

4. Diskussion

4. Diskussion

In den ersten Experimenten charakterisierte ich die Wirkung von HePC auf HaCaT-Keratinocyten, in dem ich einige typische Merkmale untersuchte, die zum zytostatischen Effekt von HePC beitragen könnten. Desweiteren wurden Unterschiede der Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens herausgearbeitet und die Wirkung von HePC an Hand zweier weiterer Zelllinien überprüft.

Das Ziel der weiteren Untersuchungen war es, herauszufinden, welche intrazellulären Signalwege der Apoptosekaskade durch HePC aktiviert werden und welche Form des Zelltodes es auslöst.

Im letzten Teil der Arbeit werden neue Sphingolipid-Analoga vorgestellt, die einen vergleichbaren Wirkmechanismus aufweisen könnten wie der Prototyp der Etherlipide.

4.1. HePC induziert DNA-Fragmentierung in HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass HePC einen starken antiproliferativen Effekt auslöst, der in HaCaT-Keratinocyten Bcl-2-unabhängig ist. Die antiproliferative Wirkung der Alkylphosphocholine ist *in vitro* an diversen Zelllinien (Detmar et al., 1994; Geilen et al., 1994; Jimenez-Lopez et al., 2002) und *in vivo* an Tumoren unterschiedlichster Histogenese (Smorenburg et al., 2000; 1993; Bredel, 1994) nachgewiesen worden. In unserm Labor lagen für HaCaT-Keratinocyten bereits Ergebnisse vor (Wieder et al., 1998), die den hier gemessenen Effekten vergleichbar sind. Dies auch wegen des gleichen experimentellen Ansatzes. Mit der Kristallviolett-Methode wurde der DNA-Gehalt der Zellen, welcher proportional zur Zellzahl ist, nach 24 h Inkubation mit HePC bestimmt. In HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES dezimierte sich die Zellzahl konzentrationsabhängig um ca. 80 % bei 7,5 μ M HePC. Dies zeigt, dass in beiden Zelllinien der Effekt etwa gleich stark ausfällt und Bcl-2-unabhängig ist. Der überwiegende Teil der Studien, die die Rolle der Bcl-2- bzw. Bcl-X_L-Expression untersuchten, berichtet, dass antiapoptotische Bcl-2-Proteine die Wirkung der Alkylphosphocholine und Alkyllysophospholipide antagonisieren (Cuvillier et al., 1999; Wieder et al., 1997; Mollinedo et al., 1997; Jendrossek et al., 2003; Naumann et al., 2004). Die Resistenzentwicklung in der epidermoidalen KB-Zelllinie nach Langzeitbehandlung mit HePC bewirkte eine Erhöhung der Bcl-2-Expression der resistenten Linie

4. Diskussion

KBr (Fu et al., 1999). Ein Autor betonte dagegen, dass die Protektion durch Bcl-2 zelltypspezifisch sei, genauer gesagt, ob Typ-I-Zellen oder Typ-II-Zellen vorliegen (Matzke et al., 2001). In der Tat wurden in drei der sechs oben zitierten Arbeiten Jurkat-Zellen mit Bcl-2 oder Bcl-X_L transfiziert, welche entsprechend der CD95/Fas-Sensibilität als Typ-II-Zellen bezeichnet werden und daher ALP- bzw. APC-resistent waren. Umgekehrt verifizieren die Ergebnisse dieser Arbeit mit CH11, dass HaCaT-Keratinocyten Typ-I-Zellen sind, da die Bcl-2-Überexpression die DNA-Fragmentierung nicht blockieren konnte, falls diese Einteilung überhaupt auf epidermale Zellen zu übertragen ist. In Übereinstimmung dazu induzierte HePC in beiden HaCaT-Linien Proliferationshemmung. Dieser Punkt wird im Verlauf noch detaillierter zu diskutieren sein. Doch zunächst soll der antiproliferative Effekt von HePC weiter differenziert werden.

C₂-Ceramid löste in HaCaT-Keratinocyten Differenzierung und Zellzyklusstop aus (laborinterne Ergebnisse). Ebenso ist von HePC bekannt, dass es Differenzierung z.B. in primären Keratinocyten (Blume-Peytavi et al., 1997) und in C6-Gliomzellen (Jendrossek et al., 2001) bewirkt. Die Analyse der Zellzyklusalteration durch HePC oder anderer Phospholipid-Analoga ergab in verschiedenen Zellsystemen einen Arrest in G2-M. Auch HaCaT-Zellen akkumulierten nach Behandlung mit Perifosin in der G2-M-Phase. Diese Autoren erklärten den Effekt mit einer Induktion des *cyclin-dependent kinase inhibitor* p21^{WAF1}, der die Aktivität zyklinabhängiger Kinasen an den Restriktionspunkten des Zellzyklus reguliert. p21^{AF1} inhibiert cdc2/CyclinB und hemmt daher die G2-M-Transition. Der Effekt war p53-unabhängig (Patel et al., 2002), da der Transkriptionsfaktor p53 in HaCaT-Keratinocyten defekt ist, d.h. eine Mutation der Transaktivierungssequenz vorliegt (Lehman et al., 1993). Die Experimente zur Zellzyklusverteilung in dieser Arbeit erbrachten eine biphasische Veränderung. Bei 2,5 µM HePC akkumulierten die Zellen v.a. in der G0-G1-Phase und weniger in der G2-M-Phase, bei steigender Konzentration nahm die G2-M-Phase weiter zu und im Gegenzug die G0-G1-Phase bis 7,5 µM ab. Bei 7,5 µM überwog die S-Phase-Akkumulation der Zellen. Insgesamt sind die Zellzyklusveränderungen in diesem experimentellen System nicht sehr stark ausgeprägt, sodass wohl nur ein kleiner Teil des antiproliferativen Effektes von HePC der Zellzyklusalteration zuzuschreiben ist. Die S-Phase-Akkumulation bei 7,5 µM könnte möglicherweise durch die Interferenz mit der Phospholipid-Synthese erklärt werden. Der Phospholipid-Turnover ist naturgemäß an den Zellzyklus gekoppelt. Der cdc2/CyclinB-Komplex reguliert zellzyklusabhängig die Aktivität der Cytidylyltransferase, die am Ende der G2-Phase durch progrediente Phosphorylierung inaktiviert wird. In der S-Phase findet die Nettoakkumulation von Phosphatidylcholin vor der Zellteilung statt (Jackowski, 1996), was durch HePC sicherlich behindert wird, sodass die S-Phase nicht komplettiert werden kann und die Zellen in ihr verweilen. Aus dem Vergleich beider unbehandelten Zelllinien geht weiterhin hervor, dass sie sich in ihrer

