

3. Ergebnisse

3.1. Zytotoxizität von HePC

Aufgrund der Struktur von Hexadecylphosphocholin erwartet man in wässriger Lösung eine Mizellenbildung mit lytischen Effekten an Zellmembranen. Daher wurde in diesem Zellsystem zunächst der Konzentrationsbereich ermittelt, der primär keine oder nur geringe lytische bzw. nekrotische Effekte in den beiden Zelllinien HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES hervorruft. Die Bestimmung der Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) ins Kulturmedium diente als Marker für unspezifische lytische Effekte von HePC. LDH ist ein ubiquitäres, zytoplasmatisches Enzym, das nach Beschädigung der Membran im Kulturmedium nachzuweisen ist.

HaCaT/bcl-2 und HaCaT/pIRES wurden 6 h mit verschiedenen Konzentrationen von HePC inkubiert. Bis zu einer Konzentration von 7,5 μM war keine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität in den HaCaT/Bcl-2-Klonen zu bestimmen. Im Vergleich dazu waren die HaCaT/pIRES-Klone etwas empfindlicher gegenüber der Behandlung mit HePC. Bereits bei 7,5 μM waren die Aktivitätswerte deutlich erhöht im Verhältnis zur Ethanolkontrolle. Nach Behandlung mit 25 bzw. 50 μM HePC wurde in beiden Zelllinien eine ähnlich starke Zunahme der LDH-Aktivität auf mehr als 500 % der Kontrolle gemessen. Als Vergleichssubstanz wurde C₂-Ceramid eingesetzt. Es ist ein kurzkettiges, synthetisches Ceramid-Analogon, das membranpermeabel ist und als ein gebräuchlicher Apoptoseinduktor bekannt ist. In früheren Experimenten wurde die Wirkung von C₂-Ceramid an HaCaT/Bcl-2 bzw. HaCaT/pIRES in unserem Labor untersucht, sodass sich diese Substanz als Kontrollsubstanz anbot. Die verwendete Konzentration von 10 μM C₂-Ceramid zeigte in Übereinstimmung mit älteren Daten keine zytotoxische Wirkung in beiden Zelllinien. Die Freisetzung der LDH im zeitlichen Verlauf über 8 h wurde mit der Konzentration von 7,5 μM HePC ermittelt, da diese keine unspezifischen lytischen Effekte in den HaCaT/Bcl-2 Zellen auslöste. In beiden Zelllinien konnte nach 8 h eine deutliche lytische Aktivität bestimmt werden, die in der vektortransfizierten Zelllinie doppelt so hoch war, als in den HaCaT/Bcl-2-Klonen. Insgesamt ist eine verzögerte LDH-Freisetzung der HaCaT/Bcl-2-Zellen zu verzeichnen, die bis 6 h nach Behandlungsbeginn nur wenig erhöht war. Dagegen waren die Messwerte der HaCaT/pIRES-Zellen bereits nach 6 h auf einem ähnlichen Niveau wie bei den Bcl-2 transfizierten Zellen nach 8 h. 30 μM C₂-Ceramid lösten nach 8 h keine zytotoxischen Effekte aus.

3. Ergebnisse

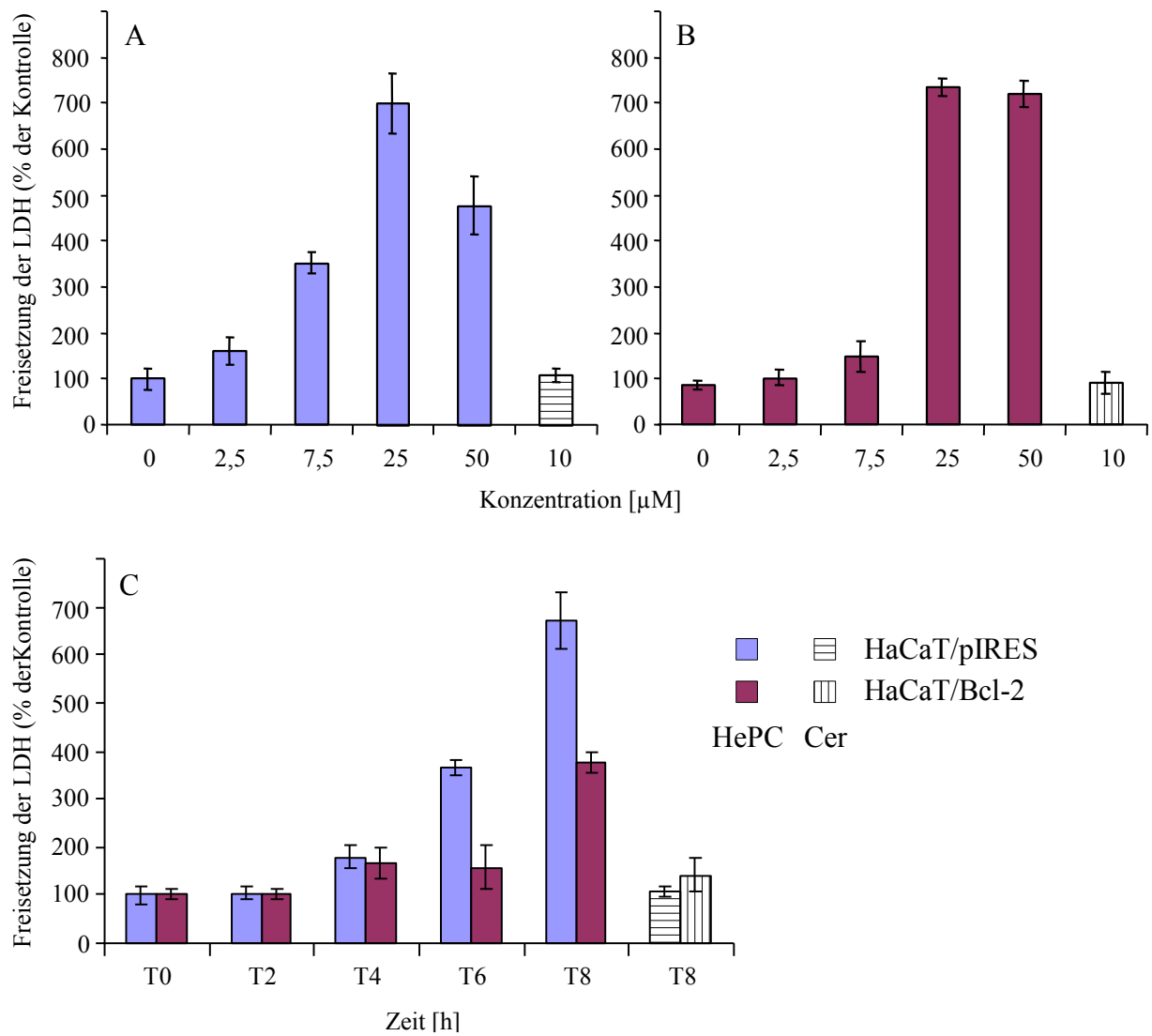


Abbildung 3.1.: Zytotoxizität von HePC. Serumfrei kultivierte HaCaT-Keratinocyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen HePC und 10 μM C₂-Ceramid 6 h behandelt (A: HaCaT/pIRES; B: HaCaT/Bcl-2). HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 wurden mit 7,5 μM HePC bzw. 30 μM C₂-Ceramid zu unterschiedlich Zeitpunkten geerntet (C). Die Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) wurde jeweils wie unter 2.2.2. beschrieben bestimmt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.2. Bcl-2-Überexpression hemmt die Proliferation von HaCaT-Keratinocyten

Zur Charakterisierung der beiden verwendeten Zelllinien, wurde ihr Wachstumsverhalten im Vergleich zu Wildtyp-HaCaT-Keratinocyten untersucht. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von 30.000/ml Medium ausgesät und nach 72 h die Zellzahl mit der Kristallviolettmethodem bestimmt. Die Zellen wurden fixiert, anschließend mit dem Farbstoff Kristallviolett, der an DNA bindet, inkubiert und nach Extraktion des Farbstoffes mit Triton X-100 die Absorption des Überstandes im ELISA-Photometer quantifiziert. Wie in Abbildung 3.2. zu erkennen, beobachtete man nach drei Tagen Wachstum bei den HaCaT/Bcl-2-Zellen eine 25 %ige Proliferationshemmung verglichen mit den beide anderen Keratinocyten-Zelllinien.

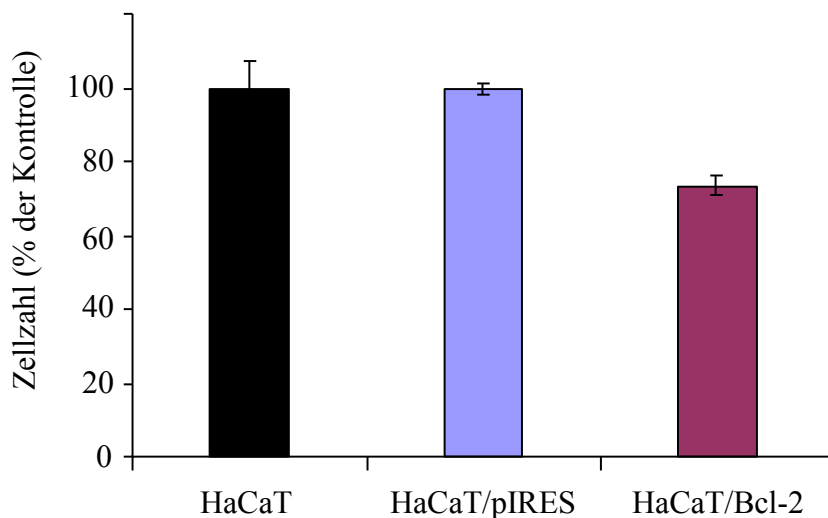


Abbildung 3.2.: Proliferationsvergleich. HaCaT-Keratinocyten wurden 48 h serumfrei kultiviert und die Zellzahl mit der Kristallviolettmethodem wie unter 2.2.3. beschrieben gemessen. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.3. HePC hemmt die Proliferation von HaCaT/pIRES- und HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten

Die proliferationshemmende Wirkung von HePC konnte an verschiedenen humanen *in vitro* Tumorzellsystemen nachgewiesen werden. Bei Experimenten mit Wildtyp-HaCaT - Keratinocyten, hemmte HePC das Wachstum der Zellen konzentrationsabhängig. Um das Wachstumsverhalten der HaCaT/Bcl-2- und HaCaT/pIRES-Klone zu ermitteln, wurden diese mit steigenden Konzentrationen von HePC 24 h inkubiert. Wie oben beschrieben, wurde mit der Kristallviolettmethod die Zellzahl bestimmt. Bereits bei einer Konzentration von 2,5 μM inhibierte HePC das Zellwachstum in beiden Zelllinien hochsignifikant. Im höheren Konzentrationsbereich ergaben die Messungen Werte um 20 % der Kontrolle wiederum in beiden Zelllinien. Ebenso hemmte C₂-Ceramid in beiden Zelllinien die Proliferation signifikant.

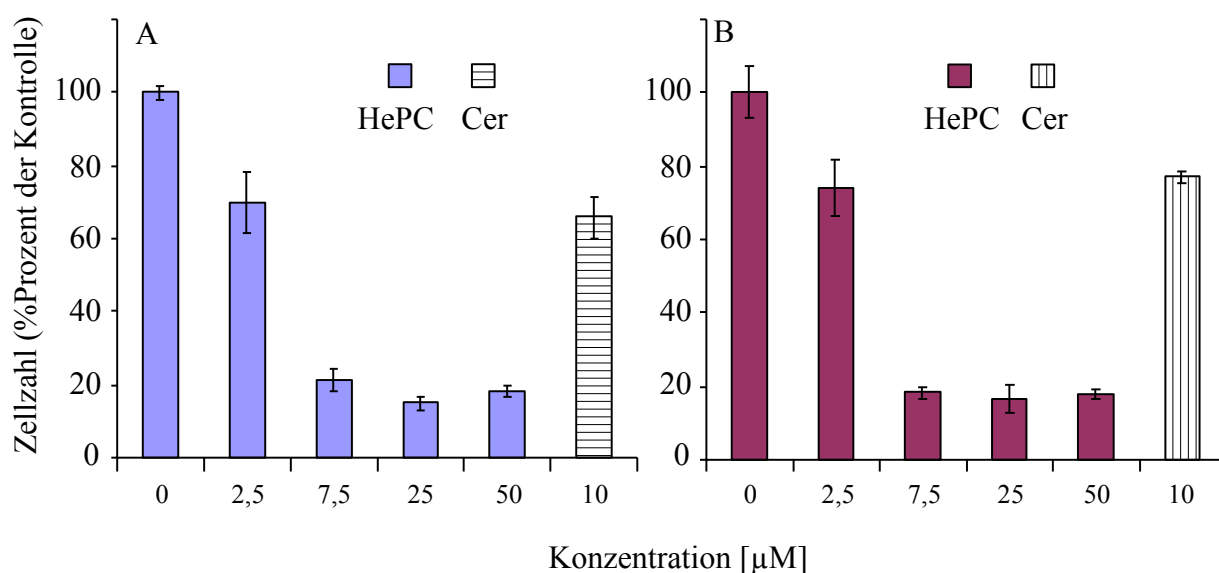


Abbildung 3.3.: Antiproliferativer Effekt von HePC. Präkonfluente HaCaT/pIRES (A) - und HaCaT/Bcl-2 (B) - Keratinocyten wurden 24 h serumfrei gehalten und anschliessend mit unterschiedlichen Konzentrationen HePC oder mit 10 μM C₂-Ceramid behandelt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.4. Bcl-Expression alteriert die Zellzyklusprogression und HePC induziert Zellzyklusstop in HaCaT-Keratinocyten

Die Zellzyklusanalyse gestattet das Proliferationsverhalten von Zellen zu beurteilen. HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES wurden mit Konzentrationen zwischen 0 und 7,5 μM HePC 24 h inkubiert. Jeweils ca. 1.000.000 Zellen wurden mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumjodid gefärbt und mittels Durchflußzytometer der DNA-Gehalt von 10.000 Zellen analysiert. Das Prinzip der Methode basiert auf der Oszillation des DNA-Gehaltes während der Zellzyklusprogression. So korreliert jede Zellzyklusphase mit einem bestimmten DNA-Gehalt, was sich in unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten ausdrückt, die den einzelnen Phasen zugeordnet werden können.

Der Vergleich beider unbehandelter Zelllinien bestätigte das verzögerte Wachstum der HaCaT/Bcl-2-Zellen, wie unter 3.2. mit der Kristallviolett-Methode beschrieben. 55 % der unbehandelten HaCaT/pIRES-Zellen konnten der G0-G1-Phase (2n-DNA-Gehalt) zugeordnet werden und 43 % der Zellen befanden sich in der S-Phase (2n-4n-DNA-Gehalt) des Zellzyklus. Dagegen war der Anteil der G0-G1-Phase der Bcl-2-Klone um ca. 15 % erhöht und korrespondierend die Synthese-Phase um ca. 15 % erniedrigt. Ca. 8 % der Zellen beider Linien verweilten in der G2-M-Phase (4n-DNA-Gehalt). Die Verschiebung der Zellzyklusverteilung hin zur G0-G1-Phase korreliert mit der Wachstumsretardierung der Bcl-2-Klone.

