Raf-1 activates MAP kinase-kinase'. *Nature*, 358 (6385):417-421.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J., (2001). 'Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation'. *Physiol Rev*, 81 (2):807-869.
- Laemmli U.K., (1970). 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4'. *Nature* 227:680-685.
- Lao, C.D., Ruffin, M.T.t., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I., Bailey, J.M., Boggs, M.E., Crowell, J., Rock, C.L. and Brenner, D.E., (2006). 'Dose escalation of a curcuminoid formulation'. *BMC Complement Altern Med*, 6:10.
- Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C. and Maniatis, T., (1998). 'MEKK1 activates both I κ B kinase alpha and I κ B kinase beta'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (16):9319-9324.
- Lee, Y.S., Dlugosz, A.A., McKay, R., Dean, N.M. and Yuspa, S.H., (1997). 'Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes'. *Mol Carcinog*, 18 (1):44-53.
- Lemmon, M.A. and Schlessinger, J., (1994). 'Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization'. *Trends Biochem Sci*, 19 (11):459-463.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S. and Ahn, N.G., (1998). 'Signal transduction through MAP kinase cascades'. *Adv Cancer Res*, 74:49-139.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J., (1998). 'Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis'. *Cell*, 94 (4):491-501.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. and Parsons, R., (1997). 'PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer'. *Science*, 275 (5308):1943-1947.
- Li, L., Lorenzo, P.S., Bogi, K., Blumberg, P.M. and Yuspa, S.H., (1999). 'Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector'. *Mol Cell Biol*, 19 (12):8547-8558.

- Li, N., Chen, X., Liao, J., Yang, G., Wang, S., Josephson, Y., Han, C., Chen, J., Huang, M.T. and Yang, C.S., (2002). 'Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin'. *Carcinogenesis*, 23 (8):1307-1313.
- Liu, J.Y., Lin, S.J. and Lin, J.K., (1993). 'Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells'. *Carcinogenesis*, 14 (5):857-861.
- Lizcano, J.M., Morrice, N. and Cohen, P., (2000). 'Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155'. *Biochem J*, 349 (Pt 2):547-557.
- Lodha, R. and Bagga, A., (2000). 'Traditional Indian systems of medicine'. *Ann Acad Med Singapore*, 29 (1):37-41.
- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J. and Cotman, C.W., (1993). 'Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (17):7951-7955.
- MacFarlane, M., Cain, K., Sun, X.M., Alnemri, E.S. and Cohen, G.M., (1997). 'Processing/activation of at least four interleukin-1beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells'. *J Cell Biol*, 137 (2):469-479.
- Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y. and Baldwin, A.S., Jr., (2001). 'Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the I kappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38'. *J Biol Chem*, 276 (22):18934-18940.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F. and Marshall, C.J., (1998). 'Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C'. *Science*, 280 (5360):109-112.
- Masamune, A., Suzuki, N., Kikuta, K., Satoh, M., Satoh, K. and Shimosegawa, T., (2006). 'Curcumin blocks activation of pancreatic stellate cells'. *J Cell Biochem*, 97 (5):1080-1093.
- Moon, D.O., Jin, C.Y., Lee, J.D., Choi, Y.H., Ahn, S.C., Lee, C.M., Jeong, S.C., Park, Y.M. and Kim, G.Y., (2006). 'Curcumin decreases binding of Shiga-like toxin-1B on human intestinal epithelial cell line HT29 stimulated with TNF-alpha and IL-1beta: suppression of p38, JNK and NF-kappaB p65 as potential targets'. *Biol Pharm Bull*, 29 (7):1470-1475.
- Moragoda, L., Jaszewski, R. and Majumdar, A.P., (2001). 'Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells'. *Anticancer Res*, 21 (2A):873-878.
- Nakagawa, T. and Yuan, J., (2000). 'Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis'. *J Cell Biol*, 150 (4):887-894.
- Newton, A.C., (2001). 'Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions'. *Chem Rev*, 101 (8):2353-2364.