4. Diskussion

Zellzyklusverteilung unterscheiden. Die HaCaT/pIRES-Klone spiegeln eine typische Verteilung der Zellzyklus-Phasen bei proliferierenden Zellen wieder. HaCaT/Bcl-2 dagegen befinden sich vermehrt in der G0-G1-Phase (55 % bei HaCaT7pIRES und 70 % bei HaCaT/Bcl-2) und dem entsprechend vermindert sich der Anteil der S-Phase. Dieses Resultat deutet auf eine Wachstumsretardierung der HaCaT/Bcl-2-Zellen hin. Eine Gegenüberstellung der drei HaCaT-Zelllinien zur Messung der Proliferation mit der Kristallviolett-Methode bestätigte diese Daten. Daraus ist ersichtlich, dass die HaCaT/Bcl-2-Zellen eine um 25 % herabgesetzte Proliferation aufwiesen. Dieser Effekt kommt auch *in vivo* zum Tragen, wie Untersuchungen an Colonkarzinomen beweisen (Pietenpol et al., 1994). Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und Proliferationsverhalten der Zellen genauer betrachtete, schrieb der prolongierten G0-G1-Phase eine protektive Funktion zu, ähnlich der Arretierung der Zellen in der G1-Phase durch das Retinoblastom-Genprodukt, das vor Apoptose schützt. Zusätzlich deckte der Autor auf, dass die Wachstumsinhibition durch Koexpression von Bax aufgehoben wird (Borner, 1996). Daher ist anzunehmen, dass die Bindungskapazität von Bcl-2 von entscheidender Bedeutung ist. Eine Reihe von Proteinen wie *p53 binding protein 2*, R-Ras und Calcineurin interagieren mit Bcl-2 (Reed, 1998) ohne eine BH3-Domäne zu besitzen, was, je nach Ausmaß der Bindung, eine Zellzyklusalteration herbeiführen könnte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die p53-Proteinexpression in den Bcl-2-transfizierten HaCaT-Klonen verglichen mit den Vektorzellen erhöht ist, vielleicht über eine verstärkte Bindung an Bcl-2. Dies könnte auch die Zellzyklusretardierung erklären, da der Transkriptionsfaktor p53 in HaCaT zwar defekt, aber nicht komplett funktionslos ist.

Ein weiteres wichtiges Kennzeichen des antiproliferativen Effektes der Alkylphosphocholine ist die Induktion der Apoptose (Matzke et al., 2001; Jendrossek et al., 2003). Auch HaCaT-Zellen zeigen nach Behandlung mit HePC DNA-Fragmentierung (Wieder et al., 1998). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob in beiden verwendeten Zelllinien DNA-Fragmentierung als Kriterium der Apoptose messbar ist. Nach 24-stündiger Inkubation mit HePC konnte in HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Fragmentierung bis 7,5 μM bestimmt werden, deren Auslösung durch die Bcl-2-Überexpression nur verzögert, aber nicht verhindert wurde. Im Vergleich mit HaCaT-Zellen waren die transfizierten Klone deutlich sensibler. Wie bereits diskutiert ist dieser Effekt zelltypspezifisch und steht auch im Gegensatz zu Ergebnissen mit Molt4/Bcl-2-Zellen aus unserer Arbeitsgruppe (Wieder et al., 1997). Deshalb wurden zwei weitere Zelllinien in die Untersuchung einbezogen, um die Ergebnisse zu validieren. Die Melanomzelllinien A375/Bcl-2 und A375/pIRES sowie Mel-HO, Mel-HO/pIRES und Mel-HO/Bcl-2 reagierten ebenfalls sensibel auf die Behandlung mit HePC.

4. Diskussion

Bei Betrachtung der Fragmentierungswerte der Bcl-2-transfizierten HaCaT-Keratinocyten und A375- bzw. Mel-HO-Melanomzellen fällt auf, dass diese zum Teil sehr viel höher liegen als in HaCaT/pIRES bzw. A375/pIRES und Mel-HO/pIRES, was vermuten lässt, dass die Bcl-2-transfizierten Klone jeweils sensibler auf HePC reagieren als die Kontrollzellen. Um dies beurteilen zu können, müssen mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass die verglichenen Zelllinien nicht identisch sind, da die Bcl-2-Transfektion das Wachstumsverhalten zumindest der HaCaT-Zelllinie veränderte. Analog dazu verminderte sich nach Transfektion nicht unerwartet die basale DNA-Fragmentierungsrate der HaCaT/Bcl-2-Zellen. Die Absorptionswerte der unbehandelten Zellen beider Linien unterschieden sich ca. um den Faktor zwei. Diese phänotypische Veränderung impliziert aber zugleich ein statistisches Problem, das die Vergleichbarkeit beider Zelllinien erschwert, da nach Subtraktion des Leerwertes von den Absorptionswerten der Faktor zur prozentualen Berechnung der Fragmentierungswerte bei den HaCaT/Bcl-2 sehr klein wird und somit der Quotient, d.h. die Zunahme der DNA-Fragmentierungswerte im Vergleich zur Kontrolle, pronouncierter erscheint als bei den HaCaT/pIRES-Zellen. Der Effekt tritt umso mehr zu Tage, da HePC für HaCaT/Bcl-2 unbestreitbar ein starker Stimulus der DNA-Fragmentierung ist. Die Ermittlung der Proliferationshemmung und die prozentuale Angabe der apoptotischen Zellen mittels Bisbenzimid-Färbung und Annexin-V-Färbung belegen, dass in etwa die gleiche Anzahl der Zellen sterben. Das bedeutet allerdings, dass aufgrund der Bcl-2-Überexpression die DNA in jeder Zelle stärker fragmentiert wird, was möglicherweise auf differierende Induktionsmechanismen in beiden Zelllinien hinweist.

Jedenfalls konnte ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Wirkung von HePC und C₂-Ceramid beobachtet werden. Obwohl 10 µM C₂-Ceramid in HaCaT/Bcl-2 keine DNA-Fragmentierung initiierten, vermocht es doch deren Proliferation signifikant zu hemmen. Die Ergebnisse zur Zellzyklus-Analyse an HaCaT-Zellen aus unserem Labor (unveröffentlicht) legen die Vermutung nahe, dass der Arrest in der G₀-G₁-Phase die Proliferationshemmung vermittelt. Apoptose und Zellzyklus-Alteration werden also von C₂-Ceramid über voneinander unabhängige Mechanismen aktiviert.

Des weiteren war die Abschätzung des lytischen Effektes von HePC von besonderer Bedeutung. Lipidanaloga nehmen aufgrund ihrer amphiphilen Struktur in wässriger Lösung Mizellenform an. Deshalb sollten sie zumindest in höheren Konzentrationen unspezifische lytische Nebenwirkungen zeigen. Im Tierversuch bestätigte sich diese Annahme, da HePC in hohen Dosen (LD₅₀ = 606 µmol/kg Körpergewicht) für Ratten zytotoxisch und lethal ist (Muschiol et al., 1987). Um den lytischen Effekt von HePC in diesem Zellsystem von seiner antiproliferativen und apoptotischen Wirkung abzugrenzen, wurde die LDH-Aktivität im Medium bestimmt.