HePC induzierte eine biphasische Zellzyklusverschiebung. Bei 2,5 μM HePC akkumulierten die Zellen in der G0-G1-Phase bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase. Der umgekehrte Fall lag bei 5 μM und 7,5 μM vor. Aus der G0-G1-Phase verschob sich das Spektrum zur S-Phase. Bei 7,5 μM verringerten sich die G0-G1-Phase der HaCaT/pIRES-Zellen um 10 % auf 42 % und um 20 % auf 50 % bei den HaCaT/Bcl-2-Zellen jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Anteilig vermehrte sich die S-Phase der pIRES-Klone um 8 %, die der Bcl-Klone um 15 % bezogen auf die Kontrolle. Die restlichen Prozent verteilen sich auf die G2-M-Phase, die nach einem Gipfel bei 5 μM HePC wieder abfällt, aber auf etwas erhöhtem Niveau gegenüber der Kontrolle verbleibt.

3. Ergebnisse

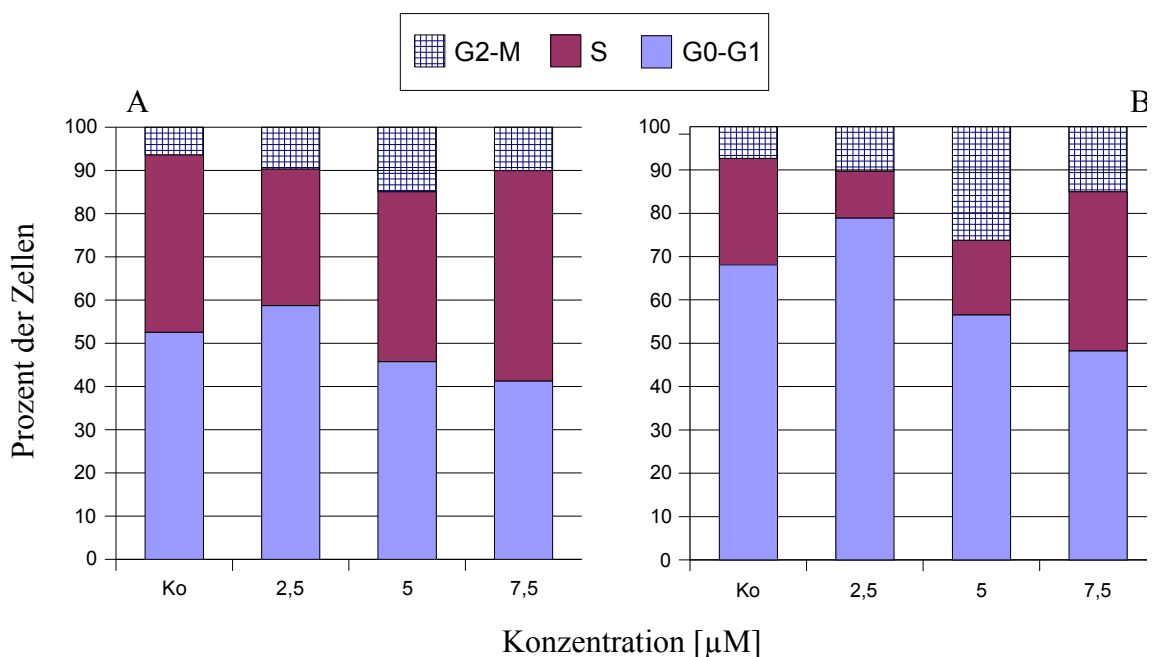


Abbildung 3.4.: Zellzyklusanalyse. HaCaT/pIRES (A) und HaCaT/Bcl-2 (B) wurden 24 h serumfrei kultiviert und anschliessend mit steigenden Konzentrationen HePC behandelt. Pro Ansatz wurden 10.000 Zellen im Durchflußzytometer analysiert, deren Zellzyklusverteilung in Prozent der Gesamtzellzahl gezeigt wird. Gegeben wird ein repräsentatives Experiment aus 4 unabhängigen Untersuchungen.

3.5. HePC induziert DNA-Fragmentierung in Bcl-2-transfizierten HaCaT-Keratinocyten

Ein Hauptmerkmal der Apoptose besteht in der internukleosomalen DNA-Fragmentierung durch spezifische Endonukleasen. Die mono- bzw. oligonukleosomalen DNA-Histon-Fragmente werden ins Zytoplasma freigesetzt und können mittels eines ELISA-Systems bestimmt werden, um die Apoptose zu quantifizieren.

Nach einer 24 stündigen Inkubation mit steigenden Konzentrationen von HePC wurde die DNA-Fragmentierung, als Maß für die Apoptose in beiden HaCaT-Zelllinien in Prozent der Kontrolle bestimmt. Im Konzentrationsbereich bis 7,5 µM induzierte HePC in beiden Zelllinien eine dosisabhängige Zunahme der DNA-Fragmentierung auf 714 % in den Bcl-2-transfizierten HaCaT und 442 % bei den Kontrollzellen. Bei weiterer

3. Ergebnisse

Konzentrationssteigerung überwogen die lytischen Eigenschaften der Substanz und die Fragmentierung sank auf Werte unter 100 % in beiden Zellsystemen. Die Kontrollsubstanz C₂-Ceramid bewirkte in den HaCaT/pIRES eine Steigerung der DNA-Fragmentierung auf mehr als 300 %, hingegen zeigte sich mit 10 µM C₂-Ceramid in den HaCaT/Bcl-2 Zellen keine signifikante DNA-Fragmentierung (Abbildung 3.5. A und B). Aufgrund der Ergebnisse zur Zytotoxizität und Apoptose wurde in den meisten sich anschließenden Experimenten mit der Konzentration von 7,5 µM HePC gearbeitet, da diese eine deutliche DNA-Fragmentierung in beiden Vergleichszelllinien nach 24 h auslöste und nach vier Stunden nur geringe direkte lytische bzw. nekrotische Effekte hervorrief. Zur Ermittlung des Beginns der DNA-Fragmentierung erfolgten Messungen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit 7,5 µM HePC innerhalb eines Zeitraumes von acht Stunden. In beiden Zelllinien war im Intervall zwischen vier und sechs Stunden Inkubationsdauer der Anstieg auf signifikant erhöhte Fragmentierungswerte zu verzeichnen, mit einer geringen Verzögerung in den HaCaT/Bcl-2-Zellen. Der Anstieg erreichte hier erst bei 6 h signifikante Werte. 30 µM C₂-Ceramid blieben in beiden Zelllinien wirkungslos. Hingegen induzierte der agonistische Fas-Antikörper CH11, der als starker apoptotischer Stimulus gilt, in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme der DNA-Fragmentierungswerte bereits nach acht Stunden, die tendenziell im Bcl-2-transfizierten Klon deutlicher erscheint (Abbildung 3.5. C).

In einer Vergleichsuntersuchung der drei HaCaT-Zelllinien konnte ein Sensibilitätsunterschied gegenüber HePC festgehalten werden. Aus Abbildung 3.5. läßt sich bereits eine stärkere DNA-Fragmentierung bei HaCaT/Bcl-2-Zellen als bei HaCaT/pIRES nachweisen. Abbildung 3.6. zeigt bei geringer Konzentration, dass sowohl HaCaT-Zellen als auch HaCaT/pIRES-Zellen bei 2,5 µM keine DNA-Fragmentierung aufweisen, hingegen HaCaT/Bcl-2-Klone bereits mit signifikanter Fragmentierung auf den Stimulus reagieren. Ein Transfektionsartefakt kann somit ausgeschlossen werden. Der Sensibilitätsunterschied beruht daher höchstwahrscheinlich auf der unterschiedlich hohen Bcl-2-Expression.

3. Ergebnisse

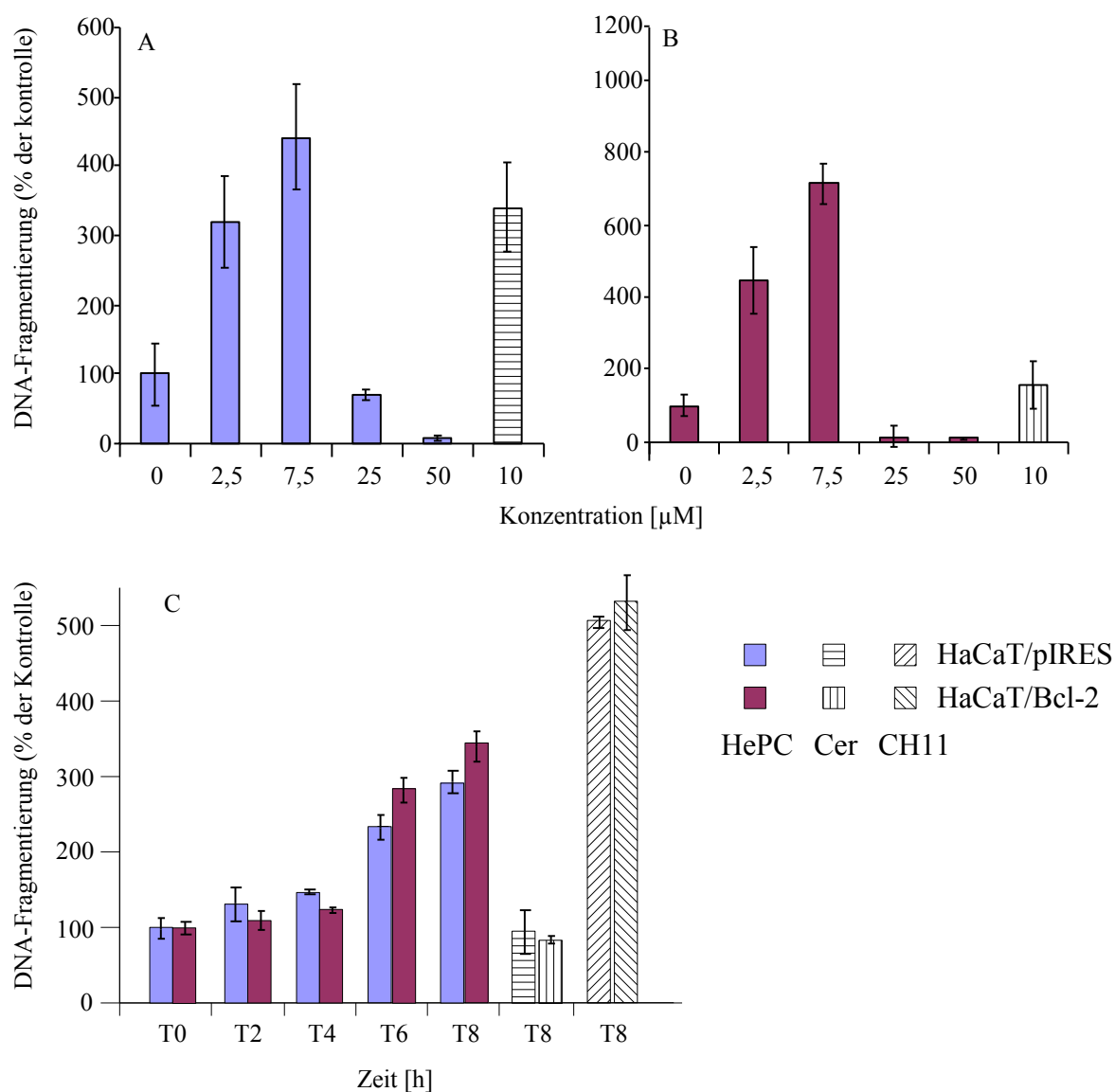


Abbildung 3.5.: DNA-Fragmentierung unter HePC. Serumfrei kultivierte HaCaT-Keratinocyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen HePC und 10 μM C₂-Ceramid 6 h behandelt (A: HaCaT/pIRES; B: HaCaT/Bcl-2). HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 wurden mit 7,5 μM HePC, 30 μM C₂-Ceramid oder mit 500 ng/ μl CH11 zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (C). Die DNA-Fragmentierung wurde jeweils wie unter 2.2.4.1. beschrieben bestimmt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

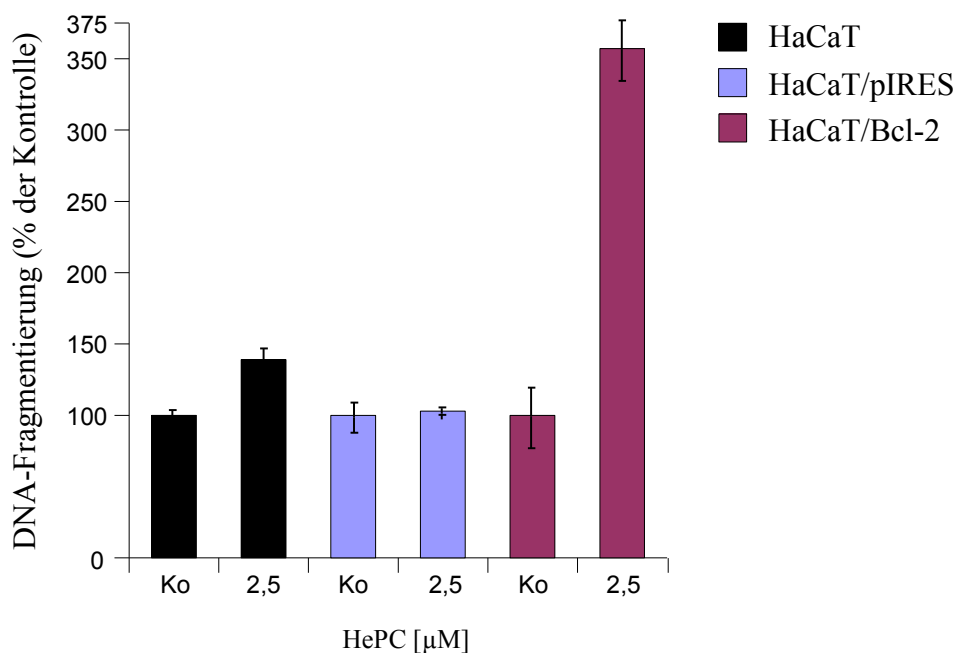


Abbildung 3.6.: DNA-Fragmentierung in verschiedenen HaCaT-Zelllinien. Gemäß dem Standardprotokoll wurden die Zelllinien HaCaT, HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 mit 2,5 µM HePC behandelt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3.6. Quantifizierung der HePC-induzierten Apoptose in HaCaT-Keratinocyten mittels Bisbenzimid-Färbung und Morphologie des Zelltodes

Die Messung der DNA-Fragmentierung mittels einer ELISA-Technik, wie sie unter 3.4 beschrieben wurde, ermöglicht nicht die Abschätzung, bei wieviel Prozent der Zellen DNA-Fragmentierung durch HePC induziert wird. Die bisher erzielten Ergebnisse deuten aber an, dass HePC in der Lage ist, in Bcl-2-überexprimierenden Zellen verstärkt die DNA-Fragmentierung zu induzieren. Deshalb untersuchten wir in HaCaT-Keratinocyten auf Einzelzellebene die DNA-Fragmentierung. Das Fluorochrom Bisbenzimid bindet an DNA-Bruchstellen und markiert so die Zellen, in denen DNA-Fragmentierung auftritt. In Zellen, die nicht mittels Apoptose untergehen, verteilt sich der Farbstoff homogen in den Kernen, der unter dem Fluoreszenzmikroskop dunkelblau erscheint. Als apoptotische Zellen gelten solche,

3. Ergebnisse

deren Kerne kondensiert, fragmentiert und unruhig gefärbt sind oder durch eine hellere Farbe hervortreten.