- Newton, A.C., (2001). 'Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions'. *Chem Rev*, 101 (8):2353-2364.
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A., (1997). 'Caspases: killer proteases'. *Trends Biochem Sci*, 22 (8):299-306.
- Nishizuka, Y., (2003). 'Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue'. *J Biochem*, 133 (2):155-158.
- Ogawa, Y., Takai, Y., Kawahara, Y., Kimura, S. and Nishizuka, Y., (1981). 'A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. I. Characterization of a calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase'. *J Immunol*, 127 (4):1369-1374.
- Ohba, M., Ishino, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N.H. and Kuroki, T., (1998). 'Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C'. *Mol Cell Biol*, 18 (9):5199-5207.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J., (1993). 'Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death'. *Cell*, 74 (4):609-619.
- Pahl, H.L. and Baeuerle, P.A., (1995). 'A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B'. *Embo J*, 14 (11):2580-2588.
- Pan, G., O'Rourke, K. and Dixit, V.M., (1998). 'Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex'. *J Biol Chem*, 273 (10):5841-5845.
- Pan, M.H., Huang, T.M. and Lin, J.K., (1999). 'Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice'. *Drug Metab Dispos*, 27 (4):486-494.
- Papp, H., Czifra, G., Lazar, J., Gonczi, M., Csernoch, L., Kovacs, L. and Biro, T., (2003). 'Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes'. *Exp Dermatol*, 12 (6):811-824.
- Pereira, M.A., Grubbs, C.J., Barnes, L.H., Li, H., Olson, G.R., Eto, I., Juliana, M., Whitaker, L.M., Kelloff, G.J., Steele, V.E. and Lubet, R.A., (1996). 'Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats'. *Carcinogenesis*, 17 (6):1305-1311.
- Priyadarsini, K.I., (1997). 'Free radical reactions of curcumin in membrane models'. *Free Radic Biol Med*, 23 (6):838-843.
- Priyadarsini, K.I., Maity, D.K., Naik, G.H., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., Satav, J.G. and Mohan, H., (2003). 'Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin'. *Free Radic Biol Med*, 35 (5):475-484.
- Pulla Reddy, A.C., Sudharshan, E., Appu Rao, A.G. and Lokesh, B.R., (1999). 'Interaction of curcumin with human serum albumin--a spectroscopic study'. *Lipids*, 34 (10):1025-1029.

- Radhakrishna Pillai, G., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P. and Carrier, E., (2004). 'Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin'. *Cancer Lett*, 208 (2):163-170.
- Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B. and Reddy, B.S., (1995). 'Chemoprevention of colon cancer by dietary curcumin'. *Ann N Y Acad Sci*, 768:201-204.
- Rashmi, R., Kumar, S. and Karunakaran, D., (2005). 'Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL'. *Carcinogenesis*, 26 (4):713-723.
- Rashmi, R., Santhosh Kumar, T.R. and Karunakaran, D., (2003). 'Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases'. *FEBS Lett*, 538 (1-3):19-24.
- Ravindranath, V. and Chandrasekhara, N., (1980). 'Absorption and tissue distribution of curcumin in rats'. *Toxicology*, 16 (3):259-265.
- Reddy, S. and Aggarwal, B.B., (1994). 'Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase'. *FEBS Lett*, 341 (1):19-22.
- Royall, J.A. and Ischiropoulos, H., (1993). 'Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells'. *Arch Biochem Biophys*, 302 (2):348-355.
- Ruby, A.J., Kuttan, G., Babu, K.D., Rajasekharan, K.N. and Kuttan, R., (1995). 'Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids'. *Cancer Lett*, 94 (1):79-83.
- Rushworth, S.A., Ogborne, R.M., Charalambos, C.A. and O'Connell, M.A., (2006). 'Role of protein kinase C delta in curcumin-induced antioxidant response element-mediated gene expression in human monocytes'. *Biochem Biophys Res Commun*, 341 (4):1007-1016.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N., (1995). 'Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies'. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19 (3):183-232.
- Savill, J. and Fadok, V., (2000). 'Corpse clearance defines the meaning of cell death'. *Nature*, 407 (6805):784-788.
- Schenk, P.W., Nebl, T., Fisher, P.R. and Snaar-Jagalska, B.E., (1999). 'A serpentine receptor-dependent, Gbeta- and Ca(2+) influx-independent pathway regulates mitogen-activated protein kinase ERK2 in Dictyostelium'. *Biochem Biophys Res Commun*, 260 (2):504-509.
- Sharma, O.P., (1976). 'Antioxidant activity of curcumin and related compounds'. *Biochem Pharmacol*, 25 (15):1811-1812.
- Shi, M., Cai, Q., Yao, L., Mao, Y., Ming, Y. and Ouyang, G., (2006). 'Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells'. *Cell Biol Int*, 30 (3):221-226.

- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y., (1999). 'Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC'. *Nature*, 399 (6735):483-487.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R. and Srinivas, P.S., (1998). 'Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers'. *Planta Med*, 64 (4):353-356.
- Singh, S. and Aggarwal, B.B., (1995). 'Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B'. *J Biol Chem*, 270 (18):10631-10639.
- Singh, S.V., Hu, X., Srivastava, S.K., Singh, M., Xia, H., Orchard, J.L. and Zaren, H.A., (1998). 'Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin'. *Carcinogenesis*, 19 (8):1357-1360.
- Sizemore, N., Leung, S. and Stark, G.R., (1999). 'Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit'. *Mol Cell Biol*, 19 (7):4798-4805.
- Song, G., Mao, Y.B., Cai, Q.F., Yao, L.M., Ouyang, G.L. and Bao, S.D., (2005). 'Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression'. *Braz J Med Biol Res*, 38 (12):1791-1798.
- Squires, M.S., Hudson, E.A., Howells, L., Sale, S., Houghton, C.E., Jones, J.L., Fox, L.H., Dickens, M., Prigent, S.A. and Manson, M.M., (2003). 'Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells'. *Biochem Pharmacol*, 65 (3):361-376.
- Sreejayan and Rao, M.N., (1997). 'Nitric oxide scavenging by curcuminoids'. *J Pharm Pharmacol*, 49 (1):105-107.
- Sreejayan, N. and Rao, M.N., (1996). 'Free radical scavenging activity of curcuminoids'. *Arzneimittelforschung*, 46 (2):169-171.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H. and Tavtigian, S.V., (1997). 'Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers'. *Nat Genet*, 15 (4):356-362.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. and Cory, S., (1990). 'Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2'. *Nature*, 348 (6299):331-333.
- Syu, W.J., Shen, C.C., Don, M.J., Ou, J.C., Lee, G.H. and Sun, C.M., (1998). 'Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*'. *J Nat Prod*, 61 (12):1531-1534.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A., (2006). 'Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis'. *EMBO Rep*, 7 (9):880-885.

- Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T. and Imahori, K., (1993). 'Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (16):7789-7793.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R. and Comb, M.J., (1999). 'p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway'. *J Biol Chem*, 274 (49):34859-34867.
- Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Hirose, Y., Wang, A., Mori, H., Satoh, K., Hara, A. and Ogawa, H., (1994). 'Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene'. *Cancer Res*, 54 (17):4653-4659.
- Terai, C., Kornbluth, R.S., Pauza, C.D., Richman, D.D. and Carson, D.A., (1991). 'Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1'. *J Clin Invest*, 87 (5):1710-1715.
- Thapliyal, R. and Maru, G.B., (2001). 'Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo'. *Food Chem Toxicol*, 39 (6):541-547.
- Tibbles, L.A. and Woodgett, J.R., (1999). 'The stress-activated protein kinase pathways'. *Cell Mol Life Sci*, 55 (10):1230-1254.
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A., (1995). 'Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli'. *Embo J*, 14 (12):2876-2883.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. and et al., (1984). 'Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells'. *Nature*, 309 (5967):418-425.
- Ushida, J., Sugie, S., Kawabata, K., Pham, Q.V., Tanaka, T., Fujii, K., Takeuchi, H., Ito, Y. and Mori, H., (2000). 'Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats'. *Jpn J Cancer Res*, 91 (9):893-898.
- Van Laethem, A., Van Kelst, S., Lippens, S., Declercq, W., Vandenabeele, P., Janssens, S., Vandenheede, J.R., Garmyn, M. and Agostinis, P., (2004). 'Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes'. *Faseb J*, 18 (15):1946-1948.
- Violin, J.D. and Newton, A.C., (2003). 'Pathway illuminated: visualizing protein kinase C signaling'. *IUBMB Life*, 55 (12):653-660.
- Wahlstrom, B. and Blennow, G., (1978). 'A study on the fate of curcumin in the rat'. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 43 (2):86-92.
- Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y. and Lin, J.K., (1997). 'Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products'. *J Pharm Biomed Anal*, 15 (12):1867-1876.
- Wells, A., (1999). 'EGF receptor'. *Int J Biochem Cell Biol*, 31 (6):637-643.

- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. and et al., (1995). 'Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis'. *Immunity*, 3 (6):673-682.
- Wolff, K., Honigsmann, H., Gschnait, F. and Konrad, K., (1975). '[Photochemotherapy of psoriasis: clinical experiences with 152 patients (author's transl)]'. *Dtsch Med Wochenschr*, 100 (48):2471-2477, 1497.
- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D.V., (1997). 'I κ B kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK'. *Science*, 278 (5339):866-869.
- Wu, Y., Chen, Y., Xu, J. and Lu, L., (2002). 'Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma'. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 24 (4):348-352.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. and Dunlop, D., (1984). 'Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis'. *J Pathol*, 142 (1):67-77.
- Xu, Y.X., Pindolia, K.R., Janakiraman, N., Noth, C.J., Chapman, R.A. and Gautam, S.C., (1997). 'Curcumin, a compound with anti-inflammatory and anti-oxidant properties, down-regulates chemokine expression in bone marrow stromal cells'. *Exp Hematol*, 25 (5):413-422.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B., (2001). 'The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation'. *Nat Immunol*, 2 (7):620-624.
- Zhao, M., Eaton, J.W. and Brunk, U.T., (2001). 'Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis'. *FEBS Lett*, 509 (3):405-412.

7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

7.1. PUBLIKATIONEN

Dujic, J., Kippenberger, S., Hoffmann, S., Ramirez-Bosca, A., Miquel, J., Diaz-Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd A., (2007). 'Low Concentrations of Curcumin Induce Growth Arrest and Apoptosis in Skin Keratinocytes Only in Combination with UVA or Visible Light'. *J Invest Dermatol*, 127(8): 1992-2000.

Salber, J., Gräter, S., Harwardt, M., Hofmann, M., Klee, D., Dujic, J., Jinghuan, H., Ding, J., Kippenberger, S., Bernd, A., Groll, J., Spatz, J.P., Möller, M., (2007) 'Influence of Different ECM Mimetic Peptide Sequences Embedded in a Nonfouling Environment on the Specific Adhesion of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts on Deformable Substrates'. *SMALL*, 3(6):1023-1031.

Dujic, J., Kippenberger, S., Hoffmann, S., Ramirez-Bosca, A., Miquel, J., Diaz-Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., 'Curcumin in Combination with Visible Light Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Tumor Model'. akzeptiert 2008 in *Int J Cancer*.

7.2. POSTER/ABSTRACTS

Dujic, J., Kippenberger, S., Simon, S., Ramirez Bosca, A., Quintanilla Almagro, E., Diaz Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., (2002) 'Curcuma longa extract combined with UVA or visible light induces apoptosis in human keratinocytes'. 32. ESDR Meeting, Genf, Schweiz, *J Invest Dermatol*, 119, 763.

Dujic, J., Kippenberger, S., Simon, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., (2003) 'Inhibition of NF- κ B and Induction of Apoptotic Processes in Human Keratinocytes After Treatment with Light Activated *Curcuma Longa* Extract'. XXX. ADF Tagung, Frankfurt/M, *Arch Dermatol Res*, 294:492.

Dujic, J., Kippenberger, S., Simon, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., (2004) 'Inhibition of EGF-R/Akt signalling pathway and induction of apoptosis in human keratinocytes after treatment with light activated *Curcuma longa* extract'. XXXI. ADF Tagung, Dresden, *Arch Dermatol Res*, 295:329.

Dujic, J., Kippenberger, S., Simon, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., (2004) 'Light activated *Curcuma longa* extract induces apoptosis and inhibits the EGF-receptor such as AKT and ERK1/2 and JNK1/2 in human keratinocytes'. FEBS lecture course on Cellular Signalling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, Dubrovnik, Kroatien.

Dujic, J., Kippenberger, S., Simon, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., (2005) 'Light activated curcumin induces apoptosis and inhibits the EGF-receptor such as AKT and ERK1/2 in human keratinocytes'. XXXII. ADF Tagung, Innsbruck, *Arch Dermatol Res*, 296:432.

Buss, S., Dujic, J., Kippenberger, S., Kaufmann, R., Bernd, A., (2007) 'Light activated curcumin induces apoptosis in human melanoma cells at low concentrations'. 14. ESPDR Meeting, Bari, Italien, *Pigment Cell Research*, 20: 445-446, 2007.