4. Diskussion

Nach 6 h Behandlung mit 7,5 μM HePC war in HaCaT/pIRES eine signifikante Erhöhung der LDH-Werte feststellbar; die HaCaT/Bcl-2-Zellen reagierte zu diesem Zeitpunkt nur mit einer geringen Zunahme. Bei Konzentrationen darüber hinaus war ein deutlicher Anstieg der LDH-Werte in beiden Zelllinien zu verzeichnen, synchron dazu verringerten sich die DNA-Fragmentierungswerte, was insgesamt auf einen primär lytischen oder nekrotischen Effekt bei hohen Konzentrationen schließen lässt. Daten aus vergleichbaren Experimenten mit der Mutter-Zelllinie HaCaT stimmen mit den hier gezeigten Ergebnissen nicht überein, da diese bis 25 μM HePC nach 4 h keine LDH-Freisetzung aufwiesen (Wieder et al., 1998). Der zeitliche Verlauf der LDH-Freisetzung bei 7,5 μM beschreibt eine Retardierung des Anstieges durch Bcl-2, der nach acht Stunden Inkubation in HaCaT/Bcl-2 signifikante Werte erreicht, in HaCaT/pIRES dagegen schon nach sechs Stunden. Die Messungen mit Annexin V an HaCaT/Bcl-2 Zellen zeigten ebenfalls einen parallelen zeitlichen Verlauf der PS-Externalisierung und der Färbung mit Propidiumiodid. HePC induziert also zytotoxische Effekte, die nicht primärer Natur sind, d.h. aufgrund einer potentiellen Mizellenbildung, die die Membranstruktur permeabilisiert, sondern die lytischen Effekte stellen sich erst nach einer Latenzzeit von mindestens vier Stunden ein. Parallel dazu bzw. zeitlich etwas früher treten DNA-Fragmentierung und Cytochrom C-Freisetzung in Erscheinung, die beide durch Bcl-2 etwas verzögert werden. Weiterhin sprechen Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten von ET-10-OCH₃ gegen einen primären lytischen Effekt dieser Substanzklasse bei niedrigen Konzentrationen. Wie dabei gezeigt wurde, werden Etherlipide über *raft*-abhängige Endozytose sehr schnell aufgenommen. Nach zwei Stunden Inkubation mit 15 μM ET-18-OCH₃ war die Aufnahme in S49-Zellen abgeschlossen, da mittels Albuminrückextraktion die Substanz nicht mehr aus dem äußeren Blatt der Membran extrahiert werden konnte (van der Luit et al., 2002). Ähnlich Daten liegen hierüber auch an isolierten Membranen aus MDCK-Zellen vor. In diesen *In-vitro*-Studien erreichte die Aufnahme von 50 μM HePC bereits nach einer Stunde ein Plateau (Geilen et al., 1994). Vergleicht man die Aufnahmekinetik dieser Experimente mit den Ergebnissen dieser Arbeit, lässt sich daraus folgern, dass nur die Insertion von HePC in die Plasmamembran nicht ausreichend für den lytischen Effekt ist, der erst nach frühestens vier Stunden detektierbar wird. An Modellmembranen konnte gezeigt werden, dass sich HePC-Moleküle sogar oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration als Monomere mit lokaler Anreicherung ohne Detergenzeffekte in Membranen einfügt (Rakotomanga et al., 2004). Das Auftreten lytischer Zeichen korreliert aber einerseits gut mit dem Beginn der DNA-Fragmentierung und Cytochrom C-Freisetzung in dieser Arbeit und andererseits mit der intrazellulären Verteilung von HePC, das in MDCK-Zellen nach vier Stunden in allen subzellulären Kompartimenten nachweisbar ist (Geilen et al., 1994). Die lytische Wirkung der Substanz ist daher eine Komponente des Zelltodes, den HePC induziert. Ein

4. Diskussion

weitere Argument hierfür liefern Untersuchungen an HaCaT-Keratinocyten mit Hexadecylphosphoserin (HePS), ein Etherlipid-Analogon, das sich von HePC nur in der Kopfgruppe unterscheidet. Bis 50 μM HePS konnte keine LDH-Freisetzung gemessen werden, aber gleichzeitig löste die Substanz auch keine DNA-Fragmentierung aus (Wieder et al., 1998).

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse bis hier wie folgt interpretieren. HePC induziert in HaCaT-Keratinocyten einen Zelltod, der Bcl-2 unabhängig ist und das typisch Apoptosekriterium der DNA-Fragmentierung aufweist, aber zugleich auch nekrotische Kriterien erfüllt.

4.2. HePC aktiviert den mitochondrialen Apoptoseweg

Zunächst wurde der Bcl-2-Expressionslevel überprüft, der in allen verwendeten Zelllinien deutlich positiv war. Bcl-2 ist ein physiologischer Inhibitor der Apoptose, der aber in artifiziellen Systemen, je nach Expressionslevel, auch eine proapoptotische Funktion ausüben kann (Cheng et al., 1997; Shinoura et al., 1999). So verstärkten hohe Bcl-2-Expressionslevel die Fas-induzierte Apoptose sowie die basale Apoptoserate von Gliom-Zelllinien. Letzteres kann für das HaCaT/Bcl-2-System ausgeschlossen werden, wie oben bereits diskutiert wurde. Doch wird eine Zunahme der DNA-Fragmentierung auf Einzelzellebene durch die Daten dieser Arbeit angedeutet. Shinoura et al. zeigten, dass die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose in Bcl-2-überexprimierenden Zellen sehr ausgeprägt waren, insbesondere lag auch eine Schädigung der Mitochondrien vor, die hydroptisch geschwollen waren, was funktionell der *mitochondrial permeability transition pore* (MPT) gleichkommt und die Freisetzung aller mitochondrialen proapoptotischen Proteine gewährleistet. Da Bcl-2 kanalbildende Eigenschaften besitzt (Reed, 1997), könnte diese Funktion die Schädigung bzw. die Sensibilisierung des Mitochondriums bei unphysiologischen hohen Bcl-2-Proteinmengen erklären. Ergebnisse einer Studie, die die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation untersuchte, unterstützen diese Vermutung. Bcl-2-Überexpression, die mit Hilfe von speziellen Zielsequenzen nur mitochondrial zu finden war, löste Apoptose aus, hingegen war Bcl-2-Protein, das vorrangig am ER lokalisiert war, weiterhin antiapoptotisch wirksam (Wang et al., 2001). In beiden Studien wurde Bcl-2 nur transient exprimiert und deshalb sind diese Ergebnisse auf stabile Bcl-2-Transfektanten nicht übertragbar, da bei deren Gewinnung eine Selektion lebensfähiger Klone erfolgt. Sicherlich

4. Diskussion

kann aber eine hohe Bcl-2-Expression unter bestimmten Umständen auch proapoptotische Eigenschaften aufweisen.

Ein anderes Merkmal von Bcl-2 ist die mögliche Konversion in ein Bax-ähnliches Protein durch die Spaltung der Caspase-3 am N-terminalen Aspartat 34 (Kirsch et al., 1999). Das Spaltprodukt p21 transloziert ans Mitochondrium und verstärkt im Sinne eines positiven *feedback loop* die Cytochrom C-Freisetzung und somit die Apoptose. Dieser Mechanismus könnte auch in diesem Bcl-2-Zellsystem relevant für die Interpretation der DNA-Fragmentierungswerte sein. Er beantwortet nicht die initiale Caspase-3-Aktivierung. Wie aus Abbildung 3.13. hervorgeht wird Bcl-2 während der HePC-induzierte Apoptose nicht gespalten, obwohl HePC Caspase-3 aktiviert. Deshalb scheint dies hier keine Rolle zu spielen