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten gezogen und vor Behandlungsbeginn 24 h serumfrei kultiviert. Nach 8 h Behandlungszeit mit 2,5 μM und 7,5 μM HePC sowie der Kombination aus 7,5 μM HePC und 10 μM des Breitspektrum Caspasen-Inhibitor z-VAD-fmk (siehe auch 3.10.4), der irreversibel alle Caspasen hemmt, wurden die Zellen geerntet und Zytospins angefertigt. Nach Färbung der Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bisbenzimid in PBS wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop jeweils mindestens drei Gesichtsfelder ausgezählt und der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen berechnet.

In beiden Zelllinien konnte HePC konzentrationsabhängig DNA-Fragmentierung auslösen. Die prozentuale Verteilung der Apoptose war in beiden Zelllinien sehr ähnlich, bei einer geringen Betonung der Fragmentierung in HaCaT/Bcl-2 unter 2,5 μM HePC. Dieses deutet an, dass in HaCaT/Bcl-2 die DNA möglicherweise stärker zerstückelt wird, als in HaCaT/pIRES. Z-VAD-fmk reduzierte in beiden Linien die DNA-Fragmentierung auf nicht signifikante Werte, aber bei HaCaT/Bcl-2 deutlich nicht auf Kontrollwerte.

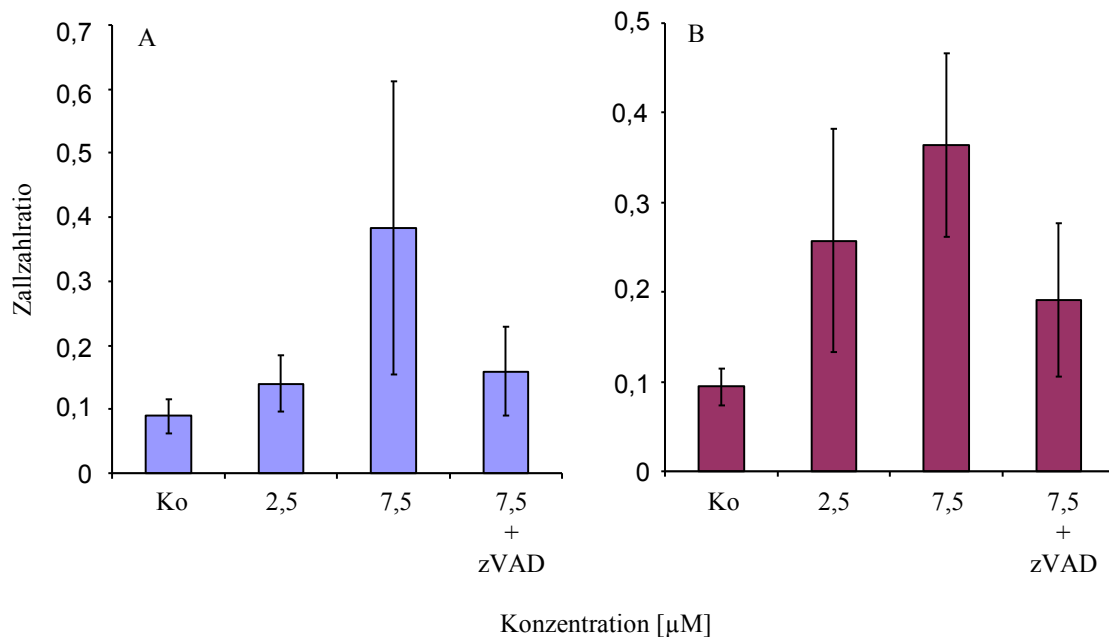


Abbildung 3.7.: Kernfärbung mit Bisbenzimid. HaCaT/pIRES (A) und HaCaT/Bcl-2 (B) wurden 8 h mit unterschiedlichen Konzentrationen HePC oder zusätzlich mit 10 μM z-VAD-fmk inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden jeweils mindestens 3 Gesichtsfelder ausgezählt und die relative apoptotische Zellzahl angegeben \pm SD (n=3).

3. Ergebnisse

Zur morphologischen Beurteilung der Zellen wurden Fluoromount-eingebettete Dauerpräparate den Bisbenzimid-gefärbten Zytospins gegenübergestellt. In Abbildung 3.8. zeigen A – F HaCaT/pIRES-Zellen und G – L HaCaT/Bcl-2-Zellen. Die Kontrollzellen (linke Spalte) zeigen im Lichtmikroskop das typische Wachstumsmuster adhärenter HaCaT-Keratinocyten, die sich ähnlich den Hornperlen des Plattenepithelkarzinoms zu konzentrischen, zwiebelschalenartig Formationen anordnen und ein pflastersteinartiges Bild ergeben. Bei stärkerer Vergrößerung zeichnen sich, homogen verteilt, zytoplasmatische Granula ab, die Keratin beinhalten, als weiteres Merkmal der potentiellen Differenzierungsfähigkeit der Zellen. In den Bisbenzimid-Färbungen der Zytospins fluoreszieren die Kerne zart und homogen bläulich, d.h. sie sind apoptosenegativ. Im Gegensatz dazu sind die Kerne der Zellen der mittleren Spalte unregelmässig in Form und Farbe. Sie treten hell leuchtend hervor, sind kondensiert und fragmentiert, haben jedoch keine Zeichen der, typischerweise bei Apoptose auftretenden, *apoptotic bodys*. Sie wurden 8 h mit 7,5 μM Hexadecylphosphocholin behandelt. Unter dem Lichtmikroskop findet sich nach 18 h eine z.T. zerstörte Zellstruktur, ein Verlust an Zellen und Vakuolisierung bei einer Reihe von Zellen. Die rechte Spalte umfaßt Zellen nach Behandlung mit 7,5 μM HePC und 10 μM z-VAD-fmk. Nach 18 h Behandlung ergibt sich hierbei lichtmikroskopisch ein deutlicher Verlust an Zellen beider Linien. Erhaltene Zellen sind abgerundet, stehen singulär und sind z.T. geschwollen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach 8 h Inkubation dokumentieren ein ähnlich homogenes Kernfärbungsmuster wie die Kontrollaufnahmen. Es leuchten nur vereinzelt Kerne auf.

3. Ergebnisse

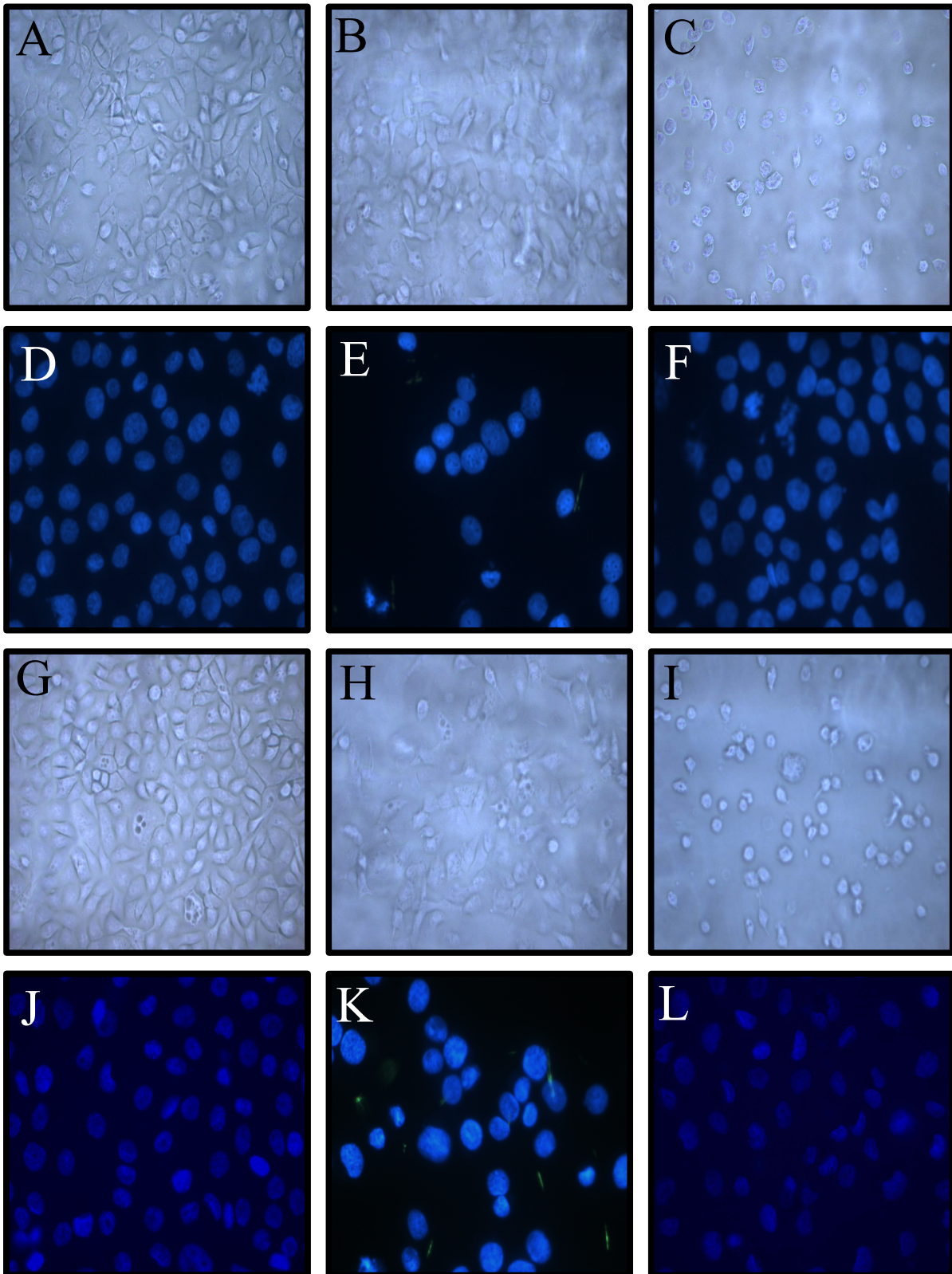


Abbildung 3.8.: Morphologie der Apoptose. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung x20) von HaCaT/pIRES (A, B, C) und HaCaT/Bcl-2 (G, H, I) im Vergleich mit fluoreszenzmikroskopischen Bildern (Vergrößerung x40) von HaCaT/pIRES (D, E, F)

3. Ergebnisse

und HaCaT/Bcl-2 (J, K, L). Die linke Spalte ist jeweils die Kontrolle, die mittlere Spalte enthält Aufnahmen von Zellen, die mit 7,5 μM HePC behandelt wurden und rechts wurden die Zellen mit 7,5 μM HePC und 10 μM z-VAD-fmk behandelt.

3.7. Quantifizierung der HePC-induzierten Apoptose in HaCaT-Keratinocyten mittels Annexin V-Färbung

Zur weiteren Eingrenzung des apoptotischen Effektes von HePC dienten Untersuchungen am Durchflußzytometer mittels der Doppelfärbung Annexin V/Propidiumiodid. Sie eignet sich zur Quantifizierung des Zelltodes und zur Diskriminierung von Nekrose und Apoptose auf Einzellebene. Die Phosphatidylserinexternalisierung ist eines der erste Phänomene im Apoptoseprozess, die sich weit vor der endgültigen Permeabilisierung der Membran der *apoptotic bodies* ereignet. FITC-Annexin V bindet hochaffin Phosphatidylserin und markiert somit einzelne apoptotische Zellen. Hingegen wird beim nekrotischen Zelltod die Membran frühzeitig lysiert und Propidiumiodid kann in die Zellen eindringen. Als roter, DNA-bindender Farbstoff interkaliert es an der DNA über deren AT-Regionen. Apoptotische Zellen erscheinen daher unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, nekrotische und apoptotische Zellen werden rot und grün gefärbt. Nur nekrotische Zellen leuchten rot.

Zur Auswertung am Durchflußzytometer werden pro Ansatz 1×10^6 Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Davon werden letztlich 10.000 analysiert und die prozentuale Verschiebung der Fluoreszenz in Punkt-Histogrammen angegeben. Im unteren linken Quadranten des Histogramms befinden sich ungefärbte, d.h. lebende Zellen. Nur apoptotische Zellen werden im unteren rechten Quadranten registriert; sie fluoreszieren grün. Der obere rechte Quadrant enthält Zellen, die sowohl apoptotische als auch nekrotische Merkmale aufweisen; diese Zellen werden rot und grün markiert. Schließlich umfaßt der linke obere Quadrant Zellen, die nur nekrotisch sind und rot erscheinen, d.h. es vollzog sich kein Phosphatidylserin-Flipflop als Kennzeichen der Apoptose.

In beiden Zelllinien lösten 5 μM HePC nach 24 h einen etwa gleich starken Effekt aus, der jedoch unerwartet gering ausfiel. Nur jeweils ca. 3 % der Zellen wanderten im Histogramm aus dem linken unteren Quadranten, der die nicht markierten Zellen repräsentiert, in andere Quadranten. Vorrangig sammelten sich die Zellen im rechten oberen Quadranten, der Annexin V- und Propidiumiodid-gefärbte Zellen enthält (Abbildung 3.9. A und B). Warum

3. Ergebnisse

nur derart wenige Zellen als apoptotisch bzw. nekrotisch gekennzeichnet werden, liegt vermutlich am Protokoll zur Aufbereitung der Zellen, d.h. die Trypsinierung und Zentrifugation. Eine ähnliche Abnahme der Apoptoserate findet sich auch bei ELISA-Messungen, aber erst im oberen Konzentrationsbereich. Stark nekrotische bzw. apoptotische Zellen zerfallen und lösen sich vom Kulturgrund ab. Bei einer Zentrifugation geht die Information verloren. Die FACS-Analyse erfordert mehrere Zentrifugationsschritte und zusätzlich eine Trypsinierung, die apoptotische bzw. nekrotische Zellen überdies schädigt. Auf diese Weise unterschätzt man die Zellzahl. Im Umkehrschluss lässt sich aber die Aussage treffen, dass in beiden Zelllinien die Anzahl der nekrotischen oder apoptotischen Zellen und der Verlust an Zellen annähernd gleich gross sein sollte, da eine ähnliche Zahl messbarer Zellen bei beiden Linien vorhanden war.

Die Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der Ereignisse legen obige Vermutung ebenso nahe. Nach acht Stunden Inkubation mit 7,5 μM HePC zeigte sich im linken unteren Quadranten bereits eine Abnahme der Zellzahl um 32 %, d.h. zu einem frühen Zeitpunkt lässt sich eine deutliche Zunahme des Zelltodes in HaCaT/Bcl-2 nachweisen. Diese verteilen sich ausschliesslich in den oberen beiden Quadranten für Propidiumiodid-gefärbte Zellen (oben links, 12 %) und Propidiumiodid/Annexin V-gefärbte Zellen (oben rechts, 20 %). Zu keinem Zeitpunkt erscheinen Zellen nur grün gefärbt (unten rechts), also rein apoptotische Zellen (Abbildung 3.10.)

