

**Apoptose-Messungen nach
HBR-Therapie mit Pulsarion®
der Firma Pulsarion - Medizintechnik**

Studie

durchgeführt im Labor

Prof. Dr. Doris Kloor

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Juni 2008

Rationale

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Der programmierte Zelltod ist ein lebenswichtiger Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus. Nur wenn die Neubildung und Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus gesund. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind krankhafte Erscheinungen wie Krebs oder AIDS die Folge.

Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltods, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrollen und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Ausgelöst werden kann die Apoptose von außen, etwa durch Immunzellen oder aufgrund zellinterner Prozesse. Charakteristisch für die Apoptose ist das Induzieren einer Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen, den sogenannten Caspasen. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose. Desweiteren lässt sich bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle beobachten und die DNA wird durch Endonukleasen in definierte Stücke, auch als DNA-Leiter bekannt, abgebaut.

Zielsetzung

Induktion der Apoptose durch Staurosporin und deren Hemmung durch HBR-Therapie. Staurosporin ist ein Protein-Kinase Hemmstoff mit antibiotischen Wirkkomponenten.

Methoden

Die Experimente wurden mit der humanen Hepatomzelllinie HepG2 durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine adhärente, epithel-ähnliche Zelllinie, die als Monolayer in Kulturschalen wächst.

Versuchsdesign: Pro Versuch wurden jeweils 2 Kulturschalen mit konfluent gewachsenen HepG2 Zellen für 10 min bzw. 15 min auf die Behandlungszone gelegt. Als Kontrolle dienten Schalen die für 10 min bzw. 15 min bei Raumtemperatur (in einem separaten Raum) liegen gelassen wurden.

Im Anschluss daran wurde die Apoptose mit 5 μ l Staurosporin induziert und 24h später wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet:

1. für die fluorometrische Messung der Caspasen 3 und 9 und
2. für den Nachweis der DNA-Leiter.

Ergebnisse

Unter Kontrollbedingungen beträgt die Caspase 3 Aktivität 1.4 ± 0.4 nmol/mg Protein *min. Die Applikation von Staurosporin hat eine Erhöhung der Enzymaktivität um das 9-fache zur Folge. Unter Kontrollbedingungen bedingt die HBR-Therapie keine Erhöhung der Caspase 3 Aktivität (0.8 ± 0.1 bzw. 0.9 ± 0.2 nmol/mg Protein*min). Die HBR-Therapie ist aber nicht in der Lage die durch Staurosporin induzierte Caspase 3 Aktivität, 20.5 ± 4.1 bzw. 17.2 ± 1.0 nmol/mg Protein*min, zu verhindern oder zu minimieren. Siehe dazu Abbildung 1.