Das Mitochondrium ist das zentrale Element der Zelltodinduktion und die Cytochrom C-Freisetzung initiiert den mitochondrialen Apoptoseweg. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zellsystem gezeigt werden, dass HePC zur Cytochrom C-Freisetzung führt und die Bcl-2-Überexpression diese nicht verhindern kann. Nachfolgend wird Caspase-3 aktiviert und die DNA-Fragmentierung wird meßbar. Die spezifische Inhibition der Caspase-3 und Caspase-9 sowie die Inhibition aller Caspasen mit z-VAD-fmk reduzierte die DNA-Fragmentierung auf Kontrollwerte in beiden Zelllinien und belegt die Relevanz des mitochondrialen Apoptoseweges bei der HePC-induzierten DNA-Fragmentierung. Diese Ergebnisse bestätigen zwei Studien an Jurkat-Zellen, die mit zwei unterschiedlichen Etherlipid-Analoga behandelt wurden und ebenfalls die Aktivierung dieser Komponenten untersuchten (Jendrossek et al., 2003; Cuvillier et al. 1999). Bezüglich der spezifischen Inhibition der Caspase-8/10 unterschieden sich die beiden HaCaT-Zelllinien, da 50 µM des Caspase-8/10-Inhibitors die Bildung von Oligonuklesomen in HaCaT/pIRES verhinderte, dagegen in HaCaT/Bcl-2 nur um ein Drittel verminderte. Dies deutet einen weiteren fundamentalen Unterschied der beiden Zelllinien hinsichtlich der Aktivierung des Apoptose-Programms an und schreibt der Caspase-8/10 in HaCaT/pIRES eine Initiationsfunktion zu. Zugleich impliziert dies wiederum die Aktivierung des CD-95-Signalweges bei der HePC-induzierten Apoptose, wie es an FADD-negativen BJAB-Transfektanten gezeigt werden konnte (Matzke et al., 2001). Es gelang auch der direkte Nachweis des *cappings* an Jurkat-Zellen (Gajate et al., 2000). Nach der These von Matzke et al. (2001) induziert HePC in Typ-I-Zellen trotz Bcl-2-Überexpression Apoptose, da das Mitochondrium durch direkte Aktivierung der Caspase-3 zunächst umgangen wird. Die Involvierung des CD-95-Signalweges scheint aber in unserem Falle mehr ein Epiphänomen zu sein, das nur unter bestimmten Umständen zum prädominanten Ereignis wird und sich parallel zur direkten Wirkung von HePC auf das Mitochondrium einstellt. In einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe um Matzke wurden mit unseren Ergebnissen völlig übereinstimmende Daten

4. Diskussion

vorgestellt. Es wurde das neue Alkylphospholipid S-1-*O*-Phosphocholin-2-N-Acetyl-Octadecan (S-NC-2) eingesetzt, das in Jurkat-Zellen Fas-*capping* auslöste und in Jurkat-Wildtyp-Zellen, in Jurkat/FADD^{-/-}-Zellen sowie in Jurkat/Caspase-8^{-/-}-Zellen zur PARP-Spaltung führte. Bei gleichzeitiger Inkubation von S-NC-2 und z-VAD-fmk oder S-NC-2 und z-DEVD-fmk (irreversibler Caspase-3-Inhibitor) reduzierte dies die PARP-Spaltung auf Kontrollniveau in Jurkat-Wildtyp-Zellen, in Jurkat/FADD^{-/-}-Zellen und in Jurkat/Caspase-8^{-/-}-Zellen. Die entsprechende Inkubation entweder mit einem irreversiblen Caspase-10- oder Caspase-8-Inhibitor konnte wiederum die PARP-Spaltung in allen drei Zelllinien nur reduzieren; ausser in Jurkat/Caspase-8^{-/-}-Zellen, die erst nach zusätzlicher Blockierung der Caspase-9 keine PARP-Spaltung mehr aufwiesen (Krug et al., 2003). Diese neuen Daten stehen also im Gegensatz zu älteren Veröffentlichungen dieser Arbeitsgruppe, sind aber eine Bestätigung unserer Ergebnisse mit HaCaT/Bcl-2. Sie weisen deutlich auf eine zelltypspezifische und substanzspezifische Gewichtung der Induktionsmechanismen hin. Die Frage ist daher nicht, ob HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES Typ-I- oder Typ-II-Zellen sind, obwohl die Ergebnisse mit CH11 nahe legen, dass HaCaT/Bcl-2-Zellen als Typ-I-Zellen einzustufen sind. Vielmehr beeinflussen Faktoren am Mitochondrium die Sensibilität der Zellen gegenüber Alkylphosphocholine. Beispielsweise bewirkte die Überexpression von Bcl-2 in Jurkat-Zellen, die mit Erucylphosphocholin behandelt wurden, zwar eine Reduzierung der apoptotischen Zellen bis 25 µM, doch bei 50 µM des Therapeutikums verursachte es Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials und PARP-Spaltung (Jendrossek et al., 2003).

Der Redox-Status einer Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler Proteine, die die Induktion von Apoptose und Nekrose einleiten können. Das Mitochondrium generiert den Hauptpool der Zelle an *reactive oxygen species* (ROS) während der oxidativen Phosphorylierung (Fernandez-Checa, 2003; Ueda et al., 2002). Ein sehr frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose kann die mitochondriale Produktion von ROS und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sein (Tan et al., 1998). ROS vermitteln die Öffnung der *permeability transition pore* möglicherweise durch Oxidation des *adenine nucleotide translocator* (ANT) und leiten - Bcl-2-unabhängig - die *mitochondrial permeability transition* (MPT) ein, die zu Matrixschwellung und Zerreißen der äußeren Membran führt (Costantini et al., 2000). Antioxidative Enzyme, die den mitochondrialen ROS-Spiegel senken, konnten die Auslösung der Apoptose verhindern (Coulter et al., 2000). Weiterhin sensibilisierte die Erhöhung des ROS-Spiegels Hepatozyten gegenüber TNF- α vermittelter Apoptose (Garcia-Ruiz et al., 2003). Die Modulation des mitochondrialen Redox-Status beeinflusst also die Reaktionsfähigkeit des Mitochondriums gegenüber apoptotischen Stimuli. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wird berichtet, dass Bcl-2-Überexpression in HL60-Zellen

4. Diskussion

den ROS-Spiegel konstitutiv erhöht und den antioxidativen GSH-Pool verringert. Als Ort der ROS-Generation wurde Komplex III der Atmungskette identifiziert. Die Behandlung beider Zelllinien mit Diethylmaleat, das den GSH-Pool erniedrigt, löste in HL60/Bcl-2-Zellen eine stärkere ROS-Generation aus, als in HL60-Kontrollzellen und induzierte selektiv in HL60/Bcl-2 die MPT mit nachfolgender Aktivierung der Caspase-3 und DNA-Fragmentierung. Die Koinkubation mit z-VAD-fmk konnte den Zelltod nicht verhindern. Die Autoren legten dar, dass die ROS-Generierung die Öffnung des *adenine nucleotide translocator* herbeiführt und die *mitochondrial permeability transition* auslöst (Armstrong und Jones, 2002).