3. Ergebnisse

Abbildung 3.9. (Seite 95): Annexin V-Färbung. HaCaT/pIRES (A) und HaCaT/Bcl-2 (B) wurden 24 h mit 5 μ M HePC inkubiert. Die Analyse erfolgte am Durchflußzytometer FACSCalibur von BecktonDickinson. Die Erstellung der Histogramme wurde mit MotFit durchgeführt. FL1-H grüne Fluoreszenz 1; FL2-H rote Fluoreszenz 2; FSC-H *forward light scatter*; SSC-H *side light scatter*; LL lower left; LR lower right; UL upper left; UR upper right; Quad Quadrant; R1 ausgewertete Region 1. Gezeigte wird ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten, mit ähnlichen Ergebnissen.

Abbildung 3.10. (Seite 96): Annexin V-Färbung bei Zeitabhängigkeit. HaCaT/Bcl-2 wurden in einem Intervall von 8 h mit 7,5 μ M HePC inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten T geerntet. Die Analyse erfolgte am Durchflußzytometer FACSCalibur von BectonDickinson. Die Erstellung der Histogramme wurde mit MotFit durchgeführt. FL1-H grüne Fluoreszenz 1; FL2-H rote Fluoreszenz 2; FSC-H *forward light scatter*; SSC-H *side light scatter*; LL *lower left*; LR *lower right*; UL *upper left*; UR *upper right*; Quad Quadrant; R1 ausgewertete Region 1. Gezeigte wird ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten, mit ähnlichen Ergebnissen.

3. Ergebnisse

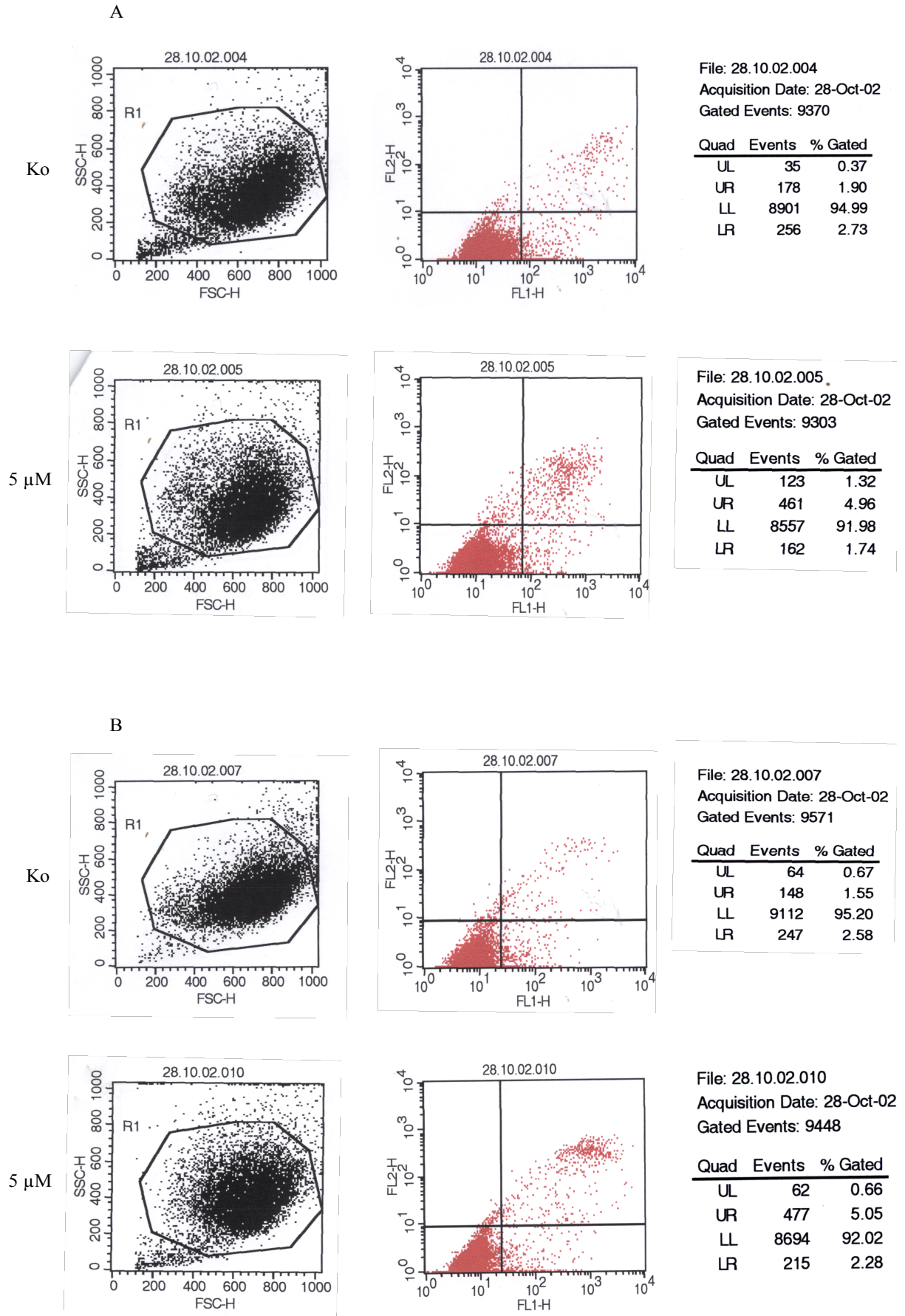


Abbildung 3.9.

3. Ergebnisse

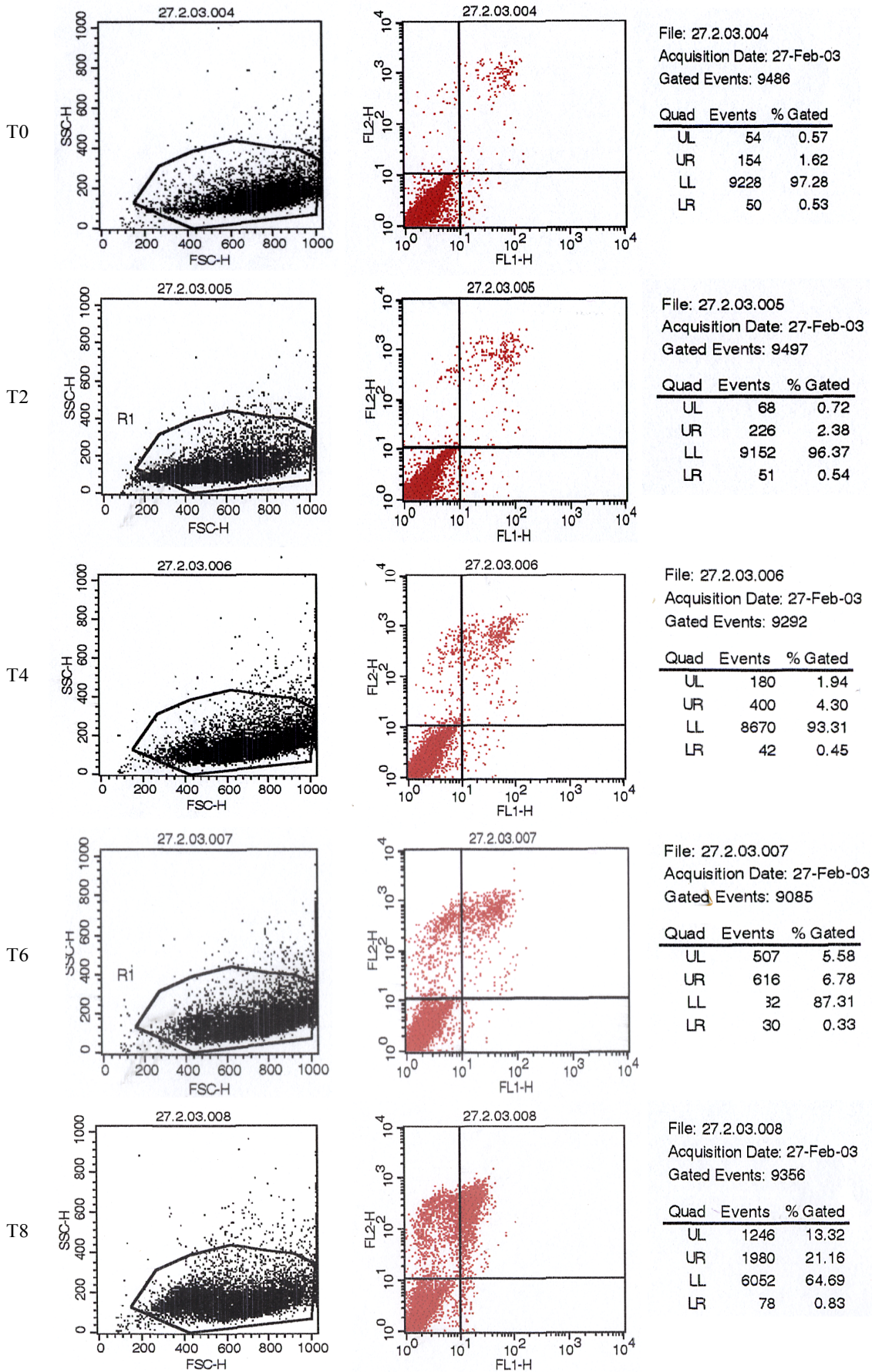


Abbildung 3.10.

3. Ergebnisse

3.8. HePC induziert DNA-Fragmentierung in A375/Bcl-2- und Mel-HO/Bcl-2-Zellen

Um den Apoptose-induzierenden Effekt von HePC an weiteren Zelllinien zu verifizieren, wurden zwei Bcl-2-überexprimierende Melanom-Zelllinie untersucht. Dazu wurden die Zelllinien A375/Bcl-2 und A375/pIRES sowie Mel-HO/Bcl-2 und Mel-HO/pIRES mit steigenden HePC-Konzentrationen 24 h inkubiert. Die Kultivierung von Melanomzellen erfordert die Anwesenheit von Serum im Medium. Wegen der ausgeprägten Albumin-Bindung von HePC musste bei diesen Experimenten der Konzentrationsbereich z.T. erhöht werden.

Die A375/pIRES-Klone reagierten auf die Behandlung mit HePC erst bei 50 μM und 75 μM mit signifikanten DNA-Fragmentierungswerten von ca. 250 % der Kontrolle. Dagegen induzierte HePC in den A375/Bcl-2-Zellen schon bei 10 μM deutliche DNA-Fragmentierung, die sich bis 50 μM zwischen 300 % und 400 % der Kontrolle bewegt. Bei 75 μM vervielfachte sich die Fragmentierung auf ca. 4000 % der Kontrolle. Zum Vergleich wurden die beiden Melanom-Zelllinien wie die HaCaT-Zellen ebenfalls 24 h mit 30 μM C₂-Ceramid behandelt. C₂-Ceramid vermochte in den Kontrollzellen nur eine geringe Zunahme der DNA-Fragmentierung auszulösen, die Bcl-2-transfizierten A375 blieben unbeeinflusst.

Die Mel-HO-Zelllinien erwiesen sich auch unter Serum recht empfindlich. Bereits bei 10 μM HePC reagierten die transfizierten Zellen Mel-HO/pIRES mit einer signifikanter DNA-Fragmentierung von 150 %; die Mel-HO/Bcl-2-Linie war wiederum tendenziell sensibler bei Fragmentierungswerten von 230 % der Kontrolle. 10 μM HePC lösten in der Mutterzelllinie Mel-HO keine Fragmentierung aus.

3. Ergebnisse

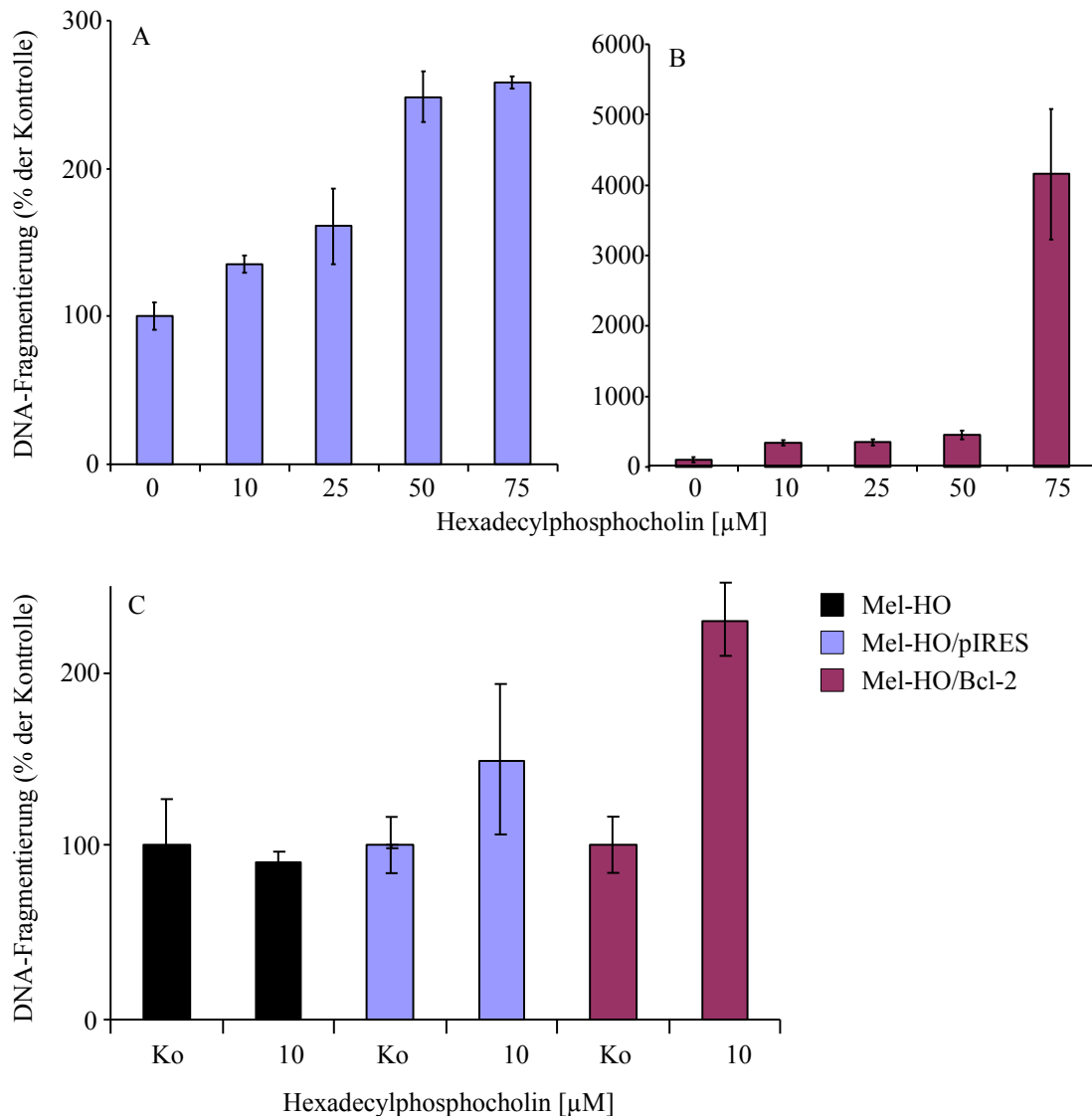


Abbildung 3.11.: DNA-Fragmentierung in Melanom-Zelllinien. A375/pIRES (A) und A375/Bcl-2 wurden mit steigenden Konzentrationen HePC 24 h behandelt. Die Mel-HO-Zelllinien wurden 24 h mit 10 μM HePC behandelt (C). Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.9. Überprüfung der Bcl-2- und p53-Expression in HaCaT- und Melanom-Zellen

HaCaT-Zellen exprimieren aufgrund einer Mutation des Transkriptionsfaktors p53 keine signifikanten endogenen Bcl-2-Proteinmengen. Daher eignen sie sich sehr gut als Model zur Untersuchung der protektiven Eigenschaften einer Bcl-2-Überexpression.