7.3. VORTRÄGE

Dujic, J. (2004): 'Inhibition of EGF-R/Akt signalling pathway and induction of apoptosis in human keratinocytes after treatment with light activated *Curcuma longa* extract'. XXXI. ADF Tagung 2004, Dresden

Dujic, J. (2005): 'Wirkung von Curcumin auf das Wachstum menschlicher Keratinozyten'. Ärztliches Fort- und Weiterbildungsseminar im ZDV, Frankfurt/M

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ad	auf
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Apaf-1	„apoptosis protease activating factor“
APO-1	„apoptosis-1“
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASK	„apoptosis signal-regulated kinase“
Bad	„Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter“
Bak	„Bcl-2 antagonist/killer“
Bax	„Bcl-2 associated x protein“
Bcl	„B-cell lymphoma“
Bcl-xL	„long form of Bcl-x“
BID	„BH-3-interacting domain“
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	„bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CARD	„caspase recruitment domain“
CLSM	„confocal laser scanning microscope“
CREB	„cAMP-response element-binding protein“
Cur.	Curcumin
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DD	„death domain“
dest.	destilliert
DHR	Dihydrorhodamin
DISC	„death inducing signal complex“
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Echerichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraaceticacid-Disodium

EGF-R	„epidermal growth factor receptor“
EH	Rhodamin
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
EMSA	„Electrophoretic Mobility shift assay“
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Erk1/2	„Extracellular-regulated kinase 1/2“
et al.	und andere
Fa.	Firma
FADD	„Fas associated protein with death domain“
Fas	„fibroblast associated“
FKHRL	„forkhead-related transcription factor“
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„Guaninnukleotid-exchange-Faktoren“
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HaCaT	„human adult low calcium high temperature“
HB-EGF	„heparin-binding EGF“
HBSS	„Hanks basal sodium saline“
HER	„human epidermal growth factor receptor“
HRP	„horseradish peroxidase“
HSA	„human serum albumin“
i.p.	intraperitoneal
IAP	„inhibitor of apoptosis protein“
IHC	Immunhistochemie
IKK	I κ B-Kinase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
J	Joule
JNK	c-jun-NH ₂ -terminal kinase
k	Kilo
Kap.	Kapitel
KGM	„keratinocyte growth medium“
Ko.	Kontrolle
L	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
lx	Lux
M	Mol
m	milli oder Meter
MAPK	„mitogen-activated kinase“

MEK	MAPK/Erk Kinase
Mg	Magnesium
min	Minute
MLK	„Mixed lineage kinase“
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	nuclear factor of immunoglobulin k locus in B cells
NIK	NF- κ B inducing kinase
NMRI	Naval Medical Research Institute
nu	nude (nackt)
OD	optische Dichte
p	phospho
p90RSK	90 kDa ribosomal S6 kinases
PBS	„phosphate buffered saline“
PDK	„pyruvate dehydrogenase kinase“
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat
PK	Postivkontrolle
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PTEN	„phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten“
PUVA	Psoralen plus UVA
Rab	„Ras-related in brain“
RAK	„related to PKA and PKB“
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROS	„reactive oxygen species“
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
s.c.	subcutan
s.L.	sichtbares Licht
s.o.	siehe oben
SAPK	„stress-activated protein kinase“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
sog.	so genannt
SOS	„son of sevenless“

Ste20	„sterile 20 kinase family“
Tab.	Tabelle
TBS	„tris buffered saline“
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TGF	„transforming growth factor“
Thr	Threonin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	„tumor necrosis factor“
TPA	13-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRAIL	„TNF-related apoptosis inducing ligand“
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt oder Volumen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9. DANKSAGUNG

❖ Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Bereiter-Hahn für die Betreuung dieser Arbeit, seine wissenschaftlichen Ratschläge und die Erstellung des Gutachtens danken. Zu besonderem Dank bin ich ihm für das Engagement bei den Untersuchungen am CLSM, bei denen er mir persönlich zur Seite stand, verpflichtet.