Dieses Szenario ist dem in der vorliegenden Arbeit sehr ähnlich. Man findet hier ebenfalls Bcl-2-überexprimierende Zellen, die auf den apoptotischen Stimulus HePC sehr empfindlich reagieren und z-VAD-fmk nicht imstande ist, den Zelltod zu inhibieren. Ferner konnte man zeigen, dass ET-18-OCH₃ in p53-defekten, SV40-immortalisierten Hepatozyten verstärkt ROS generiert und die Inhibition der ROS-Produktion an Komplex I der Atmungskette mit Rotenon (Blockierung des Elektronentransfers auf Ubiquinon) die Apoptose supprimiert. Ähnliche Ergebnisse erzielte man mit Cholin-defizienten Medium. Weiterhin beobachtete man bei beiden Ansätzen eine Reduktion des Phosphatidylcholin-Gehaltes der Mitochondrien um 31 % bei ET-18-OCH₃ und um 24 % bei Cholinmangel. Der mitochondriale bzw. der zelluläre Ceramidgehalt wurde nicht bestimmt (Vrablic et al., 2001). Zwei weitere Studien belegen aber, dass die Inhibition der Phosphatidylcholin-Biosynthese auf Ebene der Cytidylyltransferase mit HePC in HaCaT einerseits und durch Cholinmangel andererseits, den zellulären Ceramid-Pool anhebt und Apoptose auslöst (Wieder et al., 1998; Yen et al., 1999). Daher kann man annehmen, dass sich neben dem mitochondrialen PC-Gehalt auch der mitochondriale Ceramid-Gehalt verändert. Die nahe räumliche Assoziation von Mitochondrium und ER, sowie die Möglichkeit des direkten Austausches von Membranlipiden zwischen beiden Organellen spricht ebenso dafür, da am ER die *De-novo*-PC- und Ceramid-Synthese abläuft und die SM-Synthase lokalisiert ist, die reversibel die Reaktion $PC + Ceramid \rightarrow SM + DAG$ katalysiert (Daum und Vance, 1997; Henneberry et al., 2002). Der Abfall des PC-Gehaltes würde die SM-Hydrolyse und damit die Ceramid-Generierung begünstigen. Deshalb könnten die Mitochondrien eine der ersten Kompartimente sein, deren Ceramid-Gehalt sich erhöht. Bisher existieren aber keine direkten Beweise darüber, ob die Inhibition der PC-Biosynthese den mitochondrialen Ceramid-Pool erhöht, obwohl dies aus obigen Gründen naheliegend ist.

Wie ET-18-OCH₃ induziert Ceramid gleichfalls die ROS-Generierung am Mitochondrium. An isolierten Mitochondrien konnte man zeigen, dass Ceramid mit Komplex III der Atmungskette direkt interagiert und die ROS-Produktion verstärkt. Die Inhibition des Komplex I mit Rotenon reduzierte, in Analogie zu den Ergebnissen von Vrablic mit ET-18-OCH₃, die ROS-Produktion

4. Diskussion

(Garcia-Ruiz et al., 2003; Garcia-Ruiz et al., 1997).

Zusammenfassend könnte man also festhalten, dass ein erhöhter Ceramid-Pool, wie er nach Behandlung mit Alkylphosphocholinen auftritt, als geeigneter Mediator einer ROS-induzierten *mitochondrial permeability transition* erscheint, die die Effekte in unserem Zellsystem gut erklären könnte. Ceramid und Bcl-2 induzieren an Komplex III der Atmungskette die ROS-Generierung, die den ANT unspezifisch öffnet, und die MPT Bcl-2- und Cyclosporin-A-unabhängig einleitet. Dies ist konsistent mit dem Modell, nachdem die MPT in zweierlei Weise operiert: die regulierbare MPT wird aktiviert durch Calcium und inhibiert durch Cyclosporin-A, die unregulierbare MPT ist Calcium-unabhängig und unbeeinflusst von Cyclosporin-A (He und Lemaster, 2002).

In HaCaT/Bcl-2-Zellen würde so durch HePC eine ausgeprägt DNA-Fragmentierung hervorgerufen, die nicht Caspase-8-abhängig ist. HaCaT/pIRES sind nicht sensibilisiert gegenüber ROS-vermittelter MPT, daher überwiegt die Aktivierung der Caspase-8 mit selektiver Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, früher Cytochrom C-Freisetzung und starker Aktivierung der Caspase-3 bereits nach 2 h. Mit entsprechender Inhibition der Caspase-8 in HaCaT/pIRES wird die DNA-Fragmentierung verhindert. Unter Berücksichtigung, dass nach 2 h keine Bid-Spaltung in beiden Linien vorliegt, ist zu schliessen, dass auf direkten Wege die Caspase-3 aktiviert wird. Die ausgebliebene Caspase-8-Spaltung widerspricht dem nicht, da deren Aktivierung initial unabhängig von einer Spaltung ist.

Sicherlich spielt die HePC-vermittelte ROS-Generierung auch in HaCaT/pIRES eine gewisse Rolle, die aber vielleicht erst zum Tragen kommt, wenn die ATP-Produktion der Mitochondrien schon erloschen ist, daher ATP als Kofaktor der Aktivierung der Caspase-9 nicht mehr zur Verfügung steht und deshalb die DNA-Fragmentierung trotz Cytochrom C-Freisetzung nicht in Erscheinung tritt. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Sensitivität verschiedener Zelllinien auf Edelfosin mit der Produktion von ROS korrelierte (Wagner et al., 1998).

Dies leitet über zu einer weiteren Eigenschaft der *mitochondrial permeability transition*, die entweder eine nekrotische oder eine apoptotische Form des Zelltodes induzieren kann, je nach dem ob, ausreichend ATP vorhanden ist. Falls die ATP-Versorgung der Zelle aufrechterhalten bleibt - auch über exogene Zufuhr - induziert die *mitochondrial permeability transition* Apoptose, bei Verringerung des ATP-Spiegels löst der gleiche Stimulus Nekrose aus, da die Aktivierung der Caspase-9 ausbleibt (Crompton et al., 1999; Kim et al., 2003). Dass hierbei Übergänge zu finden sind, liegt auf der Hand. Die MPT könnte daher in unserem System das Auftreten von DNA-Fragmentierung als typisches Kriterium der Apoptose und die nekrotischen Eigenschaften von HePC erklären. Neben der DNA-Fragmentierung wurde mit der Bisbenzimid-Kernfärbung

4. Diskussion

beobachtet, wie sich der Kern morphologisch unter dem Einfluß von HePC verändert. Hierbei fand sich Kernkondensation und Fragmentierung, aber keine Formation von *apoptotic bodies*, die das Endstadium der Apoptose anzeigen, sodass vermutet werden kann, dass nicht alle Stadien der Apoptose durchlaufen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem für Apoptose sehr frühen Nachweis der LDH-Freisetzung, der aber mit dem Beginn der DNA-Fragmentierung korreliert. Die irreversible Inhibition aller Caspasen mit z-VAD-fmk reduzierte zwar die DNA-Fragmentierung auf Kontrollwerte, doch der Zelltod wurde nicht verhindert wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen und eine kaum reduzierte Zytotoxizität unter z-VAD-fmk belegen. Dieses Phänomen wurde auch mit Erucylphosphocholin und anderen Alkylphosphocholinen beobachtet (Kugler et al., 2002; Naumann et al., 2004). Auch die Aktivierung des Fas-Rezeptors, welche wiederum den mitochondrialen Ceramid-Pool erhöht (Matsko et al., 2001), induzierte einen Zelltod, der nach Hemmung der Caspasen-Aktivität mit einem Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor deutliche nekrotischen Merkmale aufwies (Vercammen et al., 1998). Ähnliche Daten liegen auch für C₂-Ceramid vor (Ramos et al., 2003; Vercammen et al., 1998). Sogar in *Leishmania donovani* konnte HePC einen Apoptose-ähnlichen Zelltod induzieren, der nach Applikation von z-VAD-fmk keine DNA-Fragmentierung mehr aufwies, aber trotzdem Phosphatidylserin-Externalisierung und Zellschrumpfung zeigte (Paris et al., 2004).