Um die Funktionstüchtigkeit der Transfektion in den HaCaT/Bcl-2-Zellen zu verifizieren, wurden subkonfluente HaCaT/pIRES, HaCaT/Bcl-2 und die Mutterzelllinie HaCaT hinsichtlich der humanen- und murinen Bcl-2-Expression untersucht. Damit verglichen wurde die Bro-Melanomzelllinie, die einen schaltbaren *tet-on*-Promoter für Bcl-2 besitzt und eine endogene Bcl-2-Expression aufweist. Nach Gesamtproteinextraktion und Proteinbestimmung wurden 50 µg Protein aufgetrennt, geblotet und die Zielproteine mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Aus Abbildung 3.12. ist die Überexpression des murinen Bcl-2-Gens in zwei verschiedenen Chargen HaCaT/Bcl-2-Klone ersichtlich. Die vier Keratinozyten-Linien exprimierten kein endogenes Bcl-2-Protein, hingegen exprimierten die vier Proben der Bro-Zellen humanes Bcl-2. Nach 24 h Inkubation mit 4 µM Doxycyclin aktivierte der schaltbare Bcl-2-Promoter der Bro/*tet-on*/Bcl-2-Zellen die Bcl-2-Expression.

Der Transkriptionsfaktor p53 ist ein wichtiger Mediator der Apoptose und induziert Zellzyklusstop. Interessanterweise scheint die p53-Expression in HaCaT/Bcl-2-Zellen etwas verstärkt im Vergleich zu den HaCaT und HaCaT/pIRES.

Die Bcl-2-Expression der Melanomzelllinien A375/Bcl-2 und A375/pIRES wurde gleichermaßen kontrolliert und dokumentiert.

3. Ergebnisse

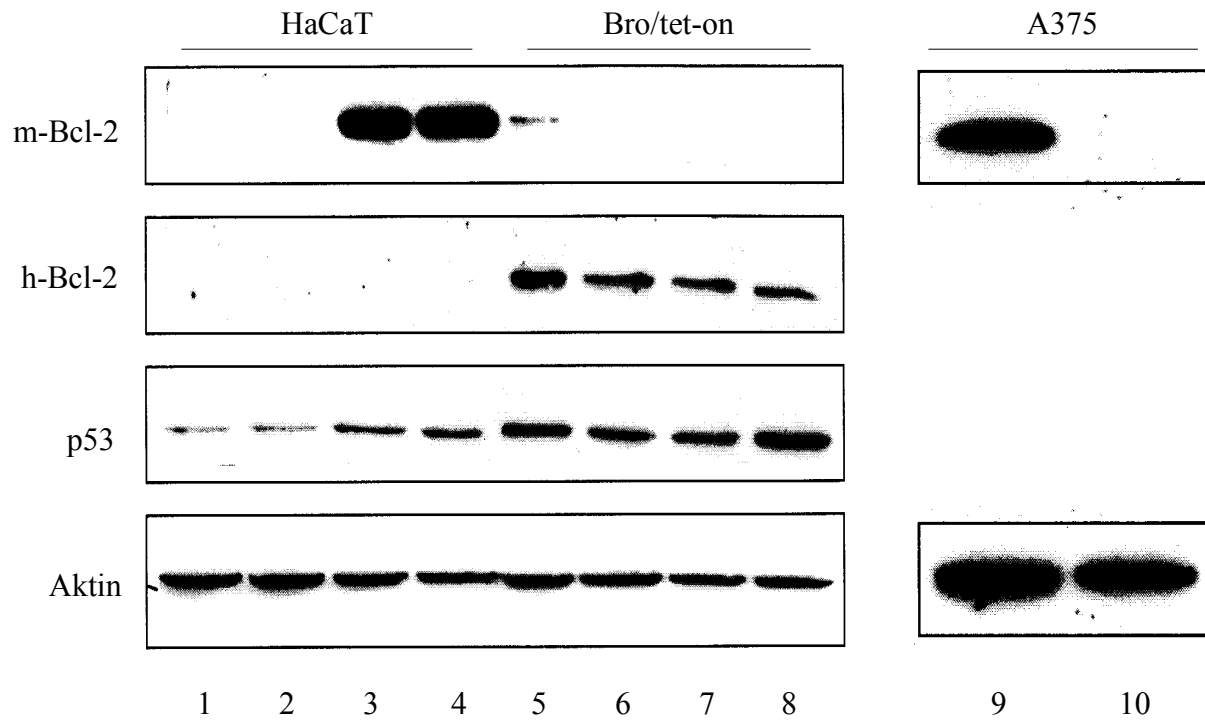


Abbildung 3. 12.: Exogene und Endogene Bcl-2-Expression. Entsprechend dem benötigten Protokoll wurden die Zellen kultiviert und ohne Apoptosestimulus lysiert. Anschliessend die Proteine über SDS-Page getrennt und mittels Immunoblotting identifiziert. 1 HaCaT; 2 HaCaT/pIRES; 3 HaCaT/Bcl-2 Klon 1; 4 HaCaT/bcl-2 Klon 2; 5 Bro/tet-on + 4 μM Doxyzyklin; 6 Bro/tet-on – Doxyzyklin; 7 Bro/pTRE + 4 μM Doxyzyklin; 8 Bro/pTRE – Doxyzyklin; 9 A375/Bcl-2; 10 A375/pIRES.

3.10. Intrazelluläre Signaltransduktion von HePC in HaCaT-Zellen

3.10.1. Die Bcl-2-Expression der HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten wird durch HePC nicht beeinträchtigt

Um zu überprüfen, ob HePC den Bcl-2-Expressionslevel verändert, wurde eine Zeitabhängigkeit erstellt. HaCaT/Bcl-2-Zellen, behandelt mit 7,5 μM HePC, wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten im Zeitintervall bis 18 h geerntet. D.h. mit entsprechendem

3. Ergebnisse

Puffer lysiert, Gesamtprotein extrahiert und 50 µg Protein zur Western Blot-Analyse eingesetzt.

Wie aus Abbildung 3.13. ersichtlich, verändert sich das Bcl-2-Expressionslevel im untersuchten Zeitraum nicht signifikant.

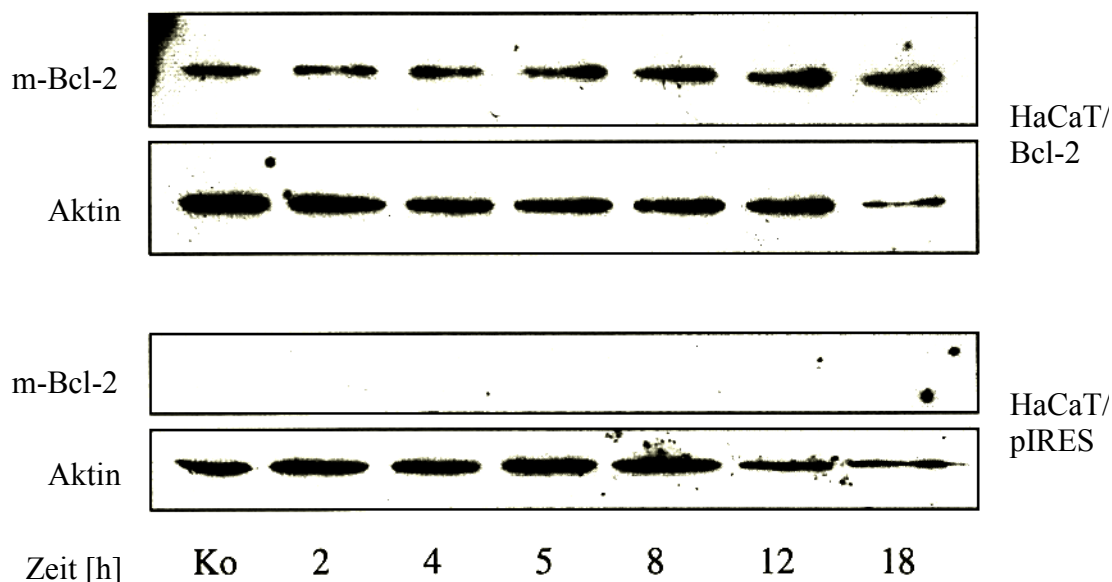


Abbildung 3.13.: Zeitabhängige Bcl-2-Expression. Serumfrei vorinkubierte HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES wurden mit 7,5 µM HePC 24 h behandelt. Nach anschliessender Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE, wurden die Proteine mittels Immunoblotting identifiziert.

3.10.2. HePC induziert Cytochrom C-Freisetzung in HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES

Das Mitochondrium steht im Mittelpunkt der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Kaskade. Um zu beurteilen, ob HePC Cytochrom C-Freisetzung induziert, wurden die beiden HaCaT-Linien mit 7,5 µM HePC inkubiert und anschliessend einer subzelluläre Fraktionierung unterzogen. 50 µg Protein aus der zytosolischen Fraktion wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Die immunologische Detektion von Cytochrom C erfolgte im Western Blot mittels eines Maus-Antikörpers gegen humanes Cytochrom C. Nach 8 h Behandlung mit HePC ist in beiden Zelllinien eine deutliche Bande detektierbar. Die kontrollbehandelten Zellen blieben negativ. Die Kinetik der Cytochrom C-Freisetzung wurde im Intervall bis 8 h

3. Ergebnisse

Behandlungszeit genauer betrachtet. In HaCaT/pIRES-Zellen translozierte Cytochrom C bereits nach 2 h in die zytosolische Fraktion, nach 4 h und 8 h Behandlungszeit sind markante Banden sichtbar. Die Bcl-2-Überexpression verzögerte in den HaCaT/Bcl-2-Klonen die Cytochrom C-Freisetzung, da erst nach 4 h Behandlungszeit eine entsprechende Bande erschien.

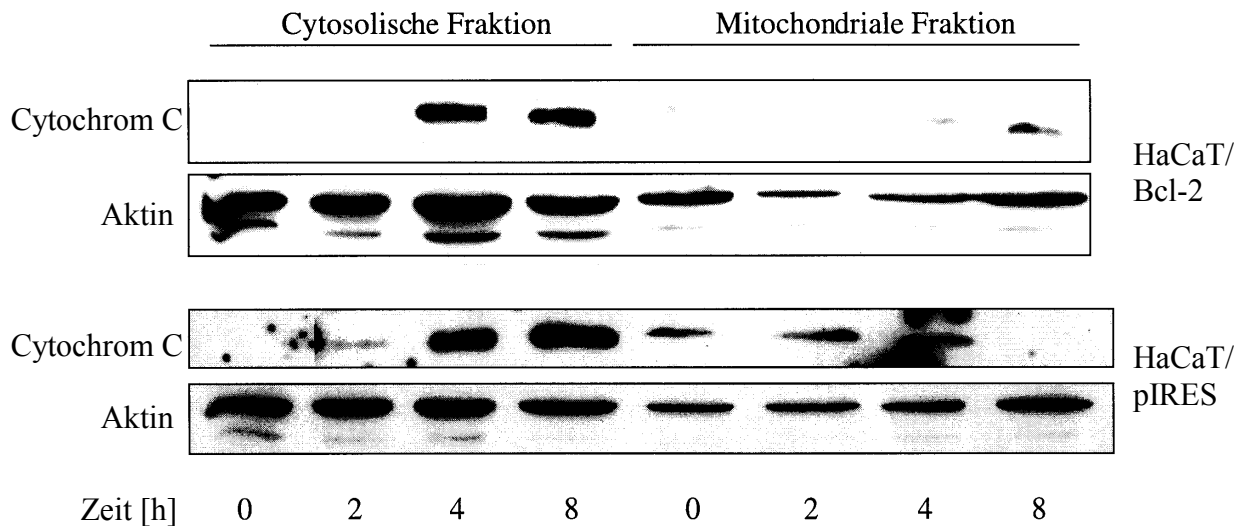


Abbildung 3.14.: Cytochrom C-Freisetzung. Serumfrei vorinkubierte HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES wurden mit 7,5 μ M HePC behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Nach anschliessender Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE, wurden die Proteine mittels Immunoblotting identifiziert.

3.10.3. HePC verursacht Caspase-3-Spaltung und Caspase-3-Aktivierung.

Im Signalweg unterhalb der Cytochrom C-Freisetzung ist die Caspase-3-Spaltung Voraussetzung für ihre Aktivierung und somit der Übertragung des proapoptotischen Signals. Caspase-3 ist die maßgebende Effektor-Caspase, die eine Vielzahl sog. Todessubstrate spaltet. Um die durch HePC in Gang gesetzte Signaltransduktion weiterzuverfolgen, wurde erhoben, ob nach Einwirkung von HePC die inaktive Proform der Caspase-3 in HaCaT-Keratinocyten abnimmt.

Die Zellen wurden 4 h und 8 h mit 7,5 μ M HePC behandelt und die Proteine, zur Immunodetektion anhand eines Western-Blotes, isoliert. Aus Abbildung 3.15. A kann man

3. Ergebnisse

entnehmen, dass bereits nach 4 h die Proform in den HaCaT/pIRES um 40 % und in den HaCaT/Bcl-2 um 55 % verringert war. Nach 8 h Inkubation verzeichnete man nur noch eine geringe weitere Reduktion der Proform der Caspase-3 in beiden Zelllinien. Dieser Zeitverlauf korrelierte mit dem Beginn der Cytochrom C-Freisetzung und der DNA-Fragmentierung.

In einem Aktivitätsansatz, der auf fluoreszenzspektroskopischen Messungen beruht, wurde die zugehörige Caspase-3-Aktivität bestimmt. Hierbei wird ein fluoreszenz-markiertes Substrat der Caspase-3 gespalten, was das Emissionsmaximum der Substanz verschiebt. Der Zuwachs der Fluoreszenzintensität bei 460 nm ist proportional zur Zunahme der Aktivität der Caspase-3.