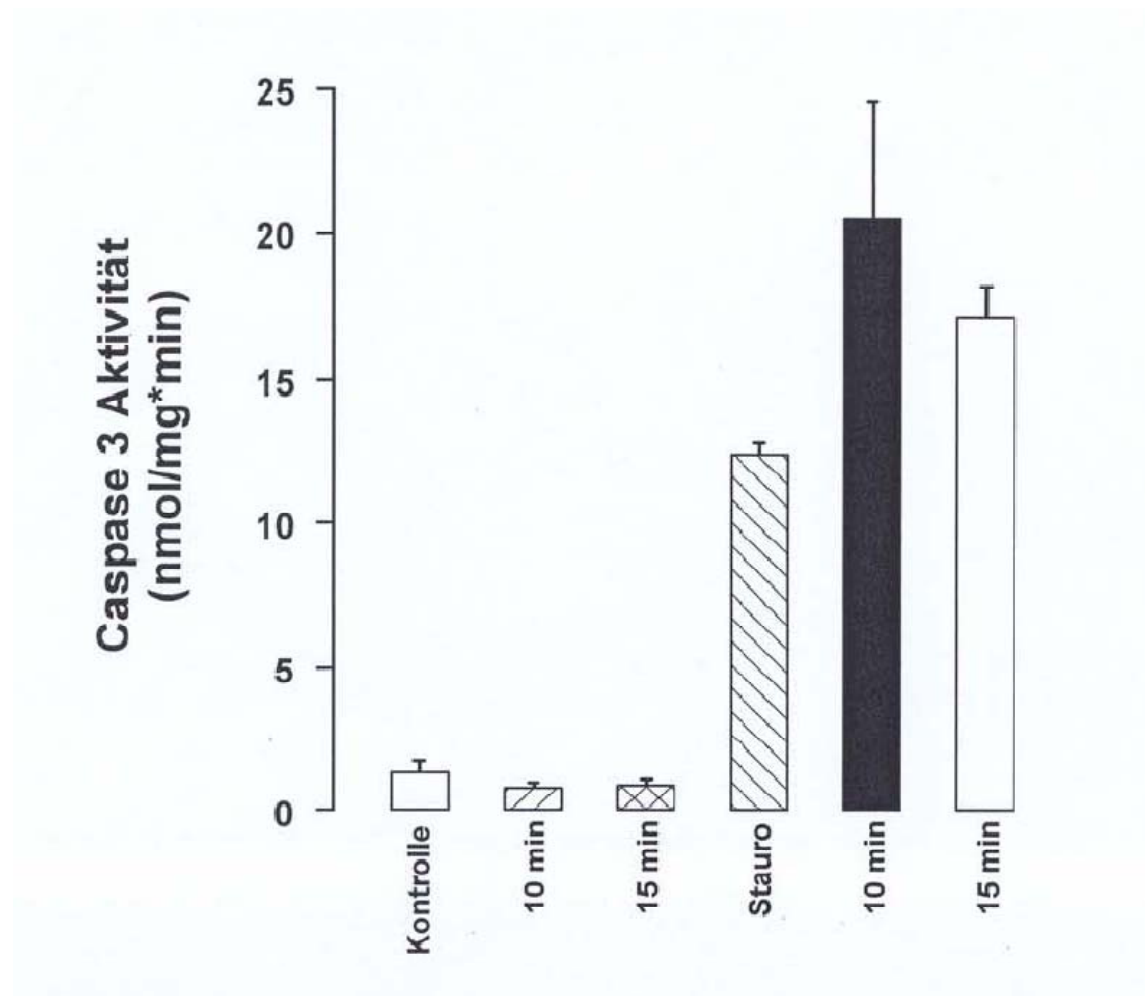


Abbildung 1: Induktion der Caspase 3 Aktivität durch Staurosporin (n=4-6)

Die Caspase 9 Aktivität beträgt unter Kontrollbedingungen 0.63 ± 0.05 nmol/mg Protein*min und steigt nach Applikation von Staurosporin auf 5.0 ± 0.5 nmol/mg Protein*min. Die HBR-Therapie führt unter Kontrollbedingungen zu keiner Erhöhung der Caspase 9 Aktivität (0.4 ± 0.1 bzw. 0.4 ± 0.1). Sie ist aber nicht in der Lage die durch Staurosporin induzierte Caspase 9 Aktivität, 5.4 ± 0.4 bzw. 5.9 ± 0.1 , zu verhindern oder zu minimieren. Siehe dazu Abbildung 2.