❖ Mein ganz besonder Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit, für die Bereitschaft jederzeit auf meine Fragen und Probleme einzugehen und für die Erstellung des Zweitgutachtens. Für die Möglichkeit vieler kostbarer Erfahrungen, beispielsweise der Präsentation meiner Ergebnisse auf verschiedenen Kongressen, möchte ich mich ebenfalls sehr bedanken.

❖ Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Kippenberger für seine bei Fragen und Problemen stets offene Tür. Danke für die immer neuen Denkanstöße wissenschaftlicher aber auch philosophischer Art und die gemeinsame Lösung vieler Rätsel.

❖ Bei Herrn Prof. Dr. Kaufmann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Laborplatzes und die wissenschaftlichen Anregungen bei den B-Labor Seminaren.

❖ Den Mitarbeitern des B-Labors danke ich sehr für die herzliche Atmosphäre im Labor sowie die Unterstützung bei meiner Arbeit. Ich bin schon allein glücklich darüber euch kennen gelernt zu haben: Gerlinde Schley, Helga Büttner, Kugheta Kugarajan, Tsige Hailemariam-Jahn, Stephanie Hoffmann, Monika Stein, Maria del Carmen Fernandez, Kerstin Görg, Maila Roßberg, Fatima Asskali, Veronika König und Maike Schulz.

„Last but not least“: Jutta Müller, die mir stets eine gute Freundin in dieser Zeit war und bleibt.

- ❖ Ich danke meinen biologischen Mitdoktoranden Matthias Hofmann, Julijana Ivosevic-Zaper, Annette Dorn, Carolin Fischer, Nadja Zöller, Sybille Mayer, Gabi Reichenbach, Vesselina Laubach und Konstantinos Fotiou für die gute Zusammenarbeit und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse auf Tagungen. Dafür möchte ich mich auch bei den medizinischen Doktoranden Igor Hrgovic, Andreas Pinter, Leonie Ratz, Michael Schuster, Stefan Buss, Despina Michailidou, Julia Naidenow und Barbara Berlinski bedanken.

- ❖ Viel Dank für die fachliche Unterstützung bei den Tierversuchen gebührt den Mitarbeiterinnen der Zentralen Forschungseinrichtung Kirsten Frank, Christa Tandi, Jeanette Pfeffer und Petra Schulze-Johann.

- ❖ Außerdem danke ich meiner Freundin Tina Hilgert, die immer für mich da ist.

- ❖ Zu ewiger Dankbarkeit bin ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern verpflichtet, die mich bei jedem Schritt meines Lebens unterstützt und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ich danke meinem Freund Davor-Jurica Dobra und meinem Bruder Stipe Dujic, auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Promotionsprüfung unterzogen habe.

Frankfurt/M, 15.09.2008

Jadranka Dujic

EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die im Fachbereich
Biowissenschaften der Johann
Wolfgang Goethe-Universität angefertigte Dissertation über

Wirkung von Curcumin und Licht auf Haut-und Tumorzellen

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt/M, 15.09.2008

Jadranka Dujic

11. CURRICULUM VITAE

Jadranka Dujić
geboren am 19.11.1976
in Offenbach/M.
kroatisch, ledig

DISSERTATION

seit Dez. 2002 **Dissertation an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/M.**

Doktorarbeit: „*Wirkung von Curcumin und Licht auf Haut- und Tumorzellen*“
unter der Betreuung von Prof. Dr. Bereiter-Hahn im Labor für
Dermatologische und Klinische Biochemie im Zentrum für Dermatologie
und Venerologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/M
unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd.

STUDIUM

1996 – 2002 **Studium der Biologie an der J. W. Goethe-Universität
Frankfurt/M.**

Fächer: Zell- und Entwicklungsbiologie (Schwerpunktfach), Genetik,
Neurobiologie

Diplomarbeit: „*Wirkung von lichtaktiviertem Curcuma longa-Extrakt auf das
Zellwachstum*“ Betreuung von Prof. Dr. Bereiter-Hahn im Labor für
Dermatologische und Klinische Biochemie im Zentrum für Dermatologie
und Venerologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/M
unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd.

Abschluss: Diplom mit Gesamtnote „sehr gut“

SCHULAUSBILDUNG

1987 – 1996 Gymnasium mit Abschluss Abitur an der Marienschule in Offenbach/M.

1983 – 1987 Grundschule an der Sonnentauschule in Obertshausen