In diesen Experimenten diente der agonistische CD95/Fas-Antikörper CH11 als Kontrolle neben HePC. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5. belegen, dass CH11 in beiden Zelllinien DNA-Fragmentierung auszulösen vermag und es ist bekannt, dass CH11 Caspase-3 aktiviert. Nach den Behandlungszeiten 2 h, 4 h und 6 h bei HePC sowie 2 h und 6 h bei CH11 wurden die Zellen geerntet und 2×10^5 Zellen pro Ansatz im Fluoreszenz-ELISA-Reader ausgewertet. Die Kontrollzellen HaCaT/pIRES reagierten auf die Behandlung mit 7,5 μ M HePC schon nach 2 h mit einer Steigerung der Caspase-3-Aktivität um den Faktor vier im Vergleich zur Kontrolle. Zu den späteren Zeitpunkten erhöhte sich die Aktivität nur noch gering auf 500 % der Kontrolle. CH11 induzierte eine sehr ausgeprägte Caspase-3-Aktivierung nach 2 h auf ca. 1200 %, die nach 6 h auf 2000 % anstieg. Die HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten bieten nach Stimulation ein weniger ausgeprägtes Aktivierungsmuster. HePC löste erst nach 6 h eine signifikante Aktivierung der Caspase-3 auf 150 % aus, wohingegen bei 2 h sogar eine Suppression angedeutet wird. Die Kontrollsubstanz CH11 konnte die Caspase-3 wiederum schon nach 2 h markant auf Werte um 300 % aktivieren, die zum Zeitpunkt 6 h nur gering vermehrt angehoben waren. Die Bcl-2-Expression reduzierte also die Amplitude der Aktivierung durch beide Substanzen, aber nur bei HePC war die Aktivierung im Vergleich mit den Kontrollzellen deutlich retardiert (Abbildung 3. 15. B). Dieser Zeitverlauf korrelierte wiederum mit dem Beginn der Cytochrom C-Freisetzung, dem Beginn der DNA-Fragmentierung und der Caspase-3-Spaltung.

3. Ergebnisse

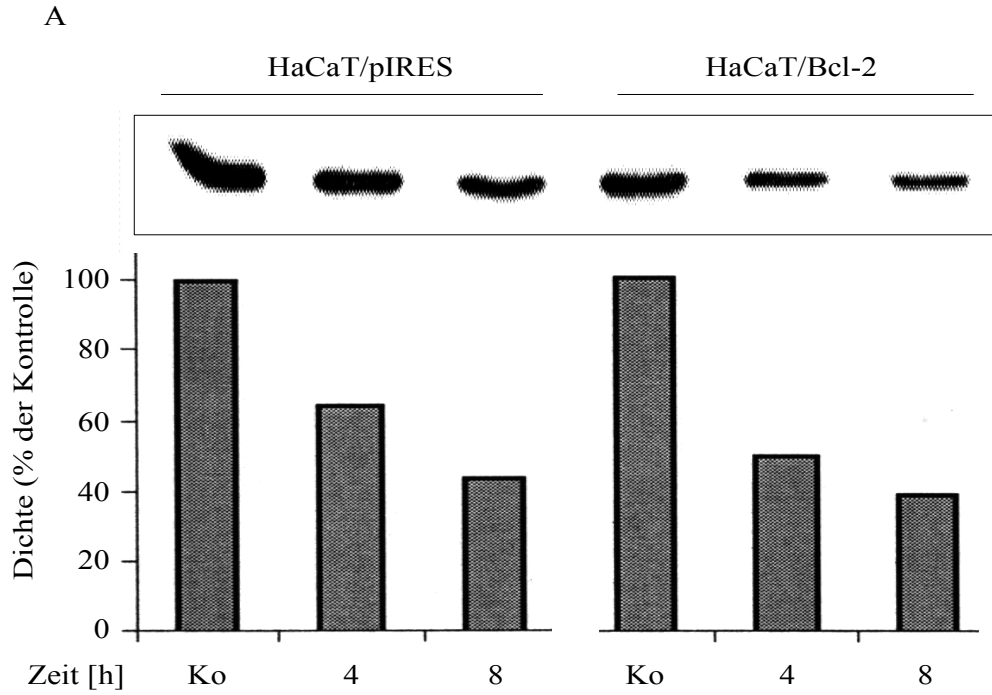


Abbildung 3.15. A

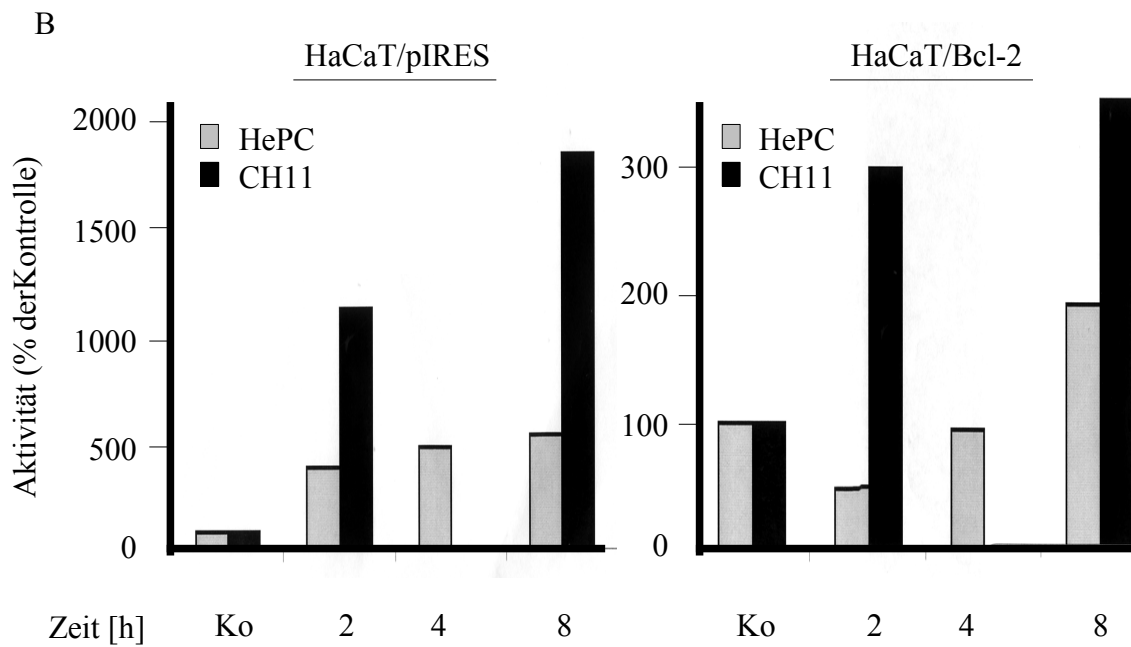


Abbildung 3.15. B

3. Ergebnisse

Abbildung 3.15. A und B (Seite 104): Caspase-3-Spaltung und Aktivierung. Serumfrei vorinkubierte HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES wurden mit 7,5 μM HePC 4 h und 8 h behandelt. Nach Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE, wurden die Proteine mittels Immunoblotting identifiziert. Die Abnahme der Proform der Caspase-3 wurde densitometrisch quantifiziert und auf Aktin normiert (A). Die Aktivität der Caspase-3 wurde mit einem *onestep* Fluoreszenzassay bestimmt. Nach 2, 4 und 8 h Behandlung mit 7,5 μM HePC bzw. 500 ng/ μl CH11 wurde dem Ansatz 100 μl Reagenz hinzugefügt und 2 h inkubiert. Anschliessend erfolgte die Messung im Fluoreszenz-ELISA-Reader (B). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten.

3.10.4. HePC-induzierte DNA-Fragmentierung wird durch z-VAD-fmk und Caspase-3-Inhibitor komplett verhindert

Die Aktivierung von Caspasen ist ein wichtiges Kennzeichen der Apoptose und es konnte oben gezeigt werden, dass HePC in beiden Zelllinien Caspase-3 aktiviert. Deshalb wurden Caspase-Inhibitoren verwendet, um zu testen, ob diese die Apoptose inhibieren. Z-VAD-fmk inhibiert alle Caspasen irreversibel, in dem er kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms bindet. Der Caspase-3/7-Inhibitor Ac-DEVD-CHO (C3I) hemmt im Konzentrationsbereich bis 100 μM spezifisch die beiden entscheidenden Effektor-Caspasen. Aufgrund einer kompetitiven Substratbindung ist die Hemmung im Gegensatz zu z-VAD-fmk aber reversibel.

Die Zellen wurden mit jeweils 10 μM C3I oder z-VAD-fmk 1 h vorinkubiert. Zu Behandlungsbeginn wurde frisches Medium zusammen mit 7,5 μM HePC und entsprechendem Inhibitor zugegeben.

Nach 24 h Behandlung blockierten die Inhibitoren vollständig die DNA-Fragmentierung in beiden Zelllinien. Weder der Caspase-3-Inhibitor noch zVAD-fmk verstärkten die Zytotoxizität von HePC nach 4 h. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass HePC Caspasen aktiviert und dass insbesondere Caspase-3 eine tragende Rolle bei der Ausführung der DNA-Fragmentierung inne hat.

3. Ergebnisse

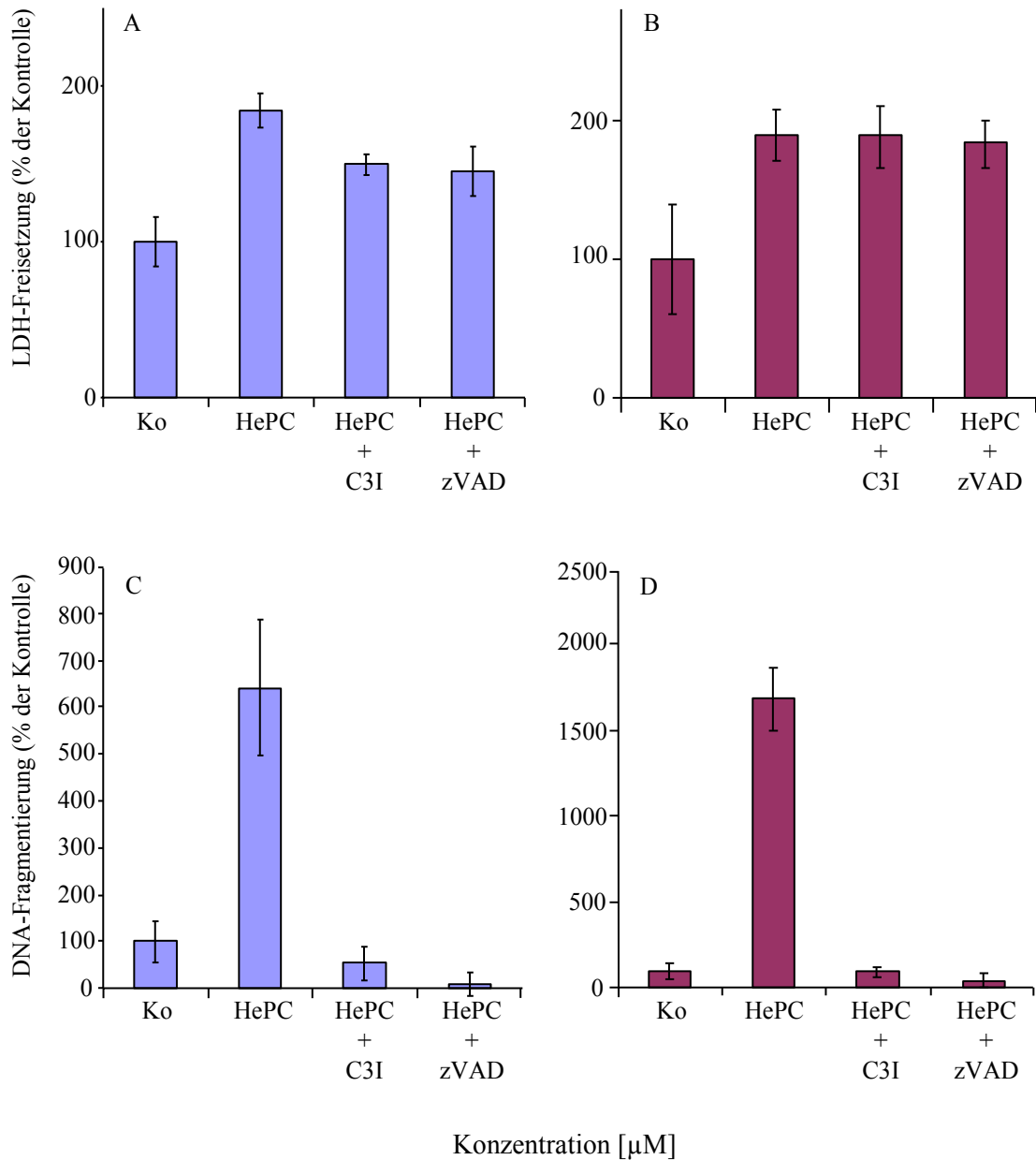


Abbildung 3.16.: LDH-Freisetzung und DNA-Fragmentierung bei Caspasen-Inhibitoren. HaCaT/pIRES (A, C) und HaCaT/Bcl-2 (B, D) wurden jeweils 1 h mit 10 μM C3I oder mit z-VAD-fmk 10 μM vorinkubiert. Anschliessend wurde neues Medium mit 7,5 μM HePC und frischen Inhibitor hinzugefügt und 24 h behandelt (C, D). Nach 6 h Inkubation wurde die LDH-Freisetzung bestimmt (A, B). Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.10.5. Caspase-8-Inhibitor blockiert nur in HaCaT/pIRES die HePC-induzierte DNA-Fragmentierung

Die Caspasen-8/9/10 sind Initiationscaspasen, die, je nach dem welcher Apoptose-Weg aktiviert wird, die Apoptose einleiten. Der mitochondriale Apoptose-Weg wird durch Caspase-9 initiiert. Am Beginn des extrinsischen Systems stehen Caspase-8/10. Mit spezifischen Inhibitoren wurde in den folgenden Experimenten untersucht, welchen Beitrag die beiden Wege zur HePC-induzierten DNA-Fragmentierung leisten.

Die reversibel hemmenden Caspase-Inhibitoren Ac-IETD-CHO für Caspase-8/10 und Ac-LEHD-CHO für Caspase-9 wurden, wie unter 3.10.4. beschrieben, eingesetzt.

Nach einer Inkubationsphase von 24 h reduzierte die Behandlung mit 50 μ M C9I und 7,5 μ M HePC die DNA-Fragmentierung in beiden Zelllinien auf Kontrollniveau. Die Kombination aus 50 μ M C9I und 50 μ M C8I ergab wiederum in beiden Linien eine Erniedrigung auf Ausgangswerte. 50 μ M C8I allein konnte die DNA-Fragmentierung nur in HaCaT/pIRES supprimieren. In HaCaT/Bcl-2-Zellen änderten sich in diesem Falle die Fragmentierungswerte nicht signifikant. Es ergibt sich somit ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Relevanz des extrinsischen Apoptoseweges bei den beiden HaCaT-Linien.

Alle Ansätze mit Caspaseninhibitoren zeigten eine Reduktion der LDH-Freisetzung nach 4 h Inkubation.