Als Resümee läßt sich konstatieren, dass die Hypothese, nach der HePC die PC-Biosynthese auf der Stufe der CT inhibiert und dabei den zellulären Ceramid-Gehalt erhöht, der wiederum die Apoptose auslöst, und von Wieder (1998) erstmals formuliert wurde, die diversen Effekte der Alkylphosphocholine gut erklären kann. Sowohl das *capping* des Fas-Rezeptors unter bestimmten Bedingungen, als auch die zum Teil unspezifischen Alterationen von Signaltransduktionswegen, die nicht auf eine direkte Enzymhemmung der Substanz zurückzuführen sind, werden durch den membranmodulierenden Mediator Ceramid integriert. Das Hauptziel der Alkylphosphocholine stellt das Mitochondrium dar, wie in dieser Arbeit verdeutlicht werden konnte. Dort wäre Ceramid imstande, einerseits eine selektive Permeabilisierung der äußerer Membran auszulösen, entweder allein oder in Kooperation mit proapoptotischen Bcl-2-Proteinen, andererseits, falls dies z.B. durch eine Bcl-2-Überexpression verhindert wird, die ROS-Generierung zu verstärken und die MPT auszulösen, die den Zelltod, der apoptotische und nekrotische Merkmale aufweisen kann, trotz Bcl-2-Überexpression sicherstellt.

Zum Schluß sollen einige Überlegungen die Bedeutung des Fas-*cappings* und die Ceramid-Generierung unter dem Einfluß von Etherlipiden noch genauer diskriminieren. Rakotomanga et al. (2004) zeigten, dass HePC eine höhere Affinität zu Cholesterin aufweist als zu Phosphatidylcholin. Dazu passend sind Ergebnisse, die eine rasche Akkumulation dieser Substanzen in *lipid rafts*

4. Diskussion

beschreiben, da diese typischerweise einen hohen Anteil an Cholesterol aufweisen. Die weitere Aufnahme der Substanz erfolgt endozytotisch über die GTPase Dynamin (Van der Luit et al., 2002; Van der Luit et al., 2003). Ob die Substanz zuvor die Membran mit Hilfe eines spezifischen Transporters überqueren muss, um aufgenommen zu werden, kann anhand der vorliegenden Daten noch nicht abschliessend geklärt werden (Hanson et al., 2003; Perez-Victoria et al., 2003). Jedenfalls muß die Substanz intrazellulär vorliegen, um wirksam zu sein. In Jurkat-Zellen tritt bereits nach 15 min Inkubation mit ET-18-OCH₃ das Clustern von *lipid rafts* in Erscheinung und der direkte Nachweis der Kolokalisation von *raft clusters* bzw. *caps* an Hand fluoreszierender Edelfosin-Moleküle gelang bis zu 15 h Behandlungszeit. Erst sekundär wandert der Fas-Rezeptor nach 6 h in die *clusters* und die Apoptose beginnt nach 9 h Behandlungszeit. Die *raft*-Aggregation wird auch in Fas-negativen Jurkat-Zellen beobachtet. Sie ist unter diesen Umständen nicht suffizient zur Auslösung der Apoptose (Gajate et al., 2004).

Diese Ergebnisse belegen, dass Etherlipide primär die Membraneigenschaften deutlich verändern und das zunächst inkomplette *capping* (keine Fas-Rezeptoren) den physikochemischen Eigenschaften zuzuschreiben ist. Es konnte bereits beobachtet werden, dass die Membranfluidität unter Einfluß der Alkylphospholipide verändert wird (van Blitterswijk et al., 1987). Dies zeigt auch eine Studie, die mit hochsensiblen Kanninchen-Brustkrebszellen arbeitete (CMT). Schon nach drei Minuten Inkubation mit HePC konnte PS mittels Annexin V sowie Mikroversikulationen an der Plasmamembran nachgewiesen werden ohne die Membranintegrität zu zerstören. Nach 5 min schollen die Mitochondrien und das ER an, die beide nach 10 min zerstört waren. Es resultierte ein rapider Zelltod, der nicht Caspasen-abhängig war und keine DNA-Fragmentierung, sondern nur DNA-Kondensierung aufwies (Duijsings et al., 2004). Bei diesem extremen Beispiel der Wirkung von HePC kann fast ausgeschlossen werden, dass im Minutenbereich bereits signifikante Veränderungen der Membranzusammensetzung vorliegen, sprich ein reduzierter PC-Gehalt und ein erhöhter Ceramid-Gehalt, und eine derart deutliche Antwort in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten auslösen könnten. Zumal in HaCaT-Zellen der Ceramidgehalt mit 25 µM HePC nach 20 h nur auf ca. 170 % der Kontrolle anstieg und mit 7,5 µM keine signifikanten Änderungen auftraten (Wieder et al., 1998). Auch Gajate et al. (2004) konnten in Jurkat-Zellen über 8 h keine signifikante Ceramid-Generierung aufzeigen.

Es erscheint fast so, als könnte die Substanzklasse aufgrund direkter membranmodulierender Eigenschaften einen Teil der Ceramid-Wirkung imitieren, was unter bestimmten Umständen ausreichend ist, um eine artifizielle Form des Zelltodes zu induzieren, wie z.B. in oben genannten CMT-Zellen. An dieser Stelle sein nur nebenbei angemerkt, dass die einzige klinische Zulassung für Miltefosin gegen Hautmetastasen eines Mammakarzinoms besteht.

4. Diskussion

Welche Faktoren die Sensibilität der Substanz gegenüber Zellen determiniert, soll kurz erläutert werden. Eine Voraussetzung ist sicherlich die Proliferation der Zellen. Normale humane Hepatozyten und Rattenhepatozyten sind nicht proliferierend und verhielten sich resistent. Die Beobachtung aus der Zellkultur, dass postkonfluente, differenzierte HaCaT/Bcl-2-Zellen ebenfalls resistent sind, ist ein weiterer Hinweis in diese Richtung, der im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde. An die Proliferation einer Zelllinie ist die Aufnahme der Substanz gekoppelt, da nur proliferierende Zellen einen genügend hohen Lipid-Turnover aufweisen. Dementsprechend sind humane Hepatozyten und Rattenhepatozyten nicht in der Lage ausreichend Etherlipide zu akkumulieren und sind trotz Fas-Expression resistent (Gajate et al., 2004). Alle Literaturstellen, die die Wirkung der Etherlipide in Abhängigkeit ihrer zellulären Aufnahme untersuchten, bestätigen dies übereinstimmend.

Die weitere intrazelluläre Route *raft*-abhängiger, endozytotischer Vesikel, die in unserem Fall vorrangig aus HePC und weiteren Membranbestandteilen bestehen, ist noch ein weitgehend unerforschtes Gebiet. Derzeit gibt es Hinweise für einen konstitutiven Weg zwischen Plasmamembran, Golgi-Apparat und zurück zur Plasmamembran, der zur Aufrechterhaltung der Membranhomöostase dienen könnte. Der Turnover wird mit ca. 2 h angegeben, d.h. nach 2 h wäre die gesamte applizierte HePC-Menge einmal von der Membran zum Golgi und zurück gewandert, ein Zeitrahmen, der den verschiedenen bekannten Aufnahmekinetiken der Alkylphosphocholine entspricht (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001).