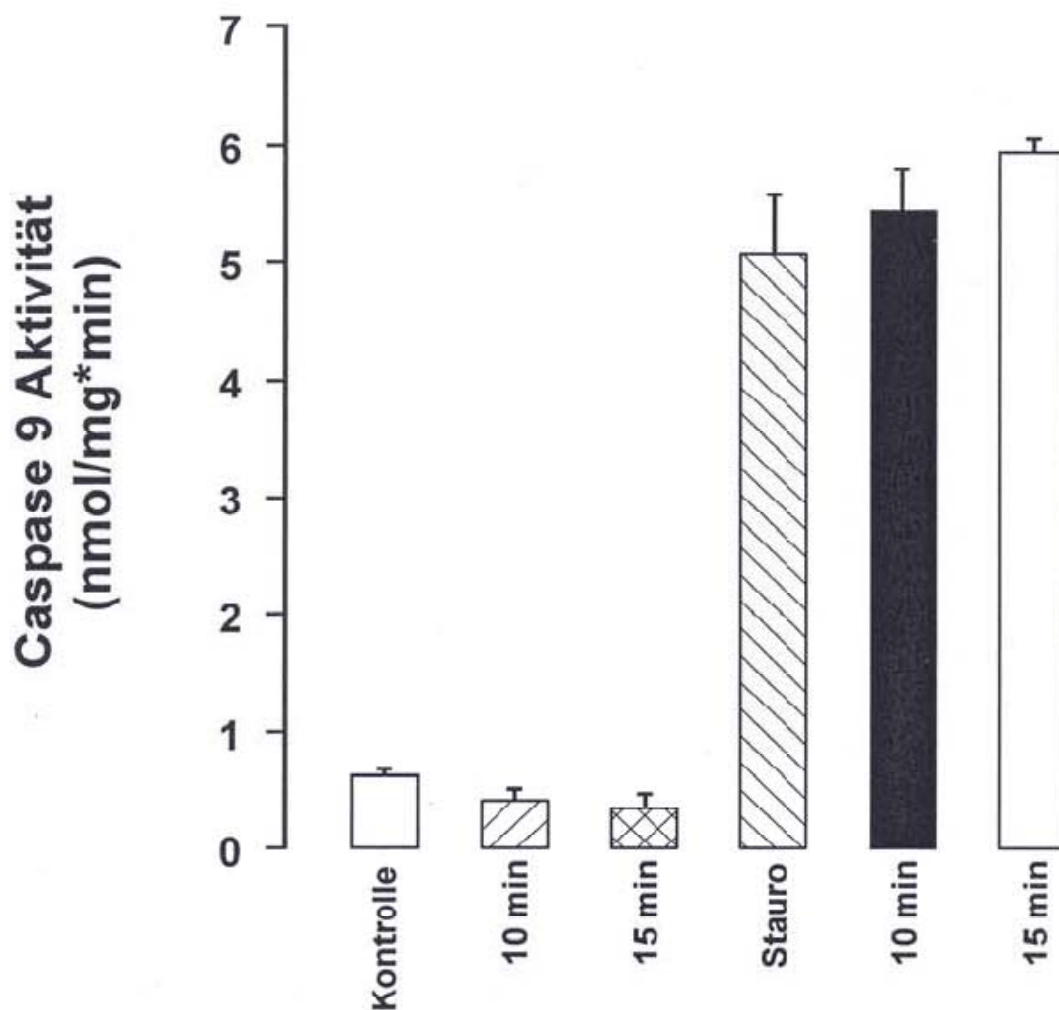


Abbildung 2: Induktion der Caspase 9 Aktivität durch Staurosporin (n=2-4)

Ein anderer Nachweis für Apoptose ist die DNA-Leiter.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, kommt es durch Staurosporin zum Abbau der DNA, auch nach HBR-Therapie.