3. Ergebnisse

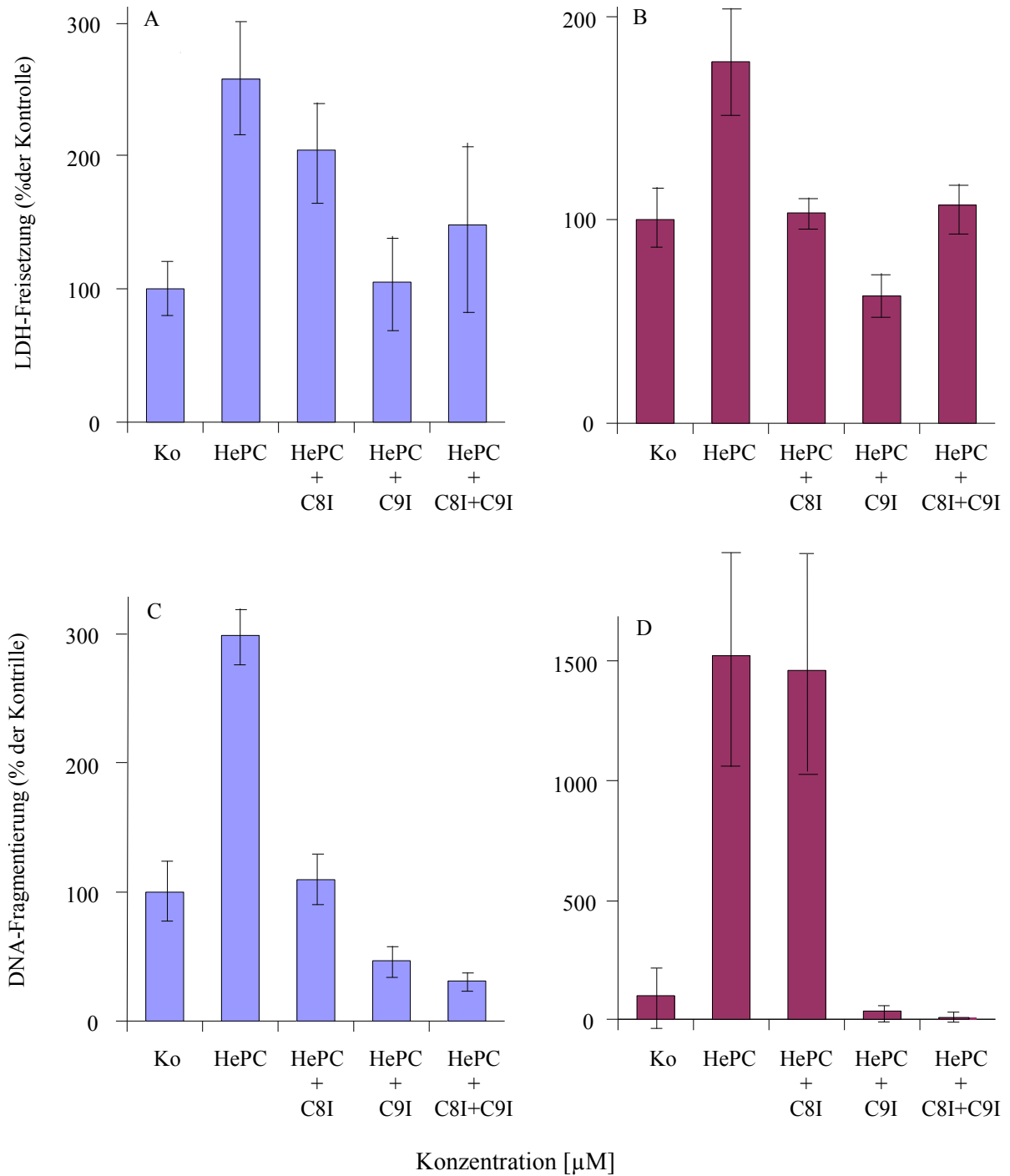


Abbildung 3.17.: LDH-Freisetzung und DNA-Fragmentierung bei Caspase-8/9-Inhibitoren. HaCaT/pIRES (A, C) und HaCaT/Bcl-2 (B, D) wurden jeweils 1 h mit 50 μM C8I und/oder mit 50 μM C9I vorinkubiert. Anschliessend wurde neues Medium mit 7,5 μM HePC und frischen Inhibitor hinzugefügt und 24 h behandelt (C, D). Nach 6 h Inkubation wurde die LDH-Freisetzung bestimmt (A, B). Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

3.10.6. HePC induziert keine Caspase-8-Spaltung sowie keine initiale Bid-Spaltung

Caspase-8 und Bid stehen am Beginn des CD-95-Signalweges. Es wurde von zwei Arbeitsgruppen berichtet, dass ET-18-OCH₃ den extrinsische Apoptose-Weg als initierendes Apoptoseereignis aktiviert. Daher wurde untersucht, ob HePC in diesem System Caspase-8 und Bid spaltet.

HaCaT-Keratinocyten wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und vor Behandlungsbeginn 24 h serumfrei kultiviert. Es wurde eine Zeitabhängigkeit der Caspase-8- und Bid-Spaltung erstellt, die die Ereignisse innerhalb der ersten 8 h genauer untersucht und mit CH11 und C₂-Ceramid verglichen. Entsprechend des Protokolls wurden die Proteine isoliert und mit einem monoklonalen Antikörper, der die Proform und die Spaltprodukte erkennt, die Caspase-8-Spaltung detektiert. Anschliessend wurde ein polyklonaler Bid-Antikörper inkubiert.

Abbildung 3.18. zeigt, dass in beiden Linien weder HePC noch CH11 und C₂-Ceramid in den ersten 8 h Caspase-8 spaltet.

Erst nach 8 h Behandlung mit HePC erkennt man eine deutliche Bid-Spaltung in beiden Zelllinien. Sie wird zu einem Zeitpunkt sichtbar, der sich nach der Cytochrom C-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung befindet. Eine initiale, apoptoseauslösende Funktion für Bid wird somit unwahrscheinlich. CH11 erzielt nach 8 h in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion von Bid. Bei C₂-Ceramid reduziert die Bcl-Expression das Ausmaß der Bid-Spaltung nach 8 h.

3. Ergebnisse

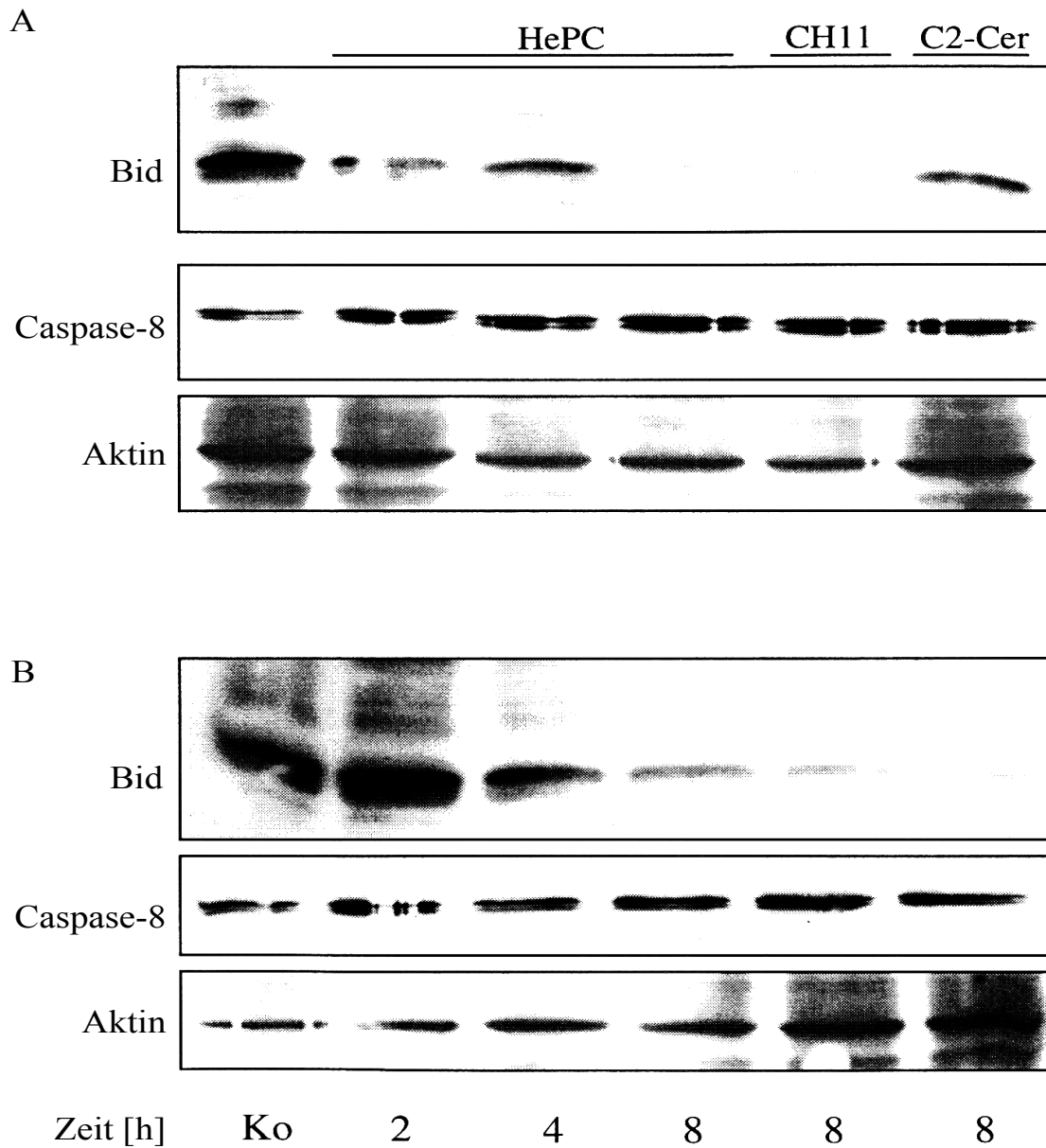


Abbildung 3.18.: Caspase-8- und Bid-Spaltung. HaCaT/Bcl-2 (A) und HaCaT/pIRES (B) wurden mit 7,5 μM HePC 2, 4 und 8 h behandelt. Zur Kontrolle wurden mit 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ CH11 und 30 μM C₂-Ceramid 8 h behandelt. Nach Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE, wurden die Proteine mittels Immunoblotting identifiziert.

3. Ergebnisse

3.10.7. Fumonisin-B1 reduziert teilweise die DNA-Fragmentierung

Um die Hypothese von Wieder et al. (1998), dass HePC seine Wirkung über einen Ceramid-Anstieg vermittelt, in unserem Zellsystem zu verifizieren, setzten wir Fumonisin-B1 (FB1) ein, das die Ceramid-Synthese auf der Stufe der Sphinganin-*N*-acyltransferase hemmt (Merrill et al., 1996). In HaCaT-Zellen antagonisierten 50 μ M Fumonisin-B1 die Wirkung von 25 μ M HePC, sodass in diesen Experimenten ebenso mit 50 μ M 20 h vorinkubiert wurde und anschliessend 7,5 μ M HePC und 50 μ M FB1 koinkubiert wurden und nach 24 h die Anreicherung zytosolischer Nukleosomen bestimmt wurde.

Abbildung 3.19. zeigt eine Reduzierung der Fragmentierungswerte in HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 mit 7,5 μ M HePC und 50 μ M FB1 um jeweils ca. 30 % im Vergleich zur alleinigen Behandlung der Zellen mit 7,5 μ M HePC.

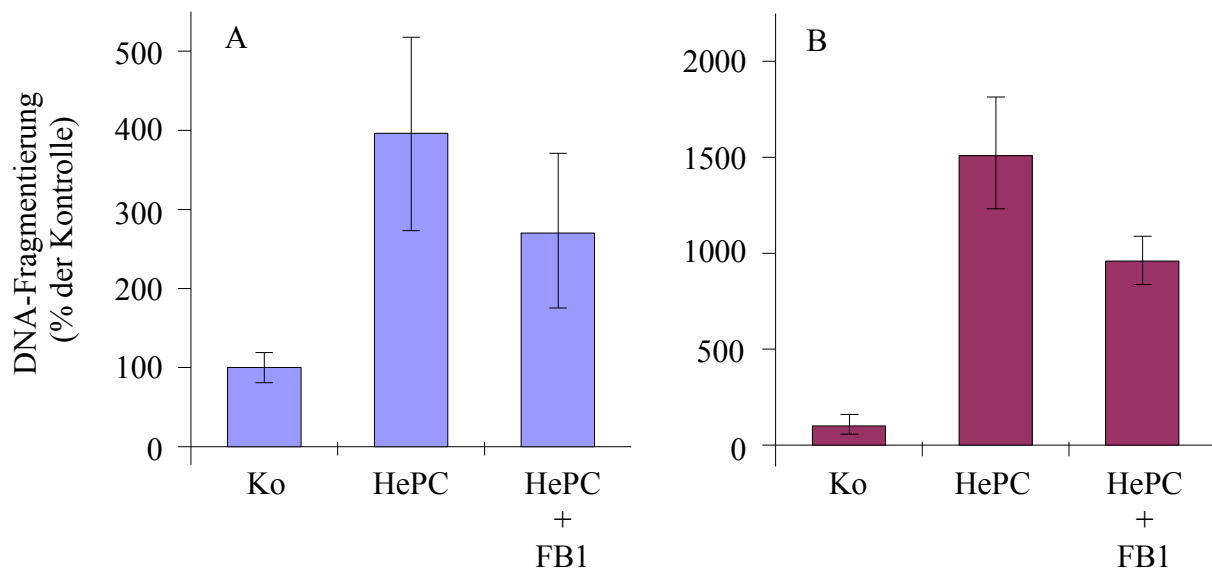


Abbildung 3.19.: Fumonisin-B1. HaCaT/pIRES (A) und HaCaT/Bcl-2 (B) wurden jeweils 20 h mit 50 μ M Fumonisin-B1 serumfrei vorinkubiert. Anschliessend erfolgte die Koinkubation von 7,5 μ M HePC und 50 μ M FB1 über 24 h und die DNA-Fragmentierung wurde mittels ELISA-Technik ermittelt. Die Werte sind gegeben als % der Kontroll \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

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

Freundlicherweise stellte uns Dr. S. Gatt vier neu synthetisierte Sphingomyelin-Analoga zur Verfügung. Einige ihrer biologischen Wirkungen wurden erstmalig in dieser Arbeit untersucht.

3.11.1. Zytotoxizität von AD2646, AD 2673, AD2665 und AD2687

Wie unter 3.1. erläutert wurden die zytotoxischen Effekte der Analoga überprüft. Die Zellen wurden 5 h mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die LDH-Freisetzung im Medium bestimmt.

Bereits nach 5 h löste AD2646 konzentrationsabhängig deutliche zytotoxische Effekte aus. Die HaCaT/Bcl-2-Zellen waren merklich empfindlicher gegenüber der Behandlung mit AD 2646, da die Werte im Vergleich zur Kontrolle bei allen Konzentrationen etwa um den Faktor zwei höher lagen als bei den HaCaT/pIRES.

Die Substanz AD2673 führte weder in HaCaT/pIRES noch in HaCaT/Bcl-2 signifikante LDH-Freisetzung herbei, obwohl höhere Konzentrationen zum Einsatz kamen als bei den anderen drei Analoga.

AD2665 erwies sich in HaCaT/Bcl-2-Zellen bis 10 μ M als nicht zytotoxisch, wohingegen in HaCaT/pIRES-Zellen bereits bei 7,5 μ M die Werte auf ca. 200 % und bei 10 μ M auf ca. 350 % der Kontrolle anwuchsen.

AD2687 bewirkte in HaCaT/Bcl-2-Zellen bei 5 μ M keine LDH-Erhöhung, bei 7,5 μ M einen geringfügigen Anstieg und bei 10 μ M eine ausgeprägte Steigerung der Werte. Die HaCaT/pIRES-Zellen reagierten auf die Behandlung bereits ab 5 μ M mit einer zunehmenden LDH-Freisetzung mit Werten bis zu 700 % der Kontrolle bei 10 μ M.