Zusätzlich wurde in einer Studie der Zusammenhang zwischen *De-novo*-PC-Synthese und vesikulären endozytotischen und exozytotischen Membrantransport nach PLD-abhängiger PC-Hydrolyse herausgestellt. Danach wird in Abhängigkeit des PC-Gehaltes der Vesikel die PC-Synthese reguliert und neu synthetisiertes Phosphatidylcholin im Minutenbereich in Vesikeln zur Plasmamembran zurück transportiert. Präinkubation mit HePC verhinderte den vesikulären Transport, da die *De-novo*-PC-Synthese inhibiert wurde (Coletti et al., 2000).

Es wird deutlich, dass der vesikuläre Transport, die Lipidkomposition der Plasmamembran bzw. der Vesikel und die *De-novo*-PC-Synthese in einem engen Verhältnis zueinander reguliert werden und HePC über endozytotische Vesikel schnell in die sensiblen Kompartimente der PC-Synthese wie ER und Golgi vordringt. So war in HaCaT-Zellen der Einbau von Cholin in Phosphatidylcholin bereits nach 4 h Behandlung mit 7,5 μ M HePC um mehr als 50 % gehemmt, hingegen, wie bereits erwähnt, der Ceramid-Spiegel noch unbeeinflusst (Wieder et al., 1998). Das von Gajate beobachtete einwandern des Fas-Rezeptors in die *cluster* nach 6 h könnte vielleicht über einen relativen Ceramid-Anstieg bei einem deutlichen PC-Abfall erklärt werden. Auch das CH11-induzierte *capping* benötigt nur eine geringen und transienten Ceramid-Anstieg über 4 min, der als

4. Diskussion

Initiationspunkt für die weitere Signaltransduktion dient (Cremesti et al., 2001).

In unserem System vermochte die Suppression der *De-novo*-Ceramid-Generierung mit Fumonisin-B1 die DNA-Fragmentierung nur zu vermindern, was die HePC-induzierte Antwort zumindest teilweise von der Ceramid-Generierung entkoppelt. Ein transienter, relativer Ceramid-Anstieg kann mit diesen Versuchen natürlich nicht ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse widerlegen aber die Beobachtungen in der parentalen HaCaT-Zelllinie, die nach Präinkubation mit Fumonisin-B1 keine DNA-Fragmentierung unter HePC aufwies (Wieder et al., 1998). Konsistent mit den übrigen hier ermittelten Daten, reagierten die HaCaT/Bcl-2 weniger deutlich auf eine Ceramid-Reduzierung als die HaCaT/pIRES, d.h. es müssen andere Faktoren bestimmt für die Auslösung der DNA-Fragmentierung sein und diese variieren sogar innerhalb des Transfektionssystems von der Mutter-Zelllinie über die vektortransfizierten Kontrollzellen zu den HaCaT/Bcl-2-Zellen. Neben den metabolischen Prädiktoren müssen daher weitere Merkmale der Zelle die Sensibilität gegenüber Alkylphosphocholine bestimmen.

Die Involvierung des CD95-Signalweges bei der Auslösung des HePC-induzierten Zelltodes wird, wie oben erläutert, immer wieder kontrovers diskutiert. In unserem System überwiegt er z.B. in den HaCaT/pIRES-Zellen unabhängig vom Initiationsmechanismus und weiteren Angriffspunkten intrazellulär. Andere Todesrezeptoren und TNF- α scheinen interessanterweise weit weniger oder überhaupt nicht einbezogen zu werden (Gajate et al., 2004), obwohl für den TNF- α -Rezeptor ebenfalls das Rezeptor-*clustering* in Zusammenhang mit einer Ceramid-Generierung beschrieben wird (Gulbins und Grassmé, 2002). Die Expression des CD95-Rezeptors ist also sicherlich ein wichtiger bestimmender Faktor hinsichtlich der Wirksamkeit der Substanzklasse. Vorläufige Ergebnisse aus unserem Labor, geben ebenfalls Anhaltspunkt diesbezüglich. So unterscheidet sich die Mutterzelllinie HaCaT von den beiden anderen transfizierten Zelllinien bezüglich der Expressionsstärke. HaCaT-Zellen exprimieren deutlich weniger Fas-Rezeptor als HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2. Dieser Unterschied könnte die differierende Sensibilität gut erklären und würde im Fall der HaCaT-Keratinocyten die langsameren biochemischen Alterationen über Ceramid in den Vordergrund stellen, im anderen Fall weit mehr eine Aktivierung des Fas-Systemes bzw. direkte physikochemische Eigenschaften der Substanz, was eine schnellere und ausgeprägtere Antwort zur Folge hätte, wie es auch in unserem Transfektionssystem der Fall ist. Es kann die abweichende Sensibilität der Transfektanten untereinander nicht auflösen.

Damit fällt das Augenmerk auf die Mitochondrien und deren Empfindlichkeit gegenüber HePC, da trotz der antiapoptotischen Wirkung von Bcl-2 in HaCaT-Keratinocyten bezüglich C₂-Ceramid und der Blockierung des extrinsischen Apoptoseweges mit dem entsprechenden Inhibitor, nach Behandlung mit HePC die Cytochrom C-Freisetzung und DNA-Fragmentierung gemessen werden

4. Diskussion

kann. Die Bedeutung des Redox-Status der Zelle und welche Rolle Bcl-2 und Ceramid einnehmen wurde oben schon diskutiert. Da jedoch offen ist, ob Ceramid zum Zeitpunkt der Cytochrom C-Freisetzung sich in den Mitochondrien angereichert hat und die vorliegenden Daten von Wieder und Gajate eher schliessen lassen, dass dies nicht der Fall ist und C₂-Ceramid als artifizielle Ceramid-Erhöhung die DNA-Fragmentierung in HaCaT/Bcl-2 nicht ermöglicht, sollen weitere denkbare Mechanismen in Betracht gezogen werden.

Die Lipidkomposition und Lipid-Proteininteraktionen in der Plasmamembran und in intrazellulären Kompartimenten insbesondere der Mitochondrien sind wichtige neue Ansatzpunkte zum Verständnis der Apoptoseeinleitung und Regulation (Cristea und Esposti, 2004). Mitglieder der Bcl-Familie wie Bax, Bcl-X_L und Bcl-2 haben die Eigenschaft in Membranen Kanäle zu bilden, die auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit bakteriellen Toxinen und physikochemische Interaktionen von Membranlipiden und Proteinen basiert (Degli Esposti, 2003).

Für Bid konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung und Oligomerisierung innerhalb der Proteinfamilie durch Triton X-100, einem nichtionischen Detergenz mit Lipidcharakteristika, aufgrund dessen spezifischen physikochemischen Merkmalen ausgelöst werden kann (Hsu und Youle, 1997). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Bindung von Lysophosphatidylcholin in die hydrophobe Tasche von Bid und Bcl-X_L. Es ermöglicht die Regulation von Proteinen über Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran (Losonczi et al., 2000). Deshalb ist eine direkte Interaktion von HePC am Mitochondrium mit verschiedenen Bcl-2-Proteinen eine weitere Möglichkeit, die zur Überwindung der protektiven Bcl-2-Funktion beitragen könnte. HePC liegt zum Zeitpunkt der Cytochrom C-Freisetzung am Mitochondrium vor (Geilen et al., 1994) und es hat strukturelle Ähnlichkeit mit Triton X-100 sowie insbesondere mit Lysophosphatidylcholin. Ausserdem induzierte Triton X-100 in U937-Zellen und HaCaT-Zellen Apoptose ohne einer primär, lytischen Komponente (Jelinek und Klocking, 1998) (Abbildung 4.1.).