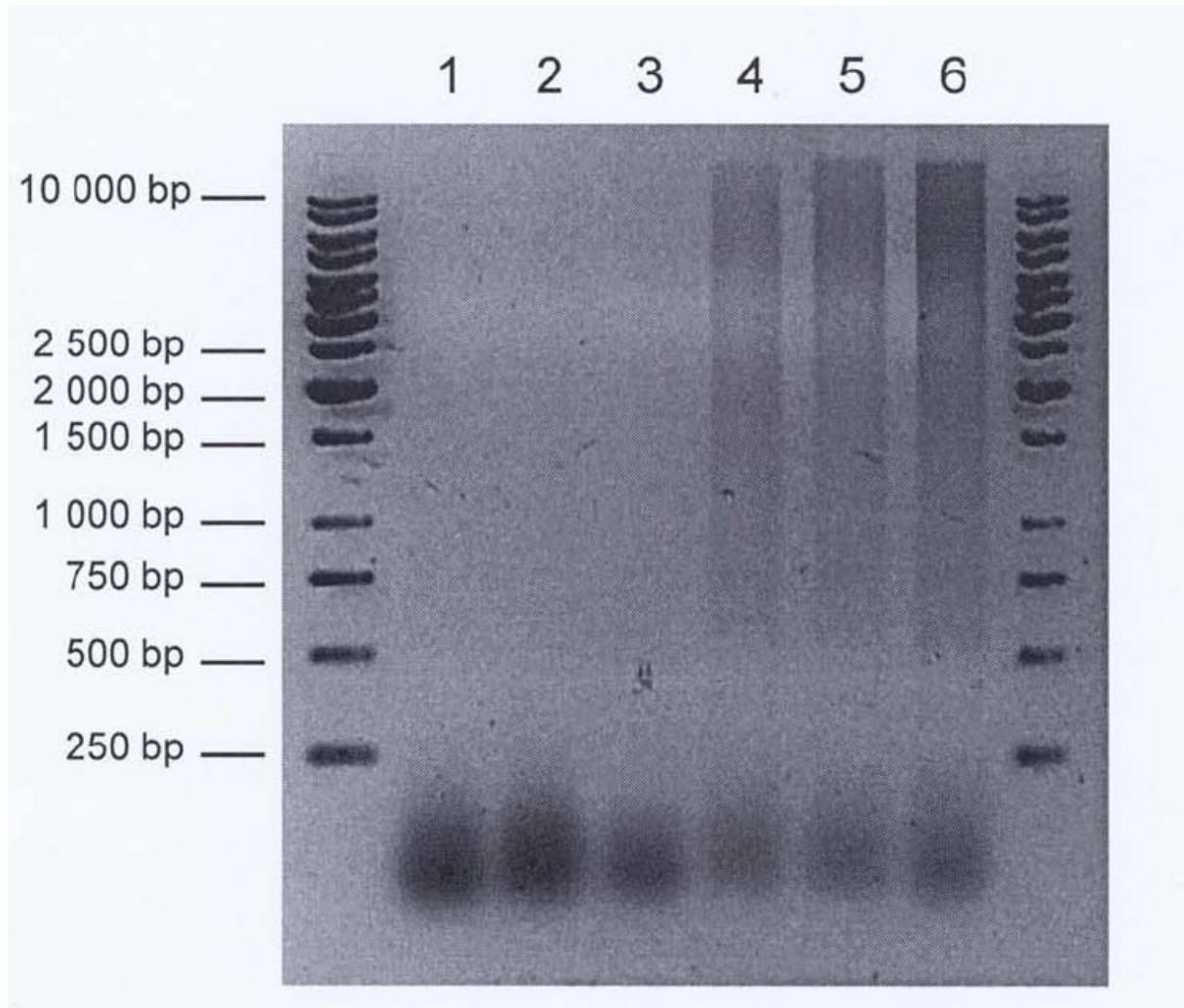


Abbildung 3: Agarose Gelelektrophorese der DNA isoliert aus HepG2-Zellen.

Bahn 1 - Kontrolle

Bahn 2 – 10 min auf der Behandlungssonde

Bahn 3 – 15 min auf der Behandlungssonde

Bahn 4 – Apoptose-Induktion durch Staurosporin

Bahn 5 – 10 min auf der Behandlungssonde danach Apoptose-Induktion durch Staurosporin

Bahn 6 – 15 min auf der Behandlungssonde danach Apoptose-Induktion durch Staurosporin

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen den Schluss zu und zeigen eindeutig, dass die HBR-Therapie mittels des Pulsarion® die durch Staurosporin induzierte Apoptose nicht verhindern kann. Da der programmierte Zelltod ein lebenswichtiger Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus ist, ist das Ergebnis der durchgeführten Studie als absolut positiv zu bewerten.