Abbildung 3.20. (Seite 113): Zytotoxizität der SM-Analoga. Serumfrei kultivierte HaCaT/Bcl-2 (B, D, F, H) und HaCaT/pIRES (A, C, E, G) wurden entweder mit AD2646 (A, B), AD2673 (C, D), AD2665 (E, F) oder mit AD2687 (G, H) 5 h inkubiert und LDH-Freisetzung bestimmt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

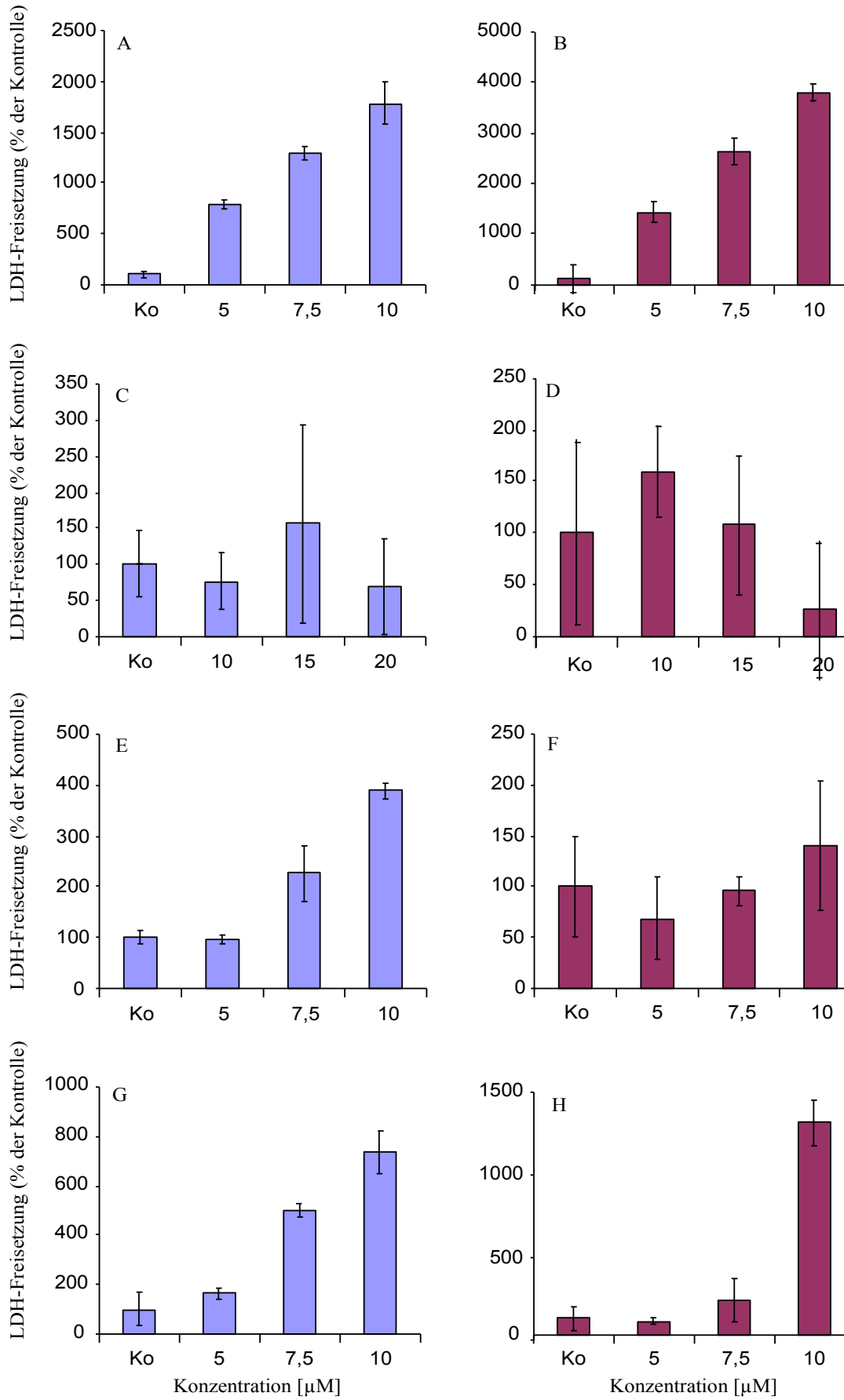


Abbildung 3.20.

3. Ergebnisse

3.11.2. DNA-Fragmentierung

Die Versuche wurden mit dem ELISA-System zur Messung definierter DNA-Bruchstücke, die ein typisches Zeichen der Apoptose repräsentieren, vollzogen (siehe auch 3.5.). Die Apoptose wurde 24 h induziert und die Fragmentierungswerte in Prozent der Kontrolle aufgetragen.

AD2646 induzierte in beiden Linien DNA-Fragmentierung, doch dieser Effekt war begleitet von einer markanten Anhebung der LDH-Aktivität im Medium. In HaCaT/Bcl-2- und HaCaT/pIRES-Zellen erreichten die Werte bereits bei 5 μM Maximalwerte um 400 %. Die Konzentrationssteigerung auf 10 μM resultierte in prägnant niedrigeren Fragmentierungswerten bei den HaCaT/Bcl-2 und weniger deutlich bei den HaCaT/pIRES. Bei gleichzeitig ansteigenden LDH-Werten deutet dies auf einen lytischen Effekt der Substanz.

AD2673 löste bis 20 μM weder in HaCaT/Bcl-2 noch in HaCaT/pIRES DNA-Fragmentierung aus.

AD2665 induzierte bis 10 μM eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fragmentierungswerte in beiden Zelllinien, die in HaCaT/Bcl-2-Zellen bei 10 μM um den Faktor drei höher waren als in HaCaT/pIRES, ohne dass dabei in ersteren zytotoxische Effekte in Erscheinung traten.

AD2687 war der potenteste Apoptoseinduktor dieser vier neuen Substanzen. In HaCaT/Bcl-2-Keratinocyten eskalierten die Werte bis 7,5 μM auf ca. 2500 % der Kontrolle. Darüber hinausgehende Steigerung der Konzentration reduzierte die Fragmentierungswerte aufgrund von lytischen Effekten bereits wieder. HaCaT/pIRES reagierten auf die Behandlung mit 5 μM mit Werten um 500 % der Kontrolle, die sich durch weitere Konzentrationssteigerung nicht anheben ließen, da wiederum lytische Effekte auftraten (Abbildung 3.21.).

Ähnlich den Ergebnissen mit HePC reagierten die Bcl-2-transfizierten Zellen bei allen Analoga scheinbar sensibler als die HaCaT/pIRES-Zellen. Um ihren Effekt auf Eizellebene zu beschreiben, wurden Kernfärbungen mit Bisbenzimid angefertigt (siehe 3.6.). Beispielhaft wurde die Substanz AD2665 ausgewählt, da sie bis 10 μM über die geringste Zytotoxizität bei signifikanter DNA-Fragmentierung verfügt.

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten gezogen und vor Behandlungsbeginn 24 h serumfrei kultiviert. Nach 8 h Behandlungszeit mit 10 μM AD2665 sowie der Kombination aus 10 μM AD2665 und 10 μM des Breitspektrum-Caspasen-Inhibitors z-VAD-fmk (siehe auch 3.10.4), der irreversibel alle Caspases hemmt, wurden die Zellen geerntet und Zytospins angefertigt. Nach Färbung der Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid in PBS wurden unter dem Fluoreszenz-

3. Ergebnisse

mikroskop jeweils mindestens drei Gesichtsfelder ausgezählt und der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen berechnet.

In beiden Zelllinien löste AD2665 DNA-Fragmentierung aus. Die prozentuale Verteilung betrug 24 % für HaCaT7pIRES und 36 % für HaCaT/Bcl-2. Folglich sind in diesem Ansatz die HaCaT/Bcl-2-Zellen gleichfalls stärker betroffen, jedoch nur um den Faktor 1,5. Z-VAD-fmk reduzierte in beiden Linien die DNA-Fragmentierung auf nicht signifikante Werte. Es konnte wie bei HePC keine Bildung von *apoptotic bodies* beobachtet werden (Abbildung 3.22.).

Abbildung 3. 21. (Seite 116): DNA-Fragmentierung der SM-Analoga. Serumfrei kultivierte HaCat/Bcl-2 (B, D, F, H) und HaCaT7pIRES (A, C, E, G) wurden entweder mit AD2646 (A, B), AD2673 (C, D), AD2665 (E, F) oder mit AD2687 (G, H) 24 h inkubiert und DNA-Fragmentierung bestimmt. Die Werte sind gegeben als % der Kontrolle \pm SD (n=4).

3. Ergebnisse

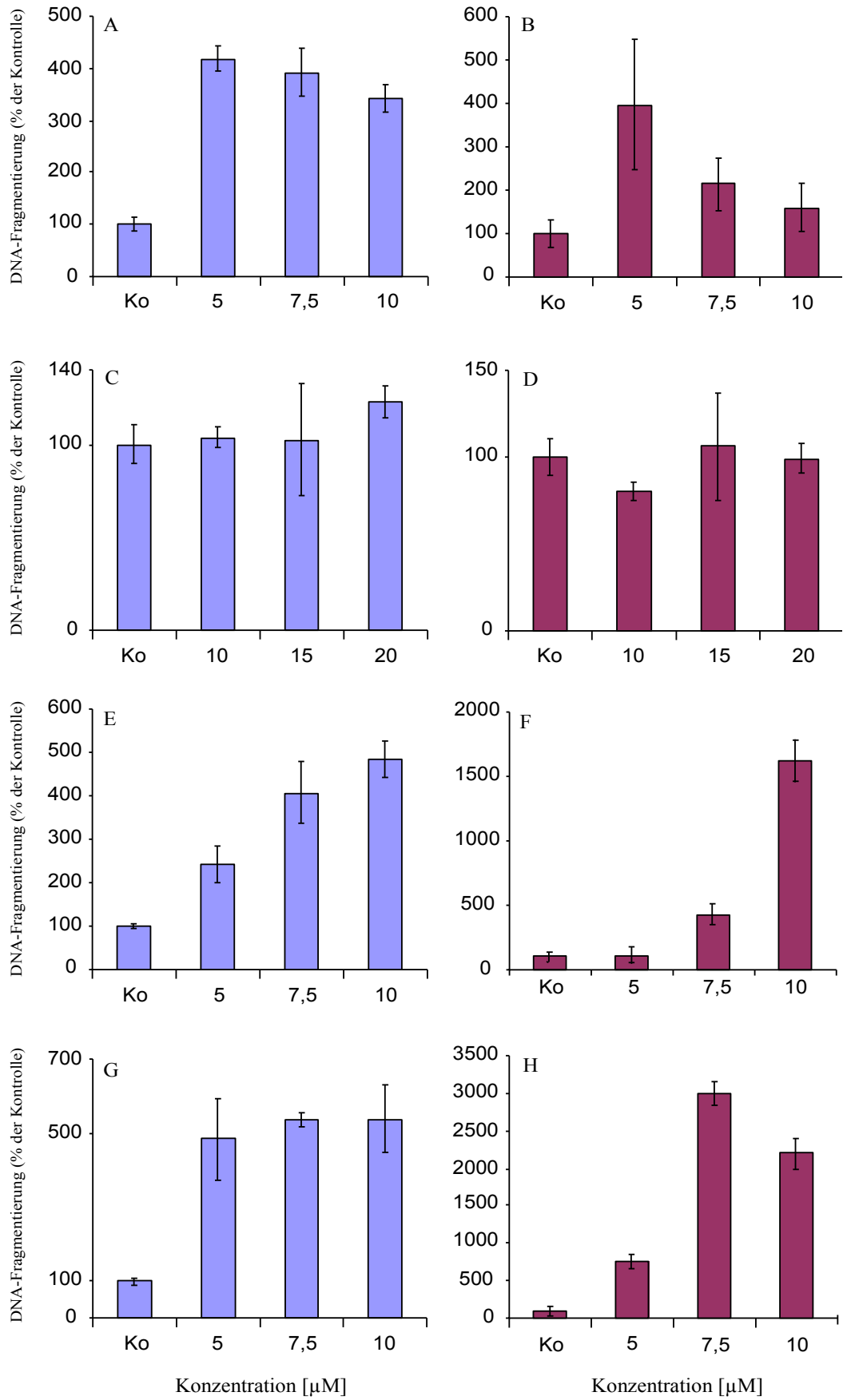


Abbildung 3.21.

3. Ergebnisse

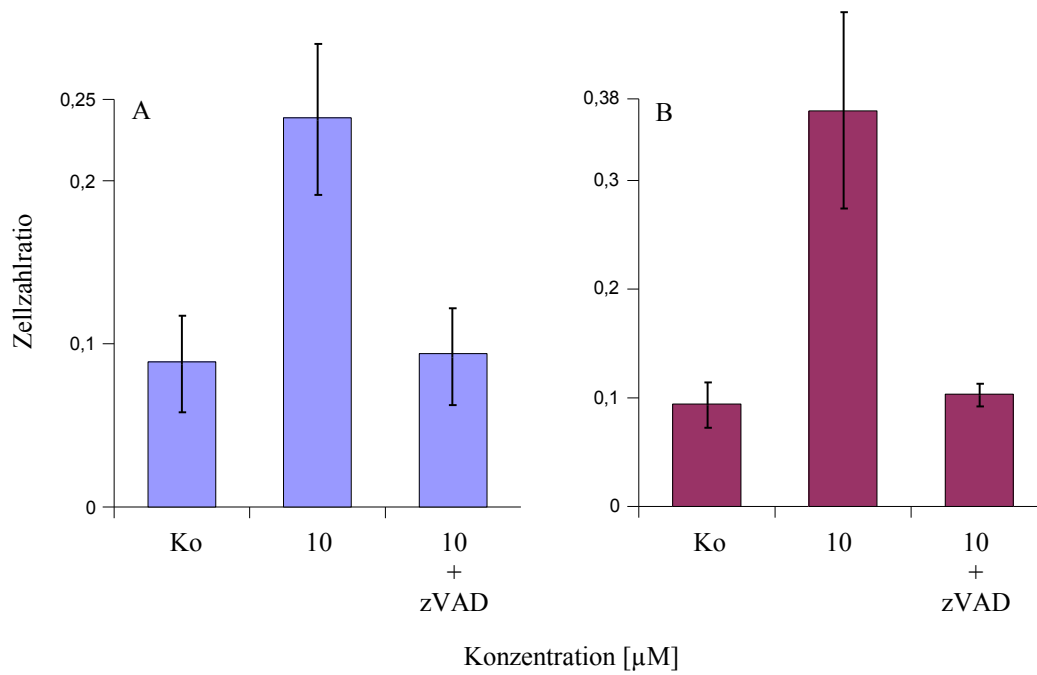


Abbildung 3.22.: Kernfärbung mit Bisbenzimid. HaCaT/pIRES (A) und HaCaT/Bcl-2 (B) wurden 24 h mit 10 μM AD2665 oder zusätzlich mit 10 μM z-VAD-fmk inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden jeweils mindestens 3 Gesichtsfelder ausgezählt und die relative apoptotische Zellzahl angegeben ± SD (n=3).