4.3. Sphingomyelin-Analoga induzieren DNA-Fragmentierung in HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten

Nachfolgend werden die Eigenschaften der neu synthetisierten Sphingomyelin-Analoga diskutiert. Es zeigen sich teilweise Gemeinsamkeiten zu den vorherbeschriebenen Ergebnissen mit HePC.

Drei der vier Analoga lösten Bcl-2-unabhängig DNA-Fragmentierung in unterschiedlicher Intensität aus. Die Substanz AD2673 blieb bezüglich DNA-Fragmentierung und LDH-Freisetzung inaktiv, obwohl in HL60-Zellen bereits nach 3 h eine ausgeprägte Caspase-3-Aktivität gemessen werden konnte und nach zwei Stunden ein deutlicher Ceramid-Anstieg zu verzeichnen war (Dagan et al., 2003). Der offensichtliche Unterschied beruht wohl auf zelltypspezifischen Eigenschaften.

In Übereinstimmung mit obiger Studie aus dem Labor von Shimon Gatt induzierten die drei anderen Analoga in unserem Zellsystem DNA-Fragmentierung. In HL60-Zellen wurde nach zwei Stunden eine signifikante Ceramid-Erhöhung gemessen, der bereits nach 3 h eine konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung folgte, die nach 24 h ein Maximum erreichte. Die HaCaT-Zellen reagierten ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt (8h) mit DNA-Fragmentierung, die nach 24 h sehr markante Werte erreichte. Der benutzte Konzentrationsbereich war in beiden Studien vergleichbar.

Die Analoga sind daher potente Induktoren der DNA-Fragmentierung in differenten Zelllinien, die in HaCaT-Zellen in Kinetik, Dynamik und Morphologie an die Ergebnisse mit HePC erinnern. Beide Substanzklassen, die der Etherlipide und der Sphingolipide, interferieren direkt oder indirekt mit dem Ceramidstoffwechsel der Zelle und erhöhen deren Ceramidgehalt. Die saure Ceramidase katalysiert den Abbau von Ceramid zu Sphingosin. Die vermutete Hemmung dieses Enzyms durch die hier vorgestellten Sphingolipid-Analoga würde einen starken apoptotischen Stimulus erzeugen, da einerseits der intrazelluläre Ceramidgehalt erhöht wird, gleichzeitig Sphingosin-1-phosphat, das als proliferationsförderndes Signalmolekül gilt (Geilen et al., 2001), reduziert wird. Für dieses Bcl-2-überexprimierende System kann somit festgestellt werden, dass unabhängig vom Ort der Ceramid-Generierung die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 überwunden wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit C₂-Ceramid, das ebenfalls ein Sphingolipid-Analogon ist, widersprechen scheinbar obiger Argumentation, da es, obwohl der zelluläre Ceramid-Gehalt erhöht wird, keine apoptotische Funktion in HaCaT/Bcl-2 ausübt. C₂-Ceramid wird als kurzkettiges, wasserlösliches und zellpermeables Ceramid-Analogon nicht über den *raft*-abhängigen Lipid-Turnover aufgenommen, worüber es in den sensiblen Bereichen, wie etwa Mitochondrien, akkumulieren könnte, sondern es verteilt sich diffus über alle Membrankompartimente und im

4. Diskussion

Cytoplasma. Für die lipophileren neuen Sphingolipid-Analoga kann ein ähnliches Aufnahmeverhalten angenommen werden wie für HePC und natürliche Sphingolipide. Sie sollten zunächst in die Membran inserieren und dann in entsprechenden *raft*-abhängigen, möglichst sauren Aufnahmekompartimenten angereichert werden, um auf die saure Ceramidase einwirken zu können.

Zur Frage der lytischen Eigenschaften der Analoga konnten wir feststellen, dass die drei wirksamen Substanzen schon nach 5 h LDH-Freisetzung erzeugten. AD2673 löste weder DNA-Fragmentierung noch LDH-Freisetzung aus. Das Sphingosin-Analogon AD2673 hat als einziges Molekül dieser Substanzreihe keine Substituenten am Stickstoffatom des Aminopropandiol-Restes. Dieser Strukturunterschied könnte neben zelltypspezifischen Merkmalen der Grund für die fehlende biologische Wirksamkeit dieser Substanz in unserem Zellsystem sein. Daher ist der lytische Effekt der Substanzen wie bei HePC ein Teil des Wirkmechanismus und kein Detergenzeffekt. Auch eine zweitägige Inkubation der Substanzen mit Erythrozyten induzierte bis 12,5 μM nur 5 % Hämolyse (Dagan et al., 2003). Erythrozyten sind nicht-proliferierende Zellen, d.h. ihr Lipid-Turnover ist nur gering und die Zellen sind möglicherweise deswegen resistent.

Weiterhin fällt auf, dass die Analoga in Übereinstimmung mit den HePC-Ergebnissen, die DNA-Fragmentierung in HaCaT/Bcl-2 bei 10 μM AD2665 um den Faktor drei stärker ausgeprägt ist als in HaCaT/pIRES. Auch die Auszählung der apoptotischen Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab eine Betonung auf Seiten der Bcl-2-Zellen um den Faktor 1,5. Wir finden also beides: eine stärkere DNA-Fragmentierung auf Einzelzellebene und mehr apoptotische Bcl-2-transfizierte Zellen. Insbesondere HaCaT/Bcl-2-Zellen sind daher hochsensibel gegenüber Sphingolipid-Analoga. Durch Koinkubation von AD2665 und z-VAD-fmk konnte die Abhängigkeit der Kernfragmentierung von der Caspasen-Aktivierung belegt werden.

Die neuen Sphingolipid-Analoga sind effektive Induktoren der Caspasen-abhängigen DNA-Fragmentierung, die in unserem Zellsystem Bcl-2-unabhängig ausgelöst werden konnte und neben DNA-Fragmentierung als apoptotisches Kennzeichen auch nekrotische Merkmale, wie frühe LDH-Freisetzung und fehlende *apoptotic body* Formierung, trägt. Nach ersten Experimenten wird die saure Ceramidase als ein mögliches Zielenzym angesehen, nach dessen Inhibition Ceramid intrazellulär akkumuliert. Es könnte wie bei HePC an der Mediiierung des apoptotischen Signals beteiligt sein und für beide Substanzklassen der Ausgangspunkt der gemeinsamen Endstrecke darstellen. So könnten die apparenten Parallellitäten der beiden Substanzklassen bezüglich der Ergebnisse in HaCaT-Zellen Ausdruck der Ceramid-medierten DNA-Fragmentierung sein. Andererseits sind auch die oben angeführten Argumente zu direkten physikochemischen Wirkmechanismen von Alkylphosphocholinen in Betracht zu ziehen, da die beiden Substanzklassen – Sphingolipid-Analoga und Alkylphosphocholine – strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen.